

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Avaliação de HER-2 em Câncer de Pâncreas: Diferenças entre as
Classificações HercepTest™ e ToGA *Trial* e Correlação com a
Sobrevida**

MARCIA PITHAN PEREIRA

Porto Alegre
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Avaliação de HER-2 em Câncer de Pâncreas: Diferenças entre as
Classificações HercepTest™ e ToGA *Trial* e Correlação com a
Sobrevida**

MARCIA PITHAN PEREIRA

Orientador: Maria Isabel Albano
Edelweiss

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Mestre

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Pereira, Marcia Pithan

Avaliação de HER-2 em Câncer de Pâncreas: Diferenças entre as Classificações HercepTest™ e ToGA Trial / Marcia Pithan Pereira. -- 2012.
59 f.

Orientadora: Maria Isabel Albano Edelweiss.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Adenocarcinoma de pâncreas. 2. HER-2. 3. HercepTest. 4. ToGA Trial. I. Edelweiss, Maria Isabel Albano, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

À minha Orientadora Professora Doutora Maria Isabel Albano Edelweiss, pelo incentivo e confiança em mim depositada, além da disponibilidade para orientar-me e tranqüilizar-me nas horas mais difíceis.

À Patrícia Izetti, Médica do Laboratório de Medicina Genômica e Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, pessoa imprescindível para a realização deste projeto desde a sua concepção até a redação final, pela incansável dedicação e disponibilidade, sempre com a delicadeza e seriedade características na transmissão do conhecimento e nas palavras de apoio.

À médica patologista Camila Nóbrega Juliano, colega e grande amiga, parceira fundamental nesta jornada, por ter sido tão determinada e paciente frente às minhas dificuldades.

À Dra. Patrícia Ashton-Prolla, Médica do Serviço de Genética Médica e do Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo conhecimento compartilhado e confiança desde o início do projeto.

Ao Dr. Alessandro Bersch Osvaldt, Médico do Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo, Grupo de Vias Biliares e Pâncreas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela dedicação incondicional na realização deste trabalho e por ser um exemplo de pesquisador.

Aos bolsistas Alex Pritzel dos Santos e Charles Pedro Bravosi que ajudaram na coleta de dados.

Muito Obrigada!

Resumo

Introdução: a superexpressão de HER-2 tem correlação com maior agressividade em carcinomas de mama e estômago, e a sua detecção já foi incorporada como rotina na análise destas neoplasias. Critérios ideais para avaliação do HER-2 em câncer de pâncreas permanecem incertos.

Objetivos: avaliar o *status* do HER-2 e o seu valor preditivo em adenocarcinoma pancreático.

Materiais e métodos: análise clinicopatológica e imuno-histoquímica de 112 pacientes com diagnóstico de câncer de pâncreas com base nos critérios propostos para câncer de mama (HercepTest™) e de estômago (*ToGA Trial*).

Resultados: pelo HercepTest™ 5 (4.5%) casos apresentaram escore 3+, 3 (2.7%) escore 2+ e 104 (92.9%) escores 0/1+. Na análise pelo *ToGA Trial*, 9 (8.0%) obtiveram escore 3+, 32 (28.6%) escore 2+ e 71 (63.4%) escores 0/1+. Todos os casos positivos pelo HercepTest™ também o foram para o *ToGA Trial*. Pacientes com hipereexpressão (3+) apresentaram sobrevida média maior que aqueles sem (0 a 2+) tanto pelo HercepTest™ quanto pelo *ToGa Trial* (43.88 vs. 10.3 meses, $p = 0.029$ e 40.7 vs. 10.1 meses, $p = 0.013$, respectivamente). Os demais parâmetros não mostraram correlação com a expressão de HER-2.

Conclusão: diferenças na incidência e no significado prognóstico da superexpressão podem ser decorrentes do pequeno tamanho amostral e do uso de dois critérios diferentes de positividade para HER-2. Estes resultados servem com impulso para novas investigações de superexpressão e amplificação do HER-2

utilizando, além da imuno-histoquímica, métodos como FISH e SISH, a fim de se obter mais opções terapêuticas para oferecer aos pacientes, como agentes anti-HER-2.

PALAVRAS-CHAVE: CÂNCER DE PÂNCREAS, HER-2, HERCEPTEST™, TOGA
TRIAL

Abstract

Introduction: HER-2 overexpression is correlated with aggressiveness in breast and gastric cancers, and its detection has been incorporated as routine in the analysis of these neoplasms. Ideal criteria for evaluation of HER-2 in pancreatic cancer remain unclear.

Objectives: to assess the HER-2 status and its predictive value in pancreatic adenocarcinoma.

Material and methods: clinicopathologic and immunohistochemical analysis were undertaken in 112 patients with pancreatic cancer using the criteria proposed for breast (HercepTest™) and stomach cancer (ToGA Trial).

Results: using HercepTest™ 5 (4.5%) cases had a score of 3+, 3 (2.7%) had a score of 2+ and 104 (92.9%) had scores of 0/1 +. By ToGA Trial, 9 (8.0%) obtained score of 3+, 32 (28.6%) had a score of 2+ score and 71 (63.4%) had scores of 0/1 +. All positive cases by HercepTest™ also went to the ToGA Trial. Patients with overexpression (3 +) showed greater survival than those without (0 to 2 +) by both HercepTest™ and ToGa Trial (43.88 vs. 10.3 months, $p = 0.029$ and 40.7 vs. 10.1 months, $p = 0.013$, respectively). Other parameters did not show correlation with the expression of HER-2.

Conclusion: differences in incidence and prognostic significance of overexpression may be explained from small sample size and the use of two different criteria of positivity for HER-2. These results serve as an impulse for new investigations of overexpression/amplification of the HER-2 using, besides immunohistochemistry,

FISH and SISH methods, in order to get more treatment options to provide patients, as agents anti-HER-2.

KEYWORDS: PANCREATIC CANCER, HER-2, HERCEPTEST™, TOGA TRIAL

Lista de Figuras

Figura 1. Critérios para estadiamento do câncer de pâncreas.....	21
Figura 2. Representação morfológica evolutiva e biomolecular das NIPans.....	23
Figura 3. Histologia do pâncreas normal e das NIPans.....	24
Figura 4. Seqüências de progressão do adenocarcinoma pancreático.....	25

Lista de Abreviaturas

ADP	Adenocarcinoma ductal pancreático
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CPRE	Colangiopancreatografia retrógrada endoscópica
DM	Diabetes mellitus
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
HER-2	<i>Epidermal growth factor receptor 2</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
IMC	Índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NIPan	Neoplasia intraepitelial pancreática
PDQ®	<i>Pancreatic Cancer Treatment</i>
RNM	Ressonância nuclear magnetic
SISH	Hibridização <i>in situ</i> pela prata
TC	Tomografia computadorizada
ToGA	<i>Trastuzumab for Gastric Cancer</i>
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>

Sumário

1 Introdução	122
2 Revisão da literatura	155
2.1 Definição	Erro! Indicador não definido. 5
2.2 Epidemiologia.....	Erro! Indicador não definido.
2.3 Características clínicas	Erro! Indicador não definido. 7
2.4 Diagnóstico.	Erro! Indicador não definido. 8
2.5 Características histológicas	Erro! Indicador não definido. 9
2.6 Aspectos moleculares	21
2.7 HER-2 e o câncer de pâncreas	26
3 Objetivos	288
3.1 Objetivo principal.....	288
3.2 Objetivos secundários	288
4 Referências bibliográficas da revisão.....	299
5 Artigo em inglês.....	34
6 Considerações finais	55

1 Introdução

O adenocarcinoma ductal é o tipo histológico mais comum entre as neoplasias malignas do pâncreas. No mundo todo, cerca de 213.000 óbitos por ano são atribuídos a esta patologia, sendo a oitava causa de morte por câncer. A sobrevida global em 5 anos é de cerca de 4%, consequentemente a taxa de mortalidade é quase igual à incidência da doença (Hruban et al, 2007).

Geralmente, o diagnóstico do ADP é estabelecido em estágios avançados, devido à biologia tumoral agressiva, à ausência de exames de imagem ou marcadores tumorais capazes de detectar a doença em fases iniciais. Grande parte dos pacientes submetidos à ressecção cirúrgica permanece com doença residual ou apresentam recidiva. Atualmente, além dos fatores prognósticos tradicionais, que incluem o tamanho e grau tumoral, comprometimento linfonodal, margens cirúrgicas e presença de invasão linfovascular e neural, um grande número de marcadores moleculares tem sido avaliados como potenciais fatores prognósticos ou para estabelecimento de terapias alvo-moleculares. A imuno-histoquímica ainda é a técnica mais acessível e mais amplamente utilizada para a avaliação destes marcadores em espécimes teciduais.

O oncogene HER-2 (CerbB2/neu) é uma glicoproteína transmembrana, pertencente à família dos receptores do fator de crescimento epidérmico. Já está bem estabelecida a associação entre a superexpressão de HER-2 com a carcinogênese de tumores de sólidos, principalmente câncer de mama.

Slamon et al. (1987) publicou um dos primeiros e mais importantes estudos sugerindo uma forte relação entre a hiperexpressão deste gene e um pior prognóstico das neoplasias mamárias. Desde então, drogas alvo-moleculares têm sido desenvolvidas e a detecção do *status* tumoral para HER-2 (amplificação/superexpressão) já foi incorporada como rotina na avaliação prognóstica e terapêutica do câncer de mama. Mais recentemente, a literatura apontou positividade para HER-2 em tumores gástricos e da junção esôfago-gástrica. Esta positividade, assim como nos tumores mamários, também está relacionada à pior prognóstico, doença mais agressiva e menor sobrevida (Rüschoff et al., 2010).

Em ambos os casos, a determinação do *status* do HER-2 é feita inicialmente pela técnica de imuno-histoquímica, sendo os casos com resultado indeterminado encaminhados para avaliação por hibridização *in situ* (FISH ou SISH). No entanto, os métodos consagrados de avaliação da positividade nestes órgãos diferem entre si. Em mama os resultados são analisados baseando-se no HercepTest™ e em estômago e junção gastro-esofágica utilizam-se os critérios propostos pelo estudo ToGA (Rüschoff et al., 2010).

A hiperexpressão do HER-2/neu é uma das alterações genéticas mais precoces na tumorigênese do pâncreas, ocorrendo a partir das neoplasias intraepiteliais pancreáticas grau 1A (NIPan 1A) (Hruban et al., 2000). Entretanto, a superexpressão/amplificação deste oncogene em adenocarcinomas pancreáticos e a sua correlação com sobrevida ainda não

estão totalmente definidas, pois os estudos referentes ao *status* do HER-2 apresentam resultados conflitantes, com índices de positividade variando entre 0% a 82% (Saxby et al., 2005).

Com o benefício bem estabelecido da terapia anti-HER-2 utilizando o Trastuzumab (Herceptin, Genentech, South San Francisco, CA) em câncer de mama e estômago, é de vital importância explorar sua eficácia em outros sítios tumorais, como o pâncreas. Entretanto, ainda não há um método validado para a avaliação adequada da positividade do HER-2 neste órgão.

O presente estudo avaliou através de imuno-histoquímica, o *status* do HER-2 em ADPs utilizando os critérios estabelecidos para mama e para estômago, fazendo uma comparação entre eles e correlacionando os achados com outros fatores relacionados ao tumor (tipo histológico, estágio patológico e sobrevida dos pacientes).

2 Revisão da literatura

2.1) Definição:

O ADP é uma neoplasia epitelial maligna com diferenciação glandular (ductal) e sem componentes predominantes de outros tipos de carcinoma. Tem como sinônimos adenocarcinoma de células ductais, adenocarcinoma tipo tubular, carcinoma de células ductais ou câncer de pâncreas (Hruban et al., 2007).

