

**CORRELAÇÃO ENTRE RESPOSTA OBJETIVA E A  
EXPRESSÃO GÊNICA E IMUNOISTOQUÍMICA EM  
PACIENTES COM CÂNCERES GÁSTRICOS IRRESSECÁVEIS  
OU METASTÁTICOS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA  
PALIATIVA Á BASE DE PLATINA E FLUOROPIRIMIDINAS**

**ROSANE OLIVEIRA DE SANT'ANA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da  
Fundação Antônio Prudente em Parceria com a  
Escola Cearense de Oncologia, para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Vladmir Claudio Cordeiro de Lima**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque  
Ribeiro**

**Fortaleza**

**2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Sant'Ana, Rosane Oliveira de

**Correlação entre resposta objetiva e a expressão gênica e imunoistoquímica em pacientes com cânceres gástricos avançados e metastáticos submetidos à quimioterapia paliativa á base de platina e fluoropirimidinas /**

Rosane Oliveira de Sant'Ana – Fortaleza, 2012.

114p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente e Escola Cearense de Oncologia – ECO. Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (Dinter) Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Vladimir Claudio Cordeiro de Lima

Descritores: 1. CÂNCER GÁSTRICO. 2. QUIMIOTERAPIA PALIATIVA. 3. EXPRESSÃO GÊNICA. 4. IMUNOISTOQUÍMICA. 5. CISPLATINA. 6. FLUOROPIRIMIDINAS.

## **DEDICATÓRIA**

Aos pacientes que nos ensinam todos os dias o valor da vida, sobretudo aqueles que participam de estudos clínicos, pela sua bondade, desprendimento e total confiança em participar de projetos cujos frutos poderão mudar a vida de outros seres humanos que sequer conhecem.

À minha família maravilhosa (Herlânio, Pedro, Gabriel e Julia), pela compreensão, apoio e paciência nos meus frequentes momentos de ausência durante esses 4 anos de doutorado.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas do Serviço de Oncologia Clínica do HCC/ICC pela colaboração no período de execução do projeto e elaboração. Sem eles, seriam meses bem mais árduos e bem menos produtivos. Agradecimento especial aos médicos residentes do serviço pelo cuidado e atenção dispensados aos pacientes mesmo em minha ausência.

À direção do Instituto do Câncer do Ceará que me acolheu logo no início de minha carreira profissional, possibilitou meu ingresso nesse programa de pós-graduação e da qual sempre percebi a maior disposição em eliminar dificuldades para a execução desse projeto.

Ao Dr. José Maria Arcanjo, médico endoscopista, sempre de prontidão para atender as demandas dos pacientes desse estudo, assim como as funcionárias do serviço, “Dita” e Eva, muito dedicadas e prestativas.

À equipe de pesquisa clínica do ICC, em especial ao funcionário Armando pelo apoio logístico integral e profissional, 24h por dia.

Ao Dr. Jose Alexandre, médico radiologista, que se esmerou nos laudos dos pacientes, atendendo às demandas do estudo mesmo nos momentos difíceis de funcionamento do seu serviço.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do HCC/ICC, em especial a Dra. Maria do Perpétuo (querida ”Patty”), e às funcionárias Rose, Izabel e Beth pela competência com a qual executavam os exames histopatológicos de seleção das amostras tumorais.

Ao meu mentor e amigo, Dr. Vladimir Cordeiro de Lima, pelo apoio intelectual, logístico e emocional na minha jornada de doutoranda. Ao meu sempre mestre e colega, Dr. Ronaldo Ribeiro, por mais essa aventura científica de nossas carreiras.

A todos os que ajudaram, com atenção, doações, críticas construtivas, e me incentivaram a prosseguir - sem sua participação, não poderia ter experimentado e aproveitado tanto mais essa empreitada grandiosa de minha vida.

## RESUMO

Sant'Ana RO. **Correlação entre resposta objetiva e a expressão gênica e imunoistoquímica em pacientes com cânceres gástricos metastáticos submetidos à quimioterapia paliativa à base de platina e fluoropirimidinas.** Fortaleza; 2012. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com Escola Cearense de Oncologia/Instituto do Câncer do Ceará]

**Introdução:** O câncer gástrico (CG) é o segundo em mortalidade no mundo. Frequentemente o diagnóstico se dá em estádios avançados quando a sobrevida em 5 anos não chega a 20%. A quimioterapia (QT) paliativa, apesar de seu benefício comprovado, não promove regressão tumoral em mais da metade dos pacientes e isso, acompanhado pelos efeitos colaterais, pode impactar negativamente a qualidade de vida desses indivíduos. No entanto, não há marcadores biológicos de resposta à quimioterapia em CG. **Objetivo:** Obter, a partir da expressão gênica, uma assinatura gênica ou imunoistoquímica (IHQ) que permita prever a resposta objetiva (RO) à QT. **Metodologia:** Estudo clínico, prospectivo, não randomizado, envolvendo pacientes com CG localmente avançados ou metastáticos, candidatos à QT paliativa baseada em platina e fluoropirimidinas. Os pacientes foram seguidos durante todo o tratamento e periodicamente avaliados radiologicamente de forma a se estabelecer, pelos critérios RECIST 1.1, a resposta ao tratamento. Foram considerados respondedores (R+) os pacientes com RO e não-respondedores (R-) aqueles sem RO. Amostras tumorais obtidas por endoscopia digestiva alta antes do tratamento foram submetidas à extração de RNA total, que, após quantificação, amplificação e marcação do mRNA, era hibridizado em lâminas de *microarray* de oligonucleotídeos, contendo 60.000 sequências gênicas. A imunoistoquímica foi realizada utilizando-se anticorpos primários para HER2, ERCC1, Topoisomerase II e Timidilato-sintetase nos espécimes tumorais coletados. Após obtenção dos dados do *microarray*, verificou-se a sua correlação com o status de R+ e R-. **Resultados:** De Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012, foram incluídos 28 pacientes no estudo,

desses, somente 24 eram aptos para as avaliações de RO, sendo 15 R+ e 9 R-, com taxa de RO de 62,5%. Predominaram pacientes do sexo masculino, com idade média de 56 anos, apresentando tumores distais, do tipo intestinal e ECOG 2. A sobrevida global (SG) foi de 12,5% e sobrevida livre de doença (SLP) foi de 25%, em um seguimento mediano de 7,2m. Não foi possível estabelecer uma correlação entre resposta e expressão imunoistoquímica, nesse estudo. Cinquenta e nove genes foram expressos diferencialmente ao se comparar amostras R+ e R-. Dentre estes, selecionamos 23 genes que, além de diferencialmente expressos, apresentavam  $\text{fold} > [2]$ . A maior parte desses genes está associada a processos biológicos de resposta a drogas, adesão celular e desenvolvimento epidérmico. Foi possível também estabelecer correlação entre a expressão gênica e SLP, sendo expressos diferencialmente 14 genes entre pacientes com BOM prognóstico (SLP mediana  $> 6$  meses) e aqueles com MAU prognóstico (SLP  $< 6$  meses), sendo 9 com  $\text{fold} > [2]$ .

**Conclusões:** Nesse estudo não foi possível determinar uma relação entre resposta e expressão por IHQ para TS, ERCC1, HER2, TOPO II $\alpha$  e caderina-E. Determinou-se uma assinatura gênica com 23 genes diferencialmente expressos entre respondedores e não respondedores à QT paliativa com sal de platina e fluoropirimidinas.

## SUMMARY

Sant'Ana RO. [Correlation of objective response with gene expression and immunohistochemical pattern in patients with metastatic gastric cancer treated with platinum plus fluoropyrimidin-based chemotherapy]. Fortaleza; 2012. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com Escola Cearense de Oncologia/Instituto do Câncer do Ceará]

**Introduction:** Gastric cancer (GC) is the 2nd leading cause of death by malignancies in the world. It is frequently diagnosed in advanced stages when curative intent is not possible and palliative chemotherapy (CT) is the only option. Despite its benefits, most patients do not respond to CT and will suffer from its adverse events. Until presently, there are no predictive markers of response to CT in GC. **Objectives:** To obtain a genomic signature to identify patients who will respond to palliative CT. **Methods:** We enrolled patients with unresectable or metastatic GC, admitted at Haroldo Juaçaba Cancer Hospital, in a prospective, non-randomized, open label, clinical trial, candidates for palliative platinum and fluoropyrimidine-based CT. During treatment, patients performed periodic radiological evaluation to assess objective response (OR) according to RECIST 1.1 criteria. Patients were deemed “Responders” (R) in case of OR and “Non-Responders” (NR) in case of progressive or stable disease. Before initial CT, tumor samples were obtained by biopsies during digestive endoscopy and then they were submitted to total RNA extraction, mRNA amplification and labelling, and hybridization onto a oligonucleotide microarray platform containing 60,000 gene sequences. Immunohistochemical expression of HER2, ERCC1, TS, TOPO II alpha and cadherin-E in tumor samples was correlated with OR. **Results:** From December 2009 to October 2011, 28 patients were admitted to this trial. The patients mean age was 56 years-old and had mostly distal and intestinal-type tumors and ECOG 2. The response rate was 62,5% with no complete responses (15 R and 9 NR). The overall survival was 12,5% and progression free survival (PFS) was 37% with a median follow up time of 7,2 months. There were 59

genes differentially expressed between R and NR. A cutoff of fold $>[2]$  selected the 23 most differentially expressed genes. Analysis of the immunohistochemical expression demonstrated no correlation with OR. We also identified a 9-gene signature associated with prognosis (PFS correlation with gene expression).

**Conclusions:** This trial do not identified a predictive role for immunohistochemistry expression of HER 2, ERCC1, TS, Cadherin-E and TOPO II $\alpha$ . We could identify a genomic profile associated with response to palliative CT in a cohort of patients with metastatic gastric cancer. After adequate prospective validation, these data may help to individualize treatment of these patients.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>CF</b>	cisplatina e 5-Fluorouracil
<b>COX</b>	ciclooxigenase
<b>DE</b>	doença estável
<b>ECF</b>	epirrubicina, cisplatina e 5-fluorouracil
<b>ECOG</b>	eastern cooperative oncology group
<b>ECX</b>	epirrubicina, cisplatina e capecitabina
<b>EGFR1</b>	receptor 1 do fator de crescimento epidérmico
<b>5FU</b>	5-fluorouracil
<b>ERCC1</b>	Excision Repair Cross Complementing Group 1
<b>HER2</b>	Human Epidermal growth factor Receptor-type 2
<b>PD</b>	progressão de doença
<b>P.S.</b>	performance status
<b>QT</b>	quimioterapia
<b>RECIST</b>	response evaluation criteria in solid tumours
<b>RO</b>	resposta objetiva
<b>RP</b>	resposta parcial
<b>SG</b>	sobrevida global
<b>SLP</b>	sobrevida livre de progressão
<b>SRR</b>	serina racemase
<b>TOPO II</b>	topoisomerase II
<b>TS</b>	timidilato sintetase
<b>VEGF</b>	fator de crescimento do endotélio vascular
<b>VEGFR</b>	receptor do fator de crescimento do endotélio vascular

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Distribuição dos pacientes conforme localização do tumor primário.....	35
<b>Figura 2</b>	Distribuição dos pacientes conforme tipo histológico.....	35
<b>Figura 3</b>	Expressão imunoistoquímica.....	37
<b>Figura 4</b>	Distribuição dos pacientes pelo esquema de quimioterapia.....	40
<b>Figura 5</b>	Distribuição dos pacientes conforme percentual de regressão tumoral.....	45
<b>Figura 6</b>	Gráfico evidenciando os percentuais de respostas dos pacientes.....	45
<b>Figura 7</b>	Expressão imunoistoquímica de ERCC1, HER 2 e Topoisomerase II entre respondedores e não-respondedores.....	49
<b>Figura 8</b>	Curva de duração de resposta conforme tipo histológico.....	51
<b>Figura 9</b>	Curva de Kaplan Meier para duração de resposta conforme ocorrência de toxicidade – Anemia.....	51
<b>Figura 10</b>	Curva de Kaplan Meier para duração de resposta conforme performance status.....	52
<b>Figura 11</b>	Curva de sobrevida livre de progressão.....	53

<b>Figura 12</b>	Sobrevida livre de progressão entre respondedores e não-respondedores à QT.....	53
<b>Figura 13</b>	Curvas de Kaplan Meier para sobrevida livre de progressão conforme performance status por ECOG 1 e 2.....	57
<b>Figura 14</b>	Curva de sobrevida livre de doença conforme o tipo histológico do tumor.....	58
<b>Figura 15</b>	Curva de sobrevida livre de doença de acordo com o padrão de toxicidade auditiva.....	59
<b>Figura 16</b>	Curva de sobrevida global.....	61
<b>Figura 17</b>	Curvas de sobrevida global entre respondedores e não-respondedores.....	63
<b>Figura 18</b>	Curva de Kaplan Meier para sobrevida global conforme Performance status.....	64
<b>Figura 19</b>	Curva de Kaplan Meier para sobrevida global conforme a histologia tumoral.....	65
<b>Figura 20</b>	Curva de Kaplan Meier para sobrevida global conforme status de DR.....	66
<b>Figura 21</b>	Curva de Kaplan Meier para sobrevida global conforme ototoxicidade.....	67
<b>Figura 22</b>	Cluster hierárquico supervisionado de genes expressos diferencialmente entre respondedores e não-respondedores.....	70

<b>Figura 23</b>	Distribuição dos genes expressos diferencialmente conforme resposta de acordo com o processo biológico.....	72
<b>Figura 24</b>	Agrupamento hierárquico supervisionado dos genes diferencialmente expressos entre os tumores de pacientes de BOM e MAU prognóstico.....	74

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Lista de exame laboratoriais iniciais.....	19
<b>Quadro 2</b>	Lista de Exames complementares radiológicos de estadiamento...	19
<b>Quadro 3</b>	Linhagens celulares selecionadas para compor o RNA referênci.....	27
<b>Quadro 4</b>	Anticorpos utilizados e respectivos fabricantes.....	28
<b>Quadro 5</b>	Lista de genes expressos diferencialmente de forma mais significante.....	71
<b>Quadro 6</b>	Lista de genes diferencialmente expressos conforme classificação em BOM e MAU prognóstico.....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Características basais dos sujeitos do estudo.....	34
<b>Tabela 2</b>	Frequências das características clinicopatológicas dos pacientes.....	34
<b>Tabela 3</b>	Expressão por imunistoquímica de HER2, ERCC1 e TOPO2A nas amostras de tumor gástrico.....	38
<b>Tabela 4</b>	Perfil de toxicidade à quimioterapia de todos os pacientes.....	41
<b>Tabela 5</b>	Perfil de toxicidade de pacientes submetidos ao esquema CF.....	42
<b>Tabela 6</b>	Toxicidade dos pacientes submetidos aos esquemas contendo 3 drogas.....	43
<b>Tabela 7</b>	Associação entre resposta com características clínicas e toxicidade à QT.....	48
<b>Tabela 8</b>	Análise multivariada das características basais e de tratamento para DR.....	50
<b>Tabela 9</b>	Associação entre as características clínicas e sobrevida livre de doença.....	55
<b>Tabela 10</b>	Análise multivariada para SLP.....	59
<b>Tabela 11</b>	Fatores clínico-patológicos de prognóstico.....	62
<b>Tabela 12</b>	Distribuição da sobrevida global conforme expressão imunistoquímica.....	63
<b>Tabela 13</b>	Análise multivariada para SG.....	68

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologia do câncer gástrico .....	1
1.2	Fatores de risco .....	3
1.3	Fatores prognósticos e preditivos.....	4
1.4	Expressão gênica por <i>microarrays</i> .....	9
1.5	Quimioterapia no câncer gástrico avançado .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1	Objetivo principal .....	16
2.2	Objetivos secundários .....	16
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1	Elegibilidade .....	17
3.1.1	Crítérios de inclusão.....	17
3.1.2	Crítérios de Exclusão .....	18
3.2	Avaliação pré-tratamento .....	18
3.3	Plano de tratamento.....	20
3.4	Plano de coleta de dados .....	21
3.4.1	Avaliação de resposta.....	21
3.4.2	Toxicidade.....	22
3.4.3	Análise de expressão gênica .....	23
3.4.4	Análise das amostras por imunistoquímica.....	28
3.4.5	Dados de sobrevida .....	31
3.5	Cálculo do tamanho da amostra e análise estatística .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
4.1	Características dos sujeitos .....	33
4.2	Expressão Imunistoquímica .....	36
4.3	Tratamento e Toxicidade .....	38

4.4	Desfechos clínicos.....	44
4.4.1	Resposta Objetiva .....	44
4.4.2	Sobrevida Livre de Progressão .....	52
4.4.3	Sobrevida Global.....	60
4.5	Expressão Gênica.....	68
4.5.1	Correlação entre Resposta e Expressão Gênica .....	69
4.5.2	Correlação entre Sobrevida livre de Progressão e Expressão Gênica.....	72
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>

### **ANEXOS**

- Anexo 1** Aprovação do CEP/ICC
- Anexo 2** ECOG *Performance Status*
- Anexo 3** Critérios de toxicidade comum do NCI
- Anexo 4** Avaliação de Resposta

### **APÊNDICES**

- Apêndice 1** Ficha Clínica
- Apêndice 2** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER GÁSTRICO**

Em 2008, foram registrados em todo o mundo 12,7 milhões de casos novos de câncer, sendo 5,6 milhões em países desenvolvidos e 7,1 milhões em países em desenvolvimento. No mesmo período foram estimadas 7,6 milhões mortes por câncer, sendo a maior parte delas em países em desenvolvimento (American Cancer Society-ACS 2011). Para 2030, a expectativa é de que esses números aumentem para 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes, em razão da maior expectativa de vida da população, bem como da redução da mortalidade infantil e da mortalidade por doenças infectocontagiosas (FERLAY et al. 2010).

Nesse mesmo período (2008), o câncer gástrico foi a quarta neoplasia maligna mais frequente no mundo, com estimativa de mais de 989 mil casos novos, correspondendo a 9,9% dos novos casos de câncer no mundo (FERLAY et al. 2010). Aproximadamente 72% dos casos ocorreram em países em desenvolvimento. Há uma grande variação mundial na incidência dessa neoplasia, sendo as regiões do leste da Ásia, a região andina da América do Sul e o leste Europeu as com as maiores taxas, e a América do Norte e o norte da Europa as de mais baixas taxas. A diferença entre essas regiões chega a até 20 vezes.

A terceira causa de morte por câncer em homens e a quinta em mulheres no mundo, no ano de 2008, foi o câncer gástrico (ACS 2011). Em termos de mortalidade é o segundo câncer mais letal do mundo, correspondendo a 12,1% dos óbitos por

câncer (PARKIN 2004; FERLAY et al. 2010). A maior proporção de casos está concentrada na Ásia, sobretudo no Japão, Coréia e China. Em países em desenvolvimento, estima-se que a mortalidade seja de 2 a 3 vezes maior que em países desenvolvidos.

Nos EUA, corresponde à 14<sup>a</sup> neoplasia maligna mais comum, com incidência estimada para 2011 de 21.520 casos e mortalidade de 10.340 casos (ACS 2011).

No Brasil, o câncer gástrico é o terceiro em incidência e em mortalidade no sexo masculino (FERLAY et al. 2010). O número de casos novos de câncer de estômago estimado para o Brasil no ano de 2010 foi de 13.820 entre homens e de 7.680 nas mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 14 casos novos a cada 100 mil homens e 8 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer de estômago em homens é o segundo mais frequente nas regiões Norte (10/100.000) e Nordeste (10/100.000). Na Região Centro-Oeste, (12/100.000) é o terceiro, e nas regiões Sul (19/100.000) e Sudeste (17/100.000), o quarto. Para as mulheres, é o terceiro mais frequente na Região Norte (6/100.000); é o quarto na Região Nordeste (6/100.000) e nas demais regiões, Sul (10/100.000), Sudeste (9/100.000) e Centro-Oeste (6/100.000), é o quinto (Ministério da Saúde 2009). Em Fortaleza, as taxas médias de incidência por ano foram de 19,12/100.000 para homens e 8,62/100.000 no período de 2001-2005 (Ministério da Saúde 2010).

## 1.2 FATORES DE RISCO

Os homens têm maior propensão ao desenvolvimento destes tumores que as mulheres, geralmente com o dobro de incidência. Os principais fatores de risco são comuns a países em desenvolvimento e outros a países asiáticos: tabagismo, baixa condição sócio-econômica, alcoolismo, alimentação rica em sal, conservantes, nitritos, nitratos, defumados e infecção por algumas cepas de *Helicobacter pylori* (SCHEIMAN e CUTLER 1999; RODER 2002). Um fato que reforça essas evidências se relaciona à observação de queda na incidência em regiões em que houve melhorias em termos de condições hidrossanitárias (diminui a infecção por *H. pylori*) e sócio-econômicas, com melhor acesso aos antibióticos, mudanças em métodos de conservação de alimentos e mudanças no hábito alimentar (RODER 2002). A gastrite crônica é comum em pacientes pertencentes a áreas de alto risco. De fato, a gastrite crônica é a principal causa de metaplasia intestinal, uma das lesões preneoplásicas da carcinogênese gástrica.

Cerca de 10% dos casos de câncer gástricos demonstra um padrão familiar e o risco dessa doença em parentes de primeiro e segundo grau é aumentado em 2 a 3 vezes em relação à população em geral (CALDAS 2007). A mais bem relacionada ao câncer gástrico é a síndrome *Hereditary Diffuse-type Gastric Cancer* (HDGC) (mutação de *CDH1*, gene da caderina-E), com um risco de desenvolver câncer gástrico ao longo da vida de 67% em homens e 83% em mulheres, com média de idade ao diagnóstico de 37 anos (CALDAS et al. 1999; PHAROAH et al. 2001).

### 1.3 FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS

A maioria dos casos apresenta-se avançado ou metastático ao diagnóstico o que confere pobre prognóstico, com taxas de sobrevida em 5 anos de cerca de 30% (COBURN et al. 2005).

Dos cânceres de estômago, 95% são adenocarcinomas. São comumente classificados macroscopicamente através do escore de Borrmann que varia de I a V (Borrmann 1926, citado por BAN 2010, p.73) e conforme a classificação histológica de Lauren (1965) citada por PARK et al. (2010, p.53), segundo a qual os adenocarcinomas gástricos são divididos em 02 tipos distintos em termos prognósticos, patológicos e etiológicos: o tipo intestinal e o tipo difuso.

O tipo difuso se caracteriza pela presença de células neoplásicas que não formam glândulas e encontram-se dispersas no tecido gástrico, progredindo com padrão infiltrativo de células isoladas. Essas células acumulam mucina que expande o citoplasma e desloca o núcleo para periferia, determinando, em algumas dessas, a forma em anel de sinete. Esse tipo é mais comum em áreas de baixa incidência.

Já o tipo intestinal apresenta células neoplásicas que se dispõem em arranjo glandular, cujo desenvolvimento se segue a um processo de metaplasia intestinal. Tais lesões crescem com padrão expansivo e infiltrativo. Esses são mais comuns em regiões de alta prevalência e, portanto, está mais associado a fatores ambientais, como, por exemplo, infecção por *H. pylori* (HAMILTON e AALTONEN 2000).

Além dos fatores relacionados à extensão locorregional (invasão tumoral da parede gástrica e órgãos adjacentes, infiltração linfonodal) e disseminação para órgãos distantes (SIEWERT et al. 1998; KIM et al. 1998), a ressecção completa do

tumor é um dos mais importantes fatores prognósticos. Pacientes submetidos a esse tipo de citorredução completa (R0 – ausência de doença residual e margens cirúrgicas livres) têm sobrevida superior aos com doença residual microscópica (R1) ou macroscópica (R2) (WANEBO et al. 1993; MOROWAKI et al. 2003). Outro fator prognóstico é a topografia da neoplasia no estômago – tumores mais distais têm menores taxas de recorrência (HARRISON et al. 1997; HUNDAHL et al. 2000).

A hiperexpressão da ciclooxigenase-2 (COX2), enzima envolvida em processos como inflamação, angiogênese e apoptose, tem sido demonstrada em espécimes de câncer gástrico. A expressão aumentada de COX2 (CHEN et al. 2006) e sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) (SONG et al. 2002; CHEN et al. 2006) está associada com maior densidade vascular, maior angiogênese tumoral e pior prognóstico. Alguns estudos correlacionam seus níveis com invasão vascular e linfonodal e maior profundidade de invasão da parede gástrica (OHNO et al. 2001; XUE et al. 2003). SHI et al. (2003) demonstraram relação direta entre a expressão de COX2, o potencial metastático e a tumorigenicidade de neoplasias gástricas. Outro achado foi que a expressão de COX2 se relaciona com uma maior contagem de microvasos, estabelecendo que parte do efeito dessa enzima no prognóstico se deve à indução de angiogênese. Os mesmos autores também verificaram uma correlação entre hiperexpressão de *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e metástases linfonodais, profundidade de invasão e invasão vascular.

Ainda em relação à expressão de proteínas associadas à neoangiogênese, KOSAKA et al. (2007) demonstraram que a expressão de *vascular endothelial growth factor receptor-1* (VEGFR1) em células de carcinoma gástrico circulantes no sangue está associada a uma doença mais avançada, maior profundidade de invasão,

envolvimento linfático, metástase linfonodal, lavado peritoneal positivo e recorrência pós-operatória.

Níveis de expressão de *epidermal growth factor receptor* (EGFR) elevados são encontrados em tumores gástricos de pior prognóstico – tumores T3/T4, com metástases linfonodais, tumores pouco diferenciados e do tipo difuso. Em análises uni e multivariada, a expressão de EGFR se mostrou um preditor independente de pior prognóstico (KOPP et al. 2002; GARCIA et al. 2003). A expressão de EGFR foi vista em 44% de uma amostra de 82 pacientes portadores de tumores gástricos submetidos à cirurgia e mostrou associação com pior sobrevida global e maior risco de recorrência, junto com estágio T avançado (T3 ou T4) e comprometimento linfonodal na análise multivariada (GALIZIA et al. 2007). MATSUBARA et al. (2008) também verificaram aumento de sobrevida (HR: 0,34 95%IC 0,20-0,56) para os pacientes cujos tumores apresentavam baixa expressão de EGFR dentre 140 portadores de carcinoma gástrico submetidos à primeira linha de quimioterapia para doença avançada. Este mesmo grupo observou uma maior taxa de resposta nos indivíduos que receberam cisplatina e cujos tumores apresentavam baixa expressão de ERCC1 (proteína essencial no reparo por excisão de nucleotídeos), enquanto que a alta expressão de ERCC1 se correlacionou com pior sobrevida global na análise multivariada. Dois outros estudos mostraram uma correlação positiva entre melhores resultados, em termos de taxa de resposta e sobrevida, e baixos níveis de expressão de ERCC1 em câncer gástrico submetido a tratamento sistêmico contendo 5-FU e um sal de platina (METZGER et al. 1998; KWON et al. 2007).

Uma série de anormalidades moleculares vem sendo correlacionada ao desenvolvimento, à evolução e à resposta a terapias no câncer gástrico, como:

hiperexpressão de p53 e de c-erbB2, perda da expressão de E-caderina, expressão de GAGE, instabilidade de microssatélites, níveis de timidilato-sintase (TS), expressão de proteínas envolvidas em reparo de DNA (relevante na resistência à cisplatina) e a expressão de enzimas envolvidas com o metabolismo de 5-fluorouracil (5-FU), como a diidro-pirimidina-desidrogenase e a timidina-fosforilase, (RHYU et al. 1994; LENZ et al. 1996; OKUYAMA et al. 2002; ZHOU et al. 2002; OUGOLKOV et al. 2003; KONG et al. 2004). Esses marcadores surgem como potenciais indicadores de prognóstico e de resposta às diversas modalidades de tratamento (cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia biológica).

KIKUYAMA et al. (2001) demonstraram a associação da ausência de expressão imunohistoquímica (IHQ) de p53 (produto do gene supressor de tumor *TP53*, central no controle do *checkpoint* entre as fases G1 e S) e BCL2 (proteína relacionada com inibição da via de apoptose mitocondrial) em amostras de 28 pacientes portadores de câncer gástrico avançados, tratados com 5-FU, cisplatina e epirrubicina, e maior sobrevida global ( $p=0,036$ ). Em outro estudo, a expressão de BCL2 em tumores gástricos esteve associada com menor profundidade de invasão, menor comprometimento linfonodal e melhor sobrevida em 05 anos (81% x 71%), enquanto a expressão de p53 esteve correlacionada com lesões mais invasivas, maior comprometimento linfonodal, mais metástases à distância, subtipo intestinal e pior sobrevida global (60% x 78%) (LEE et al. 2003). Numa amostra de 121 indivíduos árabes portadores de câncer gástrico, a expressão de p53 ( $p=0,03$ ) e o comprometimento linfonodal ( $p=0,01$ ) foram as duas únicas variáveis que estiveram associadas com pior sobrevida global numa análise multivariada incluindo vários fatores prognósticos clínicos, patológicos e imunohistoquímicos (AL-MOUNDHRI et

al. 2005). Entretanto, alguns autores não identificaram nenhuma correlação entre prognóstico e a expressão por IHQ de p53 ou BCL2 (ZAFIRELLIS et al. 2005).

METZGER et al. (1998) observaram uma melhor resposta à quimioterapia também nos indivíduos cujos tumores apresentavam níveis elevados de mRNA para timidilato-sintase (TS), enquanto o trabalho de KWON et al. (2007) não mostrou esta associação.

A amplificação de *HER2/neu*, gene que codifica a proteína c-erbB2 da família EGFR de receptores de membrana acoplados à tirosina-quinase, determinada por *fluorescent in situ hybridization* (FISH), foi identificada em sete pacientes de 182 portadores de câncer gástrico (22 pacientes por imunoistoquímica) e esteve associada ao subtipo intestinal e a uma menor sobrevida global em 5 anos (21,4% x 63,0%,  $p < 0,05$ ) (PARK et al. 2006). Outro estudo encontrou amplificação de *HER2/neu* por *chromogenic in situ hybridization* (CISH) em 16 (12,2%) de 131 portadores de adenocarcinoma gástrico e, destes, 63% apresentavam co-amplificação do gene da topoisomerase II $\alpha$  (enzima capaz de clivar e religar a dupla fita de DNA, importante no desenovelamento das fitas de DNA durante o processo de replicação). Neste estudo também houve uma associação positiva entre a amplificação de *HER2/neu* e o subtipo intestinal, bem como com pior sobrevida câncer-específica ( $p = 0,0089$ ) (TANNER et al. 2005). Já foi demonstrado que a co-amplificação de TOPO II-alfa prediz melhor resposta à quimioterapia com antraciclina em câncer de mama (KNOOP et al. 2005; TANNER et al. 2006; DI LEO et al. 2011).

Uma revisão de literatura envolvendo 42 trabalhos científicos, analisou os dados de IHQ e ISH para HER2 relativos a 12.749 pacientes. Nessa revisão se

verificou que em 71% dos estudos foi possível estabelecer um papel prognóstico negativo para esse marcador (JØRGENSEN e HERSOM 2012).

A perda de expressão de E-caderina (principal proteína de membrana responsável pela formação das junções aderentes em células epiteliais) está associada a um maior risco de comprometimento micrometastático linfonodal (KIM et al. 2008). ZHONG et al. (2008) demonstraram a perda de expressão de E-caderina em 70% de 181 casos de câncer gástrico e isto esteve associado com presença de acometimento linfonodal, metástases hepáticas, estágio avançado e pior sobrevida global em 5 anos ( $p=0,0017$ ), quando comparado aos indivíduos cujos tumores expressavam E-caderina.

#### **1.4 EXPRESSÃO GÊNICA POR *MICROARRAYS***

A análise simultânea de milhares de genes através de *microarrays* surgiu nos anos 90 e desde então tem sido utilizada com a finalidade de entender como ocorrem diversos processos biológicos (SCHENA et al. 1995).

Consiste na construção de uma plataforma contendo milhares de sequências gênicas conhecidas, ancorados em um substrato inerte. Essas sequências são expostas a hibridização com RNA de amostras de interesse e RNA de uma amostra de referência, previamente marcados com fluorescência. Tal reação irá gerar um sinal cuja intensidade será detectado por um *scanner*. A razão dos sinais do RNA de interesse e do RNA referência permitirá inferir a intensidade da expressão gênica nessa amostra (QUACKENBUSH 2006).

A análise da expressão gênica por *microarrays* permitiu uma maior compreensão de diversos aspectos da oncologia: conhecer novos subtipos de doença, identificar marcadores biológicos, prever sobrevida e resposta ao tratamento. Através dessa ferramenta avanços no estadiamento e de tratamento de tumores de mama, pulmão, rim, cólon e linfomas foram possíveis (PEROU et al. 1999; MOCH et al. 1999; ROSENWALD et al. 2001, 2002; BEER et al. 2002; ESCHRICH et al. 2005).

