

**HER2 E CARCINOMAS GÁSTRICOS:
PADRÃO DE EXPRESSÃO E METODOLOGIAS
PARA DETECÇÃO**

JOSÉ IVANILDO NEVES

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza
Begnami**

**São Paulo
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Neves, José Ivanildo

HER2 e carcinomas gástricos: padrão de expressão e metodologias para detecção / José Ivanildo Neves - São Paulo, 2015.
97p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Descritores: 1. NEOPLASIAS GÁSTRICAS. 2. GENES HER2. 3. DETECÇÃO/métodos. 4. IMUNO-HISTOQUÍMICA. 5. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU. 6. TERAPIA DE ALVO MOLECULAR.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, nunca esquecidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram na realização desse trabalho e em especial:

À Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami, pela confiança, dedicação, orientação, paciência e apoio,

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, pela confiança e oportunidade concedida durante todo esse período,

À Pesquisadora científica Cristina Takami Kanamura, pelos primeiros ensinamentos das técnicas imuno-histoquímicas, fundamentais para minha formação e aos Patologistas Dra. Leda Viegas de Carvalho, Dra. Maria Betânia Araujo Mahler, Dr. Victor Eduardo Arrua Arias, e Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami que me estimularam durante suas passagens pelo laboratório de Imuno-histoquímica desta instituição,

A pesquisadora Maisa Yoshimoto e a Dra. Isabela Werneck da Cunha pela contribuição na minha formação em técnicas de hibridização *in situ* fluorescentes,

As biólogas Fátima, Simone e Aurinete pela convivência diária e incentivo,

Aos Patologistas, residentes e funcionários do departamento de Anatomia Patológica pelo incentivo,

Aos amigos em geral e em especial ao Mario Rodrigues Júnior, pelo apoio, paciência e incentivo,

Ao Prof. Dr. José Humberto Tavares Gueirreiro Fregnani pela valiosa contribuição nas análises estatísticas,

A bibliotecária Suely, pela formatação dessa dissertação,

Ao Severino, Carlinhos, Rômulo e Suely pela contribuição nos cortes das lâminas e apoio,

À Ana Maria Kuninari, Vanuza e Luciana pela prestatividade,

Aos pesquisadores, alunos e funcionários do CIPE em especial a Gilmara pelo apoio,

A minha família sempre presente,

A instituição A.C.Camargo Cancer Center pela oportunidade de desenvolvimento profissional e aprendizado durante todos esses anos,

E a todos os professores e Mestres que cruzaram pelo meu caminho capacitando e incentivando-me na contínua busca do conhecimento.

RESUMO

Neves JI. **HER2 e carcinomas gástricos: padrão de expressão e metodologias para detecção**. São Paulo, 2015 [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma gástrico (CG) representa um sério problema de saúde, sendo a segunda causa de morte relacionada ao câncer no mundo. No Brasil, é o quarto tipo de câncer mais comum entre os homens e o quinto mais comum entre as mulheres. O gene *HER2* é um proto-oncogene localizado no cromossomo 17, codifica uma proteína transmembrana que pertence a família dos receptores HER e possui atividade tirosina quinase envolvida em vias de sinalizações relacionadas ao crescimento celular e diferenciação. Alterações no gene *HER2* têm sido associadas com o desenvolvimento e progressões de várias neoplasias humanas. Em câncer de mama, a amplificação do *HER2* é observada em cerca de 20% dos casos e o tratamento desses casos com o trastuzumabe, um anticorpo monoclonal, tem sido bastante efetivo. Em CG, a amplificação do *HER2* tem sido observada em uma frequência de 7% a 34% dos casos. Esta variabilidade é associada as diferentes metodologias utilizadas para a avaliação da expressão e/ou amplificação do *HER2*. Os resultados do estudo clínico ToGA mostraram um aumento considerável nas taxas de sobrevivência dos pacientes com CG avançados tratados com trastuzumabe e quimioterapia comparado aqueles que foram tratados somente com quimioterapia. A correta identificação e seleção dos casos que irão se beneficiar desta terapia é o primeiro e mais importante passo para o sucesso do tratamento. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão proteica e o número de cópias do gene *HER2* em 762 CG de pacientes submetidos a ressecção cirúrgica no A.C. Camargo Câncer Center (São Paulo, Brasil) usando os métodos de Imuno-histoquímica, hibridização in situ (DDISH e FISH) comparando: diferentes clones e fabricantes de anticorpos primários anti-HER2 (clone 4B5-Ventana, clone SP3-Neomarkers, herceptest-DAKO); cortes histológicos convencionais e cortes histológicos em TMA; expressão no tumor primário e em metástases do mesmo paciente; diferentes escores de interpretação da expressão do *HER2* (mama x gástrico) e os resultados do número de cópias obtidos através das análises de FISH e DDISH. De acordo com nossos resultados, podemos concluir que o anticorpo Herceptest foi o mais sensível, entretanto não houve diferença entre os

anticorpos em relação à especificidade. O melhor material para avaliar a expressão e/ou amplificação do *HER2* em CG foi o que representa maior área do tumor. O teste DDISH foi melhor que o FISH na identificação de casos amplificados com áreas heterogêneas, e a análise da expressão ou amplificação do *HER2* pode ser realizada tanto no tumor primário como em suas respectivas metástases. O escore de interpretação de *HER2* para CG proposto por Hoffmann é o mais apropriado.

SUMMARY

NevesJI. **[HER2 and gastric carcinomas: expression pattern and methodologies for detection]**. São Paulo, 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Gastric carcinoma (GC) is a serious health problem and is the second leading cause of cancer-related death in the world. In Brazil, it is the fourth most common cancer among men and the fifth most common among women. The HER2 gene is a proto-oncogene located on chromosome 17, encodes a transmembrane protein which belongs to the HER family of receptors and has tyrosine kinase activity involved in signaling pathways related to cell growth and differentiation. Alterations in HER2 gene have been associated with the development and progression of many human cancers. In breast cancer, amplification of HER2 is observed in approximately 20% of cases, and these treatment of these cases with trastuzumab, a monoclonal antibody, has been quite effective. In GC, the amplification of *HER2* has been observed at a frequency of 7% to 34% of cases. This variability is associated with the different methodologies used to evaluate the expression and / or amplification of *HER2*. The results of the clinical study ToGA showed a considerable increase in patient survival rates with advanced CG treated with trastuzumab and chemotherapy compared those treated with chemotherapy alone. The correct identification and selection of the cases that will benefit from this therapy is the first and most important step to successful treatment. The aim of this study was to evaluate the protein expression and the number of copies of the *HER2* gene in 762 GC patients undergoing surgical resection at AC Camargo Cancer Center (São Paulo, Brazil) using the methods of immunohistochemistry and in situ hybridization (FISH and DDISH) compared: different clones and manufacturers of anti-HER2 primary antibodies (4B5-Ventana clone, SP3-Neomarkers, HercepTest-DAKO); conventional histological sections and histological sections in TMA; expression in the primary tumor and metastases of the same patient; different scores for the interpretation of HER2 expression (breast x gastric) and the results of the copy number obtained through the analysis of FISH and DDISH. According to our results, we conclude that the Herceptest antibody was the most sensitive, however there was no difference between the antibodies related to specificity. The best material to

evaluate the expression and/or amplification of *HER2* was CG which is larger area of the tumor. The DDISH test was better than FISH in identifying amplified cases with heterogeneous areas, and the analysis of the expression or amplification of *HER2* can be performed either in the primary tumor and in their metastases. The *HER2* interpretation score for CG proposed by Hoffmann is the most appropriate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Carcinomas gástricos corados com diferentes anticorpos anti-HER2 por imuno-histoquímica.....	33
Figura 2	Corte convencional de carcinoma gástrico corado com 4B5 por imuno-histoquímica, mostrando áreas de marcação heterogênea.....	39
Figura 3	Carcinoma gástrico representado em cilindro de TMA (aumento 5x) com resultados discordantes entre os 3 anticorpos utilizados.....	43
Figura 4	Corte convencional de carcinoma gástrico corado com 4B5 por imuno-histoquímica.....	46
Figura 5	Carcinoma gástrico corado com 4B5 por imuno-histoquímica.	47
Figura 6	Carcinoma gástrico em corte de cilindro em TMA.....	49
Figura 7	Carcinoma gástrico em corte de cilindro de TMA.....	50
Figura 8	Cortes convencionais de carcinoma gástrico.....	53
Figura 9	Curvas ROC das análises imuno-histoquímicas realizadas por SP3, 4B5 e Herceptest.....	58
Figura 10	Cortes convencionais de carcinoma gástrico com resultados concordantes para HER2 em tumor primário e metástase em linfonodo.....	60
Figura 11	Cortes convencionais de carcinoma gástrico com resultados concordantes em tumor primário e metástase à distância.....	62

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Anticorpos primários utilizados nas reações imuno-histoquímicas, clones, fabricantes, diluições e métodos de recuperação antigênica.....	22
Quadro 2	Escore de interpretação da imuno-histoquímica do HER2 de acordo com as diretrizes propostas por Hofmann.....	23
Quadro 3	Escore de interpretação da imuno-histoquímica do HER2 de acordo com as diretrizes do Herceptest para carcinomas mamários invasores.....	24
Quadro 4	Valor de <i>Kappa</i>	29
Tabela 1	Características clinico-patológicas dos 620 carcinomas gástricos estudados.....	21
Tabela 2	Comparação das diferenças entre os escores para HER-2 utilizando-se os protocolos de interpretação recomendados para Câncer Gástrico e Câncer de Mama.....	25
Tabela 3	Resultados das reações imuno-histoquímicas para pesquisa da expressão de <i>HER2</i> nos carcinomas gástricos distribuídos em escores com número total e porcentagem de casos de acordo com os anticorpos utilizados.....	32
Tabela 4	Correlação entre os casos de carcinomas gástricos corados com os anticorpos SP3 e 4B5 por imuno-histoquímica e os escores de interpretação.....	34

Tabela 5	Número de casos de carcinomas gástricos com resultados concordantes e discordantes de acordo com os escores de interpretação com o uso dos anticorpos SP3 e 4B5 por imuno-histoquímica.....	35
Tabela 6	Correlação entre os casos de carcinomas gástricos corados com os anticorpos SP3 e Herceptest por imuno-histoquímica e os escores de interpretação.....	36
Tabela 7	Número de casos de carcinomas gástricos com resultados concordantes e discordantes de acordo com os escores de interpretação com o uso dos anticorpos SP3 e Herceptest.....	36
Tabela 8	Correlação entre os casos corados com os anticorpos 4B5 e Herceptest e os escores de interpretação.....	37
Tabela 9	Número de casos de carcinomas gástricos com resultados concordantes e discordantes de acordo com os escores de interpretação com o uso dos anticorpos 4B5 e Herceptest.....	38
Tabela 10	Correlação entre os casos de carcinomas gástricos corados por imuno-histoquímica com o anticorpo 4B5 em cortes convencionais e em TMAs.....	40
Tabela 11	Número de casos de carcinomas gástricos com resultados concordantes e discordantes de acordo com os escores de interpretação com o uso dos anticorpos 4B5 por imuno-histoquímica em cortes inteiros e em cortes de TMA.....	41
Tabela 12	Valores de <i>Kappa</i> ponderado e respectivos intervalos de confiança de 95% de acordo com a expressão dos 3 marcadores imuno-histoquímicos em cortes convencionais e em cortes de TMA.....	42

Tabela 13	Correlação entre os resultados de imuno-histoquímica com o anticorpo 4B5 nas lâminas de cortes convencionais e lâminas de TMA em relação à presença de heterogeneidade nos carcinomas gástricos.....	45
Tabela 14	Comparação entre os escores obtidos por imuno-histoquímica com SP3, 4B5 e Herceptest e os resultados de HER2 obtidos pelo DDISH nos carcinomas gástricos.....	50
Tabela 15	Número de cópias do gene HER2 obtidos pelo DDISH nos carcinomas gástricos representados em TMA e em cortes histológicos convencionais.....	51
Tabela 16	Valores de <i>Kappa</i> e respectivos intervalos de confiança de 95% de acordo com o número de cópias do gene HER2 (não amplificado VS. Amplificado) nos carcinomas gástricos.....	53
Tabela 17	Resultados das reações imuno-histoquímicas para <i>HER2</i> com o anticorpo 4B5 em carcinomas gástricos primários e suas respectivas metástases linfonodais.....	55
Tabela 18	Resultados das reações imuno-histoquímicas com o anticorpo 4B5 em tumores gástricos primários e suas respectivas metástases à distância.....	55
Tabela 19	Resultados de Hibridização <i>in situ</i> de <i>HER2</i> obtidos pela técnica de DDISH em tumores gástricos primários e suas respectivas metástases linfonodais.....	56
Tabela 20	Resultados obtidos pela técnica de DDISH para <i>HER2</i> em tumores gástricos primários e suas respectivas metástases à distância.....	57

Tabela 21	Resultados de imuno-histoquímica de <i>HER2</i> obtidos em cortes de carcinomas gástricos em TMAs com o anticorpo Herceptest utilizando dois sistemas diferentes de avaliação de escores.....	59
Tabela 22	Número de carcinomas gástricos com resultados concordantes e discordantes de acordo com os sistemas de escores de interpretação de imuno-histoquímica de <i>HER2</i>	61
Tabela 23	Indicadores de acurácia das análises imuno-histoquímicas realizadas por SP3, 4B5 e Herceptest, considerando os pontos de corte obtidos pela curva ROC (padrão-ouro: DDISH positivo).....	63
Tabela 24	Indicadores de acurácia das análises imuno-histoquímicas de <i>HER2</i> realizadas com SP3, 4B5 e Herceptest, considerando ponto de corte arbitrário estabelecido em “1+” (padrão-ouro: DDISH positivo).....	64
Tabela 25	Indicadores de acurácia das análises imuno-histoquímicas de <i>HER2</i> realizadas com SP3, 4B5 e Herceptest, considerando ponto de corte arbitrário estabelecido em “2+” (padrão-ouro: DDISH positivo).....	66
Tabela 26	Indicadores de acurácia das análises imuno-histoquímicas de <i>HER2</i> realizadas com SP3, 4B5 e Herceptest, considerando ponto de corte arbitrário estabelecido em “3+” (padrão-ouro: DDISH positivo).....	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BCSS	Breast Cancer Scoring System
CAP	College of American Pathologists
CC1	Cell Conditioning Solution
CISH	Chromogenic <i>in situ</i> hybridization
DDISH	dual-color dual hapten brightfield <i>in situ</i> hybridization
DNA	deoxyribonucleic acid
ECF	Epirubicin, Cisplatin, Fluorouracil
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization
GCSS	Gastric Cancer Scoring System
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HE	hematoxilina-eosina
HER	Human epidermal growth receptor
HER1 (ErbB1 ou EGFR)	Human epidermal growth factor receptor 1
HER2 (ErbB2, c-erbB2)	Human epidermal growth factor receptor 2
HER3 (ErbB3)	Human epidermal growth factor receptor 3
HER4 (ErbB4)	Human epidermal growth factor receptor4
HNPCC	Câncer de Cólon Hereditário Não-Polipose
IC95%	intervalo de confiança de 95%
IHC	Immunohistochemistry
ISH	<i>in situ</i> Hybridization
JGE	Junção gastro-esofágica
k	Kappa
kDa	Kilodaltons
MAGIC	Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy
mm	milímetro
mRNA	messenger ribonucleic acid
p	valor de p
RNA	ribonucleic acid
ROC	Receiver Operating Characteristic

SISH	Silver-enhanced <i>in situ</i> hybridization
TMA	Tissue microarray
ToGA	Trastuzumab for Gastric Cancer
tRNA	transfer ribonucleic acid
vs	versus

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Câncer gástrico.....	1
1.1.1	Fatores de risco, diagnóstico, prognóstico e tratamento	1
1.1.2	HER2 (Human epidermal growth factor receptor-2)	6
1.1.3	Métodos de avaliação do número de cópias do HER2 e expressão proteica.....	10
2	JUSTIFICATIVA	17
3	OBJETIVOS	18
4	MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1	Casuística.....	19
4.2	Construção dos <i>Tissue Microarrays</i> (TMAs).....	21
4.3	Imuno-histoquímica	21
4.4	Hibridização <i>in situ</i>	25
4.4.1	Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência: FISH.....	25
4.4.2	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica: Dual ISH (DDISH)	26
4.5	Fluxograma da casuística.....	28
5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	29
6	RESULTADOS	30
6.1	Resultados das reações imuno-histoquímicas para expressão de <i>HER2</i> nos carcinomas gástricos realizadas nos cortes de TMA utilizando anticorpos comercialmente disponíveis com diferentes clones	30

6.1.1	Resultados comparativos das expressões imuno-histoquímicas de <i>HER2</i> nos carcinomas gástricos utilizando os anticorpos SP3 e 4B5	33
6.1.2	Resultados comparativos das expressões imuno-histoquímicas de <i>HER2</i> nos carcinomas gástricos utilizando os anticorpos SP3 e Herceptest	35
6.1.3	Resultados comparativos das expressões imuno-histoquímicas de <i>HER2</i> nos carcinomas gástricos utilizando os anticorpos 4B5 e Herceptest	37
6.2	Resultados comparativos das expressões imuno-histoquímicas e <i>HER2</i> utilizando o anticorpo 4B5 nos cortes de carcinomas gástricos disposto em TMAs e em cortes convencionais.....	38
6.3	Concordância das expressões dos marcadores imuno-histoquímicos.....	41
6.4	Resultados comparativos das expressões imuno-histoquímicas de <i>HER2</i> nos carcinomas gástricos nos cortes de TMA e nos cortes convencionais em relação à presença de heterogeneidade intratumoral.....	44
6.5	Resultados do número de cópias do gene <i>HER2</i> por testes de hibridizações <i>in situ</i>	48
6.5.1	Resultados comparativos entre os escores obtidos por imuno-histoquímica com os anticorpos SP3, 4B5 e HercepTest e o número de cópias do gene <i>HER2</i> pelo DDISH em cortes de TMA.....	48
6.5.2	Número de cópias do gene <i>HER2</i> obtidos pelo DDISH nos carcinomas gástricos representados em TMA e em cortes histológicos convencionais.....	51
6.5.3	Número de cópias do gene <i>HER2</i> obtidos por FISH nos carcinomas gástricos em cortes histológicos convencionais	52
6.6	Taxa de concordância entre o número de cópias do gene <i>HER2</i> obtidos por DDISH e por FISH	52
6.7	Resultados dos indicadores de acurácia dos métodos Imuno-histoquímicos comparados ao DDISH.....	54

6.8	Resultados das reações Imuno-histoquímicas da expressão de <i>HER2</i> com o anticorpo 4B5 em amostras de carcinomas gástricos primários e em suas respectivas metástases.....	58
6.8.1	Comparação entre os resultados das reações Imuno-histoquímicas para <i>HER2</i> nos carcinomas gástricos primários e respectivas metástases Linfonodais.....	58
6.8.2	Resultados das reações Imuno-histoquímicas para <i>HER2</i> nos carcinomas gástricos primários e respectivas metástases à distância	60
6.9	Resultados da hibridização <i>in situ</i> de <i>HER2</i> por DDISH nos tumores gástricos primários e suas respectivas metástases.....	63
6.9.1	Resultados das hibridizações <i>in situ</i> de <i>HER2</i> por DDISH nos tumores gástricos primários e respectivas metástases linfonodais	63
6.9.2	Resultados das hibridizações <i>in situ</i> de <i>HER2</i> por DDISH nos tumores gástricos primários e respectivas metástases à distância	64
6.10	Comparação dos resultados de <i>HER2</i> obtidos por Imuno-histoquímica com HercepTest em cortes de TMA de carcinomas gástricos utilizando-se 2 sistemas de interpretação	65
7	DISCUSSÃO	68
8	CONCLUSÃO	85
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Protocolo de Construção de TMA

Anexo 3 Protocolo de Imuno-histoquímica automatizada

Anexo 4 Protocolo do Herceptest

Anexo 5 Protocolo de Hibridização *in situ* (FISH)

Anexo 6 Protocolo de Hibridização *in situ* (DDISH)

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER GÁSTRICO

1.1.1 Fatores de risco, diagnóstico, prognóstico e tratamento

A última estimativa mundial, segundo a *Internacional Agency for Reserach on Cancer-IARC* (2012) apontou a ocorrência de aproximadamente 1 milhão de casos novos de câncer de estômago para o ano de 2012, configurando-se como a quarta causa mais comum de câncer em homens (631 mil casos novos) e quinta em mulheres (320 mil casos novos). Mais de 70% destes casos acometem a população dos países em desenvolvimento. A taxa de incidência é cerca de duas vezes mais alta no sexo masculino do que no feminino (Ministério da Saúde 2014) sendo a segunda causa de morte por câncer no mundo (DANIEL et al. 2005).

No Brasil, é o quarto tipo de câncer mais comum entre os homens, sendo estimados, para 2014, 12.870 novos casos e o quinto mais comum entre as mulheres, com estimativa de 7.520 novos casos. Estes valores correspondem a um risco estimado de 13,19 casos novos a cada 100 mil homens e 7,41 para cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2014).

A infecção pelo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e os fatores associados aos hábitos alimentares são as principais causas associadas à etiologia do câncer gástrico (CREW e NEUGUT 2006). Países com altas taxas de incidência de câncer gástrico apresentam altos índices de infecção pelo *H.*

pylori e o declínio da incidência destas neoplasias observada nos países desenvolvidos está diretamente associado à queda da incidência do *H. pylori* (PARSONNET 1995). A infecção pelo *H. pylori*, estimada atualmente em três a quatro bilhões de pessoas no mundo, é a causa mais comum de gastrite ativa crônica. Os resultados de várias meta-análises concluíram que a infecção pelo *H. pylori* está associada ao aumento de duas vezes no risco de desenvolvimento do câncer gástrico (ESLICK 2006). No modelo de carcinogênese gástrica proposto por CORREA (1996), a infecção pelo *H. pylori* dá início a uma sequência progressiva de lesões na mucosa gástrica que se inicia na mucosa normal, seguida de gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia, e finalmente carcinoma (CORREA 1996). Neste modelo, a infecção pelo *H. pylori* durante a infância é um fator que irá distinguir populações de alto e baixo risco para o desenvolvimento do câncer gástrico. Vários autores têm demonstrado o papel da infecção pelo *H. Pylori* na gastrite crônica como um fator de aumento de risco para o câncer gástrico (PARSONNETT et al. 1991; TALLEY et al. 1991). A identificação do *H. pylori* como fator de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico tem estimulado várias pesquisas sobre o mecanismo pelo qual o *H. pylori* induz esta carcinogênese. A combinação da virulência bacteriana, permissividade ambiental e a susceptibilidade genética do hospedeiro são considerados os principais fatores para o desenvolvimento do câncer gástrico a partir da infecção pelo *H. pylori*. O *H. pylori* tem sido apontado como o ativador de uma cascata de eventos que promovem a progressão sequencial do epitélio gástrico normal através de gastrites

atróficas, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma (HOFMAN et al. 2004; KIM et al. 2011b).

