



CIRUGÍA y CIRUJANOS

Órgano de difusión científica de la Academia Mexicana de Cirugía
Fundada en 1933

www.amc.org.mx www.elsevier.es/circir



ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación por inmunohistoquímica de la expresión del HER2 en cáncer gástrico. Estudio clínico-patológico de 93 casos



Isabel Alvarado-Cabrero^{a,*}, Sara Gil-Hernández^b, Ana Ruelas-Perea^c,
Diego Villaverde-Rodríguez^c, José Roberto Montes-Ochoa^c y Rafael Medrano-Guzmán^d

^a Departamento de Anatomía Patológica, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

^b Departamento de Anatomía Patológica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^c Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

^d Servicio de Sarcomas y Tubo Digestivo Alto, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

Recibido el 15 de septiembre de 2016; aceptado el 29 de noviembre de 2016

Disponible en Internet el 6 de enero de 2017

PALABRAS CLAVE

Cáncer gástrico;
Adenocarcinoma;
Expresión de HER2

Resumen

Antecedentes: El cáncer gástrico ocupa en México el tercer lugar en incidencia tanto en hombres como en mujeres. La mayoría de los pacientes se presentan clínicamente con una enfermedad avanzada y pocas opciones de tratamiento. La sobreexpresión del HER2 se asocia con mal pronóstico, por lo que su evaluación con inmunohistoquímica se propone como un método de rutina que puede ayudar a seleccionar a pacientes que podrían beneficiarse del tratamiento con trastuzumab.

Objetivos: Determinar la frecuencia de la sobreexpresión del HER2 en pacientes con cáncer gástrico tratados en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI y su asociación con otros factores histopatológicos.

Material y métodos: Se incluyó en el estudio a todos los pacientes con cáncer gástrico operados entre el 12 de marzo de 2006 y el 31 de agosto de 2011. Se revisaron las laminillas originales para confirmar el diagnóstico y la evaluación del HER2 se hizo mediante inmunohistoquímica. Se utilizó el método de Hoffman para valorar la expresión del HER2. Los datos clínicos se obtuvieron de los expedientes de cada paciente.

* Autor para correspondencia. Avenida Cuauhtémoc n.º 330, Colonia Doctores, C. P. 06720, Ciudad de México, México.
Teléfono: +52 (55) 5627 6900 ext. 22733.

Correo electrónico: keme2.tijax12@gmail.com (I. Alvarado-Cabrero).

<https://doi.org/10.1016/j.circir.2016.11.016>

0009-7411/© 2016 Academia Mexicana de Cirugía A.C. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Resultados: Se incluyó en el estudio a 93 pacientes, 43 hombres (46.2%) y 50 (53.7%) mujeres. La mediana de edad fue de 64 años. El HER2 fue positivo en 6 pacientes (6.45%) y se observó con mayor frecuencia en tumores localizados en estómago proximal y en carcinomas de alto grado. No se observaron diferencias entre la sobreexpresión de HER2 y edad, género o tipo histológico.

Conclusión: Alrededor de un 7% de los pacientes con cáncer gástrico fueron HER2 positivos en nuestro estudio.

© 2016 Academia Mexicana de Cirugía A.C. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Gastric cancer;
Adenocarcinoma;
HER2 expression

Immunohistochemical assessment of HER2 expression in gastric cancer. A clinicopathologic study of 93 cases

Abstract

Background: Gastric cancer in Mexico is ranked third in both males and females. Most patients present clinically with advanced disease and treatment options are sparse. HER2 overexpression in gastric cancer is related to poor outcome. Immunohistochemical testing for HER2 is becoming the standard of care for guiding adjuvant treatment of gastric cancer with trastuzumab.

Objectives: To determine the frequency of HER2 overexpression in patients with gastric cancer in the Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional, Siglo XXI and its association with other histopathological findings.

Material and methods: Patients with gastric cancer who underwent surgery between March 12, 2006-August 31, 2011, were enrolled in this retrospective study. Diagnosis was confirmed by review of slides and immunohistochemistry with anti-HER2 antibody was performed. Scoring was done by Hoffman scoring system. Medical records were evaluated.

Results: Ninety-three patients were included in the study, with 43 (46.2%) male and 50 (53.7%) female patients. The median age was 64 years. HER2-positive tumours were identified in 6 patients (6.45%) and located most frequently in the proximal stomach. There was no difference in HER2 overexpression in relation to age, gender or histologic type.