2.2) Epidemiologia:

O ADP é a neoplasia maligna pancreática mais comum e dos tipos de câncer mais letais em humanos. Estimativas do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) indicam que cerca de 44000 novos casos de ADP tenham sido diagnosticados em 2011. Sendo o ADP considerado a quarta causa de morte por câncer em homens e mulheres (PDQ®).

Dados do INCA estimam que, no Brasil, o câncer de pâncreas represente 2% de todos os tipos de câncer e seja responsável por 4% do total de mortes por câncer. Estudo realizado em 2002 demonstrou um comportamento ascendente das taxas de mortalidade padronizadas por idade para câncer de pâncreas no Brasil (2,56 em 1980-82 e 3,10/100.000 em 1995-97), correspondendo a um incremento médio anual de 1,31% no período analisado. Os valores mais elevados foram encontrados nas regiões Sul e Sudeste (7,05/100.000 em Porto Alegre; 4,13/100.000 no Rio de Janeiro) e Porto Alegre apresentou as maiores taxas (9,4 e 5,3/100.000, para homens e

mulheres, respectivamente), demonstrando ser este um importante problema de saúde pública no nosso país (Moraes, 2002).

O câncer de pâncreas é mais comum em homens (1.3 homens: 1.0 mulheres) e ocorre predominantemente em indivíduos mais velhos, com um pico de incidência entre a 7ª e 8ª décadas de vida, sendo que 80% dos casos ocorrem entre os 60 e 80 anos. Pacientes com diagnóstico antes dos 40 anos apresentam, em geral, algum fator de risco associado, como história familiar de câncer de pâncreas ou alguma doença genética, como Peutz-Jeghers (Hruban et al., 2007).

Os fatores de risco para ADP podem ser divididos em ambientais, patológicos, genéticos e ocupacionais. O hábito de fumar é o fator de risco ambiental mais fortemente relacionado a esta neoplasia (Hruban et al, 2007; Lowenfels et al, 2004; Sakorafas et al, 2001). A maioria dos estudos publicados evidenciou que a exposição ao tabaco aumenta em duas vezes a chance de doença e que este é um fator de risco dose-dependente, ou seja, pessoas que fumam mais têm maior probabilidade de desenvolver a doença. Após 10 anos de abstinência, estima-se que a taxa de incidência seja semelhante à de não fumantes (Hidalgo, 2010; Vincent et al., 2011).

A relação entre nutrição e dieta e o câncer de pâncreas tem sido tema de várias revisões. Acredita-se que uma alta ingestão calórica, uma dieta rica em carnes e gordura, a obesidade ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$) e o sedentarismo estariam associados com um aumento no risco de câncer. Já uma dieta rica

em frutas, vegetais, fibras e vitamina C seriam protetoras (Hruban et al., 2007; Sakorafas et al., 2001).

O consumo de álcool é um fator de risco para pancreatite, entretanto ainda não foi confirmada a sua associação com o câncer (Ye et al., 2002).

Várias comorbidades aumentam a chance de desenvolver adenocarcinoma de pâncreas. Diabetes mellitus de longa data está relacionado a um aumento de duas vezes no risco de câncer e pode ser uma manifestação inicial do tumor. Cerca de 20% dos pacientes com carcinoma de pâncreas tem DM no momento do diagnóstico (Hruban et al., 2007; Hart et al., 2011).

Todos os tipos de pancreatite crônica (alcoólica, não-alcoólica e hereditária) estão relacionados ao desenvolvimento de câncer, sendo que as formas familiares têm associação mais forte. Há uma vasta lista de doenças genéticas que elevam o risco de desenvolver adenocarcinoma de pâncreas. Mutações no gene BRCA2, por exemplo, aumentam 3 a 10 vezes esta chance, enquanto pacientes com pancreatite familiar tem um risco 50 a 80 vezes maior (Hruban et al., 2007).

2.3) Características clínicas:

O ADP em estágios iniciais é, em geral, clinicamente silencioso e a doença só se torna aparente quando o tumor invade tecidos peripancreáticos ou quando produz metástases à distância. A maioria dos pacientes quando apresentam sintomas relacionados ao câncer de pâncreas já tem doença

avançada. Pacientes com ADP que são submetidos à tomografia computadorizada por outras razões antes do diagnóstico, em revisão retrospectiva revelam anormalidades sutis suspeitas para carcinoma até um ano antes do desenvolvimento dos sintomas, sugerindo uma oportunidade perdida de diagnóstico precoce.

Os sintomas típicos do ADP incluem dor abdominal ou na região dorsal, icterícia obstrutiva e perda de peso. A diminuição do peso pode ser resultante da anorexia, dificuldade digestória por obstrução do ducto pancreático ou caquexia (Vincent et al, 2011).

2.4) Diagnóstico:

Poucos são os métodos diagnósticos disponíveis atualmente capazes de detectar com precisão e precocemente o ADP na população geral, antes do início dos sintomas. Diferentes técnicas para a identificação do ADP em fase inicial têm sido estudadas, como a realização de ecoendoscopia em pacientes de alto risco, mas os resultados ainda são iniciais e controversos (Klapman et al., 2008).

Testes com marcadores moleculares têm sido desenvolvidos e propostos para o diagnóstico de lesões pancreáticas precursoras, na tentativa de detectar o tumor em estágios mais ressecáveis e curáveis. No entanto, o papel dos marcadores tumorais ainda é limitado. Nenhum deles, incluindo CA 19-9, demonstrou ser útil na avaliação de uma população assintomática. Entretanto, o CA 19.9 ainda é utilizado como forma de monitorar a resposta

ao tratamento e é válido se associado a outros testes diagnósticos (Hidalgo, 2010; Vincent et al., 2011).

Exames de imagem são úteis para o diagnóstico da doença, uma vez que o tumor seja grande o suficiente para provocar sintomas e, geralmente, neste momento já estão em estágio avançado e são irresssecáveis.

Quando há suspeita de câncer de pâncreas, as técnicas de imagem mais utilizadas são a TC, a RNM, o ultrassom endoscópico e a CPRE. A TC é o método mais amplamente usado para diagnóstico e estadiamento de neoplasias pancreáticas (Klapman et al., 2008, Vincent et al., 2011).

Dentre as novas tecnologias para a detecção do câncer de pâncreas, as técnicas de genômica e proteômica têm sido visadas para a identificação de potenciais biomarcadores. Diferentes estudos tentaram definir os genes cujas alterações estivessem associadas a anormalidades teciduais, buscando assim estabelecer uma relação entre causa e efeito. Em relação ao câncer de pâncreas, foram comparadas inicialmente as expressões gênicas entre as NIPans e os adenocarcinomas ductais (Rogers et al., 2006).

Atualmente o diagnóstico definitivo ainda é a análise histopatológica da lesão.

2.5) Características histológicas:

A maioria dos adenocarcinomas de pâncreas (60-70%) ocorre na cabeça, 5 a 15% no corpo e 10-15% na cauda do órgão. Em geral são

solitários, embora multifocalidade possa ocorrer. Raramente podem iniciar em tecido pancreático ectópico (Edelweiss et al., 2010).

Vários sistemas foram propostos para graduar o carcinoma de pâncreas. O mais utilizado é o pTNM, proposto pelo AJCC e pela UICC, no qual o prognóstico pós-ressecção de um carcinoma de pâncreas é primeiramente determinado pela extensão anatômica da doença, independentemente da ressecção completa ou não da lesão. A designação “T” refere-se ao tumor primário que não foi previamente tratado. O símbolo “p” indica a classificação patológica do TNM e está fundamentada no exame macro e microscópico. “pT” envolve a análise do tumor primário em peça de ressecção cirúrgica ou fragmento obtido por biópsia, e que sejam adequados para avaliar o maior grau pT; pN envolve a avaliação dos linfonodos ressecados quanto à presença de metástases e pM implica no exame microscópico de lesões distantes.

Figura 1. Critérios para estadiamento do câncer de pâncreas.

American Joint Committee on Cancer

Pancreas Cancer Staging*

7th EDITION

Definitions

Primary Tumor (T)

TX Primary tumor cannot be assessed
 T0 No evidence of primary tumor
 Tis Carcinoma in situ**
 T1 Tumor limited to the pancreas, 2 cm or less in greatest dimension
 T2 Tumor limited to the pancreas, more than 2 cm in greatest dimension
 T3 Tumor extends beyond the pancreas but without involvement of the celiac axis or the superior mesenteric artery
 T4 Tumor involves the celiac axis or the superior mesenteric artery (unresectable primary tumor)

Regional Lymph Nodes (N)

NX Regional lymph nodes cannot be assessed
 N0 No regional lymph node metastasis
 N1 Regional lymph node metastasis

Distant Metastasis (M)

M0 No distant metastasis
 M1 Distant metastasis

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS			
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1	N0	M0
Stage IB	T2	N0	M0
Stage IIA	T3	N0	M0
Stage IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stage III	T4	Any N	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

Tumors of the head of the pancreas are those arising to the right of the superior mesenteric-portal vein confluence.

Notes
 * Endocrine and exocrine tumors are now staged by a single pancreatic staging system.
 ** Also includes the "Papanicolaou" classification.

American Cancer Society
 Financial support for AJCC 7th Edition Staging Posters provided by the American Cancer Society

ajcc

(Fonte: Pancreatic Cancer Staging 7th edition, AJCC)

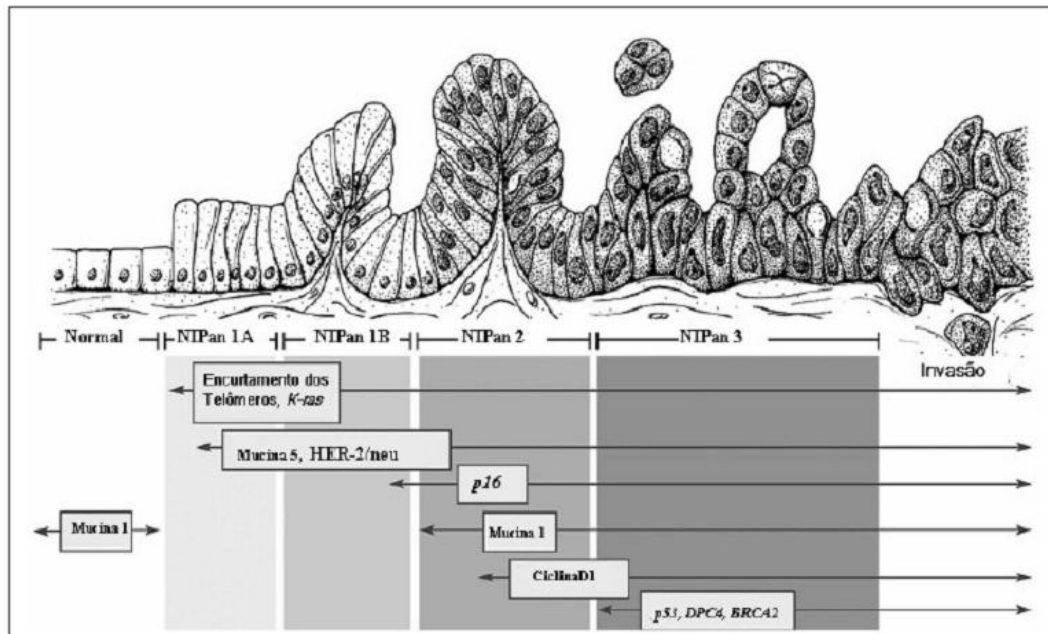
2.6) Aspectos moleculares:

O modelo de estudo das lesões neoplásicas evolutivas é semelhante ao proposto por Vogelstein et al. (1988) para adenocarcinoma colorretal, que tem como seqüência de eventos na célula colônica normal a mutação do gene APC, formação de pólipos adenomatosos com transformação para displasia

em graus variados e, finalmente, o adenocarcinoma colorretal. A evidência clínica e morfológica desta seqüência de lesões precursoras nos ADPs inicia-se com as observações de Hulst (1905) da presença de neoplasias pancreáticas intraductais (Hulst et al., 1905; Takaori et al., 2004). Além disso, características morfométricas dos núcleos destas lesões foram encontradas e correlacionadas com o grau de invasividade das mesmas (Bersch et al., 2003).