Além da infecção pelo *H. pylori*, associações com fatores ambientais e dietéticos como o consumo de alimentos ricos em sal, defumados ou crus, a exposição da mucosa gástrica a nitrosaminas, e o baixo consumo de frutas frescas e vegetais aumentam o risco de câncer gástrico (LEE et al. 2003).

Apesar de ser a segunda causa de morte por câncer no mundo em ambos os sexos, as taxas de incidência apresentam quedas substanciais na maioria dos países. Esse declínio está relacionado a diversos fatores ambientais e alimentares como o uso de refrigeradores para melhor conservação alimentar, permitindo maior disponibilidade e consumo de alimentos frescos, como frutas e hortaliças (legumes e verduras), reduzindo assim a necessidade do uso de sal, particularmente para os alimentos conservados no sal. (BERTUCCIO et al. 2009). Outro determinante para a diminuição das taxas de incidência é a redução da prevalência de infecção pela bactéria *H. pylori*, além das melhorias no saneamento básico e mudanças no estilo de vida da população (CHEN et al. 2007; TKACHENKO et al. 2007).

Estudos prospectivos têm demonstrado uma significativa relação entre o hábito de fumar e o câncer gástrico com um risco relativo 3 x maior de fumantes em desenvolver câncer gástrico (KOIZUMI et al. 2004). A obesidade também tem sido considerada como fator de risco para o desenvolvimento dos carcinomas gástricos principalmente os localizados na região cárdica. O refluxo gastro-esofágico associado à obesidade está

associado ao desenvolvimento do esôfago de Barrett, lesão precursora dos adenocarcinomas de esôfago e da junção gastro-esofágica (JGE) (ISHAQ e JANKOWSKI 2001). Outros fatores menos comuns relacionados à epidemiologia do câncer gástrico incluem radiação, anemia perniciosa, tipo sanguíneo A, cirurgias gástricas prévias e infecção pelo vírus do Epstein Barr (KORIYAMA et al. 2004).

A história familiar positiva para câncer gástrico também é um fator de risco importante, principalmente associada a síndromes genéticas como nos casos de Câncer de Cólon Hereditário Não-Polipose (HNPCC) e Síndrome de Li-Fraumeni (LA VECCHIA et al. 1992).

Aproximadamente 95% dos tumores gástricos são classificados histologicamente como adenocarcinomas. Diversas classificações histológicas para os carcinomas gástricos têm sido propostas, sendo a classificação de Lauren a mais utilizada (LAUREN 1965). Nesta classificação, os carcinomas gástricos são subdivididos em dois principais tipos: 1) glandulares ou tipo intestinal e 2) pouco diferenciados ou tipo difuso. O tipo intestinal está associado à gastrite atrófica e metaplasia intestinal, enquanto que o tipo difuso usualmente tem origem em pangastrites não atróficas. Esta classificação foi modificada e um terceiro tipo, misto ou inclassificável foi adicionado.

Pacientes com câncer gástrico avançado (estádio IV) apresentam prognóstico sombrio, com taxas de sobrevida média global de 10 meses e em 5 anos em torno de 11%, mesmo após tratamento cirúrgico e quimioterápico (DIMITRIOS 2010).

O tratamento dos carcinomas gástricos é eminentemente cirúrgico, sendo o tipo de cirurgia realizada relevante para a sobrevida (CHO et al. 2007). A ressecção cirúrgica completa do tumor representa a maior chance de cura, mas aproximadamente 80% dos pacientes com margens cirúrgicas adequadas terão recorrência tumoral com morte associada. Muitos casos de câncer gástrico continuam sendo diagnosticados em estádios clínicos avançados, estando estes associados a frequentes recorrências após a ressecção cirúrgica. Nos últimos anos, com o objetivo de melhorar o prognóstico destes pacientes, esquemas de tratamentos quimioterápicos ou radioterápicos pré, peri ou pós cirúrgicos tem sido propostos. O uso da quimioterapia pós-cirúrgica (ou adjuvante) tem mostrado aumento significativo nas taxas de sobrevida dos pacientes após a ressecção cirúrgica nos países da Ásia (SAKURAMOTO et al. 2007; SASAKO et al. 2010). O tratamento radio-quimioterápico adjuvante tem sido utilizado na América do Norte (WILKE et al. 1989; D'UGO et al. 2009) e a quimioterapia peri-operatória, ou seja, durante o procedimento cirúrgico, tem sido considerada como um dos tratamentos de escolha na Europa (CUNNINGHAM et al. 2006; CHO et al. 2012). Os resultados do estudo clínico *Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy* (MAGIC), demonstraram um aumento significativo nas taxas de sobrevida global e livre de doença no grupo de pacientes que recebeu tratamento quimioterápico peri-operatório com epirubicin, cisplatina e fluorouracil (ECF), em relação ao grupo que realizou somente a cirurgia. Algumas limitações desse estudo é que somente 42% dos pacientes do grupo tratado com

quimioterapia pré-operatória completaram todos os protocolos do tratamento e 34% dos pacientes que completaram o tratamento em ambos os grupos não fizeram a quimioterapia pós operatória devido à progressão precoce da doença, a pedido dos pacientes ou por complicações pós-operatórias (CUNNINGHAM et al. 2006).

Contudo, mais estudos ainda são necessários para determinar o impacto do uso das terapias adjuvantes, neoadjuvantes ou peri-operatórias no prognóstico dos pacientes com câncer do estômago.

As respostas clínicas aos tratamentos complementares ao cirúrgico dependem da seleção adequada das terapias a serem utilizadas bem como da identificação dos pacientes que mais se beneficiarão com o uso destas terapias. Alguns parâmetros histológicos como a localização do tumor e o subtipo histológico têm sido usados na seleção destes pacientes, mas outros parâmetros são necessários para a determinação do uso diferenciado e individualizado dos tratamentos neoadjuvantes e adjuvantes no tratamento do câncer gástrico (SCHULMACHER et al. 2013).

1.1.2 HER2 (Human epidermal growth factor receptor-2)

A carcinogênese gástrica é um processo multifatorial e de múltiplos passos, durante os quais diversas alterações genéticas e epigenéticas estão envolvidas. Estas alterações envolvem principalmente os oncogenes, genes supressores de tumores, genes de reparo de DNA, reguladores do ciclo celular e moléculas de sinalização. O número de alterações genéticas identificadas nos carcinomas gástricos está expandindo rapidamente (WU et

al. 2010; YAMASHITA et al. 2011). Uma das principais vias moleculares associadas ao desenvolvimento e progressão dos carcinomas gástricos são as vias dos fatores de crescimento epidérmico e seus receptores (YASUI et al. 2005).

A família do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER) consiste de quatro membros: ErbB1 (HER1) ou receptor do fator de crescimento epidérmico [EGFR]; ErbB2 (HER2, c-erbB2 ou *Her2/neu*); ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). Todos apresentam uma estrutura comum, com domínio de ligação extracelular, região transmembrana e um domínio intracelular com função tirosina quinase e uma região carboxi-terminal (OLAYIONE et al. 2000).

O gene *HER2* é um proto-oncogene localizado no cromossomo 17. Este gene codifica uma proteína de receptor transmembrana com função de tirosina quinase de 185kDa. Para sua ativação forma homo e heterodímeros com os outros membros da família HER, estimulando a sinalização de vias da proliferação celular, diferenciação, sobrevivência celular e angiogênese (ROSS et al. 2009).

Alterações do gene *HER2* têm sido associadas ao desenvolvimento e progressão de várias neoplasias humanas (HETZEL et al. 1992; HIRASHIMA et al. 2001; HYNES e LANE 2005). Nos carcinomas de mama, a amplificação de *HER2* é encontrada em cerca de 20% dos casos e o tratamento destes casos com Trastuzumabe, um anticorpo monoclonal, tem sido bastante efetivo (KAPTAIN et al. 2001; TRIPATH et al. 2004). Embora, o tratamento com Trastuzumabe seja aprovado pelo *Food and Drug*

Administration (FDA) somente para o tratamento do câncer de mama e estômago, há vários estudos que mostram resposta clínica satisfatória dos pacientes com tumores de outras localizações (glioblastomas, câncer de endométrio e ovário) que também mostraram amplificação e/ou superexpressão de *HER2*. (FREDERICK et al. 2000; JEWELL et al. 2006). Nos carcinomas gástricos, a amplificação de *HER2* tem sido encontrada numa frequência variável de 7 a 34% dos casos (TAKEHANA et al. 2002; HOFMANN et al. 2008). Esta variabilidade é decorrente principalmente das diferentes metodologias utilizadas para a pesquisa da expressão e/ou amplificação do *HER2* (ALLGAYER et al. 2000; TAKEHANA et al. 2002; GARCIA et al. 2003). A superexpressão de *HER2* nos carcinomas gástricos, semelhante ao observado nos carcinomas da mama, tem sido associada à pior sobrevida dos pacientes (ALLGAYER et al. 2000; SHINOHARA et al. 2002; BEGNAMI et al. 2011). Baseados nestes achados, a associação do tratamento quimioterápico (capecitabine ou 5-fluorouracil e cisplatin) e Trastuzumabe tem sido apontada como uma terapia alternativa para os pacientes com câncer gástrico avançado. Dados do estudo clínico *Trastuzumab for Gastric Cancer* (ToGA), (BANG et al. 2010) protocolo BO18255, demonstraram que pacientes com carcinomas gástricos com amplificação de *HER2* e que fizeram uso deste esquema terapêutico apresentaram significativa redução do tamanho tumoral, diminuição das metástases abdominais e maiores taxas de sobrevida global e livre de doença (BILOUS et al. 2010). O ToGA é um estudo clínico de fase III, multicêntrico, envolvendo 24 centros de vários países, que avaliou o uso do

Trastuzumabe em associação à quimioterapia de primeira linha em pacientes com carcinomas gástricos ou de junção gastro-esofágica (JGE) avançados com superexpressão de *HER2*. As 3665 amostras de carcinomas gástricos ou de JGE foram testadas para pesquisa de *HER2* utilizando reações de imuno-histoquímica e hibridização *in situ* fluorescente (FISH). A positividade para *HER2* nos carcinomas gástricos definida pelo ToGA foi a expressão imuno-histoquímica classificada como 3+ e/ou amplificação pelo FISH+ (razão *HER2*/cromossomo 17 > 2,0). Com base nesses achados, algumas agências de Saúde como a Agência de Medicina Européia (EMA) recomenda que todos os pacientes com câncer gástrico sejam testados para *HER2* no início do diagnóstico. De acordo com licença da EMA, pacientes com carcinoma gástrico metastático *HER2* positivo, ou seja, aqueles com imuno-histoquímica 3+ ou imuno-histoquímica 2+ com FISH+ ou Silver-enhanced *in situ* hybridization (SISH) positivo, são elegíveis para terapia com Trastuzumabe (Herceptin EU SmPC 2010).

O tratamento com anticorpo monoclonal como o Trastuzumabe não deve ser usado de forma abrangente, uma vez que pode apresentar efeitos colaterais indesejáveis além do custo financeiro elevado, portanto a pré-seleção dos pacientes que realmente terão algum benefício com o uso desta terapêutica deve ser criteriosa.

1.1.3 Métodos de avaliação para detecção de *HER2*

A Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica (IHC) é utilizada para localização de antígenos em cortes de tecidos congelados ou fixados em formalina e emblocados em parafina através do uso de anticorpos específicos. Esta interação Antígeno/Anticorpo pode ser visualizada pela marcação de corantes fluorescentes, enzimas, elementos radioativos entre outros.

Nas últimas décadas, melhorias na técnica de imuno-histoquímica, tais como desenvolvimento de sistemas de detecção mais sensíveis e métodos de recuperação antigênica mais eficaz, permitiram que esse método fosse amplamente utilizado. As principais indicações do uso da imuno-histoquímica são: no diagnóstico diferencial de neoplasias malignas, na caracterização do sítio primário de metástases, na imunofenotipagem de linfomas, na determinação de fatores prognósticos e preditivos de neoplasias malignas e nas pesquisas de agentes infecciosos (RABENHORST e BACCHI 1995; VASSALLO et al. 2004; NEVES 2005).

Dentre as vantagens do uso da técnica de imuno-histoquímica, destacam-se a facilidade, rapidez e baixo custo, viabilizando a realização desta técnica na maioria dos laboratórios de patologia. Além destes aspectos técnicos, a técnica de imuno-histoquímica apresenta uma excelente preservação morfológica do tecido e permite o armazenamento das lâminas por períodos longos possibilitando reavaliações futuras. As desvantagens desta técnica relacionam-se à variação nos protocolos utilizados em diferentes laboratórios, falta de padronização nas fases pré-

analíticas e pós analíticas e a métodos de interpretação de resultados subjetivos.

B Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* (ISH) é uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) a partir de sondas específicas. As sondas são sequências de nucleotídeos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do DNA ou RNA que se deseja identificar.

Para visualização do complexo envolvendo as moléculas de DNA ou RNA em estudo, as sondas podem ser associadas a moléculas: radioativas; fluorescentes (FISH); enzimas biotinizadas (CISH) ou com precipitação pela prata (SISH).

C FISH (Fluorescence in situ hybridization)

É a técnica de citogenética molecular mais comumente utilizada. Emprega sondas de ácidos nucléicos marcadas com substâncias fluorescentes para detectar anomalias cromossômicas, como microdeleções, ampliações e rearranjos cromossômicos complexos.

As vantagens desta técnica estão relacionadas à rapidez, alta eficácia de detecção, sensibilidade e especificidades elevadas, além da menor suscetibilidade a fatores pré e pós-analíticos em comparação à Imuno-histoquímica.

O escore de interpretação é mais quantitativo do que os métodos de avaliação usados na imuno-histoquímica, e identifica tumores com amplificação de acordo com o número de cópias do gene.

Algumas desvantagens desta técnica referem-se à restrição de sondas comercialmente disponíveis, alto custo em relação à imuno-histoquímica, perda de sinal da sonda ao longo do tempo, dificuldade na identificação das áreas de carcinoma invasivo, pouca quantidade de patologistas e tecnologistas treinados para interpretação, e a necessidade da utilização de microscópio de fluorescência e um sistema de análise de imagem.

D CISH (Chromogenic *in situ* hybridization)

Técnica que utiliza sondas específicas de pequenos segmentos de DNA ou RNA para detectar alterações cromossômicas na qual a sonda é conjugada com enzimas como a peroxidase ou fosfatase alcalina.

As sondas com sequências específicas de ácidos nucleicos se hibridizam com sequências complementares de DNA, ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) ou ácido ribonucleico transportador (tRNA) em tecidos, células e preparados cromossômicos.

Dentre as vantagens, destacam-se o uso da microscopia óptica e preservação morfológica possibilitando a fácil identificação das células normais e tumorais, as reações são estáveis podendo as lâminas ser armazenadas por longos períodos em temperatura ambiente, e possibilidade de utilização de material fresco ou fixado e parafinado.

A principal desvantagem está relacionada ao fato de ser uma tecnologia relativamente nova, e, portanto com maiores dificuldades de realização e interpretação dos resultados devido à inexperiência do técnico e/ou patologista.

E SISH (Silver-enhanced *in situ* hybridization)

É uma técnica de hibridização *in situ* recentemente introduzida, que permite o uso de microscópio óptico comum para a detecção de sinais de DNA, empregada principalmente para a genotipagem de neoplasias malignas. A técnica é baseada na metalografia enzimática e deposição de prata metálica resultante de complexos depósitos que são estáveis ao longo do tempo permitindo que o patologista avalie o sinal com microscópios de luz convencionais ao invés de microscópios de fluorescência. A técnica de SISH foi principalmente utilizada na avaliação da presença de amplificação do *HER2* em pacientes com câncer de mama. A versão mais recente de SISH, *dual-color dual hapten brightfield in situ hybridization* (DDISH), permite a detecção simultânea de *HER2* e da região centrômerica do cromossomo 17, incluindo uma detecção cromogênica pela precipitação da prata e outra com a enzima fosfatase.

Dentre as vantagens desse método, destacam-se a possibilidade das análises automatizadas por imagem, avaliação da expressão do *HER2* e do cromossomo 17 na mesma lâmina utilizando-se microscópio óptico convencional, armazenamento das lâminas prontas por longos períodos e

excelente preservação morfológica em tecidos fixados em formol e emblocados em parafina.

Dentre as desvantagens, destaca-se a inexperiência dos patologistas e dos técnicos na realização da técnica e interpretação dos resultados.

Peças cirúrgicas e amostras de biópsias endoscópicas do tumor primário são consideradas aceitáveis para a avaliação do estatus do *HER2* seja por imuno-histoquímica e/ou hibridização *in situ*. A escolha do melhor tipo de material pode variar de acordo com a região: por exemplo, peças cirúrgicas são mais comuns no Japão (embora biópsias também sejam avaliadas (RÜSCHOFF et al. 2012).

Quando biópsias endoscópicas são realizadas, o número adequado de fragmentos para que as biópsias sejam consideradas representativas (idealmente seis a oito) do tumor é recomendado para o teste de *HER2* para que possa refletir a possível heterogeneidade do tumor. Microarranjos de tecidos ou *Tissue microarrays* (TMAs) não são considerados seguros para a realização do teste para *HER2* na tomada de decisões clínicas devido à heterogeneidade natural presentes na super-expressão e amplificação do número de cópias do *HER2* em carcinomas gástricos, embora sua utilização para fins de pesquisa tenha demonstrado vantagens importantes, na padronização com várias amostras em uma mesma lâmina com um mínimo gasto de anticorpo primário (BILOUS et al. 2010).

A heterogeneidade de marcação do *HER2*, ou seja, diferenças de expressão observadas em áreas distintas do tumor ou nas metástases podem ser responsáveis por resultados distintos em relação à super-

expressão proteica ou amplificação gênica do *HER2*, com maior discordância entre os resultados de IHC e ISH.

Embora, os carcinomas da mama apresentem áreas histologicamente heterogêneas, ou seja, presença em um mesmo tumor de áreas pouco diferenciadas, com padrão sólido e células com grau nuclear mais elevado ao lado de áreas bem diferenciadas, com formação glandular evidente e baixa atividade mitótica, a amplificação do *HER2* tem se mostrado bastante homogênea. Já foi demonstrado que a amplificação do *HER2* nos carcinomas da mama é um evento precoce da carcinogênese, ou seja, é encontrado em fases precoces da progressão tumoral, explicando assim sua homogeneidade em áreas histologicamente distintas do tumor (SIMON et al. 2001). Este fato é muito importante para o tratamento dos pacientes, pois permite que a pesquisa da amplificação de *HER2* seja feita em qualquer área representativa do tumor.

Nos carcinomas gástricos, este fato já foi relatado e resultados contraditórios têm sido encontrados na literatura. MARX et al. (2009) em um estudo com 166 tumores primários e 69 metástases, descreveram que a amplificação de *HER2* é altamente homogênea nos carcinomas gástricos. Estes resultados foram questionados por outros autores que relataram que a amplificação de *HER2* é muito heterogênea nas áreas distintas dos tumores primários e suas metástases (BILOUS et al. 2010).

Dados preliminares de nosso grupo mostraram a superexpressão de *HER2* em 12% de 482 carcinomas gástricos, através de imuno-histoquímica e em lâminas de TMA (BEGNAMI et al. 2005). Em estudo posterior

(BEGNAMI et al. 2011), utilizando cortes convencionais de alguns casos, nosso grupo observou uma importante diferença de expressão de *HER2* em áreas distintas de um mesmo tumor, concordando assim com a hipótese de heterogeneidade na expressão do *HER2*. Diante destes achados, é inquestionável a necessidade de uma padronização na pesquisa e interpretação da expressão e amplificação de *HER2* nos carcinomas gástricos para que algumas perguntas possam ser respondidas:

- 1 Qual o material ideal a ser pesquisado: tumor primário (biópsia endoscópica ou peça cirúrgica) e metástases?
- 2 Qual o melhor anticorpo a ser utilizado na pesquisa imunohistoquímica (clones, fabricantes, métodos de recuperação antigênica, diluição)?
- 3 Quais os critérios de interpretação dos resultados imunohistoquímicos que melhor se correlacionam com a amplificação gênica por FISH e SISH?

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de terapias alvo, como por exemplo, anticorpos monoclonais contra os receptores de fatores de crescimento e inibidores de tirosina quinase têm sido empregados atualmente no tratamento de alguns tipos de câncer, e representam uma possibilidade terapêutica para os pacientes com carcinomas gástricos. A correta identificação e seleção dos pacientes que irão se beneficiar com esta terapia são o primeiro e mais importante passo para o sucesso do tratamento. Neste cenário, um estudo abrangente, incluindo um grande número de casos de câncer gástrico e metodologias adequadas para a detecção da superexpressão de HER2 poderão fornecer importantes informações para a seleção mais criteriosa dos pacientes que se beneficiarão com a terapia alvo anti-*HER2*.

3 OBJETIVOS

Avaliar a superexpressão proteica e amplificação do gene *HER2* em carcinomas gástricos de pacientes submetidos à ressecção cirúrgica no A.C. Camargo Cancer Center utilizando métodos de imuno-histoquímica, e hibridização *in situ* (DDISH e FISH) comparando-se:

- Diferentes clones de anticorpos primários anti-*HER2* de diferentes fabricantes disponíveis comercialmente, Clone 4B5 (Ventana), Clone SP3 (Neomarkers), HercepTest (DAKO).
- Cortes histológicos convencionais e cortes histológicos de TMA;
- Amostras de tumor primário e amostras de metástases do mesmo paciente;
- Diferentes escores de interpretação da expressão de *HER2* (protocolo de câncer de mama vs câncer gástrico) por imuno-histoquímica e os resultados do número de cópias obtidos das análises através de FISH e DDISH.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram utilizadas para este estudo 762 amostras de adenocarcinomas gástricos produtos de ressecções cirúrgicas realizadas no A.C. Camargo Cancer Center no período de 1980 a 2006. Estas amostras estavam distribuídas em 7 blocos de TMAs contendo 2 cilindros, de 1mm de diâmetro, representativos de áreas histologicamente distintas das neoplasias. Estes TMAs foram previamente montados e as lâminas já estavam disponíveis para o estudo, pois foram utilizados em estudos anteriores realizados no departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center.

Para este estudo, foi adotado o seguinte critério de inclusão: tumores submetidos à ressecção primária com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico confirmado pelo exame histopatológico. Foram excluídos os casos que foram submetidos a qualquer tipo de tratamento neoadjuvante (quimioterapia e/ou radioterapia), história de câncer concomitante ou prévio em período inferior a 5 anos que necessitou de quimioterapia e/ou radioterapia, ou quando o material representativo da área tumoral nos blocos de TMA era insuficiente para a realização ou interpretação das técnicas.