Conclusion: In our study, about 7% of patients with gastric cancer were HER2-positive on immunohistochemistry.

© 2016 Academia Mexicana de Cirugía A.C. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Antecedentes

El cáncer gástrico es un problema de salud pública, ocupa el cuarto lugar en frecuencia y es la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo¹. Sánchez-Barriga reportó que, entre 2002 y 2010, murieron 69,107 pacientes por cáncer gástrico en México. En el año 2000, hubo 5,003 muertes por cáncer gástrico y en el 2012, 5,459 individuos fallecieron por esta enfermedad².

La infección por *Helicobacter pylori* es el factor más importante en el desarrollo del cáncer gástrico distal esporádico³. Algunos pacientes con infección persistente por *Helicobacter pylori* desarrollan atrofia gástrica, seguida de metaplasia intestinal, la cual podría eventualmente evolucionar a displasia y adenocarcinoma^{4,5}.

Otro agente infeccioso asociado con el cáncer gástrico es el virus de Epstein-Barr, el cual se encuentra en el 80% de las células neoplásicas y no en las células epiteliales normales de los adenocarcinomas gástricos ricos en estroma linfoide⁶. Alrededor del 10% del cáncer gástrico puede ocurrir dentro de una misma familia⁷. Finalmente los casos hereditarios representan del 1 al 3% de todos los cánceres gástricos⁸.

La mayoría de los pacientes con cáncer gástrico temprano son asintomáticos, por lo que el diagnóstico de la enfermedad se hace con mayor frecuencia en individuos con estadios avanzados⁹. Las opciones terapéuticas para el cáncer gástrico avanzado son pocas, por lo que la tasa de supervivencia a 5 años es de alrededor del 20%¹⁰.

De acuerdo con el estudio ToGA, un ensayo aleatorizado internacional de fase III, el tratamiento de quimioterapia en combinación con trastuzumab incrementa en forma significativa la supervivencia en pacientes con cáncer gástrico avanzado con sobreexpresión del HER2¹¹. El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal que se une en forma selectiva al receptor de tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)¹².

El oncogén HER2neu(c-erb-B2) está localizado en el cromosoma 17 (17q11.2-q12) y codifica una proteína de 185-kDA con 3 dominios, uno extracelular rico en residuos de cisteína, uno transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosinasa. HER2 actúa como receptor en la superficie de la célula y pertenece a la familia erbB, constituida por 4 miembros (HER1 o EGFR, el propio HER2, HER3 y HER4). La sobreexpresión de moléculas de HER2 facilita la

formación de dímeros de manera espontánea en la superficie de la célula tumoral, desencadenando la activación de distintas vías de señalización intracelular cuyas consecuencias son un incremento de la proliferación celular, una mayor supervivencia celular por la evasión de la apoptosis, una pérdida del control del ciclo celular, mayor desdiferenciación y aumento de la migración celular^{13,14}.

Se ha demostrado en numerosos estudios que el HER2 en el cáncer de mama desempeña un importante papel pronóstico y predictivo, lo cual, además, se correlaciona con la evolución de la enfermedad¹⁵. Por otro lado, la sobreexpresión del HER2 como factor pronóstico en el adenocarcinoma gástrico es controversial; esto se debe a que los estudios iniciales no demostraron una correlación entre la sobreexpresión de esta oncoproteína y el pronóstico de la enfermedad^{16,17}. Sin embargo, otros estudios reportaron una correlación directa entre la sobreexpresión del HER2 y el peor pronóstico de la enfermedad¹⁸.

La frecuencia de la sobreexpresión del HER2 de acuerdo con lo publicado en la literatura es variable: se reporta entre un 7 y un 27%¹⁹. En la actualidad se recomienda que se evalúe el estatus del HER2 en todos los carcinomas gástricos al momento del diagnóstico, para poder seleccionar a los pacientes que en un momento dado se podrían beneficiar del tratamiento con trastuzumab²⁰.

Los propósitos de este estudio fueron evaluar la frecuencia de la sobreexpresión del HER2 en pacientes con cáncer gástrico y su asociación con otras características histopatológicas.

Material y métodos

Diseño del estudio

Estudio retrospectivo, observacional, descriptivo, transversal.

