

Avaliação de prevalência e correlação clinicopatológica da positividade de HER-2 em câncer gástrico no serviço de Oncologia da Santa Casa de Belo Horizonte

Mirielle Nogueira Martins^{1*} e Sebastião Cabral

¹Orientador: Dr. Sebastião Cabral Filho – Chefe do Serviço de Oncologia Clínica da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte – MG. Chefe da Clínica Oncológica do Hospital Belo Horizonte – MG. Coordenador da Especialização em Cancerologia Clínica da Santa Casa.

*Residente em Oncologia Clínica na Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte

Contato: Mirielle Nogueira Martins, R. Rodrigues Caldas 590/208; 30190-120; Belo Horizonte/MG

PALAVRAS-CHAVE

Neoplasias
Gástricas,
imunohistoquímica,
Prevalência, HER-2

RESUMO

Introdução: A descoberta do Her-2 como alvo terapêutico agrega valor à estratégia de tratamento do câncer gástrico cujo prognóstico é ainda limitado. O estudo busca avaliar e correlacionar características clínico-patológicas e expressão de Her-2 no pacientes portadores de câncer gástrico. 101 pacientes portadores de CEG tratados na Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais, de março 2010 a setembro de 2012 tiveram prontuários avaliados e amostras histológicas testadas para Her-2 em uma instituição central por Imunohistoquímica (IHQ) – hospital A.C. Camargo de São Paulo e hibridização *in situ* (SISH). Validação dos testes remetida ao escore padronizado para câncer gástrico. 91 amostras submetidas à IHQ e/ou SISH. Proteína c-erbB-2 superexpressa em CEG por IHQ : 58,2% escore 0, 15,4% 1+, 13,2% 2+ e 12,1% expressaram 3+. SISH positivo em 10 das 13 amostras, 76,9%. Portanto, Her-2 positivo em 23,1%; a maioria estágios avançados 57,1%, alto grau 44,4% e de histologia intestinal 71,4%. Tratados com quimioterapia com ELF 46,3%, estão vivos 66,7% e a idade mediana é 62 anos. Não houve correlação estatística de Her-2 com histologia intestinal, alto grau, ou estadio avançado. Curva de sobrevida aguarda tempo para fechamento. Prevalência de Her-2, correspondente à literatura, reforça terapia alvo anti- HER-2 como opção de tratamento assim como a prática rotineira de sua avaliação nos centros de tratamento oncológico. Her-2 positivo não se correlaciona à características de mal prognóstico como grau histológico alto, estágio mais avançado, histologia difuso de Lauren, portanto carece da avaliação da curva de sobrevida para correlação prognóstica.

KEYWORDS

Stomach Neoplasms, Prevalence, Immunohistochemistry, HER-2

ABSTRACT

The discovery of Her-2 as a therapeutic target adds value to the strategy of treatment of gastric cancer whose prognosis is still limited. The study aims to assess and correlate clinicopathological characteristics and expression of Her-2 in patients with esophageal cancer, gastric (CEG). 101 patients treated during march 2010 to september 2012, in Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais, were evaluated and records histological samples tested for Her-2 in a central institution for Immunohistochemistry (IHQ) – AC. Camargo Hospital in São Paulo and *in situ* hybridization (SISH). Validation tests sent to the standardized score for gastric cancer. 91 samples subjected to IHQ and / or SISH. C-erbB-2 overexpression in CEG by IHQ: 58.2% score 0, 15.4% 1+, 2 + 13.2% and 12.1% expressed 3+. SISH positive in 10 of 13 samples, 76.9%. Therefore, Her-2 positive in 23.1%; most advanced stages 57.1%,

high degree 44,4%, and of intestinal histology 71.4%. Treated with chemotherapy with ELF 46.3%, and 66.7% are alive median age is 62 years. There was no statistical correlation of Her-2 in intestinal histology, high grade or advanced stage. Survival curve wait long for closure. Prevalence of Her-2, corresponding to the literature, targeted therapy enhances anti-HER-2 as a treatment option as well as the routine practice of their evaluation in cancer treatment centers. Her-2 positive does not correlate with poor prognosis characteristics such as high histologic grade, more advanced stage, diffuse histology Lauren therefore requires assessing the survival curve for prognostic correlation.