Das 762 amostras selecionadas, 620 casos foram considerados adequados para as análises de todos os anticorpos, sendo excluídos 20%

do total inicial das amostras. Esta frequência de casos excluídos ou de perdas é esperada quando se utiliza a técnica de TMA para as análises dos casos em conjunto. Dados da literatura têm relatado perdas de até 20% dos casos. Estas perdas vêm sendo atribuídas a problemas técnicos como descolamento das áreas durante a realização das reações imunohistoquímicas ou perdas de representatividade tumoral devido ao desgaste dos blocos relacionados às diferenças de espessura das amostras (KONONEN et al.1998).

Das 620 amostras avaliáveis, 384 (61,9%) eram de pacientes do sexo masculino e 236 (38,1%) eram do sexo feminino. A média de idade dos pacientes era de 62,3 anos e mediana de 64 anos, com idade mínima e máxima de 20 e 88 anos, respectivamente. De acordo com a classificação histológica de Lauren, 342 (55,2%) carcinomas eram do tipo intestinal 224 (36,1%) do tipo difuso, 47 (7,6%) do tipo misto e 7 (1,1%) do tipo inclassificável. Os tumores que se localizavam no cárdia eram 119 (19,2%); no antro 258 (41,6%); no corpo 198 (31,9%) e 45 (7,3%) eram de outras localizações (Tabela 1). Dos 620 casos avaliados 290 (37,1%) apresentavam metástases regionais e/ou à distância.

Tabela 1 - Características clínico-patológicas dos 620 carcinomas gástricos estudados

Características clínico-patológicas		Número de casos	Porcentagem
Gênero	Feminino	236	38,1
	Masculino	384	61,9
Classificação	Intestinal	342	55,2
Histológica	Difuso	224	36,1
	Misto	47	7,6
	Inclassificável	7	1,1
Localização	Cárdia	119	19,2
	Antro	258	41,6
	Corpo	198	31,9
	Outros*	45	7,3
Total		620	100

* outras localizações incluem os tumores de localização não mencionada e de localização difusa tipo *linite plástica*.

4.2 CONSTRUÇÃO DOS *TISSUE MICROARRAYS* (TMAs)

Os TMAs utilizados neste estudo já estavam disponíveis para a utilização. A descrição da metodologia utilizada encontra-se no Anexo 2.

4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas em 2 lâminas de cada bloco de TMA com níveis distintos de profundidade dos cortes e com as lâminas dos cortes histológicos convencionais (cortes inteiros) dos casos selecionados. O protocolo adotado foi o padronizado e utilizado pelo Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center e encontra-se no Anexo 3. Para o Herceptest as reações foram manuais

segundo as recomendações e protocolo do fabricante conforme Anexo 4 (Quadro 1).

Casos controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações, sendo os controles positivos os casos de carcinomas mamários sabidamente positivos para os anticorpos pesquisados. Para os controles negativos, substituímos os anticorpos primários por tampão de lavagem.

Todas as reações foram avaliadas por um patologista (MDFSB) experiente em câncer gástrico.

Quadro 1 - Anticorpos primários utilizados nas reações imunohistoquímicas, clones, fabricantes, diluições e métodos de recuperação antigênica.

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição	Recuperação antigênica
Herceptest	Policlonal	DAKO	Pronto para uso	Solução recuperação antigênica (x10) Banho Maria 96°C – 40'
Her-2/neu	4B5	Ventana	Pronto para uso	CC1 (Cell Conditioninn Solution) 95°C – 32'
c-erbB-2	SP3	Neomarkers	1/100	CC1 (Cell Conditioninn Solution) 95°C – 32'

A interpretação das reações imuno-histoquímicas foi realizada em microscópio óptico comum, seguindo as diretrizes propostas por HOFMANN et al. 2008 (Quadro 2). Para a determinação dos resultados finais foram consideradas as análises das 4 áreas(em 2 lâminas) representativas dos tumores nos TMAs. Para casos com resultados discordantes entre as áreas analisadas (prováveis tumores heterogêneos) os resultados finais foram aqueles com o maior escore observado em qualquer uma das áreas analisadas.

Para comparação dos resultados das reações imuno-histoquímicas em relação aos diferentes protocolos de interpretação utilizamos 2 sistemas propostos para a interpretação imuno-histoquímica de HER2:

- Diretrizes propostas por HOFMANN et al. 2008 (Quadro 2);
- Diretrizes de interpretação do Herceptest nos carcinomas invasores de mama (WOLFF et al. 2013) (Quadro 3).

Quadro 2 - Escore de interpretação imuno-histoquímica do HER2 de acordo com as diretrizes propostas por Hofmann.

ESCORE	RESULTADO	PADRÃO IHQ
0	Negativo	Ausência de reatividade ou marcação de membrana em <10% das células
1+	Negativo	Marcação fraca de membrana/discretamente perceptível em > 10% das células Observadas no aumento de 40x
2+	Duvidoso	Marcação fraca a moderada, completa ou basolateral de membrana em > 10% das células. Observadas no aumento de 20x
3+	Positivo	Marcação moderada a forte, completa ou basolateral de membrana em > 10% das células. Observadas no aumento de 5x

Quadro 3 - Escore de interpretação imuno-histoquímica do HER2 de acordo com as diretrizes do Herceptest para carcinomas mamários invasores

ESCORE	RESULTADO	PADRÃO IHQ
0	Negativo	Imunocoloração ausente, ou coloração muito fraca de membrana é observada em menos de ou igual a 10% das células neoplásicas.
1+	Negativo	Imunocoloração fraca e parcial de membrana dificilmente perceptível em mais de 10% das células neoplásicas invasivas
2+	Duvidoso	Imunocoloração de membrana circunferencial, incompleta e/ou de intensidade fraca/moderada, em mais de 10% das células neoplásicas ou imunocoloração de membrana circunferencial completa e intensa em menos de, ou igual a 10% das células neoplásicas
3+	Positivo	Imunocoloração de membrana circunferencial completa e intensa em mais de 10% das células neoplásicas i

Os carcinomas gástricos exibem características únicas de imunomarcção quando comparados aos carcinomas de mama, incluindo a alta incidência de heterogeneidade tumoral (definida como < 30% de células tumorais com marcação intensa, completa e circunferencial ou somente marcação focal do tumor) em até 30% dos casos HER2 positivos (BILOUS et al. 2003; HOFMANN et al. 2008).

Algumas comparações e diferenças em relação aos carcinomas de mama e carcinomas gástricos no que se refere à expressão de *HER2* tem sido avaliadas e apontadas por agências de regulamentação da saúde como a *American Society of Clinical/College of American Pathologists (CAP)* e *European Medicines Agency (EMA)* (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação das diferenças entre os escores para HER2 em câncer Gástrico e câncer de mama

		Câncer Gástrico	Câncer de Mama
IHC	Extensão (área de cut-off)	≥10%	≥10% (a)
	Tipo tumoral	30% do tipo intestinal 15% do tipo misto 5% do tipo difuso	15-25% do tipo ductal (G2/G3) Raramente nos ductais G1, lobulares e medulares
	Localização	30% na JGE- cárdia 15% gástricos	Sem associações
FISH	Número de Células	20 núcleos tumorais (+20 núcleos R: 1.8-2.0)	20 núcleos tumorais (+20 núcleos R: 1.8-2.0)
Seleção de pacientes	FISH vs IHC	IHC mais preditivo que FISH. IHC como teste primário. (b) FISH somente nos casos IHC 2+	FISH e IHC testes igualmente preditivos

(a) De acordo com American Society of Clinical/College of American Pathologists;

(b) De acordo EMA

4.4 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

4.4.1 Hibridização *in situ* por fluorescência: FISH

As reações de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) seguiram as recomendações do fabricante da sonda, utilizando o protocolo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo.

As reações de FISH foram realizadas exclusivamente em cortes histológicos convencionais (cortes inteiros). O protocolo utilizado encontra-se no Anexo 4.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico trinocular com fluorescência de mercúrio (OLYMPUS® BX41-FL-III), equipado com objetiva de imersão e com filtros adequados. As imagens obtidas foram capturadas com câmera digital colorida refrigerada (5.1 megapixel) acoplada ao microscópio, usando o programa para análise de imagem Image Pro Plus versão 6.0 (OLYMPUS®) com a avaliação de pelo menos 30 núcleos por caso, sendo considerada amplificação gênica se a média da razão entre o número de sinais correspondentes ao locus cromossômico de interesse (espectro Orange) e ao locus de referência (espectro green) > 2 (BEGNAMI et al. 2011).

4.4.2 Hibridização *in situ* cromogênica: Dual ISH (DDISH)

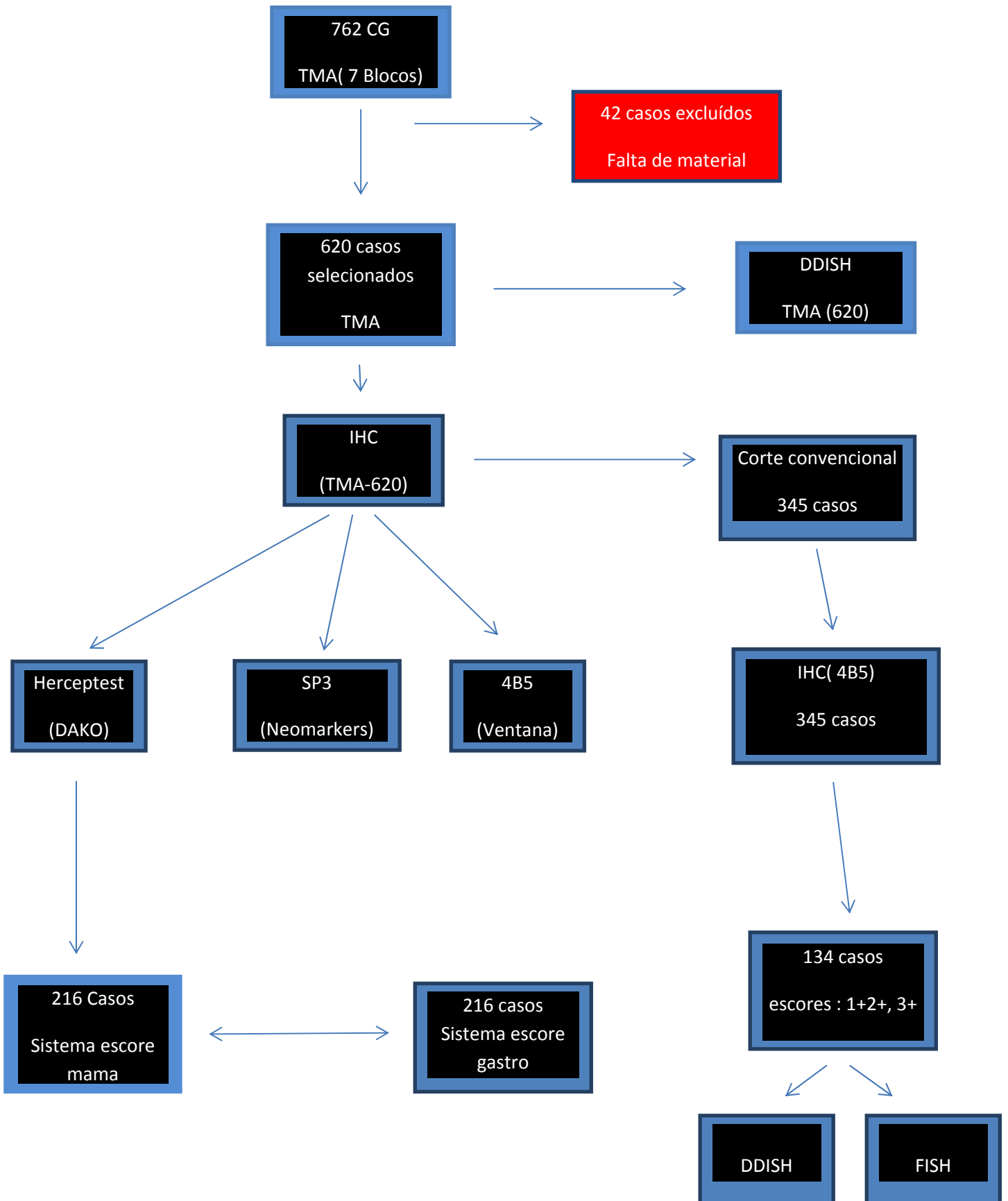
A hibridização *in situ* dual ISH (DDISH), foi realizada no equipamento Benchmart XT (Ventana) de acordo com as recomendações do fabricante e do protocolo pré-estabelecido no Departamento de Anatomia Patológica do A. C. Camargo Cancer Center em todas as lâminas dos cortes de TMA e em 134 cortes convencionais.

A técnica DDISH consiste em duas reações de hibridização *in situ* sequenciais que estão disponíveis no Anexo 5.

O resultado de DDISH é considerado positivo se a razão HER2/CEP17 for maior ou igual a 2,0 ou se a razão HER2/CEP17 for menor que 2,0 com contagem de sinais de *HER2* maior ou igual a 6,0. O resultado DDISH é considerado duvidoso se a razão HER2/CEP17 for menor que 2,0 com contagem de sinais de *HER2* maior ou igual a 4,0 e menor que 6,0. O

resultado de DDISH é considerado negativo se a razão HER2/CEP17 for menor que 2,0 com contagem de sinais de *HER2* menor que 4,0 (WOLFF et al. 2013).

4.5 FLUXOGRAMA DA CASUÍSTICA



5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A caracterização da população do estudo foi realizada por meio da estatística descritiva (frequências absolutas, frequências relativas, tabelas de frequência e tabelas de contingência). Calculou-se o índice *kappa* ponderado e os respectivos intervalos de confiança de 95%) para a análise de concordância entre escores imuno-histoquímicos dos anticorpos estudados (SP3, 4B5 e Herceptest), entre os métodos de hibridização *in situ* (DDISH e FISH) e entre os sistemas de classificação de escores (Herceptest para câncer de mama e protocolo de Hofmann para câncer gástrico). Para a análise de acurácia dos métodos imuno-histoquímicos adotou-se o resultado de DDISH como o padrão-ouro. Nesta análise, foram calculadas os seguintes parâmetros (e os respectivos intervalos de confiança de 95%): sensibilidade, especificidade, valores preditivos (negativo e positivo) e área sob a curva *Receiver Operating Characteristics* (ROC). Diversos pontos de corte da expressão imuno-histoquímica foram testados a fim de realizar esta análise.

Os Valores de *Kappa* (*K*) foram interpretados de acordo com ALTMAN (1991), sendo os valores adotados detalhados no Quadro 4.

Quadro 4 - Valor de *Kappa*

Valor de <i>K</i>	Concordância
< 0.20	Pobre
0.21 - 0.40	Regular
0.41 - 0.60	Moderada
0.61 - 0.80	Boa
0.81 - 1.00	Muito boa

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS DAS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS PARA EXPRESSÃO DE *HER2* NOS CARCINOMAS GÁSTRICOS REALIZADAS NOS CORTES DE TMA UTILIZANDO ANTICORPOS COMERCIALMENTE DISPONÍVEIS COM DIFERENTES CLONES

Do total de 620 casos dispostos nos TMAs, 619 foram analisados utilizando-se o anticorpo SP3, 618 com o anticorpo 4B5 e 619 foram analisados com o Herceptest.

As análises das reações imuno-histoquímicas dos tumores representados nos TMAs mostraram que a grande maioria dos casos, foram classificados como escore 0. Utilizando-se o anticorpo SP3, 367 (59,2%) casos foram classificados como escore 0, para o anticorpo 4B5 foram 543 (87,6%) e para o Herceptest 536 (86,5%) casos. Notamos que as porcentagens de casos classificados com o escore 0 foram muito semelhantes para os anticorpos 4B5 e Herceptest (87,6% e 86,6%, respectivamente), sendo esta frequência muito menor nos resultados obtidos com o uso do anticorpo SP3 (59,2%).

Em relação aos resultados do escore 1, observamos que 177 (28,5%) dos casos corados com o SP3, 38 (6,1%) dos casos com o 4B5, e 34 (5,5%) dos casos corados pelo Herceptest, foram classificados com este escore. Notamos novamente que os resultados dos anticorpos 4B5 e Herceptest

(6,1% e 5,5%, respectivamente) foram muito semelhantes enquanto que a frequência dos casos classificados como escore 1 para o anticorpo SP3 foi maior (28,5%).

A recomendação de interpretação da imuno-histoquímica para *HER2* nos tumores gástricos para a seleção de pacientes para o uso de Trastuzumabe agrupa os casos classificados com o escore 0 e escore 1 em um mesmo grupo nomeado “casos negativos para expressão de *HER2*”, sendo estes pacientes ilegíveis para este tratamento, uma vez que não terão benefício clínico com o uso da droga (BANG et al. 2010). Agrupando-se os casos com escores 0 e 1 (casos considerados negativos para superexpressão de *HER2*), encontramos 544 (87,9%) casos corados pelo SP3, 581 (94%) casos corados pelo 4B5 e 570 (92,1%) casos marcados pelo Herceptest. Embora tenhamos observado maior diferença nas porcentagens das análises individuais dos escores 0 e 1 com o uso do SP3 em relação aos resultados dos anticorpos 4B5 e Herceptest, esta diferença é menor quando fazemos as análises dos escores agrupados (87,9% vs 94% vs 92,1%).

Com relação aos casos classificados com o escore 2, notamos que 50 (8,1%) dos casos corados pelo SP3 foram classificados com este escore. Estas porcentagens foram de 3,5% (22) e de 3,2% (20) com o uso do 4B5 e Herceptest, respectivamente. Este grupo de pacientes é denominado como equívoco ou duvidoso para a expressão de *HER2* e devem obrigatoriamente ser testados por hibridização *in situ*. O resultado final será dado pela presença ou não da amplificação gênica. No nosso estudo, observamos que

as porcentagens dos casos com escore 2 corados com o 4B5 e Herceptest foram muito semelhantes (3,5% e 3,2%, respectivamente) e a porcentagem de casos equívocos corados pelo SP3 foi maior (8,1%). Por fim, os casos classificados como escore 3, corresponderam a minoria dos casos para todos os anticorpos pesquisados. Somente 25 (4%) dos casos corados pelo SP3 foram classificados como escore 3, estes corresponderam a 15 (2,4%) casos corados pelo 4B5 e a 29 (4,7%) dos casos corados pelo Herceptest.

Este é o grupo de pacientes que apresentam maior benefício clínico com o uso do Trastuzumabe e são classificados como positivos ou super-expressores de *HER2* (BANG et al. 2010). Diferente do observado para os outros escores, notamos que a frequência de casos com escore 3 foi muito semelhante com o uso do SP3 e Herceptest (4% e 4,7%) e menor (2,4%) com o uso do 4B5. (Tabela 3 e Figura 1)

Tabela 3 - Resultados das reações imuno-histoquímicas para pesquisa da expressão de *HER2* nos carcinomas gástrico distribuídos em escores com número total e porcentagem de casos de acordo com os anticorpos utilizados.

Anticorpos (Clones, Marcas)	SP3 (Neomarkers)	4B5 (Ventana)	Herceptest (Dako)
Escore 0	367 (59,2%)	543 (87,6%)	536 (86,5%)
Escore 1	177 (28,5%)	38 (6,1%)	34 (5,5%)
Escore 2	50 (8,1%)	22 (3,5%)	20 (3,2%)
Escore 3	25 (4%)	15 (2,4%)	29 (4,7%)
Total	619 (100%)	618 (100%)	619 (100%)

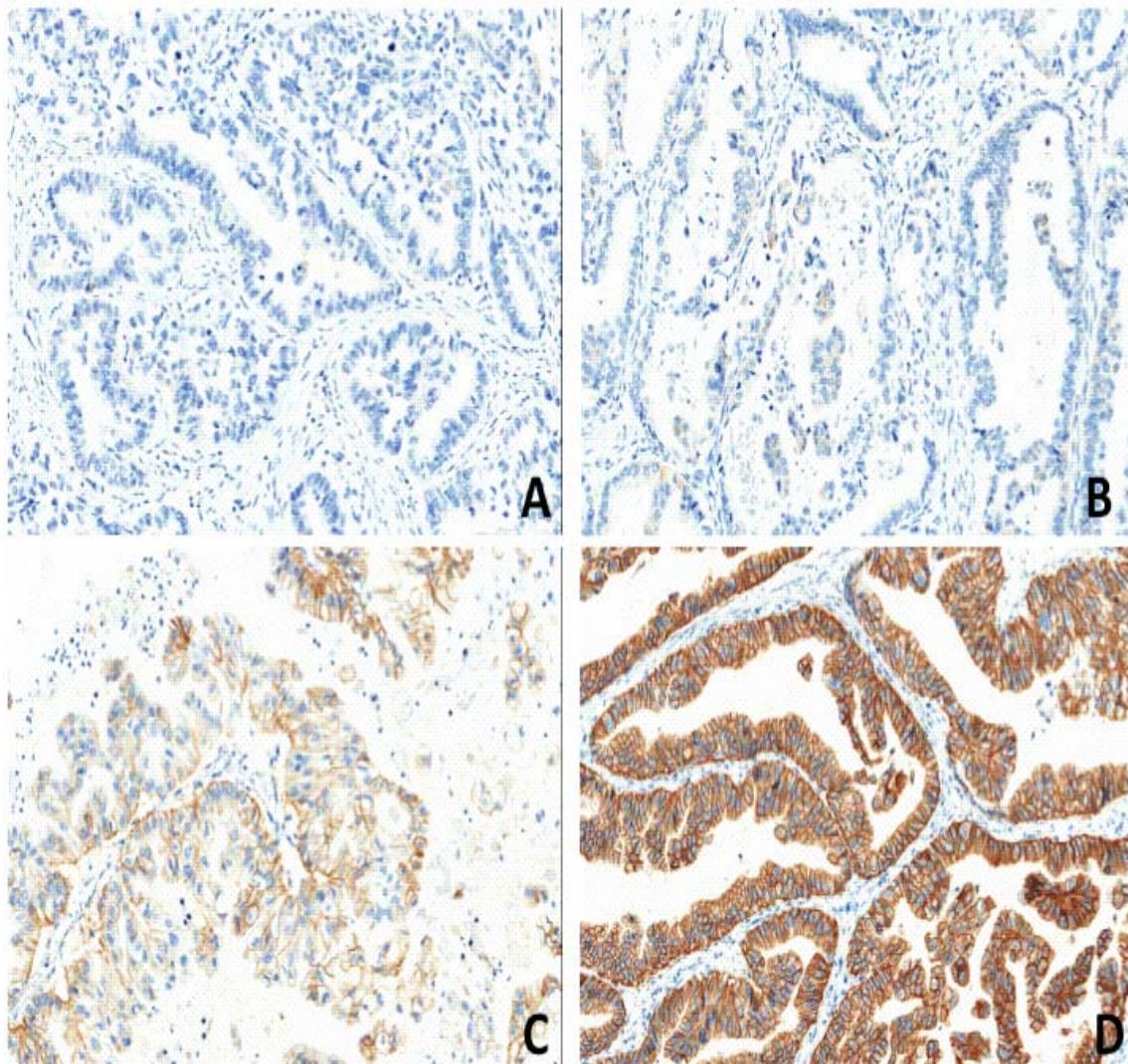


Figura 1 - Carcinomas gástricos corados com diferentes anticorpos anti-HER2 por imuno-histoquímica. **A:** Carcinoma gástrico escore 0 corado pelo anticorpo SP3, aumento original 20x; **B:** Carcinoma gástrico escore 1 corado pelo anticorpo 4B5, aumento original 20x; **C:** Carcinoma gástrico escore 2 corado pelo anticorpo Herceptest, aumento original 20x; **D:** Carcinoma gástrico escore 3 corado pelo anticorpo 4B5, aumento original 40x.

