

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

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO
EM ADENOCARCINOMA ESOFÁGICO: RELAÇÃO COM ESTÁGIO
TUMORAL E SOBREVIDA APÓS ESOFAGECTOMIA**

**ALUNO: DANIEL NAVARINI
ORIENTADOR: PROF. DR. RICHARD RICACHENEVSKY GURSKI**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
2011**

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO
EM ADENOCARCINOMA ESOFÁGICO: RELAÇÃO COM ESTÁGIO
TUMORAL E SOBREVIDA APÓS ESOFAGECTOMIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Richard Ricachenevsky Gurski

PORTO ALEGRE

2011

**À minha esposa Ana Paula, pelo amor e constante dedicação a mim e à nossa filha
Rafaela.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Richard Ricachenevsky Gurski, pela orientação e cooperação no desenvolvimento deste trabalho.

A Professora Dra. Luise Meurer, pela fundamental colaboração na realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando Fornari, pela fundamental colaboração na redação do artigo científico.

Ao estudante de Medicina/bolsista Lucas Nicoloso Aita, pela importante contribuição na realização desta pesquisa.

Ao Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente a técnica Flávia, pela colaboração na pesquisa.

Ao Dr. Wolfgang William Schmidt Aguiar, pela grande colaboração com a análise estatística do trabalho.

Ao Dr. Carlos Augusto S. Madalosso pela amizade, apoio e incentivo na realização do mestrado.

Aos ex-residentes do Serviço de Cirurgia Digestiva do HCPA, Dr. Maurício Cardoso Zulian, Dr. Diego Fonseca Mossmann e Dr. Guilherme Pretto pela amizade e apoio durante a residência médica e o mestrado.

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina – Ciências Cirúrgicas, pela oportunidade.

À Estela, secretária do PPG Medicina – Ciências Cirúrgicas, pela dedicação e disponibilidade.

Aos professores e cirurgiões contratados do Serviço de Cirurgia Geral e do Serviço de Cirurgia Digestiva do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo incentivo, ajuda e ensinamentos.

Aos residentes do Hospital São Vicente de Paulo e aos membros da equipe da Clínica Gastrobese, pela ajuda durante o período do Mestrado.

À minha esposa Ana Paula, pelo apoio, incentivo e fundamental ajuda na elaboração deste trabalho.

Aos meus pais Armando e Lourdes Navarini, e aos meus irmãos Luciano, Mauro e Marília, pelo constante incentivo e apoio.

À minha pequena Rafaela, pela compreensão.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Estadiamento TNM da Junção Esofagogastrica.....06

Figura 1. Esquema da cascata de reações após a estimulação do EGFR demonstrando as conseqüências celulares. Adaptado de Bhargava 2009⁵¹09

Figura 2. Expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em adenocarcinomas de esôfago por imunohistoquímica. (A) EGFR negativo, ausência de coloração na membrana nas células tumorais. (B) expressão do EGFR positivo, a membrana das células tumorais estão coradas. Ampliação 40X (à esquerda); 100X (à direita). Adaptado de Wang 2006⁵³10

Artigo Científico em Português

Figura 1. Expressão imunohistoquímica do EGFR (400X). (A) Adenocarcinoma EGFR negativo. (B e C) Adenocarcinomas EGFR positivo.....28

Tabela 1. Dados clínicopatológicos e relação com a expressão do EGFR em adenocarcinoma de esôfago e de JEG.....30

Figura 2. Gráfico de sobrevida média de pacientes com tumores EGFR positivo e EGFR negativo, excluídos quatro pacientes com mortalidade precoce por complicações pós-operatórias.....31

Artigo Científico em Inglês

Figure 1. EGFR expression at immunohistochemistry (400X). In A, a case of adenocarcinoma with negative EGFR. In B and C, 2 different cases of adenocarcinoma with positive EGFR (brown staining)..... 46

Table 1. Characteristics of patients with and without EGFR expression.....48

Figure 2. Survival curve in patients with and without EGFR expression (4 patients excluded due to surgery-related mortality).....49

LISTA DE ABREVIATURAS

DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
PBS	Phosphate-buffered Saline
EB	Esôfago de Barrett
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JEG	Junção Esofagogástrica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
AE	Adenocarcinoma de Esôfago

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Revisão Bibliográfica.....	02
2.1. Neoplasia de Esôfago.....	02
2.2. Adenocarcinoma de Esôfago.....	02
2.3. Fatores de risco e fisiopatologia.....	03
2.3.1. DRGE.....	03
2.3.2. Esôfago de Barrett	04
2.3.3. Progressão da DRGE – EB - Adenocarcinoma.....	04
2.4. Relação entre o adenocarcinoma de esôfago distal e o de junção esofagogástrica.....	05
2.5. Diagnóstico e Estadiamento.....	05
2.6. Prognóstico e Tratamento.....	07
2.7. Receptor do Fator de Crescimento Epitelial (EGFR).....	08
2.8. Inibição farmacológica da tirosina quinase e bloqueio do EGFR	11
2.9. Relação do EGFR com o prognóstico no adenocarcinoma de esôfago e de JEG.....	11
3. Referências Bibliográficas.....	13
4. Objetivo.....	21
Artigo Científico em Português.....	22
Resumo	23
Introdução	24
Pacientes e Métodos	26
Resultados	29
Discussão	32
Referências.....	35
Artigo Científico em Inglês	40
Abstract	41
Introduction	42
Patients and Methods	44
Results	47
Discussion	50
References.....	53

1. INTRODUÇÃO

O primeiro relato de um adenocarcinoma de esôfago (AE) foi em 1898, sendo que até 1900 apenas seis casos haviam sido descritos. Neste período, a maioria dos médicos acreditava que este tipo de tumor era na verdade um adenocarcinoma gástrico com invasão do esôfago. Somente após 1950 houve descrição de adenocarcinoma desenvolvendo-se sobre a linha Z, surgindo assim o conceito de adenocarcinoma primário do esôfago. Neste período, esta neoplasia era rara. Após a década de 1970, ocorreu um aumento progressivo na incidência desta doença na maioria dos países do mundo, sendo que nos Estados Unidos, este é o tipo de neoplasia cuja incidência mais cresce nos últimos anos. Da mesma forma, o adenocarcinoma da junção esofagogástrica (JEG), que possui fisiopatologia e prognóstico semelhantes, também tem tido aumento crescente na sua incidência ⁸.

O melhor entendimento da biologia molecular, com o conhecimento de novos marcadores tumorais, está propiciando uma avaliação mais precisa do prognóstico desta neoplasia e o desenvolvimento de drogas promissoras no tratamento de muitos tipos de neoplasias. Para tanto, é necessário o conhecimento detalhado da influência exercida por estes marcadores sobre o desenvolvimento e crescimento tumoral ³⁹.

Algumas neoplasias, como é o caso do adenocarcinoma de esôfago e do adenocarcinoma da junção esôfago gástrica, tem resposta pobre ao tratamento com a quimioterapia convencional, sendo o tratamento cirúrgico a única terapêutica com resultado eficaz.

O descobrimento de marcadores com potencial interferência na gênese e crescimento tumoral pode levar ao desenvolvimento de drogas com melhor resposta no tratamento clínico destas patologias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Neoplasia de esôfago

O câncer de esôfago é um dos tumores mais agressivos e, geralmente, possui diagnóstico tardio e pobres resultados terapêuticos. Apresenta dois tipos histológicos mais comuns, que são: o carcinoma epidermóide e o adenocarcinoma. O primeiro é o de maior prevalência no mundo, apresenta maior proporção entre os homens e sua incidência é variável conforme a região geográfica. Está relacionado ao tabagismo, ao alcoolismo, ao consumo de bebidas quentes e à acalasia ¹. O outro tipo, o adenocarcinoma, tem tido sua frequência significativamente aumentada nas últimas décadas e está relacionado, principalmente, a Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) e ao Esôfago de Barrett (EB) ¹. De acordo com Barros *et al* (1999), o carcinoma epidermóide é a forma mais prevalente em regiões endêmicas do mundo e o adenocarcinoma, é mais comum em áreas não endêmicas, como a América do Norte e em muitos países da Europa Ocidental ².

No Brasil, o câncer de esôfago está entre os dez mais incidentes (6º entre os homens e 9º entre as mulheres). Conforme dados da estimativa 2010, do Instituto Nacional do Câncer (INCA), existe uma grande variação na incidência desta neoplasia no Brasil, sendo que a região Sul sempre apresentou a maior taxa, tanto para homens quanto para mulheres. No país, a incidência entre mulheres variou de 0.25 (Amapá) a 7.18 casos (Rio Grande do Sul); já a taxa entre homens variou de 1.04 (Acre) a 18.5 casos (Rio Grande do Sul) para cada 100.000 habitantes ³. Esta grande diferença é justificada pelas diferenças regionais, ou seja, em regiões onde existem hábitos lesivos a mucosa esofágica, a incidência é significativamente maior.

2.2. Adenocarcinoma de Esôfago

O primeiro relato de um AE foi em 1898, sendo que até 1900 apenas seis casos haviam sido relatados. Neste período, a maioria dos médicos acreditava que este tipo de tumor era, na verdade, um adenocarcinoma gástrico com invasão do esôfago. Somente após 1950 houve descrição de adenocarcinoma desenvolvendo-se sobre a linha Z, surgindo assim o conceito de adenocarcinoma primário do esôfago. Neste período, esta neoplasia era rara. Após a década de 1970, ocorreu um aumento progressivo na incidência desta doença na maioria dos países do mundo. Da mesma forma, o

adenocarcinoma da junção esofagogástrica (JEG), que possui fisiopatologia semelhante, também teve um aumento significativo na sua incidência ⁴.

Nas últimas duas a três décadas, a incidência e a mortalidade relatadas para o AE aumentaram nos Estados Unidos, em diversos países europeus e na Oceania ⁵. Nos Estados Unidos, o AE é um dos tumores malignos que apresenta maior crescimento na incidência, uma vez que, entre os norte-americanos, aumentou 450% em brancos e 50% em negros, sendo mais freqüente entre os homens brancos (90% das vezes) ⁶.

Apesar de existirem poucas publicações sobre a epidemiologia do adenocarcinoma de esôfago no Brasil, eles representaram cerca de 15% dos tumores de esôfago e JEG, no período de 1987 a 1996 ². São neoplasias agressivas e na maioria dos casos, o prognóstico é reservado ⁷. A sobrevida de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico, com intenção curativa, é de somente 25 % em cinco anos ⁶.

2.3. Fatores de risco e fisiopatologia

Os fatores de risco envolvidos nesta doença ainda não estão totalmente esclarecidos. No entanto, a maioria dos estudos considera a Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) e a presença do Esôfago de Barrett (EB) os principais. Outros fatores que também podem estar envolvidos são: obesidade, uso de medicamentos que provocam relaxamento do esfíncter esofágico inferior, uso de medicações para tratamento de asma, colecistectomia prévia e tabagismo. Os fatores considerados protetores são: infecção por *Helicobacter pylori*, uso de antiinflamatórios não-esteroidais e consumo de vinho ^{6, 8}. Ainda não está bem definida a função do uso de inibidores de bomba de prótons e outros antiácidos na gênese desta doença, assim como o uso de álcool, a herança genética e o consumo de gorduras ⁸.

2.3.1. DRGE

A DRGE caracteriza-se como a condição na qual o refluxo do conteúdo gástrico causa sintomas incomodativos e/ou complicações ⁹. É uma doença bastante freqüente, e nas últimas décadas, tem aumentado significativamente ¹⁰. Estudos populacionais demonstram que, aproximadamente, 20% das pessoas apresentam sintomas de refluxo ao menos uma vez por semana e, até 60% apresentam sintomas ocasionais ^{11, 12, 13}.

