

AVALIAÇÃO DA FAMÍLIA DO RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO NO CARCINOMA GÁSTRICO

EMY FUKUDA MARQUES

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Maria Dirlei Ferreira Souza
Begnami**

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Marques, Emy Fukuda

Avaliação da família do receptor de fator de crescimento epidérmico no carcinoma gástrico / Emy Fukuda Marques – São Paulo, 2010.

74p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Maria Dirlei Ferreira Souza Begnami

Descritores: 1. RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO. 2. RECEPTOR ERBB-2. 3. GENE EGFR. 4. CÂNCER DE ESTÔMAGO. 5. IMUNOISTOQUÍMICA. 6. HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA.

DEDICATÓRIA

A pequena Luana que me traz tantas alegrias e renova diariamente minha fé na vida.

Ao meu esposo, todo meu amor e gratidão por sua presença constante, apoio e paciência inesgotáveis.

Aos meus pais queridos por tanto amor, dedicação e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Dirlei por toda sua amizade, dedicação e atenção a esse projeto.

Ao Prof. Dr. Fernando A. Soares pelas breves e valiosas conversas que me mostraram o valor do comprometimento e do envolvimento pleno em todos os nossos projetos de vida.

Aos médicos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo que com tanta boa vontade me acolheram nesses poucos e tão proveitosos anos.

Aos incontáveis colaboradores da área técnica que me assistiram com tanta presteza em todas as ocasiões.

Ao SAME, em especial a querida Hirde e Dr. Torloni que permitiram meu acesso aos prontuários.

À equipe da Biblioteca da Fundação Antonio Prudente pela ajuda incansável.

Às secretárias da pós-graduação, Ana e Luciana por toda a paciência e amizade.

À Fundação Antônio Prudente / Hospital A.C. Camargo pela oportunidade de aprimoramento intelectual e científico.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

RESUMO

Marques EF. **Avaliação da família do receptor de fator de crescimento epidérmico no carcinoma gástrico**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

OBJETIVOS: A amplificação gênica e a expressão protéica dos membros da família HER (HER1-4) têm sido observadas em várias neoplasias. Há muitos estudos em EGFR e HER2 no carcinoma gástrico (CG), mas poucos envolvendo todos os receptores da família. O objetivo deste estudo foi determinar a expressão protéica e a amplificação gênica desses quatro receptores em amostras de CG e correlacionar com dados clínico-patológicos e sobrevida global. **MÉTODOS:** Este estudo foi realizado retrospectivamente em 221 CG fixados em formalina e processados em blocos de parafina utilizando as técnicas de imunoistoquímica (IHQ) e hibridização “in situ” por fluorescência (FISH). **RESULTADOS:** A positividade IHQ para EGFR, HER2, HER3 e HER4 (padrão de membrana 2+ ou 3+) foi evidenciada em 1,5%, 12%, 0,5% e 2% dos casos, respectivamente. Para HER3 e HER4, foram avaliados também os padrões citoplasmático e nuclear. Marcação citoplasmática moderada e intensa foi observada em 64% para HER3 e 23% para HER4. Marcação nuclear foi observada em 43% para HER3 e 2% para HER4. A amplificação gênica de *EGFR* foi evidenciada em 2% dos casos e de *HER2* em 8%, não tendo sido observada dos genes *HER3* e *HER4*. Não houve associação entre o status de EGFR e as variáveis clínico-patológicas. A expressão protéica de membrana (2+ ou 3+) e amplificação gênica de *HER2* foi mais freqüente nos carcinomas gástricos do tipo intestinal e CG bem e moderadamente diferenciados em comparação aos carcinomas difusos e pouco diferenciados ($p=0,002$ e $p<0.001$). A positividade citoplasmática para HER3 e HER4 foi observada mais freqüentemente nos tumores do tipo intestinal, CG bem e moderadamente diferenciados. Já o padrão nuclear dos mesmos

correlacionou-se com os carcinomas difusos. A sobrevida global em 5 anos foi pior nos CG com amplificação de *HER2* ($p = 0,018$), com marcação nuclear de *HER3* ($p=0,035$) e presença de invasões linfática ($p=0,011$) e vascular sangüínea ($p=0,002$). A marcação citoplasmática de *HER4* foi verificada mais freqüentemente nos tumores de estádios mais baixos (39% estadio I, 27% II, 20% III e 13% IV, $p=0,025$) e correlacionou-se com a ausência de invasão linfática, vascular sangüínea, infiltração perineural e metástase linfonodal. Os receptores avaliados não apresentaram valor prognóstico isolado nas análises multivariadas. **CONCLUSÃO:** Os dados sugerem que a expressão protéica dos quatro receptores da família HER ocorre nos CG em freqüências variadas. A amplificação de *EGFR* é rara e não foi identificada de *HER3* e *HER4*. A amplificação de *HER2* foi associada aos carcinomas gástricos do tipo intestinal e a expressão protéica de *HER4* foi associada a estágios iniciais da tumorigênese gástrica.

SUMMARY

Marques EF. **[Evaluation of epidermal growth factor receptor family in gastric cancer]**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

AIM: Gene amplification and overexpression of HER1-4 protein have been observed in several cancers. There are many reports about EGFR and HER2 in gastric carcinoma (GC), but few studies considering all receptors. The aim of this study was to determine overexpression and amplification of these four receptors in GC Brazilian patients and correlate with clinic-pathologic parameters and patient survival. **METHODS:** This study was performed retrospectively in 221 formallin-fixed paraffin-embedded GC samples by immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH). **RESULTS:** EGFR, HER2, HER3 and HER4 overexpression (2+ or 3+) was detected in 1,5%, 12%, 0,5% e 2% respectively. HER3 and HER4 cytoplasm and nuclear staining were also examined, resulting in higher percentage of positive cases in the former (64% versus 23% to cytoplasm staining and 43% versus 2% to nuclear staining). Gene amplification were observed in 2% to EGFR, 8% to HER2 and none to HER3 and HER4. No correlation was found between EGFR status and clinic-pathologic parameters. The intestinal type of GC exhibited significantly higher rate of HER2 overexpression (18% versus 0%, $p = 0,002$) and gene amplification (10% versus 0%, $p = 0,027$) than diffuse type. Tumors well and moderately differentiated also showed higher rate of HER2 overexpression and gene amplification (20% versus 5%, $p = 0,001$ and 13,9% versus 0,9%, $p = 0,000$). HER2 gene amplification was associated with poor global survival ($p = 0,018$). HER3 and HER4 cytoplasm staining were observed more frequently in intestinal type, well and moderately differentiated tumors, while the nuclear staining for both was observed in diffuse type tumors. HER3 nuclear staining was associated with poor global survival ($p = 0,035$) and lymphatic ($p=0,011$) and vascular

invasion ($p=0,002$). HER4 cytoplasm staining was detected more frequently in phase I-II disease than III-IV (TNM stage) – 39%, 27%, 20% and 13% respectively ($p=0,025$) and it was correlated with no lymphatic and vascular invasion, perineural invasion or node metastasis. None of these four receptors showed prognostic value in multivariate analysis. **CONCLUSION:** These data suggest that EGFR-family receptors overexpression occurs in GC in different frequencies, that probably HER3 and HER4 gene amplification does not occur in GC and also that HER4 is demonstrated in early stage of gastric tumorigenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Carcinomas gástricos do tipo intestinal de Lauren com imunoexpressão de EGFR em padrão de membrana.....	30
Figura 2	Carcinomas gástricos com imunoexpressão de HER2 em padrão de membrana.....	30
Figura 3	Carcinomas gástricos do tipo intestinal com imunoexpressão de HER3.....	31
Figura 4	Carcinomas gástricos com imunoexpressão de HER4 em padrão de membrana.....	31
Figura 5	Pesquisa de amplificação dos genes <i>EGFR</i> e <i>HER2</i> por FISH.....	34
Figura 6	Curvas de sobrevida de Kaplan Méier dos pacientes com carcinomas gástricos com e sem amplificação de <i>HER2</i>	51
Figura 7	Curvas de sobrevida de Kaplan Méier dos pacientes com carcinomas gástricos com e sem expressão nuclear de HER3.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados na imunoistoquímica.....	19
Tabela 2	Escores utilizados na avaliação da expressão proteica em membrana por IHQ	20
Tabela 3	Sondas utilizadas para FISH.....	21
Tabela 4	Principais características epidemiológicas e histopatológicas dos carcinomas gástricos.....	27
Tabela 5	Resultados da expressão protéica por imunoistoquímica dos marcadores no padrão de membrana.....	29
Tabela 6	Resultados da expressão protéica por imunoistoquímica dos marcadores nos padrões citoplasmático e nuclear.....	29
Tabela 7	Correlação entre a expressão protéica de EGFR e HER2 por IHQ com o padrão de amplificação gênica.....	33
Tabela 8	Correlação entre os resultados da expressão protéica no padrão de membrana com o número de cópias dos genes	35
Tabela 9	Correlação entre a expressão protéica e amplificação gênica de EGFR com as variáveis epidemiológicas e histopatológicas.....	37
Tabela 10	Correlação entre a expressão protéica e amplificação gênica HER2 com as variáveis epidemiológicas e histopatológicas.....	40

Tabela 11	Correlação entre a expressão protéica de HER3 com as variáveis epidemiológicas e histopatológicas	43
Tabela 12	Correlação entre a expressão protéica de HER4 com as variáveis epidemiológicas e histopatológicas.....	46
Tabela 13	Resultado da análise univariada dos parâmetros epidemiológicos e histopatológicos.....	49
Tabela 14	Resultado da análise univariada de EGFR, HER2, HER3 e HER4.....	50
Tabela 15	Resultado das análises multivariadas. Modelo de regressão de Cox.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

BTC	beta celulina
CG	carcinoma gástrico
CISH	hibridização <i>in situ</i> por cromógeno
EC	estádio clínico
EGF	fator de crescimento epidérmico
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
EP	epirregulina
FISH	hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
H. pylori	Helicobacter pylori
HB-EGF	do inglês, <i>heparin binding</i> -EGF
HNPCC	Câncer de cólon hereditário não-polipose
IHQ	imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
NGR	neurorregulina
NI	não informado
TGF-α	fator de crescimento transformador alfa
TMA	do inglês, <i>tissue microarray</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos gerais	2
1.2	A Família das Proteínas ERBB.....	6
1.2.1	Receptores	6
1.2.2	Ligantes	7
1.2.3	Dimerização.....	8
1.2.4	Transdução do sinal	9
1.3	Câncer Gástrico e a Família das Proteínas ERBB	9
1.4	Justificativa	11
2	OBJETIVOS	12
	Principais	13
	Secundários.....	13
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	14
3.1	Casuística.....	15
3.2	Variáveis Epidemiológicas e histopatológicas	16
3.3	Construção dos Tissue Microarray (TMA)	17
3.4	Imunoistoquímica	18
3.5	FISH	20
3.6	Análises Estatísticas.....	22
4	RESULTADOS	24
4.1	Casuística e Dados da Amostra	25
4.1.1	Características Epidemiológicas e Histopatológicas	25
4.1.2	Resultados das Expressões Imunoistoquímicas	28
4.1.3	Resultados da Avaliação da Amplificação por FISH.....	32
4.2	Correlação entre os Marcadores e as Variáveis Epidemiológicas e Histopatológicas	35
4.2.1	EGFR	35

4.2.2	HER2	38
4.2.3	HER3	41
4.2.4	HER4	44
4.3	Análises Univariadas	47
4.4	Análises Multivariadas	52
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÃO	66
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

O adenocarcinoma gástrico representa 90% das neoplasias que acometem o estômago (CREW e NEUGUT 2006). Observa-se uma redução em sua incidência, correspondendo atualmente à quarta neoplasia mais incidente mundialmente e à segunda causa de mortalidade associada a neoplasias, ultrapassada apenas pelo câncer de pulmão (LOCHHEAD e EL-OMAR 2008). A incidência anual no mundo corresponde a 1.4 milhão, com 1.1 milhão de mortes relacionadas ao carcinoma gástrico (CG), a maioria ocorrendo nos países em desenvolvimento (PARKIN et al. 2005; KAMANGAR et al. 2006). No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para 2010 é de 21.500 novos casos de CG, sendo 13.820 para os homens e 7.680 para as mulheres (Ministério da Saúde 2009). Este risco em dobro para o gênero masculino em relação ao feminino também se observa mundialmente (FORMAN e BURLEY 2006).

O *Helicobacter pylori*, bacilo gram-negativo, foi reconhecido como carcinógeno humano definitivo em 1994 pela Organização Mundial da Saúde e é o fator etiológico mais importante, aumentando em 2 a 6 vezes o risco de desenvolvimento de CG (ESLICK 2006; Helicobacter and Cancer Collaborative Group 2001), relacionando-se, principalmente, aos tumores distais (HUANG et al. 1998). No modelo de carcinogênese gástrica proposto

por CORREA (1996), a infecção pelo *H. pylori* desencadeia uma seqüência progressiva de lesões gástricas, progredindo de uma mucosa normal para gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma.

Dentre outros fatores relacionados à etiopatogenia do CG, estão incluídos o tabagismo que confere um risco relativo em torno de duas vezes (GONZÁLEZ et al. 2003; KOIZUMI et al. 2004) e história familiar positiva para CG, encontrada em 10 a 15% dos pacientes (BARBER et al. 2006). O CG é comprovadamente associado a síndromes genéticas tais como Câncer de Cólon Hereditário Não-Polipose (HNPCC) e Síndrome de Li-Fraumeni (LA VECCHIA et al. 1992).

Contrariamente, os fatores relacionados à dieta rica em frutas e vegetais frescos, sal ou compostos N-nitrosos, suplementação vitamínica e consumo de álcool, não exibem resultados conclusivos sobre a redução ou aumento do risco de carcinoma gástrico, nos estudos realizados (FORMAN e BURLEY 2006).

Historicamente, várias classificações histológicas foram propostas (MING 1977; GOSEKI et al. 1992; CARNEIRO 1997), entretanto, a mais utilizada continua sendo a de LAUREN (1965) que subdivide o adenocarcinoma gástrico em tipo intestinal ou bem diferenciado, tipo difuso ou pouco diferenciado e misto na presença de características tanto do primeiro como do segundo grupo. Os carcinomas do tipo intestinal são constituídos por estruturas glandulares ou papilares bem formadas, de crescimento expansivo, sendo mais comuns em indivíduos mais velhos, com predomínio no gênero masculino e raça negra. Os carcinomas do tipo difuso

são constituídos por células pouco coesas com crescimento infiltrativo sendo mais comuns em indivíduos mais jovens, com discreto predomínio no gênero feminino (MING 1998).

A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde – OMS (HAMILTON e AALTONEN 2000) reconhece quatro tipos principais: papilífero, tubular, mucinoso e em anel de sinete, além dos adenocarcinomas dos tipos intestinal e difuso.

A subdivisão dos adenocarcinomas gástricos baseada em sua localização proximal (cárdia) e distal (corpo, antro e piloro), é válida porque cada grupo mostra etiopatogenia e epidemiologia particulares. Os tumores de cárdia, embora minoria, demonstram incidência crescente nas últimas três décadas (BROWN e DEVESA 2002), especialmente nos países desenvolvidos e compartilham etiopatogenia semelhante ao adenocarcinoma esofageano distal (CREW e NEUGUT 2006), configurando dentre os seus fatores de risco, a obesidade e a doença do refluxo gastroesofágico (LINDBLAD et al. 2005).