■ INTRODUÇÃO

O câncer gástrico, apesar da tendência de queda na incidência nos últimos anos, mantém-se na liderança das causas de mortalidade por câncer no mundo, sendo responsável por 10% de todas as mortes por câncer; atrás apenas do câncer de pulmão¹. Mudanças nos hábitos alimentares, modo de preparo e conservação dos alimentos e outros fatores ambientais são possíveis explicações para essa queda na incidência, especialmente dos tumores de localização do corpo gástrico mais relacionado à baixa produção de suco gástrico e infecção pelo *Helicobacter pylori*.

Mais de 1/3 são diagnosticado em estágios avançados e aproximadamente 70% dos casos de mortes predominam em países em desenvolvimento². A história natural deste câncer caracteriza-se por prognóstico ainda marcadamente pobre, com uma sobrevida longa inferior a 5%³. Curvas de incidência e mortalidade quase paralelas confirmam a necessidade de melhoria das abordagens terapêuticas disponíveis.

A falta de fatores de risco bem definidos, reflexo das diversidades regionais raciais e hábitos dietéticos, amplitude da prevalência de infecção de *H. pylori* por região, diagnóstico tardio e as variações de comportamento biológico do tumor conforme localização, histologia e imunohistoquímica são possíveis explicações para o insucesso das práticas terapêuticas desenvolvidas até o momento.

A sobrevida se correlaciona intimamente com a extensão da doença; profundidade de invasão do tumor e invasão de estruturas adjacentes; e guarda também forte correlação com o número de linfonodos acometidos⁴. Ressecção cirúrgica é ainda a única modalidade potencialmente curativa, mas infelizmente, resulta em altos índices de recorrência³. Controvérsias a respeito da melhor técnica cirúrgica, no que tange à extensão da ressecção e linfadenectomia (à D1 ou à D2), associada ou não a esplenectomia/ pancreatectomia par-

■ ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

CQAI - Unidade Santa Casa
Rua Piauí, 440, Santa Efigênia
Belo Horizonte | MG | Cep: 30150-320
Telefone: 031.3238.8119

cial e o conseqüente acréscimo de morbi-mortalidade com as técnicas mais agressivas, foram avaliados em estudos comparando sobrevida em 5 anos:

- MRC trial : 35 x 33%³.
- *Dutch gastric cancer* trial (15 anos follow up) : 45 x 47%⁴.

Historicamente, o tratamento do câncer gástrico ganha força com adição de quimioterapia em caráter paliativo e adjuvante. Cinco anos após publicação inicial do estudo de Mac Donald, INT-0116, o grupo Inglês com o ensaio MAGIC, reforça esse benefício da quimioterapia perioperatória mesmo sem adição de radioterapia⁵. Inicialmente drogas isoladas como mitomicina, bleomicina, fluoruracil, etoposide, cisplatina e antracíclicos eram usados mas resultavam em baixas taxas de resposta e duração de resposta, com sobrevida mediana pobre de aproximadamente 4 a 6 meses. Em seguida, regimes de combinação revelaram superioridade em relação à terapia com agente único, ressaltando-se porém, maior toxicidade com estes regimes e difícil utilização pela baixa tolerância. Agentes tais como oxaliplatina, fluoropirimidinas orais e irinotecano mostraram resultados de não inferioridade ou menos toxicidade, posicionando-os como alternativas valiosas. Associação de taxanos na primeira linha também comprovou-se ativa com melhora nas taxas de resposta (37% x 25%) e sobrevida em 2 anos (18% x 25%) porém às custas de mielotoxicidade severa⁶. Metanálise publicada em 2006 confirma essa vantagem da quimioterapia tanto em melhora da qualidade de vida como em aumento da sobrevida global⁷.

Quimioterapia em segunda linha mostrou-se superior a cuidados paliativos exclusivos para pacientes selecionados com bom "Performance status"; considerando-se a natureza paliativa do tratamento, deve-se dar preferência a regimes com baixa toxicidade e razoável taxa de resposta global.