A expressão gênica vem surgindo como promissora ferramenta da avaliação prognóstica nesses tumores. CHEN et al. (2005), empregando um *microarray* em membrana de nylon customizado, contendo 328 sequências de cDNA correspondentes a genes humanos, compararam 18 pares de tecido normal e tumoral de portadores de câncer gástrico e encontraram um conjunto de três genes (*CD36* – receptor transmembrana de trombospondina-1, está associado com regulação de apoptose e angiogênese; *SLAM* – um receptor de superfície relacionado a CD2 e expresso em linfócitos B e T ativados e células dendríticas, estando associado as respostas adaptativas do tipo Th1; e *PIM-1* – uma serina-treonina-quinase que pode ser induzida por *H. pylori*, estando associada à proliferação, diferenciação e maturação de linfócitos T, resistência à drogas, tumorigênese, instabilidade genômica, migração e proliferação de endotélio) que associados são capazes de prever uma melhor ou pior sobrevida global. MEIRELES et al. (2004), também empregando um *array* de cDNA em membrana de nylon contendo 376 sequências gênicas, identificaram vários trios de genes capazes de separar completamente amostras de tecido normal e tumoral.

Ainda através de um cDNA microarray de 4800 sequências gênicas, GOMES et al. (2005), conseguiram estabelecer uma expressão gênica diferente entre tecido escamoso e colunar representando amostras de tecido normal, tecido inflamatório, metaplasia intestinal e esôfago de Barrett, além de adenocarcinomas, todos provenientes do esôfago distal, da junção gastroesofágica (JEG) e de estômago. Foi possível nesse estudo verificar que os adenocarcinomas de JEG apresentavam padrão de expressão compatível com os adenocarcinomas intestinais de estômago e que havia uma maior correlação na expressão dos adenocarcinomas de esôfago distal com a metaplasia intestinal e não com esôfago de Barret, reforçando uma hipótese de que sua origem ocorra na região do cárdia, com conseqüente invasão do esôfago. Os autores identificaram 02 módulos funcionais cujas alterações se expressão de forma mais significativa nas amostras, um do metabolismo de glicerolipídeos (ativo nas amostras de esôfago de Barret e metaplasia intestinal e inativo nos adenocarcinomas de esôfago, JEG e intestinais de estômago) e um módulo de interação citocina-receptor de citocina (também mais inativo nos adenocarcinomas do que nos tecidos anormais não-neoplásicos e que nos tecidos normais).

Compreender a biologia tumoral a nível molecular permite a identificação de alvos potenciais da ação de novos fármacos, além da identificação de pacientes cujos tumores apresentam um perfil molecular que os tornam mais susceptíveis à ação citotóxica de um esquema terapêutico em detrimento de outro. Dessa forma, o tratamento se tornaria mais individualizado, mais eficaz, potencialmente menos tóxico e bem menos oneroso.

## 1.5 A QUIMIOTERAPIA NO CÂNCER GÁSTRICO AVANÇADO

Em 2006, WAGNER et al. publicaram os resultados de uma revisão sistemática de 27 estudos de quimioterapia em câncer gástrico avançado ou metastático, onde verificaram que a quimioterapia determinava benefício em termos de aumento de sobrevida e de qualidade de vida quando comparada com cuidados de suporte (BSC) (69% x 47% respectivamente;  $p < 0,05$ ). Concluíram também que a poliquimioterapia foi superior à monoterapia em termos de sobrevida, com HR de 0,83 (95% CI, 0,74 to 0,93;  $p=0,001$ ), predominantemente às custas de esquemas contendo 03 drogas (envolvendo cisplatina, 5-fluorouracil e antraciclina) em comparação aos com apenas 02 dessas (cisplatina e 5-fluorouracil ou 5-fluorouracil e antraciclina). Nessa mesma análise, a toxicidade de esquemas contendo três drogas foi maior naqueles em que o 5-fluorouracil foi administrado em bolus venoso em comparação à infusão venosa contínua protraída (mortalidade relacionada ao tratamento – PELF 3,3% x ECF 0,6%). A análise de qualidade de vida também foi favorável ao esquema ECF. Tal estudo juntamente com de outros autores consagraram o ECF como o esquema de referência nessa patologia (WEBB et al. 1997; ROSS et al. 2002).

Durante os anos 90, novos esquemas utilizando infusão prolongada de 5-fluorouracil foram desenvolvidos. Desses, o ECF (epirrubicina 50 mg/m<sup>2</sup> D1, cisplatina 60 mg/m<sup>2</sup> no D1, seguido por 5FU 200mg/m<sup>2</sup>/dia em infusão contínua de 21 dias) demonstrou excelentes taxas de resposta objetiva (RO) (71%) em estudos fase II (FINDLAY et al. 1994) e superioridade (RO – 45 x 21%; sobrevida mediana – 8,9 x 5,7 meses; tempo para progressão – 7,4 x 3,4 meses) na doença metastática

quando comparado a FAMTX em estudos de fase III (WEBB et al. 1997; VANHOEFER et al. 2000). A partir de então, o ECF se tornou o esquema padrão para câncer gástrico metastático na Europa, inclusive em estudos de fase III em tratamento perioperatório.

Outras drogas como oxaliplatina, irinotecano e taxanos, em associação à cisplatina e 5-fluorouracil, já foram avaliadas em estudos de fase II em doença metastática com taxas de resposta em torno de 27% a 56% (LIM et al. 2005). Dos taxanos, o docetaxel em associação à cisplatina e 5-fluorouracil infusional, demonstrou taxas de resposta superiores a 50% (ROTH et al. 2000, 2004).

Um estudo randomizado de fase III, com pacientes com câncer gástrico avançado ou metastático, comparou DCF (docetaxel 75mg/m<sup>2</sup> D1, cisplatina 75mg/m<sup>2</sup> D1 e 5-FU 750mg/m<sup>2</sup>/dia IVC por 5 dias) com PF (cisplatina 100mg/m<sup>2</sup> D1 e 5-FU 1000mg/m<sup>2</sup>/dia IVC 5 por dias) e demonstrou superioridade da adição de docetaxel tanto em termos de taxas de resposta (37% x 25%), como de tempo para progressão (5,6 meses x 3,7 meses, p= 0,0004). Houve aumento da sobrevida global no grupo do DCF (redução de 23% no risco de morte), no entanto, com maior toxicidade (VAN CUTSEM et al. 2006).

Um estudo de fase II randomizado comparou ECF a dois outros esquemas contendo docetaxel (TCF e TC) e demonstrou um benefício do TCF sobre o ECF em termos de resposta (55% x 46%), tempo para progressão de doença (7,3 x 5,0 meses) e sobrevida global mediana (10,4 x 8,0 meses), com perfis de toxicidade similares (ROTH et al. 2007).

Como forma de evitar a inconveniência e riscos do cateter venoso e da infusão venosa contínua, além de minimizar a toxicidade da cisplatina,

CUNNINGHAM et al. (2008) avaliaram, no estudo REAL-2, esquemas contendo oxaliplatina e/ou capecitabina em comparação com ECF em pacientes com doença avançada. Os autores demonstraram a não-inferioridade de EOX (epirrubicina 50mg/m<sup>2</sup> D1 + oxaliplatina 130mg/m<sup>2</sup> D1 + capecitabina 625mg/m<sup>2</sup> 2 vezes ao dia por 21 dias), ECX (epirrubicina 50mg/m<sup>2</sup> D1 + cisplatina 60mg/m<sup>2</sup> D1 + capecitabina 625mg/m<sup>2</sup> 2 x dia, 21 dias) e EOF (epirrubicina 50mg/m<sup>2</sup> D1 + oxaliplatina 130mg/m<sup>2</sup> D1 + 5-fluorouracil 200mg/m<sup>2</sup> infusão venosa contínua 21 dias) em relação ao ECF em termos de sobrevida, com um melhor perfil de toxicidade. Uma tendência (não significativa estatisticamente) de maior sobrevida livre de progressão, de taxa de resposta global e de sobrevida mediana foi observada para o esquema EOX.

AL-BATRAN et al. (2008) compararam 02 esquemas de QT, FLO (5-fluorouracil, leucovorin e oxaliplatina) e FLP (5-fluorouracil, leucovorin e cisplatina) e verificaram que a substituição da cisplatina pela oxaliplatina determinou uma tendência de melhor SLP (5,8 x 3,2m), com melhor perfil de toxicidade e maior taxa de resposta, especialmente em indivíduos idosos. No entanto, não houve benefício em termos de sobrevida global.

A individualização do tratamento oncológico é forte tendência na prática clínica atual. Para tal faz-se necessário a melhor compreensão da biologia tumoral, e isso pode ser apreendido em parte através do conhecimento do padrão de expressão gênica. Tal análise possibilita não só individualizar o tumor em termos de prognóstico, mas, principalmente, identificar possíveis alvos terapêuticos e prever resposta às terapias medicamentosas ou não (QUACKENBUSH 2006). Sendo assim,

através desse conhecimento seria possível estabelecer estratégias de tratamento mais eficazes e potencialmente menos tóxicas para um grupo específico de pacientes.

Um exemplo prático dessa possibilidade pode ser verificado mais recentemente com o estudo ToGA, no qual se evidenciou benefício de sobrevida global (13,5 x 11,1m) em pacientes com câncer gástrico metastático, HER2 positivo, tratados com QT e trastuzumabe, um anticorpo monoclonal anti-*HER2*, sobre pacientes tratados somente com QT (BANG et al. 2010).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO**

Correlacionar a taxa de resposta objetiva (resposta completa e resposta parcial) obtida após tratamento de pacientes com diagnóstico de câncer gástrico localmente avançado e irressecável ou metastático com quimioterapia contendo platina e fluoropirimidinas com o perfil de expressão gênica obtido de amostras endoscópicas dos tumores desses pacientes.

### **2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- (a) Determinar a sobrevida global, duração de resposta e sobrevida livre de progressão;
- (b) Determinar a tolerância dos pacientes à quimioterapia a partir dos parâmetros de toxicidade;
- (c) Estabelecer correlação das características clínicas-patológicas, dos marcadores imunoistoquímicos e da toxicidade à QT com os desfechos de resposta objetiva e sobrevida;
- (d) Correlacionar o perfil de expressão gênica com sobrevida.

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

Foi realizado ensaio clínico prospectivo, não-randomizado, envolvendo pacientes com cânceres gástricos localmente avançados e irressecáveis ou metastáticos admitidos e candidatos a tratamento sistêmico paliativo no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará - ICC. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto do Câncer do Ceará em 29 de Outubro de 2009, conforme carta do Anexo 1.

#### **3.1 ELEGIBILIDADE**

##### **3.1.1 Critérios de inclusão**

- Pacientes com diagnóstico citológico ou histopatológico de carcinoma ou adenocarcinoma de estômago localmente avançado irressecável ou metastático sem tratamento oncológico sistêmico prévio;
- *Performance status* ECOG entre 0 e 2 (Anexo 2);
- Expectativa de vida superior a 12 semanas;
- Interesse voluntário em participar confirmado pela assinatura do Consentimento Esclarecido (Apêndice 2);
- Doença Mensurável, conforme critérios RECIST, versão 1.1.

### 3.1.2 Critérios de Exclusão

- Diagnóstico de outra neoplasia maligna em atividade (exceto Carcinoma Basocelular de pele, carcinoma *in situ* da mama e carcinoma *in situ* de colo uterino);
- Doença sistêmica grave que na opinião do investigador possa interferir no andamento do tratamento ou intensificar seus efeitos colaterais;
- Creatinina sérica > 1,3 mg/dl ou *Clearance* de Cr < 50 ml/min;
- Insuficiência hepática ou aumento nos níveis de bilirrubinas maior que 1,5 x o valor de referência ou transaminases maior que 2,5x o valor de referência;
- Hipersensibilidade aos componentes do tratamento;
- Radioterapia intestinal prévia ou previsão de tratamento com irradiação durante a quimioterapia;
- Gravidez;
- Participação em estudo de terapia investigacional;
- Estado ou patologia mental que inviabilize a capacidade do paciente de compreender e decidir os procedimentos próprios do estudo;
- Coagulopatia clinicamente grave ou sangramento ativo pelo tumor primário que cause instabilidade hemodinâmica.

## 3.2 AVALIAÇÃO PRÉ-TRATAMENTO

Os pacientes elegíveis assinaram termo de consentimento pós-informado (Apêndice 2) após a leitura e esclarecimento do mesmo. Tiveram anamnese e exame físico realizados pelo investigador no prazo de duas semanas que antecederam o

início do tratamento. Todos os pacientes realizaram avaliação antes do início do tratamento que consistia em exames laboratoriais (hemograma completo, provas de funções renais e hepáticas, transaminases séricas, dosagem de eletrólitos séricos e de antígeno carcinoembrionário sérico) em até 7 dias do primeiro dia de infusão. Exames radiológicos de avaliação de doença foram realizadas em até 28 dias do primeiro dia da primeira infusão de QT. Nos Quadros 1 e 2, segue uma lista discriminando os referidos exames de avaliação inicial.

**Quadro 1 - Lista de Exames Laboratoriais Iniciais**

<b>Exames Laboratoriais</b>	
Hemograma Completo	Contagem de plaquetas
Uréia/ Creatinina	Sódio/ Potássio
Cálcio iônico	Albumina
Bilirrubina Total e Frações	Fosfatase alcalina
TGO/ TGP	Tempo de Protrombina (TAP)
Beta-HCG (se aplicável)	Sumário de urina

**Quadro 2 - Lista de Exames Complementares Radiológicos de Estadiamento**

<b>Exames Obrigatórios</b>	<b>Exames Condicionais</b>
Radiografia de tórax	Tomografia de Tórax (se detectadas anormalidades na radiografia de tórax)
Tomografias de abdome e pelve	Tomografia ou RNM de crânio se paciente com suspeita clínica de doença em SNC
ECG/ Ecocardiograma bidimensional ou Cintilografia miocárdica (no caso de QT contendo antraciclínas)	Cintilografia óssea de corpo inteiro, no caso de suspeita clínica de metástases ósseas

Além desses exames, foi realizada também uma endoscopia digestiva alta para coleta de amostra tumoral para análise molecular subsequente ou, na ausência do tumor primário, biópsia de lesões metastáticas.

### 3.3 PLANO DE TRATAMENTO

O esquema de quimioterapia consistiu na combinação de duas ou três drogas, sendo que duas delas deveriam, obrigatoriamente, ser uma fluoropirimidina e um sal de platina, conforme rotina em câncer gástrico (National Comprehensive Cancer Network-NCCN 2011).

O presente estudo teve por objetivo correlação clínica-molecular (RO e sobrevida versus expressão gênica e imunoistoquímica tumoral), sendo assim, a escolha do esquema terapêutico ficou dependente da avaliação do médico assistente e teve como principais bases: melhor eficácia, contra-indicações, comorbidades, histórico de hipersensibilidade, potencial de toxicidade, estado geral, estado nutricional, experiência do profissional e viabilidade no serviço. Conforme boa prática de rotina em tratamento oncológico (principalmente paliativo, no qual a qualidade de vida é o objetivo primordial), o paciente também teve participação na escolha de seu esquema após discussão clara e objetiva de seu médico assistente. Nesse contexto foram incluídos pacientes tratados com esquemas: ECF, ECX e CF.

Conforme rotina do serviço de oncologia clínica, os pacientes deveriam ser avaliados clinicamente e laboratorialmente antes de cada ciclo de quimioterapia com vistas a controle da doença e suporte de seus sintomas decorrentes da doença de base, de seu estado geral e da toxicidade apresentada, sobretudo, gastrointestinal, hematológica, renal e hepática. O Anexo 3 descreve e classifica os principais efeitos adversos do tratamento oncológico, tendo sido planejadas reduções de doses de QT (20%) nos ciclos subsequentes (obviamente adiados até recuperação), no caso de toxicidades gastrointestinais, ou hematológicas grau 3 e 4 ou neutropenia febril. Na

reincidência dos anteriores ou em caso de toxicidade auditiva ou neurológica grau 2, a QT era suspensa. Na ocorrência de cardiotoxicidade ou toxicidade renal grau 2, a QT era suspensa; se houvesse recuperação da função renal, na ausência de comorbidade de risco o tratamento era reiniciado com redução de dose.

Também foram repetidos os exames radiológicos necessários para a avaliação do desfecho clínico de resposta objetiva, conforme se pode verificar a seguir.

O tratamento foi mantido, na ausência de toxicidade acima citada, até progressão de doença, resposta máxima (definida por 2 avaliações seguidas evidenciando doença estável), em acordo com decisão do paciente, que obviamente, também poderia solicitar o fim da QT.

### **3.4 PLANO DE COLETA DE DADOS**

Todos os pacientes tiveram suas características basais, assim como todos os parâmetros clinicopatológicos (conforme ficha discriminada no Apêndice 1) necessários para obtenção dos resultados do estudo registrados em ficha clínica individual, armazenada em armário próprio no setor de pesquisa clínica da Escola Cearense de Oncologia do Instituto do Câncer do Ceará. Foram esses dados processados em banco de dados do SPSS (IBM, versão 18, sob registro da referida instituição).

#### **3.4.1 Avaliação de Resposta**

A cada 02 ciclos os pacientes realizaram avaliação radiológica e clínica com vistas à determinação de resposta, conforme critérios do *Response Criteria In Solid*

*Tumour* (RECIST versão 1.1). Foi considerada objetiva (RO) a ocorrência de resposta parcial (RP) ou resposta completa (RC), mantida por pelo menos 4 semanas. Tal procedimento foi mantido a cada 8 semanas, sendo o tratamento de QT mantido até resposta máxima, progressão de doença ou toxicidade limitante. No Anexo 4 constam os critérios RECIST para avaliação de resposta (EISENHAUER et al. 2009). Foi calculada também a duração de resposta (DR) naqueles pacientes com resposta objetivas. Esse parâmetro consiste no tempo transcorrido desde a documentação de resposta objetiva até a primeira documentação de progressão tumoral ou óbito e foi mensurado em meses.

### **3.4.2 Toxicidade**

Os pacientes estudados foram avaliados regularmente a cada ciclo quanto à toxicidade hematológica, gastrointestinal, neurológica, renal e aderência ao tratamento. Os pacientes foram pesados e tiveram anamnese e exame físico dirigidos para a pesquisa do estado nutricional e aferição rigorosa da toxicidade clínica. As reduções e atrasos de dose, relativos ao plano terapêutico inicial foram considerados na análise da toxicidade clínica.

Os pacientes foram conduzidos, na profilaxia e terapêutica dos efeitos adversos, de acordo com diretrizes clínicas internacionais para a prevenção e tratamento de mucosite induzida pela terapia do câncer (Sociedade Americana de Oncologia Clínica/ASCO; Sociedade Européia de Oncologia Médica/ESMO).

Os pacientes realizaram exames de hemograma completo, creatinina, enzimas hepáticas, sódio e potássio até dois dias antes de cada aplicação de quimioterapia. As modificações de dose seguiram critérios estabelecidos pelos estudos clínicos que

padronizaram o regime levando em consideração os Critérios de Toxicidade Comum (CTC) do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) versão 3.0 (Anexo 3). Foi administrada nova dose de quimioterapia para os pacientes com Plaquetas > 100.000/mm<sup>3</sup> e Neutrófilos > 1500/mm<sup>3</sup>.

### **3.4.3 Análise da expressão gênica**

As amostras tumorais obtidas antes do início do tratamento foram submetidas à análise histopatológica por congelação para confirmação de presença de tumor na amostra tumoral e quantificação da proporção da mesma frente ao tecido normal adjacente. Das amostras selecionadas, algumas foram mantidas em formol tamponado (aquelas utilizadas para a imunoistoquímica) e as demais foram armazenadas em tubos *RNase free*, sob refrigeração a -80° C (aquelas utilizadas para avaliação de expressão gênica). Foram utilizadas para extração de RNA as amostras que continham ao exame de congelação pelo menos 70% de tecido tumoral e garantia da homogeneidade do material. Estes critérios foram discutidos e uniformizados entre os patologistas envolvidos. De todos os pacientes foram coletadas também amostras de sangue para separação e armazenamento do soro para posterior pesquisa de marcadores séricos (estudo exploratório com objetivos não relacionados a essa tese). Essa coleta constava do TCLE submetido aos pacientes.

- **Extração do RNA total**

Os fragmentos tumorais previamente congelados à -80°C foram lisados e homogeneizados com o auxílio de um *Tissueruptor* (Polytron, Kinematica AG, Switzerland) A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o método de

minicolunas (RNeasy MiniKit, Qiagen<sup>R</sup>, EUA) seguindo especificações do fabricante. Nesse método, um tampão contendo Etanol (fornecido pelo fabricante) era adicionado ao lisado e em seguida, a solução era adicionada a colunas contendo membranas de sílica RNeasy, em várias etapas. Nessas membranas o RNA se liga e todos os demais contaminantes são eliminados. O RNA purificado é então eluído em água livre de RNase (RNase *free*).

A quantificação e pureza do RNA foram avaliadas através da leitura de Densidade Ótica (DO) nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm em espectrofotômetro (ND-1000, NanoDrop, EUA). RNA com bom grau de pureza deveriam apresentar uma razão das DO 260/280 entre 1,8 a 2,0 e uma razão das DO 260/230 maior que 1,8. A avaliação do grau de degradação e pureza do RNA foi feita pelo fracionamento em gel de agarose 1%. As amostras de RNA também foram submetidas a uma avaliação de qualidade através de análise por eletroforese utilizando o Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies<sup>R</sup>, Santa Clara, CA, US), conforme especificações do fabricante. Foram considerados de boa qualidade os RNA que apresentem um *relative integrity number* (RIN)  $\geq 7,0$  com os respectivos picos das bandas 18S e 28S do RNA ribossômico.

- **Marcação, hibridação e leitura das lâminas**

Os alvos fluorescentes representando os RNA presentes nas amostras de tecido foram obtidos pela amplificação linear dos RNA mensageiros (RNAm) presentes em uma alíquota de 250ng de RNA total isolado; a amplificação gera cRNA marcado. Foi utilizado o conjunto de reagentes para amplificação e marcação

do mRNA amplificado Low Input Quick Amp Labeling Kit, cat # 5190-2306 (Agilent<sup>R</sup> – USA), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante.

Foram empregados neste estudo *arrays* fabricados pela Agilent contendo 60.000 oligonucleotídeos de 60 bases de comprimento e que representam todo o genoma humano. O *array* utilizado foi o *Whole Human Genome Array* (8X60K), número de catálogo G4851A.

Os *oligoarrays* foram hibridados com os alvos fluorescentes durante 17h a 65° C em forno de hibridização dedicado, utilizando o tampão de hibridação *Hi-RPM* fornecido pela Agilent. Após hibridização, as lâminas foram processadas utilizando tampões fornecidos pelo fabricante (Agilent<sup>R</sup>, USA) para eliminação de alvos não-específicos e eliminação de *background*. Neste processo, as lâminas foram retiradas do suporte e lavadas por 1 min em tampão de lavagem #1 à temperatura ambiente seguido pelo tampão #2 por 1 min, a 42° C. Em seguida, as lâminas passaram pelo processo de secagem que consiste nas lavagens em acetonitrilo por 1 min e na solução de lavagem e estabilização para *microarrays* por 1 min. Os arrays foram digitalizados com o emprego do Scanner modelo Agilent Bundle (Agilent<sup>R</sup>, USA) com capacidade para 48 lâminas em resolução de 3,0µm.

Os dados de intensidade de cada *spot* digitalizados no *scanner* foram extraídos e pré-processados utilizando o programa *Agilent Feature Extraction* (v. 10.0). Nesta etapa, extraíram-se os valores de intensidade de cada *spot* e os controles de qualidade das hibridações inclusive utilizando os RNA *spikes* adicionados durante a marcação. Também foram realizadas as correções necessárias nos valores de intensidade provenientes de cada corante (usando o algoritmo *Lowess*) com o objetivo de eliminar as diferenças de eficiência da emissão dos fluoróforos Cy3 e

Cy5. Nesse momento também foi realizada a subtração do *background* local (valor de intensidade ao redor de cada *spot*).

Nos experimentos de *microarray*, todas as amostras foram comparadas contra uma referência comum, como proposto por POLLACK et al. (2002), de modo a permitir comparações horizontais. Assim, a expressão de cada gene de cada amostra foi calculada através da razão entre a intensidade do sinal na amostra sobre a intensidade do sinal na referência; e as amostras puderam ser comparadas entre si através da razão das razões.

Ainda segundo o autor acima, a referência ideal seria aquela que produz um sinal mínimo em todos os elementos do *array*, além de ser facilmente produzida e reproduzível, não só no tempo, mas também em diferentes laboratórios. Dessa forma, o que mais se aproxima da referência ideal seria um *pool* de RNA de linhagens celulares, como o utilizado na Universidade de Stanford. No presente estudo, um novo conjunto de 15 linhagens celulares foi escolhido, tomando o cuidado de selecionar tipos celulares equivalentes (Quadro 3). Todas as linhagens foram cultivadas no meio sugerido pela *American Type Cell Collection* (ATCC; [www.atcc.org](http://www.atcc.org)), suplementados com 10% de soro fetal bovino. As linhagens foram mantidas a 37° C na presença de 5% de CO<sub>2</sub> até alcançarem 80-90% de confluência, quando foi extraído o RNA total pelo método do Trizol (Invitrogen<sup>R</sup>, EUA), seguindo especificações do fabricante. Quantidades iguais do RNA total das linhagens que compõem o RNA referência foram misturadas e este RNA referência foi aliquotado e armazenado a -80° C.

**Quadro 3** - Linhagens celulares selecionadas para compor o RNA referência

Nome da Linhagem	Tipo Tumoral
Daudi	Linfoma de Burkitt
DLD-1	Adenocarcinoma de Cólon
DU 145	Carcinoma de Próstata
FaDu	Carcinoma Epidermóide de Faringe
GM 637	Fibroblasto Humano diplóide
H 146	Carcinoma de Pulmão
H 1080	Fibrossarcoma
HB4 $\alpha$	Célula Luminal de Mama
HEK 293	Rim embrionário Humano
Jurkat	Leucemia Aguda de Células T
Saos-2	Osteossarcoma
SK-BR-3	Adenocarcinoma de Mama
SK-MEL-28	Melanoma
T24	Carcinoma de Bexiga
T98G	Glioblastoma

- **Análise dos Dados**

Para a análise de expressão diferencial foi utilizado o programa TIGR *Multiexperiment Viewer* (TMeV versão 4.4.1), disponibilizado pelo TIGR *Institute For Genomic Science* (R Development Core Team 2010; <http://www.tm4.org>), onde se aplicou o teste estatístico paramétrico t, com 1000 permutações e p-value < 0,01, com ajuste de Bonferroni, na identificação dos genes diferencialmente expressos entre os grupos Não-Respondedor (R-) e Respondedor (R+), além de BOM (> 6m de SLP) ou MAU prognóstico (< 6m de SLP) (SAEED et al. 2006). Após o teste, foi calculado o Fold (razão entre as intensidades dos sinais para o gene em questão entre R- e R+ ou BOM e MAU, no caso) e feito um corte em Fold maior ou igual a 2. Então, com essa lista de genes, foi construído um agrupamento (*cluster*) hierárquico com suporte, utilizando a métrica de Pearson e *complete linkage*. Com a mesma lista,

utilizou-se o software FunNet (<http://www.funnet.info>) para visualizar as funções e vias envolvidas (PRIFTI et al. 2008), tendo como referência o Gene Ontology (GO) e a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

#### 3.4.4 Análise das Amostras por Imunoistoquímica

Foram montados preparados histológicos e blocos de parafina das amostras colhidas endoscopicamente antes do início da QT para realização de imunoistoquímica. A imunoistoquímica foi realizada através da técnica do polímero com recuperação antigênica pelo calor. Foram selecionados para as análises anticorpos monoclonais primários para E-caderina, Topoisomerase II $\alpha$  (TOPO2A), HER2, ERCC1 e TS, com diluições estabelecidas no laboratório a partir de recomendações dos fabricantes.

**Quadro 4** - Anticorpos utilizados e respectivos fabricantes

Anticorpos	Fabricante	Clone
Caderina-E	DAKO	NCH38
C-erbB2	Novocastra	CB11
Timidilato sintase	Dako	TS106
Topoisomerase II	Dako	SWT3D1
ERCC1	abcam	8F-1

A imunoistoquímica foi realizada através das seguintes etapas:

- Desparafinização e hidratação dos cortes histológicos: 3 banhos em Xilol (5 minutos cada), 4 banhos de álcool etílico (concentração decrescente), lavagem por 5 minutos em água corrente;

- Recuperação antigênica na Pascal (Câmara de Pressão) em solução Citrato pH=6,0 à 125° C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi).
- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- Bloqueio da peroxidase endógena: 3 banhos de 5 minutos cada com Peróxido de Hidrogênio (10 volumes);
- Lavagem em PBS;
- Bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO);
- Incubação dos anticorpos primários, por 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida;
- Lavagem em PBS;
- Incubação com anticorpo secundário (Advance HRP Link - DAKO) por 30 minutos (Ta);
- Lavagem em PBS;
- Incubação com Polímero (Advance HRP enzyme - DAKO) por 30 minutos (Ta);
- Lavagem em PBS;
- Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos (Kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System; DakoCytomation, Carpinteria, California);
- Lavagem em água corrente;
- Contra coloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos;
- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- Desidratação em álcool, Xilol, montagem em meio permanente.

Foram utilizados controles positivos e negativos internos e externos da reação.

Para avaliação dos escores de expressão de HER 2 foram considerados positivos os casos que apresentassem escore 3+, ou seja, marcação membranar intensa (completa ou incompleta) em mais de 10% das células tumorais ( no caso de espécime cirúrgico) ou em um dado agrupamento de células (no caso de biópsias) , conforme HOFMANN et al. (2008). A expressão de TOPO II foi avaliada determinando-se a proporção de células tumorais com núcleo marcado, sendo considerados positivos os casos com expressão nuclear em mais de 10% das células tumorais. Para tal, cerca de 200 células são avaliadas (LIANG et al. 2008). Para ERCC1, o nível de expressão é estabelecido a partir da comparação entre a marcação das células tumorais e a das células adjacentes da mesma amostra. Um resultado 0 significa que não há reatividade do anticorpo nas células tumorais; 1+ significa que a marcação no tumor é menor que nas células controles adjacentes; 2+ significa que a marcação é igual nos dois tipos celulares; 3+ significa que a marcação tumoral é maior que a das células controles. Assim é considerado positivo o caso com marcação 3+ em mais de 10% das células tumorais e negativo o caso com marcações 0-2 ou 3+ em menos de 10% de células tumorais (Genzyme Genetics 2009).

Para interpretação dos dados relativos a E-caderina foi criado um modelo que consistia no análise conjunta de escores relativos a quantidade de células (0-4) com marcação membranar e escores relativo à intensidade dessa marcação (0-3), sendo considerados positivos os casos estimados com escores agrupados 6 – 7 (ZALI et al. 2009).

### **3.4.5 Dados de Sobrevida**

Os pacientes foram seguidos ambulatorialmente até o óbito. A sobrevida global foi mensurada pelo tempo transcorrido entre o diagnóstico de câncer até o óbito por qualquer causa e foi medida em meses. Já a sobrevida livre de progressão foi calculada a partir do tempo transcorrido do início do tratamento até a data de registro de progressão de doença ou óbito.

## **3.5 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foram incluídos nesse estudo pacientes admitidos no serviço consecutivamente e, levando-se em conta que os dados de literatura apontam para taxas de resposta objetiva em pacientes com câncer metastático tratados com combinações envolvendo cisplatina e fluoropirimidinas giram em torno de 45%, com uma amplitude do intervalo de confiança de 10% - RO variando entre 10 a 40%, IC 95% (erro médio:  $\pm 10\%$ ), um erro do tipo I de 0,05 e objetivando um poder de 80%, estimamos que fosse necessária a inclusão de um total de 30 pacientes com pelo menos 6 respostas objetivas e na primeira fase 10 pacientes com pelo menos 2 respostas.

A comparação entre as variáveis demográficas, histopatológicas e de resposta foi realizada através do teste do Qui-quadrado ou do teste exato de Fisher.

As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de sobrevida acumulada de Kaplan Meier.

Foram realizadas análises univariada e multivariada no intuito de se avaliar a influência das demais variáveis na taxa de RO, sobrevida global e sobrevida livre de recidiva através do teste de log-rank e do modelo de regressão de Cox. Foram incluídas na análise multivariada todas as variáveis que apresentarem  $p > 0,1$  na análise bivariada.

Foram considerados estatisticamente significativos os dados que apresentaram nível de significância (valor de p) menor 5%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DOS SUJEITOS

Foram incluídos 28 pacientes no período de janeiro de 2010 e outubro de 2011. Desse total, 02 pacientes não iniciaram a quimioterapia proposta devido a complicações da doença de base que levaram ao óbito (um por hemorragia digestiva alta e outro por insuficiência renal obstrutiva secundária a doença metastática retroperitoneal). Outros dois pacientes iniciaram a quimioterapia, mas não foram submetidos à avaliação de resposta, em virtude de falecimento antes da realização dos exames de imagem, todos por deterioração do quadro clínico, obviamente associado à doença de base. No total, 24 estavam aptos para avaliação de resposta. As características gerais da população do estudo encontram-se discriminadas nas Tabelas 1 e 2.