De acordo com Lagergren *et al* (1999), um estudo de caso-controle, comparando pessoas assintomáticas com portadores de refluxo gastroesofágico, demonstrou um risco 43 vezes maior de desenvolvimento de AE e adenocarcinoma de JEG no grupo com

refluxo ¹⁴. Isso ocorre porque o ácido que reflui altera a estrutura normal do epitélio esofágico, produzindo dilatação dos espaços intercelulares. A penetração do ácido causa mudança no pH tissular, troca de íons com as células e aumento da acidez intracelular, fator este que representa o início da morte celular ¹⁵. A complicação mais importante desse processo inflamatório ocorre em consequência da cicatrização desordenada das lesões erosivas da mucosa esofágica, quando as células da camada basal do epitélio escamoso, ou dos ductos das glândulas submucosas esofágicas, diferenciam-se em células colunares que recobrem o esôfago distal, substituindo assim o epitélio escamoso ^{16, 17}.

2.3.2. Esôfago de Barrett

O Esôfago de Barrett é uma condição clínica na qual o epitélio escamoso estratificado, que normalmente reveste o esôfago distal, é substituído por um epitélio colunar com metaplasia intestinal associado à presença de células caliciformes (*goblet cells*) ^{18, 19}. Representa a consequência histológica mais grave do refluxo gastroesofágico crônico desenvolvendo-se em aproximadamente 8% a 20% dos pacientes que sofrem de DRGE ^{20, 21}. O epitélio metaplásico no esôfago pode progredir para neoplasia, e o risco anual de pacientes com EB desenvolverem adenocarcinoma é de 0,5% a 2%, o que representa um risco 30 a 125 vezes maior do que o da população geral ^{20, 22, 23, 24, 25}.

Em pacientes com Esôfago de Barrett, a progressão para adenocarcinoma pode ocorrer em virtude das alterações na supressão de alguns genes, como o p53 e p16. As anormalidades gênicas favorecem a hiperproliferação celular e, durante a fase proliferativa, as células adquirem mais alterações genéticas, que culminam com um crescimento celular autônomo. As aberrações crescentes do DNA favorecem que um clone de células malignas tenha a capacidade de invadir os tecidos adjacentes e proliferar-se em localizações não usuais. O exato mecanismo evolutivo gênico de transformação do Esôfago de Barrett em adenocarcinoma ainda é desconhecido ²⁶.

2.3.3. Progressão DRGE - Barrett – Adenocarcinoma

A razão pela qual somente uma minoria dos pacientes com DRGE desenvolve o EB é também desconhecida ²¹. Da mesma forma, se desconhece o modo exato pelo qual a seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma se inicia. Sabe-se que esta seqüência surge a partir de alterações histológicas caracterizadas, inicialmente, por um processo

inflamatório crônico em consequência do refluxo gastroduodenal sobre a mucosa esofágica ¹². A partir do processo inflamatório sobre a mucosa esofágica, as células podem adquirir, ao longo do tempo, alterações funcionais como resistência a apoptose, aumento da proliferação celular e instabilidade genômica, com aumento da expressão de diversas proteínas específicas, relacionadas ao controle do ciclo celular ^{23, 25}. A caracterização do mecanismo molecular que promove a progressão do Esôfago de Barrett pode levar a identificação de potenciais marcadores genéticos preditivos para a estimativa do risco de desenvolvimento de câncer esofágico.

2.4. Relação entre o adenocarcinoma de esôfago distal e o de junção esofagogástrica

A relação entre o AE e o adenocarcinoma de JEG ainda é um assunto controverso, pois os adenocarcinomas de esôfago distal podem crescer envolvendo a JEG e os de JEG podem envolver o esôfago distal. Por possuírem fisiopatologia semelhante, não há justificativa para separar estas duas entidades clínicas ⁸.

Com objetivo de facilitar o entendimento dos tumores de JEG, Siewert *et al* criaram uma classificação para estas lesões. Os tumores de JEG são tumores localizados até 5 cm acima ou 5 cm abaixo do cárdia. A classificação de Siewert separa os tumores da JEG em três tipos:

Tipo I: são tumores originados do esôfago distal;

Tipo II: são tumores centrados na cárdia e;

Tipo III: são tumores subcárdicos ²⁷.

2.5 Diagnóstico e estadiamento

As principais manifestações clínicas das neoplasias de esôfago distal e da JEG são a disfagia progressiva e a perda ponderal. A dor epigástrica ou retroesternal também pode estar presente, assim como anemia e regurgitação salivar. Na doença avançada, os sinais e sintomas estão geralmente associados ao comprometimento de outros órgãos.

O estudo contrastado do esôfago pode sugerir a presença do tumor, mas o diagnóstico definitivo é estabelecido por exame endoscópico associado à biópsia ²⁸. Exames de tomografia computadorizada de tórax e abdome, tomografia computadorizada por emissão de pósitrons, broncoscopia e ecoendoscopia são usados no estadiamento tumoral, assim como a laparoscopia e a toracoscopia ²⁹.

O estadiamento dos adenocarcinomas de esôfago distal e da JEG é baseado no sistema TNM, edição 2010 (TABELA 1)³⁰.

Tabela 1- Estadiamento TNM da Junção Esofagogástrica.

	Tumor primário (T)
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
TO	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Displasia de grau alto
T1	Tumor invade lâmina própria, muscular da mucosa ou submucosa
T1a	Tumor invade lâmina própria ou muscular da mucosa
T1b	Tumor invade submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor invade a adventícia
T4	Tumor invade estruturas adjacentes
T4a	Tumor ressecável invadindo pleura, pericárdio ou diafragma
T4b	Tumor não ressecável, invadindo outras estruturas adjacentes, tais como aorta, coluna vertebral, traqueia, etc.
	Linfonodos Regionais (N)
Nx	Linfonodo regional não pode ser avaliado
N0	Nenhuma metástase em linfonodos regionais
N1	Metastases em 1-2 linfonodos regionais
N2	Metastases em 3-6 linfonodos regionais
N3	Metastases em 7 ou mais linfonodos regionais
	Metástases (M)
M0	Nenhuma metástase à distância
M1	Presença de metástases à distância
	Grau histológico (G)
Gx	Grau não pode ser avaliado
G1	Bem diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pouco diferenciado
G4	Indiferenciado

Estágio anatômico/prognóstico de grupos				
Adenocarcinoma				
Estágio	T	N	M	Grau
0	Tis	N0	M0	1, X
IA	T1	N0	M0	1-2, X
IB	T1	N0	M0	3
	T2	N0	M0	1-2, X
IIA	T2	N0	M0	3
IIB	T3	N0	M0	Qualquer
	T1-2	N1	M0	Qualquer
IIIA	T1-2	N2	M0	Qualquer
	T3	N1	M0	Qualquer
	T4a	N0	M0	Qualquer
IIIB	T3	N2	M0	Qualquer
IIIC	T4a	N1-2	M0	Qualquer
	T4b	Qualquer	M0	Qualquer
	Qualquer	N3	M0	Qualquer
IV	Qualquer	Qualquer	M1	Qualquer

2.6. Prognóstico e Tratamento

Os tratamentos para o adenocarcinoma de esôfago distal e de JEG incluem: ablação ou ressecção mucosa, esofagectomia, esofagogastrectomia, quimioterapia e/ou radioterapia definitiva, esofagectomia combinada com quimioterapia e/ou radioterapia adjuvante ou neo-adjuvante, assim como procedimentos paliativos com uso de próteses (stents) e terapia fotodinâmica ou com laser. A esofagectomia com ressecção linfonodal reduz as taxas de recorrência local e aumenta as chances de cura. A terapêutica cirúrgica com ressecção completa da neoplasia é fundamental para a sobrevida em longo prazo no câncer esofágico localizado ^{31, 32, 33, 34, 35, 36}.

O principal fator envolvido no prognóstico desta neoplasia é o estadiamento tumoral. Porém, outros fatores como a mutação no gene p53 e a metilação do gene polipose adenomatosa coli, representam fatores independentes para um pior prognóstico ⁸.

No momento do diagnóstico, em cerca de 30% dos pacientes, esta neoplasia se estende além dos limites loco-regionais. Menos de 60% dos pacientes com doença loco-regional são passíveis de ressecção curativa. Cerca de 70% a 80% dos espécimes ressecados apresentam metástases nos linfonodos regionais. A sobrevida geral, em cinco anos após o diagnóstico, é menor do que 20% ³⁷.

Em estudo recente relacionado à sobrevida de pacientes, foi observado que o uso da cirurgia com quimioterapia e radioterapia neo-adjuvante tem se tornado a terapia mais aceita nos tumores de esôfago e JEG nos estágios II e III ³⁸.

2.7. Receptor do Fator de Crescimento Epitelial (EGFR)

Nas últimas duas décadas, a biologia molecular tem revelado diversos mecanismos de progressão das neoplasias, permitindo com isso, opções terapêuticas mais específicas que reduzem os efeitos colaterais do tratamento e melhoram o prognóstico destas doenças ³⁹.

Um dos marcadores moleculares mais promissores para a terapia do câncer é o receptor do fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor receptor- EGFR), já que é super expresso, desregulado ou mutado em muitas neoplasias humanas ⁴⁰. A ativação do EGFR tem sido conhecida por acentuar processos responsáveis pelo crescimento e progressão tumoral, incluindo o aumento da proliferação, diferenciação e migração celular, apoptose (morte programada de células), desenvolvimento de metástase e angiogênese ^{41, 42, 43}. Muitos estudos evidenciam que a alta expressão do EGFR em neoplasias, está correlacionada com baixa sobrevida, estágio avançado da doença e pouco diferenciado ⁴¹, pobre resposta à terapêutica e ao desenvolvimento de resistência aos agentes citotóxicos ⁴³, além de piora no prognóstico ⁴⁴.

Dados experimentais sugerem e suportam que a ativação da atividade quinase dos receptores ErbB exerce uma função primária no desenvolvimento e / ou progressão de vários tipos de tumores. A proliferação celular é a resposta predominante das células normais à ativação do EGFR ⁴⁵.

A família dos receptores dos fatores de crescimento epidérmico é um grupo bem definido de quatro moléculas homólogas que incluem o EGFR (HER-1), ErbB2 (HER-2), ErbB3 (HER-3) e ErbB4 (HER-4) ^{41, 43, 46, 47}.

O EGFR é uma proteína pertencente à superfamília dos receptores da tirosinaquinase, os quais atuam como mediadores da resposta celular a diversos fatores extracelulares ⁴⁹. Os receptores tirosinaquinase são mediadores primários de muitos

sinais que determinam o destino do crescimento, diferenciação, migração e morte celular ⁴⁹. Os receptores ErbB compreendem três estruturas de domínio: um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático tirosina quinase associado com um regulador tirosina quinase ou um receptor ^{43, 47, 50}.

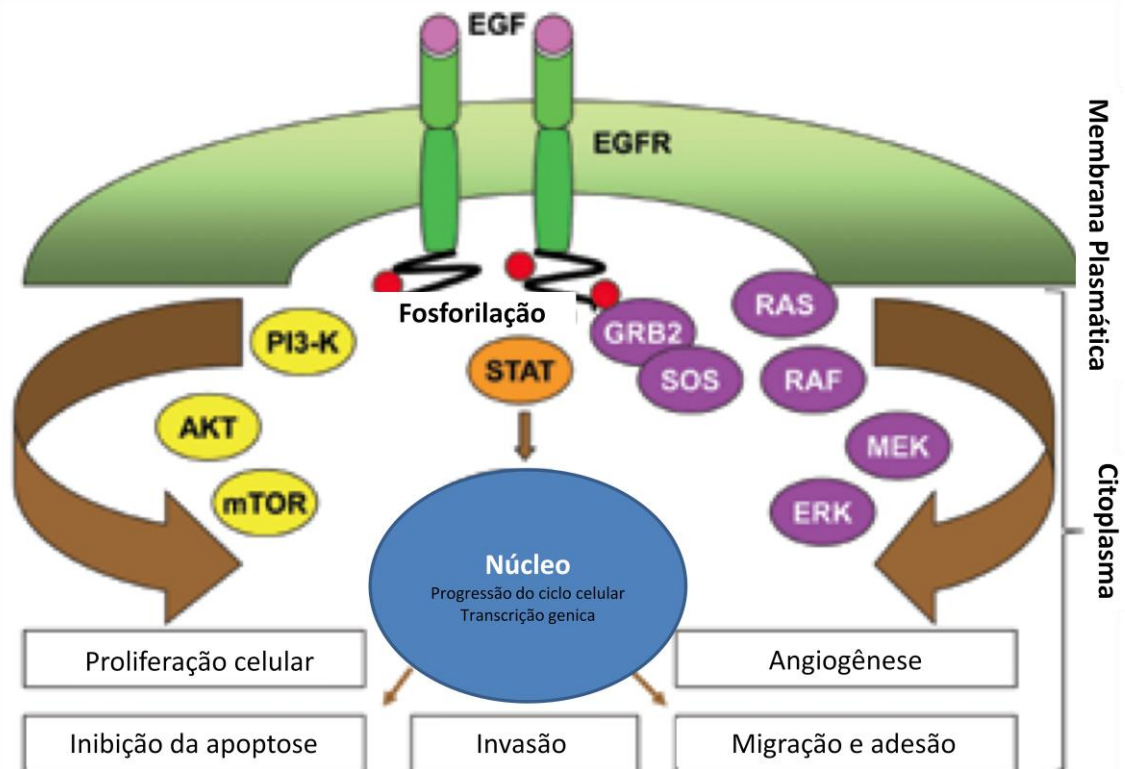


Figura 1. Esquema da cascata de reações após a estimulação do EGFR demonstrando as conseqüências celulares. Adaptado de Bhargava 2009 ⁵¹.

