

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

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE HER-2/NEU -
CERBB-2 E EGFR NA MUCOSA GÁSTRICA DE
PACIENTES PORTADORES DE ADENOCARCINOMA DE
ESTÔMAGO**

FERNANDO KREBS CIRNE LIMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR: PROF. LUIS FERNANDO MOREIRA

Porto Alegre, maio de 2006

L732e Cirne Lima, Fernando Krebs
Expressão imunohistoquímica de Her-2/Neu-CerbB-2 e EGFR na
mucosa gástrica de pacientes portadores de adenocarcinoma de
estômago /Fernando Krebs Cirne Lima ; orient. Luis Fernando
Moreira. – 2005.
60 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do
Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Neoplasias gástricas. 2. Adenocarcinoma 3. Genes erbB-2
4Genes erbB-1 I. Moreira, Luis Fernando. II. Título.

NLM: WI 320

Classificação Biblioteca FAMED/HCPA

*Esta dissertação segue as normas do Sistema Vancouver

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

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE HER-2/NEU -
CERB B-2 E EGFR NA MUCOSA GÁSTRICA DE
PACIENTES PORTADORES DE ADENOCARCINOMA DE
ESTÔMAGO**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre

FERNANDO KREBS CIRNE LIMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, maio de 2006

**“Assim que
confiases
em ti
mesmo,
saberás
como
viver”.**

Johann Wolfgang von Goethe

**Dedico este
trabalho à memória
de meu avô,
Dr. Heitor Masson Cirne Lima,
cujo exemplo de Médico e
Homem procuro seguir em
minha carreira e minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Luis Fernando Moreira**, do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), por sua dedicada e incansável orientação na realização deste trabalho, por confiar em minha capacidade para realizar este experimento, pelas inúmeras horas de trabalho e acima de tudo, por sua amizade.

À **Prof. Jane Maria Ulbrich Kulczynski**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por sua incondicional ajuda no preparo e interpretação das lâminas, e pelas sugestões, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos colegas do **grupo COG de pesquisa** pela incondicional ajuda e pelas valiosas sugestões.

À doutoranda da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre **Fabiane Pinto** e ao colega cirurgião **Dr Daniel Tressino** pela ajuda na coleta de dados dos prontuários.

Aos **funcionários do Serviço de Anatomia Patológica HCPA**, em especial à técnica **Flávia**, pela preparação das lâminas.

À **Sra. Estela**, secretária do Programa de Pós-Graduação, sempre atenciosa e solícita.

À técnica **Rosalva** da Pós Graduação da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, pela ajuda e pelas sugestões.

À **Décima Enfermaria de Cirurgia da Santa Casa de Porto Alegre**, que forneceu a amostra de pacientes para o trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia e aos seus coordenadores**, por possibilitarem a realização do experimento.

Ao **Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA**, pelas orientações e sugestões.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, que me proporcionou a realização de um curso de pós-graduação de reconhecida qualidade.

Ao **Serviço de Patologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre**, pelo fornecimento das peças para a realização do trabalho.

Ao **Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, que possibilitou a realização do trabalho.

Especialmente ao **MEC** que através do programa **PRODOC** da **CAPES** custeou parcialmente esta pesquisa.

À minha família, pelo carinho, pelo exemplo e pelo apoio em todas as horas de minha vida.

À minha mãe, **Carmen Vera** e minha irmã, **Ana Teresa**, um agradecimento especial pela revisão e tradução deste trabalho.

À **Dra Larissa Pretto Centeno**, minha esposa, pelo seu amor, carinho, compreensão e incondicional apoio em todos os momentos.

RESUMO

O câncer gástrico é ainda hoje um dos tumores sólidos mais comuns, sendo a segunda causa mais freqüente de morte por doença maligna no mundo. Apesar do aprimoramento da técnica cirúrgica e da utilização de tratamentos multimodais, o câncer gástrico, em geral, ainda permanece com um mau prognóstico. Na maioria dos países a doença é freqüentemente diagnosticada após ter invadido a camada muscular própria do órgão, estágio no qual a sobrevivência média em cinco anos é inferior a 20%. Como a maioria dos tumores humanos, o câncer gástrico é uma doença multifatorial, que se desenvolve em indivíduos geneticamente suscetíveis expostos a agentes carcinogênicos externos. Ultimamente, diversos oncogenes e genes supressores tumorais vêm sendo estudados na tentativa de esclarecer detalhadamente a carcinogênese gástrica. Her-2/Neu ou CerbB-2 e EGFR são oncogenes da família Her ou erb de receptores de fatores de crescimento. Ambos têm se mostrado com expressão aumentada em diversas neoplasias e possuem anticorpos monoclonais específicos como potencial forma de tratamento adjuvante. Em relação ao câncer gástrico, as prevalências destes oncogenes são bastante variáveis na literatura. O objetivo deste estudo foi determinar as prevalências de Her-2/Neu e EGFR na mucosa gástrica de pacientes com adenocarcinoma de estômago. Foram estudados 37 casos com avaliação de expressão imunohistoquímica de Her-2/neu e EGFR em amostras teciduais fixadas em formalina e armazenadas em parafina. Dois casos demonstraram expressão aumentada de Her-2/Neu, correspondendo a 5,4%. Nenhum caso demonstrou aumento da expressão de EGFR. Os autores concluem que a ausência da expressão do EGFR na amostra estaria mais relacionada a uma dificuldade encontrada de trabalhar com o anticorpo do que a real ausência de expressão do oncogene no câncer gástrico. Também sugerem que, apesar da baixa prevalência do Her-2/Neu na amostra, e devido à pouca resposta dos tumores gástricos às terapias hoje disponíveis, os anticorpos monoclonais específicos anti-Her deveriam ser futuramente testados nos indivíduos Her positivos, em ensaios clínicos randomizados.

ABSTRACT

Gastric cancer is one of the most common solid tumors, being the second leading cause of cancer death worldwide. Despite, better operative techniques and the use of multimodal therapies, gastric cancer still has a poor prognosis. In most countries the disease is usually detected after it has reached the muscularis propria layer, offering less than 20% survivors in 5 years. Gastric cancer is a multi-factorial disease, which occurs in genetically prone individuals who are exposed to external carcinogens. Recently, many oncogenes and tumor suppressor genes have been studied in order to explain gastric carcinogenesis. Her-2/Neu or CerbB-2 and EGFR are members of the HER family of growing factors. Both have been identified in many tumors and have specific monoclonal antibodies as a potential adjuvant therapy. Considering gastric cancer, the prevalence of these oncogenes is quite variable in literature reports. The purpose of this study was to investigate the prevalence of Her-2/Neu and EGFR in the gastric mucosa of patients with gastric adenocarcinoma. The immunohistochemical expression of Her-2/Neu and EGFR was studied in 37 formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. The immunohistochemical reaction produced by the anti-HER-2/Neu antibody was positive in 2 cases (5,4%). The immunohistochemical reaction produced by the anti-EGFR antibody was considered negative in all 37 cases. The authors conclude that the negative overexpression of EGFR is probably related to the great difficulty involving the study of this oncogene by immunohistochemistry. They suggest that, in spite of the low prevalence of Her-2/Neu in this study, and due to the bad response of gastric cancer to the present therapies, the specific anti-Her monoclonal anti-bodies should be tested in positive individuals, in future clinical trials.

ABREVIACOES

ABC- *avidin-biotin-peroxidase complex* (complexo avidina-biotina peroxidase)

AMPc *AMP cclico*

AP2 - *activator protein 2* (proteína de ativação 2)

APC - *adenomatous polyposis coli* (polipose adenomatosa colônica)

AR - amfiregulina

ATP - *adenosine triphosphat* (trifosfato de adenosina)

bFGF - *basic fibroblast growth factor* (fator de crescimento básico do fibroblasto)

DAB - tetrahidrocloroeto de diaminobenzedina

DCC - *deleted in colon carcinoma* (deletado no cancer de colon)

DNA cido desoxirribonucléico

EGF - *epidermal growth factor* (fator de crescimento epidérmico)

EGFR - *epidermal growth factor receptor* (receptor do fator de crescimento epidérmico)

FISH - *fluorescence in situ hybridisation*

HE - hematoxilina-eosina

HER-2/*neu* - *Human epidermal growth factor receptor 2* (receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2)

HGF - *hepatocyte growth factor* (fator de crescimento do hepatócito)

h-TERT - *human telomerase reverse transcriptase* (transcriptase reversa da telomerase humana)

IGF II - *insulin-like growth factor II* (fator de crescimento "tipo" insulina)

IL interleucina

kDa (kilodalton)

MAPK - *Mitogen-activated serine/threonine kinase* PBS - *phosphate buffered solution* (solução tampão de fosfato)

PDGF - *platelet derived growth factor* (fator de crescimento derivado das plaquetas)

quantitative PCR – PCR quantitativa

RNA ácido ribonucléico

RT-PCR - *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase)

TGF α - *transforming growth factor* (fator de crescimento de transformação α)

ÍNDICE

Dedicatória	V
Agradecimentos	VI
Resumo	VIII
Abstract	IX
Abreviações	X
Índice	XII
Introdução e justificativa	1
Objetivos	6
Fundamentação Teórica	7
Pacientes e Métodos	19
Resultados	23
Discussão	31
Perspectivas	38
Conclusões	39
Referências Bibliográficas	40
Anexo I	47
Anexo II	48

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer gástrico é ainda hoje um dos tumores sólidos mais comuns, principalmente na Ásia (1). É a segunda causa mais freqüente de morte por doença maligna no mundo, atrás apenas do câncer de pulmão (2). Existe uma marcada variação em sua incidência entre os diversos países e, mesmo em uma mesma região, podem existir taxas diferentes em uma mesma população, devido a vários fatores. Apesar do declínio evidente em países desenvolvidos da Europa e nos Estados Unidos, o câncer gástrico é ainda hoje o tumor mais freqüente no Japão, com taxas de incidência que se aproximam, em algumas áreas, de 100 casos para cada 100.000 habitantes. É um dos mais importantes em países subdesenvolvidos, principalmente da Ásia, África e América Latina (3). É o quarto tumor mais freqüente na França (4). Nos EUA é o décimo primeiro em incidência e oitavo em mortalidade (5).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer do Brasil (INCA) 22.330 novos casos de câncer gástrico foram diagnosticados no Brasil em 2001 e esta doença foi a terceira causa de óbitos no país entre os homens e a quinta causa entre as mulheres. No RS e em Porto Alegre no mesmo ano foram diagnosticados, respectivamente, 1520 e 200 novos casos de câncer do estômago. Para o ano de 2005 são estimados 23.145 novos casos no Brasil. No RS a estimativa de casos novos para 2005 é de 1180 casos para homens e 660 casos para mulheres. Em Porto Alegre são estimados 140 casos novos entre os homens e 100 casos novos entre as mulheres (6).

No Brasil houve uma redução nas taxas de mortalidade por câncer de estômago nas últimas décadas. Em 1979 a taxa de mortalidade era de 9,69 por 100.000 habitantes para homens e passou a 8,72 por 100.000 habitantes em 1999, com uma variação relativa de 10%. Entre as mulheres a diminuição foi semelhante, passando de 4,79 por 100.000 habitantes a 4,41 por 100.000 neste mesmo período (6).

Apesar de a maioria dos pacientes em estágio inicial de câncer gástrico poder ser curada pela cirurgia, mais da metade dos pacientes em estágios mais avançados morre por recidiva tumoral, mesmo quando são submetidos à gastrectomia curativa. Metástases linfonodais, hepáticas e disseminação peritoneal são as rotas predominantes de recidiva do câncer gástrico e, quando presentes, pioram significativamente o prognóstico (7).

Como a maioria dos tumores humanos, o câncer gástrico é uma doença multifatorial, que se desenvolve em indivíduos geneticamente suscetíveis expostos a agentes carcinogênicos externos. Assume-se que alterações genéticas sejam responsáveis pela progressão das células de estágio a estágio, desde células normais, passando por diversos tipos de lesões pré-malignas carcinoma não invasivo, até doença metastática.

O câncer colorretal é considerado o modelo humano ideal para a compreensão da carcinogênese devido à sua disponibilidade tecidual relativamente fácil, à existência de lesões precursoras e síndromes familiares claramente definidas (polipose adenomatosa familiar), além do avançado estágio de conhecimento de seu processo de carcinogênese (8). Já o conhecimento do câncer gástrico em nível molecular é menos desenvolvido, apesar de ter havido considerável progresso recente no seu entendimento. Um modelo teórico para a progressão da gastrite induzida pelo *H. Pilory* (*Helicobacter Pilory*) através de atrofia, metaplasia e displasia a câncer foi desenvolvido por Pelayo Correa e adaptado à medida que novas descobertas foram feitas. Este processo expôs tanto o valor quanto as limitações do modelo, uma vez que ficou claro que ele se aplica somente a câncer tipo intestinal histologicamente bem diferenciado. Talvez surpreendentemente, o câncer difuso mais pobremente diferenciado, parece ter uma patogênese molecular bem diferente, e há atualmente uma substancial literatura documentando as diferentes associações de vários oncogenes e genes supressores tumorais defeituosos com os diferentes tipos tumorais (9).

