

FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GASTROENTEROLOGIA E CIÊNCIAS APLICADAS A
GASTROENTEROLOGIA
MESTRADO E DOUTORADO

EXPRESSÃO DE HER-2/neu e p53 EM
ADENOCARCINOMA DE ESÔFAGO E
CÁRDIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mestrando: ERNESTO BECKER SANDER

ORIENTADORA: PROF. DRA MARIA ISABEL ALBANO
EDELWEISS

Porto Alegre, Dezembro de 2001

IDENTIFICAÇÃO DO TRABALHO

4.00.00.00-1 CIÊNCIAS DA SAÚDE

4.01.00.00-6 MEDICINA

4.01.01.11-8 GASTROENTEROLOGIA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GASTROENTEROLOGIA

LINHA DE PESQUISA: DOENÇAS MALIGNAS DO SISTEMA

DIGESTIVO

FICHA CATALOGRÁFICA

Sander, Ernesto Becker Sander

Expressão de HER-2/neu e p53 em adenocarcinoma de esôfago e estômago. / Ernesto Becker Sander; orient. Maria Isabel Albano Edelweiss. – Porto Alegre: UFRGS, 2001

96 f. il.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Gastroenterologia e Ciências aplicadas a Gastroenterologia.

1- Adenocarcinoma de esôfago e cárdia. 2- Neoplasias malignas do esôfago e cárdia. 3- Fatores prognósticos: marcadores moleculares. 4- Imunohistoquímica: HER-2/neu e p53. I- Edelweiss, Maria Isabel Albano II Título.

CDD: xxxxxxxx

CDU: xxxxxxxx

Dedico este trabalho ao meu pai Sinay e a minha mãe Maria Aparecida

AGRADECIMENTOS:

A professora Maria Isabel Edelweiss pelo estímulo e orientação recebidos.

Ao Programa de Pós Graduação em Gastroenterologia e Ciências Aplicadas a Gastroenterologia, na pessoa do Prof. Dr Sérgio Barros, por ter confiado em mim e incentivado durante todo o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por ter aprovado o projeto desta dissertação e apoiado financeiramente esta pesquisa.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do HCPA pela realização das lâminas indispensáveis para a realização deste trabalho. Um agradecimento especial a técnica Flávia Giusti pela atenção e elaboração das lâminas das técnicas de imunohistoquímica.

Aos patologistas do Serviço de Patologia do HCPA que realizaram a interpretação diagnóstica dos casos do presente estudo e em especial a Dra. Luíse Meurer pelo auxílio na versão final.

Ao Professor Dr. Cleber Dario Pinto Kruehl por disponibilizar os casos do Serviço de Cirurgia Geral e do Grupo de Cirurgia do Esôfago, Estômago e Intestino delgado do HCPA que foram analisados neste estudo. Agradeço a todos os membros cirurgiões e clínicos de sua equipe pelo apoio e incentivo.

Ao Professor Dr. Carlos Renato Mello , professor titular de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria por ter participado na avaliação das lâminas de imunohistoquímica.

LEGENDAS DAS TABELAS:

TABELA 1: Estimativas para o ano de 2001 das taxas brutas de incidência e mortalidade por 100.000 homens e do número de casos novos e óbitos por câncer, segundo localização primária (Brasil).

TABELA 2: Estimativas para o ano de 2001 das taxas brutas de incidência e mortalidade por 100.000 mulheres e do número de casos novos e óbitos por câncer, segundo localização primária (Brasil).

TABELA 3: Diagnóstico anatomopatológico.

TABELA 4: Características da População de pacientes com adenocarcinoma de esôfago e cárdia submetidos a ressecção cirúrgica no HCPA Resultados de imunohistoquímica nos tumores de esôfago e JEG.

TABELA 5: Descrição do sítio primário dos casos estudados conforme informações obtidas nos prontuários dos pacientes

TABELA 6: Diagnósticos anatomopatológicos nos 22 casos de Adenocarcinoma (Adeno) de esôfago e cárdia estudados no Serviço de Patologia do HCPA

TABELA 7: Frequência do estadiamento tumoral pelo sistema TNM, de acordo com a sua positividade para p53 e HER-2/neu.