O prognóstico do CG não se alterou muito ao longo dos anos, com uma taxa de sobrevida em 5 anos de 24% na Europa (BERRINO 2003) e países de outros continentes (VERDECCHIA et al. 2003), com exceção do Japão que apresenta a taxa de sobrevida em 5 anos superior a 50% devido aos programas de rastreamento e a alta taxa de diagnóstico precoce da neoplasia (PARKIN et al. 2005). O estudo realizado no Hospital A.C. Camargo – Brasil com pacientes atendidos entre os anos de 1988 a 1998, demonstrou uma sobrevida global em 5 anos de 36% (BEGNAMI 2007).

A sintomatologia tardia é presente em menos de 50% dos casos (AXON 2006), traduz-se em doença avançada no momento do diagnóstico, que somado ao grau histológico do tumor, constituem os principais fatores relacionados ao prognóstico.

O tratamento do CG é eminentemente cirúrgico, com a possibilidade de cura vinculada à ressecção completa do tumor (DEN DULK et al. 2006; CHO et al. 2007; SAITO et al. 2007), sendo indicado para os tumores em estádios T1s-T3N0-N2M0 ou T4N0M0 (CUTSEM et al. 2008). Ainda assim, 80% dos pacientes com margens cirúrgicas não comprometidas apresentam recorrência e morte pelo CG (MIDDLETON E CUNNINGHAM 1995).

A quimioterapia e a radioterapia têm um papel modesto no controle da doença avançada (MACDONALD et al. 2001; CUNNINGHAM et al. 2006; TSANG et al. 2007).

A utilização de terapia-alvo, como anticorpo monoclonal para inibição do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) – Cetuximab é comprovadamente eficaz no tratamento de carcinomas colo-retais e de cabeça e pescoço em estádios avançados (SALTZ et al. 2004). No CG, também parece trazer benefícios associados à quimioterapia convencional (FOLCETUX e DOCETUX) no tratamento da doença avançada (PINTO et al. 2007; STELLA et al. 2009). Foram demonstrados benefícios na utilização de Trastuzumab, anticorpo monoclonal que bloqueia HER2, associado a quimioterapia convencional em pacientes com doença localmente avançada, recidivada ou metastática, num grande estudo multicêntrico envolvendo 24 países e 3883 pacientes (CUTSEM et al. 2009).

1.2 A FAMÍLIA DAS PROTEÍNAS ERBB

A família das proteínas ERBB está entre as mais estudadas (MENDELSON e BASELGA 2000), fato que se justifica pelo papel central que desempenha na patogênese e progressão de vários carcinomas (NORMANNO et al. 2001). A família ERBB compreende quatro receptores tirosina quinases: EGFR (HER1/ERBB1), HER2 (neu/ERBB2), HER3 (ERBB3) e HER4 (ERBB4), e 13 ligantes (CITRI e YARDEN 2006): EGF (fator de crescimento epidérmico), TGF- α (fator de crescimento transformador- α), anfirregulina, HB-EGF (*heparin-binding*-EGF), BTC (betacelulina), EP (epirregulina), epigenina, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4 (neuroregulinas 1-4), NRG5 (tomorregulina) e NRG6 (epiglican).

1.2.1 Receptores

O receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) foi o primeiro receptor de tirosina quinase a ser descrito (CARPENTER et al. 1978). Pela homologia com o produto do gene eritroblastoma viral (v-erbB), os receptores foram denominados de ERBB1-4 (XU et al. 1984; ULLRICH et al. 1984; LIN et al. 1984). Todos guardam semelhanças em suas estruturas, sendo compostos por três domínios: extracelular, transmembrana e intracelular (GULLICK 2001). O domínio extracelular é o mais variável e o que confere diferente especificidade de ligação aos vários ligantes. É formado por quatro subdomínios, dois deles relacionados a ligação ao ligante (L1 e L2) e outros dois relacionados a dimerização com outro

receptor (S1 e S2) (BAZLEY e GULLICK 2005). É sabido que no modo inativo, os domínios ricos em cisteína S1 e S2, interagem entre si, enquanto que, em presença do ligante, há mudança na conformação do receptor, com liberação de S1 e exposição da alça de dimerização, possibilitando, então a ligação com outro receptor (GARRETT et al. 2002; OGISO et al. 2002). O domínio transmembrana corresponde a α -hélice que se continua com o subdomínio justamembranoso do domínio intracelular, constituído por outros dois subdomínios: o da proteína tirosina quinase e a cauda com seis resíduos de tirosina, onde se ligam as proteínas adaptadoras para a transdução do sinal (JORISSEN et al. 2003). Este é o domínio mais conservado entre os receptores da família. Existem, entretanto, algumas particularidades, que os diferenciam. O HER2 não se liga a nenhum ligante e é constitucionalmente ativo, por expor a alça de dimerização continuamente, o que faz com que seja o co-receptor preferido no processo de dimerização (KLAPPER et al. 1999), sendo considerado mais um potencializador da via de sinalização da família ERBB que propriamente um receptor (CITRI e YARDEN 2006). Já HER3 é defectivo, sem atividade tirosina-quinase (GUY 1994).

1.2.2 Ligantes

Todos os ligantes são sintetizados como proteínas glicosiladas transmembrana e precisam ser clivados por proteases na superfície celular para serem liberados como fatores de crescimento maduros. Esta via autócrina, utilizada pelas células tumorais foi citada inicialmente por DE

LARCO e TODARO (1978) e posteriormente por SPORN e ROBERTS (1985). Podem ser agrupados em três grupos, de acordo com o receptor ao qual se ligam (CASALINI et al. 2004; NORMANNO et al. 2006): 1) ligantes de EGFR (EGF, TGF- α e anfirregulina); 2) ligantes de EGFR e HER4 (EP, BTC e HB-EGF) e 3) ligantes de HER3 e/ou HER 4 (NRG1-4) que pode ser subdividido em dois subgrupos, um sendo os ligantes de HER3 e HER4 (NRG 1, NRG2), e o outro, os ligantes de HER4 (NRG3 e NRG4).

1.2.3 Dimerização

Como dito anteriormente, após a ligação do ligante ao receptor, este, por mudanças conformacionais, expõe a alça de dimerização e é capaz de ligar-se a outro receptor também ativado. São reconhecidos nove dímeros (homodímeros ou heterodímeros), que podem ainda, agrupar-se entre si para formação dos oligodímeros. A dimerização proporciona a transfosforilação dos vários resíduos de tirosina, entre os receptores, pela ativação de suas tirosinas quinases. Assim, a ativação das vias de transdução do sinal é desencadeada e a resposta celular alcançada (JORISSEN et al. 2003). O heterodímero HER2/HER3 é considerado o mais potente na transformação maligna, uma vez que é capaz de ativar tanto a via de proliferação (ras-raf-MAPK) como a de sobrevivência (PI3K-AKT) (CITRI et al. 2003) e ainda, escapa dos mecanismos de *downregulation*, conferindo uma sinalização mais prolongada (LENFERINK et al. 1998).

1.2.4 Transdução do sinal

As vias de transdução do sinal, envolvem proteínas adaptadoras/sinalizadoras (shc, Grb2, Grb7, Crk, NCK, PLC- γ), quinases intracelulares (Src, PI3K), proteínas tirosinas fosfatases (SHP1, SHP2), ubiquitina-ligase CblE3. A via ras-raf-MAPK pode ser ativada pelos quatro tipos de receptores, através de proteínas adaptadoras Grb2 ou CHIC. O mesmo ocorre para a via PI3K-AKT, mas nos receptores HER3 e HER4, o acoplamento se faz de forma direta, sem proteínas adaptadoras. Os fatores de transcrição que podem ser ativados incluem, dentro muitos, FOS, JUN, MYC, STAT, NF- κ B (NORMANNO et al. 2006).

1.3 CÂNCER GÁSTRICO E A FAMÍLIA DAS PROTEÍNAS ERBB

A expressão dos receptores e ligantes da família dos fatores de crescimento epidérmico foi demonstrada em várias neoplasias sólidas como, por exemplo, nos carcinomas não-pequenas células do pulmão, carcinomas de mama, cólon, bexiga, carcinoma de células escamosas de orofaringe e glioblastomas (SALOMON et al. 1995; NORMANNO et al. 2005). A co-expressão que ocorre entre os diversos receptores e de modo semelhante, entre os vários ligantes da família, pode ser considerada a regra, frente à elevada frequência observada, conferindo maior agressividade e pior prognóstico à neoplasia (BRABENDER et al. 2001; LEE et al. 2002; CHOW et al. 2001; NORMANNO et al. 2001; ABD EL-REHIM et al. 2004; DiGIOVANNA et al. 2005; WISEMAN et al. 2005).

No carcinoma gástrico, a maioria dos estudos realizados com os receptores de fatores de crescimento, envolveu EGFR e HER2.

A amplificação gênica de *EGFR* nos CG tem sido observada em 3-5% e imunoexpressão de EGFR tem sido demonstrada em 30-50% dos casos. A transdução do sinal leva a ativação das vias RAS/RAF/MAPK e AKT/mTOR, envolvidas na proliferação celular, apoptose, adesão, migração e diferenciação celular, que em suma, estão relacionadas ao comportamento neoplásico (ARKENAU 2009). Os tumores que expressam EGFR geralmente apresentam pior prognóstico.

A amplificação de *HER2* em CG ocorre em 10-20%, acompanhada da expressão protéica aumentada em 10-50%. Os tumores do tipo intestinal exibem com maior freqüência, positividade para HER2 que os do tipo difuso ou misto (TANNER et al. 2005; BANG et al. 2009). Há correlação da expressão de HER2 com menores taxas de sobrevida, maior recorrência e presença de metástases linfonodais (LIN et al. 2000).

A expressão protéica de HER3 nos CGs está associada aos parâmetros envolvidos na progressão tumoral, tais como a profundidade de invasão mural, comprometimento de linfonodos, presença de metástase à distância e doença recorrente, relacionando-se com pior sobrevida (HAYASHI et al. 2008). HER4 tem sido observado tanto nos CG precoces como avançados, sem qualquer valor prognóstico. Observa-se expressão protéica freqüente de HER3 e HER4 no CG, mas em padrão citoplasmático (58% e 84%, respectivamente) (HAYASHI et al. 2008).

1.4 JUSTIFICATIVA

O emprego de terapias alvo, como por exemplo, anticorpos monoclonais que se ligam aos receptores de fatores de crescimento - Cetuximab para EGFR e Trastuzumab para HER2 pode ser uma possibilidade terapêutica para o CG. Assim, estudar a família das proteínas ERBB no CG torna-se essencial. Uma abordagem ampla, que inclua todos os seus receptores para a avaliação da expressão protéica e amplificação gênica é inédita e se justifica pelo fato da co-expressão ser a regra em vários outros tumores.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS PRINCIPAIS

- Avaliar a expressão proteica de EGFR, HER2, HER3 e HER4 por IHQ no CG.
- Pesquisar a amplificação gênica de *EGFR*, *HER2*, *HER3* e *HER4* por FISH no CG.
- Correlacionar a expressão proteica e a amplificação gênica com:
 - Variáveis clínico-patológicas,
 - Prognóstico da doença.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Verificar padrões de co-expressão protéica entre os quatro receptores.
- Correlacionar os resultados da IHQ com FISH.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Realizou-se um estudo retrospectivo de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico, operados no Hospital A.C. Camargo no período compreendido entre os anos de 1998 a 2006; a partir do Banco de Dados do Departamento de Anatomia Patológica deste serviço.

Procedeu-se à revisão de prontuário médicos de pacientes junto ao Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) desta instituição.

Foram adotados como critérios de inclusão:

- Tumores submetidos à ressecção primária,
- Diagnóstico de adenocarcinoma gástrico confirmado pelo exame patológico
- Bloco de parafina representativo do tumor disponível em arquivo.
- Foram utilizados os seguintes critérios de exclusão:
- Tratamento neoadjuvante (quimioterapia e/ou radioterapia),
- Outro câncer concomitante ou prévio com menos de 5 anos, que necessitou quimioterapia e/ou radioterapia,
- Material insuficiente no bloco de parafina.

O projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A C Camargo em

22 de abril de 2008 (Projeto de Pesquisa nº 1067/08) e recebeu apoio financeiro da FAPESP (2009/06134-3).

Segundo os critérios citados, foram selecionados 221 casos para este estudo.

3.2 VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS

Foram obtidos a partir da revisão do prontuário e correspondem a:

- Dados demográficos: idade, gênero, raça e grau de escolaridade.
- História pregressa e/ou atual de tabagismo e/ou etilismo.
- História pregressa de neoplasia maligna.
- História familiar de CG envolvendo parentesco em primeiro grau.
- Tipo de tratamento realizado (cirurgia, terapias adjuvantes).
- Estadiamento patológico (TNM).
- Seguimento clínico: a partir da data da cirurgia até a data do óbito ou da última consulta em até 5 anos (60 meses).
- Características histopatológicas do tumor: localização, tamanho, classificação histológica de Lauren, grau de diferenciação, nível de infiltração mural, invasão vascular linfática e/ou sangüínea, infiltração perineural, infiltrado linfocítico intratumoral, comprometimento de linfonodos e comprometimento ou não da margem cirúrgica.

3.3 CONSTRUÇÃO DOS *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

Os blocos representativos dos tumores de casos selecionados para este estudo foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica. Novos cortes histológicos foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (HE). Ao exame de microscopia óptica, as áreas representativas do tumor foram identificadas e marcadas. Procedeu-se então à marcação do bloco de parafina (bloco doador) na área escolhida, com caneta permanente.

Utilizando o *tissue microarrayer* (Beecher Instrument, Silver Spring, MD, USA) foram extraídos os cilindros das áreas marcadas, e os mesmos transferidos para novos blocos de parafina (bloco receptor). Cada caso foi representado em duplicata, com a obtenção de dois cilindros de 1mm cada, de duas áreas distintas e representativas do tumor. Foram confeccionados 3 blocos de TMAs, contendo no total 221 casos de CG. Cortes histológicos destes blocos foram obtidos e dispostos em lâminas adequadas para posterior realização dos estudos de imunoistoquímica e FISH.

Sistema de coordenadas, a partir de tabelas em Excel, foi utilizado para a determinação e a identificação exata dos casos no TMA, tendo como referência o cilindro de tecido placentário.

3.4 IMUNOISTOQUÍMICA

O protocolo adotado no presente trabalho seguiu a padronização utilizada pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo que consiste em linhas gerais:

- 1 Obtenção de cortes histológicos de 3µm de espessura, dispostos em lâminas adesivas apropriadas e mantidos em estufa a 60°C por 24 horas,
- 2 Desparafinização das lâminas (através de sucessivos banhos em xilol e álcool absoluto),
- 3 Recuperação antigênica por calor, conforme recomendações do fabricante do anticorpo primário,
- 4 Bloqueio de peroxidase endógena com água oxigenada 10V, a 3%,
- 5 Bloqueio de proteínas inespecíficas (Protein Block-serum free, DAKO[®]),
- 6 Aplicação do anticorpo primário e incubação por 2 horas a temperatura ambiente,
- 7 Amplificação com utilização de polímero ADVANCE (DAKO[®]) seguida de incubação por 30 minutos, conforme orientações do fabricante,
- 8 Revelação com 3'3-tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB) (SIGMA[®]),
- 9 Contracoloração com hematoxilina de Harris,
- 10 Desidratação através de banhos sucessivos em álcool e xilol
- 11 Montagem das lâminas (Entellan – MERK[®])

**** OBSERVAÇÃO:** entre cada etapa do processo, foram realizados múltiplos banhos em água corrente ou solução tampão PBS, conforme a padronização local.