O p53 é um dos genes mais comumente mutados no câncer humano, estando inativado em quase metade de todos os tumores (quando então perde seu papel regulador). As transições do ciclo celular ocorrem por um mecanismo regulador que recebe uma ampla variedade de sinais, desencadeando o prosseguimento do ciclo de determinada célula. Os controladores dos pontos de checagem informam sobre a integridade do genoma; quaisquer danos, ativação de oncogenes, hipóxia e/ou infecção viral são sinais de alerta que levam à parada na progressão do ciclo mediado pelo mecanismo regulador cujo controlador essencial parece ser o p53, o “guardião do genoma”. Se a informação expressa dano grave ao genoma, a célula é levada à apoptose (morte celular programada). A célula é extremamente vulnerável à perda do p53 ou à sua mutação, por alterar o controle de proliferação diante de instabilidade

genômica (10). Dados clínicos e experimentais mostram que em muitos tumores com mutações de p53 há uma maior resistência à radio e quimioterapia, bem como pior sobrevida (11).

Outros genes, além do p53, são alvo de carcinógenos e sua identificação e caracterização serão de fundamental importância no desenvolvimento da epidemiologia molecular (12).

Atualmente já é evidente que diferentes vias genéticas levam ao câncer gástrico difuso e intestinal. Alterações em genes específicos que têm papéis importantes em diversas funções celulares como adesão celular, transdução de sinal, diferenciação, desenvolvimento ou reparo do DNA têm sido identificadas (13). Instabilidade de microssatélites tem sido detectada em 16- 36% dos cânceres gástricos e parece ocorrer precocemente no desenvolvimento do tumor (14). Inativação devido à perda de heterozigidade e/ou mutação de APC (*adenomatous polyposis coli*) e DCC (*deleted in colon carcinoma*) têm sido relatadas em câncer gástrico (15). A mutação da E-cadherina parece ser um excelente marcador diagnóstico e um alvo atrativo para futuras intervenções terapêuticas (13). O proto-oncogene *c-met* codifica para o receptor HGF (*hepatocyte growth factor*), que está preferencialmente amplificado nos tumores tipo difuso (16). A amplificação do *c-met* se correlaciona com estágio e prognóstico. O *k-sam*, um membro da família dos receptores de fator de crescimento dos fibroblastos é preferencialmente amplificado em tumores do tipo difuso (17). Perda de heterozigidade no *locus* bcl-2 está associada a tumores do tipo intestinal (18). Expressão do antígeno SC-1, um receptor da apoptose, é preferencialmente vista em tumores de tipo difuso (19). Amplificação da ciclina E é vista em 10 e 20% dos tumores gástricos de tipo difuso e intestinal, respectivamente (20).

HER-2/neu ou CerbB-2 e EGFR (*epidermal growth factor receptor*) têm sido estudados em diversos tumores e parecem estar associados, na maioria das vezes, a um pior prognóstico (21-27).

Apesar do aprimoramento da técnica cirúrgica e da utilização de tratamentos multimodais, o câncer gástrico, em geral, ainda permanece com um mau prognóstico. A compreensão da estrutura e função dos genes associados ao câncer gástrico é fundamental para o estabelecimento de métodos para o diagnóstico tumoral antes de sua invasão e disseminação, para o descobrimento de novos tratamentos e para a monitorização da eficácia de intervenções terapêuticas e preventivas (13).

Aspectos da oncologia molecular

Os oncogenes são seqüências de DNA que expressam proteínas controladoras da proliferação, diferenciação e morte celular. Eles são versões somaticamente mutadas de genes celulares normais ou proto-oncogenes, e codificam proteínas que governam passos cruciais no crescimento, diferenciação e morte programada da célula (28).

Os proto-oncogenes podem ser transformados em oncogenes por diferentes mecanismos que incluem mutações de ponto, lesões em porções cromossômicas, ampliações gênicas, rearranjos e interferência de proteínas virais (29). Tais alterações levam a uma perda ou ganho de função da proteína codificada pela seqüência alterada e à conseqüente transformação maligna (28). Nas últimas décadas, centenas de proteínas já foram identificadas como causadoras de tumores.

Diversos estudos vêm sendo realizados recentemente com a intenção de associar os oncogenes identificados com os diferentes tipos de tumores, possibilitando a utilização dos primeiros na identificação de indivíduos de risco, no diagnóstico precoce e na avaliação do prognóstico. Em vários tumores humanos sólidos e leucemias, o estudo molecular de espécimes clínicos já é feito de rotina e tem ajudado no manejo dos pacientes.

Em carcinoma de mama a amplificação de HER/2-neu ou CerbB-2 com aumento de expressão da proteína está relacionada a um pior prognóstico, com aumento de resistência à quimioterapia e diminuição de sobrevida (30).

HER-2/neu e CerbB-2, apesar de apresentarem diferenças em duas posições de suas seqüências de aminoácidos, são tratados pela literatura como um único oncogene. Decidiu-se então por tratar o oncogene como HER-2/neu, neste trabalho, para facilitar o entendimento.

HER-2/neu faz parte da família de 4 fatores de crescimento (EGFR, CerbB-2 ou HER-2/neu, CerbB-3 e CerbB-4) que possuem atividade intrínseca de tirosina kinase, cujo aumento, desencadeado pela união de um ligante com a porção externa do receptor, é o mecanismo presumido para a transformação de células (31, 32).

Por definição, tirosina kinase é uma enzima que cataliza a fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas, com ATP (*adenosine triphosphate*) ou outros nucleotídeos como doadores de fosfato. As proteínas tirosina kinases são uma grande família multigênica com particular relevância nas doenças humanas como o câncer. Foram identificados no genoma

humano 90 genes tirosina kinases, entre os quais 58 de tipo receptor. Este tipo receptor de genes está distribuído em 20 subfamílias entre as quais está a família HER ou EGFR (33).

O oncogene HER-2/neu está localizado no locus 21 do braço curto do cromossomo 17 e o seu produto é uma proteína de 185-kDa (kilodalton), que compartilha significativa homologia com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (32).

Avanços em biologia molecular demonstraram que a expressão gênica de receptores tirosina-kinase associados pode arbitrar a tumorigênese (34). Células tumorais que apresentam amplificação gênica ou expressão aumentada de EGFR e HER-2/neu estão propensas a metastatizar e invadir tecidos vizinhos (25).

O gene EGFR está localizado no braço longo do cromossomo 7 (35). No câncer de mama sua expressão aumentada mostrou estar associada a risco aumentado de recorrência precoce e resistência à endocrinoterapia (36). Por outro lado, em carcinoma colorretal, parece não haver diferença significativa nos níveis de EGFR entre a mucosa neoplásica e a normal (37). Em câncer gástrico sua amplificação parece ocorrer em estágios avançados da doença e parece ser um indicador importante de mau prognóstico a curto prazo. Também tem sua expressão aumentada em tumores de pulmão, esôfago e colo uterino.

HER-2/neu tem sido intensamente estudado em carcinoma de mama. No entanto, este oncogene também está hiper-expresso em outros tumores como adenocarcinomas do trato gastrointestinal, carcinoma de ovário (38), glioblastoma multiforme (39) e carcinoma de pulmão (21). Sabe-se que as alterações de HER-2/neu estão associadas a pior prognóstico do adenocarcinoma de estômago, na grande maioria dos estudos (40). Há ainda poucos estudos relacionando HER-2/neu e EGFR, em conjunto, ao carcinoma gástrico.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar a prevalência da expressão imunohistoquímica de HER-2/neu e EGFR na mucosa gástrica de pacientes portadores de adenocarcinoma de estômago.

Objetivos Secundários

- Relacionar as alterações de expressão de HER-2/neu e EGFR com os tipos histológicos (intestinal e difuso).
- Relacionar as alterações com o grau de diferenciação celular do tumor.
- Relacionar as alterações com o estadiamento da doença
- Relacionar as alterações com o prognóstico.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O câncer gástrico, apesar do seu declínio nas últimas décadas, ainda é a segunda causa mais freqüente de morte por doença maligna no mundo, atrás apenas do câncer de pulmão (2). Sua incidência no Japão aproxima-se, em algumas regiões, de 100 casos para cada 100.000 habitantes, sendo também elevada em países subdesenvolvidos, principalmente na Ásia, África e América Latina (3). No Brasil, no ano de 2001, foi estimada uma incidência de 18,3/100.000 habitantes para homens e 8,14/100.000 habitantes para mulheres, sendo a 3ª causa de óbitos por neoplasias entre homens e a 5ª entre mulheres (6).

Raça, classe econômica e exposição a fatores ambientais parecem influenciar na variação da incidência do câncer gástrico ao redor do mundo (41). O câncer gástrico tem maior incidência em populações de baixa renda. É infreqüente em pessoas com menos de 40 anos de idade, tendo prevalência e mortalidade maiores entre homens com mais de 60 anos de idade (42,43). A proporção geral do câncer gástrico em relação ao sexo é de dois homens para cada mulher (44,45).

O adenocarcinoma é o tipo histológico mais freqüente de câncer gástrico, sendo responsável por mais de 90% dos casos (40). A localização mais freqüente da neoplasia é o antro gástrico (46). Contudo, estudos recentes têm demonstrado uma tendência à localização mais proximal no órgão, envolvendo fundo e cárdia (47).

A sobrevida geral média em cinco anos é de cerca de 10%. A invasão do tumor na parede gástrica é o fator mais importante no prognóstico dos pacientes com câncer gástrico (48). Quando restrito à mucosa e/ou submucosa é definido como câncer gástrico precoce, com sobrevida acima de 90% em cinco anos (49). O comprometimento linfonodal, as metástases à distância, o grau de diferenciação celular e a topografia da lesão também são fatores prognósticos para o câncer gástrico (48).

A ressecção cirúrgica permanece como a única opção terapêutica curativa para o câncer gástrico. No entanto, existem controvérsias em relação à extensão da ressecção gástrica, extensão da linfadenectomia e à utilização de alternativas terapêuticas adjuvantes (46,50).

O modelo geralmente aceito para a carcinogênese gástrica, desenvolvido por Pelayo Correa e cols em 1975, propõe que o câncer é o resultado final de uma série de mutações e

transformações celulares que iniciam cedo na vida. Inicialmente o revestimento gástrico normal é submetido a um processo inflamatório crônico, “gastrite superficial”, envolvendo alguma lesão celular. Poderia ser causada por fatores como ingestão excessiva de sal ou infecção pelo *H.pylori*. O próximo estágio envolve extensa perda celular e resulta em gastrite atrófica crônica. Com esta condição, o microambiente gástrico é alterado, principalmente como resultado da secreção ácida defeituosa, e o pH aumenta a um ponto que permite extensa colonização por várias espécies de bactérias. Várias destas espécies podem reduzir nitratos a nitritos e também catalizar uma reação entre nitritos e proteínas da dieta, resultando na formação de compostos N-nitrosos. Estes são mutagênicos e carcinogênicos e podem causar transformações posteriores nas células epiteliais à metaplasia, displasia, e , por fim, câncer (51).

A diminuição da ocorrência do câncer gástrico entre as populações que migram de zonas de alta incidência, tendendo a assumir gradativamente as taxas relativas às populações dos países que as recebem sugere importante papel de diversos fatores ambientais no desenvolvimento do câncer gástrico (52). Dentre eles, os mais estudados têm sido os dietéticos. Vários estudos têm demonstrado riscos associados à alta ingestão de sal e carne ou peixe preservados em sal ou defumados. Vegetais em conserva têm demonstrado aumentar o risco para câncer mas somente em populações chinesas e japonesas (51).

A associação dietética mais forte e consistentemente observada tem sido relacionada a dieta com baixo consumo de frutas e/ou vegetais. Esta associação foi observada em estudos retrospectivos e prospectivos em populações de vários países da Europa, na América do Sul, na América do Norte, e em várias partes da Ásia. Recentemente vários estudos vêm tentando elucidar os nutrientes específicos responsáveis pela proteção conferida pela ingestão regular de frutas e vegetais. A maior atenção vem sendo dada às vitaminas antioxidantes, especialmente a vitamina C e o β -caroteno, mas seu uso sob a forma de suplementos ainda não pode ser recomendado como forma de prevenção do câncer gástrico (51).

Nas últimas duas décadas, grande importância tem sido dada à associação do *Helicobacter pylori* com o câncer gástrico. Em estudo de 1993, Forman e cols analisaram os dados de 13 países mostrando uma associação significativa entre a soropositividade para *H pylori* e os coeficientes de incidência e mortalidade para o câncer gástrico (53). Vários estudos

de caso-controle e prospectivos observacionais demonstraram ser a infecção pelo *H.pylori* um fator preditivo para o desenvolvimento do câncer gástrico do tipo intestinal (54).