Somente em 2001, em reunião de consenso, foram descritas as neoplasias intraepiteliais pancreáticas (NIPan 1A, NIPan 1B, NIPan 2 e NIPan 3) (Hruban et al., 2001). Os graus 1A, 1B, 2 e 3 representam, de forma ascendente, atipia citológica caracterizada por perda da polaridade, superposição e aumento nucleares, pseudoestratificação e hiperchromatismo. Cada estágio das NIPans é caracterizado por um padrão distinto de irregularidades genéticas que afetam genes ou seqüência gênicas específicas.

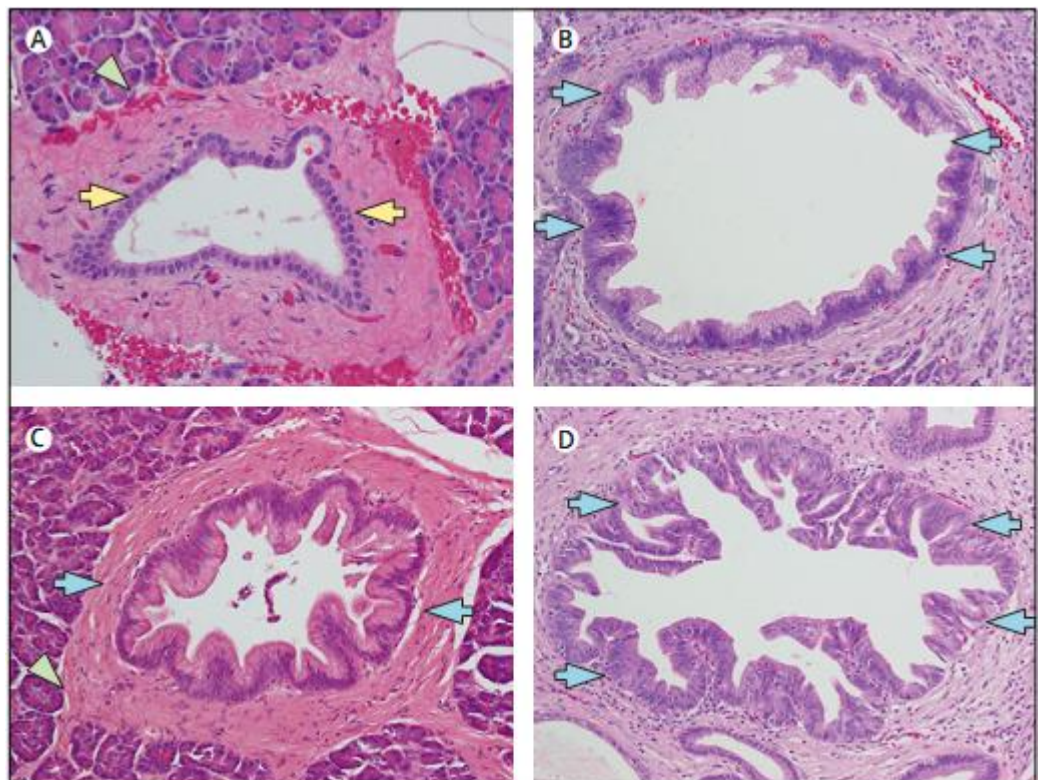
Figura 2. Representação morfológica evolutiva e biomolecular das NIPans.



(Fonte: adaptado de Maitra et al. 2003)

Assim, o ADP se desenvolve a partir de lesões precursoras não-invasoras, mais tipicamente as neoplasias intraepiteliais (figura 3), adquirindo alterações genéticas e epigenéticas ao longo do desenvolvimento. O câncer de pâncreas também pode se originar das neoplasias papilares mucinosas intraductais ou neoplasias mucinosas císticas (Hruban et al., 2000) (figura 4).

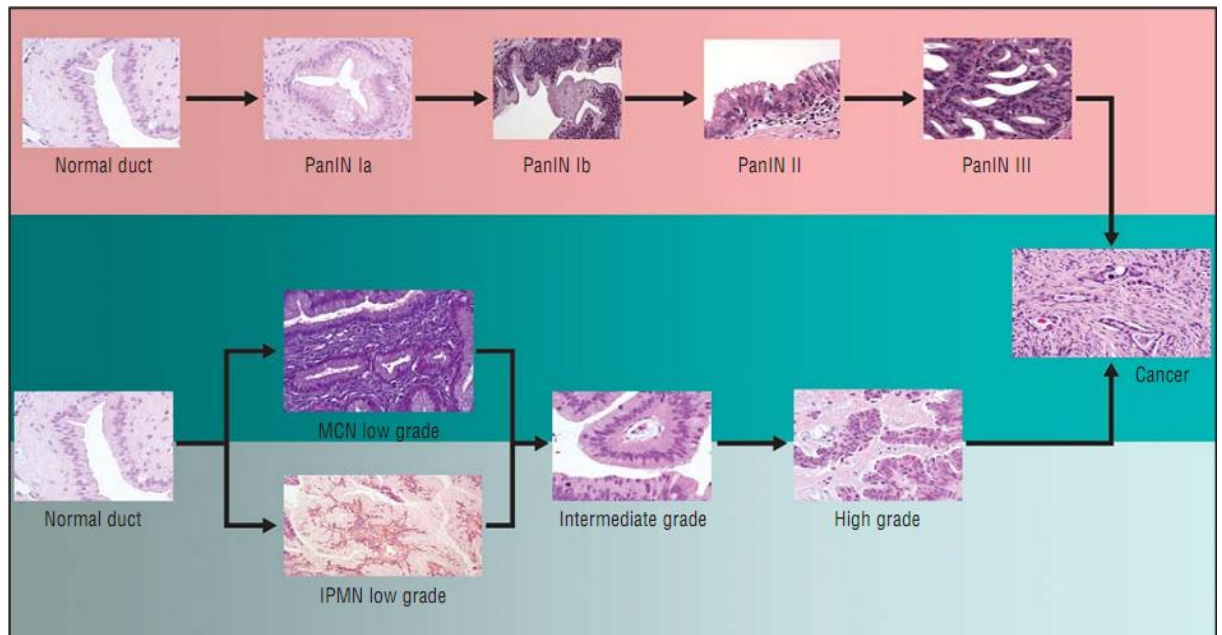
Figura 3. Histologia do pâncreas normal e das NIPans. (A) Ducto pancreático normal. (B) NIPan 1. (C) NIPan 2. (D) NIPan 3. Setas amarelas: ducto pancreático normal. Cabeça de seta verde: tecido acinar normal. Setas azuis: NIPans. 400xx



(Fonte: adaptado de Vincent et al., 2011)

Figura 4. Seqüências de progressão do adenocarcinoma pancreático.

As três lesões precursoras conhecidas são as neoplasias intraductais, as neoplasias mucinosas císticas e a neoplasias pancreáticas mucinosas intraductais.



(Fonte: adaptado de Klapman et al., 2008)

As alterações genéticas mais freqüentes no adenocarcinoma de pâncreas invasor são: ativação mutacional do oncogene KRAS, a inativação de genes supressores tumorais incluindo CDKN2A, TP53, SMAD4 e BRCA2, perdas cromossômicas, ampliações gênicas e encurtamento de telômeros. As mutações no KRAS, o encurtamento de telômeros e a amplificação do HER-2 são as anormalidades genéticas mais iniciais, ocorrendo mesmo em NIPans de baixo grau (van Heek NT et al., 2002), enquanto a inativação do TP53, SMAD4 e BRCA2 acontecem nas NIPans avançadas e nos tumores invasores (Vincent et al., 2011).

A análise da evolução molecular do ADP indica que um clone precursor inicial da neoplasia demoraria mais de 10 anos para evoluir para um clone maligno e vários anos adicionais para subclones metastáticos surgirem a partir do tumor primário. Comparações entre as alterações observadas no tumor primário e nas metástases revelam que, não somente os genes estão mutados antes do desenvolvimento do adenocarcinoma invasor, como também a instabilidade genética continua mesmo após a disseminação metastática. Embora estas estimativas reflitam a variação no comportamento tumoral nos pacientes, elas também indicam que o tumor primário pode ficar restrito ao órgão por muitos anos antes de provocar metástase, criando oportunidades de diagnóstico mais precoce (Vincent et al., 2011).

2.7) HER-2 e o câncer de pâncreas:

O oncogene HER-2 é uma proteína transmembrana, pertencente à família das tirosino-quinases. Há cerca de 25 anos foi detectada sua amplificação em tumores de mama e tal alteração mostrou forte correlação com a patogênese e progressão tumoral. A partir de então a amplificação do HER-2, resultante da superexpressão protéica, tem sido relacionada à proliferação mais rápida das células tumorais e maior resistência das mesmas. Também, drogas alvo-moleculares têm sido desenvolvidas, tornando a detecção do HER-2 uma rotina prognóstica e preditiva em câncer de mama. Ele apresenta-se hiperexpresso e/ou amplificado em cerca de 20% dos tumores mamários e, quando ativado, gera sinais antiapoptose e de proliferação celular, acelerando o desenvolvimento e progressão destas

neoplasias. A sua superexpressão ou amplificação se detectadas por métodos adequados, têm um importante valor na decisão terapêutica (Gutierrez et al., 2011).

A amplificação do HER-2 nos adenocarcinomas gástricos foi evidenciada logo após a sua descoberta no câncer de mama, particularmente nos adenocarcinomas gástricos de tipo intestinal. Em um estudo japonês de 1991, a superexpressão protéica, detectada por imuno-histoquímica, foi relatada em 11.9% dos 260 casos de câncer gástrico (Albarello et al., 2011). A positividade do HER- 2 em tumores gástricos também parece estar relacionada à pior prognóstico, doença mais agressiva e menor sobrevida (Rüschoff et al., 2010).

No pâncreas, os dados disponíveis são conflitantes em relação à incidência da expressão do HER-2, que varia de 0 a 82% (Saxby et al., 2005) nos tumores invasivos. Alguns estudos sugerem que a superexpressão de HER-2 também tem relação com o grau histológico, mas esta avaliação ainda é limitada (Dugan et al., 1997). Tal inconsistência de resultados coloca em questão o uso de terapias anti-HER-2 em ADPs até que estudos mais consistentes em relação à real incidência de positividade para HER-2 sejam realizados (Stoecklein et al., 2004; Kimura et al., 2006; Sharif et al., 2008).

3 Objetivos

3.1 Objetivo principal:

Avaliar a expressão de HER-2 por técnica imuno-histoquímica no adenocarcinoma ductal pancreático.

3.2 Objetivos secundários:

- Investigar o padrão de expressão de HER-2 em amostras de tecido tumoral por imuno-histoquímica, comparando os métodos já validados para câncer de mama (HercepTest™) e para câncer de estômago e junção gastro-esofágica (*ToGA Trial*);
- Correlacionar a superexpressão de HER-2 em adenocarcinoma de pâncreas com dados clínicos e anatomopatológicos;
- Avaliar o papel prognóstico da superexpressão de HER-2 por meio de correlações com os dados de sobrevida global e livre de doença dos pacientes incluídos no estudo.