As reações foram acompanhadas de controles negativos e positivos. Os controles positivos utilizados foram tecido placentário normal para EGFR, e carcinomas mamários sabidamente positivos para HER2, HER3 e HER4. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por PBS durante a reação.

Os anticorpos utilizados, com suas respectivas marcas, clones e diluições estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados na imunoistoquímica.

ANTICORPO	MARCA	CLONE	DILUIÇÃO
HER-1	DAKO®	H11	1/100
HER-2	DAKO®	policlonal	1/1500
HER-3	Neomarkers®	policlonal	1/100
HER-4	Neomarkers®	policlonal	1/300

A avaliação imunoistoquímica foi realizada no microscópio óptico (OLYMPUS) por dois avaliadores distintos, sendo os resultados discordantes revistos conjuntamente para determinar um consenso. A representação tumoral mínima exigida para cada core foi de 90%. A interpretação dos resultados de EGFR, HER2, HER3 e HER4 para o padrão de membrana deu-se pelo sistema de escores 0, 1+, 2+ e 3+ conforme a Tabela 2 (HOFMANN et al. 2008). Procedeu-se a análise das marcações

citoplasmática e nuclear para os imunomarcadores HER3 e HER4, classificando-as em negativo na ausência de coloração ou coloração fraca em menos que 10% das células, positivo fraco, moderado e forte, se mais de 10% das células estivessem coradas conforme a intensidade observada (HAYASHI et al. 2008).

Tabela 2 – Escores utilizados na avaliação da expressão protéica em membrana por imunoistoquímica.

ESCORE	RESULTADO	PADRÃO IHQ
0	Negativo	Coloração ausente, ou coloração muito fraca de membrana é observada em menos que 10% das células
1+	Negativo	Coloração fraca e parcial de membrana é observada em mais que 10% das células
2+	Positivo fraco	Coloração fraca a moderada, mas completa de membrana é observada em mais que 10% das células
3+	Positivo	Coloração forte e completa de membrana é observada em mais que 10% das células

3.5 FISH

A hibridização *in situ* por fluorescência, seguiu as recomendações do fabricante das sondas de hibridização utilizadas de *EGFR*, *HER2*, *HER3* e *HER4* e o protocolo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, conforme descrito a seguir. A Tabela 3 mostra as sondas utilizadas.

Tabela 3 - Sondas utilizadas para FISH.

	SONDA	CENTRÔMERO	MARCA
EGFR	7p12	7	Vysis®
HER2	17q11.2-12	17	DAKO®
HER3	12q13	12	ZytoVision®
HER4	2q34	2	ZytoVision®

As hibridizações foram realizadas em ensaios de dois dias de duração. Os cortes histológicos de 5 µm de espessura foram colocados em lâminas de vidro cobertas com material adesivo. Em seguida foram submetidos a desparafinização com xilol quente (70°C) e frio (temperatura ambiente) por 20 minutos cada, seguidos de três passagens adicionais em xilol a temperatura ambiente por 5 minutos cada. Procedeu-se então a três passagens em álcool absoluto e lavagem em água destilada (3 banhos de 5 minutos cada). As lâminas foram colocadas em solução de 0,2N HCl por 20 minutos a temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente. As lâminas receberam pré-tratamento com Citrato, pH 6,0 em banho-Maria a 80°C por uma hora sendo então submetidas a digestão enzimática com pepsina (pronto para uso) por 8 minutos a temperatura ambiente. Após serem lavadas com solução 2x SSC por 2 minutos, desidratadas em álcool em concentrações crescentes (75%, 80% e 100% por 2 minutos cada), secas em temperatura ambiente por 45 minutos, seguido da aplicação da sonda (10µl, previamente diluída em tampão de hibridização do fabricante) e recobertas com lamínula e vedadas com material selante, as lâminas foram então colocadas no hibridizador (Hybridizer - DAKO®) para codenaturação da sonda e espécime por tempo e

em temperatura indicada pelo fabricante da sonda. Decorrido este tempo, as lâminas foram retiradas do hibridizador, removido o selante e mergulhadas em solução pré-aquecida de UREA/0,1 x SSC em banho-Maria a 45°C por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em solução 2x SSC por 2 minutos a temperatura ambiente, passando-as em álcool em concentrações crescente (75%, 80%, 100% por 2 minutos cada) para desidratação. As lâminas foram deixadas secando ao ar em ambiente escuro por 1 hora, para então proceder a contracoloração com 15 µl de DAPI e colocação da lamínula.

Procedeu-se a leitura das lâminas no microscópio óptico trinocular com fluorescência de mercúrio (OLYMPUS® BX41-FL-III), equipado com objetiva de imersão e com filtros adequados. As imagens obtidas foram capturadas com câmera digital colorida refrigerada (5.1 megapixel) acoplada ao microscópio, usando o programa para análise de imagem Image Pro Plus versão 6.0 (OLYMPUS®). Foram avaliados no mínimo, 30 núcleos por caso, sendo considerada amplificação gênica se a média da razão entre o número de sinais correspondentes ao locus cromossômico de interesse (espectro Orange) e ao locus de referência (espectro green) ≥ 2 . (KIM et al. 2007; HOFMANN et al. 2008; LIANG et al. 2008). Utilizou-se como controle interno das reações, os vasos sangüíneos identificados na coloração pelo DAPI.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados referentes ao levantamento de prontuários e aos resultados dos exames de imunoistoquímica e FISH foram associados em tabela Excel

2007 e transportados para o software *Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 17.0. A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pela medida de tendência central adequada: média ou mediana, com respectivos desvio-padrão ou intervalo interquartil, de acordo com a ocorrência de distribuição normal da amostra.

Para a análise da relação entre variáveis categóricas, utilizou-se o teste do qui-quadrado de Pearson, ou nos casos de frequências menores que cinco dentro de uma tabela de 2x2, o valor do qui-quadrado bi-caudal corrigido (teste de Fischer). Para a análise da relação entre variáveis quantitativas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Na análise univariada, calculou-se a taxa de sobrevida global em 5 anos para as diversas variáveis, sendo as curvas comparadas pelo teste de log-rank. Para tanto, considerou-se o intervalo transcorrido entre a data da cirurgia e a data de óbito de qualquer natureza. Classificaram-se sob censura os casos que permaneceram vivos até o término do estudo. As variáveis que foram estatisticamente significantes na análise univariada bem como as que tiveram $p < 0,20$ mas não atingiram o nível de significância de $p < 0,05$ foram incluídos para análise multivariada pelo modelo de risco proporcional de Cox para o qual se empregou a técnica de modelagem do tipo *stepwise forward selection*. Estimou-se o risco relativo por meio de *hazard ratio* obtido a partir do modelo multivariado. Para a conclusão das análises estatísticas, o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA E DADOS DA AMOSTRA

4.1.1 Características epidemiológicas e histopatológicas

A amostra compreendeu 137 homens e 84 mulheres, com a média de idade de 63 anos (mínima de 20 e máxima de 88 anos). A raça branca correspondeu a 75% da amostra e aproximadamente 60% dos pacientes eram analfabetos ou com 1º grau de escolaridade. Observou-se história familiar positiva para câncer gástrico em 31 de 187 pacientes pesquisados (16,6%). História pregressa e/ou atual de etilismo e tabagismo foi observada em freqüências de 21% e 58%, respectivamente.

Em relação às características histopatológicas do tumor, 175 casos corresponderam a tumores distais, medindo em média 5,6 cm (mínimo de 0,45 e máxima de 19,0 cm). Cento e dezessete casos foram de carcinomas do tipo intestinal, 76 do tipo difuso e 28 do tipo misto, segundo a classificação de Lauren. A maioria dos casos estudados correspondeu a tumores pouco diferenciados (59%). Tumores precoces, com nível de infiltração mural restrito a mucosa e/ou submucosa, perfizeram apenas 18%. Tumores com invasão até tecido adiposo corresponderam a 56% dos casos. A invasão vascular linfática foi evidenciada em 117 de 219 casos analisados (53%) e a sangüínea em 30 de 210 (14%). A infiltração perineural foi encontrada em 104 de 214 casos (49%). A densidade do infiltrado linfocitário

intratumoral analisada em 50 casos, foi leve em 22 deles e moderada a intensa nos 28 restantes. A grande maioria dos casos foi operada com margens cirúrgicas livres (94%), somente 6% dos casos apresentaram margens cirúrgicas comprometidas microscópica ou macroscopicamente. Em aproximadamente dois terços dos casos observou-se metástase linfonodal, tendo sido dissecado em média 32 linfonodos (1 - 125), com uma mediana de comprometimento de 3,5 linfonodos (0 - 103). Metástases à distância foram observadas em 16%. As principais características epidemiológicas e histopatológicas podem ser vistas na Tabela 4.

Tabela 4 - Principais características epidemiológicas e histopatológicas dos carcinomas gástricos.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	NÚMERO DE CASOS (%)
Idade		média = 63 anos (20-88)
Gênero	Masculino	137 (62)
	Feminino	84 (38)
Raça	Branca	166 (75)
	Amarela	33 (15)
	Negra	8 (4)
	NI*	14 (6)
Escolaridade	Analfabeto	15 (7)
	1º grau	115 (52)
	2º grau	36 (16)
	3º grau	32 (15)
	NI*	23 (10)
Localização	Proximal	28 (13)
	Distal	175 (79)
	Difuso	8 (4)
	Anastomose	10 (4)
Tamanho (cm)	≤ 2	26 (12)
	2 a 5	43 (19)
	> 5	149 (68)
	NI*	3 (1)
Tipo histológico-Laurén	Intestinal	117 (53)
	Difuso	76 (34)
	Misto	28 (13)
Grau de diferenciação	Bem	17 (8)
	Moderado	74 (33)
	Pouco	130 (59)
Nível de infiltração mural	Mucosa/submucosa	40 (18)
	Muscular/subserosa	35 (16)
	Tecido adiposo	123 (56)
	Órgãos adjacentes	23 (10)
Metástase linfonodal	Ausente	72 (33)
	Presente	149 (67)
Metástase à distância	Ausente	185 (84)
	Presente	36 (16)
Estadiamento Patológico	IA	30 (14)
	IB	20 (9)
	II	41 (19)
	IIIA	47 (21)
	IIIB	21 (9)
	IV	62 (28)

*NI: não informado

4.1.2 Resultados das expressões imunoistoquímicas

A expressão protéica de padrão de membrana para EGFR foi evidenciada em 3 casos (1,5%), sendo dois casos escore 3+ e um caso escore 2+. Para HER2 foram observados 24 casos positivos (12%), sendo seis casos com escore 3+ e dezoito casos com escore 2+. Somente um caso (0,5%) foi positivo para HER3 (escore 2+) e 3 casos (2%) para HER4 (escore 2+). No padrão de expressão citoplasmática foram observados 189 casos positivos (98%) para HER3 e 149 (85%) para HER4, sendo que a maioria dos casos positivos para HER3 exibiu marcação moderada ou intensa (64%), o que não se observou com HER4 (23%). Na avaliação da marcação nuclear, observou-se positividade para HER3 em 83 casos (43%) e para HER4 em 4 casos (2%). Estes dados são mostrados nas Tabelas 5 e 6.

Apenas um caso apresentou co-expressão protéica por imunoistoquímica no padrão de membrana entre HER2 e HER4, ambos com positividade 2+. Co-expressão no padrão de membrana para os outros marcadores não foi observada.

As Figuras 1, 2, 3 e 4 ilustram alguns padrões de imunoexpressão de EGFR, HER2, HER3 e HER4.

Tabela 5 - Resultados da expressão protéica por imunoistoquímica dos marcadores no padrão de membrana.

	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	
IHQ	escore 0 (%)	escore 1+ (%)	escore 2+ (%)	escore 3+ (%)	Total
EFGR	193 (98)	1 (0,5)	1 (0,5)	2 (1)	197
HER2	103 (50)	80 (38)	18 (9)	6 (3)	207
HER3	189 (99,5)	1 (0,5)	1 (0,5)	0 (0)	191
HER4	149 (82)	29 (16)	3 (2)	0 (0)	181

Tabela 6 - Resultados da expressão protéica por imunoistoquímica dos marcadores nos padrões citoplasmático e nuclear.

		Positivo	Positivo	Positivo	
IHQ	Negativo (%)	fraco (%)	moderado (%)	intenso (%)	Total
HER3 CITO	4 (2)	65 (34)	108 (56)	16(8)	193
HER4 CITO	28 (15)	114 (62)	36 (20)	5 (3)	183
HER3 NUCLEAR	110 (57)	18 (9)	33 (17)	32 (17)	193
HER4 NUCLEAR	176 (98)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	180

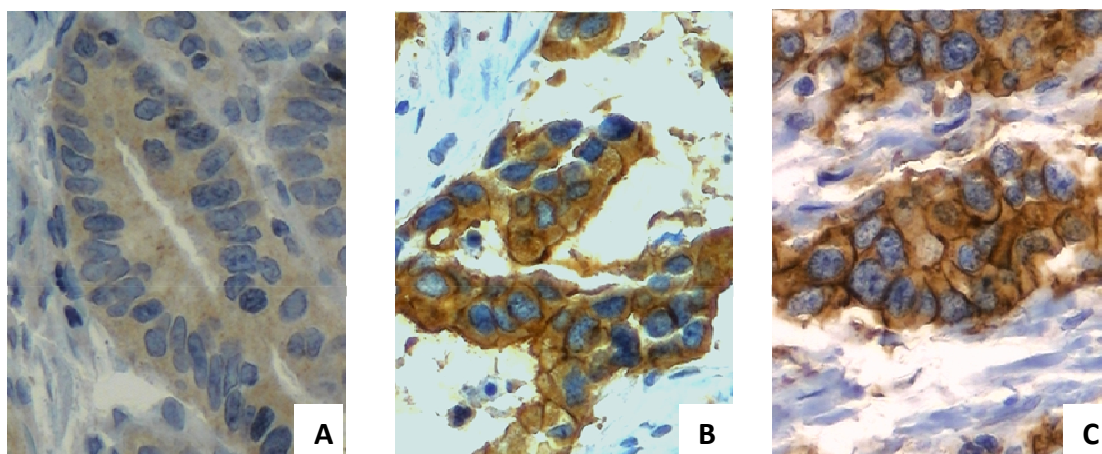


Figura 1 - Carcinomas gástricos tipo intestinal de Lauren com imunoexpressão de EGFR em padrão de membrana (x40). A: negativo 0; B: positivo 2+; C: positivo 3+.