Contudo, atualmente estima-se que praticamente metade da população do planeta seja portadora do *H.pylori* e portanto, simplesmente a sua presença, associada ou não a outros fatores, não seria capaz de causar câncer gástrico na maioria dos portadores. Mais recentemente os estudos têm se voltado para a análise das diversas cepas do *H.pylori*. Dentre elas, vac A S1, cag A, e ice A1 têm sido consideradas as mais virulentas (55).

HER-2/NEU OU CERBB-2

Caracterizado como oncogene devido à sua capacidade de promover transformação celular, CerbB-2 foi clonado de células de carcinoma de mama. Faz parte de uma família de 4 fatores de crescimento (EGFR ou CerbB-1, CerbB-2, CerbB-3 e CerbB-4), que possuem atividade intrínseca de tirosina kinase, cujo aumento, desencadeado pela união do ligante com a porção externa do receptor, é o mecanismo presumido para a transformação de células (31,32). Compartilha significativa homologia com o receptor de crescimento epidérmico (EGFR) (32). Neu foi primeiramente clonado de ratos com neuroglioblastomas induzidos com ethyl-nitrosureas (neu gene). CerbB-2 e neu diferem de seus protooncogenes por uma única mutação, tendo como resultado desta aumento na atividade intrínseca da tirosina kinase (56). O aumento da atividade de tirosina kinase ocorre também por outros dois mecanismos: amplificação gênica e modificação na regulação de translação da proteína (57).

CerbB-2 codifica uma proteína de 185 kDa localizada na membrana celular, tendo um domínio intracelular, um ponto de ancoragem e um domínio extracelular. O gene está localizado no braço curto do cromossomo 17 (lócus 21) (58). A caracterização do gene e de seu receptor foi realizada através da codificação do DNA extraído de células de mama e estômago. Os clones originais foram identificados com diferentes probes e os dois principais transcritos tem 4,6kb (gene completo) e 2,3kb (forma com corte alternativo). A forma alternativa foi identificada em células de estômago (MKN-7) (59). A caracterização do transcrito principal mostrou que a mais longa abertura da malha de leitura tem 3765 nucleotídeos com um resíduo de 1255 aminoácidos. O códon de iniciação ATG é flanqueado por nucleotídeos que seguem o critério de Kozak para início de translação. CerbB-2 mostrou estrutura secundária similar ao

EGF. Um resíduo de 22 aminoácidos (654-675) é extremamente hidrofóbico e é provavelmente o sítio de ancoragem da proteína. Esta seqüência de aminoácidos é seguida como em diversas outras proteínas por uma seqüência de aminoácidos básicos (lys-arg-arg) que promove a correta alocação da proteína na membrana celular. Os primeiros 21 aminoácidos são também hidrofóbicos sugerindo que eles representam uma seqüência de sinais para a glicoproteína de membrana. Oito locais de N-glicosilação foram identificados sugerindo que CerbB-2 e EGFR são muito similares. A seqüência do domínio extracelular tem 44% de homologia com o domínio de ligação do EGF. Existe no CerbB-2 um agregado rico de cisteínas que facilitam a geração de uma conformação propícia para transmissão celular através de pontes intra e intermoleculares de enxofre (S). A seqüência de aminoácidos 727-986 inclui o sítio de ligação de ATP e tem homologia também com a família de oncogenes src (do sarcoma). Os sítios de fosforilação encontrados foram 1139, 1222, e 1248, indicando que a proteína pode se autofosforilar. A comparação entre CerbB-2 e neu mostra que ocorrem somente duas diferenças nas posições 813 e 817 (60).

Análise da região 5' mostra diferenças entre as seqüências de CerbB-2 e EGFR. Contudo, os dois genes podem ser induzidos por agentes como ácido retinóico, AMPc (*AMP cíclico*) e fator de crescimento epitelial. É interessante notar que o ligante do EGFR é capaz de ativar o CerbB-2, não por ligação com o receptor, mas provavelmente por fosforilação heteróloga ou indução direta do promotor de CerbB-2/neu. A ação de AMPc ocorre por mediadores do tipo AP2 (*activator protein 2*) em seqüências -766 e -244. Os estudos com a indução de CerbB-2 mostram que este gene é altamente regulável como ocorre com fatores de crescimento implicados em proliferação celular (61).

ATIVIDADE DE TIROSINA KINASE

A maioria dos fatores de crescimento tem atividade de tirosina kinase. São capazes de autofosforilar seus domínios intracelulares nos resíduos de tirosina kinase e desta forma tornam-se capazes de reagir com outras proteínas. HER-2/neu tem atividade de tirosina kinase estando permanentemente ativado nas células que o expressam. Estudos mostram que a

capacidade de transformação celular induzida por HER-2/neu é diretamente relacionada à atividade catalítica da proteína sob os resíduos de tirosina (autokinase) (62).

Estudos mais recentes têm investigado os mecanismos de fosforilação de HER-2/neu e sua interação com os outros receptores da mesma família. Um estudo de Klapper e cols mostrou que provavelmente HER-2/neu atua como co-receptor para os demais fatores de crescimento desta família, uma vez que não possui ligante natural identificado, sendo que os ligantes heregulina e neuroregulina reagem com pouca afinidade com HER-2/neu. Também demonstrou que a atividade de HER-2/neu existe quando homodimerizado. Mas a sua atividade plena depende da co-expressão dos outros receptores (EGFR, CerbB-3 e CerbB-4), com os quais, HER-2/neu forma heterodímeros. Estes ativam a atividade catalítica, induzindo ativação de MAPK (*Mitogen-activated serine/threonine kinase*), o principal mediador de sinalização intracelular desta família de oncogenes, com conseqüente aumento de proliferação celular (31).

HER2-NEU E CÂNCER

HER-2/neu está superexpresso em 25 a 30% dos tumores de mama, aumentando a agressividade do tumor. Estudo de 1987, com 130 mulheres com câncer de mama identificou um subgrupo que superexpressava HER-2/neu e que teve sobrevida média de 3 anos. Em contraste, pacientes com HER-2/neu negativo tiveram sobrevida média de 6-7 anos (22). Em 1994, Muss e cols relataram diferença relacionada à dose da quimioterapia adjuvante, com necessidade de doses maiores nas pacientes HER-2/neu positivas em relação às negativas (30).

Em câncer de pulmão de pequenas células a superexpressão de HER-2/neu está associada a pior prognóstico. Já nos tumores de pulmão não de pequenas células, HER-2/neu parece ser marcador de multirresistência a quimioterápicos (21).

No caso do câncer de pâncreas, mais de 50% dos pacientes têm níveis elevados da proteína e do RNA mensageiro do HER-2. Contudo, em contraste com o câncer de mama, níveis elevados de HER-2 são encontrados nos tumores mais diferenciados, e nenhuma correlação entre níveis elevados de HER-2 e prognóstico foi estabelecida. Portanto, o significado do HER-2 no câncer de pâncreas permanece desconhecido (63).

Quanto ao câncer colorretal, Kapitanovic e cols relataram em 1997 relação de expressão de HER-2/neu com estadiamento e sobrevida (64). Já Dursun e cols em 2001 concluíram que a expressão do HER-2/neu é um evento infreqüente em tumores colorretais (13,95%) e que não há correlação entre expressão de HER-2/neu e o potencial maligno da doença (65).

Com relação ao câncer gástrico, Tsugawa e cols publicaram em 1993 estudo envolvendo 82 casos relacionando amplificação de HER-2/neu com pior prognóstico (23). Em 1998 o mesmo autor relacionou a amplificação do gene com a presença de metástases linfonodais (24). Em 2003, Xin Chen e cols, em estudo com microarranjos de cDNA relataram expressão aumentada de HER-2/neu em aproximadamente 10% (9 em 90) dos tumores gástricos de sua análise (66). Na literatura a maioria dos estudos correlaciona o aumento da expressão ou a amplificação da proteína a pior prognóstico, mas as incidências de expressão aumentada variam de 8 a 45% (Tabela 1).

Tabela 1 – Expressão de Her-2/Neu ou CerbB-2-literatura

<i>Autor</i>	<i>Ano de publicação</i>	(%)Expressão HER-2/neu	N _(tumores)
Tsugawa K, et al (23)	1993	34	28 (82)
Lee Ey, et al (67)	1994	25	14 (56)
Oshima CT, et al (68)	2001	45	37 (82)
Takehana T, et al (69)	2002	8,2	29 (352)
Ghaderi A, et al (70)	2002	16,4	24 (146)

EGFR/ HER-1/ CERBB-1

O gene EGFR está localizado no braço longo do cromossomo 7 (35). Codifica uma glicoproteína de membrana plasmática de 170 kDa, composta de um domínio extracelular, um segmento lipofílico transmembrana, e um domínio intracelular com atividade tirosina kinase (71).

O domínio extracelular amino-terminal de EGFR tem duas regiões ricas em cisteína que formam o domínio de ligação com o ligante. A região transmembrana é uma hélice alfa simples que ancora o receptor à célula (72). O domínio citoplasmático contém uma região tirosina kinase e uma cauda carboxi-terminal que contém pelo menos cinco sítios de autofosforilação de tirosina. Os domínios tirosina kinase do CerbB-3 e do CerbB-4 mostram aproximadamente 80% de homologia com o do EGFR (73), enquanto CerbB-3 não tem atividade tirosina kinase intrínseca (74). A Figura 1 é uma representação gráfica do EGFR.

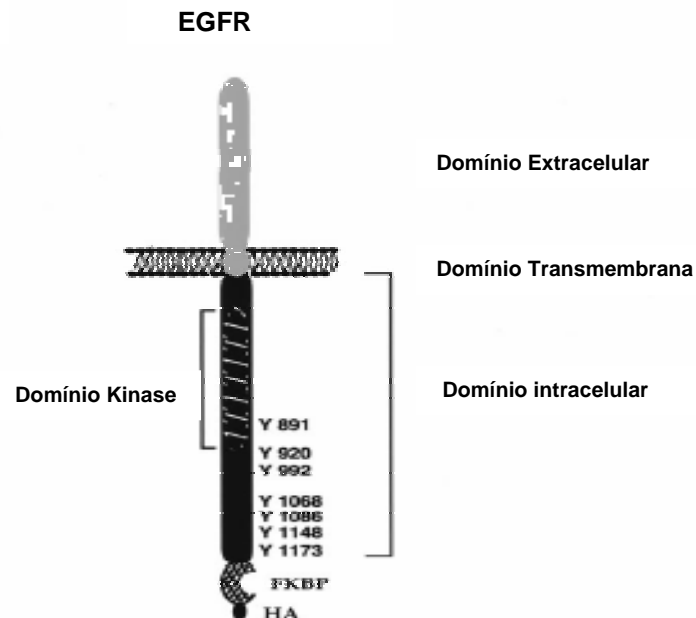


Figura 1 – Esquema de representação gráfica do EGFR

Vários ligantes podem se ligar ao EGFR, CerbB-3, e CerbB-4. Estes ligantes têm especificidades diferentes para cada receptor, resultando em diferentes efeitos celulares (75). União com o ligante induz homodimerização em EGFR, bem como heterodimerização com outros receptores Her (76) (Figura 2). Dimerização do EGFR induz atividade catalítica tirosina kinase, o que leva à autofosforilação em várias tirosinas dentro da cauda carboxil-terminal do receptor. As fosfotirosinas resultantes Y992, Y1068, Y1448, e Y1173 agem como “locais de ancoragem” para um número de enzimas transdutoras de sinal e proteínas “de adaptação”, que desencadearão os efeitos celulares (72).

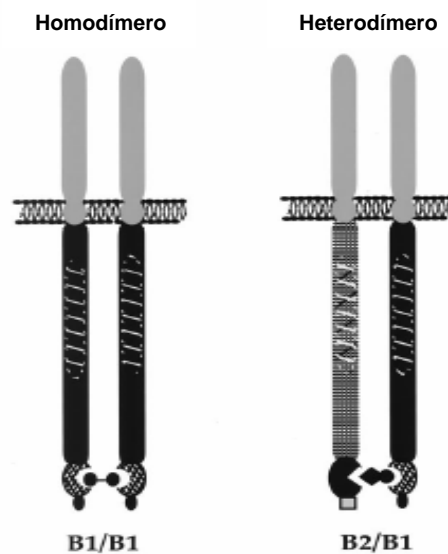


Figura 2 – Homodimerização e Heterodimerização

Ativação do EGFR ocorre quando um ligante, como o EGF (*epidermal growth factor*), o TGF α (*transforming growth factor*), ou amphiregulina, se liga ao seu domínio extracelular. Isto leva o receptor a se dimerizar com outro monômero de EGFR ou com outro membro da família CerbB (77). Após a dimerização do receptor ocorrem ativação da atividade intrínseca tirosina kinase e autofosforilação da tirosina. Estes eventos levam ao recrutamento e fosforilação de vários substratos intracelulares, levando à sinalização mitogênica e outras atividades celulares (78). Receptores que não têm função kinase, por causa de mutações no sítio de ligação do ATP, não desencadeiam a total extensão de respostas bioquímicas seguindo ligação com o ligante; isto demonstra que a atividade tirosina kinase do receptor é necessária na sinalização celular (79). A principal via de sinalização da família erbB parece ser a via *ras-raf-mitogen-activated protein kinase* (79). Outra via importante é uma constituída pelo *phosphatidylinositol 3-kinase* e pela proteína kinase *Akt* (80,81). Após sua ativação, Akt transduz sinais que regulam múltiplos processos biológicos incluindo apoptose, expressão gênica, e proliferação celular (82). Akt parece enviar sinais de sobrevivência (antiapoptóticos) pela fosforilação de múltiplos alvos, incluindo o *BAD* da família do Bcl-2 (fator pró-

apoptótico) (83) e a enzima caspase-9 (via da morte celular) (84). Akt também tem papel proeminente na regulação da progressão do ciclo celular (82).

