Expresión y amplificación del gen HER2 en el cáncer gástrico avanzado

IVÁN ROA¹, JEANNIE SLATER², DANIEL CARVAJAL³,
KURT SCHALPER³, GONZALO DE TORO⁴, RAÚL ARES⁵,
ANAKAREN GAME^{6,a}, JORGE LEÓN⁷, XABIER DE ARETXABALA⁷

HER2 gene amplification and overexpression in advanced gastric cancer

Background: Overexpression/amplification of the HER2 gene in advanced gastric cancer is a predictor of response to adjuvant therapy with monoclonal antibodies. **Aim:** To determine the frequency of HER2 gene overexpression and amplification in advanced gastric cancer. **Material and Methods:** One hundred nine advanced gastric cancer biopsy specimens, from 76 men and 33 women aged 67 ± 14 and 62 ± 12 years respectively, were selected. Three histological patterns (diffuse, intestinal and mixed) were recognized. Automated immunohistochemistry was performed with monoclonal c-erbB-2 (NCL-356) Novocastra. Fluorescent in situ hybridization (FISH) for HER2 was performed in positive cases. **Results:** In 39% of cases, immunohistochemical staining was negative. It was 1+, 2+ and 3+ positive in 15, 36 and 11% of cases, respectively. It was positive in 16% and 3% of intestinal type and mixed carcinomas, respectively. It was negative in all diffuse carcinomas. FISH was performed in 39 (2+) cases and in 11 (3+) cases. The gene amplification was positive in two (2+) and 11 (3+) cases (11.9%). The overall concordance between immunohistochemical staining and in situ hybridization was 85%. **Conclusions:** In advanced gastric cancer, HER2 gene overexpression or amplification was observed in 11% and 12% of cases, respectively.

(Rev Med Chile 2013; 141: 1411-1419)

Key words: Gene amplification; HER2, protein, human; in situ hybridization, fluorescence; Immunohistochemistry.

¹Creative Bioscience
Santiago, Chile.

²Servicio Anatomía
Patológica, Clínica Alemana
de Santiago. Chile.

³Departamento de
Patología. Facultad de
Medicina. Universidad de
Yale.

⁴Servicio de Anatomía
Patológica Hospital de
Puerto Montt. Chile.

⁵Servicio de Anatomía
Patológica Hospital Padre
Hurtado. Santiago. Chile.

⁶Facultad de Medicina.
Universidad del Desarrollo.
Santiago. Chile.

⁷Departamento de Cirugía,
Clínica Alemana de
Santiago. Chile.

^aEstudiante de Medicina.

Recibido el 28 de abril de
2013, aceptado el 3 de
septiembre de 2013.

Correspondencia a:
Dr. Iván Roa E.
Avenida Del Valle Norte
857. Oficina 102
Ciudad Empresarial.
Huechuraba Santiago.
Chile.
Código Postal 8580702
E-mail: ivanroaesterio@
gmail.com

El cáncer gástrico es la segunda causa más frecuente de muerte por cáncer en todo el mundo y representa alrededor de 8% del total de casos de cáncer y 10% de las muertes por todos los tipos de cáncer¹⁻³, y sobre 70% ocurren en los países en desarrollo^{2,3}. No obstante, de que su incidencia ha ido lentamente disminuyendo desde hace décadas, su pronóstico continúa siendo pobre^{4,5}. En Chile representa un importante problema de salud pública, siendo la mayor parte de los casos diagnosticados en estadios avanzados y con pocas expectativas terapéuticas^{6,7}. En los últimos años el tratamiento quirúrgico asociado con quimio y radioterapia ha mejorado las expectativas de vida de estos enfermos, lográndose sobrevidas

sobre 50% en las formas localizadas distales de la enfermedad, en cambio, en las formas avanzadas y proximales la sobrevida a 5 años no va más allá de 10-20%⁸⁻¹¹.

En el cáncer gástrico avanzado se ha incorporado al tratamiento la quimioterapia estándar y la terapia con anticuerpos monoclonales como el trastuzumab en aquellos casos que presentan sobreexpresión o amplificación del gen HER2¹²⁻¹⁴. Esto ha permitido abrir expectativas con terapias dirigidas a blancos moleculares tal y como se está empleando en otros cánceres como el cáncer de mama, colon y pulmón^{15,16}.