Pacientes e información clínico-patológica

Se seleccionaron, de los archivos de Patología del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), todos los especímenes de gastrectomías totales con el diagnóstico de carcinoma estudiados en el periodo comprendido entre el 12 de marzo de 2006 y el 31 de agosto de 2011 con el diagnóstico de carcinoma. Ninguno de los pacientes había recibido quimioterapia neoadyuvante ni ningún otro tipo de tratamiento previo a la cirugía. Todos los casos contaban con sus respectivos reportes histopatológicos y para confirmar el diagnóstico de carcinoma se revisaron las laminillas originales de cada caso (IAC y DVR). Se evaluaron parámetros clínicos como la edad y género de los pacientes y parámetros patológicos como topografía tumoral, tamaño, estadio y grado histológico. Los carcinomas se clasificaron de acuerdo con el sistema de Lauren²¹ en adenocarcinomas de tipo intestinal y difuso.

Se excluyeron del estudio los casos con neoplasias malignas no epiteliales (linfomas, sarcomas, neoplasias neuroendocrinas, etc.), gastrectomías parciales, casos con

material incompleto o sin bloques de parafina o material con importantes artefactos de procesamiento.

Construcción de los microarreglos

De cada caso se seleccionó la laminilla más representativa del tumor (áreas con patrón arquitectónico sólido con > 75% de células neoplásicas, sin la presencia de necrosis) y luego el bloque correspondiente a cada una de ellas. De cada bloque de parafina se tomaron cilindros tisulares de 2 mm de diámetro con una pinza utilizada para hacer biopsias en «sacabocado» en lesiones de piel. El cilindro se insertó en un bloque nuevo (bloque receptor) que contenía 8 muestras tumorales divididas en 4 columnas y 4 filas.

Inmunohistoquímica

La evaluación de la expresión del HER2 se hizo con inmunohistoquímica y se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-HER2 (Ao485, DAKO). Los resultados fueron analizados por 3 patólogos (IAC/SGH/ARP) de manera simultánea en un microscopio multicabezal. La expresión del HER2 se evaluó con el sistema de Hoffman et al.²². Los casos fueron divididos en 4 grupos, dependiendo de la extensión y de la intensidad de la expresión: 0, sin positividad o positividad en la membrana celular en < 10% de las células; 1+, tinción débil o apenas perceptible en > 10% de las células; 2+, positividad débil a moderada, completa o en la membrana basolateral de > 10% de las células; 3+ positividad intensa completa o en la membrana basolateral de > 10% de las células. Solo los casos de la categoría 3+ fueron considerados como positivos para sobreexpresión del HER2 y los casos 0 y 1+ se consideraron como negativos. Los casos 2+ fueron catalogados como equívocos para la expresión de HER2.

Para el análisis de datos se utilizaron medidas descriptivas apropiadas, medias y proporciones, y sus intervalos con una confianza del 95%.

Debido a que el estudio se realizó en material estudiado en el Departamento de Patología, no se consideró que este necesitara consideraciones éticas; sin embargo, los datos de los pacientes se mantendrán en confidencialidad.

Resultados

Un total de 93 casos de carcinomas gástricos fueron incluidos en el estudio. La edad de los pacientes al momento del diagnóstico varió entre 39 y 88 años (mediana: 64), 43 (46.2%) fueron hombres y 50 (53.7%) mujeres. El 86% de los tumores se localizaron en la porción proximal del estómago. El tamaño tumoral varió entre 1.9 y 16.0 cm (promedio: 6.44 cm), y el 74% de los casos estaban en estadios avanzados (categorías, pT2, pT3 y pT4).

Un total de 36 (38.7%) adenocarcinomas fueron de tipo intestinal y 57 (61.2%) de tipo difuso. Con respecto al grado histológico de los adenocarcinomas de tipo intestinal, 6 casos (16.6%) fueron bien diferenciados, 20 (55.5%) moderadamente diferenciados y 10 (27.7%) casos, poco diferenciados.

El análisis con inmunohistoquímica reveló 6 casos positivos (3+; 6.45%) para la sobreexpresión de HER2; 16 casos

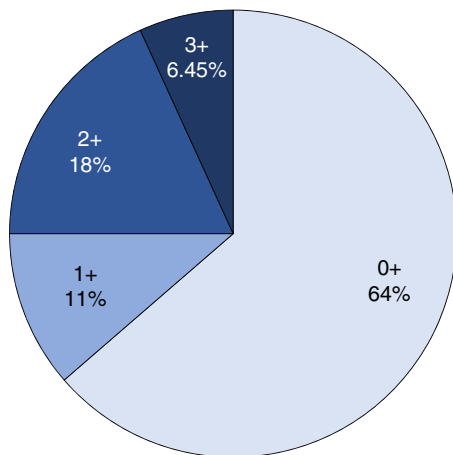


Figura 1 HER2neu y su diferente expresión en la población estudiada.