TABELA 8: Frequência de expressão para p53 e HER-2/neu nos casos de adenocarcinoma de esôfago e cárdia, relativamente à presença ou ausência de metástases . Siglas usadas referidas no texto.

TABELA 9: Frequência de expressão de p53 e HER-2/neu com relação ao local primário da lesão, conforme dados do prontuário do paciente.

TABELA 10: Frequência dos graus de diferenciação histológica nos adenocarcinomas de esôfago e cárdia estudados nesta amostra de acordo com a expressão de p53 e Her2/neu.

TABELA 11: Frequência de expressão de p53 e HER-2/neu nos adenocarcinomas de esôfago e cárdia . Relação entre observador 1 e 2

LEGENDAS DAS FIGURAS:

Figura 1: Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2001, na população brasileira.

Figura 2: Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 homens estimadas para o ano 2001, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do esôfago) .

Figura 3: Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 mulheres estimadas para o ano 2001, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do esôfago) .

Figura 4: Progressão de eventos moleculares no adenocarcinoma esofágico originado em epitélio de Barrett. As alterações estão indicadas nos estágios nos quais elas são inicialmente observadas. (Figura copiada na íntegra do site [www. EJB.org/content/vol3/full/1/f6.jpg](http://www.EJB.org/content/vol3/full/1/f6.jpg)).

Figura 5: Escores de P53: esquemas dos escores utilizados:

Figura 5A: p53 Escore 0

Figura 5B: p53 Escore 1

Figura 5C: p53 Escore 2

Figura 5D: p53 Escore 3

Figura 5E: p53 Escore 4

Figura 5 F: p53 Escore 5

Figura 6: Escores de imunohistoquímica para HER-2/neu

Figura 6 A: HER-2/neu Escore 0

Figura 6 B: HER-2/neu Escore 1

Figura 6C: HER-2/neu Escore 2

Figura 6 D: HER-2/neu Escore 3

Figura 7:Correlação entre a expressão de p53 e HER-2/neu (observador 1)

Figura 8: Correlação entre a expressão de p53 e HER-2/neu (observador 2)

Figura 9:Comparação entre os escores do observador 1 e 2 para p53

Figura 10: Comparação entre os escores do observador 1 e 2 para HER-2/neu

LEGENDAS DOS ANEXOS:

ANEXO 1: Estadiamento Dos Tumores - Classificação Dos Tumores Malignos Do Esôfago (TNM)- Fonte Inca- 2001

ANEXO 2: Protocolo para pesquisa de prontuários do SAMIS do HCPA e para identificação das avaliações histológicas e imunohistoquímicas.

ANEXO 3- Escores de imunohistoquímica dos casos individuais observador 1 e 2:

ANEXO 4- Diagnósticos anatomopatológicos revisados e avaliados quanto ao estadiamento , local da lesão, grau histológico, e expressão de p53 e Her-2/neu.

LISTA DE ABREVIATURAS E GLOSSÁRIO:

AA: Aminoácidos

Amplificações: Aumento do número de cópias do gene

Anti-Her2-neu: Anticorpo anti-HER-2/neu

AP2: Fator de transcrição

APC: Gene da adenopolipose familiar do cólon

ATM: Ataxia-teleangiectasia

Apoptose: Morte celular programada

Autokinase: Atividade de autofosforilação

Autócrina: Secreção com finalidade de auto-estimulação

Bcl-2: Gene com função de inibição da apoptose celular

CDK: Proteína-quinases dependentes de ciclinas/ciclin-dependent kinases

cDNA: Ácido desoxiribonucleico complementar

Centrossomos: Região central do cromossomo

Chk: Quinase do ponto de restrição

Clonagem: Separação de uma seqüência conhecida ou a ser descoberta

CMF: Ciclofosfamida, metotrexate, 5-fluorouracil

Critério de Kozak: Critérios que identificam a seqüência de DNA de Kozak

DNA: Ácido desoxiribonucleico

Displasia: Alteração da morfologia e função celular

E1A: Gene expresso em fases precoces da infecção por adenovirus

E1B: Gene expresso em fases precoces da infecção por adenovirus

E2F: Fator de transcrição

Enzimas de restrição: Enzimas que cortam o DNA em pontos específicos

Fatores de Transcrição: Proteínas que regulam expressão gênica

FDA: Food and Drug Administration

Formas truncadas: Proteínas com estrutura incompleta

Gene Transfectado: Gene inserido na célula por métodos físicos ou químicos

HER-2/neu: Oncogene da família do fator de crescimento epitelial

- Herceptin:** Anticorpo monoclonal anti-HER-2/neu
- Imunofluorescência:** Técnica para detecção de proteínas ou ácido nucléico que utiliza um anticorpo conjugado a fluoresceína
- IHQ:** Imunohistoquímica- Técnica para detecção de antígenos ou proteínas em tecidos parafinados
- Interleucina-2:** Citocina produzida por linfócitos Imunohistoquímica
- JEG:** Junção esôfago - gástrica
- LTR:** Sequência no RNA viral com atividade de promotor
- MCF-7:** Linhagem celular de carcinoma de mama
- MKN-7:** Linhagem celular de carcinoma de estômago
- Metaplasia:** Especialização celular
- Microsatélites:** Repetição de seqüências de bases ao longo do genoma
- Missense:** Mutação que altera a seqüência de aminoácidos de uma proteína
- Parácrina:** Secreção com estimulação de células vizinhas
- P-16:** Gene regulador do ciclo celular
- P53:** Gene supressor de tumores
- PCR:** Reação de polimerase em cadeia/polimerase chain reaction
- Perda de Heterozigosidade:** Alteração da seqüência de DNA em um ou em ambos alelos
- Pontos de restrição:** Ponto de controle do ciclo celular
- Probes:** Sequência de DNA complementar
- Promotor:** Sequência de DNA responsável pela regulação do gene
- PUC119:** Plasmídeo utilizado para sub-clonagem de DNA
- Radioimunoensaio:** Técnica para detecção de proteína em meio líquido
- Reações de polimerase em cadeia:** Técnica para amplificação de DNA ou RNA
- Rb:** Gene do retinoblastoma
- RNA:** Ácido ribonucléico
- SAMIS:** Serviço de Arquivo Médico do HCPA
- Seqüências codificadoras de mensagem:** Sequências de DNA exônicas

Seqüências complementares: Seqüências de DNA que complementam uma seqüência conhecida

Southernblot: Técnica para detecção de DNA por transferência do gel para uma membrana

SV40: Seqüência viral que induz transcrição gênica

SWOG: South West Oncology Group

Transcritos: Seqüência de RNA que traduz mensagem do DNA

Translação: Formação de proteína no ribossoma

TQ: Tirosina quinase

Ubiquitinação: Ligação da proteína ao sistema ubiquitina

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Westernblot: Detecção de proteína por separação em gel

V-RESUMO:

A incidência de adenocarcinoma de esôfago e cárdia tem aumentado nas últimas décadas por razões ainda não conhecidas. São doenças da civilização ocidental. A incidência de adenocarcinoma de esôfago e carcinoma de cárdia ultrapassou a de carcinoma epidermóide de esôfago. O desenvolvimento da biologia molecular e descoberta de oncogenes e genes supressores de tumores permitiu novos achados e melhor entendimento das características moleculares dos carcinomas de esôfago e cárdia. Novos genes envolvidos em ciclo celular, apoptose e reparo de DNA são agora alvo importante de estudos da patogênese destes tumores. HER-2/neu é um oncogene expresso in diversas neoplasias e relacionado à pior prognóstico. P53 é igualmente importante estando mutado em 50%-70% das neoplasias sólidas com implicações clínicas para muitos tumores. Este trabalho determina a frequência de p53 e HER-2/neu através de imunohistoquímica utilizando anticorpos policlonais e monoclonais DAKO anti-HER-2/neu e p53 respectivamente. Foram selecionados 22 casos de adenocarcinoma de esôfago e carcinoma de cárdia do departamento de cirurgia. HER-2/neu foi positivo em 47.7% dos casos, média entre dois observadores. P53 foi positivo em 36.6% dos casos. A correlação entre os escores de HER-2/neu e p53 foi estabelecida usando o coeficiente de correlação de Spearman que mostrou um resultado negativo -0.27 para o primeiro observador que não foi significativo. Para o segundo observador, a correlação foi a mesma -0.27 e não significativo, mostrando que o aumento na expressão de HER-2/neu não está relacionada com aumento de expressão de p53. Nós concluímos que a expressão de HER-2/neu neste grupo de neoplasias, necessita de investigações futuras e que mesmo estando alterado com muitos outros oncogenes em outros trabalhos, p53 não está correlacionado com aumento de expressão de HER-2/neu nesta série de casos.