Sinalização do EGFR age sobre vários aspectos da biologia tumoral. Ativação do EGFR tem demonstrado aumentar processos responsáveis pelo crescimento e progressão do tumor, incluindo promoção da proliferação, angiogênese, invasão, metastatização e inibição da apoptose. A expressão do EGFR em tumores tem sido correlacionada com a progressão da doença, baixa sobrevida, pobre resposta a tratamento, e ao desenvolvimento de resistência a agentes citotóxicos. Altos níveis de EGFR têm sido observados em uma variedade de tumores, incluindo próstata, mama, estômago, cólon-reto e ovário (26).

Mutações em EGFR são observadas em alguns tumores; o mutante mais comum é o EGFRvIII, que não tem um domínio externo de ligação com o ligante e tem atividade tirosina kinase constitutivamente ativada, embora atenuada. EGFRvIII é comumente superexpresso como resultado de amplificação gênica e tem sido identificado em tumores cerebrais, pulmonares, mamários, prostáticos e gástricos, mas ainda não foi encontrado em células não malignas (26).

EGFR e CÂNCER

O EGFR parece estar superexpresso em uma variedade de tumores sólidos, incluindo de pulmão não de pequenas células, epidermóides de cabeça e pescoço, de ovário, de próstata, de pâncreas, de mama e colorretais (73,26). Amplificação do EGFR ocorre em 40-50% dos glioblastomas (37).

Em 1987, Sainsbury e cols. relataram a relação entre câncer de mama EGFR + e pior prognóstico (menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida geral). Concluíram em análise multivariada que o status EGFR era a variável mais importante na predição da sobrevida livre de doença e geral nas pacientes linfonodo-positivas e a segunda variável mais importante nas pacientes linfonodo-negativas (25).

Expressão de EGFR é comum no câncer colorretal. Tem sido proposto que a sua superexpressão possa promover a formação de metástases hepáticas nesta doença (27).

Estudos têm demonstrado que EGFR e seus ligantes estão superexpressos em adenocarcinoma pancreático. Sua expressão tem sido associada a maior agressividade destes tumores (85).

O EGFR também tem se mostrado superexpresso no câncer gástrico (86). Em estudo com microarranjos, Xin-Chen e cols. relataram expressão aumentada do gene em cerca de 15% dos tumores gástricos de sua amostra (66). Na literatura, as incidências variam de 2 a 42% de expressão aumentada (tabela 2).

Tabela 2 Expressão de EGFR em Câncer gástrico

Autor	Ano de publicação	(%)Expressão EGFR	N_(tumores)
Yasui W, et al (87)	1988	37,6	45 (156)
Lee Ey, et al (67)	1994	42,8	24 (56)
Ghaderi A, et al (70)	2002	32,2	47 (146)
Takehana T, et al (88)	2003	2,2	9 (413)

ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS ANTI-EGFR

A eficácia e toxicidade variáveis das terapias tradicionais para o câncer têm impellido o desenvolvimento de novos agentes baseados em alvos específicos. Membros da família Her, em particular o EGFR, são alvos terapêuticos atrativos, pois estão superexpressos e/ou desregulados em diversos tumores sólidos (26). Ativação do EGFR desencadeia uma rede de processos de sinalização que promovem proliferação celular tumoral, migração, adesão e angiogênese, além de diminuição da apoptose. Portanto, a inibição dos membros da família Her poderia prevenir o surgimento e a progressão dos tumores (89).

Ativação anormal do receptor ou desregulação das vias de transdução do sinal do EGFR podem resultar de diferentes mecanismos que são potencialmente relevantes para o crescimento e/ou desenvolvimento de carcinomas humanos: superexpressão de receptores;

superprodução dos ligantes; ativação do receptor independente do ligante; “linha cruzada” com receptores heterólogos (89).

Diversas estratégias têm sido usadas para bloquear estes receptores. As mesmas podem ser divididas em dois tipos: bloqueio extracelular e bloqueio intracelular.

BLOQUEIO EXTRACELULAR E INTRACELULAR

Bloqueio extracelular usa anticorpos para bloquear a região extracelular do receptor de união com o ligante. Dois anticorpos monoclonais anti HER-2, *trastuzumab* (Herceptin; Genetech, Inc, South San Francisco) e 2C4 (pertuzumab) foram desenvolvidos. Vários outros anticorpos monoclonais anti-EGFR estão em desenvolvimento clínico. Entre eles, o Cetuximab (Erbix; Imclone Systems, Inc, New York, NY), o Abx-EGF e o h-R3 (89).

Outros agentes dirigidos ao Her agem no nível intracelular. São inibidores da Tirosina Kinase de baixo peso molecular. Inibidores EGFR-TK competem com ATP pela ligação com o sítio do ATP no “reservatório” de kinase do receptor. Inibindo a atividade da Tirosina Kinase, estes agentes bloqueiam a atividade catalítica do receptor e a autofosforilação, prevenindo a transdução do sinal. Dois agentes, atualmente em fase III de desenvolvimento, são *ertolinib* e *genfitinib* (Iressa; Astra Zeneca, Wilmington, DE). Estudos recentes têm demonstrado que ambos também inibem a fosforilação de HER-2-neu (89).

A tabela 3 mostra as drogas anti-Her e seus estágios de desenvolvimento clínico.

Tabela 3 Anticorpos Monoclonais e Inibidores da Tirosina Kinase em desenvolvimento clínico

Composto	Propriedade	Alvo específico	Fase de desenvolvimento
Ertolinib	ITK reversível	HER1/EGFR	III
Genfitinib	ITK reversível	HER1/EGFR	III
EKB-569	ITK irreversível	HER1/EGFR	I
GW-016	ITK reversível	HER1/EGFR; HER2	I
CI-1033	ITK irreversível	HER1/EGFR; HER2; HER4	II
Trastuzumab	IgG I humanizada	HER2	Lançado
2C4	IgG I humanizada	HER2	I
Cetuximab	IgG I humanizada	HER1/EGFR	III
ABX-EGF	IgG 2 totalmente humana	HER1/EGFR	II
h-R3	IgG I humanizada	HER1/EGFR	I

Abreviações: ITK: inibidor da tirosina quinase; HER1/EGFR: *epidermal growth factor receptor*; IgG: imunoglobulina G

Adaptado de Arteaga C. Targeting HER I/EGFR: A molecular approach to Cancer Therapy (89).

4. PACIENTES E MÉTODOS

Delineamento

Este trabalho consiste em um estudo transversal. O fator em estudo é a análise de lâminas de adenocarcinoma de estômago. Os desfechos são as expressões de HER-2/neu e EGFR na mucosa gástrica para avaliar o papel destas alterações no quadro clínico-patológico da doença.

CA / $\overline{\text{HER-2/neu}}$ / $\overline{\text{EGFR}}$

CA / HER-2/neu / EGFR

P-----A-----{

CA / $\overline{\text{HER-2/neu}}$ / $\overline{\text{EGFR}}$

CA / HER-2/neu / EGFR

P= População: pacientes com tumores gástricos operados entre os anos de 2001 e 2003 na Décima Enfermaria do Serviço de Cirurgia Geral da Santa Casa de Porto Alegre.

CA = Câncer Gástrico.

HER-2/neu = expressão imunohistoquímica do oncogene HER-2/neu.

EGFR = expressão imunohistoquímica do oncogene EGFR.

Hipóteses do Estudo

H0/1- EGFR não está expresso em adenocarcinoma gástrico.

H0/2- HER-2/neu não está expresso em adenocarcinoma gástrico.

H1/1- EGFR está expresso em adenocarcinoma gástrico.

H1/2- HER-2/neu está expresso em adenocarcinoma gástrico.

Amostra

Foram avaliados os casos de neoplasia gástrica submetidos a ressecção cirúrgica na Décima Enfermaria do Serviço de Cirurgia Geral da Santa Casa de Porto Alegre entre os anos de 2001 e 2003, seguindo os critérios de elegibilidade. Lâminas para análise histopatológica em HE e imunohistoquímica para HER-2/neu e EGFR foram preparadas a

partir dos blocos de parafina estocados pelo Serviço de Patologia da Santa Casa de Porto Alegre.

Crítérios de elegibilidade

Foram incluídos os casos de pacientes com adenocarcinoma gástrico submetidos à ressecção cirúrgica no referido Serviço.

Foram excluídos da amostra os seguintes casos:

- outros tipos histológicos que não o adenocarcinoma;
- outras neoplasias concomitantes ou prévias (exceto baso e espinocelular de pele);
- terapia neo-adjuvante (químio ou radioterapia);
- pacientes que não foram submetidos à ressecção.

No presente estudo foi utilizada uma amostra controle, constituída por lâminas de mucosa gástrica de seis pacientes sem neoplasia de estômago, estocadas no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Variáveis

Para caracterização da população estudada, foram apresentadas as seguintes variáveis: idade, gênero, localização do tumor, tipo de cirurgia e estadiamento.

As variáveis idade, gênero, localização, tipo e grau histológicos, grau de invasão na parede gástrica, presença de metástases, estágio e expressões imunohistoquímicas de HER-2/neu e EGFR foram coletadas em duas fases:

- Revisão dos prontuários médicos;
- Avaliação das lâminas.

Preparação das lâminas

Os cortes dos blocos de parafina estocados das peças cirúrgicas foram submetidos inicialmente à análise histopatológica pela coloração de HE (*hematoxilina-eosina*).

Os tumores gástricos foram avaliados segundo a classificação de Lauren em tipos intestinal e difuso. Segundo o grau de diferenciação tumoral foram caracterizados como bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados.

A análise imunohistoquímica foi efetuada utilizando-se anticorpos “*anti-human c-erbB-2 oncoprotein*” (Dakocytomation -CA, USA) que reconhecem o oncogene *cerbB-2* / HER-2/neu e anticorpos “*mouse anti-human EGFR H11*” (Dakocytomation –CA, USA) que reconhecem o oncogene EGFR. Para determinar a positividade destes anticorpos foi utilizado o método ABC (complexo avidina-biotina-peroxidase –kit LSAB DAKO). Os anticorpos foram diluídos em 1:200 e o procedimento foi executado no laboratório do Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre seguindo sua rotina técnica, que será detalhada a seguir.

Os cortes de 3 a 4 µm foram colocados sobre uma lâmina previamente embebida em solução de organoselano a 3%, permanecendo por, pelo menos, 12 horas em estufa a 60 °C. Para desparafinização as lâminas foram banhadas em xilol por dez minutos e em álcool por cinco minutos. Então foi realizada a recuperação antigênica. Para o *cerbB-2* em forno de microondas com tampão citrato (pH 6,0) em três sessões de sete minutos em potência 9. Para o EGFR foi realizada com proteinase k por 5 minutos à temperatura ambiente. Após, as lâminas foram lavadas com água destilada e banhadas em PBS (*phosphate buffered solution*) por cinco minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 5% diluído em água destilada por dois períodos de 5 minutos. Depois as lâminas foram lavadas com água destilada e por mais 3 minutos em PBS. Para bloquear a atividade inespecífica de outras proteínas as lâminas foram deixadas em solução de leite em pó desnatado a 5% diluído em PBS por 20 minutos e, após, as lâminas foram lavadas com água destilada. Os cortes foram circulados com caneta Dako Pen (Dakocytomatic –CA, USA) e após novo banho em PBS, incubados em câmara úmida e escura por 1 a 2 horas com os anticorpos primários anti-*cerbB-2* e anti-EGFR (Dako) diluídos a 1:200 em PBS. A seguir as lâminas

foram lavadas separadamente com água destilada. Após as lâminas foram banhadas em PBS por três períodos de cinco minutos. O anticorpo secundário (kit LSAB-Dako) foi pingado (1 gota) em cada lâmina. Foram realizados mais três banhos de 5 minutos em PBS. Após, a Streptavidina do kit LSAB foi pingada nas lâminas. Mais três banhos de 5 minutos em PBS foram realizados. O agente cromogênico tetrahidrocloreto de diaminobenzedina (DAB) foi pipetado nas lâminas para colorir a reação e, quando esta estava adequada, foi bloqueada em água destilada. Em seguida foram encubadas por 20 segundos em hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente. Por fim, foram mergulhadas em água amoniacal e lavadas em água corrente, álcool e xilol, sendo então realizada a montagem em entelan, com a colocação da lamínula.