6.1.1 Resultados comparativos das expressões imuno-histoquímicas de *HER2* nos carcinomas gástricos utilizando os anticorpos SP3 e 4B5

Nas análises comparativas entre os resultados obtidos com os diferentes anticorpos pesquisados para pesquisa de expressão de *HER2*

nos carcinomas gástricos, observamos que há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos com o uso dos anticorpos SP3 e 4B5 ($p < 0.001$). Observamos que, dentre os casos classificados com o escore 0 utilizando-se o anticorpo 4B5, 2 deles foram classificados com o escore 3 com o uso do anticorpo SP3. As amostras eram representativas das mesmas áreas tumorais, ou seja, não eram áreas distintas, portanto a discordância destes resultados pode ser atribuída ao uso de diferentes anticorpos. Estes resultados discordantes, portanto, podem representar resultados falso-positivos ou falso-negativos de acordo com o anticorpo utilizado (Tabela 4).

Tabela 4 - Correlação entre os casos de carcinomas gástricos corados com os anticorpos SP3 e 4B5 por imuno-histoquímica e os escores de interpretação.

		SP3				
4B5	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Total	
Escore 0	348	162	31	2	543 (87,9%)	
Escore 1	15	12	9	2	38 (6,1%)	
Escore 2	3	3	7	9	22 (3,6%)	
Escore 3	0	0	3	12	15 (2,4%)	
Total	366 (59,2%)	177 (28,7%)	50 (8,1%)	25 (4,0%)	618 (100%)	

P<0.001

Observamos que o escore com maior número de casos concordantes é o escore 0. Por outro lado, os escores com maior discordância, foram os escores 1 e 2. A frequência de casos concordantes classificados como escore 3 foi de 48% para cada anticorpo utilizado. (Tabela 5)

Tabela 5 - Número de casos de carcinomas gástricos com resultados concordantes e discordantes de acordo com os escores de interpretação com o uso dos anticorpos SP3 e 4B5 por imuno-histoquímica.

Escores de interpretação	No de casos concordantes (%)	No de casos discordantes (%)	Total
Escore 0	348 (95%)	18 (5%)	366
Escore 1	12 (6,8%)	165 (93,2%)	177
Escore 2	7 (14%)	43(86%)	50
Escore 3	12 (48%)	13(52%)	25
Total	379 (61,3%)	239 (38,7%)	618 (100%)

6.1.2 Resultados comparativos das expressões imuno-histoquímicas de *HER2* nos carcinomas gástricos utilizando os anticorpos SP3 e Herceptest

Quando comparamos os resultados obtidos com o uso dos anticorpos SP3 e Herceptest para pesquisa de expressão de *HER2* nos carcinomas gástricos, observamos que os casos classificados com escore 0 também foram os mais frequentemente concordantes e os escores 1 e 2 foram os mais discordantes. Diferente do que observamos na comparação dos resultados com os anticorpos SP3 e 4B5, a frequência de casos concordantes com os anticorpos SP3 e Herceptest em relação ao escore 3 foi elevada (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 - Correlação entre os casos de carcinomas gástricos corados com os anticorpos SP3 e Herceptest por imuno-histoquímica e os escores de interpretação.

SP3					
HercepTest	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Total
Escore 0	354	152	29	1	536 (86,6%)
Escore 1	10	17	7	0	34 (5,5%)
Escore 2	2	7	6	5	20 (3,2%)
Escore 3	1	1	8	19	29 (4,7%)
Total	367 (59,3%)	177 (28,6%)	50 (8,1%)	25 (4,0%)	619 (100%)

Tabela 7 - Número de casos de carcinomas gástricos com resultados concordantes e discordantes de acordo com os escores de interpretação com o uso dos anticorpos SP3 e Herceptest.

Escores de interpretação	No de casos concordantes (%)	No de casos discordantes (%)	Total
Escore 0	354(66%)	182(34%)	536
Escore 1	17(50%)	17(50%)	34
Escore 2	6 (30%)	14(70%)	20
Escore 3	19 (65,5%)	10(34,5%)	29
Total	396(64%)	223(36%)	619 (100%)

6.1.3 Resultados comparativos das expressões imuno-histoquímicas de *HER2* nos carcinomas gástricos utilizando os anticorpos 4B5 e Herceptest

Quando comparamos os resultados dos casos de carcinomas gástricos corados com os anticorpos 4B5 e Herceptest por imuno-histoquímica, observamos resultados muito semelhantes com os outros grupos já descritos, porém nestes grupos encontramos o maior índice total de casos concordantes entre os escores 85,3% (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 - Correlação entre os casos corados com os anticorpos 4B5 e Herceptest e os escores de interpretação.

		Herceptest				
4B5	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Total	
Escore 0	502	29	9	3	543 (87,9%)	
Escore 1	28	4	5	1	38 (6,1%)	
Escore 2	5	1	6	10	22 (3,6%)	
Escore 3	0	0	0	15	15 (2,4%)	
Total	535 (86,6%)	34 (5,5%)	20 (3,2%)	29 (4,7%)	618 (100%)	

Tabela 9 - Número de casos de carcinomas gástricos com resultados concordantes e discordantes de acordo com os escores de interpretação com o uso dos anticorpos 4B5 e Herceptest.

Escores de interpretação	No de casos concordantes (%)	No de casos discordantes (%)	Total
Escore 0	502 (92,4%)	41(7,6%)	543
Escore 1	4 (10,5%)	34 (89,5%)	38
Escore 2	6 (27,3%)	16 (72,7%)	22
Escore 3	15 (51,7%)	14 (48,3%)	29
Total	527 (85,3%)	91 (14,7%)	618 (100%)

6.2 RESULTADOS COMPARATIVOS DAS EXPRESSÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DE *HER2* UTILIZANDO O ANTICORPO 4B5 NAS AMOSTRAS DE CARCINOMAS GÁSTRICOS DISPOSTO EM TMAS E EM CORTES CONVENCIONAIS

Utilizando-se os mesmos critérios de interpretação da imunohistoquímica para *HER2* nos carcinomas gástricos que foram utilizados nas lâminas de TMA, fizemos as análises dos cortes convencionais e classificamos: 230 casos com o escore 0; 45 casos com o escore 1; 38 casos com o escore 2 e 32 casos com o escore 3 (Figura 2) (Tabela 10).

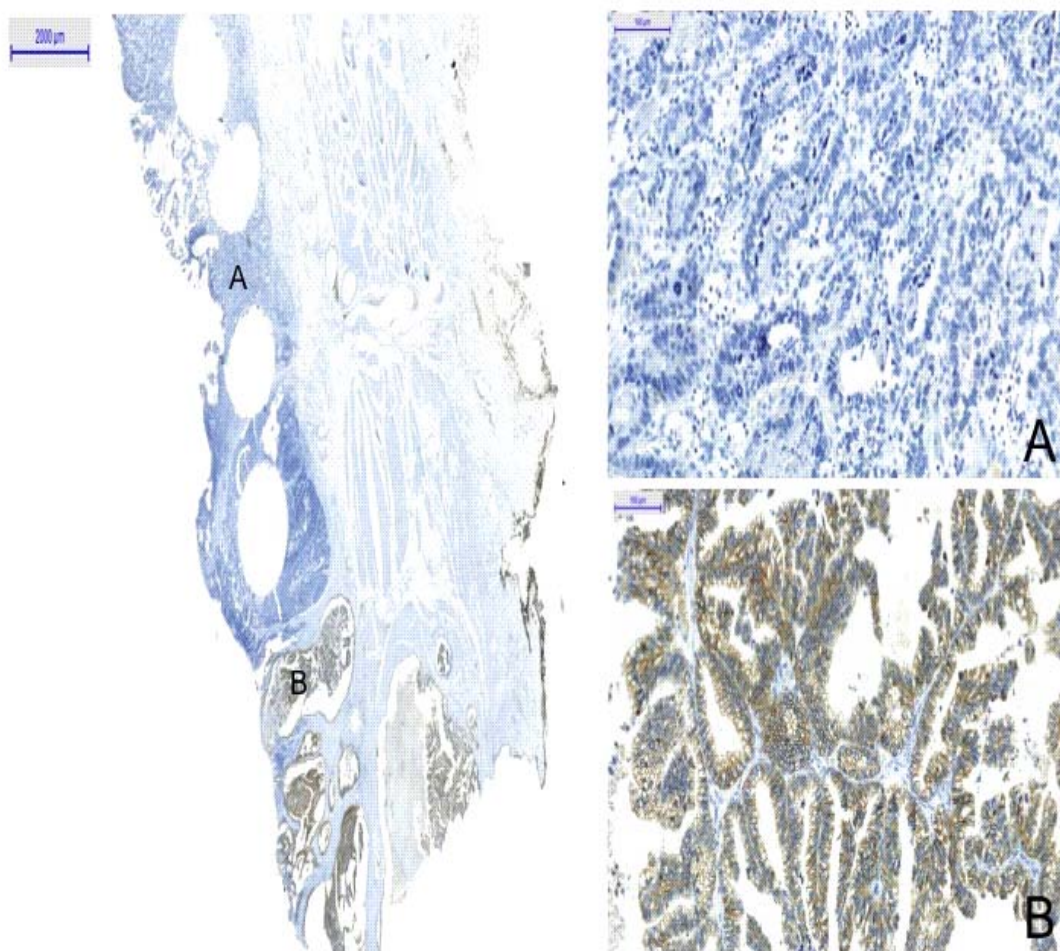


Figura 2 - Corte convencional de carcinoma gástrico corado com 4B5 por imuno-histoquímica, mostrando áreas de marcação heterogênea. **A)** Área próxima ao cilindro retirado para o TMA, mostrando ausência de marcação (score 0) aumento original 20x; **B)** Área não representada no TMA mostrando marcação forte de membrana nas células neoplásicas (score 3), aumento original 40x.

Tabela 10 - Correlação entre os casos de carcinomas gástricos corados por imuno-histoquímica com o anticorpo 4B5 em cortes convencionais e em TMAs.

4B5 (CORTE INTEIRO)					
4B5 (TMA)	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Total
Escore 0	221	34	19	8	282 (81,7%)
Escore 1	6	9	11	3	29 (8,4%)
Escore 2	3	2	8	8	21 (6,1%)
Escore 3	0	0	0	13	13 (3,8%)
Total	230 (66,7%)	45 (13%)	38 (11%)	32 (9,3%)	345 (100%)

As análises comparativas entre os resultados de *HER2* por imuno-histoquímica obtidos nos cortes convencionais e em cortes de TMA foram realizadas em 345 casos. Observamos que a maioria dos casos classificados com o escore 0 foram concordantes (96%). Nos cortes convencionais 230 casos foram classificados com o escore 0 e 221 mostraram este escore nos cortes de TMA. Notamos que, 45 casos foram classificados com o escore 1 nos cortes convencionais e em 29 nos casos de TMAs, sendo somente 20% dos casos concordantes neste escore. Em relação aos resultados do escore 2, observamos que 38 casos dos cortes convencionais foram classificados com este escore, enquanto que no TMA foram 21 casos, sendo 8 (21%) casos concordantes. Nos cortes convencionais 32 casos foram classificados como escore 3 e no TMA somente 13 casos receberam este escore, mostrando uma concordância de 40.6% entre os casos (Tabela 11).

Tabela 11 - Número de casos de carcinomas gástricos com resultados concordantes e discordantes de acordo com os escores de interpretação com o uso dos anticorpos 4B5 por imuno-histoquímica em cortes inteiros e em cortes de TMA

Escores de interpretação	No de casos concordantes (%)	No de casos discordantes (%)	Total
Escore 0	221 (96%)	9 (4%)	230
Escore 1	9 (20%)	36 (80%)	45
Escore 2	8 (21%)	30 (79%)	38
Escore 3	13 (40,6%)	19 (59,4%)	32
Total	251(72,7%)	94(27,3%)	345 (100%)

6.3 CONCORDÂNCIA DAS EXPRESSÕES DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

As taxas de concordância entre os resultados das reações imuno-histoquímicas realizadas com os anticorpos SP3 e 4B5 nos cortes de TMA foi de 0.31 (IC95% 0.24-0.39) e para os anticorpos SP3 e HercepTest foi de 0.40 (IC95% 0.33 -0.47). Estas taxas são consideradas como regulares. Esta taxa foi moderada entre o 4B5 e HercepTest sendo o valor de 0.56 (IC95% 0.47 -0.66).

As taxas de concordância entre os resultados obtidos com o anticorpo 4B5 em cortes convencionais e o anticorpo SP3 em cortes de TMA foram de 0.49 (IC95% 0.40 -0.57), sendo este valor considerado como concordância moderada. O mesmo valor foi encontrado nos casos corados pelo anticorpo 4B5 em cortes convencionais e em cortes de TMA (IC95% 0.40 – 0.58). A

concordância entre o anticorpo 4B5 em cortes convencionais e o HercepTest em cortes de TMA foi de 0.62 (IC95% 0.54 -0.70), considerada um valor de boa concordância (Figura 3) (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores de *Kappa* ponderado e respectivos intervalos de confiança de 95% de acordo com a expressão dos 3 marcadores imunohistoquímicos em cortes convencionais e em cortes de TMA.

MARCADORES IMUNO- HISTOQUÍMICOS	SP3 (em TMA)	4B5 (em TMA)	4B5 (em corte convencional)	HercepTest (em TMA)
	<i>K</i> (IC95%)	<i>K</i> (IC95%)		<i>K</i> (IC95%)
SP3 (em TMA)	-	0.31 (0.24 – 0.39)	0.49 (0.40 – 0.57)	0.40 (0.33 – 0.47)
4B5 (em TMA)	0.31 (0.24 – 0.39)	-	0.49 (0.40 – 0.58)	0.56 (0.47 – 0.66)
4B5 (em corte convencional)	0.49 (0.40 – 0.57)	0.49 (0.40 – 0.58)	-	0.62 (0.54 – 0.70)
HercepTest (em TMA)	0.40 (0.33 – 0.47)	0.56 (0.47 – 0.66)	0.62 (0.54 – 0.70)	-

K: *kappa* ponderado

IC95%: Intervalo de confiança de 95% do valor de *kappa*

TMA: *Tissue microarray*

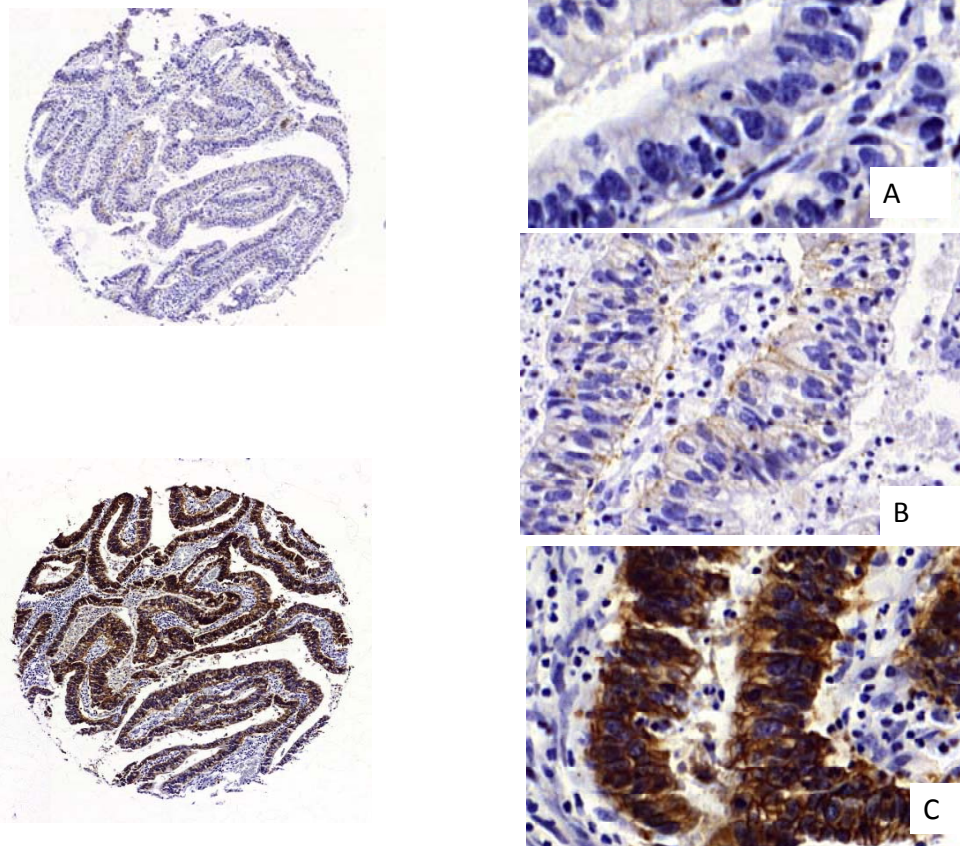


Figura 3 - Carcinoma gástrico representado em cilindro de TMA (aumento 5x) com resultados discordantes entre os 3 anticorpos utilizados. **A:** imuno-histoquímica com escore 0 para o anticorpo 4B5, **B:** imuno-histoquímica com escore 2+ para o anticorpo Herceptest, **C:** imuno-histoquímica com escore 3+ para o anticorpo SP3. aumento original 40x para todas as figuras.

6.4 RESULTADOS COMPARATIVOS DAS EXPRESSÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DE *HER2* NOS CARCINOMAS GÁSTRICOS NOS CORTES DE TMA E NOS CORTES CONVENCIONAIS EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE HETEROGENEIDADE INTRATUMORAL.

Heterogeneidade tumoral que é a presença de áreas com padrões histológicos ou de marcação distintas em uma população de células neoplásicas que representam entre 5 a 50% da área total do tumor e tem sido demonstrada em vários tumores sólidos. Cerca de 30% dos tumores gástricos apresentam padrões heterogêneos de expressão para *HER2* (RUSCHOFF et al. 2010). Para a determinação da presença de áreas heterogêneas e avaliar a representatividade tumoral necessária para a determinação de casos *HER2* positivos (escore 2+ com amplificação pelo ISH e escore 3+), fizemos a pesquisa imuno-histoquímica de *HER2* com o uso do anticorpo 4B5 nos cortes convencionais dos tumores que estavam representados também nos blocos de TMA. Avaliamos 345 cortes inteiros de carcinomas gástricos sendo que, destes, 110 (31,9%) casos apresentaram padrão heterogêneo de marcação pelo anticorpo 4B5, enquanto 229 casos tinham padrão de marcação homogênea e 6 casos foram considerados não avaliáveis (Figuras 4 e 5) (Tabela 13).

Tabela 13 - Correlação entre os resultados de imunistoquímica com o anticorpo 4B5 nas lâminas de cortes convencionais e lâminas de TMA em relação à presença de heterogeneidade nos carcinomas gástricos

Heterogeneidade		4B5 (CORTE CONVENCIONAL)				
		Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Total
Heterogêneo B5(TMA)	Escore 0	11	32	18	5	66 (60%)
	Escore 1	0	9	11	3	23 (20,9%)
	Escore 2	1	2	7	8	18 (16,4%)
	Escore 3	0	0	0	3	3 (2,7%)
	Total	12 (10,9%)	43 (39,1%)	36 (32,7%)	19 (17,3%)	110 (100%)
Homogêneo 4B5(TMA)	Escore 0	206	2	1	3	212 (92,6%)
	Escore 1	5	0	0	0	5 (2,2%)
	Escore 2	2	0	0	0	2 (0,9%)
	Escore 3	0	0	0	10	10 (4,3%)
	Total	213 (93%)	2 (0,9%)	1 (0,4%)	13 (5,7%)	229 (100%)
Não avaliável 4B5(TMA)	Escore 0	4		0		4
	Escore 1	1		0		1
	Escore 2	0		1		1
	Total	5		1		6

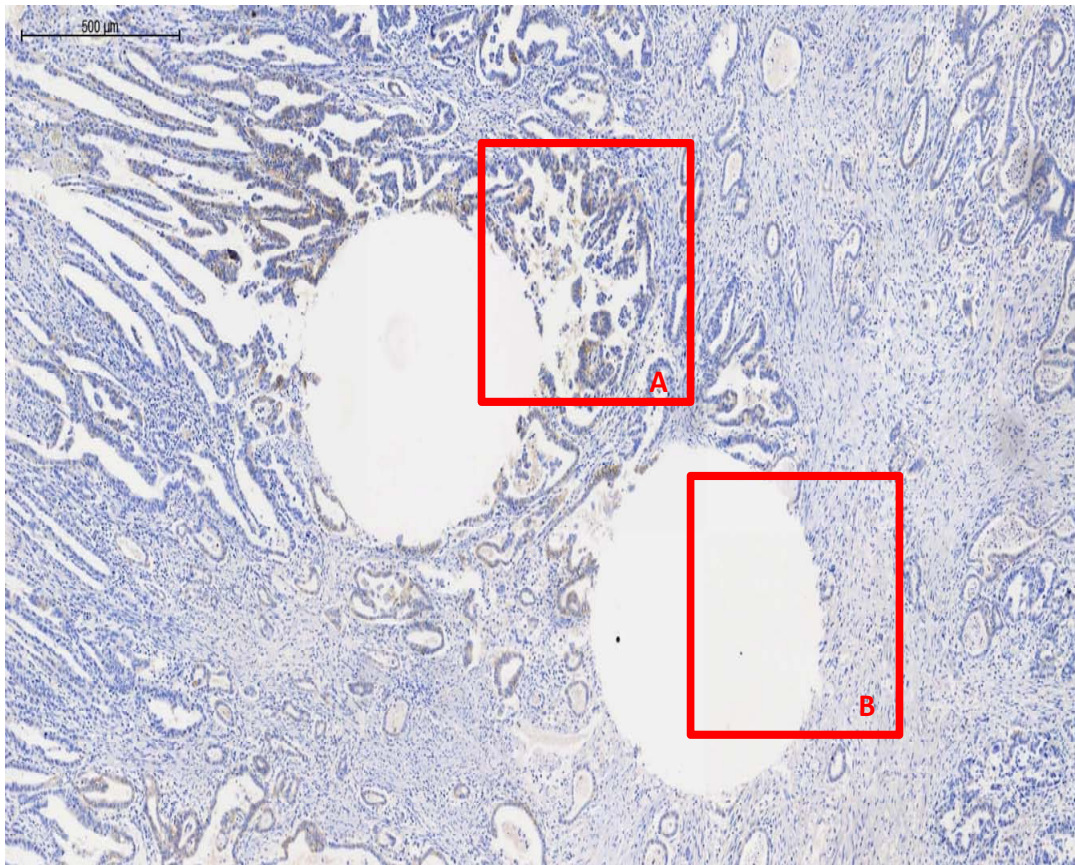


Figura 4 - Corte convencional de carcinoma gástrico corado com 4B5 por imuno-histoquímica. **A** e **B**: padrão de marcação heterogênea, escores 2+ e 0 em áreas próximas aos cilindros retirados para o TMA. Aumento original 10x.