<u>SUMÁRIO:</u>	<u>Página</u>
Identificação do trabalho.....	II
Ficha catalográfica.....	III
Dedicatória.....	IV
Agradecimentos.....	V
Legendas das tabelas	VI
Legendas das figuras.....	VII
Legendas dos Anexos.....	VIII
Lista de abreviaturas e glossário.....	IX
Resumo.....	XII
Sumário.....	XIII
1-Introdução.....	1
2-Revisão bibliográfica.....	16
3-Objetivos.....	41
4-Justificativa do estudo.....	42
5-Material e métodos.....	43
6-Resultados.....	51
7-Discussão.....	61
8-Conclusões.....	68
9-Abstract.....	69
10- Referências.....	70
11-ANEXO I.....	83
12- ANEXO II.....	89
13- ANEXO III.....	90
14- ANEXO IV.....	91

INTRODUÇÃO:

Os oncogenes, também conhecidos como proteínas relacionadas com a expressão dos mecanismos de proliferação, crescimento e morte celular, revolucionaram o estudo do câncer, possibilitando o entendimento em nível molecular dos mecanismos de transformação dos tecidos normais para tecidos neoplásicos. Nas últimas duas décadas, os oncogenes foram sendo estudados a medida que descobertos, visando o estabelecimento de sua relação com o fenótipo maligno das células (Kastan MP, 2000).

HER-2/neu, é um oncogene clonado primeiramente de células de neuroblastomas de ratos e capaz de causar transformação celular (Yamamoto T et al, 1986). Este oncogene foi melhor estudado até o momento em células de carcinoma de mama sendo inclusive alvo de estratégias terapêuticas para este tumor (Menard S et al; 2001). Porém o aumento de expressão de HER-2/neu, como inicialmente foi descrito, não é uma particularidade do epitélio mamário estando alterado em outras neoplasias (Scholl S et al. 2001). Estudos preliminares mostraram que HER-2/neu está expresso em adenocarcinoma de esôfago (Brien TP et al, 2000) e em adenocarcinomas do trato gastrointestinal, porém, bem menos estudado até o momento comparando-se a carcinoma de mama. Este estudo enfoca-se na investigação de adenocarcinomas de esôfago. Séries de estudos destes sítios de lesão mostraram aumento de expressão de HER-2/neu por imunohistoquímica e hibridização in situ (Tanaka S et al, 1997). As alterações de HER-2/neu, estão associadas a piora de prognóstico em carcinoma de estômago por exemplo (Allgayer H et al, 2000). Assim como em outros tumores, HER-2/neu, tem potencial importância para tratamento e determinação de prognóstico em tumores gastrointestinais.

O p53 é um dos genes mais importantes em câncer devido a sua função no controle de várias funções da biologia celular sendo que alterações de p53 se relacionam com modificações celulares de relevância clínica. Os estudos clínicos foram feitos em biópsias ou através da mensuração sérica de anticorpos anti-p53.