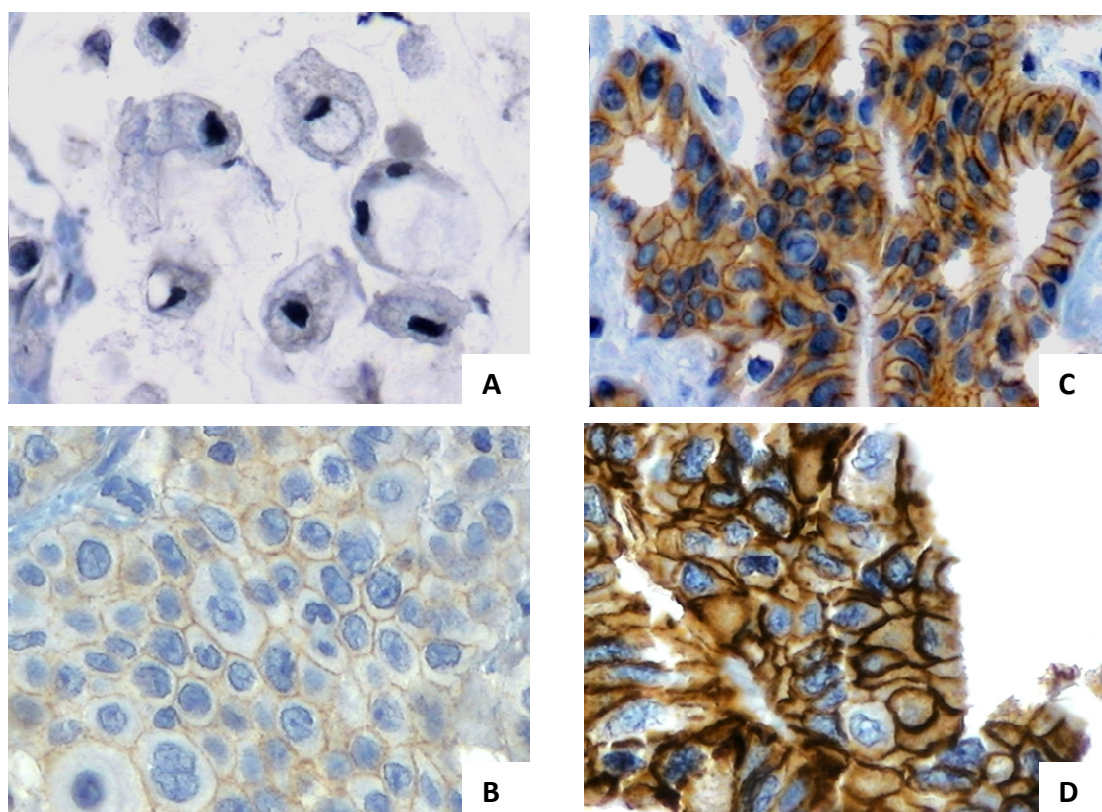


Figura 2 – Carcinomas gástricos com imunoexpressão de HER2 em padrão de membrana (x40). A: CG tipo difuso negativo 0; B: CG tipo difuso com escore 1+; C: CG tipo intestinal positivo 2+; D: CG tipo intestinal 3+.

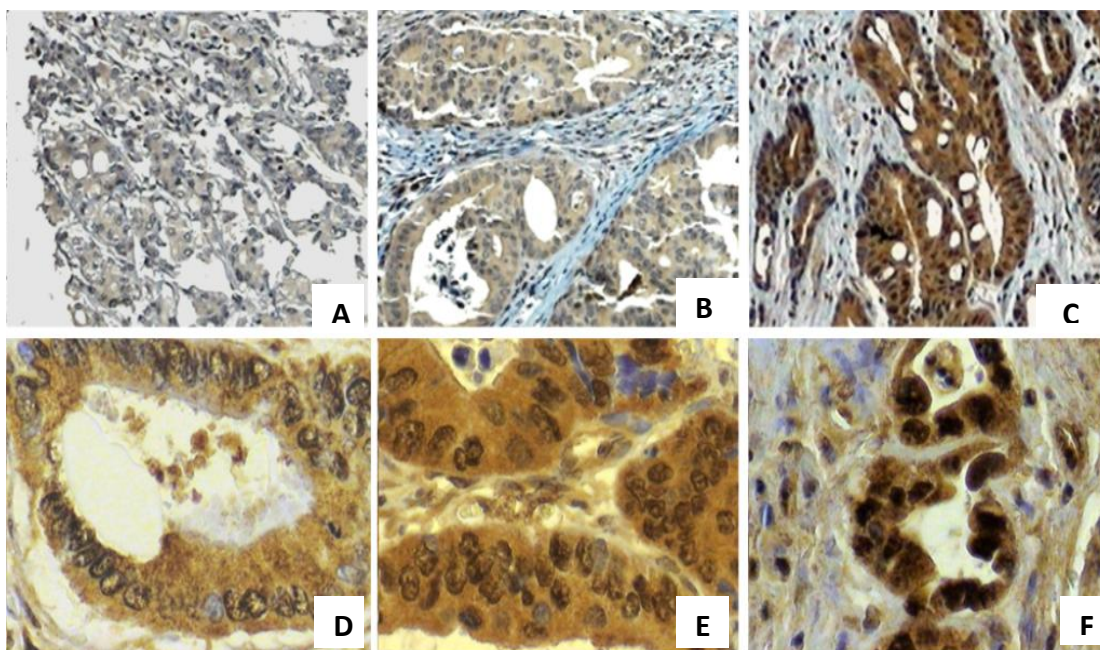


Figura 3 – Carcinomas gástricos tipo intestinal com imunoexpressão de HER3. A, B e C (x20): padrões citoplasmáticos fraco, moderado e intenso, respectivamente. D, E e F (x40): padrões nucleares fraco, moderado e intenso, respectivamente.

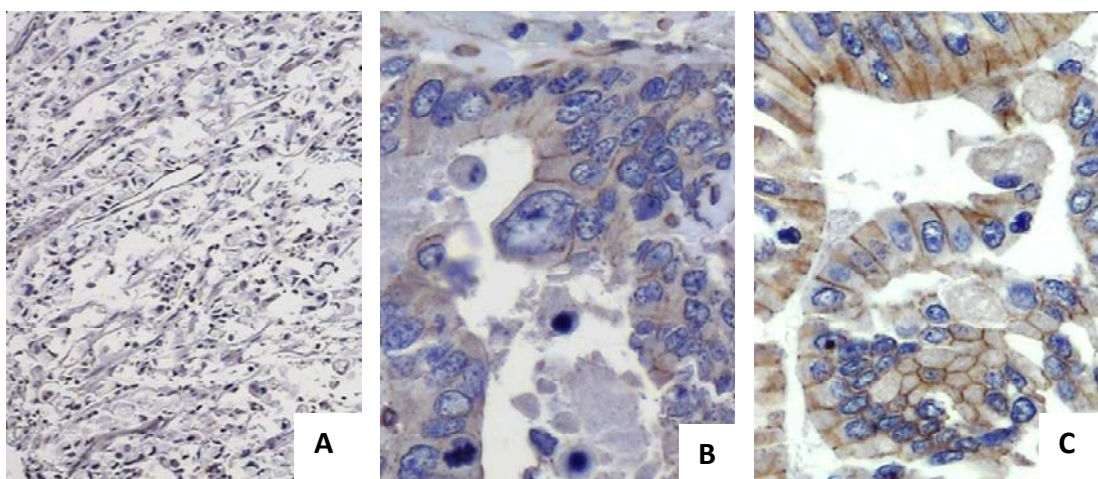


Figura 4 – Carcinomas gástricos com imunoexpressão de HER4 em padrão de membrana. A: CG tipo difuso negativo 0 (x10); B: CG tipo intestinal negativo 1+ (x40); C: CG tipo intestinal positivo 2+ (x40).

4.1.3 Resultados da avaliação da amplificação gênica por FISH

A amplificação gênica foi observada em 3 de 168 casos analisados para *EGFR*, (2%) e em 15 de 190 para *HER2* (8%). Não foram observados casos com amplificações para *HER3* e *HER4*.

Os padrões de amplificação observados para *EGFR* e *HER2* podem ser vistos na Tabela 7.

Tabela 7 - Correlação entre a expressão protéica de EGFR e HER2 por IHQ com o padrão de amplificação gênica.

CASO	IMUNOISTOQUÍMICA	FISH
EGFR		
1	2+	R > 6
2	3+	R > 6
3	3+	R = 6
HER2		
1	0	R = 6
2	2+	R = 2
3	2+	R = 2
4	2+	R = 2
5	2+	R = 3
6	2+	R = 3,5
7	2+	R = 4
8	2+	R > 6
9	2+	R > 6
10	3+	R = 5
11	3+	R = 5
12	3+	R = 6
13	3+	R = 6
14	3+	R > 6
15	3+	R > 6

*R = razão obtida entre o número total de sinais correspondentes ao gene pelo número total de sinais do locus de referência contados em 30 núcleos.

Os casos onde o padrão observado foi de *cluster* ou agrupamento de sinais correspondentes ao locus cromossômico de interesse (espectro orange), sem a possibilidade de isolá-los para contagem em separado, a razão entre o número de sinais correspondentes ao locus cromossômico de interesse (espectro *Orange*) e ao locus de referência (espectro *Green*) foi considerado maior que 6 (Figura 5).

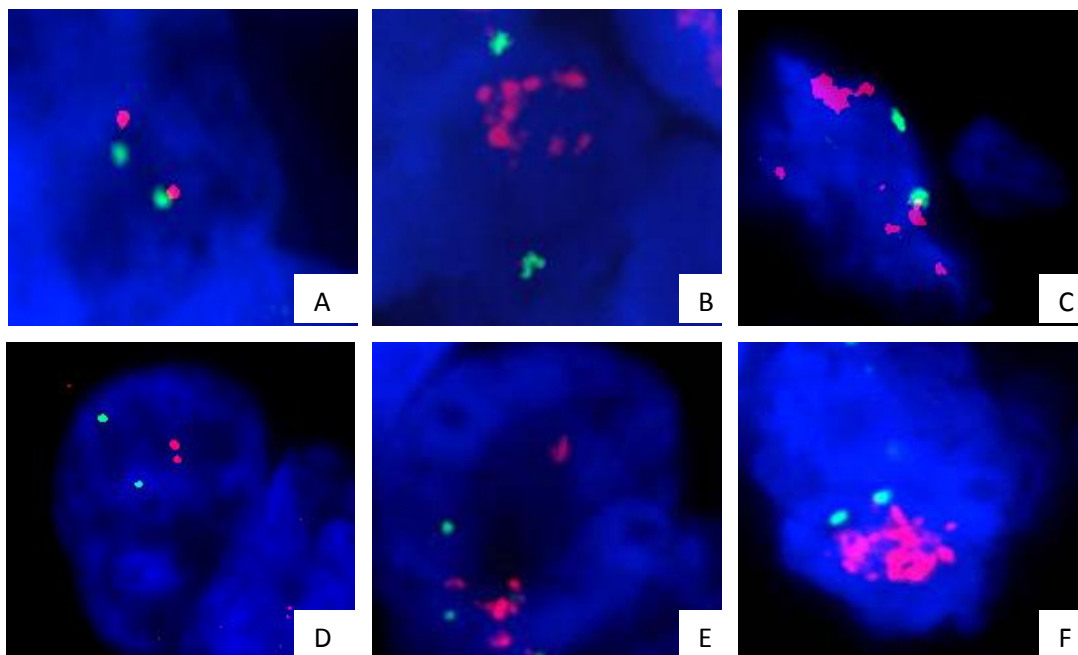


Figura 5 - Pesquisa de amplificação de *EGFR* E *HER2* por FISH. A, B, C: *EGFR* não amplificado, amplificado (R=6), amplificado com *cluster* de sinais (R>6), respectivamente. D, E, F: *HER2* não amplificado, amplificado (R=3), amplificado com *cluster* de sinais (R>6).

A Tabela 8 mostra a correlação da expressão protéica com a amplificação gênica de *EGFR*, *HER2*, *HER3* e *HER4*. Observa-se que os 3 casos com expressão protéica de *EGFR* acompanharam-se de amplificação gênica. Para *HER2*, todos os casos com positividade 3+ na IHQ, tiveram amplificação gênica detectada, enquanto dos 18 casos com positividade 2+, a amplificação gênica pode ser observada em 8 casos. Houve apenas um caso de amplificação gênica que não se acompanhou da expressão protéica de *HER2* nos cortes do TMA. O caso isolado de expressão protéica de *HER3* e os três casos de *HER4*, não demonstraram amplificação gênica pela FISH.

Tabela 8 - Correlação entre os resultados da expressão protéica no padrão de membrana com o número de cópias dos genes.

MARCADOR	IMUNOISTOQUÍMICA (n)	AMPLIFICADO (%)	NÃO AMPLIFICADO (%)
EGFR	Escore 2+ (n=1)	1 (100)	0 (0)
	Escore 3+ (n=2)	2 (100)	0 (0)
	Escore 0 (n=103)	1 (1)	102 (99)
HER2	Escore 2+ (n=18)	8 (44)	10 (56)
	Escore 3+ (n=6)	6 (100)	0 (0)
HER3	Escore 2+ (n=1)	0 (0)	1 (100)
HER4	Escore 2+ (n=3)	0 (0)	3 (100)

n=número total de casos

4.2 CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES E AS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS

4.2.1 EGFR

Os resultados da imunoistoquímica avaliados no padrão de membrana, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes para todas as variáveis estudadas, incluindo as variáveis epidemiológicas, tais como idade, gênero, raça, grau de escolaridade, história pregressa ou atual de tabagismo, etilismo, história familiar de câncer gástrico. O mesmo observou-se em relação às variáveis histopatológicas: localização do tumor, tamanho, classificação histológica, grau de diferenciação, nível de infiltração mural, invasão vascular linfática e sangüínea, infiltração perineural, infiltração linfocítica intratumoral, metástase linfonodal, estadiamento patológico e comprometimento da margem cirúrgica.

Para a amplificação gênica estudada por FISH não houve diferença estatística significativa em todas as variáveis citadas anteriormente, apesar de ter sido demonstrada uma diferença de significância limítrofe ($p = 0,052$) para a invasão vascular sangüínea onde se percebeu a amplificação gênica mais freqüente nos casos de tumores com invasão vascular presente em relação aos ausentes (9% versus 1%).

Os resultados de EGFR analisados por imunoistoquímica no padrão de membrana e FISH em relação às variáveis epidemiológicas e histopatológicas estudadas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Correlação da expressão protéica e amplificação gênica de EGFR com as variáveis epidemiológicas e histopatológicas.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	EGFR IHC		EGFR FISH	
		Positivo (%)	Valor de P	Amplificado (%)	Valor de P
Sexo	Feminino	0/73 (0)	0,297	0/63 (0)	0,293
	Masculino	3/124 (2)		3/105 (3)	
Raça	Branca	2/148 (1)	0,668	2/126 (2)	0,672
	Negra	0/8 (0)		0/7 (0)	
	Amarela	1/29 (3)		1/25 (4)	
Escolaridade	Analfabeto ou 1° grau	1/119 (1)	0,245	1/95 (1)	0,555
	2° grau/superior	2/57 (4)		2/55 (4)	
Tabaco	Não	0/76 (0)	0,261	0/68 (0)	0,250
	Sim	3/101 (3)		3/100 (3)	
Álcool	Não	1/136 (1)	0,134	1/115 (1)	0,130
	Sim	2/41 (5)		2/34 (6)	
História Familiar	Não	3/139 (2)	1	3/121 (3)	1,000
	Sim	0/27 (0)		0/21 (0)	
Classificação de Lauren	Intestinal	3/109 (3)	0,292	3/94 (3)	0,300
	Difuso	0/63 (0)		0/52 (0)	
	Misto/inclassificável	0/25 (0)		0/22 (0)	
Grau de diferenciação	Bem/moderado	3/85 (4)	0,079	3/69 (4)	0,067
	Pouco	0/112 (0)		0/99 (0)	
Nível de infiltração mural	Mucosa/submucosa	0/28 (0)	0,716	0/28 (0)	0,716
	Muscular/subserosa	1/32 (3)		1/28 (4)	
	Tecido adiposo	2/115 (2)		2/96 (2)	
	Órgãos adjacente	0/22 (0)		0/16 (0)	
Metástase linfonodal	Não	0/57 (0)	0,558	0/54 (0)	0,552
	Sim	3/140 (2)		3/114 (3)	
Estadiamento patológico	I	0/37 (0)	0,383	0/36 (0)	0,362
	II	1/37 (3)		1/32 (3)	
	III	2/62 (3)		2/51 (4)	
	IV	0/61 (0)		0/49 (0)	
Invasão linfática	Não	1/82 (1)	1	1/78 (1)	1,000
	Sim	2/114 (2)		2/89 (2)	
Invasão sangüínea	Não	1/157 (1)	0,067	1/141 (1)	0,052
	Sim	2/30 (7)		2/23 (9)	
Invasão perineural	Não	2/94 (2)	0,617	2/88 (2)	1,000
	Sim	1/97 (1)		1/74 (1)	
Infiltrado linfocitário	Leve	0/21 (0)	/	0/17 (0)	/
	Mod./intenso	0/26 (0)		0/21 (0)	
	Livres	3/185 (2)		3/159 (2)	
Margens cirúrgicas	Comprometidas	0/12 (0)		0/9 (0)	

4.2.2 HER2

Os resultados das análises imunoistoquímicas no padrão de membrana para HER2 foram correlacionados com as mesmas variáveis epidemiológicas e histopatológicas estudadas para o EGFR e citadas anteriormente.