A leitura das lâminas foi feita seguindo-se um escore de 0 a 3 + utilizando-se os critérios do Herceptest (Tabela 4): zero, completamente negativo; 1+, fracamente positivo; 2+, moderadamente positivo; 3+, fortemente positivo. A coloração considerada positiva foi de membrana para os dois anticorpos, sendo que a coloração citoplasmática foi somente anotada mas não considerada positiva.

As lâminas que não demonstraram coloração da membrana pelos marcadores foram consideradas 0+ (incluem-se aqui as que demonstraram coloração apenas de citoplasma). As lâminas que demonstraram coloração da membrana fracamente perceptível em menos de 10% das células tumorais foram consideradas 1+. As lâminas que demonstraram coloração fraca a moderada completa da membrana em mais de 10% das células tumorais foram consideradas 2+. As lâminas que demonstraram coloração forte completa da membrana em mais de 10% das células tumorais foram consideradas 3+.

Tabela 4 – Classificação da expressão do CerbB-2- HER-2/neu determinada pelo método do herceptest (DAKO)

Escore	Expressão do cerbB-2	Padrão de coloração
0	negativa	Não houve coloração, ou a coloração de membrana ocorreu em menos de 10% das células tumorais.
1+	negativa	Coloração fraca quase imperceptível em mais de 10% das células tumorais. Parte da membrana é corada.
2+	positiva	Coloração fraca à moderada completa da membrana observada em 10% ou mais das células tumorais.
3+	positiva	Coloração forte e completa da membrana observada em mais de 10% das células tumorais

Adaptado de Dutra AP, et al. C-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors (90).

Os escores considerados negativos para HER-2/neu e EGFR foram 0+ e 1+. Os escores 2 + e 3+ foram considerados positivos.

Considerações éticas

Uma vez que a análise das peças cirúrgicas faz parte da rotina do Serviço de Patologia e que a coleta de dados de prontuário se deu de maneira retrospectiva, considerou-se desnecessária a utilização de termo de consentimento por parte dos pacientes.

Análise estatística

Para análise estatística, a determinação de médias, desvio-padrão, percentagens e distribuição de frequência ou teste do qui-quadrado foi realizada onde apropriado, sendo considerado significativo $p < 0.05$ para um intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

Características da amostra

Foram analisados trinta e sete casos de pacientes com adenocarcinoma de estômago operados na Décima Enfermaria do Serviço de Cirurgia da Santa Casa de Porto Alegre, no período entre maio de 2001 e junho de 2003, segundo os critérios de elegibilidade referidos anteriormente. Vinte pacientes (54%) eram do gênero masculino e dezessete (46%) do gênero feminino (Figura 3), com idades variando entre 33 e 85 anos, média (dp) 59,4 (13) e mediana de 62. Com relação à localização, 23 tumores (62%) estavam situados entre antro e piloro, 5 (13,5%) estavam entre corpo e fundo, 4 tumores (10,8%) entre fundo e cárdia, 2 (5,4%) na cárdia, 2 (5,4%) entre antro e corpo e 1 (2,7%) tratava-se de *linitis* plástica, atingindo todo o órgão (Figura 4).

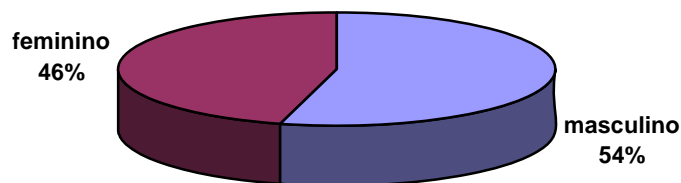


Figura 3 - Distribuição por gênero

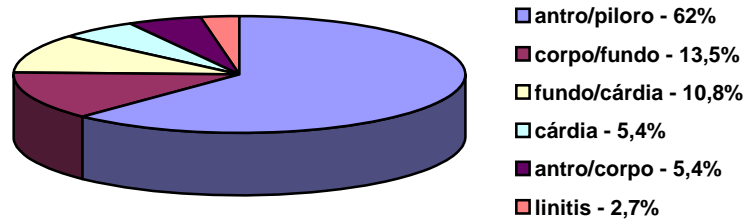


Figura 4 - Localização do tumor

Com relação aos procedimentos cirúrgicos, foram realizadas 24 gastrectomias parciais (65%), 11 gastrectomias totais (30%) e 2 esôfago-gastrectomias (5%) (Figura 5).

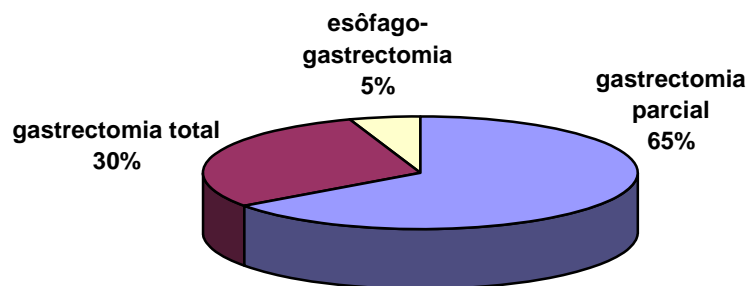


Figura 5 - Tipos de ressecção

Em relação à classificação de Lauren, 13 tumores foram considerados de tipo intestinal (35,1%) (Figura 6), 22 tumores foram considerados de tipo difuso (59,5%) (Figura 7) e 2 foram considerados mistos (5,4%). A distribuição está representada na Figura 8.

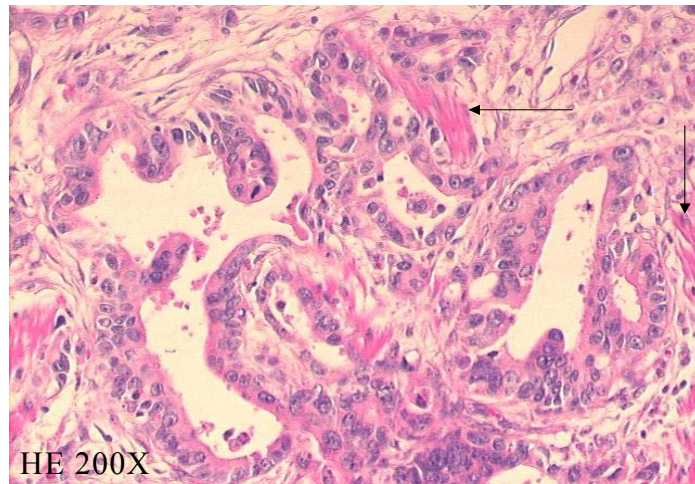


Figura 6 Adenocarcinoma de tipo intestinal da classificação de Lauren infiltrando músculo liso (setas).

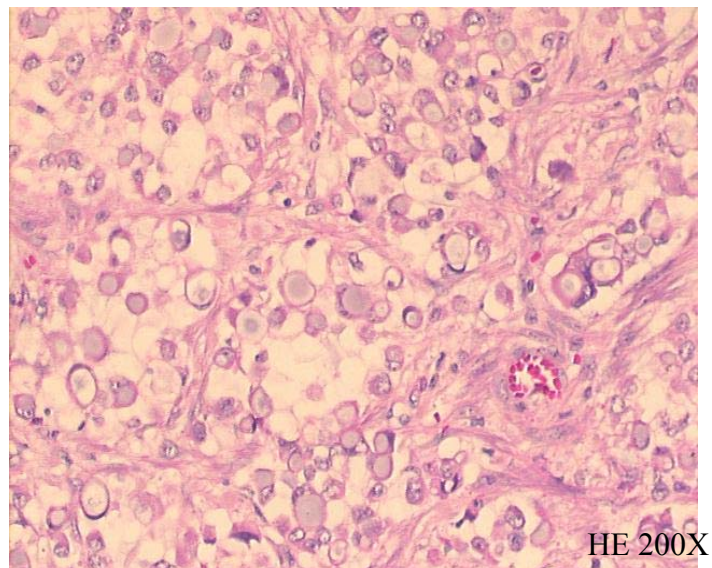


Figura 7 Adenocarcinoma de tipo difuso da classificação de Lauren, com células em anel de sinete infiltrando parede gástrica.

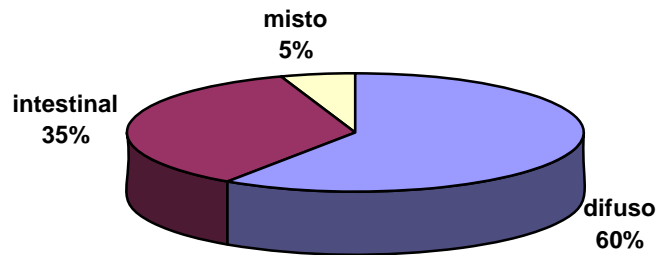


Figura 8 - Tipo histológico

Quanto ao grau de diferenciação celular, 3 tumores foram classificados como moderadamente diferenciados (8,1%) e 34 tumores foram classificados como pouco diferenciados (91,9%). Nenhum foi considerado bem diferenciado (Figura 9).

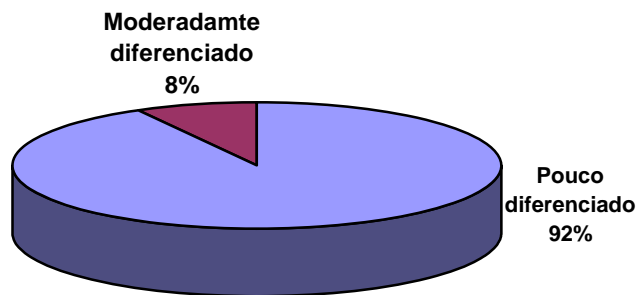


Figura 9 - Grau de diferenciação celular

Em relação à classificação de Borrmann, a distribuição foi a seguinte: 8 ou 22% tipo I (vegetante/polipóide); 18 ou 48% tipo II (ulcerado); 10 ou 27% tipo III (úlcero-infiltrativo); 1 ou 3% tipo IV (infiltrativo) (Figura 10). Levando-se em conta a classificação japonesa para os tipos macroscópicos, teríamos 1 caso de tipo 0 (superficial).

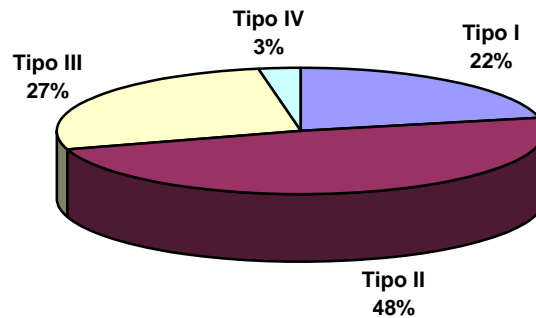


Figura 10 - Classificação de Borrmann

O número médio de linfonodos isolados das peças foi de 15,8, variando de 0 a 43 linfonodos. Já o número médio de linfonodos positivos isolados foi de 5, variando de 0 a 20 linfonodos positivos.

Quanto ao estadiamento dos tumores pelo sistema TNM, a distribuição foi a seguinte: 11 pacientes (29,7%) estavam no estágio IIIB, 10 pacientes (27%) estavam no estágio IIIA, 6 pacientes (16,2%) estavam no estágio IV, 5 pacientes (13,5%) estavam no estágio IA, 3 pacientes (8,2%) estavam no estágio II e 2 pacientes (5,4%) estavam no estágio IB (Figura 11).

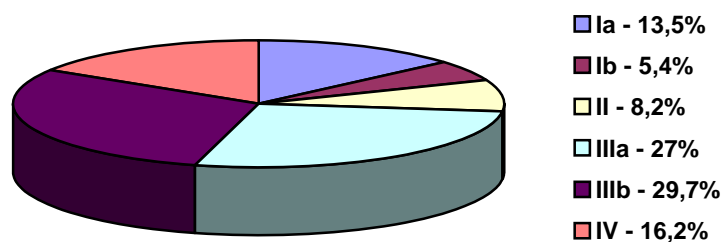


Figura 11 - Estadiamento

A reação imunohistoquímica produzida pelo anticorpo anti-EGFR foi considerada negativa em todos os 37 casos analisados. A reação imunohistoquímica produzida pelo anticorpo anti-cerbB-2 foi considerada positiva em 2 (5,4%) e negativa em 35 (94,6%) dos 37 casos analisados (Figura 12). Dentre os 35 casos considerados negativos, 4 (10,8%) apresentaram coloração citoplasmática isolada.