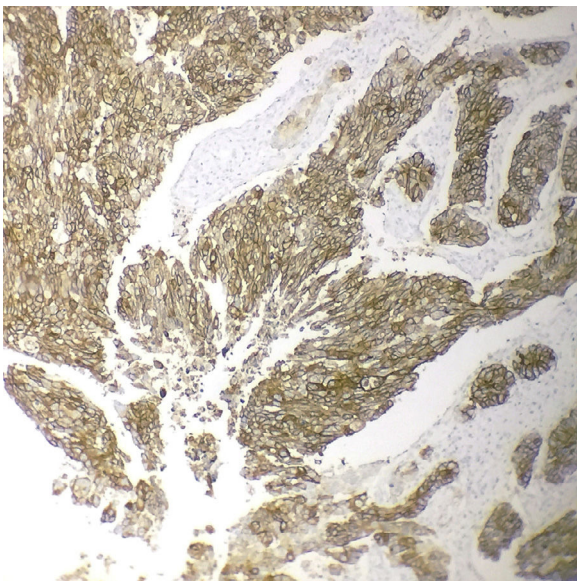


Figura 2 Expresión membranosa fuerte y completa del HER2(3+) en un adenocarcinoma intestinal poco diferenciado (inmunohistoquímica, x200).

fueron equívocos (2+); 10 casos fueron 1+ y 61 casos fueron negativos (fig. 1). De entre los tumores positivos, 3 casos fueron de tipo intestinal (fig. 2) (uno moderadamente diferenciado y 2 poco diferenciados) y 3 de tipo difuso (fig. 3). De los casos positivos al HER2, 5 se localizaron en la porción gástrica proximal y uno en la distal. Por otro lado, la mayoría de los carcinomas negativos al HER2 fueron de tipo difuso (fig. 4).

Discusión

La incidencia del cáncer gástrico varía de acuerdo con las diferentes regiones geográficas. Los casos ocurren con mayor frecuencia en el este de Asia, Europa del Este y América del Sur, con porcentajes menores en América del Norte²³. En México, el cáncer gástrico representa la tercera causa de muerte por cáncer. La alta mortalidad asociada a esta

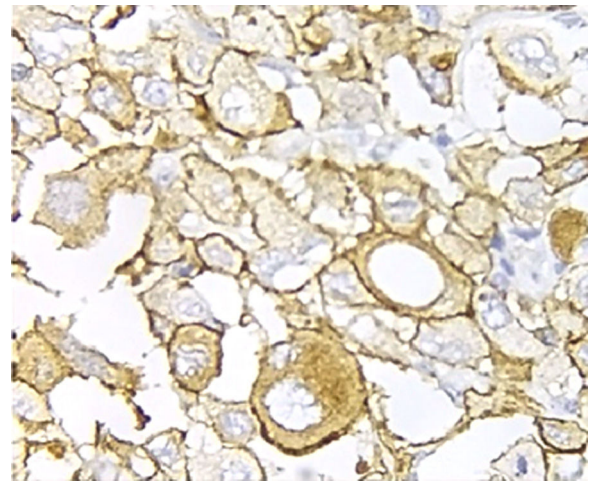


Figura 3 Análisis con inmunohistoquímica de la sobreexpresión del HER2(3+) en un carcinoma poco diferenciado con células en anillo de sello (x400).