Entre los cánceres gástricos de origen epitelial, se reconocen dos grandes grupos histológicos: los

de tipo intestinal (tumores mejores diferenciados) y los difusos (con menor diferenciación), como lo señalado en la original clasificación de Lauren en 1965^{17,18}. Ambos tipos histológicos presentan características epidemiológicas, clínicas y morfológicas diferentes, lo que refleja una patogenia y alteraciones genético-moleculares significativamente distintas¹⁹⁻²¹. Entre las principales diferencias que se observan entre los adenocarcinomas de tipo difuso e intestinal, está la pérdida de la expresión del gen de la E-caderina, cuya proteína se localiza en la superficie celular como una molécula de adhesión celular esencial para la mantención y organización de los tejidos epiteliales²²⁻²⁴.

El gen HER2 es un proto-oncogén localizado en el cromosoma 17 que pertenece a la familia HER que comprende a cuatro receptores diferentes²⁵. El gen HER2 también llamado: ErbB-2, c-erbB2 o Her2/neu, codifica una proteína de transmembrana de tipo tirosina-quinasa de 185-kDa. Estos receptores cooperan en la regulación de diferentes procesos, tales como la proliferación, la diferenciación, y la supervivencia celular. HER2 actúa como un oncogén y su amplificación se traduce principalmente como una sobreexpresión de la proteína. Esta sobreexpresión de HER2 se ha relacionado con una mayor agresividad y peor pronóstico, al facilitar la proliferación y migración de las células tumorales en algunos tumores malignos^{26,27}. Aproximadamente, 25% a 30% de los cánceres de mama sobreexpresan HER2, siendo un factor predictivo en la respuesta a la terapia con el anticuerpo monoclonal trastuzumab^{28,29} u otros inhibidores del receptor como el lapatinib³⁰. En el cáncer gástrico la sobreexpresión de HER2 se ha descrito entre 10% y 20%, y su rol como factor pronóstico aún está en estudio³¹. No obstante, de algunos resultados contradictorios³², la mayor parte de los trabajos recientes apoyan el rol que tiene la sobreexpresión y la amplificación del HER2 en la evolución del cáncer gástrico, así como la utilidad clínica de su determinación para la indicación de la terapia con anticuerpos monoclonales contra el receptor³³⁻³⁵. Además, la sobreexpresión de HER2 se ha asociado a enfermedad avanzada, lo que pudiese darle un valor pronóstico a la determinación HER2 en los tejidos tumorales^{27,36}.

El estatus de HER2 se determina en los tejidos tumorales, la sobreexpresión proteica mediante técnicas de inmunohistoquímica y la amplificación del gen a través de la visualización directa del

número de copias mediante técnicas de marcación fluorescente (FISH), y más recientemente con técnicas cromogénicas (ISH)³⁷⁻⁴⁰.

De la experiencia obtenida en el cáncer de mama, se han extrapolado algunas pautas para la interpretación de estas determinaciones, restringiéndose la positividad inmunohistoquímica a aquellos casos considerados como francamente positivos (3+), o bien con técnicas de hibridación a los casos con índices de sobre 2,2 señales de HER2 por señal centromérica del cromosoma 17^{41,42}. Sin embargo, de estas pautas, los criterios de positividad para el cáncer gástrico presentan un mayor grado de ambigüedad y de dificultad en su interpretación, en comparación a los establecidos para el cáncer de mama⁴³. La heterogeneidad en la sobreexpresión y amplificación de HER2 es un problema aún no resuelto. La correlación entre técnicas de inmunohistoquímica y FISH se han reportado en rangos que fluctúan entre 87 y 93%. Nuevas técnicas de análisis de imagen han intentado disminuir las variaciones interpersonales en la interpretación y cuantificación tanto de la tinción inmunohistoquímica como de la medición de señales fluorescentes⁴⁴.

En nuestro país se realizan determinaciones rutinarias de HER2 mediante técnicas de inmunohistoquímica y FISH para el cáncer de mama, sin embargo, no existe información publicada en cáncer gástrico. El objetivo de este trabajo es determinar la frecuencia y distribución de la sobreexpresión inmunohistoquímica y amplificación del gen HER2 en el cáncer gástrico avanzado.