4 Referências bibliográficas da revisão

1. Albarello L, Pecciarini L, Doglioni C. HER2 testing in gastric cancer. *Adv Anat Pathol* 2011 Jan; 18(1): 53-9.
2. Bersch VP, Silva VD, Osvaldt AB, Costa MSB, Rhode L, Mossmann DF. Digital karyometry in pancreatic adenocarcinoma. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, v. 25, n. 2, p. 108-114, 2003.
3. Dugan MC, Dergham ST, Kucway R, Singh K, Biernat L, Du W, et al. HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma: relation to tumor differentiation and survival. *Pancreas* 1997 Apr; 14(3): 229-236.
4. Edelweiss MI, Pereira MP, Feier FH, Silva VN, Dedavid TL, Osvaldt AB. Intraepithelial neoplasia in heterotopic pancreatic tissue. *Histopathology* 2010; 57 (Suppl. 1): 90.
5. Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2011 Jan; 135: 55-62.
6. Hart PA, Kamada P, Rabe KG, Srinivasan S, Basu A, Aggarwal G, Chari ST. Weight loss precedes cancer-specific symptoms in pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Pancreas* 2011 Jul; 40(5): 768-72.
7. Hidalgo, M. Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 2010 Apr 29; 362(17): 1605-17.
8. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000 Aug; 6(8): 2969-72.

9. Hruban RH, Klimstra DS, Pitman MB. Tumors of the pancreas. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 2007. Atlas of tumor pathology; 4th series, fascicle 6.
10. Hulst SPL. Zur kenntnis der genese des adenokarzinoms und karzinoms des pankreas. Virchows Arch B 1905; 180: 288-316.
11. Klapman J, Malafa MP. Early detection of pancreatic cancer: why, who, and how to screen. Cancer Control. 2008 Oct; 15(4):280-7.
12. Kimura K, Sawada T, Komatsu M, Inoue M, Muguruma K, Nishihara T, et al. Antitumor effect of trastuzumab for pancreatic cancer with high HER-2 expression and enhancement of effect by combined therapy with gemcitabine. Clin Cancer Res 2006 Aug 15; 12(16): 4925-32.
13. Koka V, Potti A, Koch M, Fraiman G, Mehdi S, Levitt R. Role of immunohistochemical identification of Her-2/neu and detection of variability in overexpression in pancreatic carcinoma. Anticancer Res 2002 May-Jun; 22(3): 1593-7.
14. Komoto M, Nakata B, Amano R, Yamada N, Yashiro M, Ohira M, et al. HER-2 overexpression correlates with survival after curative resection of pancreatic cancer. Cancer Sci 2009 Jul; 100(7): 1243-7.
15. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. Jpn J Clin Oncol. 2004 May;34(5): 238-44.
16. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma

- progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* 2003 Sep; 16(9):902-12.
17. Moraes, VM. Evolução do padrão alimentar e tendência da mortalidade por câncer de pâncreas nas capitais do Brasil, 1980-1997. Tese de Mestrado, Rio de Janeiro; s.n; 2002.
18. Pancreatic Cancer Staging [homepage]. Chicago, IL. American Joint Committee on Cancer, 7th edition. Disponível em: <http://www.cancerstaging.org/staging/index.html#>
19. Pancreatic Cancer Treatment (PDQ®) [homepage]. Bethesda, MD. National Cancer Institute. Disponível em <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/pancreatic/HealthProfessional/page1/AllPages>
20. Rogers CD, Fukushima N, Sato N, Shi C, Prasad N, Hustinx SR, Matsubayashi H, Canto M, Eshleman JR, Hruban RH, Goggins M. Differentiating pancreatic lesions by microarray and QPCR analysis of pancreatic juice RNAs. *Cancer Biol Ther* 2006; 5:1383-9.
21. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, et al. HER-2 diagnostics in gastric cancer – validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 2010 Sep; 457(3): 299-307.
22. Safran H, Iannitti D, Ramanathan R, Schwartz JD, Steinhoff M, Nauman C, et al. Herceptin and gemcitabine for metastatic pancreatic cancers that overexpress HER-2/neu. *Cancer Invest* 2004; 22(5): 706-12.

23. Sakorafas GH, Tsiotos GG. Molecular biology of pancreatic cancer: potential clinical implications. *BioDrugs* 2001;15(7): 439-52.
24. Saxby AJ, Nielsen A, Scarlett CJ, Clarkson A, Morey A, Gill A, Smith RC. Assessment of HER-2 status in pancreatic adenocarcinoma: correlation of immunohistochemistry, quantitative real-time RT-PCR, and FISH with aneuploidy and survival. *Am J Surg Pathol* 2005 Sep; 29(9): 1125-34.
25. Sharif S, Ramanathan RK, Potter D, Cieply K, Krasinskas AM. HER-2 Gene amplification and chromosome 17 copy number do not predict survival of patients with resected pancreatic adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2008 Nov; 53: 3026–3032.
26. Slamon D, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987 Jan 9; 235 (4785): 177-82.
27. Slamon DJ, Clark GM. Amplification of C-erbB2 and aggressive human breast tumors? *Science* 1988 Jun 24; 240: 1795-8.
28. Stoecklein NH, Luebke AM, Erbersdobler A, Knoefel WT, Schraut W, Verde PE, et al. Copy number of chromosome 17 but not HER2 amplification predicts clinical outcome of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2004 Dec 1; 22(23): 4737-45.
29. Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N. Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas* 2004 Apr; 28(3): 257-62.

30. van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, et al. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 2002 Nov; 161(5): 1541-7.
31. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban R, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011 Aug 13; 378(9791): 607-20.
32. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988 Sep 1; 319(9): 525-32.
33. Welsch T, Kleeff J, Büchler MW, Friess H. Activation of growth factor receptors in pancreatic cancer. *Am J Surg* 2007 Oct; 194(Suppl) S76-S83.
34. Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, Büchler M, Kunz J, Beger HG, et al. Overexpression of HER2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma. *Hum Pathol* 1993 Oct; 24: 1127-34.
35. Ye W, Lagergren J, Weiderpass E, Nyrén O, Adami HO, Ekblom A. Alcohol abuse and the risk of pancreatic cancer. *Gut*. 2002 Aug; 51(2): 236-9.

5 ARTIGO EM INGLÊS

HER-2 Status in Pancreatic Cancer: Differences between HercepTest™ and ToGA Trial Classification Scores and Correlation with Survival

Marcia Pithan Pereira^{1,2}, Patricia Izetti^{3,4}, Camila Nóbrega Juliano^{1,2}, Alex Pritzel dos Santos⁵, Charles Pedro Bravosi Cerveira⁵, Patricia Ashton-Prolla^{3,4,6,7}, Alessandro Bersch Osvaldt⁸⁻⁹, Maria Isabel Albano Edelweiss^{1,2,9}

1 - Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brazil.

2 - Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre - RS, Brasil

3 - Programa de Pós-Graduação em Genética de Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brasil

4 - Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre - RS, Brasil

5 - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brasil

6 - Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre - RS, Brasil

7 - Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brasil

8 - Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo, Grupo de Vias Biliares e Pâncreas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre - RS, Brasil

9 - Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brazil.

Corresponding author:

Maria Isabel Albano Edelweiss, MD, PhD.

Serviço de Patologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos 2350. 90035-903 Porto Alegre RS Brazil

e-mail: mariaisabel.edelweiss@gmail.com

Tel.: + 55 51 3359-8313; Fax: + 55 51 3359-8313

ABSTRACT

HER-2 overexpression has been linked to clinical outcomes in several solid tumors, such as breast cancer. However, the correlation between HER-2 overexpression and survival in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains unclear. This study was designed to investigate the predictive value of HER-2 overexpression on pancreatic cancer. A retrospective clinicopathologic analysis was undertaken in 112 patients diagnosed with pancreatic cancer between 2005 and 2011, and immunohistochemistry with HER-2 antibody was performed in primary tumor biopsy samples, duodenopancreatectomy specimens and metastatic disease. Immunoreactivity was classified according with two different methodologies: the scale presented in the HercepTest™ Scoring Guidelines and the score presented in the Trastuzumab for gastric cancer trial (ToGA trial). Results were analyzed in relation to patients' clinicopathologic parameters. Five cases (4.5%) had a score of 3+, 3 (2.7%) had of a score of 2+ and 104 (92.9%) had a score of 0/1+ when evaluated by the HercepTest™ for breast cancer. When classifying tumor tissues by the ToGA trial score, 9 (8.0%) cases were positive for HER-2/neu overexpression and 32 (28.6%) were considered score 2+, with 71 (63.4%) cases being classified as negative. All positive cases classified by HercepTest™ breast cancer scores were positive by ToGA trial scores. Tumor size, tumor location, tumor differentiation, histological findings, and TNM category were not correlated with HER2 expression. The median survival of the entire cohort was 10.6 months. Kaplan-Meier analysis demonstrated that the median survival time of patients with tumors HER-2 overexpression by HercepTest™ breast scores was 43.38 months (95% CI, 14.79 – 71.97), whereas cases classified as 0+ to 2+ had a median survival of 10.3 months (95% CI, 7.55 –

13.97, $p = 0.029$), contrarily from the expected. When using ToGA trial scores, the median survival time of HER-2 overexpression cases was 40.7 months (95% CI, 19.33 - 62.12) and that of the HER-2 low expression patients, 10.1 months (95% CI, 7.17 - 13.29, $p = 0.013$).

These results should encourage further investigation of HER-2 amplification using FISH or SISH methods, and treatments using new molecular targeting agents against HER-2 protein to improve the survival of pancreatic cancer patients.

INTRODUCTION

Today, pancreatic cancer is one of the most lethal cancers in western countries. Despite recent advances in diagnostic modalities and therapeutic strategies, the prognosis is still poor. This may be partially explained by the notorious complexity derived from the multiple genetic aberrations and mixed cellular population present in a pancreatic tumor, which can also explain the heterogeneous clinical course observed in daily practice. The resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) to conventional chemotherapeutic regimens and the high recurrence rate of PDAC even after tumor resection have led to intense efforts to understand the molecular pathways of pancreatic cancer, with the aim of developing additional therapeutic targets. Among the most promising molecules examined in pancreatic cancer pathogenesis for anticancer treatment are growth factors and their receptors (Welsch et al., 2007), as represented by improvements in overall survival with erlotinib (Heinemann V et al., 2012).

Growth factors play a key role in the cancer process. They are important in cell proliferation, adhesion and survival and therefore act upon processes such as tumor growth, invasion, and metastasis. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) belongs to a family of four transmembrane tyrosine kinase receptor proteins known collectively as the HER or erbB family (Saxby et al., 2005). The HER2 gene, known as ErbB-2/neu, is located on the long arm of chromosome 17 (17q12-21.32) and encodes the 185-kDa transmembrane tyrosine kinase receptor. Many studies have demonstrated that HER-2 overexpression is correlated with aggressiveness, poor

prognosis and resistance to chemotherapy in breast and gastric carcinomas (Komoto et al., 2009).

Detection of the tumor HER-2 status (gene amplification and/or protein overexpression) in breast cancer has become routine as the positive HER-2 status detected in around 25% of cases is highly associated with poorer prognosis, more aggressive disease, and an increased risk of recurrence. Furthermore, in breast cancer the determination of HER-2 status is necessary for optimal application of HER-2-directed therapies such as trastuzumab (Herceptin®, Roche), which increases overall survival in both the metastatic and adjuvant settings, and predicts response in the neo-adjuvant setting. A HER2-positive status in gastric cancer also appears to be associated with poorer prognosis, more aggressive disease, and shorter survival. Like in breast cancer, immunohistochemical testing is the primary method of choice to determine HER-2 status in gastric cancer. FISH is restricted to those cases that have equivocal (IHC2+) HER-2 expression (Rüschoff et al., 2010). Recent studies, however, have shown that the same approach may not be applied to different types of cancer. Testing of HER-2 status by immunohistochemistry (IHC) in gastric cancer seems differs from breast cancer. As validated in a large multicenter phase III trial (ToGA trial), the HER-2 testing criteria that more accurately evaluated both gastric carcinoma biopsies and surgical specimens significantly differed from those routinely applied in breast carcinoma (Bang et al., 2010). In 2006, it was reported that discrepancies between IHC and FISH occurred mainly due to basolateral membrane staining of glandular cells (resulting in incompletely stained membranes) as well as a higher percentage of heterogeneous tumors in gastric cancer in comparison with breast cancer (Rüschoff et al., 2010). On the basis of

these observations, they proposed modifications of the HercepTest™ score for gastric cancer samples in an international consensus meeting and this modified HER2 scoring system was used to identify eligible patients for enrollment in the ToGA trial (Bang et al., 2010).