Em resumo, na última década vários esquemas quimioterápicos, incluindo combinações de drogas, foram estudados. Não existe um melhor esquema de quimioterapia padronizado para tratamento do câncer gástrico avançado, e a sobrevida global permanece

estagnada; entre nove e onze meses. Esforços, no sentido de incremento de sobrevida, têm se concentrado no aprimoramento das terapias sistêmicas pré e pós-operatória⁸. O aprofundamento dos estudos em biologia molecular, no intuito de melhor entender as vias de sinalização celular patologicamente ativas no câncer gástrico, levou à pesquisa de novos alvos terapêuticos entre os quais a interrupção da sinalização patológica mediada pela proteína c-erb2 (hiperexpressão do oncogene HER-2). Esta proteína, uma glicoproteína transmembrana com atividade tirosina quinase, da família de receptores de fatores de crescimento HER (EGFR, erbB-2, erbB-3 e erbB-4) é reconhecidamente envolvida no crescimento, proliferação e diferenciação celular, e está envolvida no processo de malignidade^{9,10}.

Sua primeira descrição com relevância prognóstica foi no câncer de mama em 1987. Slamon e colaboradores encontram correlação prognóstica da hiperexpressão gênica de HER-2. Sobrevida mediana de 3 anos para os casos de HER 2 hiperexpresso e de 6 a 7 anos para os demais tumores^{11,12,13,14}.

Na literatura, a incidência de amplificação relatada é de 15 a 30% no carcinoma ductal invasor da mama¹⁵.

A terapia alvo com anticorpo humanizado anti-Her-2 tem portanto, benefício confirmado na adjuvância do tratamento de câncer de mama (NSABP B-31, NCCTG 9831, HERA, BCIRG 006) acarretando redução do risco de morte 33%, e redução do risco de recorrência de até 50%. Também na doença metastática, Trastuzumabe, nome dado ao anticorpo anti-Her-2, soma benefício à palição do câncer de mama¹⁶.

Hiperexpressão de Her-2 foi também descrita em outros carcinomas como ovário, pulmão, esôfago, cólon, endométrio, glândula salivar e próstata, porém sua influência nestas outras histologias não é bem conhecido.

No câncer esôfago-gástrico a prevalência de hiperexpressão Her-2 tem relatos conflitantes. Recente análise sistemática de revisão da literatura para determinação de prevalência da positividade de HER-2 no tumor gástrico revelou grande amplitude de resultados de 4,4 a 53,4%; assim como também a correlação prognóstica é ainda controversa¹⁷.

Estudo fase III recente reporta prevalência de 15% a 20% de positividade para Her-2 no câncer esôfago-gástrico e aumento de sobrevida com a associação de quimioterapia convencional (combinação de cisplatina e fluoropirimidina) ao bloqueio de Her-2 com Trastuzumabe (anti-corpo monoclonal anti Her-2)¹⁸. Este estudo, ToGA (Trastuzumabe for Gastric Cancer), atinge seu objetivo primário com Hazard ratio de 0,76; ou seja, uma redução do risco de morte de 24% (p=0,004).

Até recentemente, ganhos de sobrevida não haviam sido demonstrados com quimioterapia após progressão. A associação da quimioterapia convencional com terapia alvo molecular mostrou-se bem tolerada e prolonga sobrevida global mediana em aproximadamente 3 meses e em análise pré planejada, este benefício se mostra até mais robusto nos pacientes cujo HER-2 está fortemente hiperexpresso.