O EGFR (HER1 ou erbB1) é expresso, ou altamente expresso, em uma grande variedade de tumores incluindo câncer de pulmão não-pequenas células, mamas, cabeça e pescoço, estômago, colo-retal, esôfago, próstata, bexiga, rim, pâncreas e tumores ovarianos ⁴⁴. O percentual de expressão do EGFR em tumores humanos é de 40-80% em câncer de pulmão não-pequenas células, 80-100% nos de cabeça e pescoço, 25-100% nos colo-retais, 33-81% nos gástricos, 30-50% nos pancreáticos, 35-70% nos ovarianos, 15-37% nos de mama, 40-90% nos de próstata e 40-92% nos gliomas ⁴².

Em alguns casos, como no carcinoma não-pequenas células de pulmão, a alta expressão do receptor está correlacionada com uma alta proporção de metástases, pobre

diferenciação celular e redução na sobrevida⁴⁹. No adenocarcinoma gástrico a expressão do EGFR mostrou-se como fator independente de piora no prognóstico⁵⁰.

A importância desses receptores tem sido amplamente estudada em diversas neoplasias malignas, com ênfase nos carcinomas de mama, inclusive originando terapêuticas específicas no bloqueio de sua atividade⁵². Alguns estudos têm sugerido que a ativação aberrante da atividade quinase desses receptores desempenha papel importante no desenvolvimento e na progressão tumoral em carcinoma epidermóide de esôfago, induzindo aumento da migração e agregação celular, assim como hiperproliferação e diferenciação de células epiteliais⁴⁶.

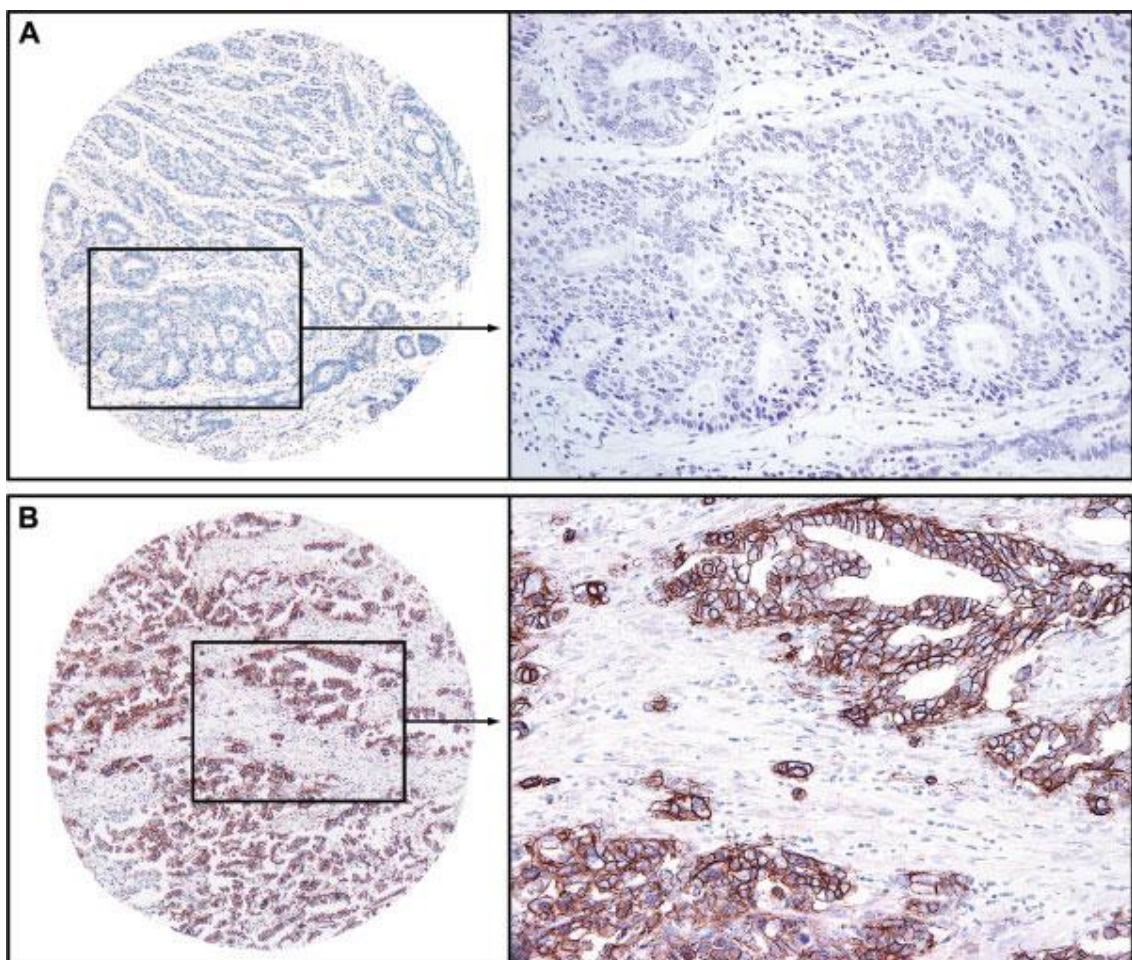


Figura 2. Expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em adenocarcinomas de esôfago por imunohistoquímica. (A) EGFR negativo, ausência de coloração na membrana nas células tumorais. (B) expressão do EGFR positivo, a membrana das células tumorais estão coradas. Ampliação 40X (à esquerda); 100X (à direita). Reproduzido de Wang, 2006⁵³.

2.8. Inibição farmacológica da tirosina quinase e bloqueio do EGFR

Apesar dos avanços em quimioterapia convencional terem aumentado o prognóstico e a sobrevida, para muitos pacientes com tumores sólidos esta resposta permanece pobre, especialmente para aqueles com metástases. A pesquisa para terapias mais efetivas e menos tóxicas tem gerado uma nova geração de drogas em oncologia, incluindo pequenas moléculas inibidoras da tirosina quinase que agem inibindo os seus receptores, e desta forma regulando a proliferação e diferenciação celular, levando a um aumento na sobrevida ⁵⁴.

A relevância clínica da expressão do EGFR tem aumentado devido ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais bloqueadores do EGFR como o Cetuximab, bem como inibidores da tirosina quinase como o Gefitinib e Erlotinib. Estudos de fase II e III têm demonstrado resposta significativa em pacientes com carcinomas escamosos de cabeça e pescoço e em carcinoma não-pequenas células de pulmão com o uso do Cetuximab combinado com quimioterapia. Também tem sido demonstrado eficácia no tratamento de pacientes com neoplasia colo-retal avançada ou irressecável com Irinotecano ⁵³.

Atualmente o uso de anticorpos anti-EGFR tem se mostrado eficaz para o tratamento de diversos tipos de neoplasias ⁵⁵.

Existem vários estudos de fase III avaliando o uso de agentes anti-EGFR no tratamento do adenocarcinoma esofágico e de JEG, no entanto o benefício destes tratamentos ainda não está estabelecido ⁴.

2.9 Relação do EGFR com o prognóstico no adenocarcinoma de esôfago e de JEG.

Muitos genes e moléculas podem ter impacto sobre o prognóstico do AE e no adenocarcinoma de JEG, entre os quais está o EGFR. Outros marcadores já pesquisados como o p21 e o VEGF não evidenciaram esta relação ^{67, 69}. Esta doença mostra alterações genéticas múltiplas, indicando que a progressão do câncer é um processo complexo, e certamente, não é um único fator molecular que influencia no comportamento biológico do tumor ³⁹.

Através da análise de citometria de fluxo se constatou o aumento da expressão do EGFR nas áreas que apresentaram maior grau de displasia esofágica, quando comparado com a mucosa de Barrett sem displasia ou mucosa cárdica normal ⁵⁶. Alguns autores sugerem que a expressão desta proteína pode exercer uma função na

carcinogênese esofágica e correlacionam esta expressão com uma piora no prognóstico do tumor^{57, 58, 59, 60, 61, 62, 63}. A partir da análise de citometria de fluxo, foi observado aumento da expressão do EGFR nas áreas que apresentaram maior grau de displasia esofágica, comparado com mucosa de Barrett sem displasia ou mucosa cárdica normal. Esse aumento da expressão dos receptores do fator de crescimento epitelial pode refletir o maior potencial de malignidade⁶⁴.

O EGFR aumenta com a progressão de Esôfago de Barrett para AE⁶⁵. Sua expressão nestes tumores foi correlacionada com avanço da classificação patológica do tumor, piora no grau de diferenciação tumoral, aumento na ocorrência de metástases linfonodais e à distância, além de piora na sobrevida^{39, 53, 66}.

A imunohistoquímica é usada para avaliar os níveis da proteína EGFR e é, de forma argumentável, o método mais conveniente para análise de amostras clínicas⁴⁴.

3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Weitz JC, Berger Z, Sabah S, Silva H. Diagnóstico y Tratamiento de las Enfermedades Digestivas.2008 In: Miranda, I.B. & Gutiérrez, R.E. Cáncer de esófago. p.100-112.
- (2) Barros SG, Vidal RM, Luz LP, et al. Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10 year period at a cancer referral center in southern Brazil. *Arq Gastroenterol* 1999;36:32-6.
- (3) INCA, Estimativa 2010, Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/> Acesso em março de 2011.
- (4) Ku GY, Ilson D H, Esophagogastric cancer: Targeted agents. *Cancer Treatment Reviews* 2010;36:235-248.
- (5) El-Serag HB. The epidemic of esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002;31:421-440.
- (6) Pande A U, Iyer R V, Rani A, Maddipatla S, Yang G Y, Nwogu C E, Black J D, Levea C M, Javle M M. Epidermal Growth Factor Receptor-Directed Therapy in Esophageal Cancer. *Oncology*,2007;73(5-6):281-289.
- (7) Al-Kasspoles M, Moore J H, Orringer M B, Beer D G. Amplification and over-expression of the EGFR and erbB-2 genes in human esophageal adenocarcinomas. *International Journal of Cancer*, 1993;54(2): 213-219.
- (8) Steven R, DeMeester. Adenocarcinoma of the Esophagus and Cardia: A Review of the Disease and Its Treatment, *Annals of Surgical Oncology*, 2005;13(1):12-30.
- (9) Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1900-20; quiz 43.