Material y Método

Casos

Se incluyen en este estudio 109 pacientes con adenocarcinomas gástricos primarios en estadios avanzados con presencia de metástasis ganglionares de los Hospitales de Puerto Montt, Hospital Padre Hurtado, Hospital Militar y Clínica Alemana de Santiago y Temuco. De cada uno de los centros se seleccionó una inclusión representativa del tumor (material de archivo de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina). Se realizó estudio inmunohistoquímico contra la proteína del gen HER2 y para los casos que mostraron positividad (2+) y (3+) (ver más adelante), se realizó estudio de hibridación fluorescente *in situ* en el Servicio

de Anatomía Patológica de Clínica Alemana de Santiago. Se confeccionó una base de datos anónima de las muestras, en la cual fueron consignados exclusivamente los siguientes parámetros: género, edad, tipo histológico y localización del tumor. Se reconocieron tres tipos histológicos⁴⁵: intestinal, difuso de acuerdo a las definiciones establecidas y un tercer grupo o mixto, en el cual se observan las características de ambos tipos histológicos.

Confección de matrices de tejidos (TMA)

De cada una de las muestras se seleccionaron 3 áreas del tumor, las que fueron señalizadas en los cortes teñidos con HE con un objetivo marcador Nikon. Para la confección de las matrices de tejidos se utilizó el Semiautomatic Tissue MicroArrayer Pathology Devices, Inc con agujas de 2 mm de diámetro. Los cilindros de tejido fueron extraídos del bloque donante y puestos en el bloque receptor. Las inclusiones fueron puestas en estufa a 55°C por 30 min para obtener la adherencia entre las muestras y el bloque receptor.

Técnica de inmunohistoquímica

Se realizó la técnica estándar para tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina. Los cortes histológicos de 4 µm de espesor obtenidos de los TMA fueron desparafinados e hidratados en concentraciones decrecientes de alcohol. La recuperación de antígenos se realizó mediante exposición a microondas en buffer citrato pH 6,0 y lavados en PBS pH 7.4. Se utilizó el anticuerpo monoclonal c-erb-B2 (NCL-356) Novocastra en una dilución de 1/40. El anticuerpo primario fue incubado a temperatura ambiente por 60 min y luego incubado con el complejo Super Picture Polymer Detection Kit™ Zymed en equipo Dakoautostainer™.

Formas de medición de la positividad

Se realizó de acuerdo a la recomendación sugerida por Hofmann et al, 2008⁴² que se resume en la Tabla 1. Se consideró como positivo a la tinción de membrana lateral o basolateral completa con intensidad (3 +) en un porcentaje de al menos

Tabla 1. Se describe el método de cuantificación de la positividad inmunohistoquímica (sobrexpresión) e hibridación *in situ* (amplificación)

Medición de la sobreexpresión y amplificación de HER2			
Inmunohistoquímica			
	Muestras quirúrgicas	Muestras endoscópicas	
Intensidad de tinción	Patrón de tinción	Patrón de tinción	Sobrexpresión HER2
0	No se observa tinción o la tinción de membrana se observa en < 10 % de las células tumorales	No se observa tinción en ninguna célula tumoral	Negativo
1 +	Leve y perceptible tinción de membrana incompleta > 10 % de las células tumorales	Leve y perceptible tinción de membrana de grupos de 5 o más células tumorales (cualquier %)	Negativo
2 +	Tinción débil a moderada completa de membrana lateral o basolateral en > 10 % de las células tumorales	Tinción leve o moderada completa de membrana lateral o basolateral (cualquier %)	Equívoca
3 +	Tinción intensa completa de membrana lateral o basolateral > 10 % de las células tumorales	Tinción intensa completa de membrana lateral o basolateral (cualquier %)	Positiva
FISH			
Relación HER2: C17P	Interpretación	Criterio	
< 2,0	Amplificación negativa	Cuento de a lo menos 20 núcleos tumorales	
> 2,0	Amplificación positiva	Se recomienda contar más núcleos si la relación está entre 1,8-2,2

Figura 1. A: Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal con signos de mucosecreción con formación de lagos de mucina y brotes epiteliales tumorales (HE X 32). B: Tinción inmunohistoquímica que se logra distinguir en la mayoría de los grupos tumorales a bajo aumento (HE X 32). C: Magnificación de la tinción positiva, intensa lateral y basolateral en la mayoría de las células tumorales (3+). D: Hibridación *in situ* fluorescente con dos señales verdes correspondientes a la marcación centromérica del cromosoma 17 y múltiples señales anaranjadas intranucleares con una relación HER2/C17 > 2 (X 1000).