Houve diferenças estatisticamente significantes em relação ao gênero, classificação histológica do tumor segundo Lauren e grau de diferenciação. Entre os homens, a expressão protéica de HER2 no padrão de membrana foi detectada em 15%, e nas mulheres em 5% ($p = 0,03$). Não foram observadas expressões protéicas de HER2 nos 65 carcinomas do tipo difusos analisados. Já nos tipos intestinal e misto, 18% e 14% dos casos foram positivos ($p = 0,002$). Em relação ao grau de diferenciação, os tumores foram agrupados em 2 categorias, sendo uma delas constituída por tumores bem e moderadamente diferenciados e a outra pelos tumores pouco diferenciados. Observou-se diferença estatisticamente significativa em relação à expressão de HER2 ($p = 0,001$). Dentre os 88 casos de tumores bem e moderadamente diferenciados, a positividade de HER2 foi verificada em 18 (20%), enquanto nos 119 casos de tumores pouco diferenciados, a positividade foi demonstrada em apenas 6 (5%).

A amplificação gênica de *HER2* pesquisada por FISH, demonstrou diferenças estatísticas significativas para as mesmas variáveis observadas na imunoistoquímica, acrescido da infiltração perineural. Em relação ao gênero, amplificação gênica foi observada em 11% dos homens enquanto que nas mulheres, em somente 3% ($p = 0,05$). Não houve amplificação

gênica em nenhum tumor tipo difuso, enquanto os tumores tipo intestinal e misto tiveram amplificação observada em 12% e 9% respectivamente ($p = 0,018$). Em relação ao grau de diferenciação, demonstrou-se amplificação gênica em 14 de 79 tumores bem ou moderadamente diferenciados, e em 1 de 111 casos pouco diferenciados ($p < 0,001$). Nos 88 casos em que se identificou infiltração perineural, apenas 2 casos mostraram amplificação, enquanto nos 96 tumores sem infiltração perineural, 12 deles tiveram amplificação de *HER2* ($p = 0,009$). Estes resultados são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 - Correlação da expressão protéica e amplificação gênica de HER2 com as variáveis epidemiológicas e histopatológicas.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	HER2 IHC		HER2 FISH	
		Positivo (%)	Valor de P	Amplificado (%)	Valor de P
Sexo	Feminino	4/76 (5)	0,030	2/74 (3)	0,050
	Masculino	20/131 (15)		13/116 (11)	
Raça	Branca	19/155 (12)	0,999	11/143(8)	0,682
	Negra	1/8 (13)		1/6 (17)	
	Amarela	4/32 (13)		3/29 (10)	
Escolaridade	Analfabeto ou 1° grau	12/125 (10)	0,178	6/109(5,5)	0,230
	2° grau/superior	10/61 (16)		7/62 (11)	
Tabaco	Não	6/82 (7)	0,670	5/77 (6,5)	0,581
	Sim	17/105 (16)		9/95 (9,5)	
Álcool	Não	17/144 (12)	0,707	10/140 (7)	0,310
	Sim	6/43 (14)		4/33 (12)	
História Familiar	Não	15/146 (10)	0,504	8/135 (6)	0,673
	Sim	4/27 (15)		2/27 (7)	
Classificação de Lauren	Intestinal	20/114 (18)	0,002	13/106 (12)	0,018
	Difuso	0/65 (0)		0/61 (0)	
	Misto/inclassificável	4/28 (14)		2/23 (9)	
Grau de diferenciação	Bem/moderado	18/88 (20)	0,001	14/79 (18)	<0,001
	Pouco	6/119 (5)		1/111 (1)	
Nível de infiltração mural	Mucosa/submucosa	5/32 (16)	0,746	3/34 (9)	0,911
	Muscular/subserosa	5/34(15)		3/32 (9)	
	Tecido adiposo	12/119 (10)		7/105 (7)	
	Órgãos adjacentes	2/22 (9)		2/19(10,5)	
Metástase linfonodal	Não	9/62 (15)	0,391	5/65 (8)	1,000
	Sim	15/145 (10)		10/124 (8)	
Estadiamento patológico	I	6/41 (15)	0,890	4/43 (9)	0,912
	II	5/40 (12)		2/37 (5)	
	III	7/65 (11)		5/57 (9)	
	IV	6/61 (10)		4/53 (7,5)	
Invasão linfática	Não	13/90 (14)	0,281	9/93 (10)	0,383
	Sim	11/115 (10)		6/96 (6%)	
Invasão sangüínea	Não	20/167 (12)	0,539	13/161 (8)	0,724
	Sim	2/30 (7)		1/23 (4)	
Invasão perineural	Não	15/101 (15)	0,133	12/96 (12,5)	0,009
	Sim	8/99 (8)		2/88 (2)	
Infiltrado linfocitário	Leve	4/21 (19)	0,383	3/18 (17)	0,297
	Mod./intenso	2/27 (7)		1/24 (4)	
Margens cirúrgicas	Livres	23/195 (12)	1,000	14/179 (8)	0,606
	Comprometidas	1/12 (8)		1/11 (9)	

4.2.3 HER3

Com um único caso positivo para HER3 no padrão de membrana, não se pode mostrar diferenças estatisticamente significantes em relação às variáveis estudadas, exceto em relação à raça, onde o único caso positivo era negro dentre os 8 pacientes negros da amostra ($p < 0.001$).

Para as análises dos resultados do padrão de expressão citoplasmática do HER3, os casos foram agrupados em duas categorias conforme a intensidade da coloração, sendo o grupo negativo constituído pelos casos negativos e positivos fracos e o grupo positivo constituído pelos casos positivo moderado e forte. Na comparação entre os dois grupos, algumas diferenças estatisticamente significantes foram demonstradas. A média de idade dos pacientes do grupo negativo foi de 60 anos, enquanto a dos pacientes do grupo positivo foi de 66 anos ($p = 0,002$). A positividade foi demonstrada com mais frequência entre os pacientes com menor grau de escolaridade (69% para os pacientes analfabetos ou com 1º grau e 51% para os pacientes com 2º grau ou mais de escolaridade) ($p = 0,020$). Os tumores do tipo intestinal (76% versus 40% no difuso e 70% no misto), os tumores mais diferenciados (80% para os tumores bem ou moderadamente diferenciados versus 52% para os tumores pouco diferenciados), e com margens cirúrgicas livres de neoplasia (66% versus 33%), mostraram positividade citoplasmática mais frequente. A mediana de linfonodos comprometidos para os casos negativos foi de 6 em relação aos casos positivos que foi de 3 ($p = 0,039$).

Na análise do padrão nuclear de expressão IHQ de HER3, diferenças estatisticamente significantes foram vistas para algumas variáveis. Os casos foram agrupados em 2 categorias conforme a intensidade da coloração, sendo o grupo negativo constituído pelos casos negativos e positivos fracos e o grupo positivo constituído pelos casos positivo moderado e forte. A média de idade dos pacientes do primeiro grupo foi de 65 anos e a do segundo, de 61 anos ($p=0,014$). A positividade nuclear foi mais frequente nos tumores do tipo difuso (47% versus 38% no misto e 26% no intestinal), com infiltrado linfocitário discreto ($p < 0,001$) e com invasão linfática ou sangüínea presente (41% e 59% respectivamente). A mediana de linfonodos comprometidos foi de 2,5 no primeiro grupo e 6,5 no segundo ($p = 0,017$).

A amplificação gênica pesquisada por hibridização *in situ* (FISH) não foi evidenciada em nenhum dos casos analisados.

Os resultados da correlação de HER3 por imunoistoquímica, analisadas no padrão de membrana, citoplasma e núcleo, podem ser vistos na Tabela 11.

Tabela 11 - Correlação da expressão protéica de HER3 com as variáveis epidemiológicas e histopatológicas.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	HER3 Membrana		HER3 Citoplasmático		HER3 Nuclear	
		Positivo (%)	Valor de <i>P</i>	Positivo (%)	Valor de <i>P</i>	Positivo (%)	Valor de <i>P</i>
Sexo	Feminino	0/70 (0)	1,000	45/72 (62)	0,696	24/72 (33)	0,938
	Masculino	1/121 (1)		79/121 (65)		41/121 (34)	
Raça	Branca	0/142 (0)	<0,001	90/142 (63)	0,896	49/143 (34)	0,399
	Negra	1/8 (13)		5/8 (62)		4/8 (50)	
	Amarela	0/30 (0)		21/31 (68)		8/31 (26)	
Escolaridade	Analfabeto ou 1° grau	0/120 (0)	0,302	84/121 (69)	0,020	39/122 (32)	0,796
	2° grau/superior	1/52 (2)		27/53 (51)		18/53 (34)	
Tabaco	Não	1/77 (1)	0,448	48/78 (62)	0,396	30/78 (39)	0,320
	Sim	0/95 (0)		65/96 (68)		30/96 (31)	
Álcool	Não	1/131 (1)	1,000	87/134 (65)	0,779	47/134 (35)	0,552
	Sim	0/41 (0)		25/40 (62)		12/40 (30)	
História Familiar	Não	1/134 (1)	1,000	88/135 (65)	0,690	48/135 (36)	0,395
	Sim	0/25 (0)		18/26 (69)		7/26 (27)	
Classificação de Lauren	Intestinal	1/110 (1)	0,691	84/110 (76)	<0,001	28/109 (26)	0,020
	Difuso	0/57 (0)		24/60 (40)		28/60 (47)	
	Misto/inclassificável	0/24 (0)		16/23 (70)		9/24 (38)	
Grau de diferenciação	Bem/moderado	1/82 (2)	0,429	66/82 (80)	<0,001	28/82 (34)	0,906
	Pouco	0/109 (0)		58/111 (52)		37/111 (33)	
Nível de infiltração mural	Mucosa/submucosa	0/25 (0)	0,875	20/27 (74)	0,142	7/27 (26)	0,578
	Muscular/subserosa	0/32 (0)		22/33 (67)		10/32 (31)	
	Tecido adiposo	1/113 (1)		73/112 (65)		39/114 (34)	
	Órgãos adjacentes	0/21 (0)		9/21 (43)		9/20 (45)	
Metástase linfonodal	Não	0/55 (0)	1,000	43/58 (74)	0,060	15/57 (26)	0,161
	Sim	1/136 (1)		81/135 (60)		50/136 (37)	
Estadiamento patológico	I	0/35 (0)	0,564	26/38 (68)	0,109	9/37 (24)	0,297
	II	0/36 (0)		27/36 (75)		12/37 (32)	
	III	1/63 (2)		42/63 (67)		20/63 (32)	
	IV	0/57 (0)		29/56 (52)		24/56 (43)	
Invasão linfática	Não	1/79 (1)	0,418	59/82 (72)	0,059	19/80 (24)	0,011
	Sim	0/110 (0)		64/109 (59)		46/111 (41)	
Invasão sanguínea	Não	1/153 (1)	1,000	103/156 (66)	0,294	44/154 (29)	0,002
	Sim	0/28 (0)		15/27 (56)		17/29 (59)	
Invasão perineural	Não	1/93 (1)	1,000	63/94 (67)	0,470	30/93 (32)	0,469
	Sim	0/91 (0)		57/92 (62)		34/92 (37)	
Infiltrado linfocitário	Leve	/	/	14/21 (67)	0,790	10/21 (48)	<0,001
	Moderado./intenso	/		17/27 (63)		1/27 (4)	
Margens cirúrgicas	Livres	1/179 (1)	1,000	120/181 (66)	0,029	62/181 (34)	0,754
	Comprometidas	0/12 (0)		4/12 (33)		3/12 (25)	

4.2.4 HER4

Não foi possível realizar as análises estatísticas de todas as variáveis clínico-patológicas estudadas em relação aos resultados da expressão protéica avaliada por imunistoquímica de HER4 no padrão de membrana devido ao pequeno número de casos positivos.

Em relação a expressão protéica no padrão citoplasmático, algumas diferenças foram mostradas. A média de idade entre os pacientes do grupo positivo foi de 67,95 anos e do negativo de 63,18 anos ($p = 0,027$). Diferenças estatísticas foram encontradas em relação ao estadiamento dos pacientes. A porcentagem de casos positivos para HER4 dos pacientes com estágio I foi de 39%; para o estágio II foi de 27%, para o estágio III de 20% e estágio IV de 13%. Os pacientes sem comprometimento linfonodal, ou com uma mediana menor de linfonodos comprometidos também exibiram maior frequência de positividade para HER4. A positividade foi mais frequente nos tumores do tipo intestinal e nos tumores bem ou moderadamente diferenciados (38% versus 10% dos pouco diferenciados com $p < 0,001$). Os tumores sem invasão vascular linfática ou sangüínea, sem infiltração perineural também exibiram maior frequência de expressão de HER4. Observou-se também relação inversa entre o nível de infiltração mural e a positividade citoplasmática de HER4, ou seja, os tumores restritos a mucosa/submucosa foram mais frequentemente positivos do que os tumores que invadiam tecido adiposo e órgãos adjacentes ($p = 0,039$).

Para a avaliação do padrão nuclear de imunoexpressão de HER4, foram criados dois grupos: grupo negativo com os casos negativos, e grupo

positivo, para os casos positivos fracos. Não houve casos que tivessem demonstrado coloração moderada ou intensa.

Houve quatro casos positivos sendo estes dos tipos difuso (4%) e misto (8%). Os carcinomas do tipo intestinal foram todos negativos ($p = 0,026$). Todas as demais variáveis epidemiológicas e histopatológicas não demonstraram diferenças estatisticamente significantes.

Os resultados da imunoistoquímica de HER4, nos padrões acima citados, estão apresentados na Tabela 12.

A amplificação gênica pesquisada através da hibridização *in situ* (FISH) não foi evidenciada em nenhum dos casos analisados.