- (10) Moraes-Filho JP, Navarro-Rodriguez T, Barbuti R, Eisig J, Chinzon D, Bernardo W. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease: an evidence-based consensus. *Arq Gastroenterol* 2010;47:99-115.
- (11) Locke GR, 3rd, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ, 3rd. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 1997;112:1448-56.
- (12) Jones RH, Lydeard SE, Hobbs FD, et al. Dyspepsia in England and Scotland. *Gut* 1990;31:401-5.
- (13) Moraes-Filho JP, Chinzon D, Eisig JN, Hashimoto CL, Zaterka S. Prevalence of heartburn and gastroesophageal reflux disease in the urban Brazilian population. *Arq Gastroenterol* 2005;42:122-7.
- (14) Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340:825-31.
- (15) Wang C, Hunt RH. Precise role of acid in non-erosive reflux disease. *Digestion* 2008;78 (1):31-41.
- (16) Orlando RC. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:584-8.
- (17) Orlando RC. Pathogenesis of reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *Med Clin North Am* 2005;89:219-41.
- (18) Kahrilas PJ, Dodds WJ, Hogan WJ, Kern M, Arndorfer RC, Reece A. Esophageal peristaltic dysfunction in peptic esophagitis. *Gastroenterology* 1986;91:897-904.
- (19) Diener U, Patti MG, Molena D, Fisichella PM, Way LW. Esophageal dysmotility and gastroesophageal reflux disease. *J Gastrointest Surg* 2001;5:260-5.

- (20) Lemme EM, Abrahao-Junior LJ, Manhaes Y, Shechter R, Carvalho BB, Alvariz A. Ineffective esophageal motility in gastroesophageal erosive reflux disease and in nonerosive reflux disease: are they different? *J Clin Gastroenterol* 2005;39:224-7.
- (21) Fibbe C, Layer P, Keller J, Strate U, Emmermann A, Zornig C. Esophageal motility in reflux disease before and after fundoplication: a prospective, randomized, clinical, and manometric study. *Gastroenterology* 2001;121:5-14.
- (22) Grossi L, Ciccaglione AF, Travaglini N, Marzio L. Transient lower esophageal sphincter relaxations and gastroesophageal reflux episodes in healthy subjects and GERD patients during 24 hours. *Dig Dis Sci* 2001;46:815-21.
- (23) Meneghetti AT, Tedesco P, Damani T, Patti MG. Esophageal mucosal damage may promote dysmotility and worsen esophageal acid exposure. *J Gastrointest Surg* 2005;9:1313-7.
- (24) Chrysos E, Prokopakis G, Athanasakis E, et al. Factors affecting esophageal motility in gastroesophageal reflux disease. *Arch Surg* 2003;138:241-6.
- (25) Orlando RC. Esophageal epithelial defense against acid injury. *J Clin Gastroenterol* 1991;13 Suppl 2:S1-5.
- (26) Barrett MT, Sanchez CA, Prevo LJ, Wong DJ, Galipeau PC, Paulson TG, et al. Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. *Nat Genet.* 1999 May;22(1):106-9.
- (27) Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Br J Surg.* 1998;85:1457-1459.
- (28) Lightdale CJ. Esophageal cancer. *American College of Gastroenterology. Am J Gastroenterol.* 1999;94(1):20-9.

- (29) Kaushik N, Khalid A, Brody D, Luketich J, McGrath K. Endoscopic ultrasound compared with laparoscopy for staging esophageal cancer. *Ann Thorac Surg.* 2007;83(6):2000-2.
- (30) AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, 7th ed, Edge, SB, Byrd, DR, Compton, CC, et al (Eds), Springer, New York 2010. p.103.
- (31) Siewert RJ, Feith M, Werner M, Stein HJ. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: results of surgical therapy based on anatomical/topographic classification in 1,002 consecutive patients. *Ann Surg* 2000;232:353-361.
- (32) Nigro JJ, DeMeester SR, Hagen JA, et al. Node status in transmural esophageal adenocarcinoma and outcome after en bloc esophagectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117: 960-968.
- (33) Ellis FH Jr, HeatleyGJ, Krasna MJ, et al. Esophagogastrectomy for carcinoma of the esophagus and cardia: a comparison of findings and results after standard resection in three consecutive eight-year intervals with improved staging criteria. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 113:836-46;discussão 846-8.
- (34) Altorki NMD, Skinner DMD. Should en bloc esophagectomy be the standard of care for esophageal carcinoma? *Ann Surg* 2001; 234:581-587.
- (35) Nygaard K, Hagen S, Hansen HS, et al. Pre-operative radiotherapy prolongs survival in operable esophageal carcinoma: a randomized, multicenter studyof pre-operative radiotherapyand chemotherapy. The second candinavian trial in esophageal cancer. *World J Surg* 1992; 16:1104-1109; discussão 1110.
- (36) Ando N, Ozawa S, Kitagawa Y, et al. Improvement in the results of surgical treatment of advanced squamous esophageal carcinoma during 15 consecutive years. *Ann Surg* 2000; 232:225-232.
- (37) Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277-300.

- (38) Krasna MJ. Multimodality therapy for esophageal cancer. *Oncology* (Williston Park). 2010(12):1134-8.
- (39) Lagarde S M, Kate F J, Richel D J, Offerhaus G J, Lanschot J J. Molecular prognostic factors in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol*, 2007;14(2):977-91.
- (40) Walker J M. Methods in Molecular Biology. In: Patel, I.B.; Bertics, P.J. Epidermal Growth Factor- Methods and Protocols. Série 327. In: Chinnaiyan, P.; Harari, P.M. Clinical Advancement of EGFR inhibitors in cancer therapy. 2006;189-202.
- (41) Tedesco K L, Lockhart A C, Berlin J D. The epidermal growth factor receptor as a target for gastrointestinal cancer therapy. *Current Treatment Options in Oncology*, 2004; 5: 393-403.
- (42) Vlahovic G, Crawford J. Activation of tyrosine kinases in cancer. *The Oncologist*, 2003;8: 531-538.
- (43) Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *The Oncologist*, 2002;7(4):2-8.
- (44) Arteaga C L. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *The Oncologist*, 2002;7(4):31-39.
- (45) Wilkinson N W, Black J D, Roukhadze E, Driscoll D, Smiley S, Hoshi H, Geradts J, Javle M, Brattain M. Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2004;8(4):448-453.
- (46) Sato Y, Nascimento CF, Ferreira S S, Fregnani J H T G, Soares F A. Análise da expressão imuno-histoquímica de c-erbB2 e EGFR em carcinoma epidermóide de esôfago. *J. Bras Patol Med Lab*, 2007;43(4):275-283.

- (47) Rowinsky E K. Signal events: Cell signal transduction and its inhibition in cancer. *The Oncologist*, 2003;8(3):5-17.
- (48) Corpa M V N, Chioato L, Ojopi E, Bacchi C E. EGFR e Carcinoma de Pulmão. *Consultoria em Patologia*, 2007.
- (49) Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Letters*, 1997; 410: 83-86.
- (50) Gamboa-Dominguez A, Dominguez-Fonseca C, Quintanilla-Martinez L, Reyes-Gutierrez E, Green D, Angeles-Angeles A, Busch R, Hermannstädter C, Nährig J, Becker KF, Becker I, Höfler H, Fend F, Lubber B. 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 May;17(5):579-87.
- (51) Bhargava R. Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Carcinoma: An Overview. *Connection* 2009, p. 40-43.
- (52) Perez EA. The role of adjuvant monoclonal antibody therapy for breast cancer: rationale and new studies. *Curr Oncol Rep*. 2001;3:516–522.
- (53) Wang KL, Wu T T, Choi IS, Wang H, Reseetkova E, Correa A M, Hofstetter W L, Swisher S G, Ajani J A, Rashid A, Albarracin C T. Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Cancer*, 2007;109(4): 658-667.
- (54) Arnold D, Peinert S, Voigt W, Schmoll H-J. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: present and future role in cancer treatment: a review. *The Oncologist*, 2006;11:602-611.
- (55) Zhu Z. Targeted cancer therapies based on antibodies directed against epidermal growth factor receptor: status and perspectives. *Acta Pharmacol Sin*, 2007;28:1476–93.

- (56) Jankowski J, Hopwood D, Pringle R, Wormsley KG. Increased expression of epidermal growth factor receptors in Barrett's esophagus associated with alkaline reflux: a putative model for carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993;88:402-8.
- (57) Al-Kasspooles M, Moore J H, Orringer M B, Beer D G. Amplification and overexpression of the EGFR and erbB-2 genes in human esophageal adenocarcinomas. *Int J Cancer*, 1993;54:213–219.
- (58) Poller DN, Steele R J, Morrell K. Epidermal growth factor receptor expression in Barrett's esophagus. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:1226–1227.
- (59) Jankowski J, Hopwood D, Wormsley, K.G. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and their receptor in gastro-oesophageal diseases. *Dig Dis* 1993;11:1-11.
- (60) Yacoub L, Goldman H, Odze R D Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor receptor, and MiB-1 expression in Barrett's-associated neoplasia: correlation with prognosis. *Mod Pathol* 1997;10:105–112.
- (61) Watanabe G, Kaganoi J, Imamura M, Shimada Y, Itami A, Uchida S, Sato F, Kitagawa M. Progression of esophageal carcinoma by loss of EGF-STAT1 pathway. *Cancer J* 2001;7: 132-139.
- (62) Jankowski J, Murphy S, Coghill G, Grant A, Wormsley KG, Sanders DS, Kerr M, Hopwood D. Epidermal growth factor receptors in the oesophagus. *Gut* 1992;33:439–443.
- (63) Calabro A, Orsini B, Renzi D, Papi L, Surrenti E, Amorosi A, Herbst H, Milani S, Surrenti C. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptor in the human oesophagus. *Histochem J* 1997;29:745–758.

- (64) Jankowski J, Hopwood D, Pringle R, Wormsley K G. Increased expression of epidermal growth factor receptors in Barret's esophagus associated with alkaline reflux: a putative model for carcinogenesis. *Am J Gastroenterol*, 1993; 88: 402-408.
- (65) Li Y, Wo JM, Ray M B, Jones W, Su RR, Ellis S, Martin R C. Cyclooxygenase-2 and epithelial growth factor receptor up-regulation during progression of Barret's esophagus to adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*, 2006;12:928-934
- (66) Langer R, Von Rahden BH, Nahrig J, Von Weyhern C, Reiter R, Feith M, Stein HJ, Siewert JR, Höfler H, Sarbia M. Prognostic significance of expression patterns of c-erbB-2, p53, p16INK4A, p27KIP1, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor in oesophageal adenocarcinoma: a tissue microarray study. *J Clin Pathol*. 2006 Jun;59(6):631-4.
- (67) Cavazzola LT, Rosa ARP, Schirmer CC, Gurski RR, Telles JPB, Mielke F, Meurer L, Edelweiss MIA, Kruel CDP. Immunohistochemical evaluation for P53 and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) is not prognostic for long term survival in end stage esophageal adenocarcinoma. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2009, v. 36: p. 24-34.
- (68) Villwock MM, Meurer L, Cavazzola LT, Gurski RR, Edelweiss MI, Schirmer CC. Prevalence of p21 immunohistochemical expression in esophageal adenocarcinoma. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2006, v. 43: p. 212-218.

4- OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar a relação entre expressão do EGFR em adenocarcinomas de esôfago e de JEG com o estadiamento, com o grau de diferenciação tumoral e com a sobrevida de pacientes submetidos à esofagectomia transhiatal no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Artigo Científico em Português

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO
EM ADENOCARCINOMA ESOFÁGICO: RELAÇÃO COM ESTÁGIO
TUMORAL E SOBREVIDA APÓS ESOFAGECTOMIA**

Daniel Navarini^{1,2}, Richard R. Gurski^{1,3,4}, Fernando Fornari^{2,4}, Carlos Augusto Madalosso^{1,2}, Lucas Aitá¹, Luise Meurer⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS; ²Faculdade de Medicina, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo-RS; ³Serviço de Cirurgia Digestiva do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-RS; ⁴Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Porto Alegre-RS, Brasil.