Os pacientes incluídos tinham idade média de 56,3 (9,8 anos) (28 - 75 anos), sendo que 75% eram do sexo masculino. Predominaram os tumores distais (antro e corpo), correspondendo a 67,9% do total. Os tumores proximais (cárdia e junção gastroesofágica) corresponderam a 25% dos pacientes e os demais (7,1% dos pacientes) apresentaram tumor primário característico de *linite plastica*. A Figura 1 descreve com mais detalhes as localizações do primário. O tipo histológico predominante foi o adenocarcinoma do tipo intestinal, correspondendo a 67,8% dos casos. Nessa categoria agrupamos 2 casos classificados como adenocarcinoma com tipo não-especificado no grupo dos intestinais, como forma de facilitar as análises

estatísticas subsequentes. Na Figura 2 é possível verificar essa distribuição com mais detalhes.

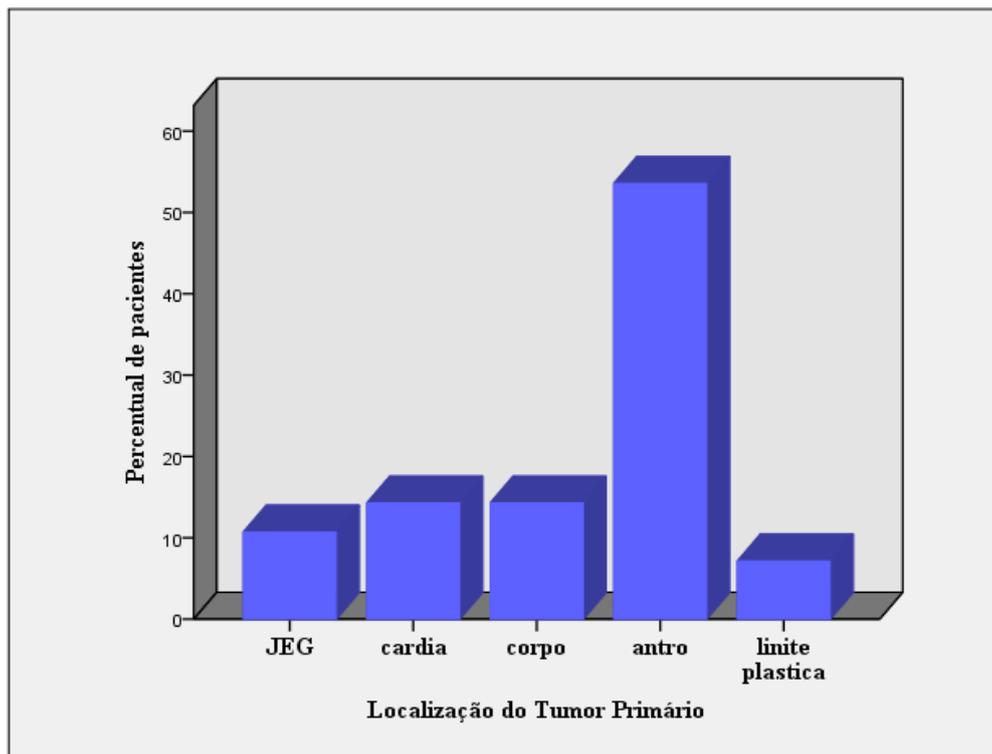
**Tabela 1** - Características basais dos sujeitos do estudo

<b>Característica</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Idade (anos)</b>	56,3	9,8	28	75
<b>Soma Lesões-Alvo (mm)</b>	143	111	21	440
<b>Perda de Peso (Kg)</b>	14,1	6,4	6	30
<b>Peso Inicial (Kg)</b>	52,3	9,9	38	74
<b>IMC</b>	20,6	3,0	15,8	26,0

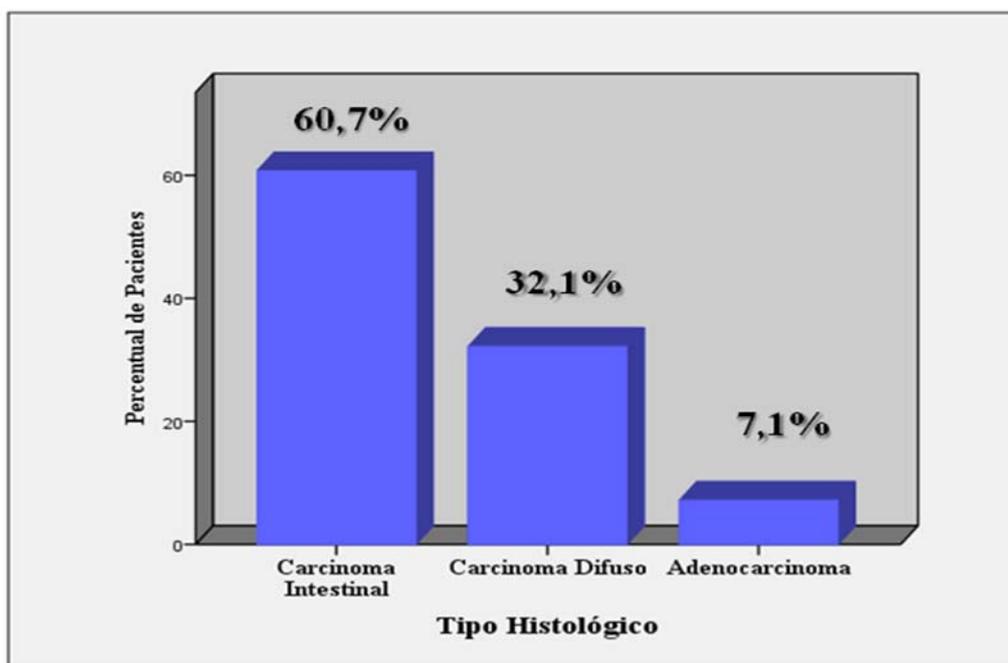
**Tabela 2** – Frequências das características clinicopatológicas basais dos sujeitos do estudo

<b>VARIÁVEL</b>	<b>CATEGORIAS</b>	<b>N=28</b>	<b>FREQUÊNCIA %</b>
<b>Sexo</b>	Masculino	21	75
	Feminino	7	25
<b>Localização do primário</b>	Proximal	7	25
	Distal	19	67,9
	Linite	2	7,1
<b>Tipo histológico</b>	Tipo intestinal	17	60,7
	Tipo difuso	9	32,1
	Adenocarcinoma não classificável	2	7,1
<b>Gastrectomia prévia</b>	Sim	3	10,7
	Não	25	89,3
<b>Status performance<sup>a</sup></b>	0	0	0
	1	11	39,3
	2	17	60,7
<b>Meta hepática</b>	Sim	18	64,3
	Não	10	35,7
<b>Meta peritoneal</b>	Sim	15	53,6
	Não	13	46,4
<b>Meta partes moles</b>	Sim	4	14,3
	Não	24	85,7
<b>Meta linfonodal</b>	Sim	24	85,7
	Não	4	14,3

<sup>a</sup>Conforme escala do ECOG



**Figura 1** - Distribuição dos Pacientes conforme Localização do Tumor Primário.



**Figura 2** - Distribuição dos Pacientes Conforme Histologia do Tumor (classificação de Lauren).

Os indivíduos do estudo apresentavam volume de doença considerável, com média da soma das lesões-alvo de 143 mm (variando de 21 a 440 mm), cujos sítios mais frequentes de metástases foram fígado, peritônio e linfonodos. A mediana para o número de sítios metastáticos foi 2. Os pacientes apresentavam importante comprometimento do *status performance*, com a maioria dos casos sendo classificados como ECOG 2 (60,7%). Não houve indivíduos com ECOG 0. À admissão no estudo, a média de peso corporal foi de 52,3Kg (variando de 38 a 74Kg), com IMC 20,6 (variando de 15,8 a 26). Foi referida uma média de perda de peso (em 6 meses) de aproximadamente 14kg (variando de 6 a 30kg).

Os pacientes padeciam de sintomas como: dor abdominal (80%), perda de peso (85%), anorexia (100%), plenitude gástrica pós-prandial (70%), disfagia (40%), vômitos pós-prandiais (60%) e melena (25%). Apenas 15% dos pacientes foram submetidos a procedimentos de desobstrução de trânsito digestivo através de prótese e gastrojejuno-anastomose ou a sondagem externa (nasoenteral ou jejunostomia).

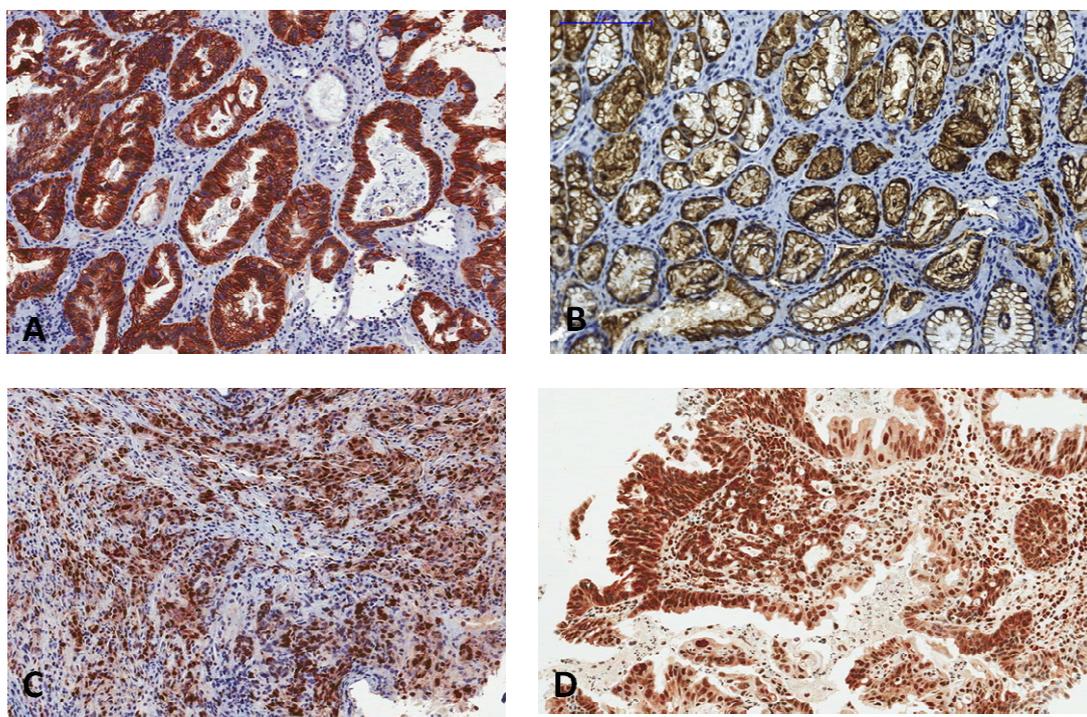
## **4.2 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA**

Por ocasião da elaboração dessa tese, estavam disponíveis para análise as marcações para HER2, Topoisomerase II-alfa (TOPO2A), caderina-E e ERCC1, devido a problemas técnicos para realização de TS (Figura 3).

No que se refere às imunomarcações, foram consideradas positivas para TOPO2A quando mais de 10% das células apresentaram marcação nuclear forte. Para HER2, a positividade foi estabelecida para marcação membranar 3+. Já no caso

do ERCC1 a positividade foi estabelecida para marcação nuclear forte do maior número de células tumorais, conforme descrito na seção MÉTODOS.

De acordo com a Tabela 3, verifica-se que em 01 amostra não foi possível se estabelecer um resultado para HER2 e em outra também não foi possível para ERCC1. A positividade no grupo de 28 pacientes foi de 100%, 82,1%, 17,9% e 57,1% para TOPO2A, HER2, ERCC1 e caderina-E, respectivamente.



**Figura 3** – Expressão imunohistoquímica. Em A. HER2; B. Caderina-E; C. Topoisomerase II e D. ERCC1.

**Tabela 3** - Expressão por imunistoquímica de HER2, ERCC1 e TOPO2A nas amostras de tumor gástrico avaliadas.

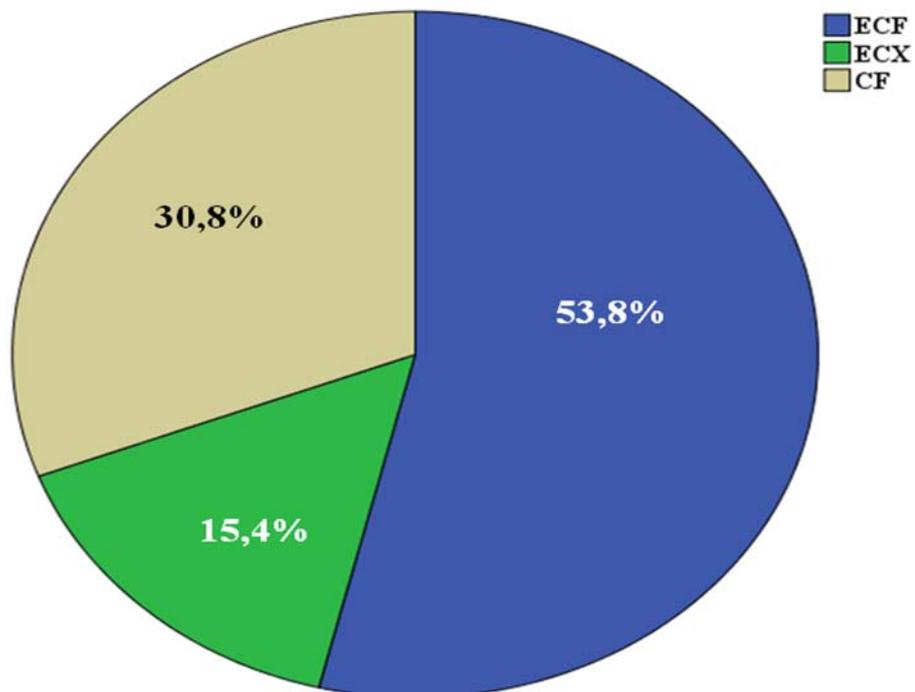
<b>Marcador</b>	<b>Expressão</b>	<b>N</b>	<b>Percentual</b>	<b>% Cumulativa Avaliável</b>
<b>TOPO2A</b>	Positivo	23	82,1	82,1
	Negativo	5	17,9	100,0
	Total	28	100,0	
<b>HER2</b>	Positivo	5	17,9	18,5
	Negativo	22	78,6	100,0
	Subtotal	27	96,4	-
	NA <sup>a</sup>	1	3,6	-
	Total	28	100,0	
<b>ERCC1</b>	Positivo	16	57,1	59,3
	Negativo	11	39,3	100,0
	Subtotal	27	96,4	-
	NA <sup>a</sup>	1	3,6	-
	Total	28	100,0	

<sup>a</sup> não avaliável. Devido ao pequeno número de indivíduos, as marcações foram categorizadas dicotomicamente (POSITIVO x NEGATIVO).

### 4.3 TRATAMENTO E TOXICIDADE

Estavam aptos para essa avaliação 26 pacientes. Mais de 60% dos pacientes receberam esquema de poliquimioterapia contendo 3 drogas, contendo associação de epirrubicina (50mg/m<sup>2</sup> D1) e cisplatina (60mg/m<sup>2</sup> D1) com 5-fluorouracil (1g/m<sup>2</sup>/dia sob infusão venosa contínua - IVC de 4 dias) ou com capecitabina (1250mg/m<sup>2</sup>/dia VO por 21 dias). Os demais pacientes receberam como esquema de quimioterapia a associação de cisplatina (80mg/m<sup>2</sup>) e 5-fluorouracil (1g/m<sup>2</sup>/dia por 4 dias em IVC). As principais razões que motivaram a escolha dos esquemas de tratamento foram: idade, PS, disponibilidade de acesso venoso, condições de ingesta oral, ausência de

obstrução intestinal e disponibilidade da capecitabina na instituição. A Figura 4 ilustra a distribuição dos pacientes conforme a QT administrada. A mediana do número de ciclos realizados foi de 5 (1-13). A principal razão para suspensão da quimioterapia foi progressão de doença, o que ocorreu em 25% dos casos, seguidos por decisão do paciente, toxicidade ou resposta máxima. Somente 04 pacientes tiveram o tratamento suspenso por toxicidade e outros 04 pacientes optaram por abandonar o tratamento por razões pessoais. O tratamento foi, em geral, bem tolerado, conforme ilustrado na Tabela 4. Dentre todos os esquemas, houve mais náuseas, ototoxicidade e neurotoxicidade nos esquemas com três drogas, conforme se verifica nas tabelas 5 e 6. Houve necessidade de redução de dose em 40% dos pacientes, principalmente em razão dos efeitos adversos hematológicos graus 3 ou 4. Não houve relato de síndrome mão-pé (eritrodisestesia palmo-plantar). A ototoxicidade de graus 1 e 2 foi verificada em 19,2% dos pacientes (n = 3 e 2, respectivamente); neurotoxicidade grau 1 ocorreu em 3 pacientes e mucosite oral foi relatada por 5 pacientes (de graus 1 e 2).



**Figura 4** - Distribuição dos pacientes pelo esquema de quimioterapia. Obs.: ECF com 5-Fluorouracil em infusão venosa contínua de 4 dias.

**Tabela 4** - Perfil de toxicidade à quimioterapia de todos os pacientes.

Toxicidade		N	Frequência (%)	Percentual Cumulativo
<b>Anemia<sup>a</sup></b>	grau 0	6	23,1	23,1
	grau 1	7	26,9	50,0
	grau 2	9	34,6	84,6
	grau 3	4	15,4	
	Total	26	100,0	100
<b>Neutropenia<sup>a</sup></b>	grau 0	11	42,3	42,3
	grau 1	1	3,8	46,2
	grau 2	3	11,5	57,7
	grau 3	9	34,6	92,3
	grau 4	2	7,7	100,0
	Total	26	100,0	
<b>Plaquetopenia<sup>a</sup></b>	grau 0	24	92,3	92,3
	grau 1	1	3,8	96,2
	grau 2	1	3,8	100,0
	Total	26	100,0	
<b>Náuseas</b>	grau 0	3	11,5	11,5
	grau 1	8	30,8	42,3
	grau 2	14	53,8	96,2
	grau 3	1	3,8	100,0
	Total	26	100,0	
<b>Vômitos</b>	grau 0	7	26,9	26,9
	grau 1	10	38,5	65,4
	grau 2	7	26,9	92,3
	grau 3	2	7,7	100,0
	Total	26	100,0	
<b>Diarréia</b>	grau 0	15	57,7	57,7
	grau 1	5	19,2	76,9
	grau 2	5	19,2	96,2
	grau 3	1	3,8	100,0
	Total	26	100,0	

<sup>a</sup>A toxicidade hematológica só foi avaliada no D1 de cada ciclo de QT

**Tabela 5** – Perfil de toxicidade de pacientes submetidos ao esquema CF.

<b>ESQUEMA CF</b>				
Toxicidades		N	%	% Cumulativo
<b>Anemia</b>	grau 0	1	12,5	12,5
	grau 1	3	37,5	50,0
	grau 2	3	37,5	87,5
	grau 3	1	12,5	100,0
<b>Neutropenia</b>	grau 0	2	25,0	25,0
	grau 1	1	12,5	37,5
	grau 2	1	12,5	50,0
	grau 3	3	37,5	87,5
	grau 4	1	12,5	100,0
<b>Plaquetopenia</b>	grau 0	7	87,5	87,5
	grau 2	1	12,5	100,0
<b>Neurológica</b>	grau 0	8	100,0	100,0
<b>Auditiva</b>	grau 0	7	87,5	87,5
	grau 2	1	12,5	100,0
<b>Náuseas</b>	grau 0	7	87,5	87,5
	grau 1	1	12,5	100,0
<b>Vômitos</b>	grau 0	2	25,0	25,0
	grau 1	2	25,0	50,0
	grau 2	3	37,5	87,5
	grau 3	1	12,5	100,0
<b>Diarréia</b>	grau 0	5	62,5	62,5
	grau 1	1	12,5	75,0
	grau 2	2	25,0	100,0
<b>Mucosite oral</b>	grau 0	7	87,5	87,5
	grau 1	1	12,5	100,0
	Total	8	100,0	

**Tabela 6** – Toxicidade dos pacientes submetidos aos esquemas contendo 3 drogas

<b>ESQUEMAS ECF e ECX</b>				
<b>Toxicidades</b>		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>% Cumulativo</b>
<b>Anemia</b>	grau 0	5	27,8	27,8
	grau 1	4	22,2	50,0
	grau 2	6	33,3	83,3
	grau 3	3	16,7	100,0
<b>Neutropenia</b>	grau 0	9	50,0	50,0
	grau 2	2	11,1	61,1
	grau 3	6	33,3	94,4
	grau 4	1	5,6	100,0
<b>Plaquetopenia</b>	grau 0	17	94,4	94,4
	grau 1	1	5,6	100,0
<b>Neurológica</b>	grau 0	15	83,3	83,3
	grau 1	3	16,7	100,0
<b>Auditiva</b>	grau 0	14	77,8	77,8
	grau 1	3	16,7	94,4
	grau 2	1	5,6	100,0
<b>Náuseas</b>	grau 0	2	11,1	11,1
	grau 1	6	33,3	44,4
	grau 2	9	50,0	94,4
	grau 3	1	5,6	100,0
<b>Vômitos</b>	grau 0	5	27,8	27,8
	grau 1	8	44,4	72,2
	grau 2	4	22,2	94,4
	grau 3	1	5,6	100,0
<b>Diarréia</b>	grau 0	10	55,6	55,6
	grau 1	4	22,2	77,8
	grau 2	3	16,7	94,4
	grau 3	1	5,6	100,0
<b>Mucosite oral</b>	grau 0	14	77,8	77,8
	grau 1	3	16,7	94,4
	grau 2	1	5,6	100,0
	Total	18	100,0	

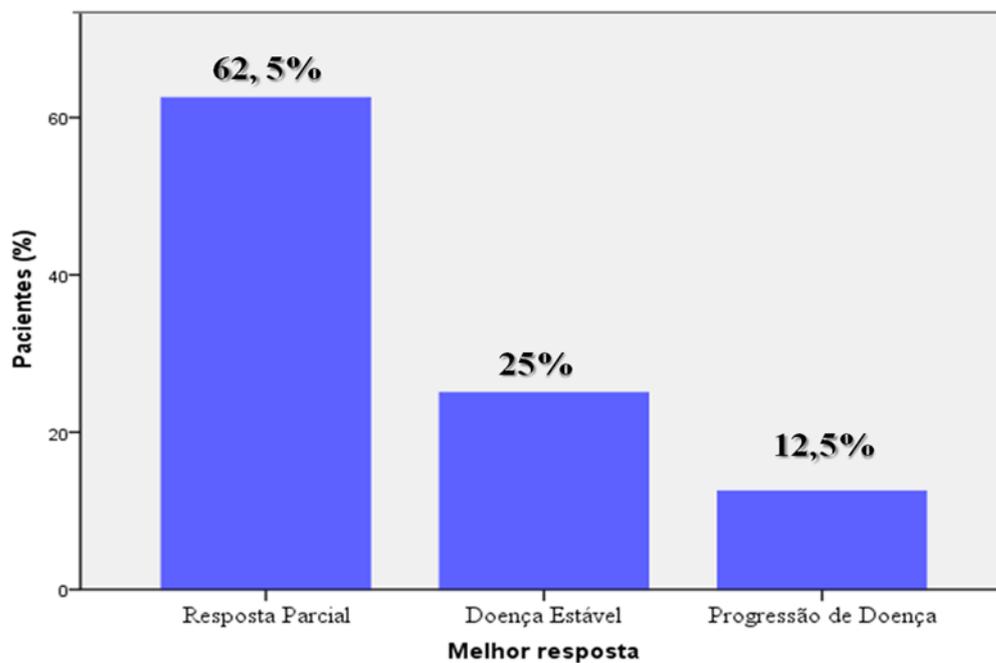
## 4.4 DESFECHOS CLÍNICOS

### 4.4.1 Resposta Objetiva

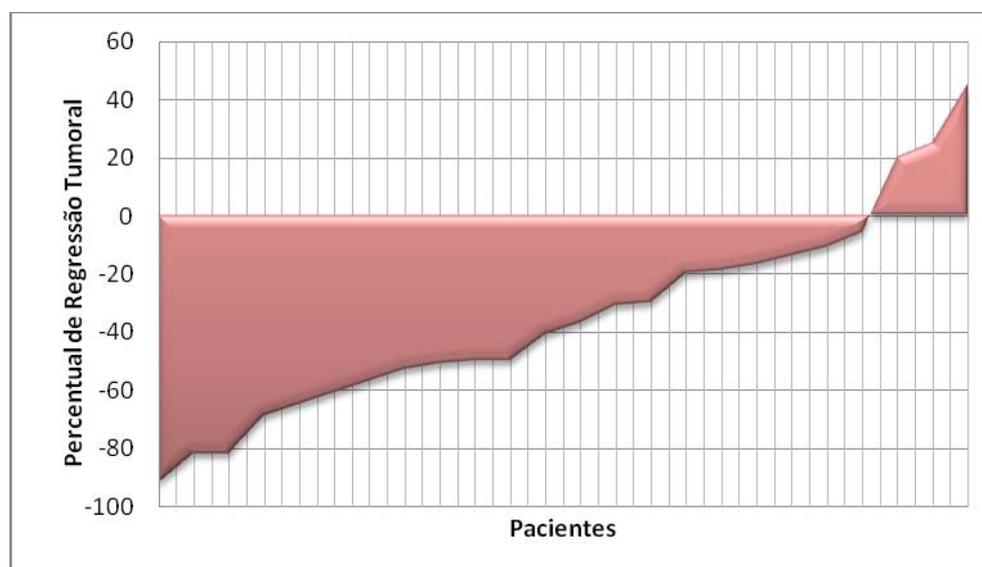
Os dados de avaliação de resposta se referem a 24 pacientes, conforme relatado previamente. Todos os casos de resposta parcial foram confirmados com nova avaliação radiológica 28 dias após sua detecção. Cada caso era classificado pela melhor resposta avaliada.

Não houve nenhum caso com resposta completa. Ocorreu resposta parcial (RP) em 62,5% dos casos, tendo os demais pacientes se apresentado com doença estável (DE) 25% e progressão de doença (PD) 12,5%. A mediana de regressão tumoral foi -37%. As Figuras 5 e 6 ilustram os dados acima mencionados.

Mesmo em alguns indivíduos com DE houve benefício clínico, principalmente no quadro de dor (80% dos pacientes com dor à admissão referiram melhora ou suspenderam uso de analgésicos), anorexia e empachamento pós-prandial. Apenas 03 respondedores permaneceram com sintomas associados a doença: melena, astenia e perda de peso, apesar de melhora de apetite. Para 3 pacientes foi reavaliada a indicação de gastrectomia curativa o que foi possível tecnicamente em 2 desses. Em outro paciente, a cirurgia não foi indicada pela presença de doença linfonodal para-aórtica à admissão. No entanto, a paciente apresentava-se com resposta completa nesse sítio após duas avaliações radiológicas, tendo sido submetida à quimiorradioterapia após 4 ciclos da QT do estudo. Ao momento da análise dos dados, as suas biópsias endoscópicas de controle encontravam-se negativas para neoplasia.



**Figura 5** – Distribuição dos pacientes conforme a melhor resposta apresentada à quimioterapia.



**Figura 6** - Distribuição dos pacientes conforme percentual de regressão tumoral.

A duração média de resposta (DR) do grupo foi de 4,6 meses, com mediana de 3,3 meses. Foram considerados de BOM status de DR os indivíduos com mediana de DR igual ou maior que 3,3m e de MAU status de DR aqueles com DR inferior a 3,3m.

Para as análises de possíveis correlações foram considerados como “respondedores” pacientes que apresentassem resposta parcial e, “não-respondedores” aqueles com doença estável ou progressão de doença. Foram analisadas possíveis associações entre várias das características clínico-patológicas dos pacientes, da doença, do tratamento e de imunohistoquímica com o status de resposta (conforme descrito anteriormente).

Somente a localização do primário demonstrou se associar com a resposta de forma significativa (Teste Exato de Fisher,  $p = 0,039$ ), tendendo os pacientes respondedores a se concentrarem mais dentre aqueles com tumores proximais (Tabela 7) do que com tumores distais ou *linite plastica*. Não houve diferenças no perfil de resposta entre os esquemas de QT (3 drogas x 2 drogas). Outros parâmetros clínicos como IMC, idade, número de sítios metastáticos, soma dos diâmetros das lesões-alvo e número de ciclos de QT, também não demonstraram correlacionar-se a melhor ou pior perfil de resposta objetiva, pelo modelo de correlação de Spearman e de Pearson.

Também não houve qualquer associação entre expressão imunohistoquímica de HER2, TOPO2A e ERCC1 e o perfil de resposta; conforme teste exato de Fisher,  $p = 1,0$ . A Figura 7 ilustra gráficos referentes à expressão desses marcadores entre respondedores e não-respondedores. Entre os indivíduos que receberam epirrubicina não houve influência da expressão da TOPO2A na resposta (DR em pacientes

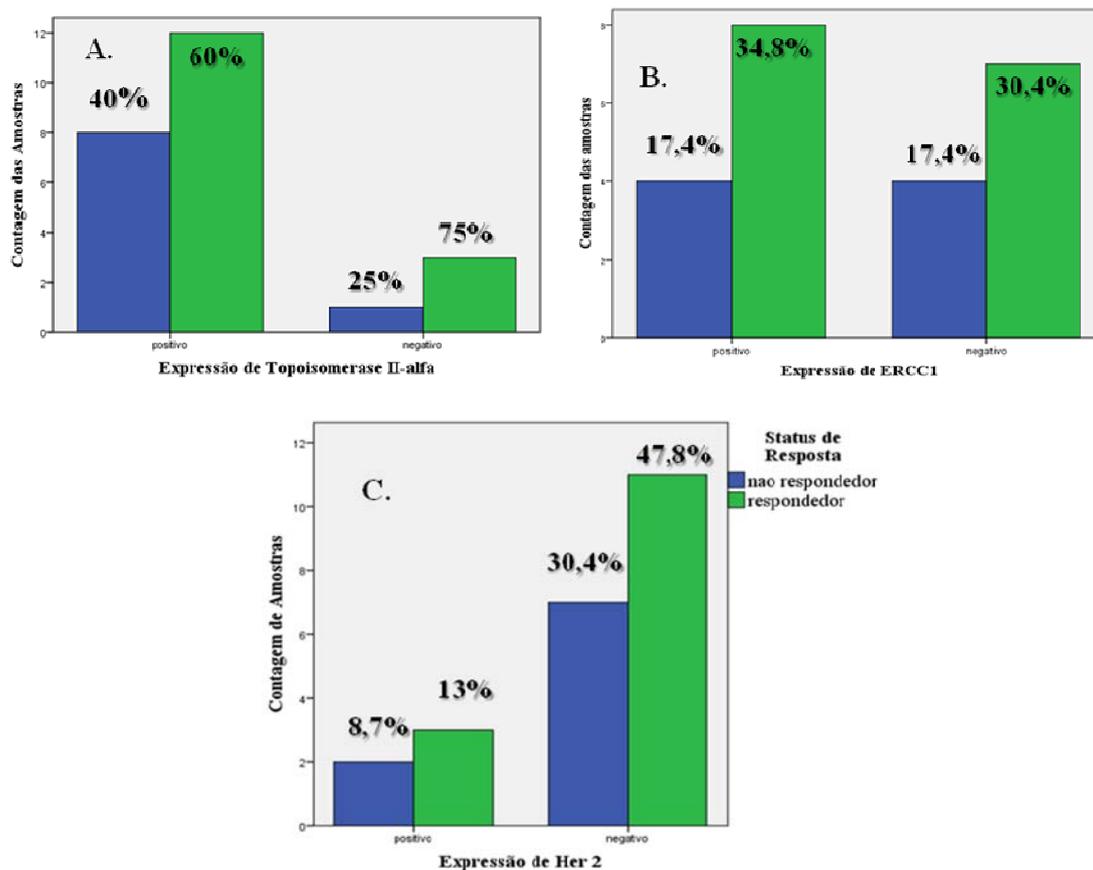
TOPO+ 3,0m e TOPO- 2,8m;  $p=0,548$ ), nem de HER2 (DR para HER2+ 2,8m e para HER2- 3,6m;  $p=0,645$ ).

A média de sobrevida global entre respondedores e não-respondedores não teve diferença estatisticamente significativa (16,2 x 11,3 meses;  $p = 0,09$ ; Teste Log Rank de Mantel-Cox), provavelmente pelo tempo de seguimento e pelo tamanho da amostra. A sobrevida livre de progressão diferiu entre esses grupos de forma significativa (10,5 x 3,7 meses;  $p < 0,002$ , teste Log Rank de Mantel-Cox).