Tabela 12 - Correlação da expressão protéica de HER4 com as variáveis epidemiológicas e histopatológicas.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	HER4 Membrana		HER4 Citoplasmático		HER4 Nuclear	
		Positivo (%)	Valor de <i>P</i>	Positivo (%)	Valor de <i>P</i>	Positivo (%)	Valor de <i>P</i>
Sexo	Feminino	1/61 (2)	1,000	17/62 (27)	0,244	2/61 (3)	0,605
	Masculino	2/120 (2)		24/121 (20)		2/119 (2)	
Raça	Branca	1/134 (1)	0,068	27/137 (20)	0,054	2/136 (2)	0,704
	Negra	0/8 (0)		0/8 (0)		0/6 (0)	
	Amarela	2/29 (7)		10/28 (36)		1/28 (4)	
Escolaridade	Analfabeto ou 1º grau	1/112 (1)	0,231	24/113 (21)	0,383	1/110 (1)	0,094
	2º grau/superior	2/51 (4)		14/51 (28)		3/51 (6)	
Tabaco	Não	0/70 (0)	0,508	14/69 (20)	0,456	3/68 (4)	0,31
	Sim	2/94 (2)		24/95 (25)		1/94 (1)	
Álcool	Não	1/124 (1)	0,442	25/124 (20)	0,108	4/123 (3)	0,573
	Sim	1/39 (3)		13/40 (33)		0/39 (0)	
História	Não	2/125 (2)	1,000	29/126 (23)	0,995	3/123 (2)	0,421
Familiar	Sim	0/26 (0)		6/26 (23)		0/26 (0)	
Classificação de Lauren	Intestinal	3/110 (3)	0,374	37/111 (33)	<0,001	0/107 (0)	0,026
	Difuso	0/47 (0)		3/49 (6,)		2/49 (4)	
	Misto/inclassificável	0/24 (0)		1/23 (4)		2/24 (8)	
Grau de diferenciação	Bem/moderado	3/83 (4)	0,095	31/82 (38)	<0,001	0/80 (0)	0,13
	Pouco	0/98 (0)		10/101 (10)		4/100 (4)	
Nível de infiltração mural	Mucosa/submucosa	1/23 (4)	0,538	9/23 (39)	0,039	0/22 (0)	0,308
	Muscular/subserosa	1/31 (3)		10/31 (32)		2/31 (7)	
	Tecido adiposo	1/107 (1)		20/108 (19)		2/105 (2)	
	Órgãos adjacentes	0/20 (0)		2/21 (10)		0/22 (0)	
Metástase linfonodal	Não	2/53 (4)	0,206	20/53 (38)	0,003	0/51 (0)	0,579
	Sim	1/128 (1)		21/130 (16)		4/129 (3)	
Estadiamento patológico	I	1/33 (3)	0,619	13/33 (39)	0,025	0/32 (0)	0,705
	II	1/33 (3)		9/33 (27)		1/32 (3)	
	III	0/60 (0)		12/61 (20)		1/60 (2)	
	IV	1/55 (2)		7/56 (13)		2/56 (4)	
Invasão linfática	Não	1/72 (1)	1,000	26/74 (35)	0,001	1/72 (1)	0,65
	Sim	2/108 (2)		15/108 (14)		3/107 (3)	
Invasão sanguínea	Não	3/145 (2)	1,000	40/148 (27)	0,010	2/144 (1)	0,118
	Sim	0/27 (0)		1/26 (4)		2/27 (7)	
Invasão perineural	Não	2/89 (2)	1,000	27/88 (31)	0,011	1/87 (1)	0,621
	Sim	1/86 (1)		13/89 (15)		3/87 (3)	
Infiltrado	Leve	/	/	2/20 (10)	0,435	1/20 (5)	0,435
linfocitário	Moderado./intenso	/		6/26 (23)		0/26 (0)	
Margens cirúrgicas	Livres	2/168 (%)	0,201	39/141 (23)	1,000	3/167 (2)	0,261
	Comprometidas	1/13 (8)		2/12 (17)		1/13(8)	

4.3 ANÁLISES UNIVARIADAS

A taxa de sobrevida global em cinco anos (60 meses) dos 221 pacientes com carcinoma gástrico foi de 39,5%. A mediana da sobrevida foi de 36,9 meses (IC95%: 25,8 a 47,9 meses). As análises univariadas de sobrevida dos pacientes em relação aos parâmetros clínico-patológicos e expressão protéica e amplificação gênica de EGFR, HER2, HER3 e HER4 podem ser vistas nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

As seguintes variáveis clínico-patológicas: história familiar de CG, estágio patológico, metástase linfonodal, status da margem cirúrgica, invasão vascular linfática e sangüínea, infiltração perineural e tamanho do tumor mostraram correlação estatisticamente significativa com a taxa de sobrevida. Todas as demais variáveis clínicas: gênero, história pregressa ou atual de etilismo e tabagismo, raça, nível de escolaridade; e variáveis patológicas como grau de diferenciação, tipo histológico de e intensidade do infiltrado linfocítico intratumoral não demonstraram associações estatísticas válidas.

Pacientes com história familiar de CG demonstraram melhor taxa de sobrevida em cinco anos do que os pacientes com história familiar negativa (74% versus 46,5%, $p = 0,006$). Foi verificado uma diminuição da sobrevida global em estadios patológicos mais avançados (no estágio I, 82% dos pacientes estavam vivos em 5 anos enquanto que esta taxa foi de 16% para o estágio IV)($p<0.001$). A presença de comprometimento linfonodal correlacionou-se com uma redução da taxa de sobrevida em torno de 50%

(71% versus 38%, $p < 0.001$). Dado semelhante foi observado com estatus da margem cirúrgica, sendo que os casos com margens comprometidas mostraram pior sobrevida (50,5% versus 23%, $p < 0.001$). O tamanho da neoplasia também foi um fator de risco, tendo aqueles com tamanho maior que 5 cm menor sobrevida (66% versus 31%, $p < 0.001$). Houve significativa diminuição da taxa de sobrevida global em 5 anos na presença de invasão vascular linfática (61% versus 38%), sangüínea (51% versus 30%) e infiltração perineural (60% versus 37%).

A presença de amplificação gênica de *HER2* correlacionou-se com pior taxa de sobrevida em cinco anos (49% versus 29%, $p = 0,018$), assim como a expressão protéica nuclear positiva de HER3 (53% versus 35%, $p = 0,035$). As análises univariadas das expressões protéicas nos padrões de membrana de todos os marcadores, citoplasmático de HER3 e HER4 e no padrão nuclear de HER4, assim como a amplificação gênica de *EGFR*, não mostraram associações estatísticas com a taxa de sobrevida global em cinco anos.

As tabelas 13 e 14 mostram os resultados das análises univariadas.

As figuras 6 e 7 correspondem, respectivamente às curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para a amplificação de *HER2* e expressão nuclear de HER3.

Tabela 13 – Resultado da análise univariada dos parâmetros epidemiológicos e histopatológicos.

Variáveis	Categorias	Taxa de Sobrevida Global em 5 anos (%)	Valor de P
Sexo	Feminino	54,2	0,064
	Masculino	45,6	
Raça	Branca	47,3	0,928
	Negra	42,9	
	Amarela	51,5	
Escolaridade	Analfabeto ou 1º grau	53,1	0,484
	2º grau ou superior	50	
Tabaco	Não	47,1	0,532
	Sim	51,8	
Alcool	Não	49,4	0,820
	Sim	51,2	
História Familiar	Não	46,5	0,006
	Sim	74,2	
Classificação de Lauren	Intestinal	50,9	0,924
	Difuso	46,1	
	Misto/inclassificável	48,1	
Grau de diferenciação	Bem/moderado	53,3	0,398
	Pouco	45,7	
Metástase linfonodal	Não	71,4	<0,001
	Sim	38,3	
Tamanho do tumor	até 5 cm	66,1	<0,001
	> 5 cm	31,4	
Estadiamento Patológico	I	81,6	<0,001
	II	67,5	
	III	44,1	
	IV	16,1	
Invasão linfática	Não	61,0	0,001
	Sim	37,6	
Invasão sangüínea	Não	51,1	0,003
	Sim	30,0	
Invasão perineural	Não	59,6	0,001
	Sim	36,9	
Infiltração linfocitária	Leve	31,8	0,070
	Moderado/intenso	64,3	
Margens cirúrgicas	Livres	50,5	<0,001
	Comprometidas	23,1	

Tabela 14 – Resultado da análise univariada de EGFR, HER2, HER3 e HER4.

Variáveis	Categorias	Taxa de Sobrevida Global em 5 anos (%)	Valor de P
EGFR IHQ	Negativo	46,9	0,964
	Positivo	66,7	
EGFR FISH	Não amplificado	47,6	0,928
	Amplificado	66,7	
HER2 IHQ	Negativo	46,2	0,570
	Positivo	47,8	
HER2 FISH	Não amplificado	49,4	0,018
	Amplificado	28,6	
HER3 IHQ membrana	Negativo	46,8	0,325
	Positivo	0	
HER3 IHQ citoplasmático	Negativo	42	0,164
	Positivo	50	
HER3 IHQ nuclear	Negativo	53,2	0,035
	Positivo	35,4	
HER4 IHQ membrana	Negativo	46,6	0,068
	Positivo	0	
HER4 IHQ citoplasmático	Negativo	40,7	0,130
	Positivo	61,0	
HER4 IHQ nuclear	Negativo	45,4	0,768
	Positivo	50,00	

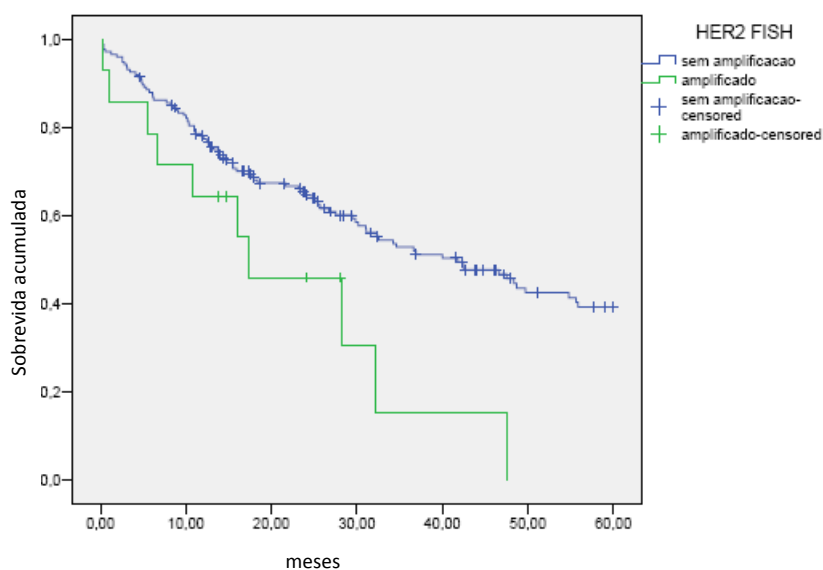


Figura 6 – Curvas de sobrevidas de Kaplan Méier dos pacientes com carcinoma gástrico com e sem amplificação de *HER2*. Os pacientes com amplificação gênica de *HER2* mostraram pior sobrevida que os que não tiveram.

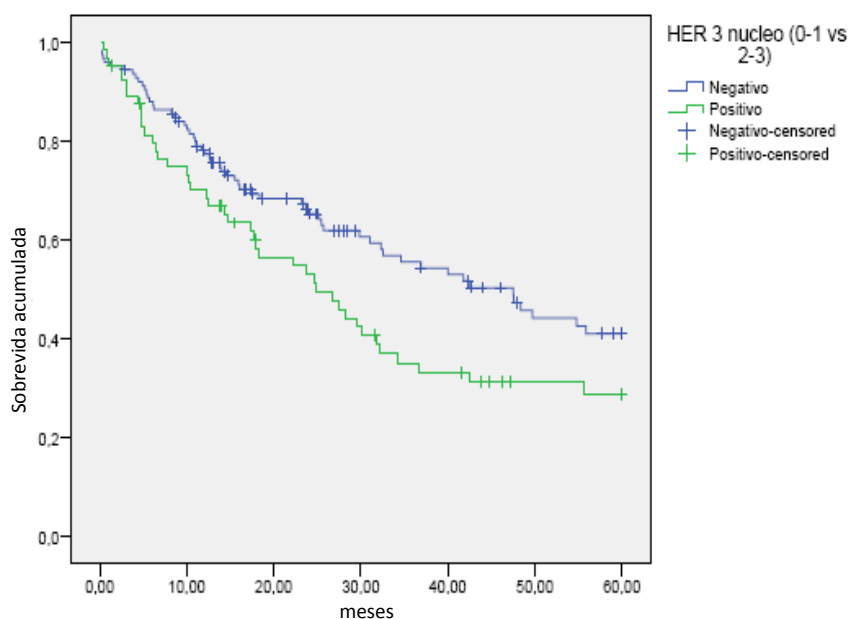


Figura 7 – Curvas de sobrevidas de Kaplan Méier dos pacientes com carcinoma gástrico com e sem expressão nuclear de *HER3*. Os pacientes com expressão nuclear de *HER3* apresentaram pior sobrevida que os que não tiveram.

4.4 ANÁLISES MULTIVARIADAS

Os fatores de risco independentes para morte identificados pelo modelo de regressão de Cox nos casos estudados foram: estágio patológico avançado, margens cirúrgicas comprometidas e idade. A presença de história familiar de CG mostrou-se fator protetor, com redução do risco de morte para 0,3. Estes dados estão expostos na Tabela 15.

Tabela 15 - Análise Multivariada. Modelo de regressão de Cox.

Variável	Categoria	Hazard Ratio	IC 95%
Estadiamento Patológico	I	1,0	Referência
	II	2,5	0,9 - 6,8
	III	5,5	2,3 - 13,4
	IV	15	6,3 - 36
História Familiar	Ausente	1,0	Referência
	Presente	0,3	0,1 - 0,6
Margens Cirúrgicas	Livres	1,0	Referência
	Comprometidas	2,7	1,2 - 6,1
Idade*	(variável		
	contínua)	1,002	0,96 - 1,02

*variável contínua

Observou-se risco de morte por CG crescente para os estádios II, III e IV se comparados ao estágio I (2,5x; 5,5x e 15x, respectivamente). O comprometimento da margem cirúrgica elevou o risco de morte por CG em 2,7 vezes. Houve discreto aumento do risco de morte associado a maior idade.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Ao longo dos últimos anos, tem-se observado um declínio na incidência do adenocarcinoma gástrico, especialmente devido à redução da incidência nos casos de tumores distais. Contrariamente, observa-se uma tendência a uma incidência crescente dos tumores proximais. O fato dos tumores distais e proximais não compartilharem a mesma etiopatogenia pode explicar parcialmente este fato. Enquanto se observam melhorias em relação a fatores dietéticos e no tratamento do *H. pylori*, ambos relacionados com os tumores distais, há um aumento na incidência da obesidade e conseqüente doença do refluxo gastroesofágico, relacionados aos tumores proximais. Há diferenças epidemiológicas entre ambos: os tumores distais ocorrem em maior freqüência nos países em desenvolvimento, acometendo a população de menor renda, negra e tem a relação de dois homens acometidos para cada mulher. Já os tumores proximais ocorrem com maior freqüência nos países desenvolvidos, onde podem chegar a corresponder a 50% dos casos de CG (MCCOLL 2006). Acometem a população de melhor nível sócio-econômico, brancos, com uma razão de homens para mulheres de 5:1, reservando um prognóstico pior que dos tumores distais.