Correspondência: Daniel Navarini, Ramiro Barcelos 2400, 2º andar, CEP 90035003, PPG em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil, Fone: 555188035607, e-mail: danielnavarini@hotmail.com

Título resumido: EGFR e prognóstico no adenocarcinoma esofágico

Financiamento: Este estudo foi financiado pela FIPE – HCPA

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse

RESUMO

Introdução e objetivos: O adenocarcinoma de esôfago (AE) é um tumor agressivo, com o aumento da incidência em países ocidentais. Vários marcadores prognósticos têm sido propostos, incluindo o Receptor do Fator de Crescimento Epitelial (EGFR). O objetivo deste estudo foi avaliar se a expressão do EGFR está relacionada com o estadiamento tumoral e com a sobrevida. **Métodos:** Trata-se de uma coorte histórica na qual 70 pacientes consecutivos com AE atendidos entre 2000 a 2009 foram considerados elegíveis para o estudo. As peças cirúrgicas dos pacientes submetidos a esofagectomia transhiatal foram avaliadas para estabelecer a expressão do EGFR e analisadas em relação às variáveis dos pacientes. A sobrevida foi determinada de acordo com os registros nos prontuários médicos dos pacientes ou por contato telefônico com familiares. **Resultados:** Dos 70 pacientes, 37 (53%) preencheram os critérios para inclusão no estudo. A expressão do EGFR foi positiva em 16 pacientes (43%) e foi mais freqüente nos estágios tumorais mais avançados, TNM (I e II = 0% vs III = 47% vs IV = 100%, $P < 0,001$). A sobrevida média em meses, foi significativamente menor no grupo de pacientes com expressão do EGFR (10,5 vs 21,7, $P = 0,001$) em comparação com pacientes sem expressão do EGFR. Houve maior expressão do EGFR em neoplasias com pobre diferenciação tumoral em relação aos bem diferenciados e moderadamente diferenciados. **Conclusão:** Em pacientes com adenocarcinoma de esôfago tratados com esofagectomia, a expressão de EGFR está relacionada com maior estágio TNM e menor sobrevida. A expressão do EGFR pode ser assumida como um marcador de prognóstico para o adenocarcinoma de esôfago.

Palavras-chave: Adenocarcinoma; EGFR; prognóstico; esôfago; estadiamento tumoral

INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma de esôfago (AE) é um tumor agressivo e com incidência crescente em vários países ¹⁻⁵. Em pacientes tratados com esofagectomia, a sobrevivência em cinco anos chega a 25% ⁶. O comportamento biológico e o diagnóstico tardio explicam, pelo menos em parte, o mau prognóstico da AE ⁷, apontando para a necessidade de estratégias capazes de melhorar a seleção dos pacientes e predição do resultado.

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é um fator de risco conhecido para o AE, particularmente na presença de esôfago de Barrett. Esta condição aumenta a probabilidade do AE em pelo menos 30 vezes ⁸, com um novo caso em 200 pacientes por ano ⁹. Estudos também sugerem um risco maior em pacientes com segmento longo de esôfago de Barrett e um risco maior em homens comparados as mulheres ^{1,10}. Outros fatores de risco estabelecidos para a AE incluem obesidade e tabagismo ¹¹⁻¹³. Entre as ferramentas de prognóstico, o estadiamento tumoral pelo sistema TNM é o mais amplamente empregado em pacientes com AE ¹⁴.

O estadiamento é realizado por exames de imagem, mas em muitos casos, uma intervenção laparoscópica ou toracoscópica é necessária ¹⁵. Estudos anteriores têm introduzido biomarcadores para prever o prognóstico do AE. A mutação no gene p53 foi descrita pela primeira vez como marcador de mau prognóstico, independentemente do seu estatus TNM ¹⁶. Mais recentemente, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) tem recebido atenção por sua capacidade de prognóstico e participa do controle da multiplicação das células epiteliais. No entanto, o EGFR pode ser expresso em câncer de esôfago, quer adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas ¹⁷⁻¹⁹.

Tem sido demonstrado que a super expressão do EGFR pode estar relacionada com maior estágio TNM e pobre diferenciação celular em pacientes com adenocarcinoma de esôfago ¹⁸⁻²⁰. Além disso, o EGFR tem sido associado com metástases e diminuição da sobrevida destes pacientes ¹⁸⁻²⁰. No entanto, o estudos de prognóstico avaliando a expressão do EGFR foram realizados com abordagens mistas para tratamento de adenocarcinoma.

A hipótese do presente estudo é de que o EGFR pode ser confirmado como um marcador de prognóstico para o adenocarcinoma de esôfago, tratado com uma técnica cirúrgica amplamente aceita ²¹.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do EGFR no estadiamento do tumor e sobrevida em pacientes com AE tratados com esofagectomia transhiatal.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes

Nesta coorte retrospectiva, foram revisados todos os casos de adenocarcinoma de esôfago tratados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre janeiro de 2000 e dezembro de 2009.

Foram selecionados pacientes reunindo os seguintes critérios: (1) adenocarcinoma esofágico e na junção esofagogástrica (Siewert I e II) e (2) tratamento com esofagectomia transhiatal.

Os critérios de exclusão foram: (1) terapia neo-adjuvante, e (2) falta de material adequado para o exame anátomo- patológico ou registro inadequado de dados nos prontuários, (3) tratamento não-cirúrgico, e (4) tumores do tipo Siewert III. Os dados referentes à sobrevida foram coletados de registros médicos ou por contato telefônico com a família do paciente.

Este estudo foi conduzido de acordo com as regras Éticas do Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (CONEP 198984 / GPPG HCPA 08-300).

Esofagectomia transhiatal

Os pacientes foram operados seguindo uma abordagem cirúrgica padronizada realizada pelas mesmas equipes cirúrgicas. A esofagectomia transhiatal foi realizada conforme já descrito²². Resumidamente, os pacientes foram submetidos à laparotomia, seguida pela abertura do diafragma e dissecação do esôfago com linfadenectomia periesofágica e cervicotomia. O esôfago foi seccionado no segmento cervical e a secção distal incluiu gastrectomia proximal. O trânsito alimentar foi reconstruído com tubo gástrico anastomosado no esôfago cervical.

Análise imunohistoquímica

Determinação do EGFR com imuno-histoquímica foi realizada na sequência de um protocolo já descrito ²³. Resumidamente, blocos de tecido tumoral foram inicialmente incluídos em parafina para posterior análise de cortes corados com hematoxilina e eosina. As fatias foram cortadas em 5 microns (mm), seguido de desparafinização e reidratação em água destilada. Eles foram submetidos a recuperação antigênica com proteinase K (Dako) por 5 minutos e lavados em água destilada.

Posteriormente, foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos para bloquear a atividade da peroxidase endógena e novamente lavados com água destilada por 5 minutos. O EGFR monoclonal anti-humano, clone H11 (anti-EGFR, Dako) foi aplicado nas fatias a uma diluição de 1:200 e incubado por 60 minutos depois de ter sido lavado em PBS e incubadas com estreptavidina (diluição de 1: 20) em 30 minutos em temperatura ambiente e novamente lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos.

Posteriormente, o cromógeno diaminobenzidina foi aplicada por 5 minutos e depois lavadas em água por 3 minutos e depois com água destilada. Finalmente, os cortes foram corados com hematoxilina por 2 minutos, desidratados com álcool e montados para análise.

Análise da expressão do EGFR

A expressão do EGFR foi considerada positiva quando a membrana das células tumorais foi corada na cor marrom (Figura 1). Um controle externo positivo foi realizado com tecido de placenta, e uma linha de células de carcinoma epidermóide de esôfago com EGFR positivo. A análise do tecido foi realizada por pesquisadores treinados e revisado avaliado por patologista experiente, sem o conhecimento dos dados clínicos e patológicos dos pacientes.

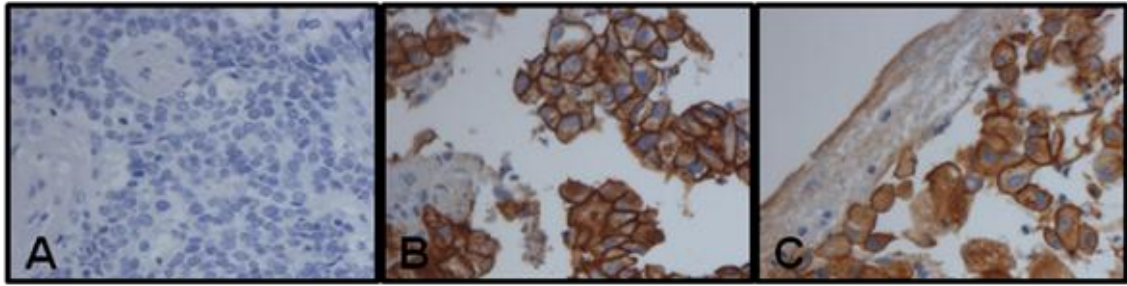


Figura 1. Expressão do EGFR em imunohistoquímica (400X). Em A, um caso de adenocarcinoma com EGFR negativo. Em B e C, dois diferentes casos de adenocarcinoma com EGFR positivo (coloração marrom).

Análise Estatística

Os dados são apresentados com média \pm DP, frequências e porcentagens, quando apropriados.

Os seguintes parâmetros foram analisados: sexo, idade, local do tumor, diferenciação celular, estadiamento cirúrgico e sobrevida. Estas variáveis foram relacionadas com a expressão do EGFR. Os dados quantitativos foram analisados através do teste t, enquanto as variáveis qualitativas foram submetidas ao teste do qui-quadrado. A sobrevida foi descrita após a análise de Kaplan-Meier, realizado com o software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL, USA). O valor p foi considerado significativo quando $\leq 0,05$.

RESULTADOS

Um total de 70 pacientes consecutivos tiveram seus prontuários revisados. Destes, 33 pacientes foram excluídos: 5 apresentaram tumores Siwert III, 15 receberam tratamento não-cirúrgico, 3 submetidos a esofagectomia diferente da abordagem transhiatal, seis foram tratados com radioterapia no pré-operatório, e 4 tiveram dados perdidos em seus prontuários.

A população final do estudo foi, portanto, composta por 37 pacientes. Destes, 16 pacientes (43,2%) foram EGFR positivo. As características dos pacientes agrupados com expressão do EGFR positivo e negativo estão apresentados na Tabela 1.

Pacientes com EGFR positivo foram significativamente mais velhos do que pacientes EGFR negativo.

Os homens representaram a maioria dos pacientes nos dois grupos. A localização do tumor não diferiu entre os grupos, com aproximadamente dois terços localizado na junção esofagogástrica (Siwert I e II), e o terço restante no esôfago distal.

Tumores EGFR positivo eram em sua maioria pouco diferenciados, em contraste com as lesões EGFR negativo, que foram bem / moderadamente diferenciados na maioria dos casos.

Diferenças significativas também foram encontrados no estadiamento TNM. Tumores EFGR positivo apresentaram escores mais altos para T (T3 + T4 = 94% vs. 51%), N participação (94% vs. 53%) ou metástases (57% vs. 0%), em comparação com lesões EGFR negativo. Como resultado, o estadiamento tumoral também diferiu entre os grupos. Todos os pacientes com EGFR positivo pertenciam a fase III ou IV, ao passo que a maioria dos pacientes EGFR negativo (62%) tinham tumores em estágio I ou II.

Tabela 1. Características dos pacientes com e sem expressão do EGFR.

	EGFR + (n = 16)	EGFR – (n = 21)	P
Idade, média ± DP	70.4 ± 8	61.2 ± 7.8	0.002
Masculino, n (%)	13 (81)	18 (86)	0.716
Localização tumoral			
Esofágico, n (%)	5 (31)	6 (29)	0.999
Siewert I e II	11 (69)	15 (71)	
Diferenciação tumoral			
Bem/moderado	7 (44)	16 (76)	0.043
Pouco diferenciado	9 (56)	5 (24)	
TNM			
T1	1 (6)	4 (19)	0.043
2	0	6 (29)	
3	11 (69)	9 (43)	
4	4 (25)	2 (9)	
N negativo	1 (6)	10 (47)	0.010
positivo	15 (94)	11 (53)	
M0	7 (43)	21 (100)	< 0.0001
1	9 (57)	0	
Estágio tumoral, n (%)			< 0.0001
I	0	3 (14)	
II	0	10 (48)	
III	7 (44)	8 (38)	
IV	9 (56)	0	

Tomando todos os pacientes como um grupo (n=37), a expressão do EGFR foi mais freqüente quanto maior o estágio TNM (I and II = 0% vs. III = 47% vs. IV = 100%; $P < 0.001$).