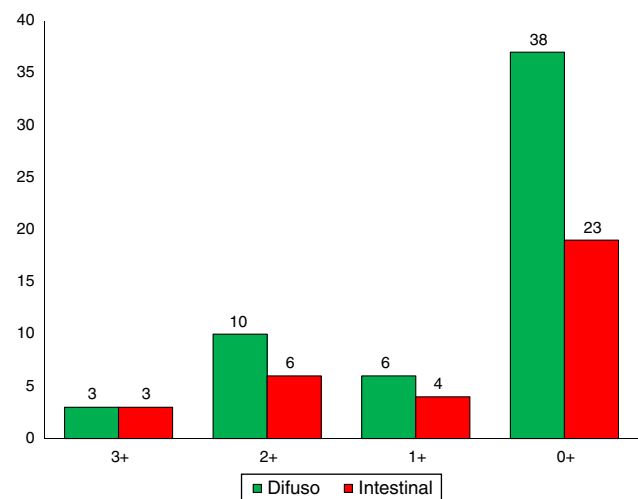


Figura 4 Distribución del HER2 por tipo de cáncer gástrico.

enfermedad y el deterioro en la calidad de vida nos indican que el cáncer gástrico es un problema de salud pública en México que requiere estudios de investigación que nos permitan establecer medidas para su prevención, diagnóstico y tratamiento²⁴.

La sobreexpresión de la oncoproteína HER2 en el cáncer gástrico se describió por primera vez en el año de 1986²⁵. Desde entonces se han desarrollado numerosas investigaciones para analizar el papel que desempeña esta oncoproteína en el desarrollo del cáncer gástrico, así como para buscar otros biomarcadores que permitan establecer su perfil molecular¹².

El estudio ToGA¹¹ es hasta ahora el que ha evaluado la sobreexpresión del HER2 en un mayor número de casos. Este proyecto internacional incluyó 24 países, que reunían un número total de 3,807 pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico; la frecuencia de expresión del HER2 fue del 22.1%.

La positividad en la expresión del HER2 en el cáncer gástrico es diferente en varias partes del mundo²⁶. En un estudio realizado en pacientes brasileños se encontró un

HER2 positivo en el 10.5% de los casos²⁷, Beltrán Garate et al.²⁸ encontraron una tasa de positividad al HER2 del 9% en pacientes peruanos, mientras que García-Ramírez et al.²⁹ encontraron una positividad del 11.2% en una población de pacientes colombianos. En la presente serie, que incluyó a 93 pacientes con cáncer gástrico, la positividad al HER2 fue del 6.45%.

En nuestro estudio, el carcinoma difuso ocurrió con mayor frecuencia que el adenocarcinoma de tipo intestinal (61.2 vs. 38.7%, respectivamente). Por otro lado, el 86% de los casos se presentaron en la porción proximal gástrica. Estas cifras son opuestas a las reportadas por Santos Laboissiere et al.³⁰ en una población de pacientes brasileños, en los cuales el subtipo histológico más frecuente fue el intestinal (61 casos, 49.2%). Por otro lado, el 80.6% de los carcinomas se presentaron en la porción distal del estómago.

Tres de las neoplasias positivas a HER2 en este estudio fueron adenocarcinomas de tipo intestinal y 3 de tipo difuso. Con respecto al tipo histológico, varios reportes señalan que la positividad al HER2 se presenta con mayor frecuencia en los adenocarcinomas de tipo intestinal comparada con los difusos o los de tipo mixto. Se ha señalado que la sobreexpresión del HER2 puede ser una de las alteraciones moleculares relacionadas con el cáncer gástrico, principalmente el de tipo intestinal³¹.