O presente trabalho constatou que quase 80% dos casos estudados correspondeu a tumores distais, mais freqüentes nos homens (1,6 homens: 1 mulher), com média de idade de 63 anos, sendo que em 60% dos casos os pacientes apresentavam baixa escolaridade, constituídos por analfabetos

ou com 1º grau de escolaridade, o que indiretamente pode refletir um baixo nível sócio-econômico. Portanto, nossa amostra é típica dos países em desenvolvimento.

Houve certa dificuldade na caracterização da nossa amostra em relação à raça, uma vez que somos uma população miscigenada, sendo consideradas as informações obtidas dos registros médicos. Preferiu-se colocar a categoria “pardos” entre os não informados, já que não existem critérios estabelecidos para tal etnia. Assim, foram consideradas apenas 3 raças: branca, negra e amarela.

Dentre os fatores de risco para o CG, o tabagismo que confere um risco aumentado, dose-dependente, com risco relativo de 2 entre os ex-tabagistas e 2,1 entre os tabagistas (CHAO et al. 2002; GONZÁLEZ et al. 2003; KOIZUMI et al. 2004) esteve presente em 57%. Um grande estudo prospectivo europeu (EPIC) estimou que 17,9% dos casos de CG poderiam ser atribuídos ao tabagismo (GONZÁLEZ et al. 2003). História pregressa ou atual de etilismo esteve presente em um quinto da amostra. Embora não haja provas de que o etilismo seja uma causa de CG, a meta-análise envolvendo 16 estudos mostrou um discreto aumento do risco para 1,3 (BAGNARDI et al. 2001).

Na história familiar para CG consideramos somente o parentesco de primeiro grau, ou seja, pais e irmãos com o relato de CG, resultando em 16,6% de história familiar positiva, o que se assemelha aos 10% a 15% citados na literatura (BARBER et al. 2006). Apesar dos fatores ambientais desempenharem papel central no desenvolvimento do CG, a citar a infecção

pelo *H. pylori*, os fatores hereditários também participam, sendo que um a 3% dos casos de CG estão relacionados às síndromes genéticas, tais como Câncer de Cólon Hereditário Não-Polipose (HNPCC), Síndrome de Li-Fraumeni, Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), Síndrome de Peutz-Jeghers e Câncer gástrico difuso hereditário (CALDAS 1999). Em nosso estudo, houve um caso apenas relacionado a HNPCC. Dois terços dos casos com história familiar positiva, correspondeu ao CG do tipo intestinal de Lauren (dados não mostrados), diferentemente do esperado pela literatura que mostra uma agregação familiar mais freqüente nos tumores do tipo difuso (LEHTOLA 1978).

Em relação às características histopatológicas do tumor, a maioria se constituiu por tumores do tipo intestinal e pouco diferenciados, se assemelhando aos estudos anteriores (CREW e NEUGUT 2006; LOCHHEAD e EL-OMAR 2008).

Doença localmente avançada ou metastática foi o predominante, com quase 60% dos casos correspondentes aos estádios patológicos IIIA, IIIB ou IV. Acredita-se que o diagnóstico do tumor em estágio precoce seja dificultado pela inespecificidade dos sintomas, caracterizados por sintomas dispépticos gerais, e freqüentemente pela ausência dos mesmos. Em seu estudo, AXON (2006) observou que em menos de 50% dos casos os sintomas de alerta para CG tais como perda de peso, anemia, disfagia e anorexia que exigiam investigação complementar com endoscopia digestiva alta estiveram presentes.

Fatores prognósticos como profundidade de infiltração mural da neoplasia, comprometimento linfonodal, além do tamanho do tumor e grau de diferenciação são bem estabelecidos. A família das proteínas do fator de crescimento epidérmico, incluindo os receptores EGFR, HER2, HER3 e HER4 e seus diversos ligantes são descritos freqüentemente na patogênese e progressão de vários carcinomas, em alguns deles, conferindo pior prognóstico, como no carcinoma mamário e carcinoma pulmonar não pequenas células (SALOMON et al. 1995; NORMANNO et al. 2005). Acredita-se que o papel desempenhado por tais receptores na tumorigênese seja exercido nos estágios iniciais de transformação, conferindo à célula tumoral vantagem proliferativa, permitindo sua sobrevivência durante a seleção clonal. Por exemplo, é bem estabelecido que carcinoma intraductal mamário expressa mais HER2 que carcinoma invasor avançado (CASALINI et al. 2004). Em nosso estudo, não pudemos observar tal fato por não termos incluído as lesões *in situ*.

Os receptores da família do fator de crescimento epidérmico são receptores acoplados a tirosina quinase, que se ativam através da homodimerização ou heterodimerização desencadeadas pela ligação do receptor ao ligante. A co-expressão dos receptores e ligantes pelas células dos carcinomas humanos é a regra e a resposta a terapias alvos está relacionada aos níveis totais dos receptores e ligantes e não, a um elemento isolado (NORMANNO et al. 2003). Terapia combinada utilizando agentes anti-EGFR e anti-HER2 mostraram sinergismo em experimento realizado por NORMANNO et al. (2002) com linhagem de células do carcinoma mamário

que expressava ambos os receptores. HER3 tem sido responsabilizado pela resistência a terapias anti-EGFR (Gefitinib) ou anti-HER2 e envolvido na desdiferenciação do CG. Diante desses fatos, optamos por estudar os quatro receptores da família avaliando suas expressões proteicas e amplificações gênicas.

O receptor de fator de crescimento epidérmico – EGFR, juntamente com HER2, são os receptores da família mais estudados no CG. Sua relação com pior prognóstico é visto em vários tumores, incluindo o CG (NICHOLSON et al. 2001). Em nosso estudo, a expressão protéica foi detectada em 1,5% dos casos, todos eles acompanhados de amplificação gênica. Embora sem diferenças estatisticamente significantes, todos os casos com expressão e amplificação de EGFR eram carcinomas distais do tipo intestinal, moderadamente diferenciado e com comprometimento linfonodal. Os nossos resultados contrastam com os descritos na literatura por apresentar valores muito menores de expressão protéica e/ou amplificação gênica de EGFR. KIMURA et al. (2004) descreveu a imunoistoquímica positiva 2+ em 7% e positiva 3+ em 6%, tendo analisado cortes inteiros do tumor. A amplificação de *EGFR*, definida como quatro ou mais cópias do gene ou uma razão entre número de cópias de EGFR pelo número de loci referência maior ou igual a 1,7 foi demonstrado em 7% dos casos de CG. Tal fato pode estar relacionado a inúmeros fatores, dentre eles, diferentes métodos de detecção de EGFR, critérios variados adotados na interpretação da imunoistoquímica e a subjetividade desta análise, utilização de anticorpos de clones distintos, métodos de fixação do material

diversos, e também a heterogeneidade intratumoral. Em seu estudo GAMBOA-DOMINGUEZ et al. (2004) analisando EGFR por imunoistoquímica em cortes inteiros de 89 tumores gástricos, observou heterogeneidade intratumoral marcante, freqüentemente mostrando variações desde negativo 0 a positivo 3+, em um mesmo caso. Como trabalhamos com TMA, com representação tumoral mínima restrita a dois cores de 1mm para cada caso, é bem provável que estes resultados possam estar subestimados. A correlação com as variáveis clínico-patológicas não atingiram valores estatisticamente significativos em virtude dos poucos casos positivos que obtivemos. Vários estudos têm demonstrado a associação de EGFR com pior prognóstico. Dominguez, no mesmo estudo citado acima, demonstrou a correlação da expressão protéica de EGFR observada em 47,2% dos casos, com metástase a distância, estágio clínico avançado e menor sobrevida. Há de se ressaltar que, nos critérios de interpretação da imunoistoquímica, ele tenha considerado negativo apenas resultados 0 e positivo escores 1+, 2+ e 3+ que corresponderam respectivamente a >10% das células coradas em padrão de membrana fraca, moderada e intensamente, independentemente se em padrão completo ou incompleto. Em outro estudo realizado por GALIZIA et al. (2007), observou-se a expressão protéica de EGFR em 44%, tendo sido adotado como ponto de corte, o valor de 1% das células coradas na imunoistoquímica e considerados positivo 1+ aqueles com intensidade da coloração fraca, 2+ moderada e 3+ intensa (30,4%, 9,75% e 3,65% respectivamente). Observou-se correlação com Borrmann e estadiamento

TNM mais avançado e pior prognóstico refletindo em menor sobrevida (triplicou o risco acumulado de morte em 5 anos) com maior recidiva da doença (sobrevida livre de doença em 5 anos de 37,1% contra os 66,2% nos casos negativos). A conclusão interessante deste estudo foi obtida pela análise multivariada, que demonstrou ser a positividade de EGFR o melhor fator preditivo de recidiva, mesmo se comparado à extensão tumoral e ao comprometimento linfonodal. Em nosso estudo, tanto a expressão protéica como a amplificação gênica de EGFR não demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação à sobrevida global em cinco anos.

Na literatura, encontramos resultados diversos para a expressão protéica de HER2 por causa das diferenças nas metodologias empregadas (análise por TMA ou cortes inteiros do tumor) e critérios de avaliação (pontos de corte variando entre 1%, 10% e até 30%). Embora haja trabalhos com taxas de expressão surpreendentemente altas como 43% e 91%, os resultados obtidos utilizando a IHQ e a avaliação pelo escore do Hercep-Test sem, entretanto considerar o percentual de células positivas para pesquisa de expressão protéica de HER2, varia geralmente entre 8 a 20% (NAKAJIMA et al. 1999; TAKEHANA et al. 2002; KIMURA et al. 2004; KIM et al. 2007; HOFMANN et al. 2008). HOFMANN et al. (2008) analisando um total de 3264 casos obtidos da revisão de vários trabalhos publicados previamente evidenciou uma média de positividade 3+ na IHQ para HER2 no CG de 17,6%. Fazendo o mesmo para a pesquisa de amplificação gênica, obteve um total de 1033 casos estudados através de hibridização *in situ* por CISH ou FISH, com uma média de amplificação de *HER2* de 19,2%. Em

nosso estudo, a positividade de membrana escore 3+ de HER2 foi demonstrada em 9% e a amplificação de *HER2* em 8%, resultados estes, inferiores aos apresentados por HOFMANN et al. (2008). Em outros estudos utilizando FISH, a amplificação gênica foi demonstrada em frequência semelhante a nossa. KIM et al. (2007) mostrou amplificação de *HER2* em CG em 7,7% e TAKEHANA et al. (2002) em 7,1%. É possível que a representação tumoral mínima oferecida no TMA, associado à maior heterogeneidade intratumoral do CG tenham contribuído de forma significativa para a redução destas frequências.

Em relação à correlação com as variáveis clínico-patológicas, nossos resultados corroboram os dados de literatura. A associação de HER2 com tumores do tipo intestinal de Lauren, bem ou moderadamente diferenciados já é bem estabelecida (NAKAJIMA et al. 1999; TAKEHANA et al. 2002; KIMURA et al. 2004; KIM et al. 2007). Dois dados novos ainda não relatados na literatura foram a correlação da amplificação gênica de *HER2* com tumores sem infiltração perineural e a correlação da expressão protéica e amplificação gênica de HER2 com o sexo masculino.

Para HER3, encontramos somente um caso com expressão protéica no padrão de membrana. Em contrapartida, em aproximadamente dois terços da amostra pode se demonstrar positividade citoplasmática e em um terço, nuclear. Não houve nenhum caso de amplificação gênica.

A expressão protéica de HER3 é observada ao longo de todo o trato gastrointestinal incluindo o epitélio escamoso da orofaringe e esôfago, as células parietais do estômago, os enterócitos de superfície do intestino

delgado e grosso (RAJKUMAR et al. 1993; NOGUCHI et al. 1999). Vários estudos têm demonstrado expressão protéica aumentada nas células neoplásicas em relação às células do epitélio gástrico normal ou de áreas de gastrite crônica (SLESAK et al. 1998; ZHANG et al. 2009). Tanto o padrão de membrana como o citoplasmático foram encontrados no estudo realizado por HAYASHI et al. (2008), correspondendo respectivamente aos valores de 13% e 58%. Embora nosso estudo tenha evidenciado uma frequência de positividade citoplasmática semelhante, o padrão de membrana, ficou muito aquém desse valor. ZHANG et al. (2009) cita uma positividade de membrana de 13,7%. Esses dois trabalhos utilizaram cortes obtidos diretamente do bloco de parafina, ao invés de TMA, o que certamente proporcionou uma maior área de avaliação e conseqüentemente maior taxa de positividade para HER3. A expressão aumentada de HER3 está geralmente relacionada aos tumores do tipo difuso de Lauren, em estádios mais avançados e a pior sobrevida (HAYASHI et al. 2008; ZHANG et al. 2009). Também em outros tumores, HER3 confere pior prognóstico, como no caso dos tumores de ovário (TANNER et al. 2006), cólon (KAPITANOVIC et al. 2000) e mama (WITTON et al. 2003).

Poucos estudos relatam a expressão nuclear dos receptores da família do fator de crescimento epidérmico. Sabe-se que EGFR no núcleo, atua como fator de transcrição, mas o papel de HER3 nuclear ainda não está claro. Acredita-se, que sua localização nuclear regule os níveis de RNAm na célula em repouso, e que na fase de proliferação, HER3 se desloque para o compartimento citoplasmático, liberando a síntese de RNAm

(OFFTERDINGER et al. 2002; WELLS e MARTI 2002; CARPENTER 2003; LO E HUNG 2006). A localização nuclear de HER3 associado a níveis elevados de RNAm em relação a célula não neoplásica foi demonstrado no carcinoma prostático por KOUMAKPAYI et al. (2006). Em nosso estudo, foi o padrão de expressão nuclear que correlacionou-se com menor sobrevida global em cinco anos e também com a presença de invasões vasculares linfática e sangüínea, mediana maior de linfonodos comprometidos, padrão difuso de Lauren e infiltração linfocitária peritumoral leve. Embora não se tenha demonstrado diferenças estatisticamente significantes, a expressão nuclear de HER3 foi mais freqüente nos tumores mais avançados.

Observou-se expressão protéica de HER4 no padrão de membrana em apenas 1,7%. A expressão citoplasmática foi evidenciada em aproximadamente um quinto dos casos. Não houve nenhum caso com expressão nuclear de intensidades moderada ou intensa; em apenas 2,2% evidenciou-se marcação nuclear de fraca intensidade. Não encontramos amplificação gênica de HER4 nos CG estudados. HAYASHI et al. (2008) demonstrou expressão protéica de HER4 mais elevada tanto no padrão de membrana (22%) como no citoplasmático (84%). Na correlação com as variáveis clínico-patológicas, a expressão citoplasmática de HER4 esteve relacionada com estádios mais precoces (39,4% ECI, 27,3% ECII, 19,7% ECIII e 12,5% ECIV), menor nível de infiltração mural e ausência de metástase linfonodal ou quando presente, com mediana de linfonodos comprometidos inferior, além de ausência de invasões vascular linfática, sangüínea ou perineural. Ainda, demonstrou-se relação com tumores do tipo

intestinal e bem ou moderadamente diferenciados. Em contraste com os demais receptores da família EGFR que parecem estar relacionados a agressividade tumoral por ativar as vias mitogênicas (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001), o HER4 parece suprimir a proliferação da célula tumoral (SARTOR et al. 2001) com perda da expressão protéica nos tumores fenotipicamente mais agressivos. Um estudo bastante interessante mostrou que HER4 induz apoptose em células de carcinoma mamário. Quando este receptor é ativado por ligante, há proteólise com liberação da porção intracitoplasmática e acúmulo mitocondrial o que induz o efluxo de citocromo-c para o citoplasma e apoptose como evento final (NARESH et al. 2006). No núcleo, parece desempenhar função de chaperona para o fator de transcrição STAT5A (*signal transducers and activators of transcription 5A*), regulando a expressão gênica. (WILLIAMS et al. 2004; CLARK et al. 2005). No presente trabalho, a expressão nuclear esteve associada a tumores difuso ou misto de Lauren, sem nenhuma outra correlação com as variáveis patológicas ou sobrevida global em cinco anos.