O tempo médio de seguimento foi de 24,5 meses. Dos 37 pacientes, 4 apresentaram óbito no pós-operatório precoce devido a complicações operatórias, incluindo pneumonia e fístula. Outros seis pacientes receberam radio/quimioterapia pós-operatória. Destes, 5 (83,3%) foram positivos para expressão do EGFR. Entre os 31 pacientes restantes tratados exclusivamente com cirurgia, apenas 11 (35,5%) tiveram lesões EGFR positivo ($P = 0,066$).

Conforme apresentado na Figura 2, a sobrevida foi significativamente maior em pacientes com EGFR negativo em comparação com aqueles que expressaram EGFR (21,7 vs. 10,5 meses, $P = 0,001$).

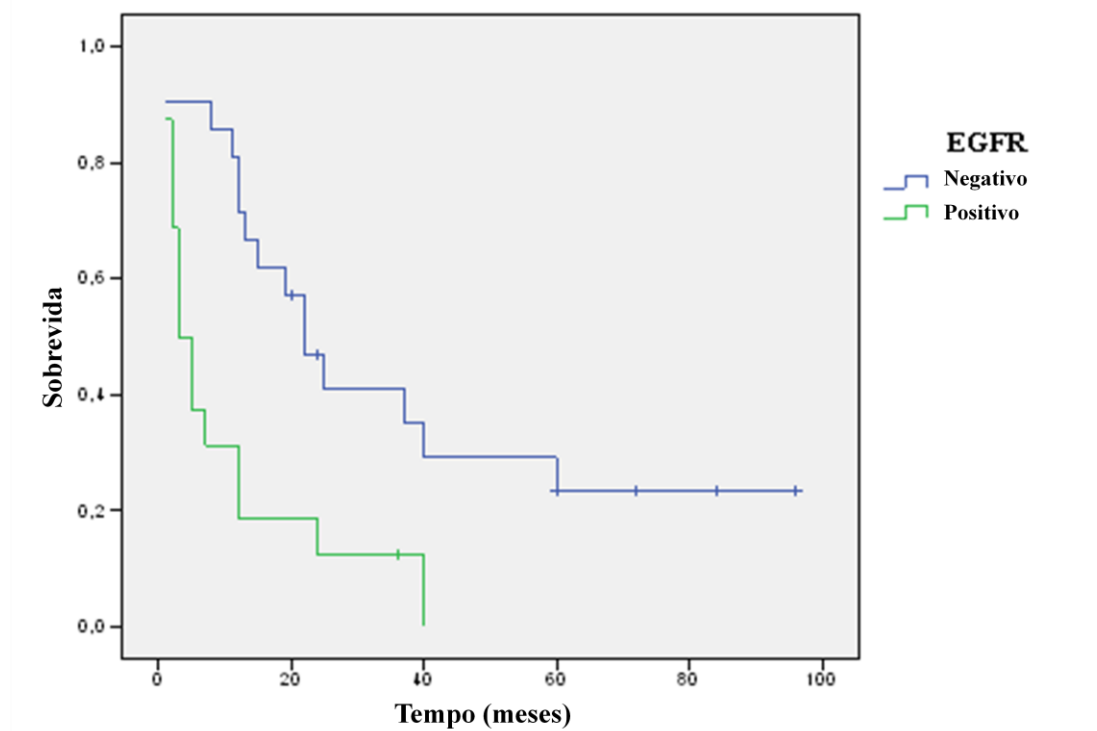


Figura 2. Curva de sobrevida em pacientes com e sem expressão do EGFR (quatro pacientes excluídos devido a mortalidade precoce, relacionada à cirurgia).

DISCUSSÃO

O adenocarcinoma esofágico e da junção esofagogástrica é considerado atualmente um problema de saúde pública, dado à sua crescente incidência e pobre sobrevida²⁴.

Esforços para melhorar os resultados, incluindo a otimização dos marcadores de prognóstico, pode ser crucial para o manejo de pacientes com esta condição. Estudos anteriores sugeriram que a expressão do EGFR pode ser útil na previsão de resultados em pacientes com adenocarcinoma de esôfago e da junção esofagogástrica (JEG)^{18,19}.

Nosso objetivo foi confirmar a utilidade da expressão do EGFR no prognóstico de pacientes com esta condição maligna tratada com esofagectomia trans-hiatal.

As principais conclusões do nosso estudo foram: 1. A expressão do EGFR está relacionada com escores mais altos nas classificações T, N e M, quanto para o estadiamento tumoral; 2. Como esperado, o grau de diferenciação do tumor foi menor nos casos com expressão positiva para o EGFR; 3. A sobrevida foi significativamente menor no grupo de pacientes que expressaram o EGFR. Resultados secundários incluíram uma relação entre EGFR positivo e idade mais elevada, a predominância de tumores da JEG em relação aos de esôfago distal, e uma tendência para a utilização de tratamento adjuvante em pacientes com EGFR positivo.

No estudo atual, a expressão do EGFR foi encontrada em quase metade dos adenocarcinomas. Isto está de acordo com outros estudos, nos quais a expressão do EGFR varia entre 32% e 64%^{18,19,25,26}. Além de sua prevalência relativamente alta, a expressão do EGFR está relacionada com lesões mais avançadas, tanto na classificação T, quanto no envolvimento linfonodal ou na presença de metástase à distância. Além disso, lesões com expressão do EGFR apresentam pobre diferenciação tumoral. Estes achados têm sido demonstrados também em outros estudos^{18,19}, indicando que a

expressão do EGFR é um marcador de tumores mais avançados e, portanto, de pior prognóstico.

A sobrevida foi significativamente menor no grupo de pacientes que expressaram o EGFR. Isso pode ser explicado por diversos fatores, incluindo escores TNM mais altos, pobre diferenciação tumoral e idade mais avançada no grupo de pacientes com EGFR positivo. Neste pacientes houve também uma maior tendência a receber tratamento adjuvante, provavelmente por tratar-se de pacientes com doença mais avançada, que geralmente exige uma abordagem mais agressiva, apesar do tratamento cirúrgico ^{27, 28}. Estudos anteriores também sugerem que a expressão do EGFR está relacionada com menor sobrevida ^{18, 19, 25, 26, 29}.

Foi proposto que o EGFR pode participar no processo de carcinogênese do adenocarcinoma de esôfago ³⁰, baseado no fato de que o EGFR pode estimular a proliferação e migração de células tumorais ^{31,32}.

Estudos adicionais são necessários para esclarecer este assunto e avaliar um possível benefício de anticorpos anti-EGFR no tratamento do adenocarcinoma esofágico e da JEG ³³. Nós reconhecemos limitações deste estudo. Em primeiro lugar, foi uma coorte retrospectiva, que impediu a caracterização exata da doença e sobrevida livre de doença e de causas de morte. Em segundo lugar, uma dimensão limitada da amostra não permitiu uma análise multivariada incluindo potenciais fatores de confusão. No entanto, reconhecemos também algumas características de alta qualidade. Em contraste com outros estudos, nossos pacientes foram tratados exclusivamente com esofagectomia transhiatal, mantendo a amostra mais homogênea e apresentando material de melhor qualidade para análise da expressão do EGFR. Assim, a avaliação do tecido não sofre potencial influência de outras modalidades terapêuticas, incluindo radioterapia e quimioterapia. Além disso, a análise do EGFR foi realizada através da

imunohistoquímica, que tem sido considerada uma técnica mais viável para aplicação na prática clínica ³⁴.

Em conclusão, este estudo avaliou se a expressão do EGFR prevê o estadiamento do tumor e a sobrevida em pacientes com AE tratados com esofagectomia transhiatal. Estabelecemos que a expressão do EGFR está relacionada com a idade avançada, má diferenciação tumoral, maior estadiamento na classificação TNM e menor sobrevida em comparação com os casos EGFR negativos. Tais achados confirmam a expressão do EGFR como um marcador prognóstico em pacientes com adenocarcinoma de esôfago e de JEG.

Mais estudos são necessários para testar a hipótese de que a avaliação endoscópica da expressão do EGFR pode ser útil no tratamento de pacientes com esta condição.

REFERÊNCIAS

- (1) Bollschweiler E, Wolfgarten E, Gutschow C, Holscher AH. Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males. *Cancer* 2001;92:549-555.
- (2) Botterweck AA, Schouten LJ, Volovics A, Dorant E, van den Brandt PA. Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries. *Int J Epidemiol* 2000;29:645-654.
- (3) El-Serag HB. The epidemic of esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:421-40, viii.
- (4) Kubo A, Corley DA. Marked regional variation in adenocarcinomas of the esophagus and the gastric cardia in the United States. *Cancer* 2002;95:2096-2102.
- (5) Lagarde SM, Ten Kate FJ, Richel DJ, Offerhaus GJ, van Lanschot JJ. Molecular prognostic factors in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol* 2007;14:977-991.
- (6) Wu PC, Posner MC. The role of surgery in the management of oesophageal cancer. *Lancet Oncol* 2003;4:481-488.
- (7) Gertler R, Stein HJ, Langer R et al. Long-term Outcome of 2920 Patients With Cancers of the Esophagus and Esophagogastric Junction: Evaluation of the New Union Internationale Contre le Cancer/American Joint Cancer Committee Staging System. *Ann Surg* 2011;253:689-698.

- (8) Solaymani-Dodaran M, Logan RF, West J, Card T, Coupland C. Risk of oesophageal cancer in Barrett's oesophagus and gastro-oesophageal reflux. *Gut* 2004;53:1070-1074.
- (9) Yousef F, Cardwell C, Cantwell MM, Galway K, Johnston BT, Murray L. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008;168:237-249.
- (10) Rudolph RE, Vaughan TL, Storer BE et al. Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus. *Ann Intern Med* 2000;132:612-620.
- (11) Brown LM, Swanson CA, Gridley G et al. Adenocarcinoma of the esophagus: role of obesity and diet. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:104-109.
- (12) Gammon MD, Schoenberg JB, Ahsan H et al. Tobacco, alcohol, and socioeconomic status and adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1277-1284.
- (13) Lagergren J, Bergstrom R, Nyren O. Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med* 1999;130:883-890.
- (14) Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1471-1474.
- (15) Demeester SR. Adenocarcinoma of the esophagus and cardia: a review of the disease and its treatment. *Ann Surg Oncol* 2006;13:12-30.

- (16) Ireland AP, Shibata DK, Chandrasoma P, Lord RV, Peters JH, DeMeester TR. Clinical significance of p53 mutations in adenocarcinoma of the esophagus and cardia. *Ann Surg* 2000;231:179-187.
- (17) Gibault L, Metges JP, Conan-Charlet V et al. Diffuse EGFR staining is associated with reduced overall survival in locally advanced oesophageal squamous cell cancer. *Br J Cancer* 2005;93:107-115.
- (18) Wang KL, Wu TT, Choi IS et al. Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Cancer* 2007;109:658-667.
- (19) Wilkinson NW, Black JD, Roukhadze E et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2004;8:448-453.
- (20) Langer R, Von Rahden BH, Nahrig J et al. Prognostic significance of expression patterns of c-erbB-2, p53, p16INK4A, p27KIP1, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor in oesophageal adenocarcinoma: a tissue microarray study. *J Clin Pathol* 2006;59:631-634.
- (21) Orringer MB, Marshall B, Iannettoni MD. Transhiatal esophagectomy: clinical experience and refinements. *Ann Surg* 1999;230:392-400.
- (22) Orringer MB, Sloan H. Esophagectomy without thoracotomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1978;76:643-654.