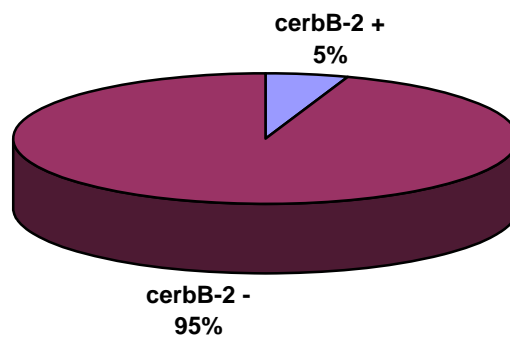


Figura 12 - Imunohistoquímica para CerbB-2

O caso positivo considerado 3+ era de tipo intestinal, moderadamente diferenciado. O caso positivo 2+ era de tipo difuso, pouco diferenciado. Dentre os casos com coloração citoplasmática, 2 eram de tipo intestinal pouco diferenciado, 1 era de tipo intestinal moderadamente diferenciado e 1 era de tipo difuso pouco diferenciado.

As figuras 13 e 14 mostram, respectivamente, o controle positivo para CerbB-2 e um dos casos classificados como positivos.

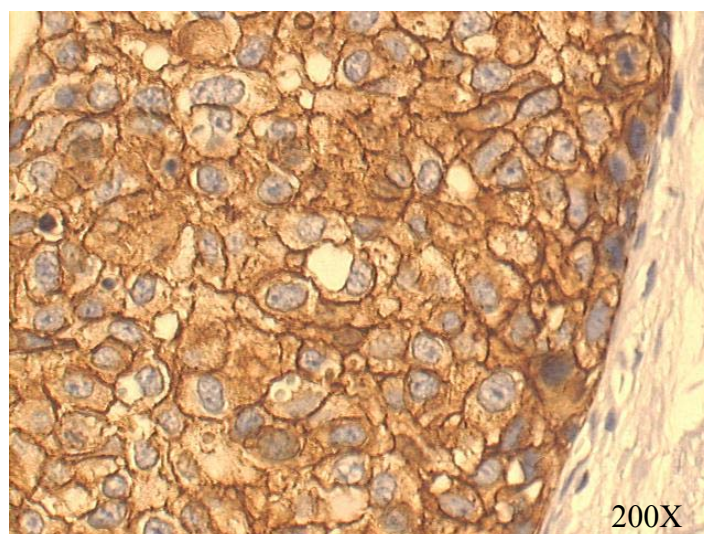


Figura 13 Controle positivo para CerbB-2

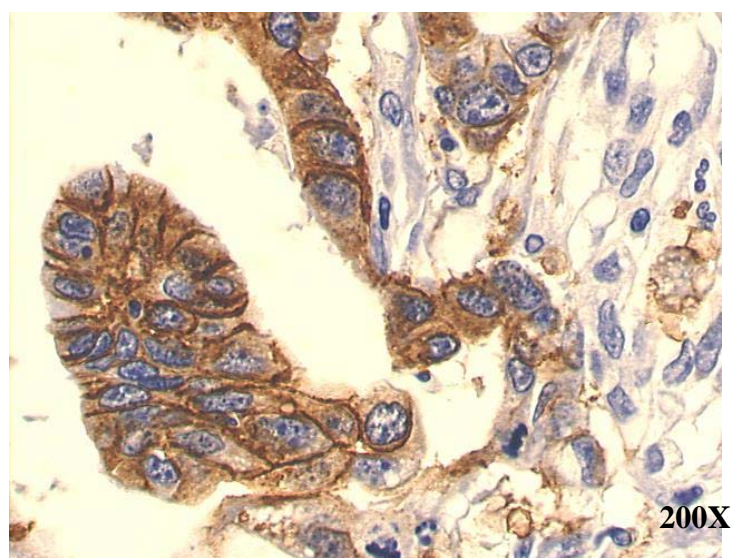


Figura 14 Caso positivo para CerbB-2

6. DISCUSSÃO

O adenocarcinoma gástrico, apesar de ter sofrido declínio considerável durante a segunda metade do século XX, continua sendo um importante problema de saúde pública mundial. Ainda é a segunda causa mais freqüente de morte por doença maligna no mundo. Aproximadamente 876.000 pessoas são diagnosticadas com a doença e cerca de 649.000 morrem dela por ano (91). No Brasil no ano de 2001 o INCA estimou 20.000 novos casos da doença, sendo 1520 no Estado do Rio Grande do Sul (6).

Na maioria dos países a doença é freqüentemente diagnosticada após ter invadido a camada muscular própria do órgão, estágio no qual a sobrevida média em cinco anos é menor que 20%. Este prognóstico desfavorável não tem melhorado de forma significativa nas últimas décadas, apesar do aperfeiçoamento da técnica cirúrgica, da quimioterapia e da radioterapia. Os casos curáveis, em sua grande maioria, são tumores diagnosticados precocemente e que, portanto, ainda não metastatizaram por via linfática ou hematogênica. A prevenção e o diagnóstico precoce parecem ser as maiores esperanças para o controle da doença (91).

Na tentativa de compreender os diversos passos do desenvolvimento dos tumores humanos e, quem sabe, prevenir o seu aparecimento, modelos de carcinogênese têm sido propostos para os diversos tumores. O mais estudado e aceito é o de Vogelstein e cols. (1988) para o câncer de cólon, sendo citado como um paradigma a ser seguido (92). Uma cadeia seqüencial de eventos moleculares tem sido procurada para os principais tumores. Apesar dos esforços consideráveis, o modelo de Vogelstein não parece servir tão bem para outros órgãos. Isto é especialmente verdadeiro para a carcinogênese gástrica, sendo que seu estudo não levou claramente à identificação de eventos moleculares passíveis de intervenções preventivas ou curativas (92).

Uma das principais dificuldades parece ser que a biologia do processo pré-canceroso gástrico envolve mais que anormalidades moleculares. Parece envolver interações tipo “agente-hospedeiro-ambiente”. O modelo biológico da carcinogênese gástrica, descrito em 1975 por Correa e cols., consiste de pelo menos 3 processos distintos: primeiro, há inflamação crônica ativa, principalmente em resposta ao *H. Pylori*; segundo, há perda de glândulas gástricas, ou atrofia, que pode resultar de um distúrbio do ciclo celular: uma perda de equilíbrio entre

apoptose e proliferação celular (Correa 1997); por fim, há uma perda progressiva de diferenciação, levando a genótipos celulares anormais, capazes de invadir suas vizinhanças na mucosa gástrica (93).

Desde a descrição do modelo em 1975, diversas publicações de diferentes países têm corroborado o mesmo, especialmente em populações de alto risco, nas quais o adenocarcinoma tipo intestinal é predominante. Forte embasamento foi dado por uma recente publicação na qual uma coorte de 4655 indivíduos sadios foi monitorada por 7,7 anos para níveis de pepsinogênio sanguíneo (marcador de atrofia) e de anticorpos anti-*H. Pylori*. Neste estudo o risco para câncer aumentou com os marcadores pré-cancerosos de maneira escalonada, com o estágio mais avançado (baixos níveis de pepsinogênio e perda de infecção ativa pelo *H. Pylori*) tendo um risco relativo de 61,85 (IC 5,6--682,5) (94).

Em relação às alterações moleculares, alterações em oncogenes, genes supressores tumorais, reguladores de ciclo celular, moléculas de adesão celular, genes reparadores de DNA, instabilidade genética e ativação da telomerase estão implicados no processo de carcinogênese gástrica humana. Contudo, combinações particulares destas alterações diferem entre os dois tipos histológicos de câncer gástrico, indicando diferentes vias carcinogênicas para o tipo intestinal e para o tipo difuso. Ainda, a interação câncer-estroma, que tem importante papel na morfogênese, na progressão do câncer e metastatização é também bastante diferente entre os dois tipos de câncer gástrico (95).

Diversos proto-oncogenes, incluindo *c-met*, *k-sam* e *HER-2/neu*, estão freqüentemente ativados nos carcinomas gástricos. *HER-2/neu* está amplificado em cerca de 20% dos cânceres intestinais mas não nos difusos (96). Superexpressão do *HER-2/neu* associada à amplificação gênica está bem correlacionada com pior prognóstico e metástases hepáticas (97). Amplificação do *EGFR* é encontrada em cerca de 3% dos cânceres gástricos (96).

Alterações da estrutura e função de genes supressores tumorais, incluindo *p53*, *p73*, *APC*, *DCC* e *FHIT* estão envolvidas na carcinogênese gástrica. Entre estas, a inativação do *p53* por perda de heterozigossidade e mutação é o evento genético mais freqüente no câncer gástrico, ocorrendo em mais de 60% dos tumores de estômago, independente do tipo histológico (98,99).

Anormalidades genéticas e epigenéticas dos reguladores do ciclo celular estão envolvidas no desenvolvimento e progressão do câncer gástrico através de proliferação descontrolada. A maioria dos cânceres gástricos está associada à superexpressão de reguladores positivos e redução ou perda de reguladores negativos, ambos tornando células normais em malignas. Entre os reguladores positivos está a ciclina E, e entre os negativos estão o p21 e o p27 (95).

Moléculas de adesão celular podem também funcionar como supressores tumorais. Mutações do gene da E-caderina têm sido relatadas em 50% dos carcinomas gástricos difusos (100). Mutações do mesmo gene também são encontradas no componente difuso de carcinomas gástricos mistos (101). Além das alterações genéticas da E-caderina, cross-talk entre β -catenina e receptores tirosina-kinase incluindo c-met, EGFR e CerbB-2 ocorrem em células gástricas tumorais *in vivo* e *in vitro*, levando à disseminação difusa de células gástricas tumorais (102).

Amplificações de c-met e k-sam no câncer gástrico claramente contribuem para a progressão e invasão peritoneal do carcinoma gástrico difuso (95).

Dois tipos de instabilidade genética envolvidos na carcinogênese gástrica são a instabilidade de microssatélites (MSI) e a instabilidade cromossômica. Instabilidade de microssatélites tem sido relatada em 15-39% dos cânceres gástricos esporádicos ao redor do mundo (103). Instabilidade de microssatélites no locus D1S191 (cromossomo 1q) é encontrada em 46% dos cânceres gástricos intestinais, mas não nos difusos. Alteração de MSI no mesmo locus é também encontrada em 26% das metaplasias intestinais adjacentes aos cânceres gástricos primários, sugerindo que a instabilidade de microssatélite descrita possa ser um evento precoce na carcinogênese gástrica (95).

Instabilidade cromossômica levando à aneuploidia do DNA é também um fator propício à carcinogênese gástrica. A extensão do telômero é necessária para manter a estabilidade cromossômica. Evidências recentes indicam que na ausência de telomerase, encurtamento do telômero pode produzir disfunção telomérica que causa tanto quebras do DNA como perdas ou ganhos cromossômicos. Portanto, disfunção telomérica pode iniciar instabilidade cromossômica na carcinogênese. Por outro lado, a telomerase pode inibir a instabilidade cromossômica (104). A maioria dos carcinomas de tipo intestinal têm telômeros

bastante encurtados, associados a altos níveis da atividade da telomerase e expressão significativa da h-TERT (*human telomerase reverse transcriptase*) (105). Por outro lado, mais de 50% das metaplasias intestinais, bem como dos adenomas, expressam baixos níveis de atividade da telomerase (106). Os tumores gástricos telomerase-negativos são só do tipo difuso e não do tipo intestinal, embora a incidência seja de apenas 13-15% (105).

Células tumorais gástricas expressam um amplo espectro de fatores de crescimento, citocinas, ou ambos, incluindo $TGF\alpha$, $TGF\beta 1$, EGF, amfiregulina (AR), cripto, heparin-binding (HB)-EGF, PDGF (*platelet derived growth factor*), IGF II (*insulin-like growth factor II*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), IL 1 α (*interleucina 1 α*), IL-6, IL-8 e OPN. Estes fatores de crescimento e citocinas funcionam como moduladores autócrinos, parácrinos e juxtácrinos do crescimento de células tumorais, e organizam a complexa interação entre células tumorais e estromais, que têm um papel chave na morfogênese, invasão, neovascularização e metastatização. A expressão dos fatores de crescimento e citocinas varia entre os dois tipos histológicos de câncer gástrico (95).

Devido a esta imensa variabilidade genética do câncer gástrico, recentemente tem se utilizado a técnica de microarranjos de DNA para o seu estudo. A técnica possibilita a análise de milhares de genes concomitantemente, fornecendo um “retrato” genético dos tumores, permitindo o reconhecimento de novos subtipos de câncer que, embora morfologicamente semelhantes, diferem quanto ao comportamento clínico, às vias moleculares de desenvolvimento e à predisposição genética própria. Através desta técnica, Xin Chen e cols estudaram cerca de 30300 genes em uma amostra de 90 tumores de estômago. Verificaram acentuada heterogeneidade genética entre amostras de câncer e de tecido não-tumoral e entre as diversas amostras de câncer gástrico entre si. Identificaram diversos grupamentos de genes com maior frequência entre os tumores que em tecido não-neoplásico, estando entre estes o grupamento do HER-2/neu (em cerca de 10% dos tumores). Relataram expressão elevada do EGFR em cerca de 15% dos cânceres da amostra (66). Em nosso meio, o elevado custo dos estudos de microarranjos torna sua realização difícil atualmente.