10% de las células tumorales (Figura 1). Los casos considerados como equívocos (2+) y positivos fueron procesados para hibridación *in situ*.

Técnica de hibridación *in situ*

Se realizó en cortes de 4 μ m obtenidos de los TMA. En los casos con discrepancia entre la inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, se repitió la hibridación en la muestra completa, a fin de disminuir la posibilidad de error por una inadecuada localización del área positiva. Resumidamente la técnica consistió en desparafinización de las muestras en xilol e hidratación en concentraciones decrecientes de alcohol. La hibridación se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante con el método Dako Cytomation con Kit HER2 FISH

pharmDx™ en Hibridador DAKO en tiempos y temperaturas de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se utilizó como control positivo muestras de cánceres de mama con HER2 (3+) y FISH positivo con un índice mayor de 6 señales.

Formas de medición de la positividad

Se realizó de acuerdo a pautas sugeridas con conteo simultáneo de señales en 30 núcleos tumorales aislados e intactos. Ambas señales fueron capturadas en las longitudes de onda específicas para fluorescencia verde y roja en cámara Olympus DP72 y procesamiento de imagen con el programa cellSens. En imágenes integradas se realizó el conteo de señales Cen17 y de HER2 (Figura 1). Se consideró como amplificación del gen HER2

cuando el cociente del número de señales HER2/Cen17 fue superior a 2,2 (Foto 2), negativo inferior a 1,8 y como no concluyente entre 1,8 y 2,2³⁷. En estos casos las preparaciones fueron reexaminadas con un nuevo conteo de 30 núcleos más.

Análisis estadístico

Se realizó mediante test de χ^2 y exacto de Fisher para las tablas de contingencia ($p < 0,05$).

Resultados

El grupo total estaba constituido por 109 casos, 33 casos (30%) correspondieron a mujeres con un promedio de edad de 61,9 años ($DS \pm 13,8$ años) y los restantes 76 casos a hombres con un promedio de edad de 66,6 años ($DS \pm 11,6$ años). La totalidad de los casos correspondieron a adenocarcinomas. Los tumores primarios se localizaron en el cuerpo en 49 casos (44,9%), 37 casos en el antro (36,6%), 15 casos en el cardias (13,7%) y en el fondo en 4 casos (3,7%). No se logró precisar la localización

del tumor en 4 casos (3,7%). En 61 casos (56%) los tumores eran de tipo intestinal y en 19 casos (17,4%) de tipo difuso. Los 29 casos restantes (26,6%) eran tumores de tipo mixto con áreas de tipo intestinal y difuso (Tabla 2). En las mujeres los tres tipos histológicos se distribuyeron homogéneamente, en cambio en los hombres predominaron los de tipo intestinal (63,2%) y sólo 11,8% (9 casos) fueron de tipo difuso. La diferencia en la distribución de tipos histológicos por género fue significativa ($p = 0,03$).

La tinción inmunohistoquímica mostró positividad intensa (3+) en 11 casos (10,9%) y fue negativa en 54% de los casos (43 casos sin tinción y 16 casos (1+)); los restantes 39 casos fueron equívocos o tinción (2+). De los 11 casos positivos (3+), sólo 2 eran mujeres (6,1%), en cambio, 9 de 76 hombres fueron positivos (15,8%) ($p = ns$). La expresión inmunohistoquímica y su relación con los distintos tipos histológicos se muestran en la Tabla 3. Es destacable que los casos positivos (3+) se observaron en 10 de los 11 tumores de tipo intestinal, es decir, 16,4% del total de tumores de

Tabla 2. Distribución de los tipos histológicos en relación al género

Tabla 3. Expresión inmunohistoquímica de HER2 en relación a los tipos histológicos

tipo intestinal. El caso positivo restante fue de tipo mixto (3,5%), cuya positividad fue observada sólo en el área con diferenciación tubular. Ninguno de los tumores difusos mostró positividad para HER2. En tres casos se observó positividad inmunohistoquímica (3+), pero en porcentajes que fluctuaron entre 0,29% y 2,1% del área total del tumor. En estos tres casos se realizó hibridación *in situ* dirigida al área de positividad, resultando los tres casos negativos.