**Tabela 7** - Associação entre a resposta com características clínicas e toxicidade à QT.

		STATUS DE RESPOSTA		Total	p
		Respondedor	Não-Respondedor		
<b>Sexo</b>	Masculino	9	8	17	0,191
	Feminino	6	1	7	
<b>Tipo</b>	Carcinoma	10	7	17	0,669
<b>Histológico</b>	Carcinoma	5	2	7	
<b>Tumor primário</b>	Proximal	6	0	6	0,039*
	Distal	7	9	16	
	Linite	2	0	2	
<b>Metástase hepática</b>	Não	6	3	9	1,0
	Sim	9	6	15	
<b>Meta linfonodal</b>	Não	1	2	3	0,533
	Sim	14	7	21	
<b>Meta peritoneal</b>	Não	9	4	13	0,657
	Sim	6	5	11	
<b>Meta partes moles</b>	Não	13	7	20	0,615
	Sim	2	2	4	
<b>Performance status<sup>b</sup></b>	1	9	2	11	0,105
	2	6	7	13	
<b>Gastrectomia Prévia</b>	Sim	2	1	3	1,0
	Não	13	8	21	
<b>Tipo de QT</b>	ECF	8	5	13	1,0
	ECX	3	1	4	
	CF	4	3	7	
<b>Anemia<sup>c</sup></b>	Graus 0-2	14	6	20	0,13
	Graus 3-4	1	3	4	
<b>Neutropenia<sup>c</sup></b>	Graus 0-2	9	4	13	0,469
	Graus 3-4	6	5	11	
<b>Náuseas<sup>c</sup></b>	Graus 0-2	15	8	23	0,375
	Graus 3-4	0	1	1	
<b>Vômitos<sup>c</sup></b>	Graus 0-2	13	9	22	0,511
	Graus 3-4	2	0	2	
<b>Ototoxicidade<sup>c</sup></b>	Graus 0-2	14	9	23	1,0
	Graus 3-4	1	0	1	
<b>Total</b>		<b>15</b>	<b>9</b>	<b>24</b>	

Análises pelo Teste Exato de Fisher; b – antes do início da QT; c – toxicidade à QT



**Figura 7** - Expressão imunoistoquímica de ERCC1, HER 2 e Topoisomerase II entre respondedores e não-respondedores. Associação entre o status de resposta (respondedores em verde e não-respondedores em azul) e o perfil de expressão imunoistoquímica de A. topoisomerase II, B. ERCC1 e C. HER 2. Não se estabeleceu uma associação, pelo teste Exato de Fisher,  $p = 1,0$  nas 3 análises.

Não foi possível estabelecer um modelo de análise multivariada para as correlações de status de resposta. Baseado nos achados de análise bivariada foi possível estabelecer correlação não significativa da DR com idade (coeficiente de Pearson de 0,301;  $p < 0,077$ ) e significativa com o número de ciclos de QT (coeficiente de Pearson 0,714;  $p < 0,0001$ ) e com o percentual de resposta (coeficiente de Pearson de -0,617;  $p < 0,001$ ). Também se verificou, pelo teste do Log-rank, uma correlação desse desfecho com ECOG (ECOG 1 com 9,0 m e ECOG 2 com 2,5 m;  $p < 0,013$ ), com tipo histológico (intestinal com DR de 7,5 e difuso com 2,0;  $p < 0,011$ )

e com a ocorrência de anemia (DR de 6,6 para os graus 0-2 e de 1,6m para os graus 3-4;  $p < 0,033$ ) (Figuras 8, 9 e 10). Tiveram correlação marginal ( $p < 0,2$ ) ototoxicidade, metástases hepáticas, metástases peritoneais e número de sítios de metástases. Todas essas variáveis foram utilizadas no modelo de análise multivariada, utilizando o modelo de Regressão de Cox.

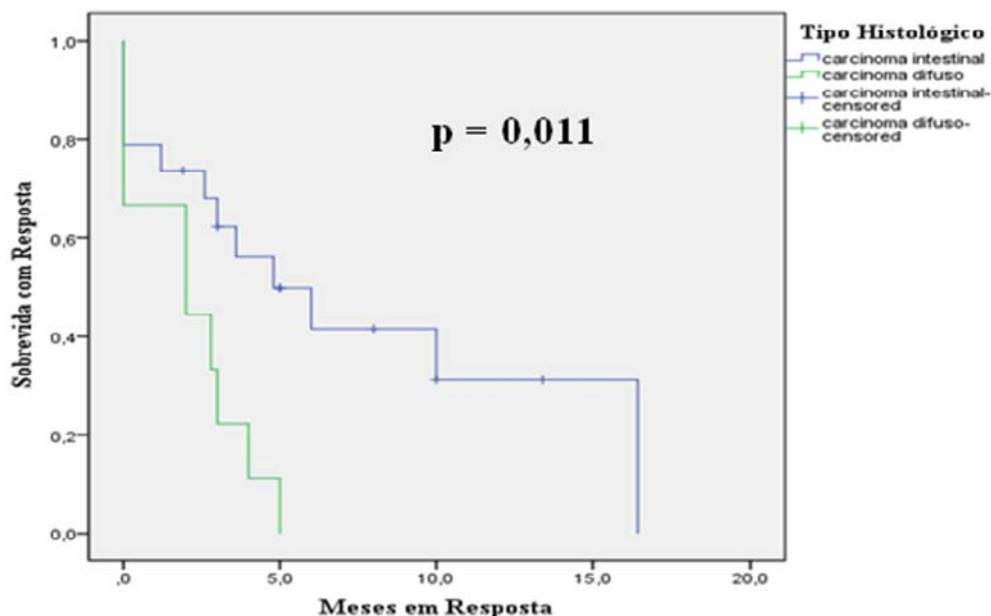
No modelo de regressão, quando foram inseridas apenas as variáveis relativas às características basais dos pacientes, apenas o ECOG se mostrou preditiva de DR, de tal forma que indivíduos com ECOG 2 apresentaram uma HR de 5,2 para menor duração de resposta ( $p < 0,015$ ) do que indivíduos ECOG 1. Ao se agrupar as características basais e relativas ao tratamento, verificaram-se como preditoras de melhor DR: indivíduos com menor número de sítios de metástases, que realizaram mais ciclos de QT e obtiveram uma maior regressão tumoral, conforme se pode verificar na Tabela 8.

**Tabela 8** – Análise multivariada das características basais e de tratamento para DR\*

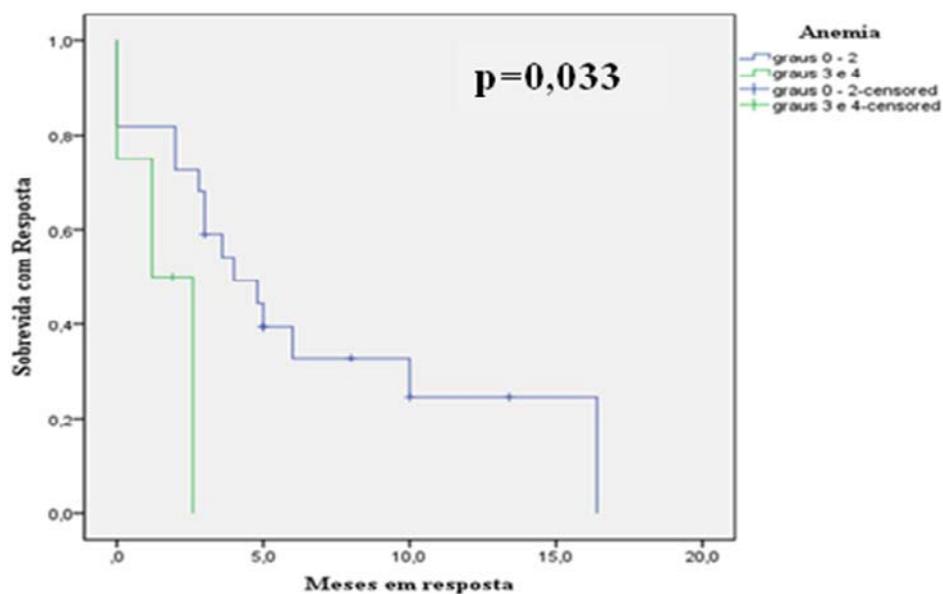
Variáveis	p	HR <sup>b</sup>	IC 95,0%	
			Superior	Inferior
No. sítios meta	0,046	2,410	1,017	5,710
No. ciclos QT	0,001	0,412	0,239	0,711
Tamanho da resposta <sup>a</sup>	0,003	1,063	1,021	1,106

<sup>a</sup>Valor de resposta expresso em %, tendo valores negativos aqueles com regressão tumoral e positivos os com crescimento tumoral. <sup>b</sup> Hazard ratio (razão dos riscos).

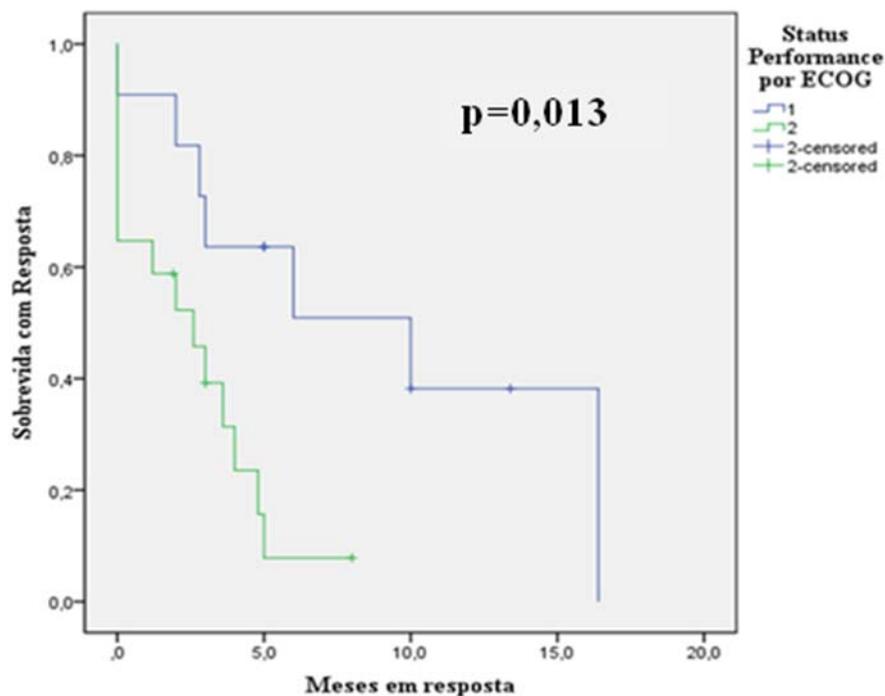
\*Regressão de Cox, sendo DR a variável dependente; considerado significante um valor de  $p < 0,05$ .



**Figura 8** – Curva de Duração de Resposta conforme Tipo Histológico. Mediana de DR para tumores difusos de 2,0m e para tumores intestinais 4,8m. Teste Log-rank de Mantel Cox, significante um valor de  $p < 0,05$ .



**Figura 9** - Curva de Kaplan Meier para Duração de Resposta conforme Ocorrência de Toxicidade - Anemia. Mediana de DR para pacientes com anemia grau 0-2 de 4,0m e para grau 3-4 de 1,2m. Teste Log-rank de Mantel Cox, significante um valor de  $p < 0,05$ .

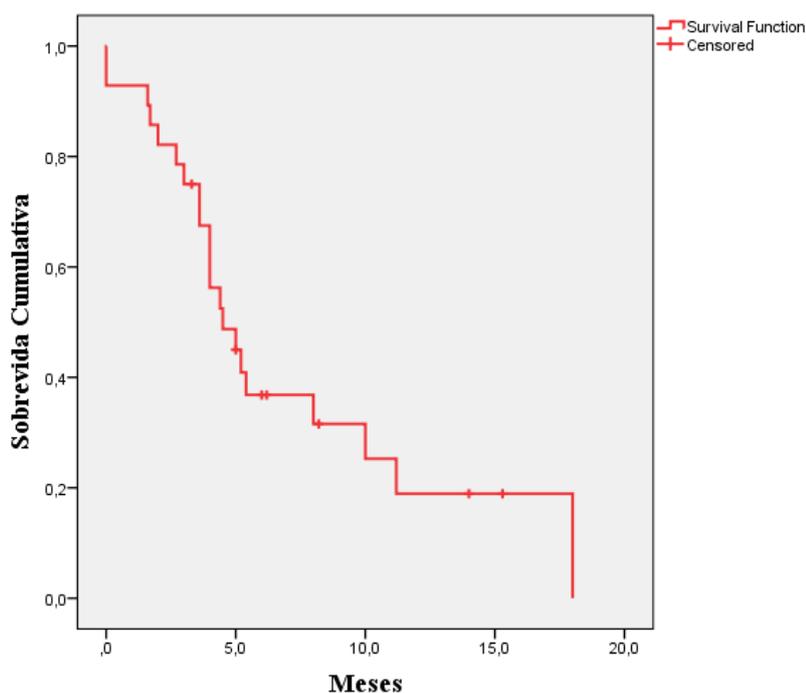


**Figura 10** – Curva de Kaplan Meier para Duração de Resposta conforme PS. Mediana de DR para pacientes com ECOG 1 de 10,0m e com ECOG 2 2,6m. Teste Log-rank de Mantel Cox, significativo um valor de  $p < 0,05$ .

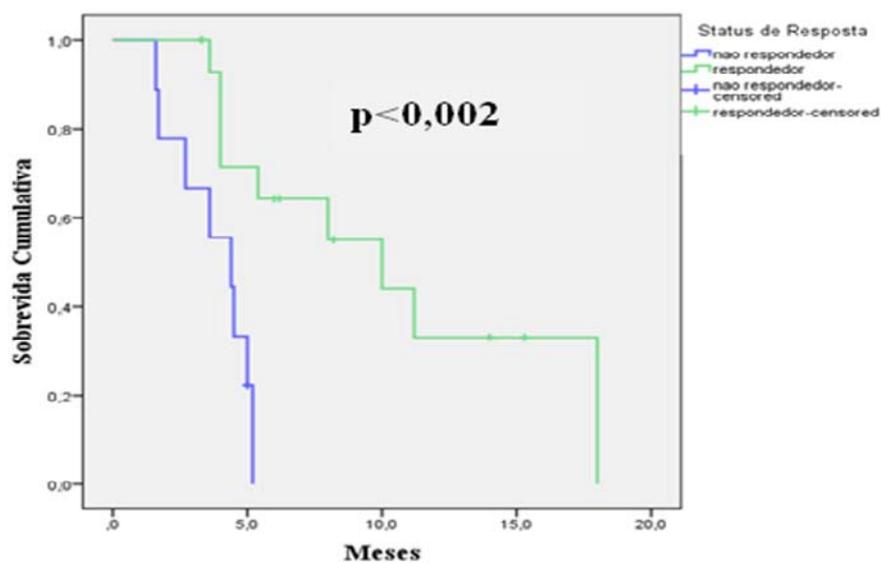
#### 4.4.2 Sobrevida livre de progressão (SLP)

Até Dezembro de 2011 havia 21 eventos relatados entre os 28 pacientes incluídos. A sobrevida livre de progressão do grupo foi de 25%, com mediana foi de 4,5 meses (95%CI 2,8 – 6,17m). No gráfico da Figura 11 se encontra a curva de SLP para os 28 pacientes.

Pode-se verificar na Figura 12, que dentre os 24 pacientes com avaliação de resposta (SLP mediana nesse grupo era 5,2 m; CI 95% 3,8 – 6,5), a SLP mediana foi de 10 m para os respondedores (95% CI 4,7 – 15,2) e de 4,4 meses para não-respondedores (95% CI 2,0 – 6,7). Houve diferença significativa do ponto de vista estatístico, com  $p < 0,002$  (LogRank - Mantel-Cox).



**Figura 11** - Curva de sobrevida livre de progressão. Curva de Sobrevida de Kaplan Meier para 28 pacientes incluídos no estudo. Sobrevida livre de progressão de 25%, em seguimento mediano de 7,2 meses (0,4 – 19 m).



**Figura 12** - Gráfico de sobrevida livre de progressão de respondedores e não-respondedores à QT. Curva de Kaplan Meier para “respondedores” e “não respondedores”; referente a 24 pacientes aptos para avaliação de resposta por RECIST. SLP de respondedores foi de 40% e de não respondedores foi de 11%,  $p < 0,002$  (Log-Rank de Mantel-Cox).

Na análise bivariada, utilizando-se as características basais dos pacientes, apenas o *Status Performance* (PS) pelo ECOG (SLP 36% para ECOG 1 contra 17% para ECOG 2;  $p < 0,01$ ), número de sítios metastáticos (coeficiente de Pearson  $r = -0,383$ ,  $p < 0,044$ ) e tipo histológico (SLP 36% para intestinal e 0% para o difuso,  $p < 0,023$ ), afetaram de forma significativa a SLP. Já dentre as variáveis relacionadas ao tratamento, a ocorrência de toxicidade auditiva (SLP 23,8% e 40% para grau 0 e 1-2, respectivamente;  $p < 0,041$ ), melhor resposta (SLP 40%, 16% e 0% para RP, DE e PD, respectivamente;  $p < 0,0001$ ), o número de ciclos de quimioterapia (coeficiente de Pearson  $r = 0,762$ ,  $p < 0,0001$ ) e o percentual de resposta (coeficiente de Spearman  $r = -0,549$ ,  $p < 0,006$ ) se correlacionaram com a sobrevida livre de doença, conforme se verifica na Tabela 9. Ao se agrupar a toxicidade auditiva quanto a sua ocorrência ou não, verificou-se que os pacientes com grau 0 apresentavam média de SLP de 5,6m, enquanto os indivíduos com graus 1 e 2 apresentaram média de 13,1m, sem atingir mediana de SLP ( $p < 0,041$ ). Nas Figuras 13 a 15 pode-se avaliar a diferença nas curvas de sobrevida livre de doença, conforme ECOG, tipo histológico e toxicidade auditiva.

**Tabela 9** - Associação entre as características clínicas e sobrevida livre de doença

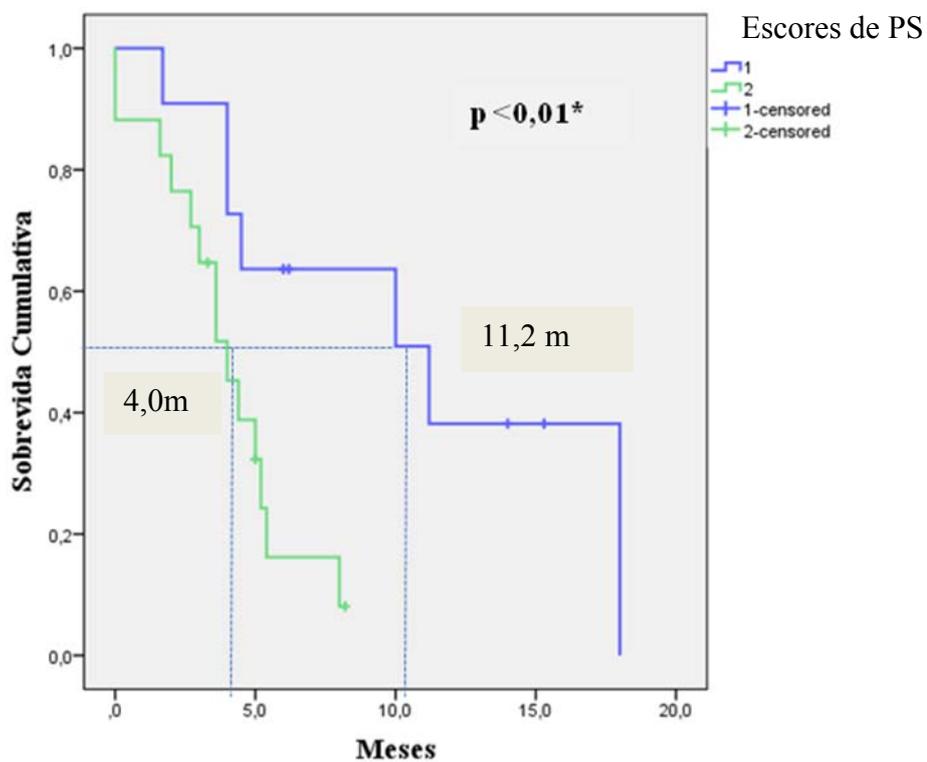
<b>Sobrevida Livre de Progressão</b>				
<b>Variável</b>	<b>Categorias</b>	<b>Média</b>	<b>95% CI</b>	<b>p</b>
Sexo	Masculino	6,5	4,1 – 8,8	0,6
	Feminino	8,5	2,3 - 11,9	
Localização primário	Proximal	6,4	2,9 – 9,9	0,63
	Distal	7,8	4,3 - 10,7	
Tipo histológico	Carcinoma intestinal	9,1	5,7 - 12,4	0,023*
	Carcinoma difuso	3,8	2,3 - 5,3	
Presença do primário	Sim	6,8	4,3 – 9,4	0,5
	Não	8,5	3,7 - 13,3	
Performance status	1	10,8	6,6 -15,0	0,01*
	2	4,0	2,8 - 5,2	
Meta hepática	Sim	5,8	3,5 - 8,1	0,147
	Não	9,2	5,4 - 13,0	
Meta peritoneal	Sim	5,0	2,9 – 7,2	0,191
	Não	8,9	4,9 - 12,8	
Meta partes moles	Sim	6,5	2,2 – 10,7	0,921
	Não	7,0	4,4 – 9,6	
Meta linfonodal	Sim	7,6	4,8 - 10,5	0,46
	Não	5,4	1,5 – 9,3	
Tipo de QT	ECF	6,7	3,0 - 10,3	0,2
	ECX	11,6	7,5 - 15,6	
	CF	6,7	4,3 - 9,1	
Anemia	0-2	8,2	5,4 – 10,9	0,081
	3-4	3,6	2,8 - 4,5	
Neutropenia	0-2	6,4	4,1 - 8,7	0,618
	3-4	8,8	4,5 - 13,2	
Toxicidade Auditiva	0	5,6	4,0 - 7,2	0,028*
	1	18,0	18,0	
	2	5,8	1,4 – 10,1	
Vômitos	0-2	7,4	4,8 - 10,1	0,476
	3-4	8,0	8,0	
Melhor Resposta	Resposta parcial	10,5	7,0 - 13,9	0,0001*
	Doença estável	4,5	3,7 - 5,2	
	Progressão de doença	2,3	1,0 – 3,5	

Teste de Log-Rank de Mantel-Cox. \* Considerado  $p < 0,05$  como significante

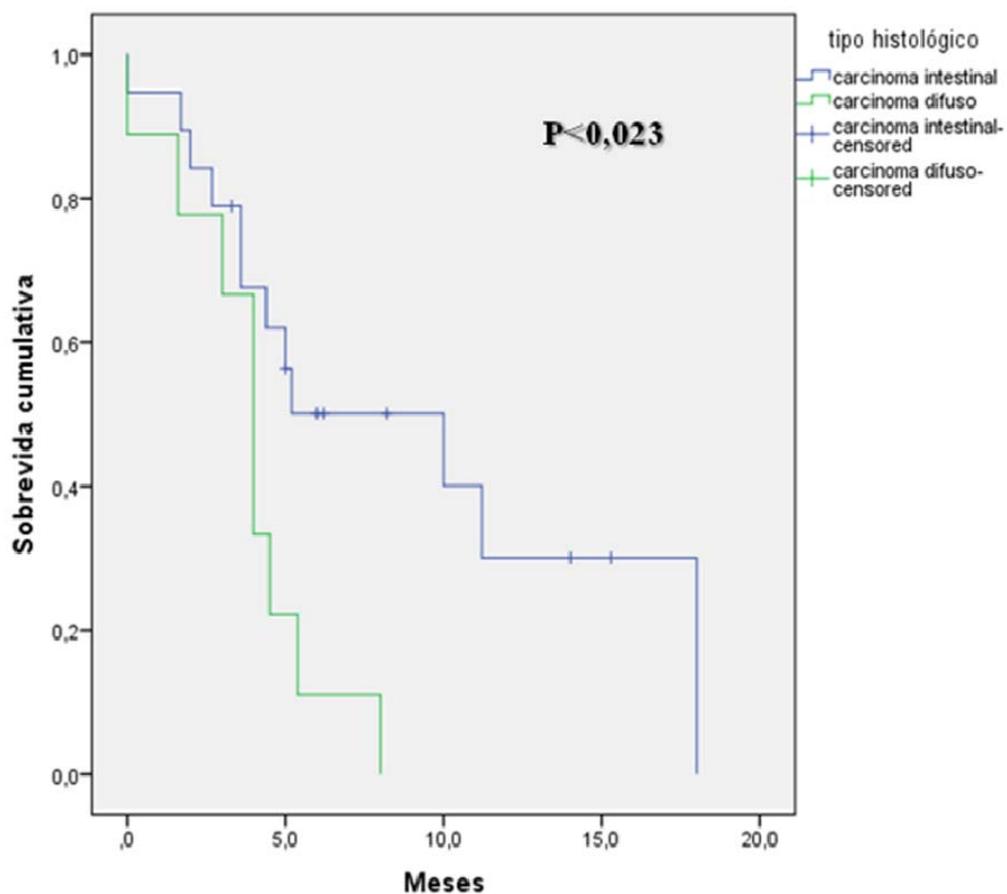
Quanto aos marcadores imunoistoquímicos, não se encontrou nenhuma relação entre a expressão de HER2 (8,8 m para positivos e 6,6m para negativos,  $p = 0,85$ ), TOPO2A (6,5m para positivos e 9,5 m para negativos,  $p = 0,475$ ) ou ERCC1 (7,1 m para positivos e 7,4m para negativos,  $p = 0,5$ ) com SLP, pelo teste log-rank de Mantel-Cox. Quando se analisou a SLP somente dos pacientes expostos a antraciclina, não se verificou qualquer interferência da expressão de TOPO2A

(mediana para positivos 4,0m e para negativos 4,5m;  $p=0,382$ ), nem da expressão de HER2 (4,0 x4,5m;  $p=0,738$ ).

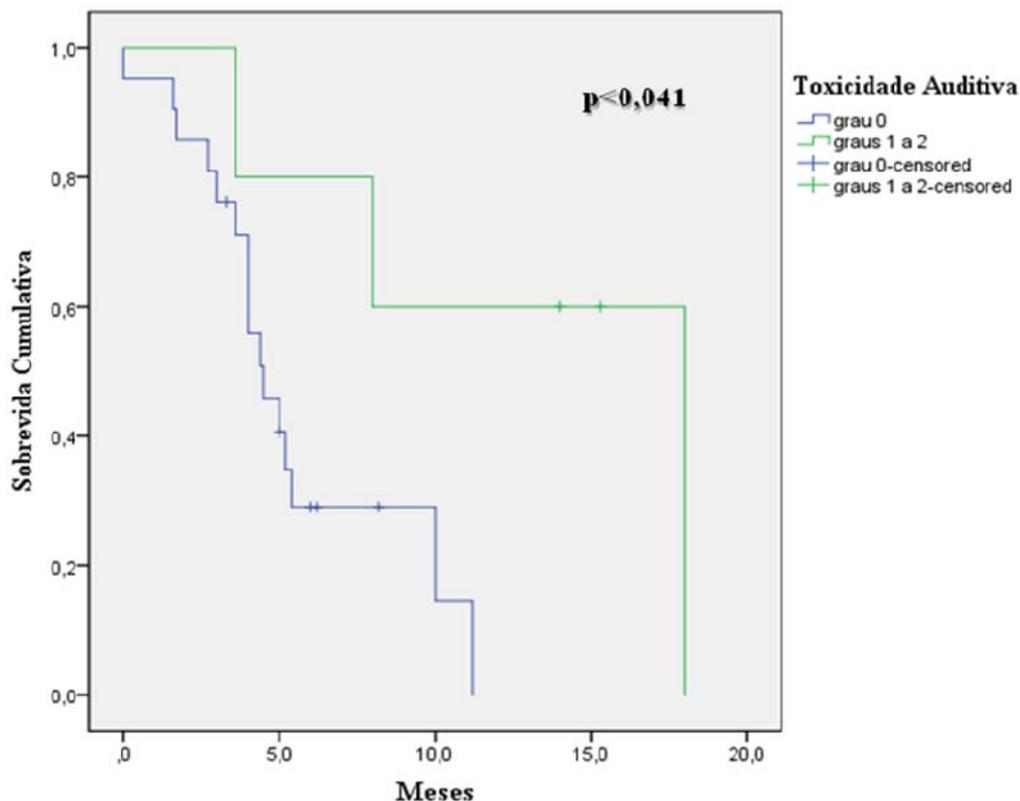
Ao se analisar somente as variáveis com valor de  $p \leq 0,1$  na análise bivariada, pela regressão de Cox, dentre as características basais, apenas o ECOG foi preditor independente de SLP, tendo pacientes com maior escore de ECOG uma pior SLP (HR 3,9 para ECOG 2;  $p < 0,017$ ). Ao se agrupar as demais variáveis relativas ao tratamento (número de ciclos de QT, percentual de resposta, status de resposta, anemia pós-QT e ototoxicidade), obteve-se, pela regressão de Cox, que a presença de meta hepática, um menor número de ciclos de QT e alteração percentual na soma das lesões-alvo tendendo para DE ou PD configuram um pior prognóstico em termos de SLP, conforme se pode verificar na Tabela 10.



**Figura 13** - Curvas de Kaplan Meier para Sobrevida Livre de Progressão Conforme Performance Status por ECOG 1 e 2. Curva de Kaplan Meier para SLP conforme ECOG. Estão destacadas as medianas de SLP. Teste log-rank de Mantel-Cox. Foi considerado como significativo um valor de  $p < 0,05^*$ .



**Figura 14** - Curva de Sobrevida Livre de Doença conforme o Tipo Histológico do Tumor. Curva de Kaplan Meier para SLP entre pacientes com tumores do tipo Intestinal (mediana 10,0meses) e do Tipo Difuso (mediana 4,0 meses). Teste Log-rank de Mantel-Cox. Considerado significativo um valor de  $p < 0,05$ .



**Figura 15** - Curva de Sobrevida Livre de Doença de acordo com o Padrão de Toxicidade Auditiva. Curvas de Kaplan Meier para SLP em pacientes sem ototoxicidade e pacientes com ototoxicidade. Teste Log-rank de Mantel-Cox; considerado significativo um valor de  $p < 0,05$ .

**Tabela 10** – Análise multivariada para SLP.

Variáveis	p	HR	IC 95,0% HR	
			Inferior	Superior
Presença de meta hepática	0,008	6,801	1,643	28,153
No. ciclos de QT	0,001	0,407	0,241	0,686
Valor de resposta	0,001	1,043	1,017	1,070

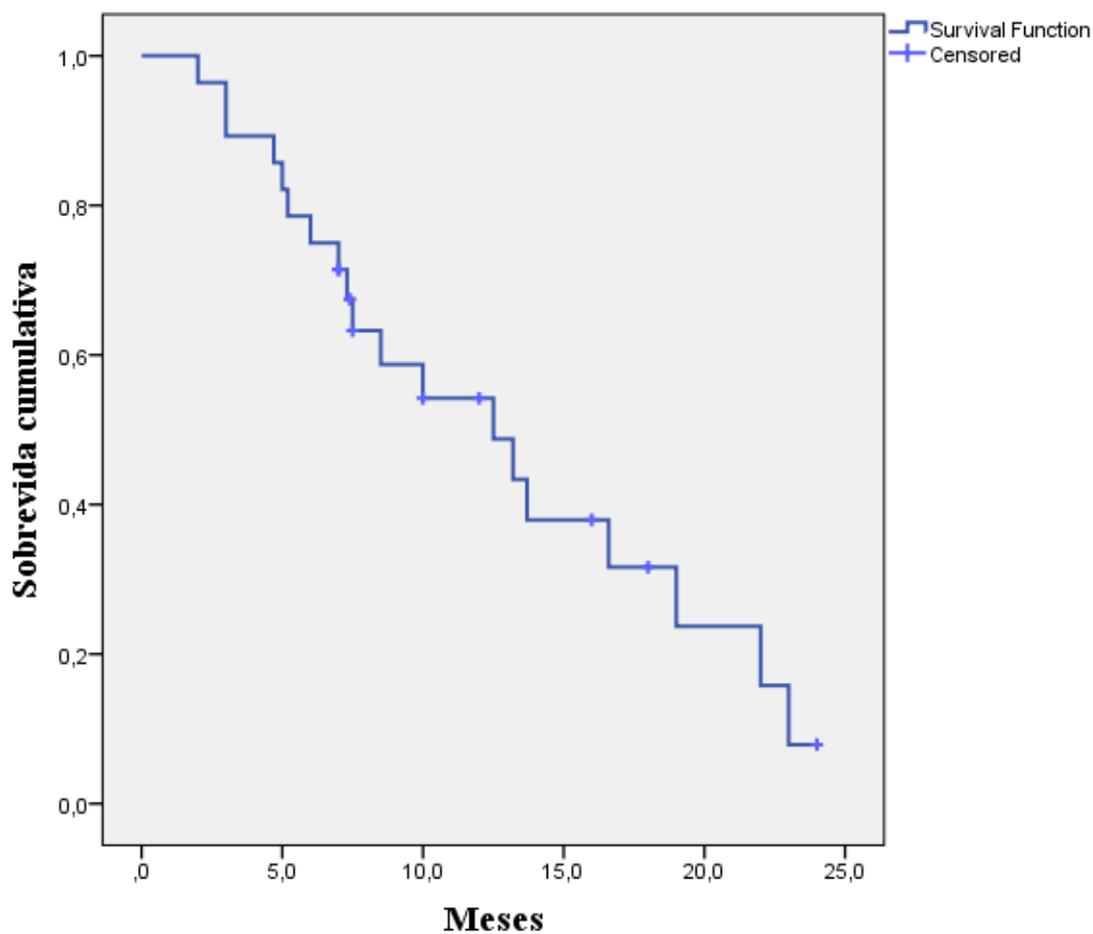
#### 4.4.3 Sobrevida Global

Até Dezembro de 2011 (seguimento mediano de 7,6 meses), ocorreram 17 mortes (SG), determinando uma mediana de sobrevida para o grupo de 28 pacientes de 12,5 meses (CI 95% 6,3 – 18,6). A Figura 16 ilustra o descrito acima.