Studies investigating the HER-2 status in pancreatic cancer, as well as correlations with prognosis and survival are very limited. The reported incidence has varied widely (7%-82%), likely due to differences in methodology and criteria for overexpression (Safran et al., 2004). These reports also showed that, unlike in breast and gastric cancer, HER-2 overexpression in pancreatic cancer does not seem to correlate with poor prognosis (Stoecklein et al., 2004; Kimura et al., 2006).

Here, we investigated the overexpression of HER-2 in pancreatic cancer using two different criteria, the HercepTest™ e and ToGA Trial, comparing the results with the tumor aggressiveness, prognostic factors and patient overall survival.

MATERIALS AND METHODOS

Case Selection and Tumor Samples

A retrospective series of 112 pancreatic cancer patients, who underwent tumor biopsy or resection at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) between 2005 and 2011 were included in this study. Histological samples were obtained from duodenopancreatectomies (25.9%), pancreatic biopsies (39.3%) and excision of metastatic pancreatic cancer lesions (34.8%). The immunohistochemical analyses were performed in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples stored in the Department of Pathology of HCPA, after approval by the Institutional Scientific

and Ethics Committees. Clinical variables were obtained from review of medical records and included: age at diagnosis, sex, tumor size and grade, lymph node status, occurrence of metastasis, resection margin involvement, treatment received (type of surgery, radiation therapy, and chemotherapy), disease free-survival and overall survival.

Immunohistochemistry for HER-2

Initially pilot tests were conducted to determine the dilutions according to the manufacturer of the antibody and also determining the pattern of positive control slides, as indicated by the manufacturer and subject to the conditions of the laboratory (positive control) and without the primary antibody (negative control). It was used the antibody HER-2/neu (mouse monoclonal, clone CB-11, Cell Marque®). Cuts were made of four posts in micrometers thick electrically charged plates and incubated at 60 ° C overnight. The blades were identified and dewaxed in xylol and then passed into ethyl alcohol in decreasing concentrations (100%, 85% and 75%) and washed in running water for five minutes. The antigen retrieval was performed following the recommendations of time and pH provided by the manufacturer using the equipment. After antigen retrieval, endogenous peroxidase was blocked and then incubated with the cuts will be blocking protein for five minutes at room temperature in a humid chamber. The cuts were incubated with the primary antibody (HER-2/neu) for 90 minutes at room temperature and subsequently incubated with secondary antibody for 30 minutes at room temperature. After washing in PBS, the sections were incubated with chromogen for 5 minutes and then washed in running water and

counter-stained with hematoxylin. Then, the slides were washed in running water, dehydrated and mounted with balsam and coverslips for microscopic analysis.

Scoring of the Immunohistochemical Stains

The analyses were performed independently by two pathologists who were blinded to all clinicopathologic and outcome variables. Immunohistochemical staining was evaluated by the Breast HercepTest™ and the ToGA trial scores (Figure 1 and 2).

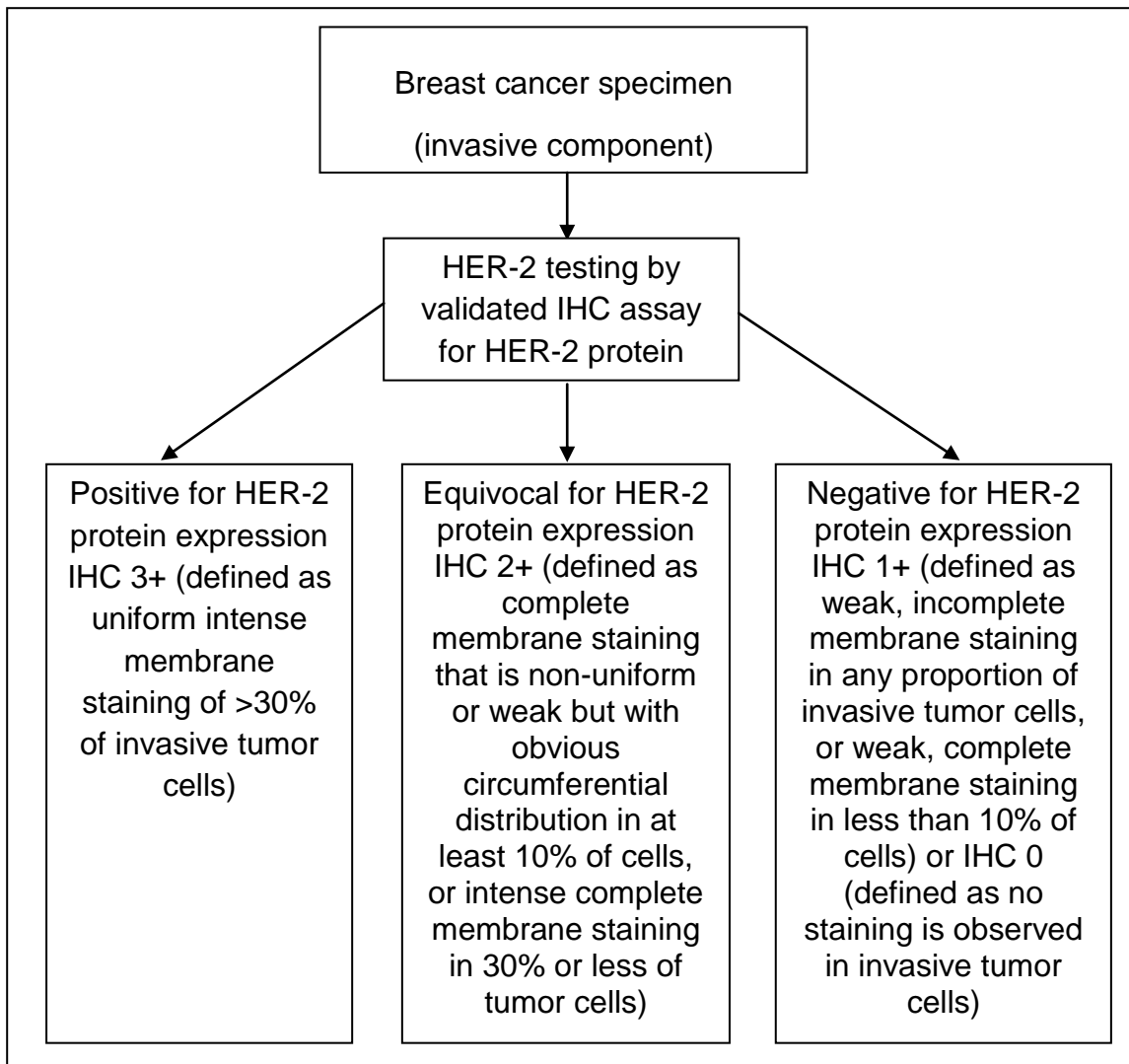


Figure 1. HER-2 algorithm for immunohistochemistry (IHC) in breast cancer (adapted from Wolff et al. and CAP/ASCO, 2007).

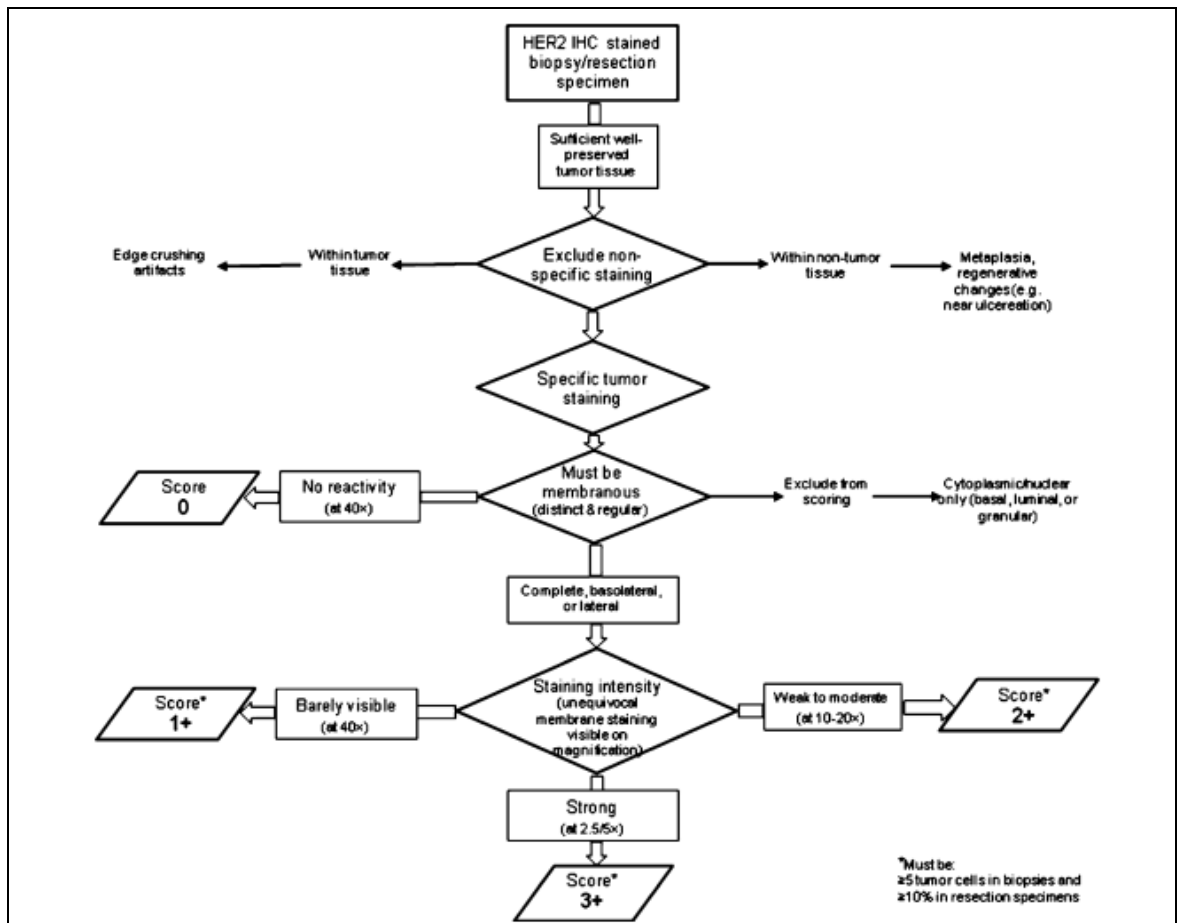


Figure 2. Stepwise approach to IHC scoring in gastric cancer: tissue and quality issues (adapted from Rüschoff et al., 2010)

Fluorescence in situ Hybridization

One slide of each block was subjected to hybridization reactions. HER2/neu amplification was analyzed using FISH HER2 PharmDx (Dako, K5331, Denmark), which contains both fluorescently-labeled HER2/neu gene and chromosome 17 centromere (Chr17) probes. Sections were incubated at 56°C overnight and deparaffinized by washing in xylene, ethanol and distilled water. After incubation in 0.2 M HCl at room temperature for 20 minutes they were heat-pretreated in citrate

buffer (2 × SSC, pH 6.0) at 80°C for 1 to 1.5 hours. They were then digested with pepsin at room temperature for 8–14 minutes, rinsed in 2 × SSC at room temperature for 2 minutes and dehydrated in graded ethanol (75, 80, and 100%) for 2 minutes. After the HER2/Chr17 probe mix was applied to the dry slides, the tissue area was coverslipped and sealed with rubber cement. The slides were then incubated in hybridizer (Hybridizer Instrument for in situ hybridization, DAKO, S2450, Denmark) for denaturation at 82°C for 5 minutes and hybridization at 45°C for about 18 hours. Posthybridization washes were performed, the slides were dehydrated in graded ethanol, and after application of 15 µL of mounting medium containing 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), the tissue area was coverslipped.