Em 2008, grande estudo internacional avaliou o método de detecção de hiperexpressão de Her-2 e observou importantes diferenças entre os carcinomas de mama e esôfago-gástrico. Como resultado, foi proposta padronização exclusiva para avaliação de positividade à imunohistoquímica de câncer gástrico, difere da utilizada na avaliação da mama e pode sofrer influência do tipo de conservação que a peça cirúrgica ou biópsia sofreu¹⁹. De posse da evidência científica dos benefícios até em sobrevida com a adição de Trastuzumabe, torna-se necessária a caracterização patológica/imunohistoquímica de HER-2 na avaliação dos casos de câncer esôfago-gástrico. Para o presente estudo os objetivos foram: avaliar e correlacionar características clínica, histológica e histoquímica, através da determinação da expressão de Her-2, nos pacientes portadores de câncer gástrico do Serviço de Quimioterapia da Santa Casa de Belo Horizonte/MG: idade mediana ao diagnóstico, estágio clínico, histologia prevalente, grau tumoral, sexo prevalente, tratamento recebido, mortalidade após seguimento ainda a ser atingido; confrontar as características analisadas e a prevalência da positividade de HER-2 da amostra em questão com os dados da literatura; correlacionar os achados clínico-patológicos com o status de positividade ao Her-2; avaliar associação prognóstica com Her-2 no câncer gástrico.

■ MATERIAIS E MÉTODOS

Avaliação retrospectiva de pacientes portadores de câncer gástrico tratados no Serviço de Oncologia Santa Casa de Belo Horizonte, no período de março de 2010 a setembro de 2012. Cento e um prontuários foram revisados e tiveram suas amostras diagnósticas anatomo-patológicas solicitadas para avaliação imunohistoquímica. 91 amostras histológicas diagnósticas fixadas em formalina, embebidas em parafina dos pacientes avaliados no período foram levantadas nos seus respectivos laboratórios de origem, revisadas pelo patologista responsável e enviadas para o Hospital A.C. Camargo de São Paulo, onde foi realizado testes para Imunohistoquímica (método HPR polimérico, Ac Ventana) e confirmação por hibridização *in situ* pela prata *SISH*, em caso de escore duvidoso (duas cruzes). A validação dos testes foi remetida ao escore padronizado para câncer gástrico segundo critérios aprovados pelo NICE, descritos abaixo:

Escore 0: nenhuma coloração de membrana nas células neoplásicas; Escore 1+ : coloração fraca em mais de 10% das células neoplásicas; escore 2+ (duvidoso): coloração fraca a moderada em mais de 10% das células neoplásicas; escore 3+: coloração forte em mais de 10% das células neoplásicas. Escore 0/1+ foi considerado negativo, escore 2+ duvidoso deveria ser submetido à SISH, enquanto escore 3+ foi considerado positivo para hiperexpressão de HER-2.

Tabelas de frequência foram construídas para as variáveis categóricas e medidas descritivas de tendência central (média e mediana), e de variabilidade (desvio-padrão) foram calculadas para as variáveis quantitativas. O software utilizado para análise foi o SPSS versão 18.0 licenciado para o serviço. Antes de qualquer análise foi realizada consistência no banco de dados para evitar erros futuros.

■ RESULTADOS

Um total de 101 pacientes com câncer gástrico foram avaliados no estudo. Destes, 91 amostras histológicas foram resgatadas e testadas com imunohistoquímica e/ou SISH. 10 amostras se perderam. Análise geral do

Tabela 1. Características dos pacientes Her2 positivos (n=21)

Tipo Histológico	Variáveis	
	n	%
Difuso	2	9,5
Intestinal	15	71,4
Adenocarcinoma SOE	4	19,0
Grau de Malignidade		
I	1	11,1
II	4	44,4
III	4	44,4
Estadio Clínico		
1	5	23,8
2	0	0,0
3	4	19,0
4	12	57,1
Sexo		
Feminino	6	28,6
Masculino	15	71,4
Estado Atual		
Vivo	14	66,7
Óbito	7	33,3

perfil dos pacientes do Serviço revela idade mediana ao diagnóstico de 62 anos. Sexo prevalente é masculino 62,2%. Maioria dos casos, 57,5%; apresentava subtipo histológico Intestinal (de acordo com a classificação de Lauren), alto grau/pouco diferenciado em 54,5% e