Não houve interferência do status de resposta sobre a SG, sendo a mesma, nos 24 pacientes que tiveram essa avaliação realizada, de 37,5% (total de 15 eventos). A sobrevida em respondedores foi 46,7% e a de não-respondedores foi de 22,2%. Como se pode observar através da Figura 17, há diferença entre as curvas em favor dos respondedores, no entanto, essa não foi significativa do ponto de vista estatístico.

Na análise bivariada, avaliada pelo teste de log-rank, as características clínico-patológicas basais que se relacionaram com a SG foram tipo histológico (ver Figura 19), de tal forma que o tipo intestinal determina uma melhor sobrevida (média de 14,7m x 8,8m;  $p=0,042$ ), PS (média de 18,2 meses para ECOG 1 e 8,6 meses para ECOG 2;  $p<0,005$ ) conforme se pode verificar nas tabelas 11 e 12 e na Figura 18. Apesar do status de resposta não ter se correlacionado de forma significativa com a SG, a DR (coeficiente de Pearson 0,689;  $p<0,0001$ ) e, portanto, o status de duração resposta (mediana de DR> ou <3,3m) demonstraram correlação (Figura 20). Conforme se verifica na Figura 21, outro fator que se apresentou como fator prognóstico foi a toxicidade auditiva, sendo a mesma favorável quando em grau 1 e 2 (mediana para grau 0 de 10m e para graus 1 e 2 de 23m;  $p=0,033$ ). Dentre as variáveis idade ( $p=0,92$ ), perda de peso ao diagnóstico ( $p=0,72$ ), peso inicial ( $p=0,48$ ), número de sítios metastáticos ( $p=0,118$ ), número de ciclos de QT, percentual de resposta objetiva ( $p=0,16$ ), duração de resposta (DR) e IMC ( $p=0,31$ ), apenas o número de ciclos de QT (coeficiente de Pearson  $r=0,758$ ;  $p<0,0001$ ) e a DR

(coeficiente de Pearson  $r=0,673$ ;  $p<0,0001$ ) se correlacionaram com uma melhor sobrevida.



**Figura 16** - Curva de sobrevida global. Curva de Kaplan Meier de Sobrevida Global para o grupo de 28 pacientes incluídos no estudo. A sobrevida foi estimada em 39,1%, com mediana de 12,5 meses.

**Tabela 11** - Fatores clínico-patológicos de prognóstico.

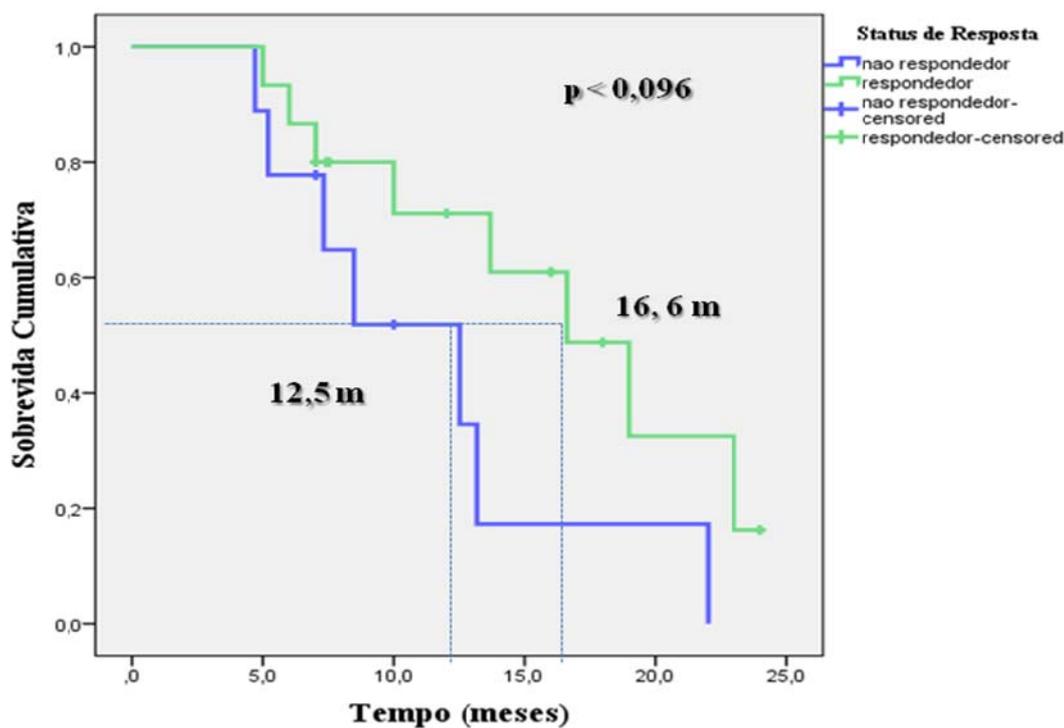
Variável	Categorias	Sobrevida Global (meses)		
		Média	95% CI	p
Sexo	Masculino	12,2	8,9 - 15,6	0,809
	Feminino	13,7	7,1 - 20,2	
Localização primário	Proximal	12,7	6,7 - 18,7	0,98
	Linite	12,8	9,3 - 16,3	
	Distal	10,5	2,8 - 18,1	
Tipo histológico	Carcinoma intestinal	14,7	11,0 - 18,4	0,042*
	Carcinoma difuso	8,8	5,2 - 12,4	
Presença do primário	Sim	12,2	9,0 - 15,4	0,25
	Não	17,7	12,3 - 23,0	
<i>Status Performance</i>	1	18,3	14,3 - 22,1	0,005*
	2	9,6	6,4 - 12,8	
Meta hepática	Sim	11,9	8,2 - 15,5	0,28
	Não	14,5	9,2 - 19,8	
Meta peritoneal	Sim	9,8	6,6 - 13,0	0,092
	Não	16,8	12,5 - 21,0	
Meta partes moles	Sim	14,9	9,6 - 20,1	0,47
	Não	12,6	9,2 - 15,9	
Meta linfonodal	Sim	13,0	9,7 - 16,3	0,68
	Não	12,5	4,5 - 20,5	
Tipo de QT	ECF	12,6	8,1 - 17,1	0,27
	ECX	18,6	11,1 - 26,0	
	CF	12,9	7,8 - 18,1	
Anemia	0-2	14,4	11,1 - 17,6	0,14
	3-4	9,2	5,1 - 13,3	
Neutropenia	0-2	12,1	8,7 - 15,7	0,58
	3-4	15,3	10,2 - 20,3	
Auditiva	0	11,7	8,6 - 14,9	0,033*
	1-2	19,9	15,8 - 23,9	
QT de segunda linha	Sim	18,0	14,6 - 21,3	0,41
	Não	12,5	8,9 - 16,2	
Melhor Resposta	Resposta parcial	16,2	12,5 - 19,9	0,2
	Doença estável	12,2	6,0 - 18,2	
	Progressão de doença	10,0	4,5 - 15,5	
Status de DR	Mau (DR<3,3m)	11,7	7,9 - 15,5	0,025*
	Bom (DR>3,3m)	18,3	14,5 - 22,1	

\*Teste do Log-rank de Mantel-Cox. Nível de significância  $p < 0,05$ .

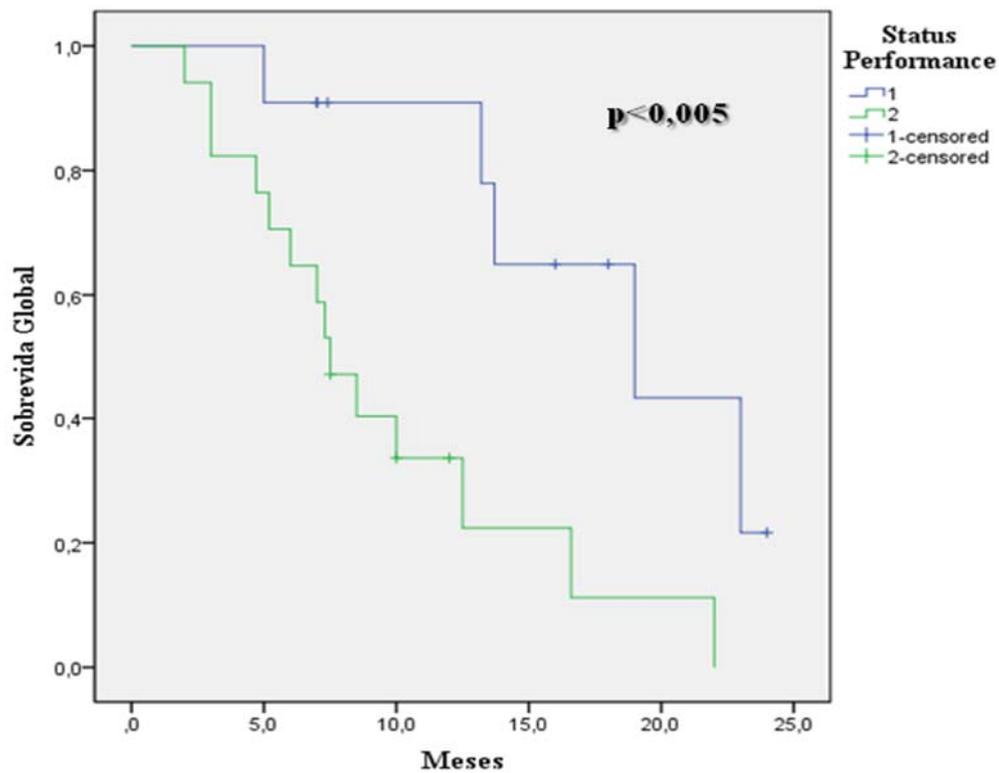
**Tabela 12** - Distribuição da sobrevida global conforme expressão imunistoquímica.

Marcador	Expressão	Média (meses)	95% IC	p
HER 2	Positivo	12,1	3,2 – 21,1	0,6
	Negativo	12,7	9,6 - 15,8	
TOPO2A	Positivo	12,2	9,2 -15,2	0,39
	Negativo	13,6	5,9 - 21,3	
ERCC 1	Positivo	13,7	9,2 – 18,2	0,57
	Negativo	12,1	8,4 – 15,5	

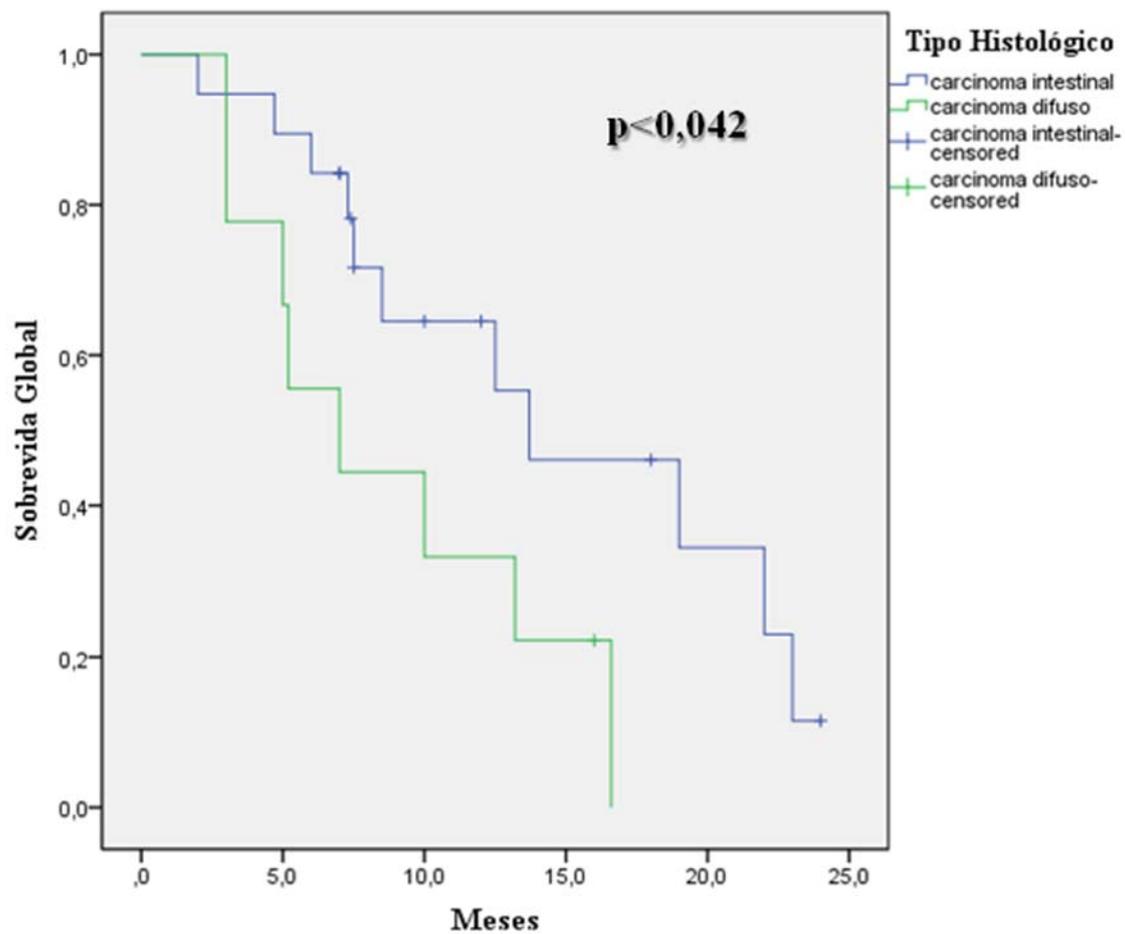
Teste Log-rank de Mantel-Cox. Considerado significativo um valor de  $p < 0,05$ .

**Figura 17** - Curvas de sobrevida global de respondedores e não-respondedores.

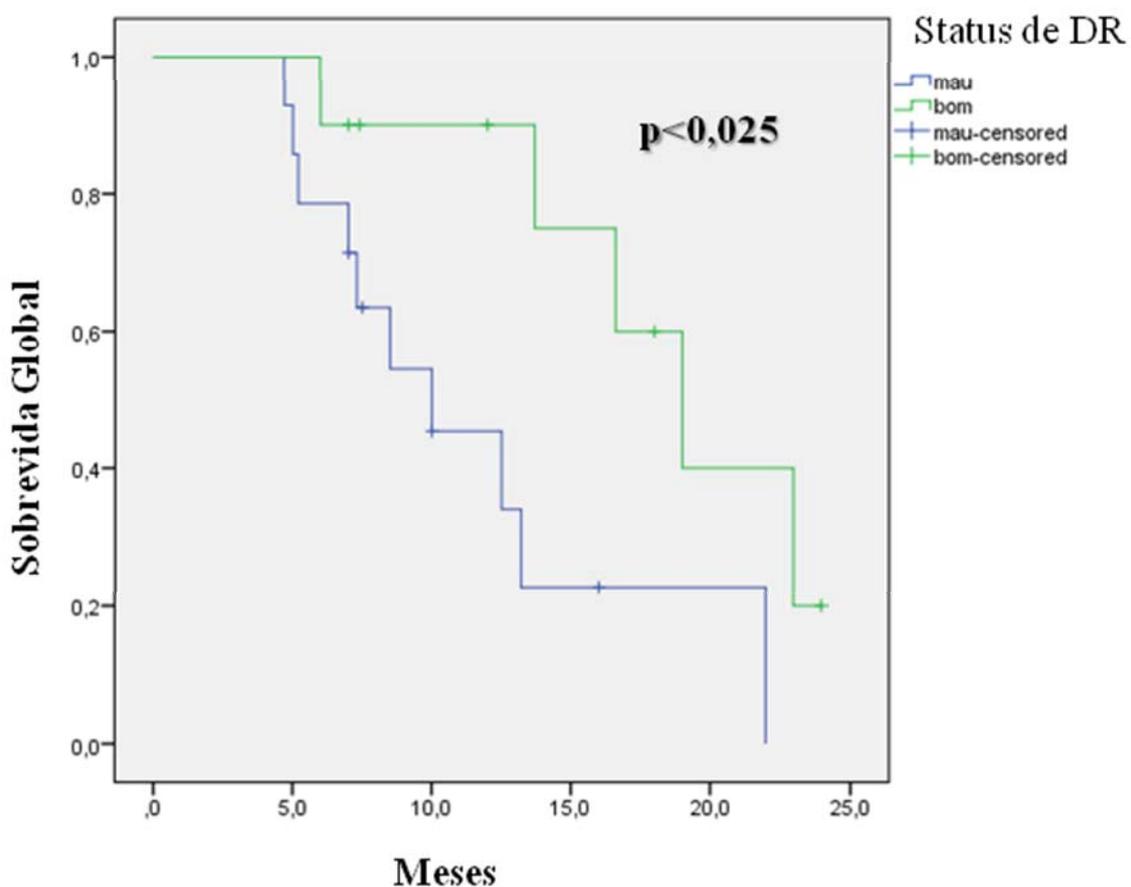
Curvas de Kaplan Meier para SG. Mediana para respondedores de 16,6 m e para não respondedores de 12,5m. Teste Log-rank de Mantel-Cox; significativo se valor de  $p < 0,05$ .



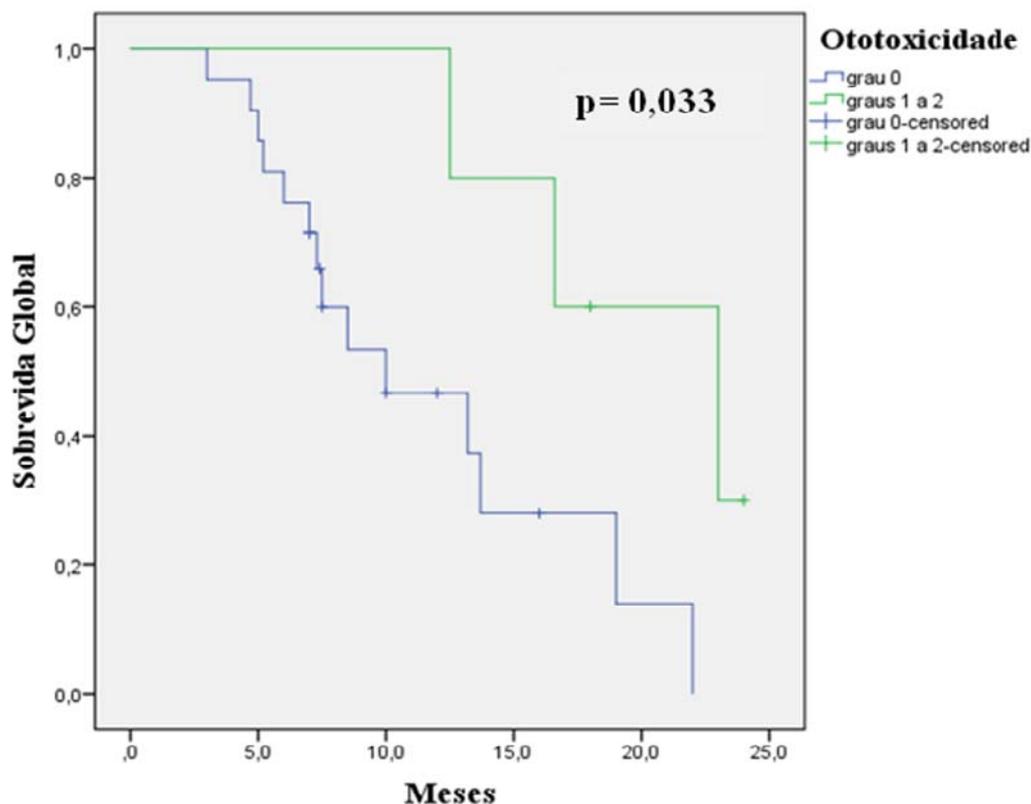
**Figura 18** - Curva de Kaplan Meier para Sobrevida Global conforme Performance Status. Mediana de SG para ECOG 1 de 19,0 meses e para ECOG 2 de 7,5meses. Teste Log-rank de Mantel-Cox, considerado significativo valor de  $p < 0,05$ .



**Figura 19** - Curva de Kaplan Meier para Sobrevida Global conforme a Histologia Tumoral. Mediana de SG para o tipo Intestinal 13,7m e para o Difuso 7,0m. Teste log-rank de Mantel-Cox, considerado significante valor de  $p < 0,05$ .



**Figura 20** - Curva de Kaplan Meier para Sobrevida Global conforme status de DR. Mediana de SG para indivíduos com DR <3,3m foi de 10m e para aqueles com DR >3,3m foi de 19,0m. Teste Log-rank de Mantel-Cox, considerado significante valor de  $p < 0,05$ .



**Figura 21** - Curva de Kaplan Meier para Sobrevida Global conforme Ototoxicidade à QT. Mediana de SG para indivíduos sem toxicidade de 10m e para aqueles com toxicidade grau 1 e 2 de 23m. Teste log-rank de Mantel-Cox, considerado significativo valor de  $p < 0,05$ .

Conforme programado, as variáveis com valor de  $p \leq 0,1$  na análise bivariada foram analisadas agrupadas, pela regressão de Cox. Ao se selecionar apenas as basais (tipo histológico, ECOG, metástases hepáticas, meta peritoneal e número de sítios metastáticos) apenas o ECOG (HR 6,08; IC95% 1,4 – 24,7);  $p < 0,012$ ) e o número de sítios metastáticos (HR 2,3; IC95% 0,9 – 5,4;  $p < 0,054$ ) se correlacionaram com a SG. Dessa forma, indivíduos com ECOG 2 e mais de 1 sítio de doença metastática tiveram pior sobrevida). Associando-se as demais variáveis relativas ao tratamento (toxicidades – anemia e ototoxicidade, número de ciclos de QT, percentual de resposta, status de DR e status de resposta) demonstraram correlação com a SG o

número de ciclos de QT (HR 0,51; IC95% 0,33 – 0,83;  $p < 0,004$ ) e presença de metástase hepática (HR 4,4; IC95% 1,0 – 19,1;  $p < 0,043$ ). Realizando-se análise multivariada, utilizando-se todas as características (independente da análise bivariada), realizada através do modelo de regressão de Cox, quatro características foram identificadas como preditoras de SG: expressão de HER2, tipo histológico, anemia pós-tratamento e ototoxicidade, conforme a Tabela 13.

**Tabela 13** - Análise multivariada para SG.

Variáveis	HR	95,0% CI		p
		Inferior	Superior	
<b>Tipo Histológico</b>	13,0	2,020	84,008	0,007
<b>Difuso</b>				
<b>Toxicidade – Anemia</b>	19,1	1,687	217,422	0,017
<b>Graus 3/4</b>				
<b>Ototoxicidade</b>	0,029	0,002	0,385	0,007
<b>Graus 1/2</b>				
<b>Expressão de HER2</b>	0,094	0,012	0,716	0,022
<b>Negativo</b>				

#### 4.5 EXPRESSÃO GÊNICA

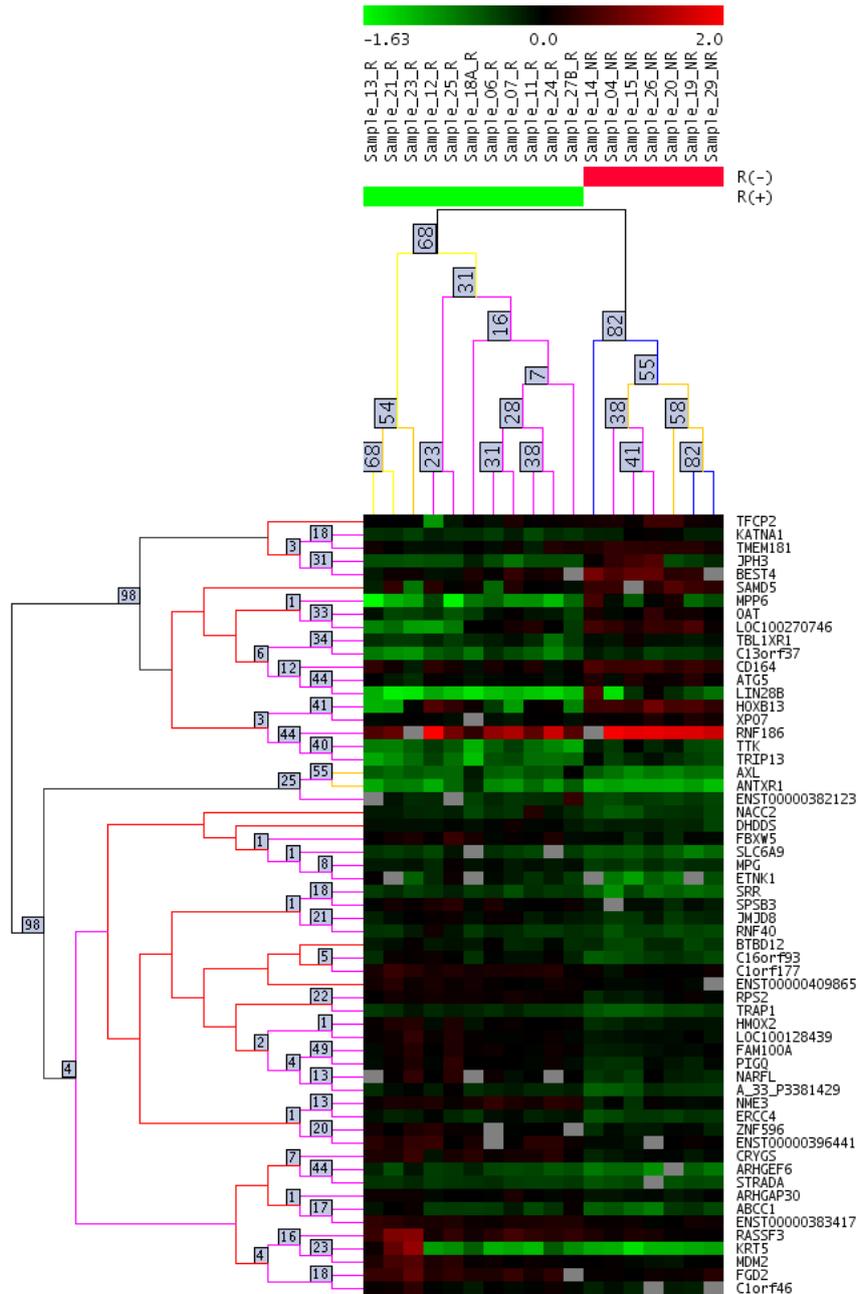
Das 28 amostras tumorais coletadas, somente 21 continham adequado percentual tumoral (mais de 70% de células tumorais), e tinham RNA extraído com boa qualidade para as hibridizações. Apenas 18 dos pacientes doadores dessas amostras estavam aptos para avaliação de resposta. Assim todas as correlações clínico-moleculares foram realizadas com essas 18 amostras.

#### 4.5.1 Correlação Resposta e Expressão Gênica

Dentre os pacientes doadores das amostras hibridizadas, 7 (38,9%) eram não-respondedores e 11 (61,1%) eram respondedores. A partir das 60.000 sequências gênicas contidas no microarray, foram identificados 59 genes diferencialmente expressos entre respondedores (R+) e não respondedores (R-), conforme evidenciado na Figura 22. Após seleção apenas dos genes com  $fold \geq |2|$ , foram discriminados 23 genes mais significativamente expressos no grupo analisado. No Quadro 5 encontram-se discriminados os 23 genes com  $fold \geq |2|$ .

Utilizando o software FUNNET, a lista de genes foi comparada ao GO *Biological Process*. Assim foi possível identificar a que processos biológicos os genes diferencialmente expressos estão relacionados. Dessa forma, encontramos que os genes identificados estão potencialmente envolvidos em: resposta a drogas, expressão gênica (processamento e inibição de RNA, expressão de fatores de transcrição), metabolismo de serina, condução neuromuscular, desenvolvimento epitelial, morfogênese tecidual, adesão celular e metabolização de serina (GO Biological Process, ver Figura 23).

Destacam-se então na lista genes cuja expressão se correlaciona com funções biológicas relevantes genes como: *LIN29B* (inibidor de miRNA), *HOXB3* (família de reguladores transcricionais da família homeobox), *SRR* (metabolismo de serina), *ANTRAXR1/TEM8* (receptor integrina-like de endotélio), *TRIP13* (co-regulador de receptores nucleares), *JPH3* (transdução de sinais), *RNF186/RACO1* (regulador transcricional), *ABCC1/CFTR* (transporte transmembrana) e *ARHGEF6* ou Rac/Cdc42 GEF6 (transdução de sinais via integrinas).



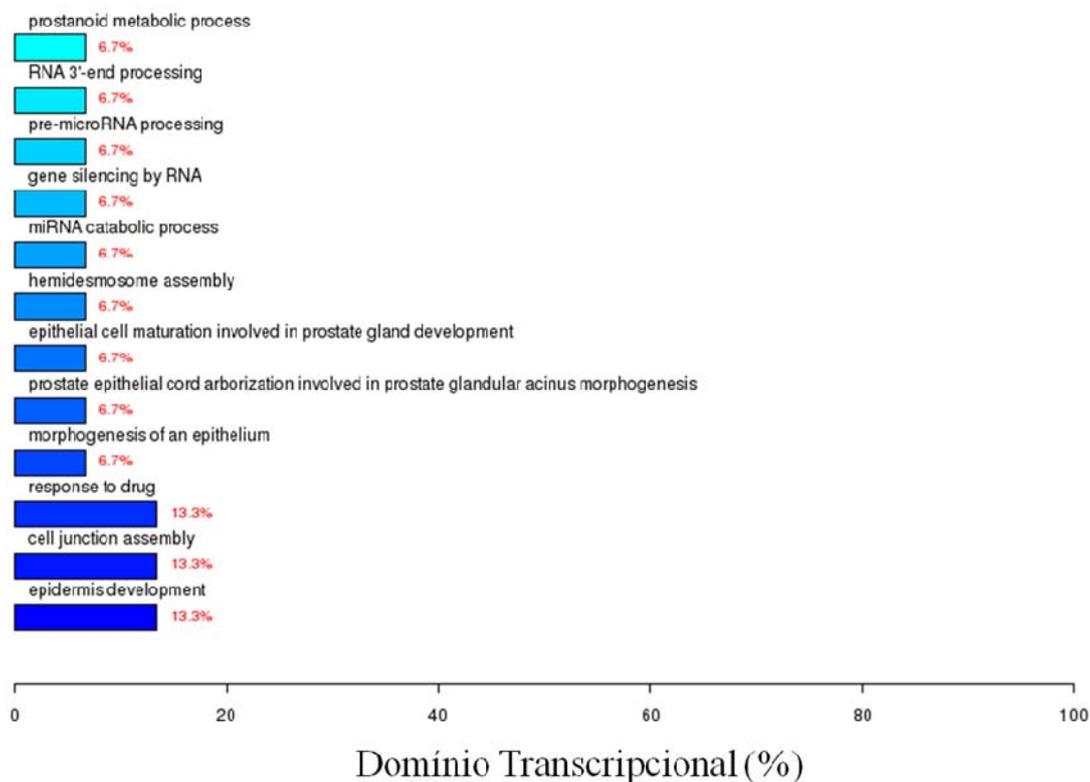
**Figura 22** - Cluster hierárquico supervisionado de genes expressos diferencialmente entre respondedores e não-respondedores. Agrupamento baseado nos transcritos diferencialmente expressos entre o grupo de R- (em vermelho) e R+ (em verde). O agrupamento foi realizado usando-se a correlação de Pearson em *linkage* completo. A cor verde genes com expressão diminuída em relação ao RNA de referência e o vermelho expressão aumentada. Preto denota ausência de expressão diferencial. Os quadrados cinza representam casos onde não foi possível avaliar a expressão para o gene em questão.