- (23) Hidalgo M, Siu LL, Nemunaitis J et al. Phase I and pharmacologic study of OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol* 2001;19:3267-3279.
- (24) Pera M, Manterola C, Vidal O, Grande L. Epidemiology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2005;92:151-159.
- (25) al-Kasspooles M, Moore JH, Orringer MB, Beer DG. Amplification and over-expression of the EGFR and erbB-2 genes in human esophageal adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1993;54:213-219.
- (26) Yacoub L, Goldman H, Odze RD. Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor receptor, and MiB-1 expression in Barrett's-associated neoplasia: correlation with prognosis. *Mod Pathol* 1997;10:105-112.
- (27) Bedard EL, Inculet RI, Malthaner RA, Brecevic E, Vincent M, Dar R. The role of surgery and postoperative chemoradiation therapy in patients with lymph node positive esophageal carcinoma. *Cancer* 2001;91:2423-2430.
- (28) Rice TW, Adelstein DJ, Chidel MA et al. Benefit of postoperative adjuvant chemoradiotherapy in locoregionally advanced esophageal carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1590-1596.
- (29) Gibson MK, Abraham SC, Wu TT et al. Epidermal growth factor receptor, p53 mutation, and pathological response predict survival in patients with locally advanced esophageal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:6461-6468.

- (30) Poller DN, Steele RJ, Morrell K. Epidermal growth factor receptor expression in Barrett's esophagus. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:1226-1227.
- (31) Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* 2002;7 Suppl 4:2-8.
- (32) Tedesco KL, Lockhart AC, Berlin JD. The epidermal growth factor receptor as a target for gastrointestinal cancer therapy. *Curr Treat Options Oncol* 2004;5:393-403.
- (33) Zhu Z. Targeted cancer therapies based on antibodies directed against epidermal growth factor receptor: status and perspectives. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:1476-1493.
- (34) Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 2002;7 Suppl 4:31-39.

Artigo Científico em Inglês

Epidermal growth factor receptor expression in esophageal adenocarcinoma:

Relationship with tumor stage and survival after esophagectomy

Daniel Navarini^{1,2}, Richard R. Gurski^{1,3,4}, Fernando Fornari^{2,4}, Carlos Augusto Madalosso^{1,2}, Lucas Aitá¹, Luise Meurer⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS; ²Faculdade de Medicina, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo-RS; ³Serviço de Cirurgia Digestiva do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-RS; ⁴Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Porto Alegre-RS, Brazil.

Corresponding author: Daniel Navarini, Ramiro Barcelos 2400, 2º andar, CEP 90035003, PPG em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil, Fone: 555188035607. E-mail: danielnavarini@hotmail.com

Short title: EGFR and prognosis of esophageal adenocarcinoma

Funding: This study was supported by FIPE-HCPA.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

ABSTRACT

Background and aims: Esophageal adenocarcinoma (EA) is an aggressive tumor with increasing incidence in occidental countries. Several prognostic biomarkers have been proposed, including epidermal growth factor receptor (EGFR). The aim of this study was to assess whether EGFR expression predicts tumor staging and survival. **Methods:** In this historical cohort, 70 consecutive patients with EA managed between 2000 and 2009 were considered eligible for the study. Surgical specimens from those treated with esophagectomy were evaluated to establish EGFR expression and tumor differentiation. Survival was determined according to medical register or patient contact. **Results:** Among 70 patients, 37 (53%) underwent esophagectomy without pre-surgical chemotherapy and composed the study population. Of these, EGFR expression was found in 16 patients (43%). EGFR expression was more frequent as higher was TNM staging (I and II = 0% vs. III = 47% vs. IV = 100%; $P < 0.001$). Average survival in months was significantly shorter in the group of patients with EGFR expression (10.5 vs. 21.7; $P = 0.001$). **Conclusions:** In patients with esophageal adenocarcinoma treated with esophagectomy, EGFR expression was related with higher TNM staging and shorter survival. EGFR expression can be assumed as a prognostic marker for esophageal adenocarcinoma.

Key words: Adenocarcinoma; EGFR; esophagus; prognosis; tumor staging

INTRODUCTION

Esophageal adenocarcinoma (EA) is an aggressive tumor with increasing incidence in several countries ¹⁻⁵. Optimistic five-year survival reaches 25% in patients treated with esophagectomy ⁶. Biological behavior and late diagnosis explain at least in part the poor prognosis of EA ⁷, pointing to the need of strategies able to improve patient selection and outcome prediction.

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is a well known risk factor for EA, particularly in the presence of Barrett esophagus. This condition increases the likelihood of EA at least 30 times ⁸, with 1 new case in 200 patients per year ⁹. Studies also suggest a higher risk for patients with long-segment Barrett's esophagus and a greater risk in men compared with women ^{1,10}. Other established risk factors for EA include obesity and smoking ¹¹⁻¹³.

Among prognostic tools, tumor staging using TNM system is widely employed in the management of patients with EA ¹⁴. Staging is performed by imaging studies, but in many cases a laparoscopic or thoracoscopic interventions is necessary ¹⁵. Prior studies have introduced biomarkers to predict the prognosis of EA. Mutation in p53 gene was first described as marker of poor prognosis, regardless of TNM status ¹⁶.

More recently, epidermal growth factor receptor (EGFR) has received attention by its prognostic capability and participates in the control of epithelial cell multiplication. However, EGFR may be over expressed in esophageal cancer, either adenocarcinoma or squamous cell carcinoma ¹⁷⁻¹⁹.

It has been demonstrated that EGFR over expression may be related with higher TNM staging and poor cellular differentiation in patients with esophageal adenocarcinoma ¹⁸⁻²⁰. Furthermore, EGFR has been linked with metastasis and decreased survival in these

patients ¹⁸⁻²⁰. Moreover, prognostic studies on EGFR were performed with mixed approaches for adenocarcinoma treatment.

The hypothesis of the present study is that EGFR might be confirmed as a prognostic marker for esophageal adenocarcinoma treated with a widely accepted surgical technique ²¹. Therefore, the aim of this study was to assess whether EGFR expression predicts tumor staging and survival in EA patients treated with transhiatal esophagectomy.

PATIENTS AND METHODS

Patients

In this retrospective cohort, we reviewed all cases of esophageal adenocarcinoma managed in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre between January 2000 and December 2009. Patients were selected if they meet the following criteria: (1) Adenocarcinoma located in the esophagus or gastroesophageal junction (Siewert I and II); and (2) Treatment with trans-hiatal esophagectomy. Patients were excluded according to the following criteria: (1) Neo adjuvant therapy; and (2) Missing of pathology or follow-up data; (3) Non-surgical treatment; and (4) Siewert III tumor.

Data regarding survival were collected from medical registers or phone contact with patient family.

This study was conducted according with rules of the Brazilian Ethics and approved by the Ethical Committe of the HCPA (CONEP 198984 / GPPG HCPA 08-300).

Transhiatal esophagectomy

Patients were operated following a standardized surgical approach carried out by the same surgical team. Transhiatal esophagectomy was performed as described elsewhere²². Briefly, patients underwent laparotomy and cervicotomy, followed by diaphragm hiatus opening and esophageal dissection with periesophageal linphoadenectomy. The esophagus was sectioned proximally in the cervical segment and distally combined with proximal gastrectomy. Transit was reconstructed with anastomosis between gastric tube and cervical esophagus.

Immunohistochemistry analysis

Determination of EGFR expression with immunohistochemistry was carried out following a protocol described elsewhere²³. Briefly, blocks with tumor tissue were first embedded in paraffin for posterior analysis of slices stained with hematoxylin and eosin. The slices were cut in 5 microns (μm), followed by deparaffinization and rehydration in distilled water. They underwent antigen retrieval with Proteinase K (Dako) for 5 minutes and washed in distilled water. Subsequently they were immersed in 3% hydrogen peroxide for 15 minutes to block endogenous peroxidase activity and further washed with distilled water for 5 minutes. The monoclonal anti-human EGFR, clone H11 (anti-EGFR, Dako) was applied to slices at a dilution of 1:200 and incubated for 60 minutes after it was rinsed in PBS and incubated with streptavidin (dilution de 1:20) by 30 minutes at room temperature and again washed twice with PBS for 5 minutes. Thereafter the chromogen diaminobenzidine was applied for 5 min and then washed in water for 3 minutes and then in distilled water. Finally the slices were stained with hematoxylin for 2 minutes, dehydrated with alcohol and mounted for analysis.

Analysis of EGFR expression

EGFR expression was considered positive when membrane tumor cell was stained in brown color (Figure 1). An external positive control was performed with placenta tissue and a cell line of esophageal squamous carcinoma with positive EGFR.

Tissue analysis was performed by trained investigators and reviewed by an experienced pathologist without knowledge of clinical and pathological data.

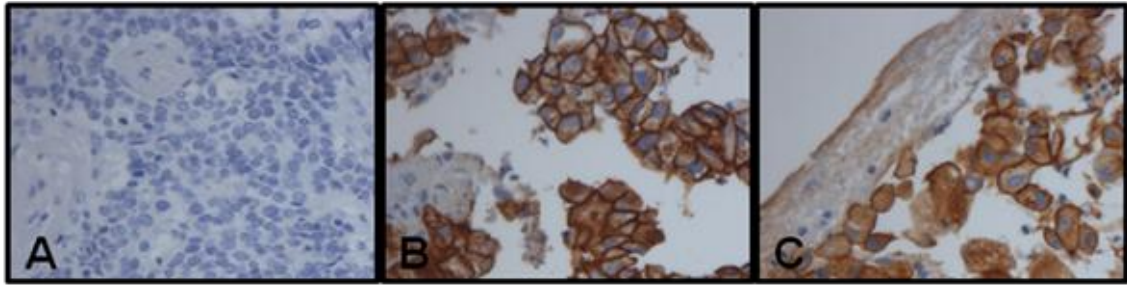


Figure 1. EGFR expression at immunohistochemistry (400X). In A, a case of adenocarcinoma with negative EGFR. In B and C, 2 different cases of adenocarcinoma with positive EGFR (brown staining).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SD, and frequencies and percentages when appropriate. The following parameters were analyzed: gender, age, tumor place, tumor differentiation, surgical staging and survival. These variables were related with EGFR expression pattern. Quantitative data were analyzed using *t* test, whereas qualitative variables were tested with qui-square test. Survival was described after Kaplan-Meier analysis, carried out with the software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL, USA). The P-value was considered significant when \leq than 0.05.

RESULTS

A total of 70 consecutive patients had their medical records revised. Of these, 33 patients were excluded: 5 had Siwert III tumors, 15 received non-surgical treatment, 3 underwent esophagectomy other than trans-hiatal approach, 6 were treated with radiochemotherapy preoperatively, and 4 had missing data in their medical records. A final study population was therefore composed of 37 patients. Among them, there were 16 patients (43.2%) with positive EGFR.

The characteristics of patients grouped as positive and negative EGFR expression are shown in Table 1. EGFR positive patients were significantly older than EGFR negative patients. Men represented the majority of patients in both groups. Tumor localization did not differ between groups, with approximately two-thirds located at the GEJ (Siwert I and II), and the remaining third in the esophagus. EGFR positive tumors were mostly poorly differentiated, in contrast with EGFR negative lesions, which were well/moderate differentiated in most cases. Significant differences were also found in TNM staging. EGFR positive tumors presented higher scores either for T (T3+T4 = 94% vs. 51%), N involvement (94% vs. 53%), or Metastases (57% vs. 0%), in comparison with EGFR negative lesions. As a result, tumor staging also differed between groups. All patients with positive EGFR belonged to stage III or IV, whereas most patients (62%) negative for EGFR had stage I or II tumors. Taking all patients as a group (n = 37), EGFR expression was more frequent as higher was TNM staging (I and II = 0% vs. III = 47% vs. IV = 100%; $P < 0.001$).

Patients were followed-up for 24.5 months on average. Out of 37 patients, 4 died immediately after the surgery due to operatory complications, including pneumonia and anastomotic leak. Other 6 patients received radiochemotherapy postoperatively.

Table 1. Characteristics of patients with and without EGFR expression.