Tabela 2. Histologia conforme estatus de Her-2

		TH		
		Difuso	Intestinal	
her 2	Negativo	n	18	34
	%		34,6%	65,4%
	Positivo	n	2	15
	%		11,8%	88,2%
Total	n		20	49
	%		29,0%	71,0%

estadio clínico avançado; 50,6% EC IV e 16,9% EC III. Dos pacientes avaliados para Her-2, apenas 73,6% tiveram condições de ser tratados com QT, dos quais 46,3% com ELF (etoposide, leucovorin e fluoruracil), 35,8% com quimiorradioterapia (fluoruracil, leucovorin concomitante à radioterapia), 4,5% DCF (docetaxel, cisplatina e fluoruracil), 1% EOX (epirrubina, oxaliplatina e xeloda) e 9% cisplatina e fluoruracil. Na data de conclusão do estudo, 35,2% dos pacientes eram óbitos. Proteína c-erbB-2 superexpressa em câncer gástrico por imuno-histoquímica : 58,2% escore 0, 15,4% 1+, 13,2% 2+ e 12,1% expressaram 3+. Dos pacientes submetidos ao SISH por escore duvidoso 2+, 10 das 13 amostras ou seja, 76,9% confirmaram amplificação Her-2. Estatus Her-2 positivo revelou portanto, prevalência de 23,1%, com mediana de idade também de 62 anos. Os resultados das características gerais dos pacientes Her-2 positivos estão expostos na tabela 1.

Tabela 3. Grau de diferenciação Histológica (bem/moderado) x baixo conforme estatus de Her-2

		GM COD		
		1+2	3,00	
her 2	Negativo	n	14	20
	%		41,2%	58,8%
	Positivo	n	5	4
	%		55,6%	44,4%
Total	n		19	24
	%		44,2%	55,8%

Nota: Não encontramos diferença significativa para grau de malignidade, $p = 0,477$.

Tabela 4. Sexo conforme estatus de Her-2

			SEXO	
			Feminino	Masculino
her 2	Negativo	n	28	40
		%	41,2%	58,8%
	Positivo	n	6	15
		%	28,6%	71,4%
Total		n	34	55
		%	38,2%	61,8%

Nota: A hiperexpressão de HER-2 também não apresentou correlação com sexo, $p = 0,299$

Tabela 5. Estadiamento inicial (I e II) x avançado (III x IV) conforme estatus de Her-2

			ESTADIO	
			INICIAL	AVANÇADO
her 2	Negativo	n	24	43
		%	35,8%	64,2%
	Positivo	n	5	16
		%	23,8%	76,2%
Total		n	29	59
		%	33,0%	67,0%

Nota: $p=0,307$

Tabela 6. Número de óbitos x vivos conforme estatus de Her-2 (no período de seguimento)

			Status	
			Vivo	Óbito
her 2	Negativo	n	45	24
		%	65,2%	34,8%
	Positivo	n	14	7
		%	66,7%	33,3%
Total		n	59	31
		%	65,6%	34,4%

Nota: Tabela realizada no período de seguimento considerado curto para correlação de sobrevida. Sujeita a reavaliação.

É importante ressaltar que a maioria dos casos positivos para hiperexpressão de HER-2, é de histologia intestinal (88,2%), o que corresponde à literatura, porém sem significância estatística (teste do Qui-quadrado -Tabela 2, $p= 0,071$); já que 65,4% dos Her-2 negativos eram também do tipo intestinal.

Também não foi estatisticamente significativa a correlação entre positividade de Her-2 e grau de malignidade mais alto, conforme exposto na tabela 3, $p = 0,477$.

Não existiu na presente avaliação, relação de sexo masculino ou feminino com hiperexpressão de HER-2, $p = 0,299$ (tabela 4), como também não se demonstrou tal relação em trabalhos anteriores na literatura.

Com relação ao estadiamento, na ocasião do diagnóstico 57,1% dos pacientes Her-2 eram EC IV mas apesar da inferência ao pior prognóstico sugerida na literatura, 64,2% da nossa amostra de Her-2 negativo também se tratava de doença avançada; *porém sem associação significativa, $p=0,307$* (tabela 5).

No momento da análise dos resultados, 66,7% dos pacientes com Her2 hiperexpresso encontravam-se vivos, assim como 65,2% dos não hiperexpressos.

As curvas de sobrevida ainda serão calculadas quando houver tempo de seguimento suficiente para tal análise.