FISH analyses were performed according to the HER2 FISH PharmDx (Dako, Denmark) criteria. In each case, 100 non-overlapped, intact interphase tumor nuclei identified by DAPI staining were evaluated, and gene (red signal) and Chr17 (green signal) copy numbers in each nucleus were assessed. The cases were considered to be amplified when the average copy number ratio, HER2/Chr17, was ≥ 2.0 in all nuclei evaluated or when the HER2 signals formed a tight gene cluster. Among the cases in which the gene was not amplified, samples showing more than four copies of the HER2 gene and more than four Chr17 in more than 10% of the tumor cells were considered to be polysomic for chromosome 17.

Statistical analysis

Chi-square statistics was performed to analyze the relationship between HER-2 overexpression and clinicopathological characteristics of pancreatic cancer, and the correlation between both scores. The probability of survival for the different

subgroups was calculated using the Kaplan-Meier method. The Cox proportional hazard model was used to evaluate the association between various HER-2 status and patient's survival. In addition to the HER-2 pattern we included sex, age, T and N stage as potential confounders. Overall survival time was measured from the time of surgery or biopsy to the date of death or last follow-up. All statistics were performed 2-sided, at a significance level of $P < 0.05$, using the SPSS16.0 statistical software.

RESULTS

Of the 112 cases of pancreatic cancer samples examined by IHC, a total of 5 (4.5%) cases were positive for HER-2 overexpression at a score of 3+ when evaluated by the HercepTest™ for breast cancer. Another 3 (2.7%) cases were equivocal with a score of 2+, and the other 104 (92.9%) cases were negative, scored as 0/1+ (Figure 3). When classifying tumor tissues by the ToGA trial score, 9 (8.0%) cases were positive for HER-2/neu overexpression and 32 (28.6%) were considered score 2+, with 71 (63.4%) cases being classified as negative. All positive cases classified by HercepTest™ breast cancer scores were positive by ToGA trial scores. FISH results were available for only three of the 9 cases scored as 3+ and only one of them showed an increase in the HER2-gene copy.

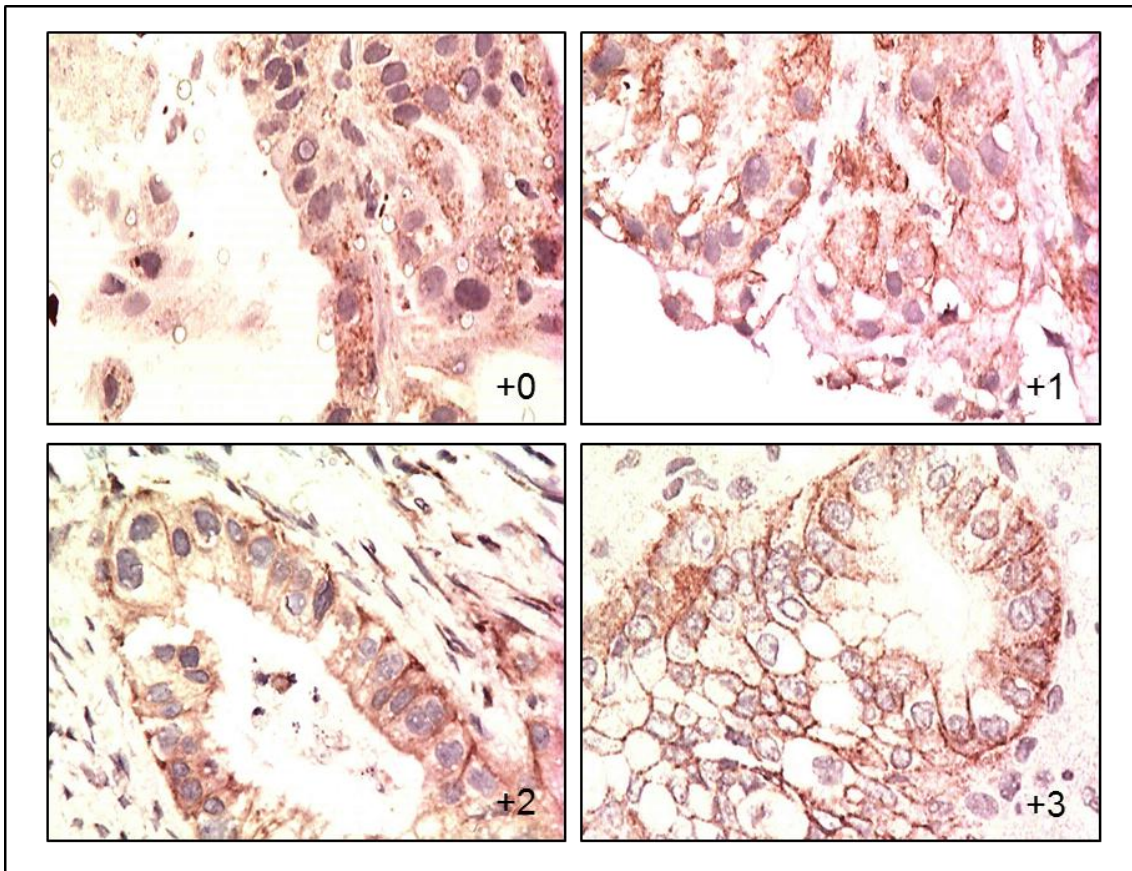


Figure 3. Immunohistochemistry (IHC) for HER-2 expression in cases which there was concordance between breast HercepTest™ and ToGa trial criteria.

Correlation between HER2 expression and clinicopathological factors

Tumor size, tumor location, tumor differentiation, histological findings, and TNM category were not correlated with HER2 expression (Table 1). Tumors with a higher mean size showed a higher HER-2 amplification rate than smaller tumors when classified through HercepTest™ breast cancer scores ($P < 0.05$). There was no relationship observed between HER-2 overexpression and sex, age, tumor differentiation, UCLA stage, lymph node and distant metastases ($P > 0.05$).

Table 1. Relationship between HER-2/neu overexpression (IHC 3+) by HercepTest™ and ToGA Trial Scores and clinicopathological characteristics of pancreatic cancers.

Clinicopathological Characteristics	No. Patients	HercepTest™ scores		P value	ToGA trial scores		P value
		IHC <3+ No. (%)	IHC 3+ No. (%)		IHC <3+ No. (%)	IHC 3+ No. (%)	
Mean age at diagnosis (± SD)	112	65.35 ± 10.3	66.00 ± 9.1	0.891	65.49 ± 10.5	64.2 ± 7.0	0.725
Gender							
Male	112	52 (48.6)	1 (20.0)	0.214	50 (48.5)	3 (33.3)	0.385
Female		55 (51.4)	4 (80.0)		53 (51.5)	6 (66.7)	
Tumor differentiation*							
Well and moderate	76	51 (68.0)	0 (0.0)	0.155	48 (66.7)	3 (75.0)	0.734
Poor		24 (32.0)	1 (100.0)		24 (33.3)	1 (25.0)	
Tumor pathologic stage							
T1-T2	112	14 (13.2)	1 (20.0)	0.668	13 (12.7)	2 (22.2)	0.430
T3-T4		92 (86.8)	4 (80.0)		89 (87.3)	7 (77.8)	
Mean tumor size (± SD)	102	4.03 ± 1.7	6.00 ± 4.2	0.047	4.09 ± 1.8	4.59 ± 3.2	0.494
Lymph node status							
N0	103	51 (52.0)	3 (60.0)	0.731	50 (53.2)	4 (44.4)	0.620
N1		47 (48.0)	2 (40.0)		44 (46.8)	5 (55.6)	
Metastasis status							
M0	112	62 (57.9)	2 (40.0)	0.433	59 (57.3)	5 (55.6)	0.921
M1		45 (42.1)	3 (60.0)		44 (42.7)	4 (44.4)	
Tumor Stage							
I-II	112	28 (26.2)	2 (40.0)	0.499	27 (26.2)	3 (33.3)	0.647
III-IV		79 (73.8)	3 (60.0)		76 (73.8)	6 (66.7)	
Tumor resection							
Yes	112	26 (24.3)	2 (40.0)	0.433	24 (23.3)	4 (44.4)	0.163
No		81 (75.7)	3 (60.0)		79 (76.7)	5 (55.6)	

SD = standard deviation

* Assessed only in cases with primary tumor tissue, not described in metastatic tissues.

Impact of HER2 overexpression on survival

The median survival of the entire cohort was 10.6 months. Kaplan-Meier analysis demonstrated that the median survival time of patients with tumors HER-2 overexpression by HercepTest™ breast scores was 43.38 months (95% CI, 14.79 –

71.97), whereas cases classified as 0+ to 2+ had a median survival of 10.3 months (95% CI, 7.55 – 13.97, $p = 0.029$), contrarily from the expected (Figure 4). When using ToGA trial scores, the median survival time of HER-2 overexpression cases was 40.7 months (95% CI, 19.33 - 62.12) and that of the HER-2 low expression patients, 10.1 months (95% CI, 7.17 - 13.29, $p = 0.013$). These differences, however, may be partially due to the small sample size and limited number of positive cases, which may increase the effect of unaccounted factors on Kaplan-Meyer analysis. This can also be inferred by the large confidence interval in the survival analyses of positive cases. There were no statistically significant differences in treatments between the HER2-positive and -negative cases by both criteria.

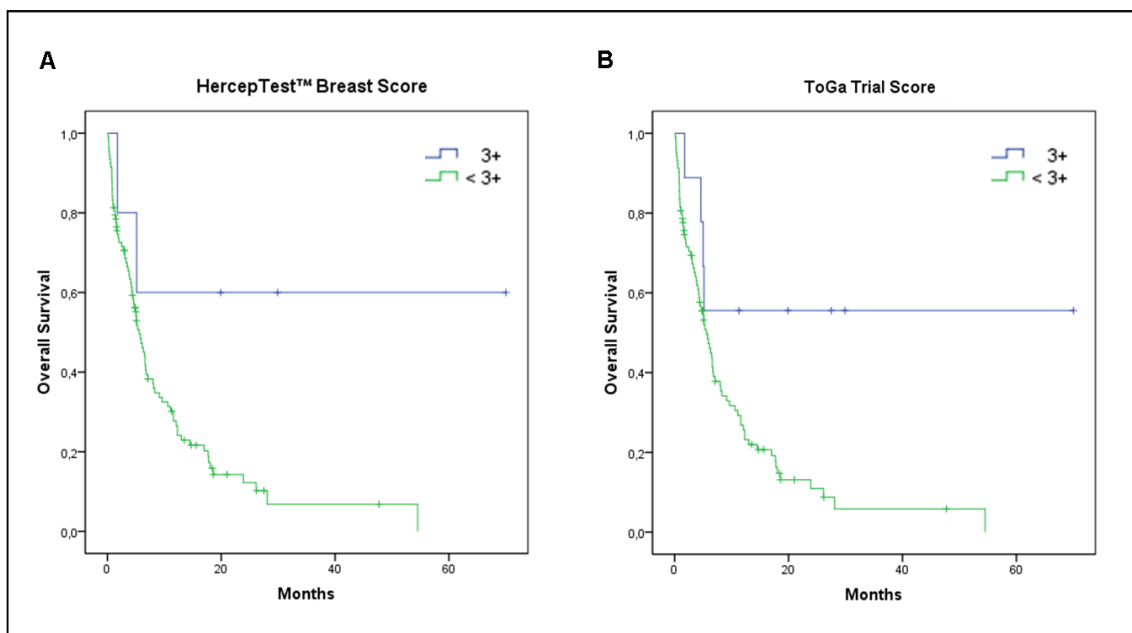


Figure 4. Overall survival on the basis of HER-2 expression pattern. A) HER-2 classification using HercepTest™ breast cancer score and B) HER-2 classification using ToGa trial score.