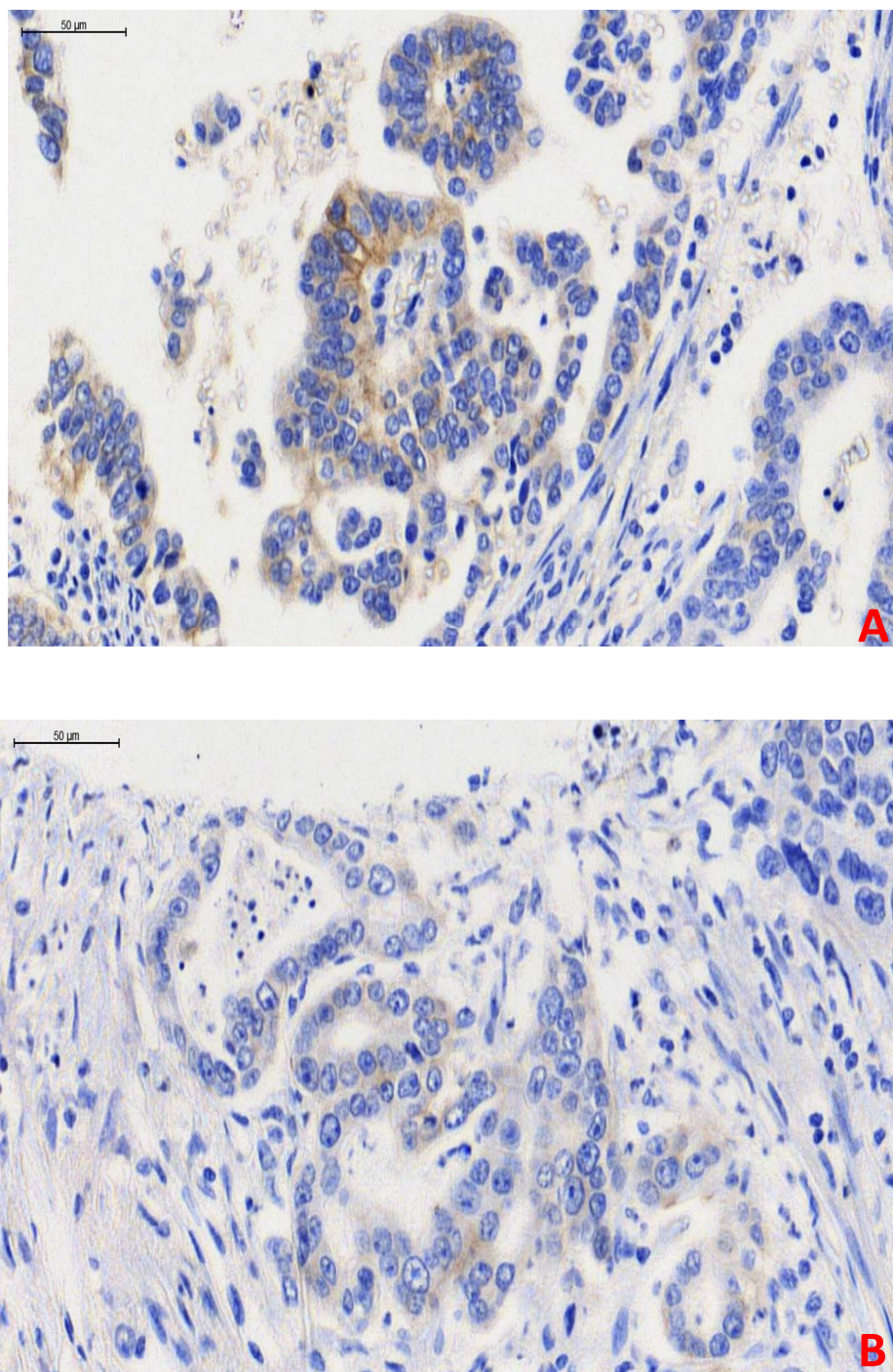


Figura 5 - Carcinoma gástrico corado com 4B5 por imuno-histoquímica **A**: Área próxima ao cilindro retirado para o TMA, mostrando presença de marcação para o anticorpo 4B5 por imuno-histoquímica (escore 2+); **B**: Área próxima ao cilindro retirado para o TMA não apresentando marcação para o anticorpo 4B5 por imuno-histoquímica (escore 0). Aumento original 40x em ambas as figuras.

6.5 RESULTADOS DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *HER2* POR TESTES DE HIBRIDIZAÇÕES *IN SITU*

6.5.1 Resultados comparativos entre os escores obtidos por imunohistoquímica com os anticorpos SP3, 4B5 e HercepTest e o número de cópias do gene *HER2* pelo DDISH em cortes de TMA.

Agrupando-se os casos classificados com escore 0 e escore 1 (negativos para superexpressão de *HER2*), encontramos 544 (87,9%) casos corados pelo SP3, 581 (94%) casos corados pelo 4B5 e 570 (92,1%) casos marcados pelo Herceptest. A Figura 6 representa um caso classificado como negativo e concordante entre os resultados da imuno com o anticorpo 4B5 e DDISH. Dos 544 casos corados pelo SP3 classificados como negativos por imunohistoquímica (escore 0 e escore 1) 4(0,7%) casos mostraram amplificação de *HER2* pelo DDISH. Dos 581 casos corados pelo 4B5 classificados como negativos 15(2,6%) casos mostraram amplificação de *HER2* pelo DDISH. Dos 569 casos corados pelo Herceptest classificados como negativos, 6 (1%) casos mostraram amplificação de *HER2* pelo DDISH. Dos 48 casos classificados com escore 2+ pelo SP3 17(35,4%) casos mostraram amplificação de *HER2* pelo DDISH. Para o anticorpo 4B5, dos 20 casos classificados com escore 2+ 15(75%) casos mostraram amplificação de *HER2* pelo DDISH. Pelo Herceptest, dos 19 casos classificados com escore 2+ 10 (52,6%) casos mostraram amplificação de *HER2* pelo DDISH.

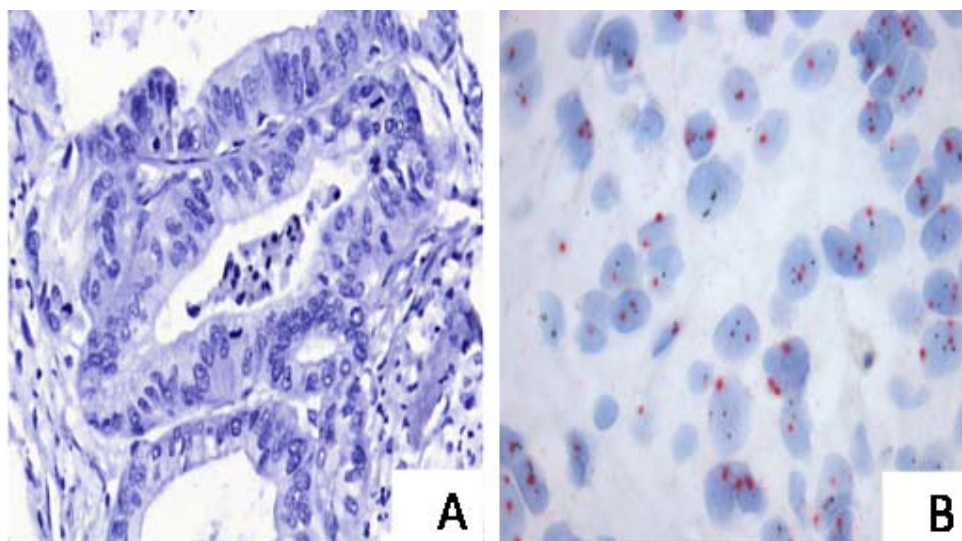


Figura 6 - Carcinoma gástrico em corte de cilindro em TMA. **A:** Imuno-histoquímica para o anticorpo 4B5 com ausência de marcação (escore 0). Aumento original 40x ; **B:** Hibridização *in situ* cromogênica (DDISH) para HER2 com ausência de amplificação do gene HER2. Aumento original 60x.

Para o anticorpo SP3, dos 25 casos classificados com escore 3+ 1 caso não apresentou amplificação de *HER2* pelo DDISH. Para os anticorpos 4B5 e HercepTest 100% dos casos classificados com escore 3+ mostraram amplificação de *HER2* pelo DDISH (Figura 7) (Tabela 14).

Tabela 14 - Comparação entre os escores obtidos por imuno-histoquímica com SP3, 4B5 e Herceptest e os resultados de HER2 obtidos pelo DDISH nos carcinomas gástricos.

Anticorpo	DDISH para HER2 em TMA	
	Escore de interpretação	Não Amplificado / Amplificado
SP3*	Escore 0/1	540 / 4 (0,7%)
	Escore 2	31 / 17(35,4%)
	Escore 3	1 / 24
4B5*	Escore 0/1	566 / 15 (2,6%)
	Escore 2	5 / 15 (75%)
	Escore 3	0 / 15
Herceptest*	Escore 0/1	563 / 6 (1%)
	Escore 2	9 / 10(52,6%)
	Escore 3	0 / 29

*Valores de $p < 0.0001$ para todas as análises

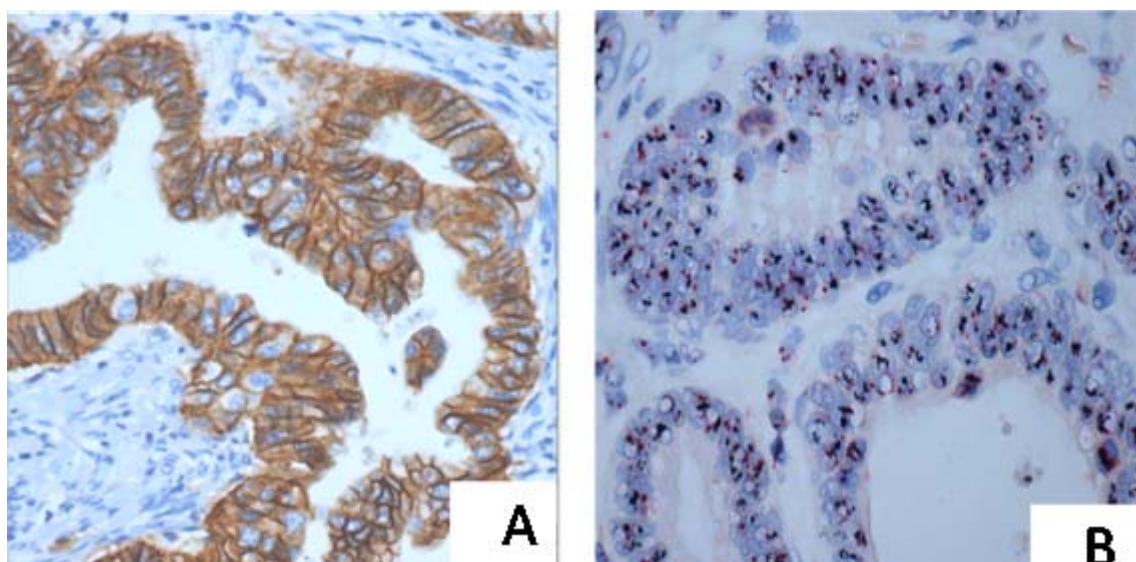


Figura 7 - Carcinoma gástrico em corte de cilindro de TMA. **A:** Imuno-histoquímica para o anticorpo 4B5 com escore 3+. **B:** Hibridização in situ cromogênica (DDISH) com amplificação para o gene HER2. Aumento original 40 x (ambas).

6.5.2 Número de cópias do gene *HER2* obtidos pelo DDISH nos carcinomas gástricos representados em TMA e em cortes histológicos convencionais

As reações de hibridização *in situ* cromogênica (DDISH, Ventana) para determinação do número de cópias do gene *HER2* foram realizadas em 134 carcinomas gástricos em cortes convencionais, sendo 82 (61,2%) casos classificados como não amplificados (negativos) para *HER2* e 45 (33,6%) como amplificados (positivos). Tivemos problemas nas análises de 7(5,2%) casos que foram excluídos dos resultados finais. Dos 134 casos em cortes de TMA correspondentes aos casos em cortes convencionais, 91 (67,9%) casos foram classificados como não amplificados para *HER2*, 39 (29,1%) casos como amplificados e 4 (3,0%) casos foram excluídos (Tabela 15). Esta pesquisa também foi realizada em 620 carcinomas gástricos representados em TMAs. Destes, 572 (92,3%) casos foram classificados como não amplificados (negativos) para *HER2*, 45 (7,2%) como amplificados (positivos) e 3 (0,5%) casos foram excluídos dos resultados finais devido a problemas técnicos.

Tabela 15 - Número de cópias do gene *HER2* obtidos pelo DDISH nos carcinomas gástricos representados em TMA e em cortes histológicos convencionais

Categoria	DDISH			Total
	Não amplificado	Amplificado	Não avaliável	
TMA	91 (67,9%)	39 (29,1%)	4 (3,0%)	134 (100%)
Corte convencional	82 (61,2%)	45 (33,6%)	7 (5,2%)	134 (100%)

6.5.3 Número de cópias do gene *HER2* obtidas por FISH nos carcinomas gástricos em cortes histológicos convencionais

As reações de hibridização *in situ* fluorescente foram realizadas em 131 carcinomas gástricos representados em cortes histológicos convencionais. Observamos que 84 (64,1%) casos foram não amplificados (negativos) para *HER2* e 40 (30,5%) casos mostraram amplificação (positivos). 7(5,4) casos foram considerados não avaliáveis.

6.6 TAXA DE CONCORDÂNCIA ENTRE O NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *HER2* OBTIDOS POR DDISH E POR FISH

A concordância do número de cópias do gene *HER2* nos carcinomas gástricos obtidos pelo DDISH nos cortes de TMA e nos cortes convencionais foi de 0.87 (IC95% 0,78 - 0.96), sendo esta taxa de concordância considerada muito boa.

A concordância entre o número de cópias do gene *HER2* nos carcinomas gástricos obtidos nas reações por DDISH realizados nos cortes de TMA e por FISH realizados nos cortes convencionais também foi considerada muito boa, sendo o valor de 0.86 (IC95% 0.77- 0.96).

A maior taxa de concordância dos resultados do número de cópias do gene *HER2* nos carcinomas gástricos foi de 0.90 (IC95% 0.82 - 0.99) observada na comparação dos resultados entre as técnicas de DDISH e FISH realizadas nos cortes convencionais (Figura 8) (Tabela 16).

Tabela 16 - Valores de *Kappa* e respectivos intervalos de confiança de 95% de acordo com o número de cópias do gene HER2 (não amplificado VS. Amplificado) nos carcinomas gástricos.

	SISH (TMA)	SISH (corte convencional)	FISH (corte convencional)
	<i>K</i> (IC95%)	<i>K</i> (IC95%)	
SISH (TMA)	-	0.87 (0.78 – 0.96)	0.86 (0.77 – 0.96)
SISH (corte convencional)	0.87 (0.78 – 0.96)	-	0.90 (0.82 – 0.99)
FISH (corte convencional)	0.86 (0.77 – 0.96)	0.90 (0.82 – 0.99)	-

Legenda: *K*: *kappa* ponderado; IC 95%: Intervalo de confiança de 95% do valor de *kappa*; TMA: *Tissue microarray*

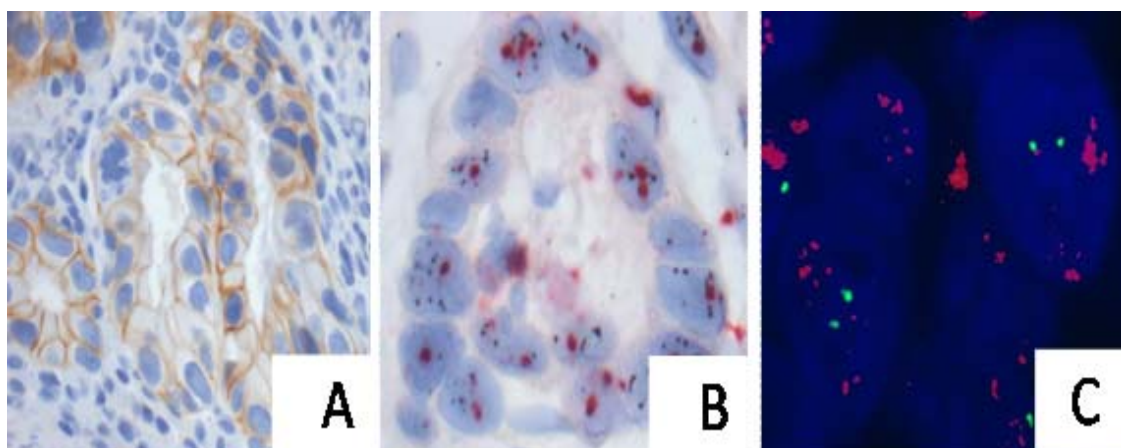


Figura 8 - Cortes convencionais de carcinoma gástrico. **A:** Imuno-histoquímica para o anticorpo 4B5 com escore 3+. Aumento original 40x; **B:** Hibridização *in situ* cromogênica (DDISH) com amplificação para o gene HER2. Razão HER2/CEN17 > 2,0. Aumento original 60x; **C:** Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com amplificação para o gene HER2. Razão HER2/CEN17 >2,0. Aumento original 1000x.

6.7 RESULTADOS DOS INDICADORES DE ACURÁCIA DOS MÉTODOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS COMPARADOS AO DDISH

Para a análise de acurácia dos métodos imunoistoquímicos adotou-se o resultado de DDISH como o padrão-ouro. Nesta análise, foram calculadas as seguintes estatísticas e os respectivos intervalos de confiança de 95%: sensibilidade, especificidade, valores preditivos (negativo e positivo) e área sob a curva ROC. Diversos pontos de corte da expressão imuno-histoquímica foram testados a fim de realizar esta análise.

Considerando os pontos de cortes 2+ para o anticorpo SP3 e 1+ para os anticorpos 4B5 e Herceptest como melhor ponto de corte definido pela curva ROC, os anticorpos SP3 e Herceptest foram os mais sensíveis na detecção da expressão do *HER-2* em relação ao DDISH com sensibilidade de 91,1% (IC95% 78,8 -97,5) para o SP3 e 97,8% para o Herceptest (IC95% 88,2- 99,9) em relação ao 4B5 que apresentou sensibilidade de 80,0% com intervalo de confiança de 95% (IC95% 65,4 - 90,4). Os 3 anticorpos apresentaram especificidades semelhantes com 94,9% (IC95% 92,2 -96,1), para o SP3, 93,4% (IC95% 91,0 – 95,3) para o 4B5 e 93,4% (IC95% 91,2 - 95,4) para o Herceptest. (Tabela 17)

Tabela 17 - Indicadores de acurácia das análises imuno-histoquímicas realizadas por SP3, 4B5 e Herceptest, considerando os pontos de corte obtidos pela curva ROC (padrão-ouro: DDISH positivo).

	SP3	4B5	Herceptest
Melhor ponto de corte (*)	2+	1+	1+
Sensibilidade	91,1 (78,8 – 97,5)	80,0 (65,4 – 90,4)	97,8 (88,2 – 99,9)
Especificidade	94,4 (92,2 – 96,1)	93,4 (91,0 – 95,3)	93,6 (91,2 – 95,4)
VP positivo	56,2 (44,1 – 67,8)	48,6 (36,9 – 60,6)	54,3 (42,9 – 65,4)
VP negativo	99,3 (98,1 – 99,8)	98,3 (96,9 – 99,2)	99,8 (99,0 – 100,0)
Área sob a curva ROC	0,96 (0,94 – 0,97)	0,89 (0,86 – 0,91)	0,98 (0,97 – 0,99)

(*) Ponto de corte definido pela curva ROC.

Considerando o ponto de corte arbitrário de 1+ para os 3 anticorpos definidos pela curva ROC, os anticorpos SP3 e Herceptest foram os mais sensíveis na detecção da expressão do *HER-2* em relação ao DDISH com sensibilidade de 97,8% (IC95% 88,2 -99,9) para os dois anticorpos e sensibilidade de 80% para 4B5 (IC95% 65,4 – 90,4). Em relação a especificidade, houve uma perda significativa com o uso do SP3 , 64,0%(IC95% 59,9 – 67,9) em relação ao 4B5 com especificidade de 93,4% (IC95% 91,0 – 95,3) e ao Herceptest que apresentou especificidade de 93,6% (IC95% 91,2 – 95,4) (Tabela 18).

Tabela 18 - Indicadores de acurácia das análises imuno-histoquímicas de *HER2* realizadas com SP3, 4B5 e Herceptest, considerando ponto de corte arbitrário estabelecido em “1+” (padrão-ouro: DDISH positivo).

	SP3	4B5	Herceptest
Ponto de corte arbitrário	1+	1+	1+
Sensibilidade	97,8 (88,2 – 99,9)	80,0 (65,4 – 90,4)	97,8 (88,2 – 99,9)
Especificidade	64,0 (59,9 – 67,9)	93,4 (91,0 – 95,3)	93,6 (91,2 – 95,4)
VP positivo	17,6 (13,1 – 22,9)	48,6 (36,9 – 60,6)	54,3 (42,9 – 65,4)
VP negativo	99,7 (98,5 – 100,0)	98,3 (96,9 – 99,2)	99,8 (99,0 – 100,0)
Área sob a curva ROC	0,96 (0,94 – 0,97)	0,89 (0,86 – 0,91)	0,98 (0,97 – 0,99)

Considerando o ponto de corte arbitrário de 2+ para os 3 anticorpos definido pela curva ROC, os anticorpos SP3 e Herceptest foram os mais sensíveis na detecção da expressão em relação ao DDISH com sensibilidade de 91,1% (IC95% 78,8 -97,5) para o SP3 e 86,7% (IC95% 73,2 -94,9) para o Herceptest. O 4B5 foi o menos sensível, com valores sensibilidade de 66,7% (IC95% 51,0 – 80,0).

Não houve diferenças de especificidade do 4B5 e Herceptest considerando o ponto de corte arbitrário em 2+ com valores de 98,9 (IC95% 97,7 – 99,6) e 98,4% (IC95% 97,0 – 99,3) respectivamente. O anticorpo SP3 apresentou uma perda de especificidade em relação aos demais anticorpos apresentando especificidade de 94,4% (IC95% 92,2 – 96,1) (Tabela 19).