■ CONCLUSÃO

À luz das controvérsias sobre o melhor tratamento do Câncer Gástrico e pobre incremento em sobrevida com os regimes disponíveis, é crítico estabelecer caracterização individualizada e informações adicionais de subgrupos de pacientes que poderão servir como base para melhor adaptação e efetividade das abordagens terapêuticas. Atualmente, não há um tratamento padrão para o câncer gástrico²⁰. A sobrevida longa na doença avançada é inferior a 5%. O progresso do tratamento talvez esteja em individualizá-lo, levando em conta fatores como idade, perfil de toxicidade, imuno-histologia, diferenças epidemiológicas e é carente de novas drogas que melhorem este panorama. O benefício da terapia sistêmica adjuvante/ paliativa foi comprovado em estudos ao proporcionar melhora da qualidade de vida e aumento de sobrevida^{5,6,7,20}.

A hipótese de que a hiperexpressão de *c-erbB2* no tumor gástrico esteja envolvida nos mecanismos patológicos de disseminação metastática surgiu em virtude do aumento progressivo de sua expressão a medida que o tumor avança e sugere aumento na agressividade biológica destes tumores²¹. Esta hipótese não se aplica à realidade da população avaliada neste estudo em que a maioria dos tumores HER-2 positivos e negativos eram avançados. Apesar da confirmada correlação prognóstica e preditiva no câncer de mama, o papel da hiperexpressão do HER-2 como fator prognóstico no câncer gástrico permanece controverso. O número relativamente baixo de amostras submetidas ao teste no caso do câncer gástrico, provavelmente em virtude da novidade desta aplicabilidade como recurso terapêutico e da maior incidência deste tumor em estágios mais avançados nas classes menos favorecidas eco-

nomicamente (o que restringe o recurso da avaliação imuno-histoquímica com propósito terapêutico), além das diversidades étnicas entre as populações testadas, a falta de hábito em coleta e preservação adequada de amostras com este propósito e por fim; diferenças na concordância de validação da Imunohistoquímica mesmo entre os patologistas, podem ser explicações para a grande amplitude de resultados encontrados nos estudos que avaliaram a prevalência da hiperexpressão de HER-2 no câncer gástrico e sua correlação com mau prognóstico^{22,23, 24}. A importância da avaliação transversal da taxa de positividade de Her-2 no câncer gástrico está em reforçar a credibilidade do teste, confrontar sua positividade com outras características clínicas e patológicas do tumor; melhor entendimento da doença e individualização do tratamento, visando maior eficácia e menor toxicidade. Taxa de 23,1% observada na população do presente estudo corresponde aos dados da literatura e reforça a opção do anticorpo monoclonal anti-HER-2 como alvo terapêutico. Padronização de conduta para coleta de material, com amostra e preservação adequadas também ganham importância com a confirmação da prevalência. Positividade para Her-2 revelou forte associação com subtipo intestinal da classificação de Lauren, o que reforça a utilidade dessa classificação para distinção anátomo-biológica entre os subgrupos. Assim como na mama, Her-2 é mais prevalente na histologia ductal e incomum na lobular; no gástrico, é mais comum no intestinal do que no difuso.

Curvas de sobrevida não atingiram tempo mínimo necessário para avaliação, e tem previsão para conclusão em junho de 2013 com base na sobrevida média deste tumor. Amostras coletadas antes da data estipulada poderiam ter sofrido problemas de conservação que acarretariam falso-negativo na avaliação imuno-histoquímica proposta; além das dificuldades dos laboratórios de patologia em disponibilizar peças mais antigas para estudo.

Na presente avaliação, não houve correlação de positividade ao Her-2 com estadiamento mais avançado, grau mais alto ou subtipo histológico difuso de Lauren ao qual tem sido atribuído piores desfechos, portanto, se a sobrevida revelar-se pior após conclusão do seguimento, poder-se-á inferir que Her-2 hiperexpresso confere maior agressividade biológica.

Dadas as condições do estudo, por tratar-se de limitado a um centro de tratamento, com amostra relativamente pequena, favorece-se que ocorra viés, apesar da contribuição científica da avaliação da população. A elaboração de revisões sistemáticas com metanálises ou estudos prospectivos é necessária para melhor elucidar essa controvérsia.