Ghaderi e cols publicaram em 2002 estudo semelhante ao presente, em pacientes iranianos. Estudaram retrospectivamente 146 casos de câncer gástrico quanto à expressão imunohistoquímica de EGFR e HER-2/neu. Encontraram expressão aumentada de EGFR em

32,2% (48) dos pacientes e de HER-2/neu em 16,4% (24) dos pacientes. Relataram também correlação positiva entre expressão de EGFR e tamanho do tumor, invasão local e envolvimento linfonodal. Já o HER-2/neu mostrou correlação negativa com o estágio tumoral, isto é, quanto mais diferenciado o tumor maior a probabilidade de expressão aumentada do HER-2/neu. Contudo, ao contrário da maioria dos estudos destes oncogenes, consideraram positivas as colorações tanto de citoplasma quanto de membrana, o que pode ter contribuído para uma positividade relativamente alta do estudo (70).

Já García e cols. estudaram os mesmos oncogenes por ensaio imunoenzimático em tumores gástricos ressecáveis. Encontraram grande variabilidade dos níveis de EGFR e HER-2/neu entre os tumores. Verificaram associação positiva entre níveis elevados de EGFR e HER-2/neu e menor tempo de sobrevida (107).

A variabilidade entre os resultados de diversos estudos em relação ao HER-2/neu e EGFR no câncer gástrico pode se explicar tanto por diferenças genéticas verdadeiras entre os diversos tumores quanto pelo método utilizado para a detecção dos oncogenes. Os resultados mais fidedignos são os de detecção direta do DNA dos oncogenes (RT-PCR, FISH, quantitativo PCR), contudo, seu custo elevado acaba inviabilizando sua utilização em larga escala, especialmente em países como o Brasil. O método mais utilizado para a detecção de *herbB-2* e EGFR é a imunohistoquímica. O Colégio Americano de Patologistas publicou um estudo em 2002 comparando a avaliação entre diversos laboratórios americanos para hibridização *in situ* (FISH) e imunohistoquímica de HER-2/neu em câncer de mama. Os resultados da hibridização *in situ* tiveram uma grande concordância entre os diferentes laboratórios. Já os resultados da imunohistoquímica mostraram substancial variabilidade entre laboratórios avaliando os mesmos casos (108). Contudo a imunohistoquímica é em geral mais fácil, menos cara e pode ser realizada na maioria dos laboratórios de patologia, já sendo empregada rotineiramente por diversos laboratórios para a avaliação de diversos oncogenes e genes supressores tumorais. Os autores acreditam que a análise imunohistoquímica realizada por um patologista experiente no método e revisada por outro patologista igualmente experimentado é um método confiável na avaliação da expressão destes oncogenes.

Apesar de diversos estudos de expressão imunohistoquímica de HER-2/neu publicarem seus resultados utilizando o escore do herceptest (tabela 4), uma comparação entre

os mesmos parece difícil pois os estudos, em sua grande maioria, não especificam detalhadamente como determinaram os escores. Em relação ao EGFR, a dificuldade para comparar resultados de imunohistoquímica entre os diferentes estudos ainda é maior, pois não há nenhum escore uniformemente utilizado para avaliação. A maioria dos estudos de EGFR também não refere como classificou as lâminas em positivas ou negativas.

No presente estudo os autores encontraram muita dificuldade no preparo das lâminas para avaliação imunohistoquímica da expressão do EGFR. Depois de diversas tentativas de preparo da lâmina de controle positivo pela técnica usual do Laboratório de Patologia, foi recebida a orientação pelo representante do anti-EGFR que deveria ser utilizada proteinase K para a recuperação antigênica no preparo da lâmina. Em relação aos resultados negativos da expressão em todos os casos, os autores acreditam refletir mais a grande dificuldade de se estudar o EGFR por imunohistoquímica do que a real ausência de sua expressão em todos os casos estudados. O próprio autor Carlos Arteaga, uma das maiores autoridades no assunto, reconhece que a falta de um método consistente para a avaliação dos níveis de EGFR causou uma disparidade entre os relatos do EGFR como um fator prognóstico, atestando a dificuldade em se estudar o oncogene (109).

Com relação a outros tumores, vários estudos têm demonstrado bons resultados com inibidores do EGFR e do HER-2/Neu. Num ensaio clínico randomizado com 469 pacientes com câncer de mama metastático HER-2/Neu+ a taxa média de resposta foi de 50% no grupo selecionado para a associação de Trastuzumab com quimioterápico contra 35% no grupo selecionado para não receber Trastuzumab, e a sobrevida média foi de 25 contra 20 meses a favor da associação (110). Trastuzumab também mostrou boa resposta de células pancreáticas HER-2+ em estudo experimental com ratos (85). Estudos com inibidores EGFR em tumores de pulmão não de pequenas células, epidermóides de cabeça e pescoço e colorretais têm demonstrado resultados promissores (89).

A baixa positividade para a expressão do HER-2/neu em nossa amostra encontra possíveis explicações na literatura. Uchino e cols (111) relataram 2% de positividade para HER-2/neu em tumores pouco diferenciados e 14% entre bem e moderadamente diferenciados, por imunohistoquímica. Já Tsujimoto e cols (112) não encontraram amplificação gênica do oncogene, por Western Blot, em tumores indiferenciados. Em nosso estudo, 92% dos tumores

eram pouco diferenciados e 8% eram moderadamente diferenciados. Ainda, autores como Becker (13) e Kameda (96), referem que não há amplificação gênica de HER-2/Neu em tumores de tipo difuso, e que há 20% de amplificação em tumores do tipo intestinal em suas séries. Em nossa amostra 13 tumores foram considerados de tipo intestinal, 2 foram do tipo misto e 22 de tipo difuso.

Os autores não encontraram expressão do EGFR e constataram baixa prevalência de expressão do HER-2/Neu. Contudo, o péssimo prognóstico do câncer gástrico com as terapias atualmente disponíveis e as boas e promissoras respostas de certos tumores aos anticorpos anti-EGFR e anti-HER-2/Neu devem estimular a busca destes oncogenes em outras amostras populacionais de pacientes com câncer gástrico, bem como a realização de ensaios clínicos com drogas anti-família Her em pacientes identificados como EGFR e/ou HER-2/Neu positivos.

7. PERSPECTIVAS

O surgimento e desenvolvimento de diversas drogas anti-família Her parecem trazer uma boa perspectiva para tratamento adjuvante nas mais diversas neoplasias humanas. Especialmente tumores de tão mau prognóstico, como o adenocarcinoma gástrico, poderiam se beneficiar de tais drogas. A melhora dos métodos de avaliação do EGFR bem como a uniformização dos escores de resultados serão essenciais à utilização clínica futura deste oncogene, seja como marcador tumoral, ou como alvo de tratamentos adjuvantes. A boa resposta de tumores como de mama à Herceptin (Trastuzumab®) sugere uma boa perspectiva ao teste desta e de outras drogas anti-Her nos indivíduos positivos para os oncogenes em outros tumores, como o de estômago. Ensaios clínicos com pacientes com tumores gástricos positivos para HER-2/Neu deverão ser realizados no futuro, para avaliar a resposta destes indivíduos às drogas anti-Her.

8. CONCLUSÕES

Determinou-se uma prevalência de 5,4% de expressão imunohistoquímica de HER-2/Neu na mucosa gástrica de pacientes com adenocarcinoma de estômago. Acredita-se que a baixa prevalência se deva à grande proporção de tumores pouco diferenciados em nossa amostra.

Não encontrou-se expressão de EGFR em nossa amostra. Acredita-se que a ausência de expressão em todos os casos se deva a dificuldades técnicas de se trabalhar com o oncogene e não a sua real ausência na amostra.

A baixa prevalência do HER-2/Neu não permitiu relacionar sua expressão com os tipos histológicos, com o grau de diferenciação celular, com o estadiamento da doença ou com o prognóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kelsen D. *Introduction: Gastric cancer*. Semin Oncol 1996; 3 : 279-80.
2. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. *Estimates of the worldwide frequency of eighteen major cancers*. Int J Cancer 1993;54:594-606.
3. Fuchs CS, Mayer RJ. *Gastric carcinoma*. N Eng J Med 1995;333 (1):32-41.
4. Fingerhut A, Hay JM, Millat B, Lacaine F, Fagniez PL. *General and gastrointestinal tract surgery in France*. Arch Surg 1998;133:568-74.
5. Miller BA, Ries LAG, Hankey BF, Kosary CL, Hurray A, Devesa SS, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review: 1973-1990*, National Cancer Institute. NIH Pub. No. 93-2789, 1993.
6. INCA- Ministério da Saúde do Brasil. <http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa>.
7. Hanai A, Tsukuma H, Hiyama T, Fujimoto, I. *Survival of patients with stomach cancer. Results from population-based cancer registries*. In T. Sugimura and M. Sasako (Eds). Gastric Cancer. New York: Oxford Univ Press. 1997. Pp. 22-30.
8. Rosen N, DeVitta VTjr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Fifth ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997; 32, *Cancer of the gastrointestinal tract*. P. 971-80.
9. Editorial. Surgical Oncology 2000;9:1-3.
10. Jacks T, Weinberg RA. *Cell cycle control and its watchman*. Nature (Jun) 1996;381:p 643.
11. Wasan HS, Bodmer WF. *Inherited susceptibility to cancer*. In: *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. Eds. LM Franks and NM Teich, Oxford University Press; p60-91, 1997.
12. Soussi T. *The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer*. Molecular Medicine Today 1996;Jan: 32-37.
13. Becker KF, Keller G, Hoefler H. *The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer*. Surgical Oncology 2000; 9:5-11.
14. Rhyu M-G, Park W-S, Melzer S. *Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma*. Oncogenetics 1994;9 ;29-32.
15. Uchino S, Tsuda H, Nogushi M, Yokota J, Terada M, Saito T, Kobayashi M, Sugimura T, Hirohashi S. *Frequent loss of heterozygosity at the DCC locus in gastric cancer*. Cancer research 1992;52 (11):3099-102.
16. Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. *Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer*. Biochemical and Biophysical Research Communications 1992;189 (1):227-32.
17. Tahara E. *Molecular mechanism of stomach carcinogenesis*. Journal of Cancer Research Clinical and Oncology 1993;119:265-72.
18. Klein RF, Vollmers HP, Müller-Hermelink HK. *Different expression of bcl-2 in diffuse and intestinal type stomach carcinomas*. Oncology Reports 1994;69:943-6.

19. Vollmers HP, Dammrich J, Hensel F, Ribbert H, Meyer-Bahlburg A, Ufken-Gaul T, von Korff M, Muller-Hermelink HK. *Differential expression of apoptosis receptors on diffuse and intestinal type stomach carcinoma*. Cancer 1997;79 (3):433-40.
20. Tahara E. *Molecular prognostic factors of gastric cancer*. Proceedings of the 2nd International Gastric Cancer Congress 1997 held in Munich, Germany; Monduzzi Editore S.p.A.-Bologna, Italy, 1997. p. 371-7.
21. Potti A, Willardson J, Forseen C, Kishor Ganti A, Koch M, Hebert B, et al. *Predictive role of HER-2/neu overexpression and clinical features at initial presentation in patients with extensive stage small cell lung carcinoma*. Lung Cancer 2002; 36:257-261.
22. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene. Science 1987; 235:177-82.
23. Tsugawa K, Fushida S, Yonemura Y. Amplification of the cerbB-2 gene in gastric carcinoma: correlation with survival. Oncology 1993; 50 (6): 418-25.
24. Tsugawa K, Yonemura Y, Hirono Y, Fushida S, Kaji M, Miwa K, et al. Amplification of the c-met, cerbB-2 and EGFR genes in human gastric cancers: correlation to clinical features. Oncology 1998; 55 (5):475-81.
25. Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. *Epidermal growth factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer*. Lancet 1987; 1:1398-402.
26. Baselga J. Why the Epidermal Growth Factor Receptor ? The rationale for cancer therapy. The oncologist 2002;7(suppl 4):2-8.
27. Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardied scoring system. Cancer (Phila) 2001; 92:1331-46.
28. Hall CC, Herring JA, Hall TJ. *Molecular oncology and the surgeon*. The American Surgeon,1995, 61: 156-60.
29. Krontiris T.G, *Oncogenes*. N Eng J Med, 1995; 333: 303-306.
30. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, et al. C-erb-B-2 expression and S phase activity predict response to adjuvant therapy in women with node-positive breast cancer. N Eng J Med 1994; 330(18):1260-66.
31. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, et al. *The ErbB-2/HER-2/neu oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors*. Proct Natl Acad of Sci USA, 1999; 96: 4995-5000.
32. Ruddon RW. *Genetic alterations in cancer cells*. In: Cancer biology. 3rd ed, New York Oxford Univ. Press,1995.
33. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. Oncogene 2000; 19:5548-57.