Tabela 19 - Indicadores de acurácia das análises imuno-histoquímicas de *HER2* realizadas com SP3, 4B5 e Herceptest, considerando ponto de corte arbitrário estabelecido em “2+” (padrão-ouro: DDISH positivo).

	SP3	4B5	Herceptest
Ponto de corte arbitrário	2+	2+	2+
Sensibilidade	91,1 (78,8 – 97,5)	66,7 (51,0 – 80,0)	86,7 (73,2 – 94,9)
Especificidade	94,4 (92,2 – 96,1)	98,9 (97,7 – 99,6)	98,4 (97,0 – 99,3)
VP positivo	56,2 (44,1 – 67,8)	83,3 (67,2 – 93,6)	81,2 (67,4 – 91,1)
VP negativo	99,3 (98,1 – 99,8)	97,4 (95,8 – 98,5)	98,9 (97,7 – 99,6)
Área sob a curva ROC	0,96 (0,94 – 0,97)	0,89 (0,86 – 0,91)	0,98 (0,97 – 0,99)

Considerando o ponto de corte arbitrário de 3+ para os 3 anticorpos definido pela curva ROC, o Herceptest foi o que apresentou a melhor sensibilidade na detecção da expressão do *HER-2* em relação ao DDISH com sensibilidade de 64,4 (IC95% 48,8 – 78,1). Houve uma perda significativa da sensibilidade para os anticorpos SP3 e 4B5 com valores de

53,3 (IC95% 37,9 – 68,3) e 33,3 (IC95 20,0 – 49,0) respectivamente. Uma excelente especificidade para os três anticorpos foi observada considerando este ponto de corte arbitrário, com valores de 99,8 (IC95% 99,0 – 100,0) para o SP3 e 4B5 e valores de 100,0(IC95% 99,4 – 100,0) para o Herceptest. (Tabela 20).

Tabela 20 - Indicadores de acurácia das análises imuno-histoquímicas de *HER2* realizadas com SP3, 4B5 e Herceptest, considerando ponto de corte arbitrário estabelecido em “3+” (padrão-ouro: DDISH positivo).

	SP3	4B5	Herceptest
Ponto de corte arbitrário	3+	3+	3+
Sensibilidade	53,3 (37,9 – 68,3)	33,3 (20,0 – 49,0)	64,4 (48,8 – 78,1)
Especificidade	99,8 (99,0 – 100,0)	99,8 (99,0 – 100,0)	100,0 (99,4 – 100,0)
VP positivo	96,0 (79,6 – 99,9)	93,7 (69,8 – 99,8)	100,0 (87,7 – 100,0)
VP negativo	96,5 (94,6 – 97,8)	95,0 (93,0 – 96,6)	97,3 (95,6 – 98,4)
Área sob a curva ROC	0,96 (0,94 – 0,97)	0,89 (0,86 – 0,91)	0,98 (0,97 – 0,99)

A área sob a curva ROC demonstra uma sensibilidade maior para o anticorpo Herceptest, seguido do SP3 e 4B5 respectivamente (Figura 9).

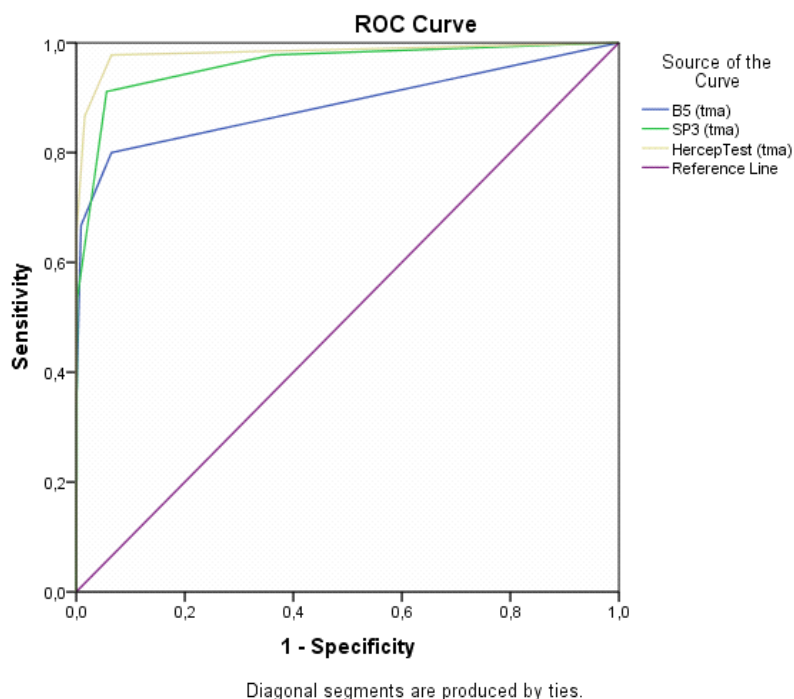


Figura 9 - Curvas ROC das análises imuno-histoquímicas realizadas por SP3, 4B5 e Herceptest

6.8 RESULTADOS DAS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DA EXPRESSÃO DE *HER2* COM O ANTICORPO 4B5 EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS GÁSTRICOS PRIMÁRIOS E EM SUAS RESPECTIVAS METÁSTASES

6.8.1 Comparação entre os resultados das reações imuno-histoquímicas para *HER2* nos carcinomas gástricos primários e respectivas metástases linfonodais

A expressão de *HER2* por imuno-histoquímica foi realizada com o anticorpo 4B5 em 19 carcinomas gástricos primários e em suas respectivas metástases linfonodais.

Dos 19 carcinomas gástricos primários 10 casos foram classificados com o escore 0 e 9 casos com o escore 3. Em relação à expressão de *HER2* nas respectivas metástases linfonodais, 9 casos foram classificados como escore 0 2 casos como escore 1 e 8 casos como escore 3. Agrupando-se os casos classificados com escore 0 e escore 1 (casos negativos), encontramos uma concordância de 100% entre os tumores primários e suas respectivas metástases linfonodais (Figura 10). Um caso de tumor primário classificado como escore 3, foi classificado como escore 0 na metástase linfonodal correspondente (Tabela 21).

Tabela 21 - Resultados das reações imuno-histoquímicas para *HER2* com o anticorpo 4B5 em carcinomas gástricos primários e suas respectivas metástases linfonodais

		Carcinomas gástricos primários		
		Escore 0	Escore 3	Total
Metástases em Linfonodos*	Escore 0	8	1	9
	Escore 1	2	0	2
	Escore 3	0	8	8
	Total	10	9	19

*P<0.001

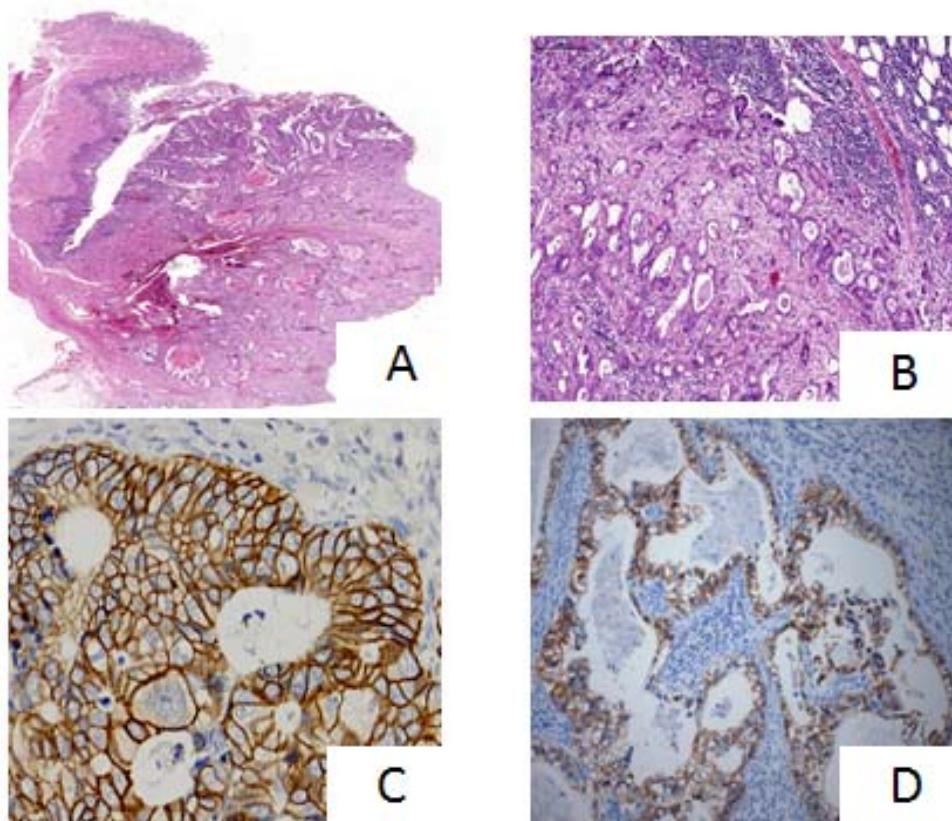


Figura 10 - Cortes convencionais de carcinoma gástrico com resultados concordantes para HER2 em tumor primário e metástase em linfonodo. **A:** Tumor primário corado por Hematoxilina e Eosina. **Aumento original 10x.** **B:** Metástase em linfonodo corado por Hematoxilina e Eosina. **Aumento original 10x.** **C:** Imuno-histoquímica para o anticorpo 4B5 com escore 3+ em tumor primário. **Aumento original 40x.** **D:** Imuno-histoquímica para o anticorpo 4B5 com escore 3+ em metástase de linfonodo. **Aumento original 20x.**

6.8.2 Resultados das reações Imuno-histoquímicas para *HER2* nos carcinomas gástricos primários e respectivas metástases à distância

A expressão de *HER2* por imuno-histoquímica com o anticorpo 4B5 foi determinada em 19 carcinomas gástricos primários e suas respectivas metástases à distância.

Dos 19 casos de tumores primários 10 deles foram classificados com escore 0 e 9 casos foram classificados com escore 3. As respectivas

metástases à distância mostraram 10 casos com o escore 0, 3 casos com escore 2 e 6 casos com escore 3 (Figura 11). Um caso classificado com escore 3 no tumor primário, foi classificado com escore 0 na metástase à distância. Três casos de metástases à distância classificados com escore 2 apresentaram resultados diferentes em relação aos carcinomas primários sendo 1 caso classificado como escore 0 e 2 casos com escore 3 (Tabela 22).

Tabela 22 - Resultados das reações imuno-histoquímicas com o anticorpo 4B5 em tumores gástricos primários e suas respectivas metástases à distância

		Tumor Primário		
		Escore 0	Escore 3	Total
Metástase à distância*	Escore 0	9	1	10
	Escore 2	1	2	3
	Escore 3	0	6	6
Total		10	9	19

*P<0.001

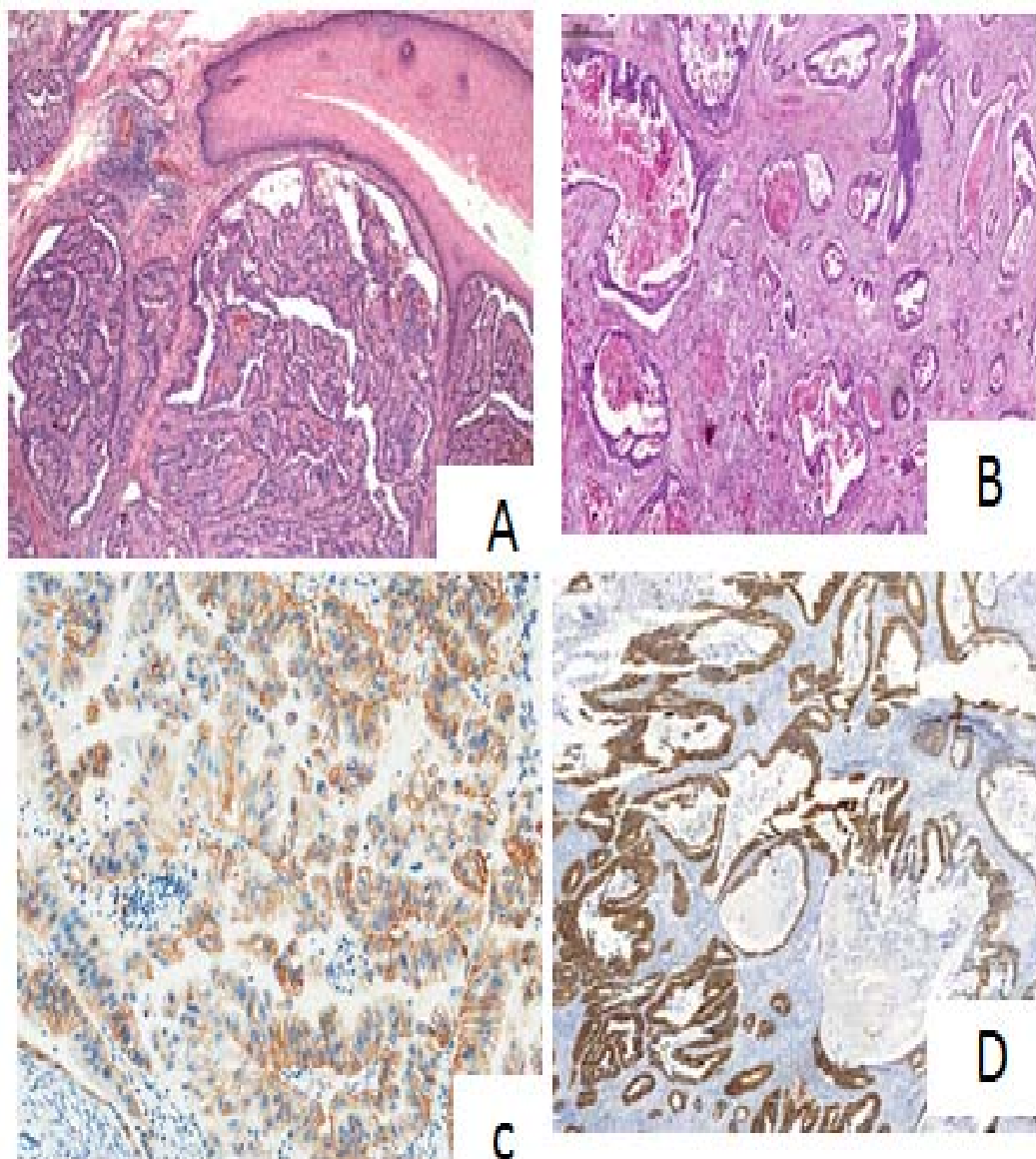


Figura 11 - Cortes convencionais de carcinoma gástrico com resultados concordantes em tumor primário e metástase à distância. **A:** Tumor primário corado por Hematoxilina e Eosina. Aumento original 20x. **B:** Metástase em fígado corado por Hematoxilina e Eosina. Aumento original 20x. **C:** Imuno-histoquímica para o anticorpo 4B5 com escore 3+ em tumor primário. Aumento original 40x. **D:** Imuno-histoquímica para anticorpo 4B5 com escore 3+ em fígado. Aumento original 20x.

6.9 RESULTADOS DA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* DE *HER2* POR DDISH NOS TUMORES GÁSTRICOS PRIMÁRIOS E SUAS RESPECTIVAS METÁSTASES

6.9.1 Resultados das hibridizações *in situ* de *HER2* por DDISH nos tumores gástricos primários e respectivas metástases linfonodais

As reações de hibridização *in situ* cromogênica (DDISH, Ventana) foram realizadas em 19 casos de tumores gástricos primários e suas respectivas metástases linfonodais, sendo 10 casos classificados como não amplificados (negativos) e 8 como amplificados (positivos). Tivemos problemas na análise de 1 caso que foi classificado como não avaliável na avaliação da metástase linfonodal e classificado como não amplificado no tumor gástrico primário. Houve discordância nos resultados de apenas um caso. Este foi classificado como amplificado no tumor primário e não amplificado na análise da metástase linfonodal (Tabela 23).

Tabela 23 - Resultados de Hibridização *in situ* de *HER2* obtidos pela técnica de DDISH em tumores gástricos primários e suas respectivas metástases linfonodais.

		Tumor Primário		
		Amplificado	Não Amplificado	Total
Metástases em linfonodos*	Não avaliável	0	1	1
	Amplificado	8	0	8
	Não amplificado	1	9	10
Total		9	10	19

*p=0.015

6.9.2 Resultados das hibridizações *in situ* de *HER2* por DDISH nos tumores gástricos primários e respectivas metástases à distância

As reações de hibridização *in situ* cromogênica (DDISH, Ventana) foram realizadas em 19 casos de tumores primários e suas respectivas metástases à distância, sendo 10 casos classificados como não amplificados (negativos) e 9 como amplificados (positivos). Houve uma concordância de 100% nos resultados obtidos por DDISH entre os tumores primários e suas respectivas metástases à distância (Tabela 24).

Tabela 24 - Resultados obtidos pela técnica de DDISH para *HER2* em tumores gástricos primários e suas respectivas metástases à distância.

		Tumor Primário		
		Amplificado	Não Amplificado	Total
Metastase à distância*	Amplificado	9	0	9
	Não amplificado	0	10	10
Total		9	10	19

P<0.001

6.10 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE *HER2* OBTIDOS POR IMUNO-HISTOQUÍMICA COM HERCEPTEST EM CORTES DE TMA DE CARCINOMAS GÁSTRICOS UTILIZANDO-SE 2 SISTEMAS DE INTERPRETAÇÃO

Para comparação dos resultados das reações imuno-histoquímicas com Herceptest em cortes de TMA, utilizamos 2 sistemas de interpretação de *HER2* nos carcinomas gástricos (HOFMANN et al. 2008; WOLFF et al. 2013).

Dos 216 casos avaliados utilizando as diretrizes de HOFMAN et al. (2008), para a interpretação dos carcinomas gástricos 132 casos foram classificados com escore 0, 56 casos classificados com escore 1 14 casos com escore 2, e 14 casos classificados com escore 3.

Utilizando as diretrizes propostas por WOLFF et al. (2013) para interpretação de *HER2* nos carcinomas mamários invasores, dos 216 casos avaliados, 131 casos foram classificados com escore 0, 62 casos classificados com escore 1, 17 casos classificados com escore 2 e 6 casos foram classificados com escore 3. Observamos que, no grupo de casos classificados com o escore 1 utilizando-se o sistema de escores para carcinomas mamários, 7 casos foram classificados com o escore 2 quando utilizado o sistema de escores para carcinomas gástricos. Dos 17 casos classificados com o escore 2 no sistema de escores para carcinomas mamários, 8 casos foram classificados com o escore 3, 1 caso classificado

com o escore 0 e 1 caso com escore 1 quando utilizamos o outro sistema de interpretação de HER2 para carcinomas gástricos (Tabela 25).

Tabela 25 - Resultados de imuno-histoquímica de *HER2* obtidos em cortes de carcinomas gástricos em TMA's com o anticorpo Herceptest utilizando dois sistemas diferentes de avaliação de escores.

Sistema de escore em câncer gástrico					
Sistema de escore em câncer de mama	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3	
Escore 0	122	9	0	0	131 (60,6%)
Escore 1	9	46	7	0	62 (28,7%)
Escore 2	1	1	7	8	17 (7,9%)
Escore 3	0	0	0	6	6 (2,8%)
Total	132 (61,1%)	56 (25,9%)	14 (6,5%)	14 (6,5%)	216 (100%)
Weighted Kappa ^a	0,785				
95% CI	0,721 to 0,848				

A concordância dos resultados para pesquisa da expressão de *HER2* foi boa (kappa 0,78 - IC95% 0,72 - 0,84), quando comparamos os dois sistemas de interpretação para *HER2* com o anticorpo Herceptest em cortes de TMA de carcinomas gástricos (Tabela 26)

Tabela 26 - Número de carcinomas gástricos com resultados concordantes e discordantes de acordo com os sistemas de escores de interpretação de imuno-histoquímica de *HER2*

Escores de interpretação	No de casos concordantes (%)	No de casos discordantes (%)	Total
Escore 0	122 (92,4%)	10 (7,6%)	132
Escore 1	46 (82%)	10 (18%)	56
Escore 2	7 (50%)	7 (50%)	14
Escore 3	6 (42,8%)	8 (57,2%)	14
Total	181 (83,8%)	35 (16,2%)	216 (100%)

7 DISCUSSÃO

O câncer de estômago é o tumor mais frequente do trato gastrointestinal, ocupando a quarta posição em incidência mundial, e a segunda causa de morte por câncer no mundo. Com exceção de alguns países asiáticos, a maior parte dos casos é diagnosticada em estágios avançados com poucas possibilidades de tratamento e cura (KAMANGAR et al. 2006; HU et al. 2012).

No Brasil observa-se que a taxa de incidência deste tumor é maior em homens do que em mulheres, numa proporção de cerca de 2:1 (Ministério da Saúde 2014). A nossa casuística também reflete este cenário sendo constituído predominantemente por homens.

A obesidade, ingestão de álcool e consumo de tabaco são alguns dos fatores que estão associados a maior probabilidade do desenvolvimento do câncer gástrico. Dados da pesquisa *Vigitel 2012*, do Ministério da Saúde, mostraram que 51% da população (acima de 18 anos) está acima do peso ideal. Entre os homens, o excesso de peso atinge 54% e entre as mulheres, 48%. A prevalência de fumantes e consumidores de bebidas alcoólicas é também superior no sexo masculino (Ministério da Saúde 2014). Esses índices podem explicar a maior incidência deste tumor no gênero masculino. No nosso estudo não tivemos acesso a estas informações, impedindo assim qualquer suposição ou conclusão a este respeito.

A utilização do Trastuzumabe associado à quimioterapia, após os resultados do estudo ToGA, tem como um grande desafio a seleção adequada dos pacientes que terão benefício com esse tratamento. Atualmente muitas questões permanecem sem respostas em relação à melhor metodologia e à amostra mais adequada para a determinação do estatus do *HER2* nos carcinomas gástricos.

A imuno-histoquímica tem sido o teste de escolha para avaliação do estatus de *HER2* em vários tipos de tumores, por ser uma técnica fácil, com boa reprodutibilidade, de baixo custo e com altos índices de correlação com técnicas de hibridização *in situ*. Há uma variedade crescente de anticorpos anti-*HER2* disponíveis comercialmente e vários estudos demonstraram a sensibilidade e especificidade desses anticorpos na determinação da superexpressão de *HER2* em câncer de mama (WOLFF et al. 2013).