■ REFERÊNCIAS

1. Ferlay JB, Parkinson F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide. ISRC Cancer Bases no 5.
2. Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011 Jul-Aug;61(4):212-36.
3. DeVita, VT; Hellman, S; Rosenberg, SA; (Eds). DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & practice of oncology. 9. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. Capítulo: Gastric Cancer Part 1 Epidemiology and Etiology. 2.800p.
4. Cuschieri A, Weedens, Fielding J, et al. Patient survival after D1 and D2 resections for gastric cancer: long-term results of MRC randomized surgical trial. *Br J Surg* 1999;79(9-10):1522
5. Sogun I, Putter H, Kranenbarg EM, et al. Surgical treatment of gastric cancer: 15-year follow up results of the randomized nationwide Ducth D1D2 trial. *Lancet Oncol* 2010;11(5):439.
6. Sun Z, Zhu GL, Lu C, et al. The impact of N-ratio in minimizing stage migration phenomenon in gastric cancer patients with insufficient number or level of lymph node retrieved: results from a Chinese mono-institutional study in 2159 patients. *Ann Oncol.* 2009 May;20(5):897-905
7. Macdonald JS. Gastric cancer--new therapeutic options. *N Engl J Med.* 2006 Jul 6;355(1):76-7.
8. Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, et al; V325 Study Group. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol.* 2006 Nov 1;24(31):4991-7.
9. Wagner AD, Grothe W, Haerting J, et al. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *J Clin Oncol.* 2006 Jun 20;24(18):2903-9. Review
10. Brooks GA, Enzinger PC, Fuchs CS. Adjuvant therapy for gastric cancer: revisiting the past to clarify the future. *J Clin Oncol.* 2012 July 1;30(19):2297-99.
11. Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, et al. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene.* 1995 Jun 15;10(12):2435-46.
12. Begnami MD, Fukuda E, Fregnani 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 Clin Oncol.* 2011 Aug 1;29(22):3030-6.
13. Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology.* 2001;61 Suppl 2:1-13. Review.
14. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
15. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989 May 12;244(4905):707-12.
16. Chia S, Norris B, Speers C, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol.* 2008 Dec 10;26(35):5697-704
17. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001 Mar 15;344(11):783-92.
18. Ross JS. Update on HER2 testing for breast and upper gastrointestinal tract cancers. *Biomark Med.* 2011 Jun;5(3):307-18.
19. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, et al. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science.* 1986 Jun 27;232(4758):1644-6.
20. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al; ToGA Trial Investigators. Trastuzumab in combination with chemotherapy

versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010 Aug 28;376(9742):687-97. Erratum in: *Lancet*. 2010 Oct 16;376(9749):1302.

21. National Institute for Health and Clinical Excellence .Trastuzumab for the treatment of HER2-positive metastatic gastric cancer: This guidance was developed using the single technology appraisal process. NICE technology appraisal guidance 208. Disponível em : www.nice.org.uk/guidance/TA208 . Acesso em 18/02/2013.
22. DeVita, VT; Hellman, S; Rosenberg, SA; (Eds). DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & practice of oncology. 9. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. Capítulo: Gastric Cancer Part 2 Treatment of Localized Disease. 2.800p.
23. Bianco AR Targeting c-erbB2 and other receptors of the c-erbB family:rationale and clinical applications. 2004 *J Chemother* 16(Suppl 4):52-54
24. Mammano E, Belluco C, Sciro M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR): mutational and protein expression analysis in gastric cancer.*Anticancer Res*. 2006 Sep-Oct;26(5A):3547-50.
25. Bayrak M, Olmez OF, Kurt E, et al. Prognostic significance of c-erbB2 overexpression in patients with metastatic gastric cancer.*Clin Transl Oncol*. 2012 Aug 22.
26. Jørgensen JT, Hersom M. HER2 as a Prognostic Marker in Gastric Cancer - A Systematic Analysis of Data from the Literature.*J Cancer*. 2012;3:137-44
27. Chemotherapy for locally advanced unresectable and metastatic Gastric Cancer, Biologic Agents .Disponível em : <<http://www.uptodate.com/index>> . Acesso em abril 2012.