	EGFR + (n = 16)	EGFR – (n = 21)	P
Age, mean ± SD	70.4 ± 8	61.2 ± 7.8	0.002
Men, n (%)	13 (81)	18 (86)	0.716
Tumor localization			
Esophageal, n (%)	5 (31)	6 (29)	0.999
Siewert I and II	11 (69)	15 (71)	
Tumor differentiation			
Well/moderate	7 (44)	16 (76)	0.043
Poor	9 (56)	5 (24)	
TNM			
T1	1 (6)	4 (19)	0.043
2	0	6 (29)	
3	11 (69)	9 (43)	
4	4 (25)	2 (9)	
N negative	1 (6)	10 (47)	0.010
positive	15 (94)	11 (53)	
M0	7 (43)	21 (100)	< 0.0001
1	9 (57)	0	
Tumor staging, n (%)			< 0.0001
I	0	3 (14)	
II	0	10 (48)	
III	7 (44)	8 (38)	
IV	9 (56)	0	

Of these, 5 (83.3%) were positive for EGFR expression. Among the remaining 31 patients treated exclusively with surgery, only 11 (35.5%) had EGFR positive lesions ($P = 0.066$). As presented in Figure 2, survival was significantly longer in EGFR negative patients compared to those who expressed EGFR (21.7 vs. 10.5 months; $P = 0.001$).

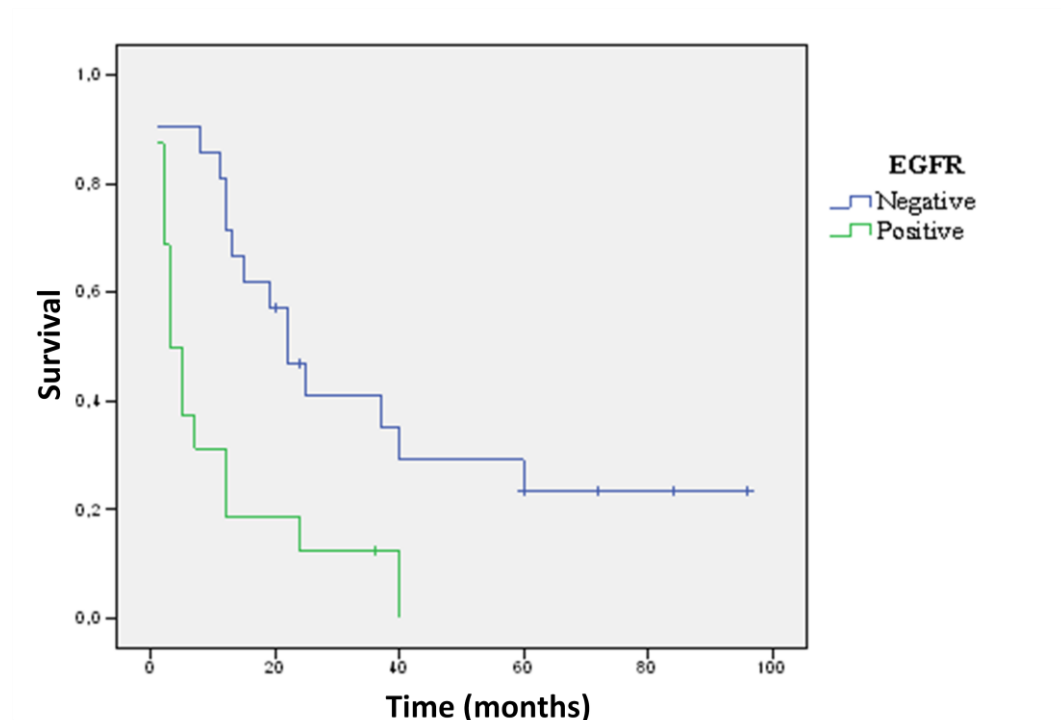


Figure 2. Survival curve in patients with and without EGFR expression (4 patients excluded due to surgery-related mortality).

DISCUSSION

Adenocarcinoma of the esophagus and gastresophageal junction is currently considered a public health problem, given its increasing incidence and poor survival ²⁴. Efforts to ameliorate outcomes, including optimization of prognostic makers, can be crucial to the management of patients with this condition. Prior studies have suggested that EGFR expression might be useful in predicting outcomes in patients with adenocarcinoma of the esophagus and GEJ ^{18,19}. Our purpose was to confirm the utility of EGFR expression in the prognosis of patients with this malignant condition treated with trans-hiatal esophagectomy.

The main findings of our study were: 1. EGFR expression was related with more advanced lesions, with higher scores for both TNM classification and tumor staging; 2. As expected, the degree of tumor differentiation was poorer in cases with positive expression for EGFR; 3. Survival was significantly shorter in the group of patients who expressed EGFR. Secondary findings included a relation between EGFR positivity and older age, a predominance of GEJ compromising in spite of esophageal lesions, and a trend for utilization of radiochemotherapy in EGFR positive patients.

In the current study, EGFR expression was found in nearly half of adenocarcinomas. This is in agreement with other studies, in which EGFR expression ranges between 32% and 64% ^{18,19,25,26}. Besides its relatively high prevalence, EGFR expression was related with more advanced lesions, with higher scores either for tumor staging, nodal involvement, or metastasis. Furthermore, lesions with expressed EGFR showed poorer tumor differentiation. These findings have been demonstrated in other studies ^{18,19}, indicating that EGFR expression is a marker of more advanced tumors and therefore poorer prognosis.

Survival was significantly shorter in the group of patients who expressed EGFR. This can be explained by several factors, including higher TNM scores, poorer tumor differentiation and also older age in the group of patients with positive EGFR. These patients also showed a trend to receive more adjuvant treatment with radiochemotherapy after esophagectomy. This likely reflects advanced lesions, which usually requires an aggressive approach in spite of surgical treatment^{27,28}. Prior studies have also suggested that EGFR expression is related with shorter survival^{18,19,25,26,29}. It has been proposed that EGFR may participate in the carcinogenesis process of esophageal adenocarcinoma³⁰, based on the fact that EGFR may stimulate proliferation and migration of tumor cells^{31,32}. Further studies are needed to clarify this topic and assess a possible benefit of anti-EGFR antibodies³³.

We acknowledge limitations in this study. Firstly, it was a retrospective cohort, which impeded the exact characterization of free-disease survival and death causes. Secondly, a limited sample size precluded multivariate analysis including additional potential confounders. However, we also recognize some high-quality characteristics. Contrasting with other studies, our patients were treated exclusively with trans-hiatal esophagectomy before providing tumor specimens for EGFR analysis. Thus, tissue evaluation did not suffer potential influences of other therapeutic modalities, including radiochemotherapy. In addition, EGFR analysis was carried out using immunohistochemistry, which has been considered a feasible technique for this purpose³⁴.

In conclusion, the current study assessed whether EGFR expression predicts tumor staging and survival in EA patients treated with trans-hiatal esophagectomy. We found that EGFR expression was related with older age, poor tumor differentiation, higher TNM staging, and shorter survival in comparison with EGFR negative cases. These

finding confirm EGFR expression as a prognostic markers in patients with adenocarcinoma of the esophagus and GEJ. Further studies are needed to test the hypothesis that endoscopic assessment of EGFR expression can be useful in the management of patients with this condition.

REFERENCES

- (1) Bollschweiler E, Wolfgarten E, Gutschow C, Holscher AH. Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males. *Cancer* 2001;92:549-555.
- (2) Botterweck AA, Schouten LJ, Volovics A, Dorant E, van den Brandt PA. Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries. *Int J Epidemiol* 2000;29:645-654.
- (3) El-Serag HB. The epidemic of esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:421-40, viii.
- (4) Kubo A, Corley DA. Marked regional variation in adenocarcinomas of the esophagus and the gastric cardia in the United States. *Cancer* 2002;95:2096-2102.
- (5) Lagarde SM, Ten Kate FJ, Richel DJ, Offerhaus GJ, van Lanschot JJ. Molecular prognostic factors in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol* 2007;14:977-991.
- (6) Wu PC, Posner MC. The role of surgery in the management of oesophageal cancer. *Lancet Oncol* 2003;4:481-488.
- (7) Gertler R, Stein HJ, Langer R et al. Long-term Outcome of 2920 Patients With Cancers of the Esophagus and Esophagogastric Junction: Evaluation of the New Union Internationale Contre le Cancer/American Joint Cancer Committee Staging System. *Ann Surg* 2011;253:689-698.

- (8) Solaymani-Dodaran M, Logan RF, West J, Card T, Coupland C. Risk of oesophageal cancer in Barrett's oesophagus and gastro-oesophageal reflux. *Gut* 2004;53:1070-1074.
- (9) Yousef F, Cardwell C, Cantwell MM, Galway K, Johnston BT, Murray L. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008;168:237-249.
- (10) Rudolph RE, Vaughan TL, Storer BE et al. Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus. *Ann Intern Med* 2000;132:612-620.
- (11) Brown LM, Swanson CA, Gridley G et al. Adenocarcinoma of the esophagus: role of obesity and diet. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:104-109.
- (12) Gammon MD, Schoenberg JB, Ahsan H et al. Tobacco, alcohol, and socioeconomic status and adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1277-1284.
- (13) Lagergren J, Bergstrom R, Nyren O. Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med* 1999;130:883-890.
- (14) Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1471-1474.
- (15) Demeester SR. Adenocarcinoma of the esophagus and cardia: a review of the disease and its treatment. *Ann Surg Oncol* 2006;13:12-30.

- (16) Ireland AP, Shibata DK, Chandrasoma P, Lord RV, Peters JH, DeMeester TR. Clinical significance of p53 mutations in adenocarcinoma of the esophagus and cardia. *Ann Surg* 2000;231:179-187.
- (17) Gibault L, Metges JP, Conan-Charlet V et al. Diffuse EGFR staining is associated with reduced overall survival in locally advanced oesophageal squamous cell cancer. *Br J Cancer* 2005;93:107-115.
- (18) Wang KL, Wu TT, Choi IS et al. Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Cancer* 2007;109:658-667.
- (19) Wilkinson NW, Black JD, Roukhadze E et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2004;8:448-453.
- (20) Langer R, Von Rahden BH, Nahrig J et al. Prognostic significance of expression patterns of c-erbB-2, p53, p16INK4A, p27KIP1, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor in oesophageal adenocarcinoma: a tissue microarray study. *J Clin Pathol* 2006;59:631-634.
- (21) Orringer MB, Marshall B, Iannettoni MD. Transhiatal esophagectomy: clinical experience and refinements. *Ann Surg* 1999;230:392-400.
- (22) Orringer MB, Sloan H. Esophagectomy without thoracotomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1978;76:643-654.

- (23) Hidalgo M, Siu LL, Nemunaitis J et al. Phase I and pharmacologic study of OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol* 2001;19:3267-3279.
- (24) Pera M, Manterola C, Vidal O, Grande L. Epidemiology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2005;92:151-159.
- (25) al-Kasspooles M, Moore JH, Orringer MB, Beer DG. Amplification and over-expression of the EGFR and erbB-2 genes in human esophageal adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1993;54:213-219.
- (26) Yacoub L, Goldman H, Odze RD. Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor receptor, and MiB-1 expression in Barrett's-associated neoplasia: correlation with prognosis. *Mod Pathol* 1997;10:105-112.
- (27) Bedard EL, Inculet RI, Malthaner RA, Brecevic E, Vincent M, Dar R. The role of surgery and postoperative chemoradiation therapy in patients with lymph node positive esophageal carcinoma. *Cancer* 2001;91:2423-2430.
- (28) Rice TW, Adelstein DJ, Chidel MA et al. Benefit of postoperative adjuvant chemoradiotherapy in locoregionally advanced esophageal carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1590-1596.
- (29) Gibson MK, Abraham SC, Wu TT et al. Epidermal growth factor receptor, p53 mutation, and pathological response predict survival in patients with locally advanced esophageal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:6461-6468.

- (30) Poller DN, Steele RJ, Morrell K. Epidermal growth factor receptor expression in Barrett's esophagus. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:1226-1227.
- (31) Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* 2002;7 Suppl 4:2-8.
- (32) Tedesco KL, Lockhart AC, Berlin JD. The epidermal growth factor receptor as a target for gastrointestinal cancer therapy. *Curr Treat Options Oncol* 2004;5:393-403.
- (33) Zhu Z. Targeted cancer therapies based on antibodies directed against epidermal growth factor receptor: status and perspectives. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:1476-1493.
- (34) Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 2002;7 Suppl 4:31-39.