NUNES et al. (2013), compararam a sensibilidade e especificidade dos anticorpos A0485 e Herceptest (DAKO, policlonal), CB11 (Novocastra, monoclonal de camundongo), SP3 (Neomarkers) e 4B5 (VENTANA, monoclonal de coelho) por IHC, usando o DDISH como padrão ouro em 200 casos pré-selecionados de carcinoma invasivo de mama distribuídos em um TMA. Houve uma concordância muito boa entre os cinco anticorpos anti-*HER2*. O CB11 foi o anticorpo mais específico, mas apresentou resultados com mais casos falso negativos. Os anticorpos A0485, SP3, 4B5 e Herceptest foram altamente sensíveis e específicos, mas com mais casos falsos positivos. Outros trabalhos comparativos utilizando anticorpos monoclonais de coelho e de camundongo, demonstraram maior desempenho

dos anticorpos monoclonais de coelho, e alta concordância com FISH e SISH, com alta reprodutibilidade entre laboratórios (POWELL et al. 2007; VAN DER VEGT et al. 2009; RHODES et al. 2010).

Em câncer gástrico, há poucos trabalhos na literatura comparando os resultados dos anticorpos anti-Her2 disponíveis comercialmente (BOERS et al. 2011; ABRAHÃO-MACHADO et al. 2013).

BOERS et al. (2011), compararam os anticorpos 4B5 e SP3 em adenocarcinoma gastro-esofágico em relação a dois métodos de hibridização *in situ* (FISH e SISH). O anticorpo 4B5 foi o mais sensível para a amplificação do *HER2*. As técnicas de FISH e SISH apresentaram resultados idênticos, mas a avaliação por SISH foi considerada mais fácil.

ABRAHÃO-MACHADO et al. (2013) compararam os anticorpos 4B5, SP3 e Herceptest em cortes convencionais e em TMA. Os autores concluíram que o uso do anticorpo 4B5 nos cortes convencionais foi o método de IHC mais acurado para a avaliação da expressão de HER2 em adenocarcinoma gástrico.

Contudo, no nosso estudo, o anticorpo 4B5 foi o menos sensível na detecção de casos com escore 3, sendo o Herceptest o mais sensível.

No nosso trabalho, avaliamos a expressão dos anticorpos do kit Herceptest, 4B5 e SP3 em carcinomas gástricos dispostos em TMAs seguindo protocolos pré-estabelecidos no A.C. Camargo Cancer Center para verificarmos se há diferenças nos resultados da imuno-histoquímica na dependência do anticorpo utilizado. Os anticorpos podem variar em relação à especificidade e sensibilidade, e dessa forma o anticorpo ideal seria o que

apresentasse a melhor sensibilidade para possibilitar a identificação de todos os pacientes que se beneficiarão do tratamento, e minimizar erros em casos falsos positivos que possam ocasionar efeitos indesejáveis decorrentes do tratamento, permitindo uma maior reprodutibilidade e menores variações inter-observadores (RÜSCHOFF et al. 2010).

O anticorpo SP3 e 4B5 são anticorpos monoclonais de coelho dirigidos contra o domínio extracelular e intracelular do receptor do *HER2*, respectivamente (BOERS et al. 2011). Essa geração de anticorpos monoclonais de coelho conjugou a especificidade dos anticorpos monoclonais e a sensibilidade dos anticorpos policlonais, o que representou um passo fundamental no aumento da sensibilidade e conseqüentemente melhor reprodutibilidade das reações de imunoistoquímica (ROSSI et al. 2005).

Atualmente o anticorpo 4B5 (Ventana) e HercepTest (DAKO) são os dois kits aprovados pelo FDA e EMA para pesquisa da expressão de *HER2* em câncer de mama e gástrico (RUSCHOFF et al. 2010).

Com relação à frequência dos casos classificados como positivos ou negativos no nosso estudo, como já mostrado por vários autores, a grande maioria dos casos foram classificados como negativos. Isto representa que alterações nos receptores dos genes de crescimento epidérmico não são as mais frequentemente relacionadas ao desenvolvimento dos carcinomas gástricos (BOERS et al. 2011; ABRAHÃO-MACHADO et al. 2013). Encontramos cerca de 7,2% dos carcinomas gástricos *HER2+*. Esta frequência esta de acordo com a literatura que apresentam estudos que

avaliaram o estatus do *HER2* por imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, com taxas de expressão e amplificação entre 7,0 a 34% (TAKEHANA et al. 2002; HOFMANN et al. 2008).

As maiores discordâncias em nosso estudo foram em relação aos resultados obtidos nos casos com escore 2+, que é o grupo de pacientes classificados como duvidosos pela IHC e que devem necessariamente ser testados pela hibridização *in situ*. Por ser um escore intermediário, dependendo do anticorpo utilizado ou metodologia de interpretação, os casos podem ser classificados como escore 1 ou escore 3. As duas situações podem representar situações clínicas complexas. Para os casos erroneamente classificados com o escore 1, não serão oferecidos oportunidades de pesquisar a amplificação por ISH, deixando-se de identificar um paciente que poderia se beneficiar com o uso do Trastuzumabe. Por outro lado, aqueles casos erroneamente classificados com escore 3, poderão fazer o uso do Trastuzumabe sem trazer benefício clínico, além de acarretar desperdício financeiro e possíveis efeitos colaterais.

No nosso estudo, 5 casos classificados com o escore 2+ com o uso do SP3 e amplificados pelo SISH, foram classificados como negativos ao utilizarmos os anticorpos 4B5 e Herceptest (escore 0 ou 1). Nesta situação, 5 pacientes deixariam de ser tratados com Trastuzumabe dependendo diretamente da escolha do anticorpo primário. Nesta situação, o anticorpo SP3 foi o melhor anticorpo para a identificação dos casos que deveriam ser testados por hibridização *in situ*, diminuindo a presença de falso-negativos,

aumentando a chance de detecção de pacientes elegíveis para o tratamento. Resultados semelhantes foram relatados por ABRAHÃO-MACHADO et al. (2013) ao analisarem esses mesmos marcadores em cortes de TMA, demonstrando um maior número de casos com escore duvidoso quando utilizado o anticorpo SP3.

O anticorpo 4B5 apresentou dois casos tipicamente falso-negativos, sendo estes 2 casos classificados como negativos (escore 0), e que a análise da mesma área, com os anticorpos SP3 e Herceptest, foi classificado com escore 3+ e escore 2+, respectivamente. Os 2 casos com resultados distintos na IHC mostraram a presença de amplificação por ISH, confirmando assim a menor sensibilidade do anticorpo 4B5.

Estudo prévio de BOERS et al. (2011) comparando-se os resultados obtidos com os anticorpos SP3 e 4B5, encontraram uma boa correlação por imuno-histoquímica e SISH nos adenocarcinomas gastro-esofágicos. A imuno-histoquímica para o SP3, segundo estes autores, produziu um padrão de marcação mais claro, sendo a avaliação mais rápida e fácil, uma vez que alguns casos apresentaram marcações citoplasmáticas ou nucleares quando utilizado o anticorpo 4B5. Entretanto, neste estudo 5 dos 22 casos amplificados por SISH foram negativos pela imuno-histoquímica quando utilizado o anticorpo SP3 e somente 1 de 19 casos amplificados foi classificado como negativo quando utilizaram o 4B5. O anticorpo 4B5 foi então considerado mais sensível que o SP3, apresentando também uma melhor correlação com os resultados do SISH. Em nosso estudo, marcação citoplasmática e nuclear em alguns casos utilizando o 4B5 também foi

observada, mas não interferiram no resultado final, uma vez que marcações inespecíficas não foram consideradas como positivas. O treinamento de profissionais em cursos de atualizações e o conhecimento de particularidades de determinados anticorpos e padrão de marcação são necessárias e indicadas, para evitar erros de interpretação do *HER2* nos casos de câncer gástrico (RUSCHOFF et al. 2012).

Os casos classificados com escore 0 e escore 3+, independente do anticorpo primário utilizado, são os mais facilmente identificados e concordantes quando avaliamos o estatus do *HER2* tanto em câncer de mama, como de estômago (BEGNAMI et al. 2011; BOERS et al. 2011).

O Herceptest foi o anticorpo com maior sensibilidade, especificidade, maior valor preditivo positivo e negativo quando adotamos qualquer valor de ponto de corte na curva ROC em relação aos demais anticorpos, seguido do anticorpo SP3. O anticorpo 4B5 quando comparado aos demais anticorpos analisados, foi o menos sensível na detecção da expressão de *HER2* por imuno-histoquímica nos carcinomas gástricos e de especificidade semelhante.

Em relação ao tipo de material utilizado para pesquisa de *HER2*, no nosso estudo comparamos os resultados obtidos nos cortes convencionais, representativos de uma amostra total do tumor, com os obtidos nos cortes de TMA, representativos de amostras parciais do tumor (2 cilindros de 1mm cada). Os resultados obtidos destas amostras mostraram uma excelente concordância em relação aos casos classificados como negativos. Observamos uma concordância de 20% dos casos classificados com o

escore 1 e escore 2. Nos casos classificados como escore 3 a concordância foi de 40.6% entre os materiais

As diferenças nos resultados de expressão de HER2 encontradas em cortes convencionais em relação aos cortes em TMA podem ser explicadas pela presença de heterogeneidade de expressão do HER2 característica em câncer gástrico, relatados por vários autores e não somente um efeito da amostra com o uso do TMA (HOFMANN et al. 2008; RÜSCHOFF et al. 2010; CHO et al. 2013).

WARNEKE et al. (2013), estudaram 454 carcinomas gástricos em cortes convencionais e cortes em TMA representativos dos mesmos blocos de parafina por imuno-histoquímica com o anticorpo 4B5 e por SISH. Observaram que cerca de 25% dos casos com superexpressão do *HER2* foram negativos quando avaliados em grupos de até 05 biópsias (TMA). 5% dos casos foi observada uma taxa de casos falsos positivos. Os autores concluíram que a avaliação do estatus do *HER2* em biópsias de carcinomas gástricos carrega um risco significativo de resultados falsos negativos.

Observamos em nosso estudo uma variação de cerca de 10% em relação aos resultados obtidos com o anticorpo 4B5 nos carcinomas gástricos analisados por imuno-histoquímica em TMA comparados aos resultados de SISH avaliados nos cortes convencionais. A limitação do tamanho da amostra, como no TMA, pode ser um viés na identificação dos casos elegíveis para o tratamento com o Trastuzumabe. De acordo com nossos resultados, sugerimos que o material ideal, para a pesquisa de

HER2 nos carcinomas gástricos é aquele com a maior representatividade tumoral na amostra.

Nos casos onde a disponibilidade do material é somente de amostras de biópsias, a quantidade mínima de 06 a 08 fragmentos é a recomendada para garantir uma avaliação mais precisa (RÜSCHOFF et al. 2012). A maior concordância entre os resultados tanto na imuno-histoquímica como nas hibridizações *in situ* foi observada na utilização dos cortes convencionais. Esses dados corroboram com a importância da representatividade tumoral das amostras nos casos de câncer gástrico na pesquisa de *HER2*.

Em relação à representatividade das amostras, ASIOLI et al. (2012) avaliaram o quanto o número de blocos de tecidos analisados ou os anticorpos utilizados podem influenciar nos resultados da imuno-histoquímica para *HER2* nas peças de gastrectomias. Um bloco para cada um dos 88 tumores primários e 60 tumores pareados (tumor primário e metástases) foi analisado por IHC, utilizando três diferentes anticorpos (Herceptest, CB11 e 4B5) e FISH. Dois adicionais blocos de tecidos do tumor primário foram testados por IHC se o resultado do primeiro bloco foi negativo. A concordância entre os 3 anticorpos foi de 94,5% (testando somente 01 bloco). Dois casos encontraram uma discrepância clinicamente significativa entre o tumor primário (escore 0) e metástases em linfonodos (escore 3+). A análise de blocos adicionais aumentou a sensibilidade (de 63% para 83%) e a acurácia (de 91% para 94%) da IHC quando comparada com os resultados do FISH. A avaliação de vários blocos pode potencialmente identificar um maior número de cânceres gástricos *HER2+*,

particularmente naqueles com heterogeneidade tumoral. De acordo com estes autores, a representatividade tumoral foi mais relevante do que a utilização de diferentes anticorpos. Na prática laboratorial, até por questões de custos, a reação de imuno-histoquímica é realizada somente em um bloco previamente selecionado pelo Patologista após a análise da área tumoral mais representativa na lâmina corada por Hematoxilina e Eosina (HE) e, somente nos casos duvidosos (escore 2) é solicitado a reação de hibridização *in situ* para confirmação do resultado.

A utilização de técnica de hibridização *in situ* é fundamental para a seleção de pacientes para o tratamento com Trastuzumabe, principalmente nos casos duvidosos. A técnica de Hibridização *in situ* fluorescente foi a pioneira na identificação desses casos na rotina diagnóstica, utilizada inclusive no estudo ToGA. Com o surgimento de novas técnicas de hibridização *in situ* sem a utilização da fluorescência, vários trabalhos foram realizados para comparar a concordância dessas duas técnicas (BOERS et al. 2011; GARCIA-GARCIA et al. 2011).

GARCIA-GARCIA et al. (2011), demonstraram uma concordância de 96,4% entre os resultados do FISH e DDISH em 166 carcinomas gástricos. Em nosso estudo houve uma boa concordância entre as técnicas, e embora ambos os testes (FISH e SISH) sejam aprovados pelo FDA e pela EMA, a utilização do SISH como a metodologia mais adequada para o câncer gástrico vem aumentando gradativamente. O SISH é uma metodologia que usa o campo claro e, portanto, permite a rápida identificação de focos de tumor *HER2* positivo em áreas heterogêneas, além de permitir um maior

acesso a esta técnica nos laboratórios que não possuem microscópio de fluorescência (RUSCHOFF et al. 2012). O SISH também tem a vantagem de permitir o armazenamento das lâminas por períodos longos, quando comparado ao FISH, cujas lâminas vão perdendo o sinal com o tempo.

Com base nos resultados obtidos e dados encontrados na literatura, concordamos e sugerimos o teste de SISH (DDISH) como melhor opção na identificação de casos amplificados com áreas heterogêneas em câncer gástrico.

Outra questão referente à análise do estatus do *HER2* nos carcinomas gástricos é se esta pesquisa pode ser feita somente nos tumores primários ou nas metástases.

As metástases dos pacientes com câncer gástrico são raramente ressecadas ou biopsiadas, e a concordância do estatus do *HER2* por imunohistoquímica entre tumor primário e lesões metastáticas, que não sejam em linfonodos, não tem sido frequentemente relatados (BOZZETTI et al. 2011; KIM et al. 2011a).

Em câncer da mama, alta concordância entre os resultados de *HER2* nos tumores primários e metástases linfonodais tem sido observada (CARDOSO. et al. 2001; SIMON et al. 2001). Entretanto, em metástases à distância a taxa de concordância encontrada tem sido baixa (CHANG et al. 2011; CHAN et al. 2012).

Neste estudo avaliamos a expressão de *HER2* por imunohistoquímica com o anticorpo 4B5 em 19 carcinomas gástricos primários e

em suas respectivas metástases linfonodais e metástases à distância de diversos sítios.

Observamos uma concordância de 100% entre os casos classificados como negativos por IHC nos tumores primários e suas respectivas metástases linfonodais. Houve discordância apenas em um caso classificado como positivo no tumor primário e negativo na metástase linfonodal, sendo este resultado confirmado com amplificação por SISH.

Na análise dos tumores primários e suas respectivas metástases à distância, houve discordância em apenas um caso que foi classificado com escore 3 no tumor primário e escore 0 na metástase.

Houve uma concordância de 100% nos resultados obtidos por SISH entre os tumores primários e suas respectivas metástases à distância.

KIM et al. (2011a) reportaram significativa discordância (17,2%) entre o tumor primário e metástase por IHC, mas não houve discordância quando estes casos foram analisados por FISH. Essas discordâncias foram atribuídas à presença de áreas heterogêneas nos tumores primários.

Resultados semelhantes aos nossos, foram reportados por BOZZETTI et al. (2011), que avaliaram 39 casos de tumores primários e suas respectivas metástases reportando uma taxa de concordância de 94,9% entre tumor primário e lesões metastáticas por imuno-histoquímica. SHIBATA et al. (2014) analisaram 37 casos de pacientes (9 biópsias e 28 peças cirúrgicas) com taxa de concordância em torno de 97% entre os tumores primários e suas respectivas metástases. Em ambos os estudos,

somente um caso discordante foi encontrado entre o tumor primário e metástase.

A elevada concordância observada nesses estudos e na nossa casuística, entre os resultados de *HER2* obtidos por imuno-histoquímica e hibridizações *in situ* (FISH ou SISH) em tumores primários e metástases correspondentes sugere que o estatus do *HER2* é mantido inalterado durante o processo metastático, permitindo desta forma que a análise do estatus do *HER2* seja realizada independente da origem do material (primário ou metastático). KIM et al. (2011a) demonstraram que nas lesões metastáticas a correlação positiva, que é quando o tumor primário é negativo e a metástase positiva, ocorreu em 2,4% dos 250 casos avaliados e a correlação negativa foi observada em 0,4%, e embora a correlação positiva seja maior que a correlação negativa, a incidência de ambas foi baixa.

IENI et al. (2014) analisaram 108 amostras de tumores primários e suas respectivas metástases linfonodais sincrônicas, com taxa de positividade para *HER2* de 17% e concordância de 90,74% entre as amostras. Discordância foi observada em 10 casos, sendo que 6 casos apresentaram correlação inversa, ou seja eram positivos no tumor primário e negativos nas metástases, enquanto que 4 casos apresentaram correlação positiva. Os autores concluem que embora a análise do estatus do *HER2* não seja mandatória nos tumores primários e suas respectivas metástases, essas discordâncias podem ter um significado relevante no manejo e tratamento dos pacientes com câncer gástrico *HER2+*.

Como existem poucos trabalhos na literatura com uma casuística representativa, achamos que mais investigações com um número maior de casos são necessárias para reforçar essa avaliação pois, como consequência, a análise de metástases linfonodais ou à distância podem fornecer informações adicionais importantes para os pacientes, uma vez que pode ser de ajuda na identificação de possíveis candidatos elegíveis para o tratamento com o Trastuzumabe, mesmo em pacientes com tumores primários negativos para *HER2*.

Entre os sistemas de escore para *HER2* em câncer de mama, o HercepTest (Dako Denmark A/S. Glostrup, Denmark) é frequentemente o kit IHC de escolha para avaliar super-expressão de *HER2*. O sistema de escore proposto pela ASCO/CAP é baseado na intensidade da reatividade, se esse padrão de marcação de membrana é completo ou incompleto e a porcentagem de células neoplásicas marcadas. Este sistema de escore foi validado para câncer de mama e não leva em conta diferenças histológicas entre áreas distintas de um mesmo tumor.

HOFMANN et al. (2008), propuseram a validação de um sistema de escore para avaliação de HER-2 em câncer gástrico, tendo em vista a grande variedade de taxas de positividade para HER-2 e as diferenças relacionadas ao padrão de marcação de membrana incompleta, tipicamente com a forma em U, muito mais comum em câncer gástrico do que em câncer de mama e em relação ao nível de heterogeneidade do tumor. Foram avaliados 168 casos, que apresentaram 18 amostras (10,7%) classificadas com escore 3+ por imuno-histoquímica utilizando o sistema de escore de

câncer de mama. A concordância entre IHC e FISH foi de 93,5%, com uma concordância de 100% para os casos classificados com escore 3+. A análise de FISH resultou numa positividade em 29 casos. Observou-se uma diferença em 11 casos que foram FISH positivo e classificados como IHC negativa (IHC 0, IHC1+) ou equivocada (IHC 2+) usando o sistema de escore para câncer de mama. Para avaliar as razões dessas discrepâncias, elas foram categorizadas em 3 grupos distintos.

O primeiro grupo compreendeu alguns casos com imunoreatividade intensa, mas com < 10% das células marcadas. Este grupo exibiu um pequeno número de células marcadas com escore 3+ em uma área tumoral <10%, e de acordo com o critério do escore HercepTest, essas amostras foram classificadas com escore IHC 0, embora tenham sido FISH+ na mesma área. O segundo grupo compreendeu 07 amostras com reatividade basolateral incompleta de membrana que foram classificadas com escore IHC 0 e IHC 1+, não sendo portanto encaminhadas para realização do FISH. Duas dessas amostras foram FISH +. O grupo final compreendeu amostras com reatividade de membrana completa e intensidade moderada de marcação (IHC 2+ usando o sistema de escore de mama). Neste grupo, 36% dos casos 2+ foram também FISH+.

A validação desse estudo resultou em um sistema de escore para avaliação do HER2 por IHC no câncer gástrico estabelecendo critérios de avaliação tanto para peças cirúrgicas como para biopsias.

PARK et al. (2012), avaliaram 1091 casos dispostos em TMA, utilizando os dois sistemas de escore, *Gastric Cancer Scoring System*

(GCSS) e *Breast Cancer Scoring System* (BCSS), comparando a correlação da expressão proteica do *HER2*, com uso dos anticorpos 4B5 e Herceptest com a amplificação do número de cópias por SISH. Usando o dual-SISH como padrão de comparação, os autores avaliaram a sensibilidade e especificidade dos resultados das reações de imuno-histoquímica utilizando os dois sistemas de escore. O sistema GCSS encontrou significativo aumento da sensibilidade comparado com o BCSS, independente do anticorpo utilizado. A especificidade foi maior no BCSS comparado ao GCSS. Como o sistema GCSS apresentou uma maior sensibilidade na avaliação da expressão do *HER2* em câncer gástrico, os autores sugerem a utilização desse sistema como mais indicado para esse tipo de tumor.

Em nosso estudo, também encontramos uma boa concordância entre os resultados em relação aos sistemas de interpretação de *HER2* (escores da mama vs gástrico) nos carcinomas gástricos. As maiores e mais importantes discordâncias estão no escore 3. O sistema de interpretação de *HER2* gástrico foi capaz de identificar maior número de casos positivos, permitindo assim uma melhor seleção de pacientes elegíveis para o tratamento.

Utilizando-se o sistema de interpretação de *HER2* da mama, observamos um maior número de casos classificados com escore 2. Estes casos são necessariamente submetidos ao teste de ISH, sendo assim, a utilização deste sistema aumenta o custo financeiro decorrente da realização de ISH, em casos que não necessitariam deste teste se avaliados pelo sistema de interpretação do *HER2* gástrico. Portanto, em concordância com

dados prévios da literatura, recomendamos a utilização do sistema de interpretação do HER2 proposto para câncer gástrico.

De modo geral, observamos que a frequência de casos HER2 positivos no nosso estudo (7,2%) é um pouco menor daquelas descritas na literatura HOFMANN et al. (2008), com muitos estudos demonstrando valores maiores de 15% a 25% (HOFMANN et al. 2008; ZHANG et al. 2009). Dados já publicados de estudo prévio do nosso grupo com 221 carcinomas gástricos dispostos em TMA e utilizando-se Herceptest mostrou 9% de casos com escore 2 e 3% com escore 3 e uma taxa geral de amplificação de 8% quando utilizado o FISH (BEGNAMI et al. 2011).