Nas análises multivariadas, o estágio clínico avançado, margens cirúrgicas comprometidas e a idade avançada provaram ser fatores de pior prognóstico, relacionados a menor sobrevida global em cinco anos, semelhante ao que se encontra na literatura. Fato interessante foi a história familiar de CG que se comportou como fator de melhor prognóstico quando presente. Apesar de nenhum dos marcadores estudados demonstrarem valor prognóstico na análise multivariada, pudemos observar menor taxa de sobrevida em 5 anos nas análises univariadas para amplificação de HER2 e

expressão nuclear de HER3. Tendo em vista os resultados do presente trabalho que demonstrou a participação de todos os receptores da família EGF na carcinogênese gástrica, em especial nos tumores do tipo intestinal, a utilização de terapias alvos no tratamento do CG deve ser considerada.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A expressão protéica dos receptores da família do fator de crescimento epidérmico: EGFR, HER2, HER3 e HER4, avaliados por IHQ ocorreu em freqüências e padrões variados.
- A amplificação gênica avaliada pela FISH de EGFR e HER2 foi muito pouco freqüente no CG, e de HER3 e HER4 não foi evidenciada.
- Os tumores do tipo intestinal de Lauren, bem ou moderadamente diferenciados se correlacionaram com a expressão protéica e amplificação gênica de HER2, e expressão protéica de HER3 e HER4 no padrão citoplasmático. Já os tumores do tipo difuso, estão relacionados a expressão protéica nuclear de HER3 e HER4, e os tumores do tipo misto foram vistos em associação com expressão nuclear de HER4.
- A expressão protéica HER4 no padrão citoplasmático ocorreu em tumores em estádios mais precoces.
- Nenhum dos receptores estudados demonstrou valor prognóstico isolado na análise multivariada, embora em análise univariada, pode-se correlacionar menor sobrevida global com amplificação de HER2 e expressão nuclear de HER3.
- Não se evidenciou padrões freqüentes de co-expressão protéica no padrão de membrana para os receptores da família do fator de crescimento epidérmico.

- Existe uma forte associação entre a expressão protéica de membrana e amplificação gênica, de EGFR e HER2 avaliadas respectivamente por IHQ e FISH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd El-Rehim DM, Pinder SE, et al. Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. **Br J Cancer** 2004; 91:1532-42.

Arkenau HT. Gastric cancer in the era of molecularly target agents: current drug development strategies. **J Cancer Res Clin Oncol** 2009; 135:855-66.

Axon A. Symptoms and diagnosis of gastric cancer at early curable stage. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2006; 20:697-708.

Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, et al. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. **Br J Cancer** 2001; 85:1700-05.

Bang Y, Chung H, Xu J, et al. Pathological features of advanced gastric cancer: Relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in global screening programme of Toga trial. [abstract]. **J Clin Oncol** 2009; 27(20 Suppl):4556. [Presented at 2009 ASCO Annual Meeting Proceedings; 2009 May 29 through June 2; Orlando, Florida].

Barber M, Fitzgerald RC, Caldas C. Familial gastric cancer - aetiology and pathogenesis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2006; 20:721-34.

Bazley LA, Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family. **Endocr Relat Cancer** 2005; 12 Suppl 1:17-27.

Begnami MDF. **Classificação molecular dos carcinomas gástricos**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Berrino F. The EURO CARE Study: strengths, limitations and perspectives of population-based, comparative survival studies. **Ann Oncol** 2003; 14 Suppl 5:9-13.

Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. **Clin Cancer Res** 2001; 7:1850-5.

Brown LM, Devesa SS. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. **Surg Oncol Clin N Am** 2002; 11:235-56.

Carneiro F. The distinction between dysplasia and truly invasive cancer: classification of gastric carcinomas. **Curr Diag Pathol** 1997; 4:51-9.

Carpenter G, King L Jr, Cohen S. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. **Nature** 1978; 276:409-10.

Carpenter G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 15:143-8.

Casalini P, Iorio MV, Galmozzi E, Ménard S. Role of HER receptors family in development and differentiation. **J Cell Physiol** 2004; 200:343-50.

Chao A, Thun MJ, Henley SJ, Jacobs EJ, McCullough ML, Calle EE. Cigarette smoking, use of other tobacco products and stomach cancer mortality in US adults: The Cancer Prevention Study II. **Int J Cancer** 2002; 101:380-9.

Cho BC, Jeung HC, Choi HJ, et al. Prognostic impact of resection margin involvement after extended (D2/D3) gastrectomy for advanced gastric cancer: a 15-year experience at a single institute. **J Surg Oncol** 2007; 95:461-8.

Chow NH, Chan SH, Tzai TS, Ho CL, Liu HS. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Clin Cancer Res** 2001; 7:1957-62.

Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. **Exp Cell Res** 2003; 284:54-65.

Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:505-16.

Clark DE, Williams CC, Duplessis TT, et al. ERBB4/HER4 potentiates STAT5A transcriptional activity by regulating novel STAT5A serine phosphorylation events. **J Biol Chem** 2005; 280:24175-80.

Correa P. Helicobacter pylori and gastric cancer: state of the art. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1996; 5:477-81.

Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2006; 12:354-62.

Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. **N Engl J Med** 2006; 355:11-20.

Cutsem EV, Velde CV, Roth A, et al. Expert opinion on management of gastric and gastro-oesophageal junction adenocarcinoma on behalf of European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC)-gastrointestinal group. **Eur J Cancer** 2008; 44:182-94.

Cutsem EV, Kang Y, Chung H, et al. Efficacy results from ToGA trial: a phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy in first line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer abstract]. **J Clin Oncol** 2009; 27(20 Suppl):4509. [Presented at 2009 ASCO Annual Meeting Proceedings; 2009 May 29 through June 2; Orlando, Florida].

de Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1978; 75:4001-5.

den Dulk M, Verheij M, Cats A, Jansen EP, Hartgrink HH, Van de Velde CJ. The essentials of locoregional control in the treatment of gastric cancer. **Scand J Surg** 2006; 95:236-42.

DiGiovanna MP, Stern DF, Edgerton SM, Whalen SG, Moore D 2nd, Thor AD. Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients. **J Clin Oncol** 2005; 23:1152-60.

Gamboa-Dominguez A, Dominguez-Fonseca C, Quintanilla-Martinez L, et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system. **Mod Pathol** 2004; 17:579-87.

Eslick GD. Helicobacter pylori infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic, and experimental evidence. **World J Gastroenterol** 2006; 12:2991-9.

Forman D, Burley VJ. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2006; 20:633-49.

Galizia G, Lieto E, Oditura 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

Garrett TP, McKern NM, Lou M, et al. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 2002; 110: 763-73.

González CA, Pera G, Agudo A, et al. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2003; 107:629-34.

Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut* 1992; 33:606-12.

Gullick WJ. The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:75-82.

Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL 3rd. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:8132-6.

Hamilton SR, Aaltonen LA. **Pathology and genetics of tumors of the digestive system**. Lyon: IARC Press; 2000. Tumors of the stomach; p.37-52.

Hayashi M, Inokuchi M, Takagi Y, et al. High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 7843-8.

Helicobacter and Cancer Collaborative Group. Gastric cancer and Helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. **Gut** 2001; 49:347-53.

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

Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between Helicobacter pylori seropositivity and gastric cancer. **Gastroenterology** 1998; 114:1169-79.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. **Exp Cell Res** 2003; 284:31-53.

Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **J Clin Oncol** 2006; 24:2137-50.

Kapitanovic S, Radošević S, Slade N, et al. Expression of erbB-3 protein in colorectal adenocarcinoma: correlation with poor survival. **J Cancer Res Clin Oncol** 2000; 126:205-11.

Kim MA, Jung EJ, Lee HS, et al. Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction. **Hum Pathol** 2007; 38:1386-93.

Kimura M, Tsuda H, Morita D, et al. A proposal for diagnostically meaningful criteria to classify increased epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 gene copy numbers in gastric carcinoma, based on correlation of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical measurements. **Virchows Arch** 2004; 445:255-62.

Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, et al. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:4995-5000.

Koizumi Y, Tsubono Y, Nakaya N, et al. Cigarette smoking and the risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan. **Int J Cancer** 2004; 112:1049-55.

Koumakpayi IH, Diallo JS, Le Page C, et al. Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer. **Clin Cancer Res** 2006; 12:2730-7.

La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, Maisonneuve P, Levi F. Trends of cancer mortality in Europe, 1955-1989: I, Digestive sites. **Eur J Cancer** 1992; 28:132-235

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

Lee JC, Wang ST, Chow NH, Yang HB. Investigation of the prognostic value of coexpressed erbB family members for the survival of colorectal cancer patients after curative surgery. **Eur J Cancer** 2002; 38:1065-71.

Lehtola J. Family study of gastric carcinoma; with special reference to histological types. **Scand J Gastroenterol Suppl** 1978; 50:3-54.

Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, et al. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. **EMBO J** 1998; 17:3385-97.

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.

Lin CR, Chen WS, Kruiger W, et al. Expression cloning of human EGF receptor complementary DNA: gene amplification and three related messenger RNA products in A431 cells. **Science** 1984; 224:843-8.

Lin WC, Kao HW, Robinson D, Kuang HJ, Wu CW, Chen HC. Tyrosine kinases and gastric cancer. **Oncogene** 2000; 19:5680-89.

Lindblad M, Rodríguez LA, Lagergren J. Body mass, tobacco and alcohol and risk of esophageal, gastric cardia, and gastric non-cardia adenocarcinoma among men and women in a nested case-control study. **Cancer Causes Control** 2005; 16:285-94.

Lo HW, Hung MC. Nuclear EGFR signaling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. **Br J Cancer** 2006; 94:184-8.

Lochhead P, El-Omar EM. Gastric cancer. **Br Med Bull** 2008; 85:87-100.

Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. **N Engl J Med** 2001; 345:725-30.

McColl KE. Cancer of the gastric cardia. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2006; 20:687-96.

Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. **Oncogene** 2000; 19:6550-65.

Middleton G, Cunningham D. Current options in the management of gastrointestinal cancer. **Ann Oncol** 1995; 6 Suppl 1:17-25; discussion 25-6.

Ming SC. Gastric carcinoma: a pathobiological classification. **Cancer** 1977; 39:2475-85.

Ming SC. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: a critical review. **Gastric Cancer** 1998; 1:31-50.

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

Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, et al. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. **Cancer** 1999; 85:1894-902.

Naresh A, Long W, Vidal GA, et al. The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. **Cancer Res** 2006, 66:6412-20.

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. **Eur J Cancer** 2001; 37 Suppl 4:S9-15.

Noguchi H, Sakamoto C, Wada K, et al. Expression of heregulin α , erbB2, and erbB3 and their influences on proliferation of gastric epithelial cells. **Gastroenterology** 1999; 117:1119-27.

Normanno N, Bianco C, De Luca A, Salomon DS. The role of EGF-related peptides in tumor growth. **Front Biosci** 2001; 6:685-707.

Normanno N, Campiglio M, De LA, et al. Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth. **Ann Oncol** 2002; 13:65-72.

Normanno N, Maiello MR, De Luca A. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action? **J Cell Physiol** 2003; 194:13-9.

Normanno N, Bianco C, Strizzi L, et al. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. **Curr Drug Targets** 2005; 6:243-57.

Normanno N, de Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene** 2006; 366:2-16.

Offterdinger M, Schofer C, Weipoltshammer K, Grunt TW. c-erbB3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. **J Cell Biol** 2002; 157:929-39.

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. **Cell** 2002; 110:775-87.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. **CA Cancer J Clin** 2005; 55:74-108.

Pinto C, Di Fabio F, Siena S, et al. Phase II study of cetuximab in combination with FOLFIRI in patients with untreated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (FOLCETUX study). **Ann Oncol** 2007; 18:510-7.

Rajkumar T, Gooden CSR, Lemoine NR, Gullick WJ, Goden CS. Expression of the C-erbB-3 protein in gastrointestinal tract tumours determined by monoclonal antibody RTJ1. **J Pathol** 1993; 170:271-8.

Ruschoff J, Dietel M, Baretton G, et al. HER2 diagnostics in gastric cancer – guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. **Virchows Arch** 2010; 457:299-307.

Saito H, Fukumoto Y, Osaki T, et al. Prognostic significance of the ratio between metastatic and dissected lymph nodes (n ratio) in patients with advanced gastric cancer. **J Surg Oncol** 2007; 97:132-5.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. **Crit Rev Oncol Hematol** 1995; 19:183-232.

Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. **J Clin Oncol** 2004; 22:1201-8.

Sartor CI, Zhou H, Kozłowska E, et al. Her4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells. **Mol Cell Biol** 2001; 21:4265-75.

Slesak B, Harłozinska A, Porebska I, et al. Expression of epidermal growth factor receptor family proteins (EGFR, c-erbB-2 and c-erbB-3) in gastric cancer and chronic gastritis. **Anticancer Res** 1998; 18:2727-32.

Sporn MB, Roberts AB. Autocrine growth factors and cancer. **Nature** 1985; 313:745-7.

Stella G, Llimpe FR, Barone C, et al. KRAS and BRAF mutational status as response biomarkers to cetuximab combination therapy in advanced gastric cancer patients [abstract]. **J Clin Oncol** 2009; 27(20 Suppl):e15503. [Presented at 2009 ASCO Annual Meeting Proceedings; 2009 May 29 through June 2; Orlando, Florida].

Takehana T, Kunitomo K, Kono K, et al. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immuno-sorbent assay. **Int J Cancer** 2002; 98:833-7.

Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, et al. Amplification of HER2 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 B, Hasenclever D, Stern K, et al. ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:4317-23.

Tsang WK, Leung SF, Chiu SK, et al. Adjuvant chemoradiation for gastric cancer: experience in the Chinese population. **Clin Oncol** 2007; 19:333-40.

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. **Nature** 1984; 309:418-25.

Verdecchia A, Mariotto A, Gatta G, Bustamante-Teixeira MT, Ajiki W. Comparison of stomach cancer incidence and survival in four continents. **Eur J Cancer** 2003; 39:1603-9.

Xu YH, Ishii S, Clark AJ, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA is homologous to a variety of RNAs overproduced in A431 carcinoma cells. **Nature** 1984; 309:806-10.

Wells A, Marti U. Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2002; 3:697-702.

Williams CC, Allison JG, Vidal GA, et al. The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. **J Cell Biol** 2004; 167:469-78.

Wiseman SM, Makretsov N, Nielsen TO, et al. Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival. **Cancer** 2005; 103:1770-7.

Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. **J Pathol** 2003; 200:290-7.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:127-37.

Zhang XL, Yang YS, Xu DP, et al. Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer. **World J Surg** 2009; 33:2112-8.