**Quadro 5** - Lista de genes expressos diferencialmente de forma mais significante\*.

<b>N. Probe</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Fold</b>	<b>Nome do Gene</b>
A_33_P3220615	<i>LIN28B</i>	8,4305711	H. sapiens lin-28 homolog B
A_23_P71053	<i>MPP6</i>	7,0493924	H. membrane protein, palmitoylated 6
A_24_P365015	<i>HOXB13</i>	6,9809879	H. sapiens homeobox B13
A_32_P232035	<i>LOC100270746</i>	5,9237731	H. sapiens hypothetical LOC100270746
A_23_P126248	<i>RNF186</i>	5,7047182	H. sapiens ring finger protein 186
A_24_P150791	<i>JPH3</i>	3,6351994	H. sapiens junctophilin 3
A_33_P3244808	<i>BEST4</i>	3,4548051	H.sapiens bestrophin
A_24_P602871	<i>SAMD5</i>	3,1333400	H. sapiens sterile alpha motif domain containing 5
A_33_P3339212	<i>TRIP13</i>	2,9043903	H. sapiens thyroid hormone receptor interactor 13
A_23_P259586	<i>TTK</i>	2,8517854	H. sapiens TTK protein kinase
A_23_P98092	<i>OAT</i>	2,4675301	H. sapiens ornithine aminotransferase (gyrate atrophy)
A_32_P9382	<i>C13orf37</i>	2,3845415	H. sapiens chromosome 13 open reading frame 37
A_23_P254756	<i>CD164</i>	2,2164066	H. sapiens CD164 molecule, sialomucin
A_23_P84576	<i>ANTXR1</i>	-2,0226167	H. sapiens anthrax toxin receptor 1
A_23_P141248	<i>SRR</i>	-2,0676007	H. sapiens serine racemase
A_24_P227831	<i>ABCC1</i>	-2,077791	H. sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP)
A_23_P152115	<i>NME3</i>	-2,0821122	H. sapiens non-metastatic cells 3, protein expressed in
A_23_P37877	<i>NARFL</i>	-2,1712395	H.sapiens nuclear prelamin A recognition factor-like
A_23_P2397	<i>RASSF3</i>	-2,1956307	H. sapiens Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 3
A_24_P228875	<i>ARHGEF6</i>	-2,2474553	H. sapiens Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6
A_24_P842006	<i>C16orf93</i>	-2,3378056	H. sapiens chromosome 16 open reading frame 93
A_33_P3351566	<i>ETNK1</i>	-3,4586095	H. sapiens ethanolamine kinase 1
A_23_P218047	<i>KRT5</i>	-4,7853084	H. sapiens keratin 5

\*Genes com  $\text{fold} \geq |2|$ , conforme status de resposta objetiva. Em verde, os genes hipoexpressos e em vermelho os superexpressos, nos indivíduos não respondedores em relação aos respondedores.

### GO Biological Process



**Figura 23** - Distribuição dos Genes Expressos Diferencialmente Conforme Resposta de Acordo com o Processo Biológico. Observa-se uma concentração maior de genes envolvidos com resposta a drogas, organização de junções celulares e desenvolvimento da epiderme, todos os três processos representados por 13,3% dos genes diferencialmente expressos na amostra quando analisadas em relação ao tipo de resposta.

#### 4.5.2 Correlação entre Sobrevida Livre de Progressão e Expressão Gênica

Por ocasião da análise dos dados do *microarray*, a sobrevida livre de progressão teve mediana estimada em 6 meses. Baseado nessa estimativa, foram estabelecidos dois grupos prognósticos de pacientes: o de BOM PROGNÓSTICO, com SLP mediana igual ou maior que 6 meses e outro de MAU PROGNÓSTICO,

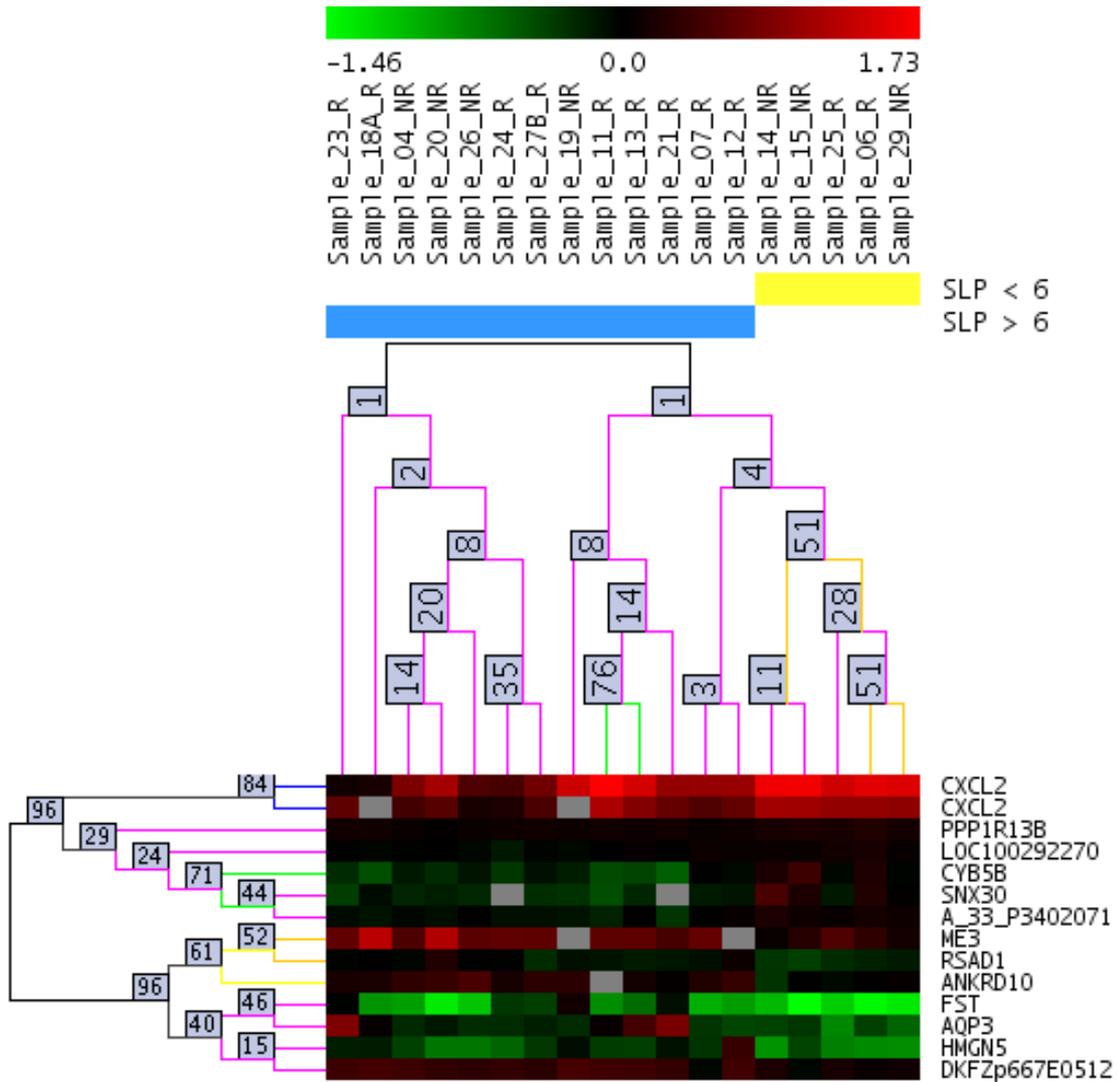
com SLP inferior a 6 meses. Para esses dois grupos de pacientes foi construído um novo agrupamento hierárquico supervisionado com base na SLP.

Na avaliação do *microarray* quanto à expressão gênica diferencial em tumores de grupos de pacientes quanto ao desfecho clínico de sobrevida livre de doença foram identificados 14 sequências gênicas (Figura 24). Após se aplicar o critério de  $\text{fold} \geq |2|$  restaram 9 sequências (8 genes) de expressão diferencial mais significativa, conforme discriminado no Quadro 6.

**Quadro 6** - Lista de Genes diferencialmente expressos conforme pacientes de BOM e MAU prognóstico.

Nome do Probe	Símbolo do Gene	Fold	Nome do Gene
A 23 P110531	<i>FST</i>	-4,55577639	H. sapiens follistatin
A 23 P112482	<i>AQP3</i>	-3,22215135	H. sapiens aquaporin 3
A 23 P116614	<i>ME3</i>	-2,8963876	H. sapiens malic enzyme 3, NADP(+)-dependent
A 23 P136909	<i>HMG5</i>	-2,66960809	H. sapiens high-mobility group nucleosome binding domain 5
A 23 P205046	<i>ANKRD10</i>	-2,06244376	H. sapiens ankyrin 10
A 33 P3388948	<i>SNX30</i>	2,47030251	H. sapiens sorting nexin family member 30
A 33 P3357535	<i>CYB5B</i>	2,50629536	H. sapiens cytochrome b5 type B
A 24 P257416	<i>CXCL2</i>	2,73784653	H. sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2
A 23 P315364	<i>CXCL2</i>	4,43944786	H. sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2

Lista dos genes expressos diferencialmente entre grupos de pacientes conforme SLP, em destaque os genes com  $\text{fold} \geq |2|$ : sinal - denota os genes hipoexpressos (verde) e +, os genes hiperexpressos (vermelho).



**Figura 24** - Agrupamento (cluster) hierárquico supervisionado dos genes diferencialmente expressos entre os tumores de pacientes de BOM e MAU prognóstico. Agrupamento baseado na expressão diferencial de genes entre pacientes com BOM prognóstico (mais de 6 meses de SLP) e de MAU prognóstico (menos de 6 meses). A cor verde representa genes com expressão diminuída em relação ao RNA de referência e o vermelho significa expressão aumentada. Preto denota ausência de expressão diferencial. Os quadrados cinza representam casos onde não foi possível avaliar a expressão para o gene em questão.

## 5 DISCUSSÃO

O câncer gástrico é uma das neoplasias mais letais do mundo. O câncer gástrico tem evolução insidiosa, permanecendo em estágio inicial (assintomático) por muitos anos (tempo de duplicação de cerca de 3 anos). Uma vez que alcança estádios mais avançados (sintomáticos), essa progressão se torna mais rápida (tempo de duplicação de 1 ano) (TSUKUMA et al. 2000). A sobrevida em 5 anos tem clara relação com o estágio, sendo reduzida a cerca de 20% nos estádios III e IV (EDGE et al. 2010). O diagnóstico, na maioria dos casos se faz em estádios avançados da doença, nos quais a ressecção cirúrgica, a modalidade terapêutica considerada curativa, não é indicada. No Ocidente, diagnósticos em estágio I não chegam a 20% e mesmo nesses pacientes, a sobrevida após a cirurgia não ultrapassa os 50% (BUNT et al. 1995). O diagnóstico do câncer gástrico é realizado em estágio fora de possibilidade cirúrgica em 70 a 80% dos casos. Nesses casos, resta apenas a possibilidade de tratamento paliativo.

Tratamento paliativo é aquele utilizado com objetivo primordial de aliviar sintomas, possibilitando assim uma melhor qualidade de vida para o indivíduo afetado (LE GALÉS-CAMUS et al. 2007). Geralmente, esse objetivo é alcançado através da regressão tumoral. Dessa forma, os melhores tratamentos paliativos são aqueles que determinam uma resposta objetiva, ou seja, a obtenção de resposta parcial ou até mesmo resposta completa tumoral, mesmo que não ocorra aumento na sobrevida global. A quimioterapia antitumoral tem por mecanismo de ação a eliminação de células tumorais através de medicamentos que inibem os mecanismos

de replicação, transcrição ou de síntese protéica dessas células, levando-as, em última instância à morte. Como tem atividade sistêmica, é o tratamento de escolha para tumores avançados regionalmente ou metastáticos (DEVITA e CHU et al. 2001).

O benefício da QT paliativa frente a medidas paliativas não citorredutoras no câncer gástrico foi inicialmente determinado em estudos randomizados, nos quais os pacientes sob QT tiveram vantagem de sobrevida mediana de 6 meses em relação ao melhor cuidado de suporte clínico (do inglês, BSC) (MURAD et al. 1993; SCHEITHAUER et al. 1994; PYRHÖNEN et al. 1995). Nesses estudos, a poliquimioterapia se baseava em 5-fluorouracil em bolus, cuja eficácia e o perfil de toxicidade são conhecidamente desfavoráveis em relação ao 5-fluorouracil em infusão venosa contínua (LOKICH et al. 1989).

WEBB et al. (1997) compararam ECF (epirrubicina  $50\text{mg}/\text{m}^2$  + Cisplatina  $60\text{mg}/\text{m}^2$  + 5-Fluorouracil  $200\text{mg}/\text{m}^2$  em infusão venosa contínua de 21 dias a cada 21 dias) e este foi superior a FAMTX (metotrexato  $1500\text{mg}/\text{m}^2$  + 5-fluorouracil  $1500\text{mg}/\text{m}^2$  em bolus no dia 1 + doxorrubicina  $30\text{mg}/\text{m}^2$  no dia 15 a cada 28 dias) em um estudo randomizado de fase III. Esse estudo demonstrou vantagem do ECF em relação ao FAMTX em termos de resposta objetiva (45% x 21%;  $p = 0,0002$ ), sobrevida mediana (8,9m x 5,7m;  $p = 0,0009$ ) e sobrevida livre de falha (7,4m x 3,4m;  $p = 0,00006$ ). A partir desses dados e reforçados pelos de uma metanálise (WAGNER et al. 2006), poliquimioterapia baseada em cisplatina, 5-fluorouracil e antraciclina passou a ser considerada a terapia padrão para câncer gástrico metastático.

A despeito da maior eficácia, a combinação de três drogas é mais tóxica e sua indicação em pacientes idosos, com *status performance* comprometido e comorbidades relevantes é discutível, restando nessa situação a possibilidade de esquemas com duas drogas. Outro inconveniente é a infusão venosa contínua do 5-fluorouracil durante 21 dias que está associado a um maior custo e maiores complicações referentes a necessidade de cateteres venosos, ou a necessidade de hospitalização.

Uma vez que a população assistida em nosso serviço é conveniada ao Sistema Único de Saúde (SUS) foi proposta nesse estudo terapia antineoplásica com base em cisplatina e fluoropirimidina, sendo o 5-fluorouracil sob infusão venosa contínua a opção de acesso maior por esses pacientes. A associação dessas com epirrubicina no presente estudo, impactou em aumento de toxicidade gastrointestinal (náuseas), ototoxicidade e neurotoxicidade em relação ao esquema CF, que cursou com mais anemia. Não houve episódios de neutropenia febril e observou-se baixa incidência de toxicidade gastrointestinal grau 3, além de baixa frequência de suspensões do tratamento por toxicidade.

Apesar da boa tolerância, em nosso estudo, ao contrário da literatura em geral, não houve diferenças significativas do ponto de vista estatístico, em termos de resposta e sobrevida, entre os esquemas *triplet* e *doublet* de QT. Houve uma tendência (destaque-se que não significativa estatisticamente) do esquema contendo capecitabina ser melhor em resposta, SLP e SG que o CF e o ECF nas condições em que esse último foi utilizado (4 dias de infusão), o que se assemelha aos achados de uma metanálise dos estudos REAL-2 e ML17032, onde se verificou uma melhor SG, mas não SLP, com a utilização das combinações de capecitabina ao invés de 5-

fluorouracil (OKINES et al. 2009). Destaque-se a limitação desse estudo para avaliar tais diferenças, tendo em vista seu delineamento primordial ser correlação de resposta e expressão gênica e não eficácia terapêutica.

A expressão imunoistoquímica de TOPO2A, HER2 e ERCC1 foi compatível com a literatura. A positividade na expressão de TOPO2A, determinada por índice nuclear de no mínimo 10%, observada em 82% dos pacientes é compatível com outros autores que a relataram entre 68 e 100% (SHI et al. 2008; LIANG et al. 2008; TAN et al. 2010). Da mesma forma a baixa positividade para HER2 (17,9%) está dentro da faixa relatada por artigos de revisão (ROSS e MCKENNA 2001) de 6 a 43%. De acordo com esses autores, as séries de casos com tumores gástricos de estádios mais avançados apresentam maior expressão imunoistoquímica de HER2. Para ERCC1 a positividade aqui encontrada de 57,1% se aproxima da de KIM et al. (2011) que verificaram 63% de expressão em espécimes de tumores gástricos operados e submetidos a QT com cisplatina e 5-fluorouracil. Nesse estudo se verificou uma correlação entre a expressão de ERCC1 com tumores menores que 5cm.

Nesse estudo a expressão imunoistoquímica de caderina-E foi encontrada em 100% das amostras tumorais. Essa proteína está normalmente envolvida a adesão celular e controle de proliferação celular. GAMBOA-DOMINGUEZ et al. (2005) avaliaram sua expressão em 177 espécimes de gastrectomia e 101 biópsias endoscópicas e verificaram que a expressão normal, anormal ou ausente em tumores gástricos não se correlacionou com sobrevida, no entanto a detecção de deleções de exon 8 e 9 (o que ocorreu em 5,3% dos casos) impactou negativamente na sobrevida desses pacientes. Em tumores ressecáveis de estômago a expressão anormal de

caderina-E se correlacionou com presença de metástases linfonodais e presença de micrometastases em sangue periférico. A presença desses dois marcadores se associou a uma pior sobrevida livre de doença, sendo a doença micrometastática sanguínea preditor independente de pior prognóstico (SAAD et al. 2010). O fato de a população de nosso estudo ser de pacientes com doença metastática estabelecida pode ser a explicação pela qual encontramos tal frequência de expressão. Entendendo-se que a perda da expressão normal ou uma expressão anormal da expressão da caderina-E deve ocorrer predominantemente durante o processo de invasão e que sua expressão pode ser dinâmica durante a metastatização, pode-se inferir que em população como a nossa seria esperada uma alta expressão da mesma.

Uma nuance importante na população do presente estudo foi a observação de que apesar de serem pacientes jovens para esse diagnóstico, apresentavam, predominantemente doença metastática volumosa, com mediana de 2 sítios de implantes, sendo inclusive o fígado como um dos mais comumente observados e, além disso, tinham performance status comprometido, predominando ECOG 2. Apesar disso, a taxa de resposta objetiva de 62,5% obtida pelos pacientes foi acima do relatado para literatura, no que se refere a estudos de fase 3 (cuja taxa foi a base do cálculo da amostra em questão), no entanto, compatível com achados de estudos de fase 2 que avaliaram esse *triplet* (FINDLAY et al. 1994; BAMIAS et al. 1996).

Não foi possível estabelecer um fator preditivo de resposta baseado em características clínicas ou patológicas, com exceção da localização do tumor no estômago, sugerindo maior responsividade de tumores proximais à QT, achado o que parece conflitante com a literatura, onde se verifica um pior prognóstico para esse tipo de tumor (HUNDAHL et al. 2000; DEMEESTER 2006).

Considerando os mecanismos de ação da cisplatina, fluoropirimidinas e antracíclicos, drogas frequentemente utilizadas para o tratamento desse tipo tumoral, vários autores estudaram biomarcadores de resposta para esse tipo de terapia. No presente estudo, nem ERCC1, TOPO2A, nem HER2 se mostraram fatores preditivos ou prognósticos. A literatura traz dados conflitantes para esses marcadores, com exceção de HER2 que se mostrou não só um fator prognóstico, mas também preditivo de resposta a trastuzumabe em câncer de estômago metastático. Um dos fatores com papel indeterminado é a Topoisomerase II-alfa, alvo farmacológico de antraciclina, epidofilotoxinas e da actinomicina. A atividade dessas drogas depende da expressão dessa enzima que, por sua vez, depende de sua amplificação, no entanto, não foi possível estabelecer uma clara correlação entre sua expressão e sua amplificação gênica. LIANG et al. (2008) não conseguiram, ao contrário de VARIS et al. (2004) determinar essa relação. Provavelmente devido a uma maior expressão dessa enzima em fases específicas do ciclo (pico em G2/M e queda no final da mitose). Sendo assim, a imunistoquímica talvez não seja um bom indicador da terapia anti-TOPO II. Além disso, a análise de alguns dados da literatura nos sugere que a avaliação da atividade de TOPO IIA, seja por IHQ, seja pela amplificação gênica, parece ter maior importância na determinação da quimiosensibilidade tumoral, quando analisada em conjunto com outros biomarcadores, como glutathione-S-transferase, cicloxigenase 2, glicoproteína P e até mesmo HER2 (KANTA et al. 2006; SHI et al. 2008; TAN et al. 2010).

Também para ERCC1 não foi possível estabelecer um papel preditivo nesse estudo. Um estudo semelhante, envolvendo 41 pacientes com câncer gástrico metastático submetidos a esquemas de quimioterapia baseados em platina (ECU –

epirrubicina, cisplatina e EFT, mDCF – docetaxel, cisplatina, leucovorin e 5-fluorouracil e a associação de cisplatina e irinotecano), avaliou a correlação da expressão imunohistoquímica de ERCC1 e a resposta apresentada. Não houve correlação entre a taxa de resposta apresentada (68% para ERCC+ e 69% para ERCC1-) e a expressão de ERCC1, que nesse estudo ocorreu em 31% dos pacientes. No entanto, pacientes com tumores ERCC1- e que utilizaram esquema de QT contendo irinotecano tiveram vantagem em termos de sobrevida global (OZKAN et al. 2010). YUN et al. (2010) também não conseguiram demonstrar qualquer papel preditivo ou prognóstico da expressão por IHQ de ERCC1 em um estudo de fase II no qual pacientes com doença metastática foram tratados com esquema CX e ECX.

Buscando uma relação que sugerisse um maior benefício aos pacientes além da obtenção de regressão tumoral, determinou-se a duração de resposta, cuja mediana foi de 3,3 meses e se correlacionou, na análise univariada, negativamente com a escala de ECOG e com a classificação tumoral de Lauren (tendo melhor DR pacientes com tipo intestinal). Além desse fator, foram determinantes de DR, o percentual de regressão tumoral (quanto maior a regressão tumoral maior a DR), o número de ciclos de QT e a ocorrência de anemia. Na análise multivariada, das características basais dos pacientes, o ECOG foi preditor independente de DR, tendo os pacientes com PS-ECOG 2 uma DR mais curta. Ainda na análise multivariada, evidenciou-se que quanto menos sítios de doença, mais tempo de QT e maior a regressão tumoral apresentada à QT, maior a duração de resposta e, por conseguinte maior o benefício em termos de qualidade de vida. Merece destaque como preditor de resposta/DR o PS pelo ECOG, que já consta como um dos principais critérios de seleção de pacientes para tratamento paliativo em câncer gástrico, conforme

diretrizes do NCCN (2011), segundo o qual para pacientes com ECOG maior que 2 não deve ser oferecida QT paliativa e sim suporte clínico paliativo exclusivo.

Semelhante ao encontrado para DR, a sobrevida livre de doença se correlacionou positivamente com *performance status* ECOG 1, com a ocorrência de resposta objetiva, um menor número de sítios metastáticos e com tipo tumoral intestinal. Ainda na análise bivariada, verificou-se que indivíduos que não apresentavam toxicidade auditiva tiveram pior SLP. Na análise multivariada, identificou-se como fatores de bom prognóstico a ausência de metástases hepáticas, maior número de ciclos de QT e uma maior regressão tumoral. Alguns dos fatores que foram identificados para sobrevida e para os parâmetros de resposta, são bem coerentes com os achados de literatura (como o ECOG, metástases hepáticas e tipo histológico). Por exemplo, a associação japonesa de câncer gástrico já incorpora em seu sistema de estadiamento uma análise discriminada das metástases hepáticas, sendo a ausência dessas melhor que uma metástase, que é melhor que vários nódulos (Japanese Gastric Cancer Association 2010). Outros parâmetros podem ser justificados com o conhecimento da biologia tumoral e com os princípios da terapia antilástica. Nesse último caso, sabe-se que quanto maior o volume tumoral, menor a probabilidade de sensibilidade tumoral à QT, além disso, a intensidade de dose também influencia o desfecho terapêutico (DEVITA e CHU 2001).

Ainda assim, alguns dos fatores preditivos identificados nesse estudo são sujeitos a viés de interpretação. Por exemplo, o número de ciclos de QT. O paciente vive mais em função do aumento dos ciclos, e, portanto, da dose final maior, ou faz mais QT porque tem tumores que naturalmente permitem uma maior sobrevida? Da mesma forma para a toxicidade auditiva. Baseado em evidências que sugerem que: 1)

a dose da QT é essencial para maior resposta e sobrevida, 2) a dose ideal é melhor determinada pela farmacocinética e farmacodinâmica individual e não pela área de superfície corporal e 3) a toxicidade hematológica pode ser preditora de resposta, alguns autores avaliaram esquemas de escalonamento de dose de QT baseados no nadir das contagens hematológicas (MAYERS et al. 2001; CAMERON et al. 2003; SCHUELL et al. 2005). Tratava-se de estudos em câncer de mama metastático, nos quais parâmetros de eficácia (RO e sobrevida), de segurança e de qualidade de vida foram avaliados. As taxas de resposta foram de cerca de 80%, com sobrevida mediana de 36 meses, nos quais os pacientes apresentaram boa tolerância, com poucas complicações e não tiveram detrimento de qualidade de vida quando sua QT tinha suas doses aumentadas (LINDMAN et al. 2007; IIRISTO et al. 2011).

Há vasta evidência de literatura para correlação entre toxicidade ao tratamento e resposta objetiva e sobrevida. Destaque-se a relação entre a ocorrência e intensidade do rash acneiforme com uma maior resposta e sobrevida de pacientes tratados com inibidores de tirosina-quinase do EGFR e anticorpos monoclonais anti-EGFR em câncer de cólon, pulmão e de cabeça e pescoço (BASELGA et al. 2005; WACKER et al. 2007; DOUILLARD et al. 2010).

A sobrevida global nessa amostra foi alta (mediana de 12,5 meses) para uma população com tantas características de mau prognóstico, ainda mais se considerando que na sua estimativa foram computados os dados de 02 pacientes que sequer chegaram a fazer QT e que faleceram rapidamente após seus diagnósticos. Já a sobrevida livre de progressão foi compatível com a descrita para essa patologia. O fato relevante nesses dados é que a RO representou mais que um benefício só para a palição, mas realmente se comportou como preditora de sobrevida livre de doença e

sobrevida global; tendo os pacientes respondedores, maior sobrevida que aqueles que não-respondedores, embora sem significância estatística (provavelmente em decorrência do tamanho da amostra). Sendo assim, o objetivo primordial desse estudo, que foi correlacionar resposta objetiva com expressão gênica ganha maior importância, uma vez que a predição desse desfecho, hipoteticamente, seria predição do benefício de palição e maior tempo de vida.

Apesar de haver diversos estudos avaliando marcadores prognósticos e preditivos, não há nenhum marcador de diagnóstico, de prognóstico, muito menos preditivo de resposta à quimioterapia em câncer gástrico, devidamente consolidados. Apenas a expressão de HER2 se comprovou como fator preditivo de resposta ao trastuzumabe (anticorpo monoclonal anti-HER2), droga que associada à QT, determinou ganho de sobrevida a pacientes com superexpressão de HER2. No entanto, a detecção desse marcador favorece menos de 20% dos pacientes com câncer gástrico. Na realidade, os diversos fatores avaliados apresentaram resultados, às vezes, conflitantes, ou sob metodologias não padronizadas de detecção e sem validação clínica prospectiva. Mais provavelmente essa carência de biomarcadores se deva a complexidade da doença e do processo de resistência aos quimioterápicos, além da possibilidade de surgimento de novas mutações ao longo da terapia e da existência de vias de promoção de crescimento celular redundantes. Sendo assim, seria pouco provável identificar-se apenas 1 ou 2 marcadores isolados e independentes de resposta. Dentro dessa perspectiva a avaliação de expressão gênica global pode trazer mais respostas para essa lacuna. Tenha-se como exemplo os estudos de expressão gênica em câncer de mama que permitiram, além do conhecimento mais detalhado sobre as características moleculares da doença

(PEROU et al. 2000; SORLIE et al. 2001), chegar mais próximo da individualização do diagnóstico e prognóstico, e do tratamento. A partir desses estudos foram geradas ferramentas de estratificação de risco de recaída que permitem a seleção mais sofisticada da terapia (quimioterapia e hormonioterapia x hormonioterapia isolada), poupando as pacientes do risco de terapias desnecessárias (VAN DE VIJVER et al. 2002; VAN'T DE VEER et al. 2002).

Baseado nessa perspectiva, nesse estudo se buscou um perfil gênico que pudesse prever a resposta objetiva de pacientes com câncer gástrico. Essa análise permitiu estabelecer dois grupos, de respondedores e de não-respondedores distintos pela expressão diferencial de 59 genes. A aplicação de um ponto de corte baseado na razão entre as intensidades de expressão ( $\text{fold} \geq |2|$ ) nesse grupo de genes determinou a identificação de 23 genes mais diferencialmente expressos. Esses, comparados ao banco do *Biological Process GO* se associam a funções biológicas, sendo as mais predominantes: resposta a drogas, adesão celular e desenvolvimento epidérmico. Isso reforça a evidência de que esse agrupamento de genes é coerente com predição de resposta, além disso, alguns desses genes isoladamente já tiveram relação com terapia estabelecida em relatos de literatura, outros ainda parecem participar de fenômenos celulares que merecem destaque, como se segue.

*Rac/Cdc 42 GDP Exchange Factor 6* (ARHGEF6) codifica uma proteína que é um membro da família das proteínas G acopladas a receptores e modula a ativação das RhoGTPases, através da troca da ligação dessas ao GDP pelo GTP. Essas RhoGTPases estão envolvidas com transdução celular de sinais externos. Um dos principais desses sinais está associado a interações célula-matriz extracelular, através de receptores integrina-símile, associados a PI3K (ZHAO et al. 2011). MAITI (2010)

estudou culturas de linhagens celulares de câncer de ovário resistentes à clorambucil, uma droga alquilante, que induz dano celular através da formação de ligações covalentes ao DNA, gerando verdadeiras pontes intramoleculares na fita dupla. Para correção desse tipo de dano, a célula se utiliza de um mecanismo de reparo conhecido como reparo por *non-homologous end joining repair* (NHEJ). O estudo verificou que era possível reverter a resistência dessas células induzindo estresse oxidativo e a análise por *microarray* da expressão gênica dessas células demonstrou que o fenômeno observado guardava forte relação com a expressão de ARHGEF6, TP53 e DNA-PK (Proteína-quinase DNA dependente). Níveis persistentemente altos dessa última foram associados à resistência à QT, provavelmente por aumento do reparo de DNA mediado por NEHJ (BOLDOGH et al. 2003).

*HOXB13* pertence à família de genes Homeobox, conhecidos reguladores transcricionais, envolvidos em diferenciação celular e morfogênese. A hiperexpressão do produto desse gene se correlaciona com aumento da taxa de proliferação, perda da inibição por contato, perda da adesão por contato e inibição de apoptose; por outro lado, experimentos com linhagens celulares nocaute para *HOXB13* apresentam menor formação de colônias e menor taxa de crescimento. A hiperexpressão de *HOXB13* já foi evidenciada em tumores de mama, cólon, ovário, próstata e pulmão. Apesar de não se saber como ele determina exatamente a progressão nesses tumores, há evidências de que aparentemente tem papel colaborativo com *RAS* na indução do crescimento tumoral. Além disso, evidências de estudos com linhagens de fibroblastos transfectados com *HOXB13* sugerem que a transformação só ocorre quando há genótipo p53 *-/-* concomitante. Em tumores endócrino-responsivos, há uma correlação negativa entre a expressão desse gene com

resistência a terapia hormonal. Em tumores de mama hormônio-responsivos tratados com tamoxifeno, a expressão de *HOXB13* está associada a um pior prognóstico (MA et al. 2004). O efeito anti-proliferativo e pró-apoptótico do tratamento com tamoxifeno é revertido em modelos experimentais de câncer de ovário com expressão aumentada de *HOXB13* (MIAO et al. 2007).

Outro gene hiperexpresso no grupo de não-respondedores é *RNF186*, também conhecido por *RAC1*, que codifica um co-ativador de *JUN*, membro da conhecida família AP-1 de fatores de transcrição (FT) envolvidos com proliferação celular. A depleção de *RNF186* determina inibição de proliferação induzida pelos conhecidos alvos de *JUN*: *cdc2*, ciclina D1 e hb-egf (DAVIES et al. 2010). Pouco se sabe sobre quais são os fatores de crescimento que estimulam esses FT. LEE e KIM (2012) estudaram, através de cDNA *microarray*, o papel de *JUN* na proliferação e invasão tecidual induzida por HGF (do inglês, fator de crescimento do hepatócito) em linhagens de células neoplásicas de estômago. Verificou-se que HGF induziu a expressão de *JUN*. Nesse estudo, a inibição de *JUN* por siRNA promoveu inibição da expressão de MMP9 (metaloproteinase 9) induzida por HGF, além de inibir o processo de proliferação induzida por esse último.