On multivariate survival analysis, high expression of HER-2 appeared as an independent prognostic factor, being associated with increased overall survival by

the two classifying scores (Table 2). This result is also different from the expected considering the literature.

Table 2. Multivariate proportional hazards analyses of overall survival.

HER-2 scoring	Overall Survival		
	Adjusted HR*	95% CI	P value
HER-2 IHC 2+ and +3 (HercepTest breast score)	4.19	1.30 – 13.50	0.016
HER-2 IHC 2+ and +3 (ToGA trial score)	2.24	1.10 – 4.73	0.035
HER-2 IHC 3+ (HercepTest breast score)	4.57	1.10 – 19.09	0.037
HER-2 IHC 3+ (ToGA trial score)	3.50	1.26 – 9.72	0.016

* The following covariates were used: (1) T stage (T1-T2 v T3-T4), (2) nodal involvement (no v yes), (3) tumor differentiation (not poor v poor), (4) sex (female v male)

When grouping HER-2 2+ and 3+ cases against 0 and 1+, the differences observed in overall survival is maintained (Figure 5). When using ToGA trial score, the median survival time of HER-2 2+ and 3+ cases was 28.4 months (95% CI, 11.95 - 44.76) and that of 0/1+ cases, 10.4 months (95% CI, 7.12 - 13.60, $p = 0.041$).

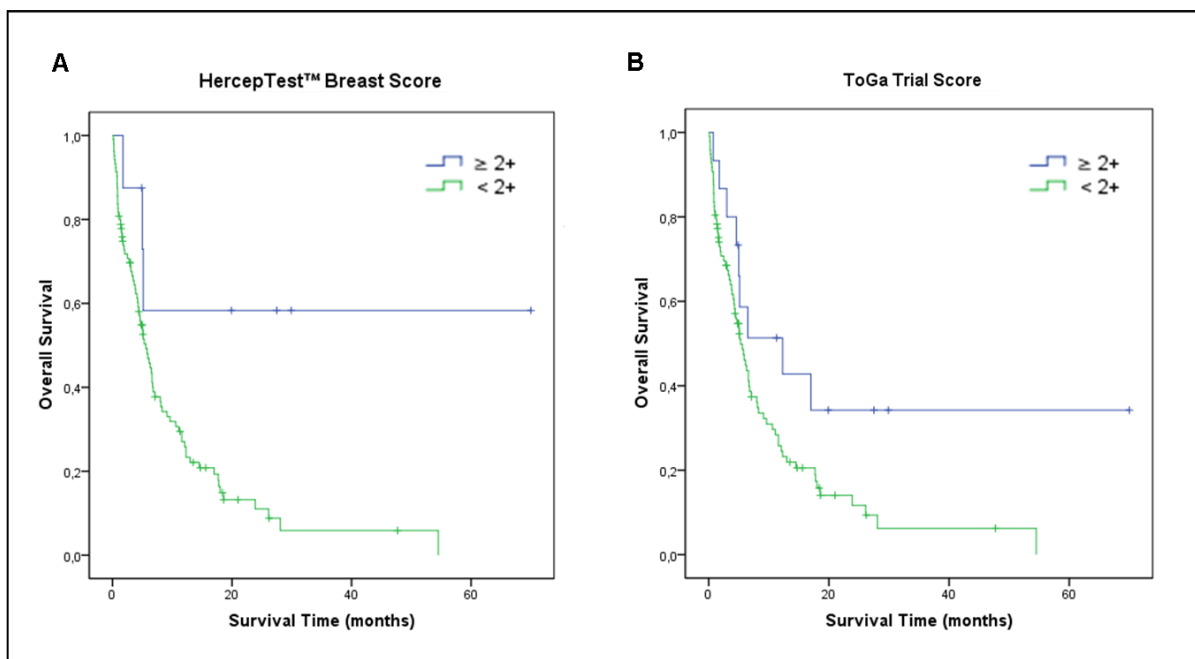


Figure 5. Overall survival on the basis of HER-2 expression pattern grouping 2+ and 3+ cases. A) HER-2 classification using HercepTest™ breast cancer score and B) HER-2 classification using ToGa trial score.

DISCUSSION

Progress is being made in developing adjuvant therapies to decrease recurrence rates after surgery and improve survival in pancreatic cancer, but new therapeutic targets and better prognostic markers for patient stratification are needed. Currently, the most important prognostic factors that predict survival are lymph node status, tumor size and negative margins in resected cases. More recently, we have entered an era when sophisticated “recurrence scores” based on gene profiling have been developed to accurately predict relapse after surgery and response to adjuvant therapy but more studies are warranted (Saima et al., 2008).

Gene expression has been used to identify prognostic factors and targets for therapy in cancer. Many studies have demonstrated HER-2 overexpression in pancreatic cancer, but few have investigated HER-2 expression as a prognostic factor. Furthermore, analysis comparing HER-2 overexpression in pancreatic cancer using two different methodologies for scoring have not been described, and the studies correlating HER-2 overexpression with survival in pancreatic carcinoma have been very limited. Considering this lack of data, we retrospectively analyzed HER-2 overexpression by immunohistochemistry and verified its role as outcome predictor in pancreatic ductal adenocarcinoma.

A wide range, from 16% to 69%, of pancreatic cancers has been reported to show HER-2 overexpression, ranging from 16 to 69% according different studies (Yamanaka et al., 1993; Saxby et al., 2005; Komoto et al., 2009). In the present

study, HER-2 overexpression was observed in 4.5% of cases by the HercepTest™ breast cancer score and 8.0% by the ToGa trial score. When putting together +2 and +3 cases, the percentage increased significantly when using the ToGa score, with approximately 35% of cases being classified as positive, while only 7.1% with the HercepTest™ breast cancer score. The substantially different percentages of HER-2 overexpression among the reports may be attributed to the differences in the procedures used for immunohistochemistry, antibodies, and determination criteria of HER-2 overexpression, as well as the patients' racial differences, while the differences among both scores are probably due to allowing incomplete membranous staining to be scored as 3+ in the ToGa score, as well as considering microcluster of cells staining 3+ enough to score HER2 as positive in a biopsy specimen.

Few studies have evaluated the HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization (FISH) together with immunohistochemistry in PDACs, but the concordance levels between both techniques **in these tumors are significantly lower when compared with breast cancer results**. In our study we had technical difficulties to analyze the 3+ cases through FISH, but from the 3 with available results, one was positive and the other two negatives. Saxby et al. (2005), in an attempt to better understand expression of HER-2 in pancreatic cancer, assessed gene amplification by FISH, cytoplasmic mRNA levels measured by RT-PCR and receptor labeling by IHC and found that only 1 of 5 (20%) PDACs scored as HER2 3+ by IHQ had an increase in HER-2 gene copy, which was not due to aneuploidy. When analyzing HER-2 mRNA expression, 7 of the 30 PDACs (23%) had a greater than 10-fold expression of mRNA compared with adjacent (macroscopically uninvolved) pancreatic tissue from the same patient. Ten tumors showed evidence of

aneuploidy represented by a raised gene copy number with normal HER-2 / chromosome 17 centromeric ratio. Similarly, Safra et al. (2010) studying tumor specimens from patients with PDAC found that only three of 11 (27%) patients with HER-2/neu overexpression by immunohistochemistry had gene amplification by FISH. Discordances between IHQ and FISH are probably due to translational and transcriptional dysfunctions that occur at any level in the production of the HER-2 protein during pancreatic carcinogenesis such that overexpression exists on the cell surface without genetic amplification.

Although HER-2 has established its role as a reliable predictive and prognostic marker in breast cancer, it has mixed results in pancreatic cancer. Koka et al, (2002), studying 308 patients with pancreatic cancer, found that patients with positive HER-2 expression presented a mean survival of 11 months, compared to 7 months in the HER-2 negative group (no statistical significance). They concluded that HER-2 overexpression detected by immunohistochemistry did not appear to be a poor prognostic factor in patients with adenocarcinoma of the pancreas. Similarly, Dugan et al. analyzed 79 cases of primary pancreatic carcinoma and found that overall survival of HER-2-positive and HER-2-negative patient groups was not significantly different when 2/3+ HER-2 positive cases were compared to 0/1+ HER-2 cases. By studying a non-selected population predominantly of advanced pancreatic cancer patients, we found a different correlation of HER-2 overexpression and survival from what was expected, with positive cases (IHC 3+) for both HercepTest™ and ToGA trial criteria being linked to better outcome. One of the reasons for that can be attributed to the small sample size and especially few positive cases, which may have led to less reliable estimations in survival analysis. Also, although the majority

of studies with other types of tumors (Berchuck et al., 1990; Kakar et al., 2000; Meert et al., 2003) have correlated HER-2 overexpression with a more aggressive clinical behavior, others (Jimenez et al., 2001) have linked it to a better clinical outcome and more studies are needed to establish the HER-2 prognostic value in pancreatic cancer.

Studying HER-2 expression patterns in pancreatic cancer is also relevant for better defining the potential role of drugs such as Trastuzumab (Herceptin®), a neutralizing humanized antibody directed against the HER2 tyrosine receptor kinase, as a therapeutic agent in this disease. The current standard therapy with gemcitabine-based combinations has not led to further improvements in survival and several studies have evaluated the potential therapeutic benefit of anti-HER2 drugs in these tumors. A number of preclinical studies and pilot studies in humans have shown the effectiveness of Trastuzumab in HER2 overexpressing pancreatic adenocarcinoma (Isacoff et al., 2001; Buchler et al., 2005; Kimura et al., 2006), but recent studies with trastuzumab combined with capecitabine in metastatic pancreatic cancer patients showed that progression-free survival and overall survival rates did not perform favorably compared with standard chemotherapy, suggesting that further evaluation of anti-HER2 treatment in patients with metastatic pancreatic cancer should not be recommended (Harder et al., 2012).

Differences in both the incidence of expression and its prognostic significance are very likely explained by different methodologies, including assessment of HER-2 status, method used and definition of HER-2 positivity by different scores. Thus, the literature in the field is extremely difficult to compare, and significant conclusions are hard to draw from the aggregate data. Until now, few studies have correlated HER-2

overexpression with prognosis and survival in pancreatic cancer (Dugan et al., 1997; Stoecklein et al., 2004; Saxby et al., 2005; Tsiambas et al., 2006; Saima et al. 2008; Komoto et al., 2009) and none of them have found higher expression associated with better outcome. These results should encourage further investigation of HER-2 amplification using FISH or SISH methods, as well as genomic analysis, in order to better clarify HER-2 role as a prognostic factor in both early and advanced pancreatic ductal adenocarcinoma.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq/Rede Genoprot (Grant #559814/2009-7), CAPES and Fundo de Incentivo à Pesquisa - FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Grant #10-0418). Prof. Maria Isabel Albano Edelweiss, Patricia Ashton-Prolla and Alessandro Bersch Osvaldt are investigators of CNPq. Patricia Izetti received a grant from CAPES and Alex Pritzel dos Santos received a grant from CNPq.

We thank Ms. Flávia Giusti from Hospital de Clínicas de Porto Alegre for help with tissue immunohistochemistry staining and Prof. Fernando A Soares from Hospital AC Camargo (São Paulo, Brazil) for performing part of the FISH analysis.

REFERENCES

ALBARELLO L, PECCIARINI L, DOGLIONI C. HER2 Testing in Gastric Cancer. *Adv Anat Pathol* 2011 Jan; 18(1):53-9.

ASHKTORAB H, BELGRAVE K, HOSSINKHAH F, BRIM H, NOURAIE M, TAKKIKTO M, HWITT S, LEE EL, DASHWOOD RH, SMOOT D. Global histone H4 acetylation and HDAC2 Expression in colon adenoma and adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2009 Oct; 54(10): 2109-2117.