La hibridación *in situ* se realizó en 50 casos correspondientes a 39 casos con intensidad inmunohistoquímica (2+) y a los 11 casos (3+). Los 11 casos (3+) fueron positivos en la hibridación y dos casos con tinción (2+). Es decir, en 2 de 39 casos (2+) (5,7%), se logró demostrar amplificación de aquellos casos considerados como equívocos siendo el restante 94,3% negativos. Dos casos fueron considerados como no concluyentes a pesar del recuento de un mayor número de núcleos tumorales y un caso fue considerado como inadecuado para estudio.

La concordancia global observada entre la tinción inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*

alcanzó a 85%, detectándose más casos positivos con la hibridación *in situ* que con la inmunohistoquímica a expensas del grupo de los equívocos o (2+), lo cual muestra consistencia entre ambas determinaciones. El escaso número de observaciones y la negatividad de algunas variables no permitieron realizar otros análisis estadísticos.

Discusión

Nuestros resultados muestran sobreexpresión y/o amplificación del gen HER2 en 11,9% de las muestras de cánceres gástricos avanzados operados. La diferencia observada entre la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ* fue consecuencia del estudio de todos los casos considerados como equívocos o (2+), que en esta serie correspondieron a 39 casos (35,7%), grupo en el cual se detectaron dos casos amplificados, lo cual traduce la baja frecuencia de amplificación en este grupo de pacientes. Considerando el alto costo que tiene el examen de hibridación *in situ*, sumado a esto el alto consumo de tiempo de observación

por ser láminas completas, en las que se requiere examinar múltiples campos, se debería evaluar su justificación y utilidad, ya que casi 95% de estas determinaciones resultan negativas.

Tal y como está reportado en series extranjeras la sobreexpresión/amplificación de HER2, se observa con significativa mayor frecuencia en los tumores mejor diferenciados o de tipo intestinal³⁴. En nuestros casos esta positividad alcanzó a 16,4%. Por su parte, los tumores con una histología bifásica (histológicamente mixtos) mostraron muy baja positividad (3,5%) y los de tipo difuso fueron todos negativos. Este hecho sugiere que la determinación del estatus HER2, debería reservarse para aquellos pacientes portadores tumores de tipo intestinal⁴⁶. Es importante también señalar que la heterogeneidad observada tanto en la tinción inmunohistoquímica como en la amplificación del gen HER2 en el cáncer gástrico lo hace diferente a otras neoplasias como el cáncer de mama, lo cual restringe la validez de sus resultados⁴⁷⁻⁴⁹. Estas marcadas diferencias intratumorales es una de las mayores limitaciones del método que determina su poca aplicabilidad a biopsias endoscópicas, las cuales podrían mostrar resultados negativos producto exclusivamente del muestreo⁵⁰. Como señalamos en tres de nuestros casos, a pesar de tener áreas intensamente positivas (3+) dentro del tumor, si hubiesen sido detectadas en biopsias endoscópicas, estos casos habrían sido considerados como positivos, sin embargo, no cumplían los criterios de positividad establecidos para las biopsias quirúrgicas⁴². Por otro lado, la negatividad de biopsias endoscópicas, tampoco garantiza que el tumor sea negativo dadas las mismas consideraciones anteriores.

Finalmente, podemos concluir que la determinación de la sobreexpresión de HER2 en el cáncer gástrico avanzado en nuestro medio, representa un pequeño avance a pesar de beneficiar sólo a un selecto grupo de pacientes, pero abre expectativas a la determinación de otros genes, así como el uso de terapia dirigida a estos blancos moleculares en esta tan frecuente enfermedad maligna.