*Thyroid Hormone Receptor Interactor 13* (TRIP13) é um co-regulador transcricional de receptores nucleares. Está associado ao desenvolvimento dos carcinomas de células não pequenas de pulmão e está expresso em 68% dos pacientes com estágio I da doença (KANG et al. 2008). BERGAMASCHI et al. (2011) identificaram, em um grupo de pacientes com câncer de mama com receptor de estrógeno positivo, sob tratamento com tamoxifeno, uma subpopulação que apresentava prognóstico ruim em relação às demais. Foi evidenciada, nessa

subpopulação uma assinatura gênica diferencial de 29 genes, onde 46% desses estavam envolvidos com ciclo celular. Dentre esses genes, encontrava-se *TRIP13*.

*Receptor 1 da Toxina de Anthrax* (ANTXR1) é um dos genes *down-regulated* em pacientes não-respondedores. Consiste em uma proteína transmembrana tipo I (tipo “integrina-símile”), sendo reconhecido como um marcador endotelial específico, envolvido na carcinogênese colorretal. É conhecido como *Tumor Endothelial Marker 8* (TEM8). Induz aumento de vascularização e estabilização de vasos formados em um aspecto fenotipicamente semelhante ao induzido por genes da família Wnt (VERMA et al. 2011). Realmente, já foi demonstrada a sua interação com LPR6, um co-receptor de ligantes Wnt. Em câncer de mama, foi evidenciada que a expressão dessa proteína nas células do estroma adjacente, associada a sua hipoexpressão tumoral está associada ao fenótipo basalóide desses tumores (GUTWEIN et al. 2011).

Outro gene diferencialmente expresso é *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR). Distúrbios dessa proteína estão mais bem relacionados à fibrose cística. Consiste em uma proteína transmembrana da família ABCC1 que realiza transporte transmembrana de ânions e drogas. Está implicada no fenômeno de resistência tumoral a diversos quimioterápicos *multidrug resistance* (MDR) como doxorrubicina, taxanos e vincristina (COLE et al. 1992; DOYLE et al. 1998; BAKOS e HOMOLYA 2007).

De forma não menos interessante, a assinatura gênica estabelecida aqui também contém hiperexpressão de *LIN28B*, que codifica uma proteína de ligação ao RNA que inibe a biogênese de uma família de miRNA (microRNA), a família Let-7. As LIN28 são repressores pós-transcricionais de Let-7 através da uridilação terminal

de seus precursores levando-os à degradação. *LIN28B* está expresso em vários tumores. VISWANATHAN et al. (2009) analisou várias linhagens celulares tumorais e amostras de tumores humanos, como LMC, hepatocarcinoma, câncer de ovário, câncer de cólon e verificou que LIN28/LIN28B estão expressos em cerca de 15% dessas. Em alguns desses tumores, essa expressão se correlacionou com pior prognóstico. Em câncer de cólon, a sua expressão tumoral está associada a um fenótipo mais invasivo e com expressão de marcadores de células-tronco intestinais (marcadores L6R5 e PROM-1) (KING et al. 2011). Os Let-7 constituem-se de 12 sequências de miRNA distribuídos em 8 *clusters* genômicos e que estão frequentemente reprimidos em câncer. Essa repressão determina a desrepressão celular de oncoproteínas fetais e, portanto seus efeitos estão normalmente envolvidos com diferenciação e auto-renovação celulares. Realmente, tumores que não expressam Let-7 apresentam células com fenótipo epitelial, indiferenciado e são mais avançados (células tipo I). Há relatos de que *cdc25A*, *CDK6*, *RAS*, *HMGA*, *MLIN41* e *IMP1* seriam alvos naturais dos Let-7 durante o desenvolvimento embrionário (PETER 2009; HELLAND et al. 2011). Já foi possível identificar altas concentrações de miRNA da família Let-7 em exossomas de uma linhagem celular de câncer gástrico metastático sugerindo que, como forma a manter seu potencial maligno e metastático, essas células secretam esses miRNA (OHSHIMA et al. 2010).

A expressão de microRNA vem sendo estudada como preditor de recorrência. BRENNER et al. (2011) conseguiram estabelecer uma correlação entre a expressão de 3 deles (miR-451, miR-199a-3p e miR-195) e a sobrevida livre de recorrência em uma população de 45 pacientes com câncer gástrico ressecado, utilizando miR *microarrays* e conferindo posteriormente com RT-PCR.

Todos os genes acima descritos apresentam evidência de relação com processos celulares envolvidos com fenótipos tumorais mais agressivos e com refratariedade ao tratamento. Dessa forma o perfil genômico identificado, em geral, possui um racional biológico para ser um possível preditor de resposta à QT.

Apesar de não ter sido delineado para avaliação prognóstica e sim preditiva do perfil genômico nesses tumores gástricos, a resposta apresentada pelos portadores à quimioterapia se correlacionou de forma significativa com SLP. Sendo assim foi realizada uma análise exploratória nesse sentido. Ao se separar a amostra em dois grupos conforme sua mediana de SLP, pode-se determinar que esses pacientes também apresentam diferenças na expressão gênica entre si. Isso se refletiu na identificação de um perfil de expressão gênica com 14 sequências, que após seleção usando um  $\text{fold} \geq |2|$  manteve 09 sequências gênicas diferencialmente expressas entre pacientes com BOM e MAU prognóstico ( $\text{SLP} \geq 6$  meses x  $< 6$  meses). Alguns desses genes parecem se relacionar a processos de controle da replicação celular, invasão e metastatização e inibição de apoptose. Destacam-se 3 dentre eles, *FST* e *AQP3*, hipoexpressos nos tumores com progressão curta, e *CXCL2*, hiperexpresso nesses mesmos tumores.

A folistatina (*FST*) está envolvida com mecanismos de sobrevivência em meios com baixa oferta de glicose (GAO et al. 2010). Essa atividade foi verificada em estudos com linhagens de células transformadas. Essa proteína parece exercer tal efeito através da inibição das activinas (membros da família de TGF-beta) que participam do controle da proliferação celular, da diferenciação e indução de apoptose (RISBRIDGER et al. 2001; HARRISON et al. 2005).

Outro gene identificado foi *aquaporina 3* (AQP3). Ele codifica uma proteína da família de moléculas hidrofóbicas de membrana (família MIP). Sua expressão é diferente entre tecido normal e de carcinomas gástricos, sendo que nesses últimos, a expressão se correlaciona com metástases linfonodais e invasão angiolinfática (SHEN et al. 2010). Há evidências de que AQP3 modula esses fenômenos através da indução de metaloproteinases (MMP), via sinalização por PI3K/Akt (XU et al. 2011). Sua expressão parece ser induzida através da ação de hEGF, via das MAPK (HUANG et al. 2010).

Do nosso *array* também se identificou a expressão de *CXCL2/GROβ* que codifica uma quimiocina, envolvida com processos de inflamação e injúria, carcinogênese e metástases (KEELEY et al. 2010). A hipoexpressão de *CXCL2* em tumores de esôfago se correlacionou com diminuição da proliferação e colonização celular tumoral, ou seja, menor progressão do estadiamento TNM (DONG et al. 2011). Aparentemente, há mediação de sua atividade através da via de RAS/RAF/ERK, que uma vez ativados geram aumento de fatores reguladores da expressão de reguladores do ciclo celular, como p67 e p27. Considerando a relação entre câncer gástrico e a infecção por *H. pylori*, KUZUHARA et al. (2007) determinaram através de experimentos com *microarray*, que esse microorganismo promovia a expressão de quimiocinas. Tal expressão, que incluía *CXCL2*, era induzida pela proteína Tipalpha (Tumour Necrosis Factor-alpha Inducing Protein), secretada pelo *H. pylori* em um modelo de câncer gástrico em camundongos. Em câncer gástrico também há correlação entre a expressão de *CXCL2* e estádios avançados da doença (PARK et al. 2007). Em câncer colorretal, está relacionado com pior sobrevida (AKISHIMA-FUKASAWA et al. 2009).

RAO et al. (2007) selecionaram 35 pacientes com câncer gástrico, submetidos à quimioterapia neoadjuvante e também os dividiu em grupos conforme sua sobrevida mediana. O autor também conseguiu estabelecer, a partir de um *microarray* de 22.000 genes uma assinatura gênica de prognóstico. No *pool* de genes expressos diferencialmente entre pacientes de bom ou mau prognóstico predominavam aqueles envolvidos com sinalização celular de receptores de tirosina-quinase e proliferação celular. A diferença desse estudo com o presente projeto foi a população, tanto no que se refere à idade, quanto ao estágio.

Dentro do contexto de uma população de 33 pacientes submetidos a ressecção cirúrgica, ZHANG et al. (2011) realizaram uma análise da expressão de 47.296 transcritos e a correlacionaram com sobrevida, também separando os pacientes em baixo e alto risco baseado em sua sobrevida mediana. Os autores identificaram uma assinatura gênica constituída de 10 genes (6 deles relacionados a proteínas ribossômicas) que se mostrou fator prognóstico independente nessa população, comparável ao TNM.

Nesse estudo, apesar da variedade de esquemas de QT, não houve diferenças no desfecho clínico principal – resposta objetiva. A heterogeneidade de esquemas utilizados nesse estudo pode constituir alguma restrição na análise de expressão gênica em si, no entanto, clinicamente, a aplicabilidade de um único perfil genômico de resposta a vários esquemas contendo cisplatina e fluoropirimidinas seria mais realista, útil e prático. De qualquer forma, considerando que não houve diferenças significativas entre os esquemas aqui utilizados e ao fato de que a amostra inicialmente dimensionada não foi alcançada, o recrutamento de novos pacientes

tratados com um esquema contendo apenas as duas drogas de interesse pode minimizar eventuais distorções.

Nossos resultados demonstraram que é possível identificar assinaturas gênicas associadas com responsividade à QT paliativa e, também sobrevida livre de doença, dois desfechos de grande importância em pacientes com doença metastática, na qual a seleção terapêutica impacta bastante em qualidade de vida. Para reforçar esse dado será realizada validação dos genes com RT-PCR e de seus produtos por imunistoquímica. Uma grande limitação nas análises de correlações clínico-patológicas é o número reduzido de indivíduos incluídos. Esse fato pode ser corrigido através da ampliação da observação mais contínua de outros pacientes admitidos para esse tipo de tratamento na instituição. Outra limitação consiste na ausência dos dados de outros marcadores imunistoquímicos inicialmente selecionados. Acreditamos que a correlação conjunta desses com os desfechos clínicos, uma vez identificada, teria maior fundamento biológico que sua análise isolada.

## 6 CONCLUSÕES

Nosso estudo permitiu identificar um perfil de 23 genes associados a resposta objetiva à cisplatina e fluoropirimidina em pacientes com câncer gástrico metastático.

Os esquemas de tratamento envolvendo associações de cisplatina e fluoropirimidina, apesar de não terem determinado diferenças significativas nos desfechos de eficácia, foram bem tolerados, sem nenhum caso de internações por complicações ou óbito associados aos mesmos. Na realidade, algumas toxicidades parecem se mostrar preditoras de melhor resposta e sobrevida.

Os pacientes tratados nesta amostra apresentaram altas taxas de resposta e com sobrevida comparáveis a esquemas de tratamento envolvendo terapia biológica nessa indicação.

A resposta objetiva, a duração de resposta, assim como a sobrevida global e livre de progressão se correlacionam com vários parâmetros clínicos, patológicos e terapêuticos que podem ser utilizados como preditores desses desfechos.

Assim como para resposta, foi possível identificar um perfil genômico associado com sobrevida livre de doença.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akishima-Fukasawa Y, Nakanishi Y, Ino Y, Moriya Y, Kanai Y, Hirohashi S. Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma. **Am J Clin Pathol** 2009; 132:202-10.

Al-Batran SE, Hartmann JT, Probst S, et al. Phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil, leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. **J Clin Oncol** 2008; 26:1435-42.

Al-Moundhri MS, Nirmala V, Al-Hadabi I, et al. The prognostic significance of p53, p27 kip1, p21 waf1, HER-2/neu, and Ki67 proteins expression in gastric cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study of 121 Arab patients. **J Surg Oncol** 2005; 91:243-52.

[ACS] American Cancer Society. **Global cancer facts & figures**. 2<sup>nd</sup> ed. 2011. Available from: <URL:<http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/GlobalCancerFactsFigures/gloabla-cancer-facts-figures-2nd-edition>> [2011 nov 20]

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

Bakos E, Homolya L. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). **Pflugers Arch** 2007; 453:621–41.

Bamias A, Hill ME, Cunningham D, et al. Epirubicin, cisplatin and protracted venous infusion of 5-fluorouracil for esophagogastric adenocarcinoma: response, toxicity, quality of life, and survival. **Cancer** 1996; 77:1978-85.

Ban S. Early and advanced gastric cancer. In: Tan D, Gregory YL, editors. **Advances in surgical pathology series – gastric cancer**. Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins: 2011. p.73-93.

Baselga J, Trigo JM, Bourhis J, et al. Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Oncol** 2005; 23:5568-77.

Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. **Nat Med** 2002; 8:816-24.

Boldogh I, Roy C, Lee MS, et al. Reduced DNA double-strand breaks in chlorambucil resistant cells related to high DNA-PKcs activity and low oxidative stress. **Toxicology** 2003; 193:137-52.

Borrmann R. HandBuch der speziellen pathologischen anatomie und histologie. In: Von Henke FU, Lubarch O, editors. **IV/lerster Teil**. Berlin: Julius Springer Verlag; 1926. p.864 -71.

Brenner B, Hoshen MB, Purim O, et al. MicroRNAs as potential prognostic factor in gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2011; 17:3976-85.

Bunt AM, Hermans J, Smit VT, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Bruijn JA. Surgical/pathologic-stage migration confounds comparisons of gastric cancer survival rates between Japan and Western countries. **J Clin Oncol** 1995; 13:19-25.

Bergamaschi A, Christensen BL, Katzenellenbogen BS. Reversal of endocrine resistance in breast cancer: interrelationships among 14-3-3 $\zeta$ , FOXM1, and a gene signature associated with mitosis. **Breast Cancer Res** 2011; 13:R70.

Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. **J Med Genet** 1999; 36:873-80.

Caldas C. Genetic predisposition to gastric cancer. In: American Society of Clinical Oncology. **2007 Gastrointestinal Cancers Symposium Program/Proceedings**. Alexandria(VA): American Society of Clinical Oncology; 2007. p.45-6.

Cameron DA, Massie C, Kerr G, Leonard RC. Moderate neutropenia with adjuvant CMF confers improved survival in early breast cancer. **Br J Cancer** 2003; 89:1837-42.

Chen CN, Lin JJ, Chen JJ, et al. Gene expression profile predicts patient survival of gastric cancer after surgical resection. **J Clin Oncol** 2005; 23:7286-95.

Chen CN, Hsieh FJ, Cheng YM, Chang KJ, Lee PH. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer. **J Surg Oncol** 2006; 94:226-33.

Coburn NG, Swallow C, Quan ML, Law C. ASCO significant regional variation in treatment and survival of gastric cancer. **J Clin Oncol** 2005 23(supl.1):4004.

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science** 1992; 258:1650-4.

Cunningham D, Starling N, Rao S, et al. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. **N Engl J Med** 2008; 358:36-46.

Dako Herceptest for Immunoenzymatic Staining DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca, 1999.

Davies CC, Chakraborty A, Cipriani F, Haigh K, Haigh JJ, Behrens A. Identification of a co-activator that links growth factor signalling to c-Jun/AP-1 activation. **Nat Cell Biol** 2010; 12:963-72.

DeMeester SR. Adenocarcinoma of the esophagus and cardia: a review of the disease and its treatment. **Ann Surg Oncol** 2006; 13:12-30.

Devita VT Jr, Chu E. Principles of medical oncology. In: Devita VT Jr, Hellman S, Rosenberg AS, editors. **Cancer principles e practice of oncology**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: J.B. Lippincott; 2001. p.286-309.

Di Leo A, Desmedt C, Bartlett JM, and HER2/TOP2A Meta-analysis Study Group. HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline-containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: a meta-analysis of individual patient data. **Lancet Oncol** 2011; 12:1134-42.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:15665–70.

Dong QM, Zhang JQ, Li Q, Bracher JC, Hendricks DT, Zhao XH. Clinical significance of serum expression of GROβ in esophageal squamous cell carcinoma. **World J Gastroenterol** 2011; 17:2658-62.

Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, open label, phase III study of panitumumab (PMAB) with FOLFOX4 versus FOLFOX4 alone as first-line treatment (tx) for metastatic colorectal cancer (mCRC): Efficacy by skin toxicity (ST). **J Clin Oncol** 2010; 28: 4697-705.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7<sup>th</sup> ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Digestive system; p.101-250.

Eisenhauer E, Therasse P, Bogart J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). **Eur J Cancer** 2009; 45:228-47.

Eschrich S, Yang I, Bloom G, et al. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. **J Clin Oncol** 2005; 23:3526-35.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. **Globocan 2008: cancer incidence and mortality worldwide**. France: IARC; 2010. Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr>.> [2011 nov 21]

Findlay M, Cunningham D, Norman A, et al. A phase II study in advanced gastroesophageal cancer using epirubicin and cisplatin in combination with continuous infusional 5-fluorouracil (ECF). **Ann Oncol** 1994; 5:609-16.

Galizia G, Lieto E, Orditura M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression is associated with a worse prognosis in gastric cancer patients undergoing curative surgery. **World J Surg** 2007; 31:1458-68.

Gamboa-Dominguez A, Dominguez-Fonseca C, Chavarri-Guerra Y, et al. E-cadherin expression in sporadic gastric cancer from Mexico: exon 8 and 9 deletions are infrequent events associated with poor survival. **Hum Pathol**. 2005; 36:29-35.

Gao X, Wei S, Kairan L, et al. Nucleolar follistatin promotes cancer cell survival under glucose-deprived conditions through inhibiting cellular rRNA synthesis. **J Biol Chem** 2010; 281:36857-64.

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

Genzyme Genetics. **ERCC1 immunohistochemistry analysis: sample report 2009**. Available from: <URL:<http://www.genzyme genetics.com/~media/Files/Genetics/PDF/SampleReports/OncologyPathology/sample-report-ercc1-immunohistochemistry-analysis.pdf>> [2012 jan 20]

Gutwein LG, Al-Quran SZ, Fernando S, Fletcher BS, Copeland EM, Grobmyer SR. Tumor endothelial marker 8 expression in triple-negative breast cancer. **Anticancer Res** 2011; 31:3417-22.

Gomes LI, Esteves GH, Carvalho AF, et al. Expression profile of malignant and nonmalignant lesions of esophagus and stomach: differential activity of functional modules related to inflammation and lipid metabolism. **Cancer Res** 2005; 65:7127-36.

Hamilton SR, Aaltonen LA. **Pathology and genetics of tumours of digestive system**. Lyon: IARC Press; 2000. (World Health Classification of Tumours; 2)

Harrison CA, Gray PC, Vale WW, Robertson DM. Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. **Trends Endocrinol Metab** 2005; 16:73-8.

Harrison LE, Karpeh MS, Brennan MF. Proximal gastric cancers resected via a transabdominal only approach: Results and comparisons to distal adenocarcinoma of the stomach. **Ann Surg** 1997; 225:678-83.

Helland A, Anglesio MS, George J, et al. Deregulation of MYCN, LIN28B and LET7 in a molecular subtype of aggressive high-grade serous ovarian cancers. **PLoS One** 2011; 6:e18064.

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

Huang Y, Zhu Z, Sun M, et al. Critical role of aquaporin-3 in the human epidermal growth factor-induced migration and proliferation in the human gastric adenocarcinoma cells. **Cancer Biol Ther** 2010; 9:1000-7.

Hundahl SA, Phillips JL, Menck HR. The National Cancer Data Base Report on poor survival of U.S. gastric carcinoma patients treated with gastrectomy: Fifth Edition American Joint Committee on Cancer staging, proximal disease, and the "different disease" hypothesis. **Cancer** 2000; 88:921-32.

Iiristo M, Wiklund T, Wilking N, Bergh J, Brandberg Y. Tailored chemotherapy doses based on toxicity in breast cancer result in similar quality of life values, irrespective of given dose levels. **Acta Oncol** 2011; 50:338-43.

Japanese Gastric Cancer Association. **Japanese classification of gastric carcinoma**. 14<sup>th</sup> ed. 2010. Available from: <URL:[http://www.acronymfinder.com/Japanese-Classification-of-Gastric-Cancer-\(JCGC\).html](http://www.acronymfinder.com/Japanese-Classification-of-Gastric-Cancer-(JCGC).html)> [2012 jan 12]

Jørgensen JT, Hersom M. HER2 as a prognostic marker in gastric cancer - a systematic analysis of data from the literature. **J Cancer** 2012; 3:137-44.

Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Kim JM. Gain in chromosomal region 5p15.33 containing TERT is the most frequent genetic event in early stages of non-small cell lung cancer. **Cancer Genet Cytogenet** 2008; 182:1-11.

Kanta SY, Yamane T, Dobashi Y, Mitsui F, Kono K, Ooi A. Topoisomerase IIalpha gene amplification in gastric carcinomas: correlation with the HER2 gene. An immunohistochemical, immunoblotting, and multicolor fluorescence in situ hybridization study. **Hum Pathol** 2006; 37:1333-43.

Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. CXC Chemokines in cancer angiogenesis and metastases. **Adv Cancer Res** 2010; 106:91-111.

Kikuyama S, Inada T, Shimizu K, Miyakita M, Ogata Y. p53, bcl-2 and thymidine phosphorylase as predictive markers of chemotherapy in patients with advanced and recurrent gastric cancer. **Anticancer Res** 2001; 21:2149-53.

Kim JP, Lee JH, Kim SJ, Yu HJ, Yang HK. Clinicopathologic characteristics and prognostic factors in 10 783 patients with gastric cancer. **Gastric Cancer** 1998; 1:125-33.

Kim JH, Park JM, Jung CW, et al. The significances of lymph node micrometastasis and its correlation with E-cadherin expression in pT1-T3N0 gastric adenocarcinoma. **J Surg Oncol** 2008; 97:125-30.

Kim KH, Kwon HC, Oh SY, et al. Clinicopathologic significance of ERCC1, thymidylate synthase and glutathione S-transferase P1 expression for advanced gastric cancer patients receiving adjuvant 5-FU and cisplatin chemotherapy. **Biomarkers** 2011; 16:74-82.

King CE, Wang L, Winograd R, et al. LIN28B fosters colon cancer migration, invasion and transformation through let-7-dependent and -independent mechanisms. **Oncogene** 2011; 30:4185-93.

Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, et al. retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. **J Clin Oncol** 2005; 23:7483-90.

Kong U, Koo J, Choi K, Park J, Chang H. The expression of GAGE gene can predict aggressive biologic behavior of intestinal type of stomach cancer. **Hepatogastroenterology** 2004; 51:1519-23.

Kopp R, Ruge M, Rothbauer E, et al. Impact of epidermal growth factor (EGF) radioreceptor analysis on long-term survival of gastric cancer patients. **Anticancer Res** 2002; 22:1161-7.

Kosaka Y, Mimori K, Fukagawa T, et al. Identification of the high-risk group for metastasis of gastric cancer cases by vascular endothelial growth factor receptor-1 overexpression in peripheral blood. **Br J Cancer** 2007; 96:1723-8.

Kuzuhara T, Suganuma M, Kurusu M, Fujiki H. Helicobacter pylori-secreting protein Tipalpha is a potent inducer of chemokine gene expressions in stomach cancer cells. **J Cancer Res Clin Oncol** 2007; 133:287-96.

Kwon HC, Roh MS, Oh SY, et al. Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer. **Ann Oncol** 2007; 18:504-9.

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

Lee HK, Lee HS, Yang HK, et al. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in gastric cancer. **Int J Colorectal Dis** 2003; 18:518-25.

Lee KH, Kim JR. Regulation of HGF-mediated cell proliferation and invasion through NF- $\kappa$ B, JunB, and MMP-9 cascades in stomach cancer cells. **Clin Exp Metastasis** 2012; 29:263-72.

Le Galés-Camus C, Resnikoff S, Sepulveda C. **Palliative care: cancer control: knowledge into action**. Available from: <URL:<http://www.who.int/cancer/media/FINAL-Palliative%20Care%20Module.pdf>> [2012 jan 12].

Lenz H, Leichman C, Danaberg K, et al. Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival. **J Clin Oncol** 1996; 14:176-82.

Liang Z, Zeng X, Gao J, et al. Analysis of EGFR, HER2, and TOP2A gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients. **BMC Cancer** 2008, 8:363.

Lindman H, Aström G, Ahlgren J, et al. Individually tailored toxicity-based 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide (FEC) therapy of metastatic breast cancer. **Acta Oncol** 2007; 46:165-71.

Lokich JJ, Ahlgren JD, Gullo JJ, Philips JA, Fryer JG. A prospective randomized comparison of continuous infusion fluorouracil with a conventional bolus schedule in metastatic colorectal carcinoma: a Mid-Atlantic Oncology Program Study. **J Clin Oncol** 1989; 7:452-32.

Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. **Cancer Cell** 2004; 5:607-16.

Mayers C, Panzarella T, Tannock IF. Analysis of the prognostic effects of inclusion in a clinical trial and of myelosuppression on survival after adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. **Cancer** 2001; 91:2246-57.

Maiti AK. Gene network analysis of oxidative stress-mediated drug sensitivity in resistant ovarian carcinoma cells. **Pharmacogenomic** 2010; 10:94-104.

Matsubara J, Nishina T, Yamada Y, et al. Impacts of excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1), dihydropyrimidine dehydrogenase, and epidermal growth factor receptor on the outcomes of patients with advanced gastric cancer. **Br J Cancer** 2008; 98:832-9.

Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, et al. Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa. **Cancer Res** 2004; 64:1255-65.

Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. **J Clin Oncol** 1998; 16:309-16.

Miao J, Wang Z, Provencher H, et al. HOXB13 promotes ovarian cancer progression. **PNAS** 2007; 104:17093-8.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2010 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Registros de base populacional**. 2010. Disponível em: <URL:www.inca.gov.br/cancernobrasil/2010 [2011 nov 20]

Moch H, Schraml P, Bubendorf L, et al. Identification of prognostic parameters for renal cell carcinoma by cDNA arrays and cell chips. **Verh Dtsch Ges Pathol** 1999; 83:225-32.

Morowaki Y, Kunisaki C, Kobayashi S, et al. Progressive improvement of prognosis for patients with gastric cancer (dynamic stage grouping) with increasing survival interval from initial staging: How much can a given survival expect to live? **Surgery** 2003; 133:135-40.

Murad AM, Santiago FF, Petroianu A, Rocha PR, Rodrigues MA, Rausch M. Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer. **Cancer** 1993; 72:37-41.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. **Gastric cancer: versão 2.2011**. Available from: <URL:http://www.nccn.org> [2011 dez 21]

Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, et al. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma. **Cancer** 2001; 91:1876-881.

Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, et al. Let-7 MicroRNA Family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. **PLoS One** 2010; 5:e13247.

Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. **Am J Clin Oncol** 1982; 5:649-55.

Okines AF, Norman AR, McCloud P, Kang YK, Cunningham D. Metaanalysis of the REA1-2 and ML17032 trials: evaluating capecitabine-based combination chemotherapy and infused 5-fluorouracil-based combination chemotherapy for the treatment of advanced oesophago-gastric cancer. **Ann Oncol** 2009; 20:1529-34.

Okuyama T, Maehara Y, Kabashima A, Takahashi I, Kakeji Y, Sugimachi K. Combined evaluation of expressions of p53 and p21 proteins as prognostic factor for patients with gastric carcinoma. **Oncology** 2002, 63:353-61.

Ozkan M, Akbudak IH, Deniz K, et al. Prognostic value of excision repair cross-complementing gene 1 expression for cisplatin-based chemotherapy in advanced gastric cancer. **Asian Pac J Cancer Prev** 2010; 11:181-5.

Ougolkov A, Yamashita K, Bilim V, Takahashi Y, Mai M, Minamoto T. Abnormal expression of E-cadherin, beta-catenin, and c-erbB-2 in advanced gastric cancer: its association with liver metastasis. **Inter J Colorectal Dis** 2003; 18:160-6.

Park DI, Yun JW, Park JH, et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. **Dig Dis Sci** 2006; 51:1371-9.

Park JY, Park KH, Bang S, et al. CXCL5 overexpression is associated with late stage gastric cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 2007; 133:835-40.

Park DY, Han HS, Lauwers GY. Gastric carcinoma: classifications and morphologic variants. In: Tan D, Gregory YL, editors. **Advances in surgical pathology series: gastric cancer**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p.53-72.

Parkin DM. International variation. **Oncogene** 2004; 23:6329-40.

Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:9212-7.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406: 747-52.

Peter ME. Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression. **Cell Cycle** 2009; 8:843-52.

Pharoah PD, Guilford P, Caldas C, International Gastric Cancer Linkage Consortium. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutations carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. **Gastroenterology** 2001; 121:1348-53.

Pollack JR, Van de Rijn M, Botstein D. Challenges in developing a molecular characterization of cancer. **Semin Oncol** 2002; 29:280-5.

Prifti E, Zucker JD, Clement K, Henegar C. FunNet: an integrative tool for exploring transcriptional interactions. **Bioinformatics** 2008; 24:2636-8.

Pyrhönen S, Kuitunen T, Nyandoto P, Kouri M. A randomized phase III trial comparing fluorouracil, epidoxorubicin and methotrexate (FEMTX) with best supportive care in non-resectable gastric cancer. **Br J Cancer** 1995; 71:587-91.

Rao S, Cunningham D, Benson R, et al. A prospective study to evaluate the role of gene expression profiles (GEP) in predicting clinical outcome of patients receiving preoperative chemotherapy for oesophagogastric cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25(supl 20):4501.

Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. **N Engl J Med** 2002; 354:2463-72.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2010. Available from: <URL:<http://www.R-project.org>> [2011 maio 20]

Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. **Oncogene** 1994; 9:29-32.

Risbridger GP, Schmitt JF, Robertson DM. Activins and inhibins in endocrine and other tumors. **Endocr Rev** 2001; 22:836-58.

Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. **Gastric Cancer** 2002; 5 Suppl 1:5-11.

Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. **J Exp Med** 2001; 194:1639-47.

Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. **N Engl J Med** 2002; 346:1937-47.

Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. **Cancer Invest** 2001; 19:554-68.

Ross P, Nicolson M, Cunningham D, et al: Prospective randomized trial comparing mitomycin, cisplatin, and protracted venous-infusion fluorouracil (PVI 5-FU) with epirubicin, cisplatin, and PVI 5-FU in advanced esophagogastric cancer. **J Clin Oncol** 2002; 20:1996-2004.

Roth A, Malbach R, Martinelli G, et al. Docetaxel (Taxotere)-cisplatin (TC): an effective drug combination in gastric carcinoma. Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK), and the European Institute of Oncology (EIO). **Ann Oncol** 2000; 11:301-6.

Roth A, Malbach R, Fazio N, et al. 5-Fluorouracil as a protracted continuous intravenous infusion can be added to full-dose docetaxel (Taxotere), cisplatin in advanced gastric carcinoma: a phase I-II trial. **Ann Oncol** 2004; 15:759-64.

Roth AD, Fazio N, Stupp R, et al. Docetaxel, cisplatin, and fluorouracil; docetaxel and cisplatin; and epirubicin, cisplatin, and fluorouracil as systemic treatment for advanced gastric carcinoma: a randomized phase II trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research. **J Clin Oncol** 2007; 25:3217-23.

Saad AA, Awed NM, Abd Elkerim NN, ET al. Prognostic significance of E-cadherin expression and peripheral blood micrometastasis in gastric carcinoma patients. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:3059-67.

Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, et al. TM4 microarray software suite. **Methods Enzymol** 2006; 411:134-93.

Scheithauer W, Kornek G, Hejna M, et al. Palliative chemotherapy versus best supportive care in patients with metastatic gastric cancer: A randomized trial. **Ann Hematol** 1994; 73(Suppl 2):A181.

Scheiman JM, Cutler AF. Helicobacter pylori and gastric cancer. **Am J Med** 1999; 106:222-6.

Schena M, Shalon D, Davies RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science** 1995; 270:467-70.

Shen L, Zhu Z, Huang Y, et al. Expression profile of multiple aquaporins in human gastric carcinoma and its clinical significance. **Biomed Pharmacother** 2010; 64:313-8.

Schuell B, Gruenberger T, Kornek GV, et al. Side effects during chemotherapy predict tumour response in advanced colorectal cancer. **Br J Cancer** 2005; 93:744-8.

Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. **World J Gastroenterol** 2003; 9:1421-6.

Shi H, Lu D, Shu Y, Shi W, Lu S, Wang K. Expression of multidrug-resistance-related proteins P-glycoprotein, glutathione-S-transferases, topoisomerase-II and lung resistance protein in primary gastric cardiac adenocarcinoma. **Cancer Invest** 2008; 26:344-51.

Siewert JR, Bottcher K, Stein HJ, Roder JD and the German Gastric Carcinoma Study Group Relevant Prognostic Factors in Gastric Cancer Ten-Year Results of the German Gastric Cancer Study. **Ann Surg** 1998; 228:449-61.

Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2002; 8:591-5.

Sørbye T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast cancer distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:10869-74.

Tan BB, Li Y, Han J, et al. Relationship of cyclooxygenase-2 and multidrug resistance associated factors to chemosensitivities in gastrointestinal carcinomas. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban** 2010; 41:128-31.

Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase II-alpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. **Ann Oncol** 2005; 16:273-8.

Tanner M, Isola J, Scandinavian Breast Group Trial 9401, et al. Topoisomerase II-alpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. **J Clin Oncol** 2006; 24:2428-36.

Tsukuma H, Oshima A, Narahara H, et al. Natuara history of early gastric cancer: a non-concurrent, long term, follow up study. **Gut** 2000; 47:618-21.

Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, et al. Phase iii study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the v325 study group. **J Clin Oncol** 2006; 24:4991-7.

van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med** 2002; 347:1999-2009.

van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature** 2002; 415:530-6.

Vanhoefer U, Rougier P, Wilke H, et al. Final results of a randomized phase III trial of sequential high-dose methotrexate, fluorouracil, and doxorubicin versus etoposide, leucovorin, and fluorouracil versus infusional fluorouracil and cisplatin in advanced gastric cancer: A trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group. **J Clin Oncol** 2000; 18:2648-57.

Varis A, Zaika A, Puolakkainen P, et al. Coamplified and overexpressed genes at ERBB2 locus in gastric cancer. **Int J Cancer** 2004; 109:548-53.

Verma K, Gu J, Werner E. Tumor endothelial marker 8 amplifies canonical wnt signaling in blood vessels. **PLoSOne** 2011; 6:e22334.

Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, et al. Lin28 Enhances Tumorigenesis and is Associated with Advanced Human Malignancies. **Nat Genet** 2009; 41:843-8.

Wacker B, Nagrani T, Weinberg J, Witt K, Clark G, Cagnoni PJ. Correlation between development of rash and efficacy in patients treated with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib in two large phase III studies. **Clin Cancer Res** 2007; 13:3913-21.

Wagner AD, Grothe W, Haerting J, et al. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. **J Clin Oncol** 2006; 24:2903-9.

Wanebo HJ, Kenedy BJ, Chmiel J, et al. Cancer of the stomach. a patient care study by the American College of Surgeons. **Ann Surg** 1993; 218:583-92.

Webb A, Cunningham D, Scaffè J, et al. Randomised trial comparing epirubicin, cisplatin and fluorouracil versus fluorouracil, doxorubicin and methotrexate in advanced esophageal cancer. **J Clin Oncol** 1997; 15:261-7.

Xu H, Xu Y, Zhang W, Shen L, Yang L, Xu Z. Aquaporin-3 regulates metalloproteinases via PI3K/AKT signal pathway in human gastric carcinoma SGC7901 cells. **J Exp Clin Cancer Res** 2011; 30:86.

Xue YW, Zhang GF, Zhu ZB, Wang Q, Fu SB. Expression of cyclooxygenase-2 and clinicopathologic features in human gastric adenocarcinoma. **World J Gastroenterol** 2003; 9:250-3.

Yun J, Kim KM, Kim ST, et al. Predictive Value of the ERCC1 Expression for Treatment Response and Survival in Advanced Gastric Cancer Patients Receiving Cisplatin-based First-line Chemotherapy. **Cancer Res Treat** 2010; 42:101-6.

Zafirellis K, Karameris A, Milingos N, Androulakis G. Molecular markers in gastric cancer: can p53 and bcl-2 protein expressions be used as prognostic factors? **Anticancer Res** 2005; 25:3629-36.

Zali MR, Moaven O, Asadzadeh Aghdaee H, et al. Clinicopathological significance of E-cadherin,  $\beta$ -catenin and p53 expression in gastric adenocarcinoma. **J Res Med Sci** 2009; 14:239-47.

Zhang YZ, Zhang LH, Gao Y, et al. Discovery and validation of prognostic markers in gastric cancer by genome-wide expression profiling. **World J Gastroenterol** 2011; 17:1710-7.

Zhao G, Guo LL, Xu JY, Yang H, Huang MX, Xiao G. Integrin-linked kinase in gastric cancer cell attachment, invasion and tumor growth. **World J Gastroenterol** 2011; 17:3487-96.

Zhong XY, Zhang LH, Jia SQ, et al. Positive association of up-regulated Cripto-1 and down-regulated E-cadherin with tumour progression and poor prognosis in gastric cancer. **Histopathology** 2008; 52:560-8.

Zhou YN, Xu CP, Han B, et al. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. **World J Gastroenterol** 2002; 8:987-93.

## Anexo 1 - Aprovação do CEP/ICC



Fortaleza, 29 de outubro de 2009.

**Processo 061/2009:** Correlação entre resposta objetiva e a expressão gênica e imunohistoquímica em pacientes com cânceres gástricos metastáticos submetidos à quimioterapia paliativa à base de platina e fluoropirimidinas.  
**Pesquisador (a) Responsável:** Rosane Oliveira de Sant' Ana

Levamos ao seu conhecimento que o projeto de sua responsabilidade, acima referenciado, foi apresentado na reunião do CEP, de 29/10/2009, merecendo o seguinte parecer: **aprovado**, e, portanto podendo entrar em execução.

Atenciosamente,

**MARCELO GURGEL CARLOS DA SILVA**  
PRESIDENTE DO CEP/ECO/ICC

## Anexo 2 - ECOG PERFORMANCE STATUS\*

<b>Escore</b>	<b>Características</b>
0	Totalmente ativo e capaz de desempenhar todas as atividades de antes da doença sem restrições.
1	Apresenta restrições sob atividade física forçada, mas é ambulatorial e capaz de trabalhos leves ou de natureza sedentária, como de escritório.
2	Ambulatorial e capaz de se cuidar, mas incapaz de realizar atividades profissionais. Mais de 50% de tempo sob repouso durante 24h.
3	Capaz de se cuidar com limitações, confinado a cama ou cadeira por mais de 50% do dia.
4	Completamente incapacitado. Não se cuida sozinho. Totalmente confinado à cama ou cadeira.
5	Morte

**Fonte:** Modificado de OKEN et al. (1982).

### Anexo 3 - Critérios de Toxicidade Comum do NCI

<b>Grau</b>					
<b>TOXICIDADE</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
Leucócitos	≥ 4,0	3,0 - 3,9	2,0 - 2,9	1,0 - 1,9	< 1,0
Plaquetas	D.L.N.	75,0 - Normal	50,0 - 74,9	25,0 - 49,9	<25,0
Hemoglobina	D.L.N.	10,0 - Normal	8,0 - 9,9	6,5 - 7,9	< 6,5
Granulócitos	≥ 2,0	1,5 - 1,9	1,0 - 1,4	0,5 - 0,9	< 0,5
Linfócitos	≥ 2,0	1,5 - 1,9	1,0,- 1,4	0,5 - 0,9	< 0,5
Hemorragia (Clínica)	ausente	leve, sem transfusão	grande, 1 -2 uni de transfusão por episódio	grande, 3 -4 unid de transfusão por episódio	massiva, > 4 unid de transfusão por episódio
Infecção	ausente	Leve	moderada	grave	com risco de vida
Náuseas	ausente	ingesta razoável	ingesta diminuída, mas pode comer	sem ingesta	---
Vômitos	ausente	1 x dia	2 - 5 x dia	6 – 10 x dia	> 10 x dia ou com necessidade de suporte parenteral
Diarréia	ausente	2 -3 x dia	4- 6 x dia ou noturnas, ou cólicas moderadas	7 -9 x dia ou incontinência, ou cólicas graves	≥ 10 evacuações/dia, ou com sangue ou necessidade de suporte parenteral
Estomatite	ausente	úlceras indolores, ou eritema leve	eritema, edema, ou úlcera dolorosos, mas pode comer	eritema, edema ou úlcera dolorosos, e não pode comer	exige suporte parenteral ou enteral
Bilirrubina	D.L.N.	---	< 1,5 x N	1,5 - 3,0 x N	> 3,0 x N
Transaminases	D.L.N.	≤ 2,5 x N	2,6 - 5,0 x N	5,1 - 20,0 x N	> 20,0 x N
FA	D.L.N.	≤ 2,5 x N	2,6 - 5,0 x N	5,1 - 20,0 x N	> 20,0 x N
Fígado/Clínico	inalterado	---	---	pré-coma	coma hepático

D.L.N.: DENTRO DOS LIMITES DO NORMAL

Grau					
TOXICIDADE	0	1	2	3	4
Creatinina Proteinúria Hematúria	D.L.N.  s/ alteração  negativo	< 1,5 x N  1+ ou < 0,3g% ou < 3g/l  somente micro	1,5 - 3,0 x N  2 - 3+ ou 0,3 - 1,0 g% ou 3-10  grande, sem coágulos	3,1 - 6,0 x N  4+ ou > 1,0 g% ou >10 g/l  grande, com coágulos	> 6,0 x N  síndrome nefrótica  requer transfusão
Alopecia	sem queda	Perda leve	queda intensa ou total	—	—
Pulmonar	ausente ou sem alt.	assintomático c/TFP anormal	dispnéia sob gde esforço	dispnéia mínimos esforços	dispnéia em repouso
Arritmias Cardíacas	ausente	assintomático, transitório	recorrente ou persistente, sem terapia	requer tratamento	requer monitoração/instab ilidade
Função Cardíaca	ausente	assintomático, F.E.V.E. com queda < 20% basal	assintomático, queda F.E.V.E. > 20% basal	I.C.C. leve, responsiva a terapia	I.C.C. grave ou refratária
Cardíaca - Isquemia	ausente	achatamento da onda T não- específico	assintomático, alterações sugerindo isquemia	angina, sem evidência de infarto	infarto agudo do miocárdio
Cardíaca - Pericárdico	ausente	Assintomático , efusão, sem intervenção	pericardite,(atri to,dor e alterações no ECG)	Sintomático efusão, requer drenagem	tamponamento; requer drenagem
Hipertensão	ausente ou sem alteração	assintomático, transitório > 20 mmHg (D) ou p/ > 150/100 se basal nl. Sem tratamento.	recorrente ou aumento > 20 mmHg (D) ou p/ > 150/100 se DLN antes. Sem tratamento.	requer tratamento	crise hipertensiva

Hipotensão	ausente ou sem alteração	alterações sem necessidade de terapia (ortostática transitória)	requer reposição hídrica ou outra terapia, mas sem hospitalização	requer terapia hospitalização se nl até 48 h após interrupção do agente	requer terapia e hospitalização por > 48 horas após interrupção do agente
<b>Grau</b>					
<b>TOXICIDADE</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Neuro-sensorial	ausente ou s/ alteração	parestesias leves, perda de reflexos do tendão profundo	perda sensorial objetiva leve a moderada, parestesias moderadas	perda sensorial objetiva grave ou parestesias que interferem com a função	---
Neuro-motor	ausente ou sem alteração	fraqueza subjetiva; s/ observações objetivas	fraqueza objetiva leve sem comprometimento significativo da função	fraqueza objetiva com comprometimento de função	Paralisia
Neuro-cortical	ausente	leve sonolência ou agitação	sonolência ou agitação mod	Alt. sensorio ou alucinações graves	coma, convulsões, psicose tóxica
Neuro-cerebelar	ausente	descoordenação leve, disdiadocines e	tremor, dismetria, fala dificultada, nistagmo	ataxia locomotora	necrose cerebelar
Neuro-humor	sem alteração	ansiedade leve ou depressão	ansiedade moderada ou depressão	ansiedade grave ou depressão	idéias suicidas
Neuro-cefaléia	ausente	leve	moderada ou grave, mas transitória	refratária e grave	--
Neuro-constipação	ausente ou usual	Leve	moderada	grave	íleo > 96 hs
Neuro-audição	ausente ou nl	perda somente na audiometria	tinido	Interfe com a função, mas corrigível	surdez incorrigível
Neuro-visão	ausente ou nl	---	---	sintomático, perda sub-total	Cegueira

Pele	ausente ou nl	Mácula dispersa ou pápula ou eritema assintomático	mácula dispersa ou pápular ou eritema sintomática	máculas, pápulas ou vesículas sintomáticas generalizadas	dermatite esfoliativa ou ulcerativa
------	---------------	--	---	--	-------------------------------------

D.L.N.: DENTRO DOS LIMITES DO NORMAL

<b>Grau</b>					
<b>TOXICIDADE</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Local de infusão	ausente	Dor	inflamação ou flebite	ulceração	cirurgia plástica
Alt. de Peso	< 5,0 %	5,0 - 9,9 %	10,0 - 19,9%	≥ 20,0%	
Hiperglicemia	< 116	116 – 160	161 - 250	251 - 500	> 500 ou cetoacidose
Hipoglicemia	> 64	55 – 64	40 - 54	30 - 39	< 30
Amilase	D.L.N.	< 1,5 x N	1,5 - 2,0 x N	2,1 - 5,0 x N	≥ 5,1 x N
Hipercalcemia	< 10,6	10,6 - 11,5	11,6 - 12,5	12,6 - 13,5	≥ 13,5
Hipocalcemia	> 8,4	8,4 - 7,8	7,7 - 7,0	6,9 - 6,1	≤ 6,0
Hipomagnesemia	> 1,4	1,4 - 1,2	1,1 - 0,9	0,8 - 0,6	≤ 0,5
Fibrinogênio	D.L.N.	0,99 - 0,75 x N	0,74 - 0,50 x N	0,49 - 0,25 x N	≤ 0,24 x N
Tempo de Protrombina	D.L.N.	1,01 - 1,25 x N	1,26 - 1,50 x N	1,51 - 2,00 x N	> 2,00 x N
TPTA	D.L.N.	1,01 - 1,66 x N	1,67 - 2,33 x N	2,34 - 3,00 x N	> 3,00 x N
Alergia	ausente	erupções transitórias; febre medicamentosa < 38o C	urticária, febre medicamentosa 38o C Cbroncoespasm o leve	doença do soro, broncoespasmo, requerendo medidas	Anafilaxia
Febre sem infecção	ausente	37,1 - 38o C,	38,1 - 40o C,	> 40o C por menos de 24 horas	> 40o + 24 horas ou febre acompanhada de hipotensão

#### **Anexo 4 - Avaliação de Resposta**

- Resposta Completa (RC): Desaparecimento de todas as lesões-alvo. No caso de linfonodos, se houve redução de seu menor diâmetro para menos de 10mm.
- Resposta Parcial (PR): Diminuição de, no mínimo, 30% na soma dos diâmetros das lesões-alvo, tendo como referência a soma de seus diâmetros no momento anterior ao tratamento.
- Doença Progressiva (PD): aumento de pelo menos 20% na soma dos diâmetros das lesões-alvo, tendo como referência a menor soma durante todo o estudo (pode ser ou não o de baseline, se esse for o menor do estudo). Além disso, configura PD aumento absoluto maior que 5mm de uma ou mais lesões-alvo ou aparecimento de novas lesões.
- Doença estável (DE): Qualquer diminuição que não configure RP ou aumento que não configure PD, tomando como referência o menor diâmetro enquanto no estudo.

**Apêndice 1 – Ficha Clínica**

**CORRELAÇÃO ENTRE RESPOSTA OBJETIVA E A EXPRESSÃO GÊNICA  
E IMUNOISTOQUÍMICA EM PACIENTES COM CÂNCERES GÁSTRICOS  
METASTÁTICOS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA PALIATIVA Á  
BASE DE PLATINA E FLUOROPIRIMIDINAS**

**Paciente** \_\_\_\_\_

**Iniciais** \_\_\_\_\_

**TCLE** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Prontuário** \_\_\_\_\_

- 1. Iniciais:**
- 2. Prontuário No.:**
- 3. Idade:**
- 4. Sexo: (0) masculino (1) feminino**
- 5. Data do diagnóstico de câncer gástrico: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**
- 6. Tipo histológico:** (0) carcinoma difuso
  - (1) Carcinoma intestinal
  - (2) misto
  - (3) adenocarcinoma SOE
  - (4) carcinoma SOE
- 7. Cirurgia prévia:** (0) não
  - (1) Sim, data da recidiva:
- 8. Intervalo livre de doença metastática ( ) meses**
- 9. Sítio de doença**
  - 9.1. Local (0) não (1) sim
  - 9.2. Fígado (0) não (1) sim
  - 9.3. Linfonodo (0) não (1) sim
  - 9.4. Pulmão (0) não (1) sim
  - 9.5. Peritônio (0) não (1) sim
  - 9.6. SNC (0) não (1) sim
  - 9.7. Ossos (0) não (1) sim
- 10. Avaliação pré- tratamento:**
  - 10.1. Anamnese:**

Perda de Peso: ( 0 ) não (1) sim, não especificado  
( ) Kg em 6 meses

Sangramento digestivo: (0) não (1) sim

Disfagia: (0) não (1) sim

Dor: (0) não (1)sim – VAS\_\_\_\_\_

Vômitos (grau): (0) (1) (2) (3)

**7.2.6.** Procedimento para dieta:

(0) não (1) sim, qual \_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**7.2.7.** Dieta enteral (0) não (1) sim

**7.2.8.** Outros:

### **7.3. Exame físico:**

Geral: Peso \_\_\_ Kg

Altura \_\_\_ m

ECOG \_\_\_

FR \_\_\_ rpm

FC \_\_\_ bpm

PA \_\_\_\_/\_\_\_\_ mmHg

BSA \_\_\_\_\_ m<sup>2</sup>

Pele:

Cabeça e pescoço:

Endócrino:

Hematológico:

Gastrointestinal:

Cardiovascular:

Respiratório:

Musculoesquelético:

Neurológico:

Psiquiátrico:

### **7. 4. Exames Complementares:**

**Laboratório** ( \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_):

Eritograma: Hb \_\_\_ Ht \_\_\_ He \_\_\_

Leucograma \_\_\_/mm<sup>3</sup>

Diferencial: Eos \_\_\_%

Bt \_\_\_%

Seg \_\_\_%

Linf \_\_\_%

Mono \_\_\_%

Contagem de plaquetas: \_\_\_/mm<sup>3</sup>

Uréia \_\_\_ Creatinina \_\_\_ TGO \_\_\_ TGP \_\_\_

Bilirrubinas: T \_\_\_ D \_\_\_ I \_\_\_ FA \_\_\_

Albumina \_\_\_ TAP \_\_\_ CEA \_\_\_ HCG \_\_\_

Sódio \_\_\_ Potássio \_\_\_ Magnésio \_\_\_ Cálcio \_\_\_

Glicemia \_\_\_

Sumário de urina \_\_\_

**EDA**

( \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Amostra para cDNA:** ( 0 ) não ( 1 ) sim

**Coleta sanguínea:** ( 0 ) não ( 1 ) sim

## 8. Avaliação Inicial de doença:

Lesões-Alvo:

Lesão	Localização	Dimensões	Método	Data
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				

Soma das lesões: \_\_\_mm (Baseline)

Lesões não mensuráveis/não alvo:

1.Local:

2.Local:

3. Local

## 9. TRATAMENTOS:

**Quimioterapia paliativa:**

Drogas/doses:

(1) CF

(2) ECF

(3) CX

(4) EOX

(5) DCF

(6) ECX

## CICLO 1

### DATA:

### Exame físico:

Peso\_\_\_\_\_ Kg      Altura\_\_\_\_\_mBSA\_\_\_\_\_m<sup>2</sup>

ECOG \_\_\_\_\_ FC \_\_\_\_\_ bpm      PA \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg

Temperatura\_\_\_\_\_

Pele:

Cabeça e pescoço:

Endócrino:

Hematológico:

Gastrointestinal:

Cardiovascular:

Respiratório:

Musculoesquelético:

Neurológico:

Psiquiátrico:

### Medicações concomitantes:

**Droga**

**Posologia**

**Duração**

**Razão**

---

---

---

---

---

---

---





**Medicações concomitantes:**

<b>Droga</b>	<b>Posologia</b>	<b>Duração</b>	<b>Razão</b>
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

**Exames laboratoriais (72hs antes do D1)**

Hematimetria: Hb \_\_\_ Ht \_\_\_ He \_\_\_\_\_

Leucograma \_\_\_\_\_/mm<sup>3</sup>

Diferencial: Eos \_\_\_%

Bt \_\_\_%

Seg \_\_\_%

Linf \_\_\_%

Mono \_\_\_%

Contagem de plaquetas: \_\_\_\_\_/mm<sup>3</sup>

Uréia \_\_\_ Creatinina \_\_\_ TGO \_\_\_ TGP \_\_\_

Bilirrubinas: T \_\_\_ D \_\_\_ I \_\_\_ FA \_\_\_

**Realizado:** ( 0 ) não ( 1 ) sim , razão:

**Atrasado:** ( 0 ) não ( 1 ) sim, razão:

**Redução de dose** ( 0 ) não ( 1 ) sim, razão:

**11. Avaliação de Resposta**

Lesões-Alvo

Lesão	Localização	Dimensões	Método	Data
1				
2				
3				
4				
5				

**Soma das lesões: \_\_\_ mm**

**Lesões não mensuráveis/não alvo:**

**1.Local:**

**2.Local:**

**3. Local**

**Diferença em relação ao Baseline: \_\_\_ mm/ \_\_\_ %**

**Resposta: (0) PD (1) DE (2) RP (3) RC    Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

## **12. Suspensão do tratamento**

Razão: (0) Completou esquema

(1) Atingiu resposta máxima

(2) Toxicidade grau  $\frac{3}{4}$ , qual:

(3) Progressão de doença

(4) Óbito, data:

(5) Decisão do paciente

### **13. SEGUIMENTO**

**Visita de seguimento**\_\_\_\_\_

**Data:**

**Queixas:**

**Achados físicos:**

**Exames complementares:**

**Progressão** ( 0 ) não ( 1 ) sim, data:

**Status:** ( 0 ) vivo (a) sem doença

(1) vivo (a) com doença

(2) morto (a) sem doença, data:

( 3 ) morto (a) com doença, data:

## Apêndice 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido

---

Hospital do Câncer do Ceará-ICC  
Rua Papi Junior, 1222  
Fortaleza-CE CEP 60430-230

Este formulário de consentimento contém informações a respeito do projeto de pesquisa que está sendo proposto para você pelo seu médico. Uma vez compreendido o plano de estudo e havendo o seu interesse em participar do mesmo, será solicitada a sua assinatura no Consentimento pós-informado. Você receberá uma cópia para seu arquivo. Se você achar adequado, consulte outros profissionais (médicos ou não) antes de assinar este documento.

### **Proposta de estudo**

Você está sendo consultado para colaborar com esse projeto de pesquisa por ter câncer de estômago com metástases e ter indicação pela equipe médica que lhe encaminhou e/ou que lhe acompanha de realizar quimioterapia antineoplásica (terapia anticâncer com medicamentos). Já se sabe que pacientes na sua situação se beneficiam do uso desse tipo de tratamento, pois após serem submetidos a ela apresentam redução do tamanho de seu tumor, com conseqüente melhora de seus sintomas, além de terem melhora no tempo de vida em comparação com pacientes que não a realizam. Apesar desses benefícios já terem sido comprovados em vários estudos ao longo do mundo e já ser considerado de rotina, nem todos os pacientes que se o fazem obtêm esses resultados benéficos. Uma das razões para isso consiste no fato de que os tumores malignos podem apresentar uma maior resistência às medicações disponíveis. Essa resistência é causada por características genéticas do tumor. Usualmente não há como selecionar ou definir quais pacientes com câncer gástrico irão ter bons resultados com a quimioterapia. Atualmente todos os pacientes devem receber sempre que possível o tratamento e serem, de tempos em tempos, avaliados com exame clínico e com exames para saberem se o tratamento está sendo eficaz. Caso o tumor diminua, o tratamento é mantido e caso esteja crescendo ele é suspenso ou trocado por outro. Obviamente as medicações utilizadas têm efeitos colaterais, ou seja, causam sintomas outros não desejados, que podem ser leves ou graves. O presente projeto não consiste em experimentar em você nem um novo tratamento. O objetivo desse projeto é conhecer as características genéticas de tumores de estômago de pacientes como você que irão realizar quimioterapia. A partir desse conhecimento tentaremos selecionar algumas dessas características com a resposta que seu tratamento causou em você. Dessa forma podemos descobrir num futuro próximo uma forma de saber, antes de iniciar a quimioterapia se o paciente terá benefício com ela, evitando realizar um tratamento potencialmente tóxico e potencialmente ineficaz.

### **Plano de estudo**

Para a realização desse estudo você deverá ter diagnóstico de câncer de estômago com metástases e ter recebido a indicação médica de realizar quimioterapia com pelo menos duas drogas – platina e fluoropirimidinas – essas drogas são as que juntas determinam as melhores respostas em doenças como a sua. Antes do início desse tratamento o que necessitamos para esse estudo consiste primordialmente na coleta de pequenas amostras de seu tumor. Normalmente essa coleta se faz através de uma endoscopia digestiva alta, um exame médico.

Mesmo que você já tenha sido submetido antes a uma biópsia, uma vez no estudo terá que realizá-la novamente. A razão para isso consiste no fato de que a quantidade de tumor e a forma de armazenamento e processamento das amostras obtidas para o diagnóstico não são as mesmas

---

para análise da expressão genética. Será também retirado volume de 10m de sangue antes do tratamento para avaliarmos se há presença de substâncias que indicam uma resposta do organismo à presença da neoplasia. Esse tipo de estudo busca identificarmos marcadores da agressividade, de chance de recidiva e de resposta às drogas atualmente disponíveis para esse tipo de neoplasia, somente com exames de sangue.

Basicamente as coletas de sangue e de amostras tumorais são as únicas intervenções fora da rotina de tratamento de pacientes como você, daí a necessidade de seu consentimento para prosseguirmos o estudo. Além desses exames todos os outros que você realizará, bem como seu tratamento, não mudarão independentemente de estar participando ou não do estudo. Os dados relativos aos resultados desses exames que buscam basicamente saber quais as suas características clínicas e de seu tumor, como você tolera e o quanto está se beneficiando de seu tratamento são do interesse do estudo e serão registrados em fichas individuais confidenciais que serão mantidas em arquivo próprio nessa instituição (Instituto do Câncer do Ceará).

Normalmente pacientes que irão realizar quimioterapia são submetidos inicialmente a uma avaliação que consiste na realização de exames de sangue, radiológicos (Raios X, Tomografias de abdome e se necessário de tórax) que vão indicar suas condições clínicas e a extensão do seu tumor.

Após essas avaliações iniciais, o paciente inicia o tratamento. Este consistirá de aplicações na veia e/ou oral de pelo menos duas medicações das opções abaixo:

1. **Cisplatina, carboplatina ou oxaliplatina** (uma vez a cada três semanas por via venosa) associado a
2. **5-Fluorouracil** (por infusão venosa de 5 dias a cada 21 dias) ou **capecitabina** (por via oral durante 14 dias, a cada 21 dias).

A escolha das drogas acima ou a adição a elas de outras fica a cargo da equipe médica responsável por você e geralmente se baseia em suas condições clínicas de receber e tolerar.

Os possíveis efeitos tóxicos do tratamento incluem: aftas orais (com dificuldade variável para deglutição), diarreia, náuseas e vômitos, queda de cabelo, queda nos glóbulos sanguíneos (responsáveis pelas suas defesas, coagulação e oxigenação dos tecidos), sendo mais comuns e potencialmente graves as infecções que ocorrem durante esse período de queda. Por fim, existe a possibilidade de ocorrerem sintomas decorrentes de "neuropatia periférica", que incluem formigamento, dor em queimação, dores musculares e raramente, fraqueza muscular. Muitos dos exames de avaliação realizados antes e durante o estudo têm como objetivo o controle e prevenção de muitas dessas complicações e a equipe médica e de enfermagem do hospital estão habilitados a diagnosticar e tratar essas complicações.

Após o início do tratamento, você será periodicamente avaliado com novos exames (laboratoriais e radiológicos) com objetivo de saber se está o tumor está diminuindo ou não e de avaliar suas condições de continuar com o tratamento sem riscos. Tanto o tratamento como os exames são disponíveis e são realizados a nível ambulatorial do Hospital do Câncer-ICC.

### **Benefícios**

Apesar desse tipo de estudo ser realizado em várias partes do mundo em pacientes com outros tipos de câncer, e de alguns já terem causado grandes benefícios na escolha do melhor tratamento de outros tumores, os resultados desse presente estudo não beneficiarão diretamente você. Após a identificação desses marcadores genéticos a que o estudo se propõe, esses

---

precisarão se validados em novos estudos em outros pacientes antes de realmente poderem ser utilizados de rotina na população geral com câncer gástrico. Você não terá nenhum tipo de remuneração financeira ao aceitar este tratamento. Não existe nenhum tipo de indenização para complicações ou seqüelas causadas pelo tratamento.

#### **Custo Financeiro**

Uma vez que a realização desse tipo de tratamento ser considerada de rotina (independente de fazer parte do estudo a quimioterapia já é a principal indicação para o seu caso) em nosso serviço e em outros centros oncológicos, o custo do tratamento será de responsabilidade primária do paciente ou de seu seguro de saúde (plano de saúde ou Sistema Único de Saúde). As análises próprias do estudo, que consistem da coleta tumoral e sanguínea, bem como a análise das mesmas ficarão por conta do estudo através de incentivo financeiro de agências de incentivo a pesquisa.

#### **Direito de recusar e de se retirar do tratamento.**

A escolha de entrar ou não neste estudo é inteiramente sua. Caso você se recuse a participar deste estudo será tratado com a mesma abordagem sem nenhum tipo de preconceito pelo seu médico. Você tem o direito de se retirar deste estudo a qualquer momento. Se você decidir se retirar do estudo, você será tratada de maneira convencional pelos mesmos médicos, sem nenhum tipo de preconceito.

#### **Amostras de tecido para análises genéticas**

Como já citado esse estudo busca o conhecimento das alterações do material genético que compõe as células do seu tumor de forma a tentar identificar um perfil de comportamento de neoplasias como a sua. Esse conhecimento terá impacto na melhor definição do melhor tratamento a ser administrado para pessoas com o seu mesmo problema. O material coletado do seu tumor através de endoscopia e de seu sangue será armazenado e, em seguida, processado nessa Instituição sob identificação que só será acessada pelos pesquisadores autorizados para esse projeto. Não será permitida a consulta ou divulgação de seus dados pessoais individuais, nem de prontuários ou dos resultados das análises aqui previstas para terceiros, incluindo empregadores e empresas seguradoras em qualquer hipótese. Caso após o processamento e estudo desse material, ainda restar qualquer amostra sua, essa será armazenada em condições adequadas, sob sigilo e não poderá ser utilizada em outros projetos de pesquisa a não ser que você autorize e que o Comitê de Ética em Pesquisa também o faça. Os resultados dos estudos que pretendemos realizar com as amostras de tecido, ou qualquer informação sua jamais serão utilizados de forma a tratá-lo diferentemente ou discriminá-lo. Os resultados das análises não causarão em mudança no seu tratamento, nem tampouco sobre a vida de seus familiares, porque não buscam nenhum tipo de padrão de hereditariedade dessa doença.

Esse projeto de pesquisa está sendo desenvolvido no contexto de um programa de pós-graduação (Doutorado) dessa Instituição em convênio com o Hospital AC Camargo da Fundação

---

Antônio Prudente em São Paulo-SP-Brasil, portanto, algumas das técnicas de análise das amostras teciduais terão que ser realizadas em laboratório de Genômica Funcional na referida Instituição que conta com grande respaldo científico e tecnológico para tal, no entanto, esse processo será realizado e controlado somente pelo pesquisador responsável e logo que concluídas deverão ser mantidas no Instituto do Câncer do Ceará. Deve-se ressaltar que esse material pertence e sempre pertencerá a você e em hipótese alguma lhe será negado o direito de eventualmente resgatá-lo.

O Comitê de Ética Médica do Hospital do Câncer do Ceará - ICC é o responsável legal para a certificação de que os direitos dos pacientes estejam protegidos. Este comitê analisou e aprovou este estudo.

Os investigadores responsáveis são: Dra. Rosane Oliveira de Sant'Ana (3288-4576/9984-5721) e Dr. Ronaldo Ribeiro (3288-4576/99887282) que você deverá contactar a qualquer momento em que enfrente qualquer problema relacionado ao estudo. Se você necessita de maiores informações a respeito do estudo antes de assinar o termo de consentimento, contacte os médicos acima.

#### DECLARAÇÃO DO MÉDICO OBTENDO CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu declaro que expliquei este protocolo de estudo, com todos os detalhes necessários para o (a) paciente (ou seu responsável legal) \_\_\_\_\_.

No meu julgamento, houve acesso a todas as informações disponíveis, incluindo os riscos e benefícios, para que se possa fazer uma decisão informada.

Assinatura do médico \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Nome do médico \_\_\_\_\_ CRM \_\_\_\_\_

#### DECLARAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

Eu declaro que li e compreendi a proposta de tratamento. Declaro também que discuti esta proposta pessoalmente com meu médico. Eu entendo os riscos da minha doença, o propósito do estudo, os métodos que serão utilizados e os riscos e benefícios do tratamento. Entendo também que a minha entrada neste estudo é voluntária.

Assinatura do (a) paciente \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Nome do (a) paciente \_\_\_\_\_ R.G. \_\_\_\_\_