Conclusiones

En nuestra población de pacientes, la positividad del HER2 ocurrió en 6 casos (6.45%) y no hubo diferencias entre el tipo histológico (intestinal y difuso) y la inmunorreactividad al HER2. Todos los pacientes con tumores positivos a la oncoproteína tenían adenocarcinomas poco diferenciados.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. Ferro A, Peleteiro B, Malvezzi M, Bosetti C, Bertuccio P, Levi F, et al. Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980-2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype. *Eur J Cancer*. 2014;50:1330-44.
2. Sánchez-Barriga JJ. Tendencias de mortalidad y años potenciales de vida perdidos por cáncer gástrico en México, 2000-2012. *Rev Gastroenterol Mex*. 2016;81:65-73.
3. Bornschein J, Selgrad M, Warneche M, Kuester D, Wex T, Malfertheiner PH. Pylori infection is a key risk factor for proximal gastric cancer. *Dig Dis Sci*. 2010;55:31-6.
4. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*. 1988;48:3554-60.
5. Fukase K, Kato M, Kikuchi S, Inoue K, Uemura N, Okamoto S. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: An open-label, randomized controlled trial. *Lancet*. 2008;372:392-7.
6. Wu M, Shun C, Wu C, Hsu TY, Lin MT, Chang MC, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas: Relation to *H. pylori* infection and genetic alterations. *Gastroenterology*. 2000;118:1031-8.
7. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Reruca R, Carneiro F. Familial gastric cancer: Genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol*. 2015;16:60-70.
8. Carneiro F, Wen F, Seruca R, Oliveira C. Familial gastric carcinoma. *Diagn Histopathol*. 2014;20:239-46.
9. Oue N, Sentani K, Sakamoto N, Yasui W. Clinicopathologic and molecular characteristics of gastric cancer and intestinal mucin phenotype. *Cancer Sci*. 2015;8:951-8.
10. Power DG, Kelsen DP, Shah MA. Advanced gastric cancer-slow but steady progress. *Cancer Treat Rev*. 2010;36:384-92.
11. 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 gastroesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label randomized controlled trial. *Lancet*. 2010;376:687-687.
12. Corso S, Giordano S. How can gastric cancer molecular profiling guide futures therapies? *Trends Mol Med*. 2016;22:534-44.
13. Wu X, Tang H, Guan A, Sun F, Wang H, Shu J. Finding gastric cancer related genes and clinical biomarkers for detection based on gene-gene interaction network. *Math Biosci*. 2016;276:1-7.
14. López-Ríos F, Concha A, Corominas JM, García-Caballero T, García-García E, Iglesias M. Consenso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica sobre la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico. *Rev Esp Patol*. 2011;44:32-48.
15. Jalikis F, Swanson PE, Yeh MM. Her2 in gastric cancer. Biological significance and practical considerations. *Pathol Case Rev*. 2014;19:245-51.
16. Tateishi M, Toda T, Nagasaki S. Clinicopathological significance of c-erbB-2 protein expression in human gastric carcinoma. *Surg Oncol*. 1992;49:209-12.
17. Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, Kinoshita T, Sasako M, Saito T, et al. Overexpression of c-erbB-2 in gastric cancer. Its correlation with long-term survival of patients. *Cancer*. 1993;72:3179-84.
18. Liu W, Zhong S, Chen J, Yinghao Y. Her-2/neu overexpression is an independent prognostic factor for intestinal-type and early-stage gastric cancer patients. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46:31-7.
19. Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H. Gastric cancer. *Lancet*. 2016;5:1-11.
20. 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, randomized controlled trial. *Lancet*. 2010;376:687-97.
21. Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt

- at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;64:31–49.
22. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Buttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: Results from a validation study. *Histopathology.* 2008;52:797–805.
 23. Venerito M, Link A, Rokkas T, Malfertheiner P. Gastric cancer. Clinical and epidemiological aspects. *Helicobacter.* 2016;21:39–44.
 24. Meza-Junco J, Montano-Loza AJ. Gastric cancer in Mexico: Improvement, but still a long way to go. *Rev Gastroenterol Mex.* 2016;81:63–4.
 25. Vakiani E. Her2 testing in gastric and gastroesophageal adenocarcinomas. *Adv Anat Pathol.* 2015;22:194–201.
 26. Van Cutsem E, Bang Y, Feng-Yi F, Xu JM, Lee KW, Jiao SC, et al. HER2 screening data from ToGA: Targeting HER2 in gastric and gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer.* 2015;18:1644–6.
 27. Jung JE, Ossamu Ioshii S. Immunohistochemical assessment of HER2 expression in gastric cancer in a cohort of 118 Brazilian patients. *J Bras Pathol Lab Med.* 2013;49:361–7.
 28. Beltrán-Garate B, Yabar Berrocal A. Expresión de HER2 en cáncer gástrico en Perú. *Rev Gastroenterol Perú.* 2010;30:324–7.
 29. García-Ramírez CA, Uribe-Pérez CJ, Niño-Vargas P, Salazar Radi DS, Vásquez- Pinto LE. Expresión de HER2/neu en carcinoma gástrico en el área metropolitana de Bucaramanga en el periodo 2006-2009. *Méd UIS.* 2013;26:21–8.
 30. Laboissieri RS, Buzelin MA, Balabram D, De Brot M, Nunes CB, Rocha RM, et al. Association between HER2 status in gastric cancer and clinicopathological features: A retrospective study using whole tissue sections. *BMC Gastroenterol.* 2015;15:1–7.
 31. Chua TC, Merret ND. Clinicopathologic factors associated with HER2-positive gastric cancer and its impact on survival outcomes: A systematic review. *Int J Cancer.* 2012;130:2845–56.