Referencias

1. Stomach Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008. Summary. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/stomach.asp> 2008.
2. Guggenheim DE, Shah MA. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Surg Oncol* 2013; 107 (3): 230-6.
3. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (3): 354-62.
4. Bosetti C, Malvezzi M, Chatenoud L, Negri E, Levi F, La Vecchia C. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000. *Ann Oncol* 2005; 16 (3): 489-511.
5. Tapia E O, Villaseca H M, Araya O JC, Roa S JC. [Prognostic value of extracapsular lymph node involvement among patients with gastric cancer]. *Rev Med Chile* 2011; 139 (8): 992-7.
6. Torres J, Correa P, Ferreccio C, Hernández-Suárez G, Herrero R, Cavazza-Porro M, et al. Gastric cancer incidence and mortality is associated with altitude in the mountainous regions of Pacific Latin America. *Cancer Causes Control* 2013; 24 (2): 249-56.
7. Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Praud D, Ferlay J, Negri E, et al. Recent patterns in gastric cancer: a global overview. *Int J Cancer* 2009; 125 (3): 666-73.
8. Shridhar R, Almhanna K, Hoffer SE, Fulp W, Weber J, Chuong MD, et al. Increased survival associated with surgery and radiation therapy in metastatic gastric cancer: A Surveillance, Epidemiology, and End Results database analysis 10.1002/cncr.27927. *Cancer* 2013.
9. Morabito A, Carillio G, Longo R. Systemic treatment of gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009; 70 (3): 216-34.
10. García CC, Benavides CC, Apablaza SP, Rubilar PO, Covacevich SR, Peñaloza PM, et al. [Surgical treatment of gastric cancer: results in 423 cases]. *Rev Med Chile* 2007; 135 (6): 687-95.
11. Butte JM, Torres J, Viviani P, Duarte I, Crovari F, Guzmán S, et al. [Long term survival of patients operated for early gastric cancer]. *Rev Med Chile* 2008; 136 (11): 1424-30.
12. Wong H, Yau T. Targeted therapy in the management of advanced gastric cancer: are we making progress in the era of personalized medicine? *Oncologist* 2012; 17 (3): 346-58.
13. Terashima M, Kitada K, Ochiai A, Ichikawa W, Kurahashi I, Sakuramoto S, et al. Impact of expression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18 (21): 5992-6000.
14. Chua TC, Merrett ND. Clinicopathologic factors associated with HER2-positive gastric cancer and its impact on survival outcomes-a systematic review. *Int J Cancer* 2012; 130 (12): 2845-56.
15. Stern HM. Improving treatment of HER2-positive cancers: opportunities and challenges. *Sci Transl Med* 2012; 4 (127): 127rv2.
16. English DP, Roque DM, Santin AD. HER2 Expression

- Beyond Breast Cancer: Therapeutic Implications for Gynecologic Malignancies. *Mol Diagn Ther* 2013; 17 (2): 85-99.
17. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49.
 18. Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol* 2012; 3 (3): 251-61.
 19. Deng N, Goh LK, Wang H, Das K, Tao J, Tan IB, et al. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut* 2012; 61 (5): 673-84.
 20. Carneiro F, Oliveira C, Leite M, Seruca R. Molecular targets and biological modifiers in gastric cancer. *Semin Diagn Pathol* 2008; 25 (4): 274-87.
 21. Yamashita K, Sakuramoto S, Watanabe M. Genomic and epigenetic profiles of gastric cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Surg Today* 2011; 41 (1): 24-38.
 22. Lynch HT, Grady W, Suriano G, Huntsman D. Gastric cancer: new genetic developments. *J Surg Oncol* 2005; 90 (3): 114-33; discussion 133.
 23. Liu YC, Shen CY, Wu HS, Hsieh TY, Chan DC, Chen CJ, et al. Mechanisms inactivating the gene for E-cadherin in sporadic gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (14): 2168-73.
 24. Oliveira C, Sousa S, Pinheiro H, Karam R, Bordeira-Carrico R, Senz J, et al. Quantification of epigenetic and genetic 2nd hits in CDH1 during hereditary diffuse gastric cancer syndrome progression. *Gastroenterology* 2009; 136 (7): 2137-48.
 25. Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release* 2010; 146 (3): 264-75.
 26. Rexer BN, Arteaga CL. Intrinsic and acquired resistance to HER2-targeted therapies in HER2 gene-amplified breast cancer: mechanisms and clinical implications. *Crit Rev Oncog* 2012; 17 (1): 1-16.
 27. Bayrak M, Olmez OF, Kurt E, Cubukcu E, Evrensel T, Kanat O, et al. Prognostic significance of c-erbB2 overexpression in patients with metastatic gastric cancer. *Clin Transl Oncol* 2013; 15 (4): 307-12.
 28. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy *versus* chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376 (9742): 687-97.
 29. Okines AF, Cunningham D. Trastuzumab in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2010; 46 (11): 1949-59.
 30. Chen CT, Kim H, Liska D, Gao S, Christensen JG, Weiser MR. MET activation mediates resistance to lapatinib inhibition of HER2-amplified gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2012; 11 (3): 660-9.
 31. Hechtman JF, Polydorides AD. HER2/neu gene amplification and protein overexpression in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: a review of histopathology, diagnostic testing, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136 (6): 691-7.
 32. Halon A, Donizy P, Biecek P, Rudno-Rudzinska J, Kielan W, Matkowski R. HER-2 expression in immunohistochemistry has no prognostic significance in gastric cancer patients. *Scientific World Journal* 2012; 2012: 941259.
 33. Smyth EC, Cunningham D. Targeted therapy for gastric cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2012; 13 (3): 377-89.
 34. Liu W, Zhong S, Chen J, Yu Y. HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor for intestinal-type and early-stage gastric cancer patients. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46 (4): 31-7.
 35. Kim JW, Im SA, Kim M, Cha Y, Lee KH, Keam B, et al. The prognostic significance of HER2 positivity for advanced gastric cancer patients undergoing first-line modified FOLFOX-6 regimen. *Anticancer Res* 2012; 32 (4): 1547-53.
 36. Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135 (10): 1331-9.
 37. Räschoff J, Hanna W, Bilous M, Hofmann M, Osamura RY, Penault-Llorca F, et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol* 2012; 25 (5): 637-50.
 38. Park YS, Hwang HS, Park HJ, Ryu MH, Chang HM, Yook JH, et al. Comprehensive analysis of HER2 expression and gene amplification in gastric cancers using immunohistochemistry and in situ hybridization: which scoring system should we use? *Hum Pathol* 2012; 43 (3): 413-22.
 39. Hirschmann A, Lamb TA, Marchal G, Padilla M, Diebold J. Simultaneous analysis of HER2 gene and protein on a single slide facilitates HER2 testing of breast and gastric carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2012; 138 (6): 837-44.
 40. Cho EY, Srivastava A, Park K, Kim J, Lee MH, Do I, et al. Comparison of four immunohistochemical tests and FISH for measuring HER2 expression in gastric carcinomas. *Pathology* 2012; 44 (3): 216-20.