34. Prigent SA, Lemoine NR. *The type I (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands*. Prog Growth Res 1992; 4:1-24.
35. Wang Y, Minoshima S, Shimizu N. *Precise mapping of the EGF receptor gene on the human chromosome 7p12 using an improved FISH technique*. Jpn J Human Genet 1993; 38: 399-406.
36. Farndon Jr, Nicholson S, Sainsbury Jrc, Harris AL. *Epidermal Growth factor receptors and breast cancer*. Bristol Med Chir J 1989; 104:51-52.
37. Koretz K, Schlag P, Moller P. *Expression of epidermal growth factor in normal colorectal mucosa, adenoma and carcinoma*. Virchows Arch A Pathol Anat Hist, 1990;416:343-349.
38. Rubin SC, Finstad CL, Wong GY, Almadrones L, Plante M, Lloyd KO. *Prognostic significance of HER-2/neu expression in advanced epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis*. Am J Obstet Gynecol 1993; 168:162-169.
39. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, et al. *A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity*. Proct Natl Acad Sci 1994; 91: 7727-7731.
40. Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. *C-erb-B-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor associated protease systems*. J Clin Oncol 2000; 18:2201-2209.
41. Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. N Eng J M 1995; 333 (1):32-41.
42. Theuer CP, de Virgilio C, Keese G, French S, Arnell T, Tolmos J, et al. Gastric adenocarcinoma in patients of 40 years of age or younger. Am J Surg 1996; 172:473-77.
43. Kitamura K, Yamaguchi T, Yamamoto K, Ichikawa D, Taniguchi H, Hagiwara A, et al. Clinicopathological analysis of gastric cancer in young adults. Hepato-Gastroenterology 1996; 43:1273-80.
44. Rizzieri JL, Nhuch F, Toneto MG, Moreira LF, et al. Estudo retrospectivo do índice de mortalidade por câncer de estômago em Porto Alegre e no Rio Grande do Sul. Proc XV JACAD 1997; 15:120-4.
45. Zenilman ME. Surgery in the elderly. Curr Probl Surg 1998; 35:99-178.
46. Bresciani CJC, Gama Rodrigues JJ, Strassmann V, et al. Tratamento adjuvante do câncer gástrico avançado após ressecção radical: Resultados da associação 5-fluorouracil-adriamicina-mitomomicina c- 5 anos de seguimento. Rev Col Brasil Cirurgiões 1997; 24:219-25.
47. Craanen ME, Dekker W, Blok P, Ferwerda J, Tytgat GN. Time trends in gastric carcinoma: Changing patterns of type and location. Am J Gastroenterol 1992; 87:572-79.
48. Maehara Y, Moriguchi S, Yoshida M, Takahashi I, Korenaga D, Sugimachi K. Splenectomy does not correlate with length of survival in patients undergoing curative total gastrectomy for gastric carcinoma. Cancer 1991; 67:3006-9.
49. Bringaze WL, Chappuis CW, Cohn I, Correa P. Early gastric cancer- 21 year experience. Ann surg 1986; 204:103-7.

50. Karpeh MS, Leon L, Klimstra D, Brennan MF. Lymph node staging in gastric cancer: is location more important than number? *Ann Surg* 2000; 232(3):362-71.
51. Key T, Forman D, Pike MC. Epidemiology of cancer. In: Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Eds. LM Franks and NM Teich, Oxford University Press 1997; p 43.
52. Tomatis L, et al. Cancer: causes, occurrence and control. Lyon, IARC Scientific Publications n° 100, 1999.
53. Forman D, et al. An international association between H pylori infection and gastric cancer. *Lancet* 1993; 341:1359-1362.
54. Fennerty MMB. Gastric intestinal metaplasia on routine endoscopic biopsy. *Gastroenterology* 2003; 125 (2): 586-90.
55. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, et al. Clinical relevance of the cagA, vacA and iceA status of H pylori. *Gastroenterology* 1998; 115:58-66.
56. Yamamoto T, Nishida T, Miyajima N, Kawai S, Ooi T, Toyoshima K. The ErbB gene of avian erythroblastosis virus is a member of the src gene family. *Cell* 1983; 35:71-78.
57. Child SJ, Miller MK, Gebaliet AP. Translational control by an upstream open reading frame in the Her2/neu transcript. *J Biol Chem* 1999; 274:24335-24341.
58. Fukushima S, Matsubara K, Yoshida M, Sasaki M, Suzuki T, Semba K, et al. Localization of a novel v-erbB related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cell line. *Mol Cell Biol* 1986; 6:955-958.
59. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, et al. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986; 319:230-4.
60. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1986; 230:1132-38.
61. Hudeo LG, Ertl AP, Gill GN. Structure and inducible regulation of the human c-erbB-2/neu promoter. *J Biol Chem* 1990; 265:4389-93
62. Segatto O, King CR, Pierce JH, Di Fiore PP, Aaronson SA. Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the c-erbB-2 gene. *Mol Cell Biol* 1988; 8:5570-74.
63. Buchler P, Reber HA, Buchler MC, Roth MA, Buchler MW, Friess H, et al. Therapy for pancreatic cancer with a recombinant humanized anti-Her2 antibody (Herceptin). *J Gastrointest Surg* 2001; 5:139-146.
64. Kapitanovic S, Radosevic S, Kapitanovic M, Andelinovic S, Ferencic Z, Tavassoli M, et al. The expression of p185 (her2/neu) correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1997; 112:1103-13.
65. Dursun A, Poyraz A, Suer O, Sezer C, Akyol G. Expression of Bcl-2 and c-erbB2 in colorectal neoplasia. *Pathol Oncol Res* 2001; 7 (1):24-27.

66. Chen X, Leung SY, Yuen ST, Chu KM, Ji J, Li R, et al. Variation in gene expression patterns in human gastric cancer. *Mol Biol of the Cell* 2003; 14:3208-15.
67. Lee EY, Cibull ML, Strodel WE, Haley JV. Expression of HER-2/neu oncoprotein and epidermal growth factor receptor and prognosis in gastric carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 1994;118(3):235-9.
68. Oshima CT, Lanzoni VP, Iriya K, Forones NM. C-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma: correlation with clinical stage and prognosis. *Int J Biol Markers* 2001;16(4):250-4.
69. Takehana T, Kunitomo K, Kono K, Kitahara F, Iizuka H, Matsumoto Y, 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 20;98(6):833-7.
70. Ghaderi A, Vasei M, Maleck-Hosseini SA, Gharesi-Fard B, Khodami M, Doroudchi M, et al. The expression of cerbB-1 and cerbB-2 in Iranian patients with gastric carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2002; 8(4):252-6.
71. Malik SN, Siu LL, Rowinsky EK, deGraffenried L, Hammond LA, Rizzo J, et al. Pharmacodynamic evaluation of the EGFR inhibitor OSI-774 in human epidermis of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9 (7):2478-86.
72. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31:637-44.
73. Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 2001; 19:325-405.
74. Guy PM, Platko JV, Cantley LC. Insect cell expressed p180 erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8123-6.
75. Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX. Binding specificities and affinities of egf domain for ErbB receptors. *FEBS Lett* 1999; 447:227-31.
76. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:127-37.
77. Sako Y, Minoguchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signaling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2:168-72.
78. Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogene signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997; 410:83-86.
79. Chen WS, Lazar CS, Poenie M, Tsien RY, Gill GN, Rosenfeld MG. Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor. *Nature* 1987; 328:820-23.
80. Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 1995; 376:599-602.
81. Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidences for differential signaling by homo-and-heterodimers. *Mol Cell Biol* 1999; 19:6845-57.

82. Chan TO, Rittenhouse SE, Tsihchilis PN. Akt/Pkb and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:965-1014.
83. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91:231-41.
84. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282:1318-21.
85. Huang ZQ, Buchsbaum DJ, Raisch KP, Bonner JA, Bland KI, Vickers SM. Differential responses by pancreatic carcinoma cell lines to prolonged exposure to Eritux (IMC-C225) anti-EGFR antibody. *J of Surg Res* 2003; 111:274-83.
86. Masaki T, Hatanaka Y, Nishioka M, Tokuda M, Shiratori Y, Reginfo W, et al. Activation of epidermal growth factor receptor kinase in gastric carcinoma: a preliminary study. *Am J of Gastroenterology* 2000; 95 (8); letters 2135-6.
87. Yasui W, Tahara E, Tahara H, Fujimoto J, Naka K, Nakayama J, et al. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and precancerous lesions of the stomach. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90:589-95.
88. Takehana T, Kunitomo K, Suzuki S, Kono K, Fujii H, Matsumoto Y, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in gastric carcinomas. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2003;1(6):438-45.
89. Arteaga CL, Targeting Her1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. *Semin Oncol* 2003; 3(7):3-14.
90. Dutra AP, Granja NV, Schmitt FC, Cassali GD. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(11):1673-81.
91. Correa P. Is gastric cancer preventable? *Gut* 2004; 53:1217-19.
92. Correa P. The biological model of gastric carcinogenesis. IARC Scientific Publications 2004; 157:301-10.
93. Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, et al. Gastric dysplasia: the Padova international classification. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:167-76.
94. Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, Mugitani K, Iwane M, Nakamura H, et al. Progression of chronic atrophic gastritis associated with H pylori infection increases risk of gastric cancer. *Int J Cancer* 2004; 109:138-43.
95. Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. IARC Scientific Publications 2004; 157:327-49.
96. Kameda T, Yasui W, Yoshida K, Tsujino T, Nakayama H, Ito M, et al. Expression of ErbB2 in human gastric carcinomas: relationship between p185 ErbB2 expression and the gene amplification. *Cancer Res* 1990; 50:8002-9.
97. Yonemura Y, Ninomiya I, Ohoyama S, Kimura H, Yamaguchi A, Fushida S, et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma: immunoreactivity for c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short term prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1991; 67:2914-18.

98. Sano T, Tsujino T, Yoshida K, Nakayama H, Haruma K, Ito H, et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q,5q e 17p in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51:2926-31.
99. Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitadai Y, Nishimura K, Todo H, Ayhan A, et al. p53 Point mutations in primary human gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 119:67-70.
100. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54:3845-52.
101. Machado JC, Soares P, Carneiro F, Rocha A, Beck S, Blin N, et al. E-cadherin gene mutations provide a genetic basis for the phenotypic divergence of mixed gastric carcinomas. *Lab Invest* 1999; 79:459-65.
102. Shibata T, Ochiai A, Kanai Y, Akimoto S, Gotoh M, Yasui N, et al. Dominant negative inhibition of the association between beta-catenin and cerbB-2 by terminally deleted beta-catenin supresses the invasion and metastasis of cancer cells. *Oncogene* 1996; 13:883-9.
103. Yokozaki H, Semba S, Fujimoto JY, Tahara E. Microsatellite instabilities in gastric cancer patients with multiple primary cancers. *Int J Oncol* 1999; 14:151-55.
104. Hackett JA, Feldser DM, Greider CW. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* 2001; 106:275-86.
105. Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Yasui W, Shay JW, Ide T, et al. Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1245-51.
106. Yasui W, Hata J, Yokozaki H, Nakatani H, Ochiai A, Ito H, Tahara E. Interaction between epidermal growth factor and its receptor in progression of human gastric carcinoma. *Int J Cancer*. 1988 Feb 15;41(2):211-7.
107. Garcia I, Vizoso F, Martin A, Sanz L, Abdel-Lah O, Raigoso P, et al. Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and Her-2 receptor in resectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2003; 10(3):234-41.
108. CAP Laboratory Improvement Programs. Clinical laboratory assays for Her-2/neu amplification and overexpression. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126:803-8.
109. Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *The Oncologist* 2002; 7(4):31-39.
110. Leyland-Jones B. Trastuzumab: Hopes and realities. *The lancet oncology* 2002; 3:137-44.
111. Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, Kinoshita T, Sasako M, Saito T, et al. Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Its correlation with long-term survival of patients. *Cancer* 1993; 72(11):3179-84.
112. Tsujimoto H, Sugihara H, Hagiwara A, Hattori T. Amplification of growth factor receptor genes and DNA ploidy pattern in the progression of gastric cancer. *Virchows Arch* 1997; 431(6):383-9.

ANEXO I

Protocolo para revisão de prontuário

Registro:

Nome:

Data nasc:

Idade (na cirurgia):

Sexo (1) Masculino

(2) Feminino

Localização do tumor:

() cárdia

() fundo

() corpo

() antro

Cirurgia - Data ___/___/_____

Tipo de cirurgia:

() esôfago-gastrectomia

() gastrectomia total

() gastrectomia parcial

Anátomo-patológico nº ____

Laudos:

TNM:

Tempo de seguimento

Tempo livre de doença:

Recidiva:

() local / locorregional (onde e data):

() à distância (onde e data):

Nova cirurgia

() sim

() não

Qual? _____

Condições na última consulta:

() BEG

() REG

() MEG

Óbito - data: ___/___/_____

Causa:

ANEXO II

ANÁLISE DAS LÂMINAS:

Diagnóstico de Adenocarcinoma (HE):

Classificação de Lauren (HE):

intestinal difuso

Grau de diferenciação tumoral (HE):

bem dif. mod. dif. pouco dif.

Estadiamento TNM:

I II III IV

Expressão de HER-2/neu (imunohist.)

+ -

Expressão de EGFR (imunohist.)

+ -