BANG YJ, VAN CUTSEM E, FEYEREISLOVA A, CHUNG HC, SHEN L, SAWAKI A, LORDICK F, OHTSU A, OMURO Y, SATOH T, APRILE G, KULIKOV E, HILL J, LEHLE M, RÜSCHOFF J, KANG YK; 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, randomized controlled trial. *Lancet*. 2010 Aug 28;376(9742):687-97.

BERCHUCK A, KAMEL A, WHITAKER R, KERNS B, OLT G, KINNEY R, SOPER JT, DODGE R, CLARKE-PEARSON DL, MARKS P, et al. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*. 1990 Jul 1;50(13):4087-91.

BUCHLER P, REBER HA, EIBL G, ROTH MA, BUCHLER MW et al. Combination therapy for advanced pancreatic cancer using Herceptin plus chemotherapy. *Int J Oncol* 2005, 27:1125-1130.

DUGAN MC, DERGHAM ST, [KUCWAY R](#), [SINGH K](#), [BIERNAT L](#), [DU W](#), et al. HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma: relation to tumor differentiation and survival. *Pancreas* 1997; 14(3): 229-236.

HARDER J, IHORST G, HEINEMANN V, HOFHEINZ R, MOEHLER M et al. Multicentre phase II trial of trastuzumab and capecitabine in patients with HER2 overexpressing metastatic pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(6):1033-8.

HEINEMANN V, HAAS M, BOECK S. Systemic treatment of advanced pancreatic cancer. *Cancer Treat Rev*. (2011), doi:10.1016/j.ctrv.2011.12.004.

ISACOFF WH, HINES OJ. Therapy for pancreatic cancer with a recombinant humanized anti-HER2 antibody (herceptin). *J Gastrointest Surg* 2001, 5:139-146.

JIMENEZ RE, HUSSAIN M, BIANCO FJ, VAISHAMPAYAN U, TABAZCKA P, SAKR WA, et al. Her-2/*neu* overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res* 2001 Aug; 7(8): 2440-7.

KAKAR S, PUANGSUVAN N, STEVENS JM, SERENAS R, MANGAN G, SAHAI S, MIHALOV ML. HER-2/*neu* assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: comparison of results and correlation with survival. *Mol Diagn*. 2000 Sep; 5(3):199-207.

KIMURA K, SAWADA T, KOMATSU M, INOUE M, MUGURUMA K, NISHIHARA T, et al. Antitumor effect of trastuzumab for pancreatic cancer with high HER-2 expression and enhancement of effect by combined therapy with gemcitabine. *Clin Cancer Res* 2006 Aug 15; 12(16): 4925-32.

KOKA V, POTTI A, FRAIMAN G, MEHDI S, LEVITT R. Role of immunohistochemical identification of Her-2/*neu* and detection of variability in overexpression in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res* 2002 May-Jun; 22(3): 1593-7.

KOMOTO M, NAKATA B, AMANO R, YAMADA N, YASHIRO M, OHIRA M, et al. HER-2 overexpression correlates with survival after curative resection of pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2009 Jul; 100(7): 1243-7.

MEERT AP, MARTIN B, PAESMANS M, BERGHMANS T, MASCAUX C, VERDEBOUT JM, DELMOTTE P, LAFITTE JJ, SCULIER JP. The role of HER-2/*neu* expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer*. 2003 Sep 15;89(6):959-65.

RÜSCHOFF J, DIETEL M, BARETTON G, ARBOGAST S, WALCH A, MONGES G, et al. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 2010 Sep; 457(3): 299-307.

SAFRAN H, IANNITTI D, RAMANATHAN R, SCHWARTZ JD, SEINHOF M, NAUMAN C, et al. Herceptin and gemcitabine for metastatic pancreatic cancers that overexpress HER-2/neu. *Cancer Invest* 2004; 22(5): 706-12.

SHARIF S, RAMANATHAN RK, POTTER D, CIEPLY K, KRASINSKAS AM. HER-2 Gene amplification and chromosome 17 copy number do not predict survival of patients with resected pancreatic adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2008 Nov; 53: 3026–3032.

SAXBY AJ, NIELSEN A, SCARLETT CJ, CLARKSON A, MOREY A, GILL A, SMITH RC. Assessment of HER-2 status in pancreatic adenocarcinoma: correlation of immunohistochemistry, quantitative real-time RT-PCR, and FISH with aneuploidy and survival. *Am J Surg Pathol* 2005 Sep; 29(9):1125-34.

STOECKLEIN NH, LUEBKE AM, ERBERSDOBLER A, KNOEFEL WT, SCHRAUT W, VERDE PE, et al. Copy number of chromosome 17 but not HER2 amplification predicts clinical outcome of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2004 Dec 1; 22(23): 4737-45.

TSIAMBAS E, KARAMERIS A, DERVENIS C, LAZARIS AC, GIANNAKOU N, GERONTOPOULOS K, PATSOURIS E. HER2/neu Expression and Gene Alterations in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Comparative Immunohistochemistry and Chromogenic in Situ Hybridization Study Based on Tissue Microarrays and Computerized Image Analysis. *JOP* 2006 May 9; 7(3):283-294

WELSCH T, KLEEFF, J. BÜCHLER MW, FRIESS H. Activation of growth factor receptors in pancreatic cancer. *Am J Surg* 2007 Oct; 194(Suppl) S76-S83.

WOLFF AC, HAMMOND ME, SCHWARTZ JN, HAGERTY KL, ALLRED DC, COTE RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(1):18-43.

YAMANAKA, Y., FRIESS H., et al. Overexpression of HER2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma. *Hum Pathol* 1993; 24: 1127–34

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hiperexpressão do HER-2/neu é uma das alterações genéticas mais precoces na tumorigênese do pâncreas, ocorrendo a partir das neoplasias intraepiteliais pancreáticas grau 1A (NIPan 1A) (Hruban et al., 2000). Porém há uma grande variação na superexpressão de HER-2 em adenocarcinomas de pâncreas, com índices de positividade entre 0 a 82% (Saxby et al., 2005). No presente estudo, dentre os 112 casos, a hiperexpressão foi observada em 5 casos (4.5%) pela classificação do HercepTest™ e em 9 (8.0%) com base no ToGA *Trial*. Ao estudar uma população não selecionada de pacientes com câncer avançado de pâncreas, descobriu-se que diferentes padrões de positividade para HER-2 estão associados com o prognóstico desta neoplasia, com casos apresentando hiperexpressão correlacionando-se com melhor prognóstico. A variação substancial nas porcentagens de positividade entre os estudos pode ser atribuída a diferenças na realização da técnica de imuno-histoquímica, no anticorpo utilizado, bem como diferenças raciais dos pacientes.

Neste estudo, o anticorpo monoclonal de rato Her-2/neu (c-erbB-2, clone CB-11, Cell Marque®) foi utilizado para a realização da imuno-histoquímica e os escores do HercepTest™ e do ToGA *Trial* foram utilizados para determinar a superexpressão de HER-2. O HER-2 é conhecido como um receptor transmembrana, assim somente padrão de membrana deve ser

considerado como HER-2 positivo, ou seja, superexpresso, conforme descrito no HercepTest™ e no ToGA *Trial*. Em nossa série, a maioria dos tumores pancreáticos apresentou intensidade variável na expressão da proteína.

Poucos estudos avaliaram o impacto da hiperexpressão do HER-2 na sobrevida dos pacientes com ADP, e estes resultados têm conclusões inconsistentes. Yamanaka et al. (1993) evidenciou positividade de membrana e citoplasmática para HER-2 em 45% dos 76 pacientes com câncer de pâncreas que foram submetidos à cirurgia, entretanto não houve relato de quantas cirurgias curativas foram realizadas. A hiperexpressão protéica ocorreu mais frequentemente em adenocarcinoma bem ou moderadamente diferenciados (graus 1 ou 2). Eles examinaram o tempo de sobrevida em uma parcela de pacientes (53 casos); os com superexpressão de HER-2 apresentaram menor sobrevida (10.8 ± 1.5 meses) em relação aos que não mostraram hiperexpressão (12.4 ± 0.8 meses), mas esta diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa. Koka et al. (2002) investigou por imuno-histoquímica o status do HER-2 em 308 ADP e encontrou somente 48 tumores (16%) com superexpressão. Os resultados de sobrevida foram contrários aos previamente descritos, com tempo médio de 11 meses no grupo com HER-2 positivo e sete meses no grupo HER-2 negativo. No estudo, o número de pacientes submetidos à cirurgia não está claro e os detalhes de outros tratamentos, como quimio e radioterapia não foram descritos. Devido à variabilidade de resultados nos estudos anteriormente realizados e a ausência de critérios específicos para avaliação imuno-histoquímica de HER-2 em adenocarcinoma de pâncreas, a presente análise

foi a primeira a focar-se na comparação entre dois métodos já validados para tal avaliação, que são HercepTest™ e ToGA *Trial*, para mama e estômago, respectivamente, fazendo uma correlação com parâmetros clínico-patológicos e sobrevida dos pacientes.

A presente análise corrobora os achados de Koka et al. para os dois métodos de avaliação (HercepTest™ e ToGa *Trial*). Uma possível explicação para este resultado diferente do esperado seria o pequeno tamanho amostral ou o número limitado de casos positivos. Também não houve correlação entre a superexpressão de HER-2 e o tamanho, localização e diferenciação tumoral, nem com o estágio TNM.

Embora a IHQ seja um procedimento acessível na prática laboratorial para quantificação dos níveis de expressão protéica do HER-2, a interpretação dos resultados é o fator mais crítico deste processo. A análise imuno-histoquímica é frequentemente influenciada por questões técnicas, como diferenças metodológicas (protocolos de IHQ) e fixação do material que afeta a qualidade dos epítomos antigênicos nos tecidos emblocados em parafina. A seleção de anticorpos específicos e os critérios de positividade também parecem ser importantes parâmetros para a avaliação acurada da expressão protéica. Além disto, técnicas moleculares, como FISH e SISH, foram desenvolvidas para correlacionar os níveis de expressão protéica com o *status* do gene HER-2 (normal ou amplificado).

Como já mencionado, a análise da superexpressão do HER-2 no presente trabalho foi baseada em dois parâmetros distintos. Seguindo tanto

os critérios do HercepTest™, que utiliza o padrão de positividade de membrana citoplasmática como completo ou incompleto, homogêneo ou heterogêneo, ou as recomendações do ToGA *Trial* que define como positivo um padrão de membrana citoplasmática distinto e regular, completo, basolateral ou lateral, pode ter ocorrido sub ou superestimação na avaliação de casos limítrofes. Esta observação reflete a habilidade limitada em discriminar estas situações baseando-se apenas na microscopia óptica.

Mesmo com um custo relativamente baixo e um conceito objetivo, os resultados imuno-histoquímicos podem ser divergentes, principalmente devido à sensibilidade e especificidade variáveis nos anticorpos comercialmente disponíveis, diferenças no processamento da amostra tecidual, ausência de um padrão universal e pela subjetividade na análise. A avaliação conjunta do *status* do gene com a superexpressão protéica produz informações mais valiosas do que a quantificação da hiperexpressão isoladamente. Recentemente, o SISH tem chamado a atenção, por ser um método automatizado, rápido e capaz de avaliar a amplificação/deleção de genes, aneuploidia ou translocações cromossômicas simultaneamente com a morfologia tecidual, na mesma lâmina e utilizando microscopia óptica, o que é muito interessante para a rotina laboratorial em patologia cirúrgica.

Assim, este estudo conclui que, embora progressos técnicos e bioquímicos tenham sido alcançados com a técnica de IHQ, a interpretação dos resultados é subjetiva. Considerando o ADP, a identificação da amplificação gênica combinada com a forte expressão protéica pode

proporcionar uma melhor maneira de selecionar os pacientes que poderiam responder às terapias com anticorpos monoclonais. A análise das lâminas através de programas de computador também representa um método moderno caracterizado por um aumento na acurácia e na segurança da interpretação da expressão da proteína HER-2 em tumores sólidos, como cânceres de mama, estômago e pâncreas.