41. Mrklic I, Bendic A, Kunac N, Bezic J, Forempoher G, Durdov MG, et al. Her-2/neu assessment for gastric carcinoma: validation of scoring system. *Hepatogastroenterology* 2012; 59 (113): 300-3.
42. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Böttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52 (7): 797-805.
43. Stenzinger A, von Winterfeld M, Aulmann S, Warth A, Weichert W, Denkert C, et al. Quantitative analysis of diagnostic guidelines for HER2-status assessment. *J Mol Diagn* 2012; 14 (3): 199-205.
44. Jeung J, Patel R, Vila L, Wakefield D, Liu C. Quantitation of HER2/neu expression in primary gastroesophageal adenocarcinomas using conventional light microscopy and quantitative image analysis. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136 (6): 610-7.
45. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, Fourth Edition. 2010. IARC Press, Lyon.
46. Penault-Llorca F, Chenard MP, Bouchon, Emile JF, Bibeau F, Metges JP, et al. [HER2 and gastric cancer. Recommendations for clinical practice in 2011. *Ann Pathol* 2011; 31 (2): 78-87.
47. Yoon Cho E, Park K, Do I, Cho J, Kim J, Lee J, et al. Heterogeneity of ERBB2 in gastric carcinomas: a study of tissue microarray and matched primary and metastatic carcinomas. *Mod Pathol* 2012.
48. Yang J, Luo H, Li Y, Li J, Cai Z, Su X, et al. Intratumoral heterogeneity determines discordant results of diagnostic tests for human epidermal growth factor receptor (HER) 2 in gastric cancer specimens. *Cell Biochem Biophys* 2012; 62 (1): 221-8.
49. Grob TJ, Kannengiesser I, Tsourlakis MC, Atanackovic D, Koenig AM, Vashist YK, et al. Heterogeneity of ERBB2 amplification in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell undifferentiated carcinoma of the lung. *Modern Pathol* 2012; 25 (12): 1566-73.
50. Asioli S, Maletta F, Verdun di Cantogno L, Satolli MA, Schena M, Pecchioni C, et al. Approaching heterogeneity of human epidermal growth factor receptor 2 in surgical specimens of gastric cancer. *Hum Pathol* 2012; 43 (11): 2070-9.