Uma possível explicação a essa menor taxa de positividade é referente ao período de estudo. A seleção dos materiais e respectivos blocos de parafina compreenderam o período de 1980 a 2006, e dados referentes ao processo e tempo de fixação desses materiais não estavam disponíveis e não eram controlados. A questão pré-analítica, que envolve a fixação, processamento e emblocamento do material antes dos cortes, são etapas fundamentais para o sucesso de uma boa preservação do material. A fixação inadequada é o mais comum e importante causador de artefatos que impossibilitam as análises dos testes de *HER2*, sendo importante o uso de fixadores tamponados como o formol a 10% e controle no tempo de fixação mínimo de 8 horas e máximo de 72 horas para as peças cirúrgicas e biópsias (MIDDLETON et al. 2009; WOLFF et al. 2013).

8 CONCLUSÃO

De acordo com nossos achados podemos concluir que:

- O anticorpo mais sensível para a pesquisa da expressão da proteína HER2 por imuno-histoquímica foi o Herceptest (Dako) em comparação com o SP3 e 4B5; porém não houve diferença entre os anticorpos em relação às taxas de especificidade.
- O melhor material para pesquisa da expressão e/ou amplificação de *HER2* nos carcinomas gástricos é aquele com área mais representativa do tumor, no nosso estudo, lâminas de cortes convencionais;
- Os carcinomas gástricos apresentaram áreas heterogêneas tanto histológicas como de marcação do *HER2* tanto na imuno-histoquímica como nos testes de hibridização *in situ* em torno de 31,9% dos casos avaliados.
- O teste de DDISH é melhor que o FISH na identificação de casos amplificados com áreas heterogêneas;
- A análise da expressão e/ou amplificação do gene *HER2* pode ser realizada no tumor primário ou nas suas respectivas metástases;
- O escore de interpretação para câncer gástrico proposto por Hofmann e colaboradores (2008) é o mais apropriado para interpretação da expressão do *HER2*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahão-Machado LF, Jácome AAA, Wohnrath DR, et al. HER-2 in gastric cancer: Comparative analysis of three different antibodies using whole-tissue sections and tissue microarrays. **World J Gastroenterol** 2013; 19:6438-46.

Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. **J Clin Oncol** 2000; 18:2201-9.

Altman DG. **Practical statistics for medical research**. London: Chapman and Hall; 1991.

Asioli S, Maletta F, Verdun di CL, et al. Approaching heterogeneity of human epidermal growth factor receptor 2 in surgical specimens of gastric cancer. **Hum Pathol** 2012; 43 2070-9.

Bang Yung-Jue, Cutsem EV, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2- positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomized controlled trial. **Lancet** 2010; 376:687-97.

Begnami MD, Campos AH, Silva E, et al. Expressão imuno-histoquímica de c-erb-B2 e p53 em carcinomas gástricos. **J Bras Patol Med Lab** 2005; 41:279-86.

Begnami MD, Fukuda E, Fregnami JH, et al. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. **J Clinical Oncol** 2011; 29:3030-26.

Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, et al. Recent patterns in gastric cancer: a global overview. **Int J Cancer** 2009; 125:666-73.

Bilous M, Osamura RY, Rüschoff J, et al. HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. **Hum Pathol** 2010; 41:304-5; author reply 305-6.

Boers JE, Meeuwissen H, Methorst N. HER-2 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.

Bozzetti C, Negri FV, Lagrasta CA, et al. Comparison of HER2 status in primary and paired metastatic. **Br J Cancer** 2011; 104:1372-6.

Cardoso F, Di Leo A, Larsimont D, et al. Evaluation of HER2, p53, bcl-2, topoisomerase II-alpha, heat shock proteins 27 and 70 in primary breast cancer and metastatic ipsilateral axillary lymph nodes. **Ann Oncol** 2001; 12:615-20.

Chan A, Morey A, Brown B, Hastrich D, Willsher P, Ingram D. A retrospective study investigating the rate of HER2 discordance between primary breast carcinoma and locoregional or metastatic disease. **BMC Cancer** 2012; 12:555.

Chang HJ, Han SW, Oh DY, et al. Discordant human epidermal growth factor receptor 2 and hormone receptor status in primary and breast cancer and response to trastuzumab. **Jpn J Clin Oncol** 2011; 41:593-9.

Chen J, Bu XL, Wang QY, Hu PJ, Chen MH. Decreasing seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection during 1993-2003 in Guangzhou Southern China. **Helicobacter** 2007; 12:164-9.

Cho EY, Srivastava A, Park K, et al. Comparison of four immunohistochemical tests and FISH for measuring HER2 expression in gastric carcinomas. **Pathology** 2012; 44:216-20.

Cho BC, Jeung HC, Choi HJ, et al. Prognostic impact of resection margin involvement after extended (D2/D3) gastrectomy for advanced gastric cancer: a 15-year experience at a single institute. **J Surg Oncol** 2007; 95:461-8.

Cho EY, Park K, Do I, et al. Heterogeneity of ERBB2 in gastric carcinomas: a study of tissue microarray and matched primary and metastatic carcinomas. **Mod Pathol** 2013; 26:677-84.

Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1996; 5:477-81.

Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. **World J Gastroenterol**. 2006; 12:354-62.

Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. **N England J Med** 2006; 355:11-20.

Daniel G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **Lancet** 2005; 366:1784-93.

Dimitrios H. Roukos target gastric cancer with trastuzumab: new clinical practice and innovative developments do overcome resistance. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:14-17.

D'Ugo D, Rausei S, Biondi A, Persiani R. Preoperative treatment and surgery in gastric cancer: friends or foes? **Lancet Oncol** 2009; 10:191-5.

El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. **Gastroenterology** 2003; 124:1193-201.

Eslick GD. Helicobacter pylori infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic, and experimental evidence. **World J Gastroenterol** 2006; 12:2991-9.

Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. **Cancer Res** 2000; 60:1383-7.

García-García H, Martín-Gomes C, Ângulo B, 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** 2011; 59:8-17.

Garcia I, Vizoso F, Martín A, et al. Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER2 receptor in resectable gastric cancer. **Ann Surg Oncol** 2003; 10:234-41.

Herceptin EU, Sm PC. Herceptin. Available from: <URL:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion/human/000278/WC500117821.pdf> [2015 jan 12]

Hetzel DJ, Wilson TO, Keeney GL, Roche PC, Cha SS, Podratz KC. HER-2/neu expression: a major prognostic factor in endometrial cancer. **Gynecol Oncol** 1992; 47:179-85.

Hirashima N, Takahashi W, Yoshii S, Yamane T, Ooi A. Protein overexpression and gene amplification of c-erb B-2 in pulmonary carcinomas: a comparative immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization study. **Mod Pathol** 2001; 14:556-62.

Hofman P, Waidner B, Hofman V, Bereswill S, Brest P, Kist M. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter** 2004; 9 Suppl1:15-22.

Hofmann M, Stoss O, Shi D, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. **Histopathology** 2008; 52:797-805.

Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: classification, histology and application of molecular pathology. **J Gastrointest Oncol** 2012; 3:251-61.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:341-54. Erratum in: **Nat Rev Cancer** 2005; 5:580.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **GLOBOCAN 2012**: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Available from: < http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx> [2014 out 15].

leni A, Barresi V, Caltabiano R, et al. Discordance rate of HER2 status in primary gastric carcinomas and synchronous lymph node metastases: a multicenter retrospective analysis. **Int J Mol Sci** 2014; 15:22331-41.

Ishaq S, Jankowski JA. Barrett's metaplasia: clinical implications. **World J Gastroenterol** 2001; 7:563-5.

Jewell E, Secord AA, Brotherton T, Berchuck A. Use of trastuzumab in the treatment of metastatic endometrial cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2006; 16:1370-3.

Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce disparities in different geographic regions of the world. **J Clin Oncol** 2006; 24:2137-50.

Kaptain S, Tan LK, Chen B. Her-2/neu and breast cancer. **Diagn Mol Pathol** 2001; 10:139-52.

Kim MA, Lee H-J, Yang H-K, Bang Y-J, Kim WH. Heterogeneous amplification of ERBB2 in primary lesions is responsible for the discordant ERBB2 status of primary and metastatic lesions in gastric carcinoma. **Histopathology** 2011a; 59:822-31.

Kim SS, Ruiz VE, Carroll JD, Moss SF. Helicobacter pylori infection and gastric cancer and gastric lymphoma. **Cancer Lett** 2011b; 305:228-38.

Koizumi Y, Tsubono Y, Nakaya N, et al. Cigarette smoking and the risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan. **Int J Cancer** 2004; 112:1049-55.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Koriyama C, Akiba S, Corvalan A, et al. Histology-specific gender, age and tumor-location distributions of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Japan. **Oncol Rep** 2004; 12:543-7.

La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Gentile A. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. **Cancer** 1992; 70:50-5.

Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at histoclinical classification. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1965; 64:31-49.

Lee SA, Kang D, Shim KN, Choe JW, Hong WS, Choi H. Effect of diet and *Helicobacter pylori* infection to the risk of early gastric cancer. **J Epidemiol** 2003; 13:162-8.

Marx AH, Tharun L, Muth J, et al. HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. **Hum Pathol** 2009; 40:769-77.

Middleton LP, Price KM, Puig P, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. **Arch Pathol Lab Med** 2009; 133:775-80.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Neves JI, Begnami MD, Arias V, Santos GC. Antigen retrieval methods and estrogen receptor immunoexpression using 1D5 antibody: a comparative study. **Int J Surg Pathol** 2005; 13:353-7.

Nunes CB, Rocha RM, Buzelin MA, et al. False positivity in HER2 testing of breast cancer: novel paths for approaching an old dilemma. **J Clin Pathol** 2013; 66:946-50.

Olayione MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. **EMBO J** 2000; 19:3159-67.

Park YS, Hwang HS, Park HJ, 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.

Parsonnett J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. **N England J Med** 1991; 325:1127-31.

Parsonnet J. The incidence of Helicobacter pylori infection. **Aliment Pharmacol Ther** 1995; 9 Suppl 2:45-51.

Powell WC, Hicks DG, Prescott N, et al. A new rabbit monoclonal antibody (4B5) for the immunohistochemical (IHC) determination of the HER2 status in breast cancer: comparison with CB11, fluorescence in situ hybridization (FISH), and interlaboratory, reproducibility. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2007; 15: 94-102.

Rabenhorst SH, Bacchi CE. Expressão de citoceratina 20 em carcinomas do pulmão. **J Bras Patol** 1995; 31:20-5.

Rhodes A, Sarson J, Assam EE, et al. The reliability of rabbit monoclonal antibodies in the immunohistochemical assessment of estrogen receptors, progesterone receptors, and HER2 in breast carcinomas. **Am J Clin Pathol** 2010; 134:621-32.

Ross JS, Slodkowsks EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagvi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. **Oncologist** 2009; 14:320-68.

Rossi S, Laurino L, Furlanetto A, et al. Rabbit Monoclonal antibodies: a comparative study between a novel category of immunoreagens and the corresponding mouse monoclonal antibodies. **Am J Clin Pathol** 2005; 124:295-302.

Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, et al. HER2 testing in gastric cancer: a practice approach. **Mod Pathol** 2012; 25:637-50.

Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, et al. HER2 diagnostics in gastric cancer – guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. **Virchows Arch** 2010; 457:299-307.

Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. **N Engl J Med** 2007; 357:1810-20.

Sasako M, Kinoshita T, Furukawa H, et al. Five-year results of the randomized phase III trial comparing S-1 monotherapy versus surgery alone for stage II/III gastric cancer patients after curative D2 gastrectomy (ACTS-CG study). **Ann Oncol** 2010; 21:viii225-249.

Schulmacher C, Reim D, Novotny A. Neoadjuvante treatment for gastric cancer. **J Gastric Cancer** 2013; 13:73-8.

Shibata R, Nimura S, Hashimoto T, 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** 2014; 2:751-5.

Shinohara H, Morita S, Kawai M, et al. Expression of HER2 in human gastric cancer cells directly correlates with antitumor activity of a recombinant disulfide-stabilized anti-HER2 immunotoxin. **J Surg Res** 2002; 102:169-77.

Simon R, Nocito A, Hübscher T, et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:1141-6.

Takehana T, Kunitomo K, Kono K, et al. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immuno-sorbent assay. **Int J Cancer** 2002; 98:833-7.

Talley NJ, Zinsmeister AR, Weaver A, et al. Gastric adenocarcinoma and Helicobacter pylori infection. **J Natl Cancer Inst** 1991; 83:1734-9.

Tkachenko MA, Zhannat NZ, Erman LV, et al. Dramatic changes in the prevalence of Helicobacter pylori infection during childhood: a 10 year follow-up study in Russia. **J Pediatric Gastroenterol Nutr** 2007; 45: 428-32.

Tripathy D, Slamon DJ, Cobleigh M, et al. Safety of treatment of metastatic breast cancer with trastuzumab beyond disease progression. **J Clin Oncol** 2004; 22:1063-70.

Warneke VS, Behrens HM, Böger C, et al. Her2/neu testing in gastric cancer: evaluating the risk of sampling errors. **Ann Oncol** 2013; 24:725-33.

Wilke H, Preusser P, Fink U, et al. Preoperative chemotherapy in locally advanced and nonresectable gastric cancer: a phase II study with etoposide, doxorubicin, and cisplatin. **J Clin Oncol** 1989; 7:1318-26.

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. 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. **J Clin Oncol** 2013; 31:3997-4013.

Wu WK, Cho CH, Lee CW, et al. Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. **Cancer Lett** 2010; 295:144-53.

Yamashita K, Sakuramoto S, Watanabe M. Genomic and epigenetic profiles of gastric cancer potential diagnostic and therapeutic applications. **Surg Today** 2011; 41:24-38.

Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. **Gastric Cancer** 2005; 8:86-94.

Ychou M, Boige V, Pignon JP, et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. **J Clin Oncol** 2011; 29:1715-21.

Van der Vegt B, de Bock GH, Bart J, et al. Validation of the 4B5 rabbit monoclonal antibody in determining Her2/neu status in breast cancer. **Mod Pathol** 2009; 22:879-86.

Vassallo J, Pinto GA, Alvarenga JM, Zeferino LC, Chagas CA, Metze K. Comparison of immunoexpression of 2 antibodies for estrogen receptors (1D5 and 6F11) in breast carcinomas using different antigen retrieval and detection methods. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2004; 12:177-82.

Zhang XL, Yang YS, Xu DP, et al. Comparative study on overexpression of her2/neu and her3 in gastric cancer. **World J Surg** 2009; 33:2112-8.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 03 de setembro de 2013.

A

Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami.

Aluno: José Ivanildo Neves (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1527/11

“HER2 e carcinomas gástricos: Padrão de expressão e metodologias para detecção”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 03/09/2013, tomaram conhecimento e solicitam esclarecimentos dos seguintes documentos:

- Comunicado de alteração de título do estudo em referência, de “*HER2 e carcinomas gástricos: Protocolos de interpretação e metodologias para detecção*” para “*HER2 e carcinomas gástricos: Padrão de expressão e metodologias para detecção*”, em carta datada de 06 de agosto de 2013;
- **Relatório de Acompanhamento do estudo em referência, datado de 06 de agosto de 2013.**

Parecer do CEP: Pesquisador pede solicitação de alteração de título do projeto, o qual foi considerado aprovado.

Pesquisador incluiu também relatório de acompanhamento de projeto. Porém as informações do andamento do projeto não foram devidamente preenchidas.

Solicita-se então, que seja enviado novo formulário de acompanhamento com as informações completamente preenchidas.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Protocolo de Construção de TMA

As amostras representativas dos tumores foram resgatadas do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center. Novos cortes histológicos foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (HE). Através do exame de microscopia óptica, as áreas representativas do tumor foram identificadas e marcadas. Procedeu-se então à marcação do bloco de parafina (bloco doador) na área escolhida, com caneta permanente.

Utilizando o *tissue microarray* (Beecher Instrument, Silver Spring, MD, USA) foram extraídos os cilindros das áreas marcadas, e os mesmos transferidos para novos blocos de parafina (bloco receptor). Cada caso foi representado em duplicata, com a obtenção de dois cilindros de 1mm cada, de duas áreas distintas e representativas do tumor. Cortes histológicos destes blocos foram obtidos e dispostos em lâminas adequadas para posterior realização dos estudos de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*.

Foi utilizado um sistema de coordenadas, a partir de tabelas em Excel, para a determinação e identificação exata dos casos no TMA, tendo como referência o cilindro de tecido placentário ou hepático.

Anexo 3 - Protocolo de Imuno-histoquímica automatizada

Cortes histológicos de 3µm de espessura, dispostos em lâminas de vidro carregadas com cargas (Starfrost) foram mantidos em estufa a 60°C por 24 horas. Foi realizado a desparafinização das lâminas em 3 passagens em xilol, por 5 minutos cada , seguido de banho em álcool 70%, 80% 100% e hidratação em água corrente. Após a recuperação antigênica por calor foram adotados os protocolos recomendados do Fabricante do anticorpo primário, seguido de bloqueio de peroxidase endógena com água oxigenada 10V, a 3%. Foi então utilizado o anticorpo primário conforme a concentração e tempo de incubação pré-estabelecido durante a padronização do experimento. A detecção da reação antígeno/anticorpo foi realizada com sistemas a base de polímeros conforme orientações do fabricante. A revelação foi feita com 3'3-tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB) e a contra-coloração com hematoxilina (Ventana). Após a desidratação por banhos sucessivos em álcool 70%, 85% 100% foi realizada a montagem das lâminas no equipamento com Tissue Tek film (Sakura). Entre cada etapa do processo, foram realizados múltiplos banhos em tampão de lavagem Reaction Buffer (Ventana).

Anexo 4 - Protocolo do Herceptest

Cortes histológicos de 3µm de espessura, dispostos em lâminas de vidro carregadas com cargas (Starfrost) foram mantidos em estufa a 60°C por 24 horas. Foi realizado a desparafinização das lâminas em 3 passagens em xilol, por 5 minutos cada , seguido de banho em álcool 70%, 80% 100% e hidratação em água corrente. Após a recuperação antigênica por calor no banho-maria à 96°C, por 40 minutos, as lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente por 20 minutos e lavadas 2x em tampão de lavagem, seguido de bloqueio de peroxidase endógena com água oxigenada, 2x 5 minutos. Foi então utilizado o anticorpo primário pronto para uso por 30 minutos à temperatura ambiente. A detecção da reação antígeno/anticorpo foi realizada com o sistema de detecção Envision, por 30 minutos à temperatura ambiente, seguido de duas lavagens em tampão. A revelação foi feita com 3'3-tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos e a contra-coloração com hematoxilina de Harris por 2 minutos. Após a desidratação por banhos sucessivos em álcool 70%, 85% 100% foi realizada a montagem das lâminas no equipamento com Tissue Tek film (Sakura). Entre cada etapa do processo, foram realizados múltiplos banhos em tampão de lavagem Reaction Buffer (Ventana).

Anexo 5 - Protocolo De Hibridização *in situ* (FISH)

Os cortes histológicos de 3 µm de espessura foram colocados em lâminas de vidro carregadas com cargas (Starfrost). Em seguida, as lâminas foram submetidas à desparafinização com 3 passagens em xilol por 10 minutos cada a temperatura ambiente. Procedeu-se então a 3 passagens em álcool absoluto e lavagem em água destilada (3 passagens de 5 minutos cada). As lâminas foram colocadas em solução de 0,2N HCL (ácido clorídrico) por 20 minutos a temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente por 5 minutos. As lâminas foram pré-tratadas em solução de Citrato 0,1N (ácido Cítrico/MERCK), pH 6,0 em banho-maria pré-aquecido a 80°C por uma hora sendo então submetidas a digestão enzimática com pepsina (pronta para uso - DAKO) em concentração estabelecida pelo fabricante por 8 minutos a temperatura ambiente. Após serem lavadas com solução 2x SSC (Sodium citrate, Sodium chloride/DAKO) por 2 minutos, desidratadas em álcool em concentrações crescentes (75%, 80% e 100% por 2 minutos cada), secas em temperatura ambiente por 5 minutos, foram aplicados 10 microlitros da sonda em concentração pré-estabelecida pelo fabricante (HER-2/CEN17 - Vysis) recobertas com lamínula 22 x 22 mm e vedadas com material selante (Selante – DAKO). As lâminas foram colocadas no equipamento (Hybridizer - DAKO®) para co-denaturação por 5 minutos a 82°C e hibridação por 20 horas a 45°C conforme indicações do fabricante. No segundo dia, as lâminas foram retiradas do equipamento, removido o selante e lamínula e mergulhadas em solução pré-aquecida de UREA(Merck) 1,5M/0,1 x SSC em banho maria pré-aquecido a 45°C por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em solução 2x SSC por 2 minutos a temperatura ambiente, passando-as em álcool em concentrações crescente (75%, 80% 100% por 2 minutos cada) para desidratação. As lâminas secaram em temperatura ambiente, para então serem contracoradas com 15 µl de DAPI (Vysis) e colocação de lamínula 24 x 40 mm.

Anexo 6 - Protocolo de Hibridização *in situ* (DDISH)

A primeira reação utiliza uma sonda genômica anti HER-2/*neu* de aproximadamente 200.000 pares de bases conjugada ao DNP(2,4-Dinitrophenol), e a detecção é feita através da precipitação pela prata.

A segunda reação utiliza uma sonda de oligonucleotídeo anti-centrômero do cromossomo 17(CEP17), de aproximadamente 45 pares de bases conjugada ao DNP, e a detecção é feita através da precipitação da fosfatase alcalina.

As reações foram realizadas no equipamento Benchmark XT (VENTANA), seguindo protocolo pré-estabelecido e padronizado : Após a desparafinização as lâminas foram submetidas a 3 ciclos de incubação em solução Cell Conditionin CC2, ciclo 1 incubação de 8 minutos, ciclo 2 incubação de 12 minutos e ciclo 3 incubação de 12 minutos. A digestão enzimática foi realizada com ISH Protease 3 por 12 minutos, seguida da aplicação da sonda HER2 DNP CHR17 DIG com desnaturação a 80°C durante 20 minutos e hibridação a 72°C por 6 horas. Na seqüência, incubação com Multimer SISH, consistindo de 1 gota SIL ISH DNP HRP por 16 minutos 1 gota do cromógeno de prata SIL ISH DNP CHRC por 4 minutos, seguido de incubação com Multimer ISH vermelho que consiste de 1 gota RED ISH DIG AP por 24 minutos e 1 gota cromógeno vermelho RED ISH DIG FR por 8 minutos. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina II por 24 minutos, seguido de incubação pós contrastante com Bluing Reagent por 4 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente, e secas em estufa a 60°C por 15 minutos e montadas no equipamento com Tissue Tek film (Sakura). Entre cada etapa do processo, foram realizados múltiplos banhos em tampão de lavagem Reaction Buffer (Ventana).