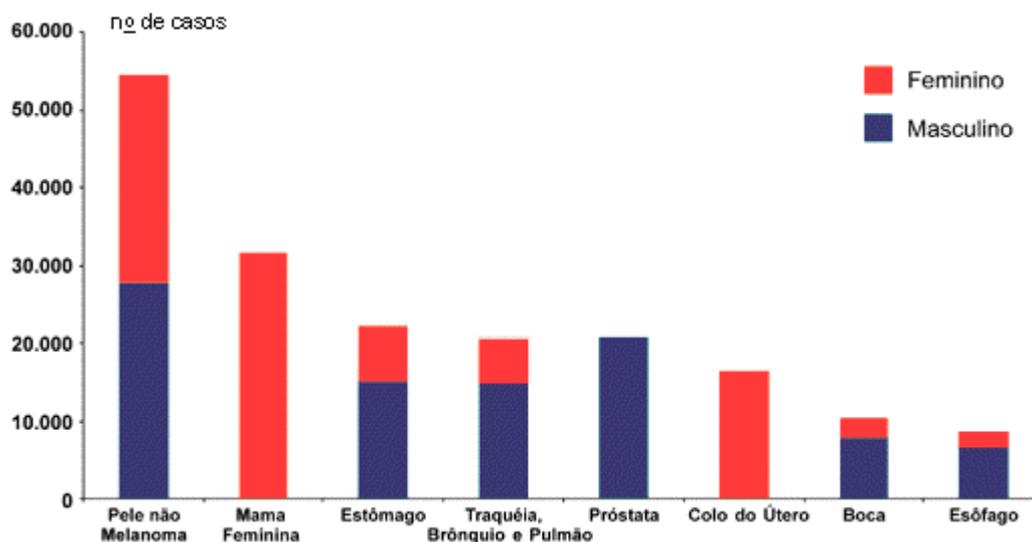
Neste estudo investigou-se a expressão de HER-2/neu em adenocarcinoma de esôfago e cárdia por técnicas imunohistoquímicas usando o método de estreptavidina-biotina sendo que as observações foram correlacionadas com alterações na expressão de p53, um gene supressor de tumores que encontra-se alterado na maioria das neoplasias malignas.

Alterações de p53, estão freqüentemente acompanhadas de outras alterações moleculares durante o processo de carcinogênese. O estudo destes dois marcadores permite melhor entendimento das alterações moleculares do epitélio esofágico que levam à formação do tumor.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

1.1 Carcinoma de esôfago:

As doenças malignas do esôfago são altamente letais, sendo o Rio Grande do Sul uma das áreas de mais alta incidência no Brasil (Projeto câncer no Brasil; SBOC 2000). No Brasil, carcinoma de esôfago é a sexta causa de câncer em homens sendo estimado que em 2001 ocorram 4,89 mortes /100.000 habitantes e a sétima causa de câncer em mulheres, estimando-se em cerca de 1,39 mortes/100.000 habitantes, segundo dados da Divisão Nacional de Epidemiologia do Ministério da Saúde (www.inca.org.br/epidemiologia , 2001). Como pode ser visto na figura 1 e nas tabelas 1 e 2.



Fonte: INCA-MS

Figura 1: Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2001, na população brasileira.

Tabela 1- Estimativas para o ano de 2001 das taxas brutas de incidência e mortalidade por 100.000 homens e do número de casos novos e óbitos por câncer, segundo localização primária (Brasil).

Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos		Estimativa dos Óbitos	
	Nº de Casos	Taxa Bruta	Nº de Óbitos	Taxa Bruta
Pele não Melanoma	27.710	33,21	485	0,54
Traquéia, Brônquios e Pulmão	14.900	17,88	10.700	12,83
Estômago	15.260	18,29	7.090	8,47
Próstata	20.820	24,94	7.320	8,75
Cólon e Reto	7.795	9,31	3.355	3,97
Esôfago	6.650	7,96	4.080	4,89
Leucemias	3.880	4,61	2.315	2,75
Boca	7.940	9,50	2.565	3,04
Pele Melanoma	1.425	1,66	585	0,66
Outras Localizações	44.070	52,83	24.835	29,77
Total	150.450	180,34	63.330	75,91

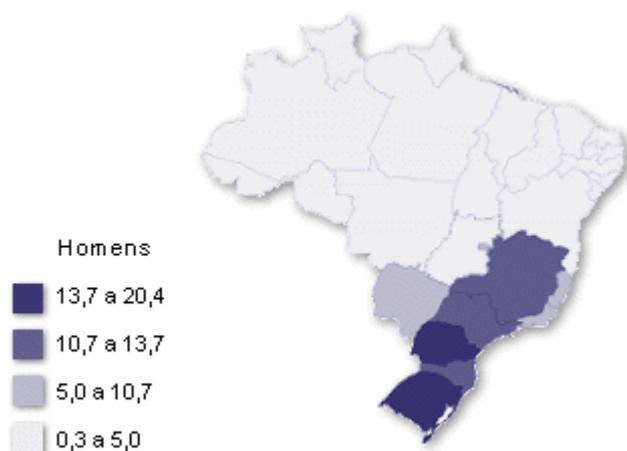
Fonte: INCA,MS 2001

Tabela 2- Estimativas para o ano de 2001 das taxas brutas de incidência e mortalidade por 100.000 mulheres e do número de casos novos e óbitos por câncer, segundo localização primária (Brasil).

Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos		Estimativa dos Óbitos	
	Nº de Casos	Taxa Bruta	Nº de Óbitos	Taxa Bruta
Pele não Melanoma	26.750	30,90	345	0,35
Mama Feminina	31.590	36,47	8.670	9,99
Traquéia, Brônquios e Pulmão	5.935	6,86	4.445	5,10
Estômago	7.070	8,14	3.675	4,22
Colo do Útero	16.270	18,86	3.725	4,31
Cólon e Reto	8.370	9,65	3.875	4,44
Esôfago	2.215	2,52	1.230	1,39
Leucemias	3.120	3,56	1.950	2,24
Boca	2.625	3,02	660	0,73
Pele Melanoma	1.505	1,70	465	0,50
Outras Localizações	49.430	57,40	25.180	29,24
Total	154.880	178,75	54.220	62,91

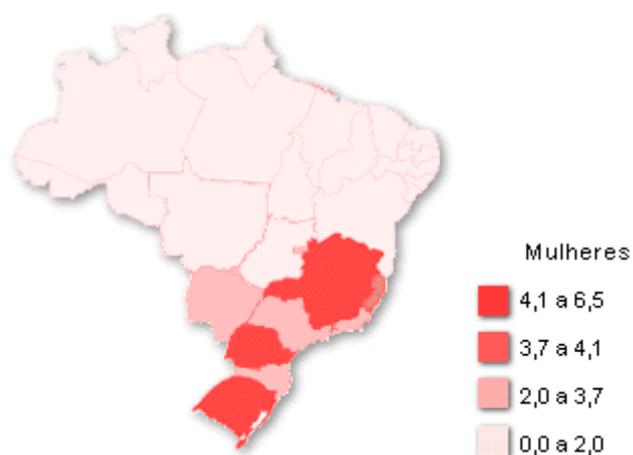
FONTE: INCA, MS 2001

Na região Sul as neoplasias de esôfago são igualmente bastante freqüentes como pode ser observado nas figuras 2 e 3.



Fonte : INCA-MS- 2001

Figura 2: Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 homens estimadas para o ano 2001, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do esôfago)



Fonte: INCA-MS- 2001

Figura 3: Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 mulheres estimadas para o ano 2001, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do esôfago)

Os fatores de risco associados a esta alta taxa de incidência de câncer de esôfago em nossa região é um dos principais temas de investigação do Programa de Pós-graduação em Gastroenterologia e Ciências Aplicadas a Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da UFRGS.

Os dois tipos histológicos mais comuns dos tumores malignos do esôfago são o carcinoma epidermóide e o adenocarcinoma (Roth JA, Putnam JB, et al, 1995).

A incidência de adenocarcinoma de esôfago está aumentando de uma maneira geral por motivos ainda não bem entendidos e parece ser uma doença do mundo ocidental que está sendo melhor diagnosticada nos últimos anos e associada a doença de refluxo gastroesofágico. Nos Estados Unidos e na Europa ocidental a incidência de adenocarcinoma de esôfago ultrapassou a de carcinoma epidermóide nos últimos anos (Landis SH et al, 1998). Muitos autores referem-se ao adenocarcinoma de esôfago como tendo causa desconhecida, porém estudos de caso controle em populações sugerem fortemente que o refluxo gastro-esofágico está associado a esta doença. Outra causa associada é metaplasia de Barrett que tem como uma das causas também a doença de refluxo (Hirota WK et al;1999 ;Spechler SJ, 1999).

Freqüentemente, as lesões do epitélio esofágico em pacientes portadores de adenocarcinoma de esôfago, contém áreas de metaplasia intestinal de Barrett e displasia, sendo que estas lesões, estão localizadas quase na totalidade dos casos no terço inferior do esôfago e cárdia.

O desenvolvimento da biologia molecular e descoberta dos genes que controlam crescimento, proliferação, diferenciação e morte celular, possibilitou que algumas características biológicas das lesões pré-malignas e malignas do esôfago fossem melhor entendidas. Uma perda de heterozigosidade para genes comprovadamente importantes em câncer como p53, gene da adenopolipose do cólon (APC), perda de expressão de p-16, aumento de bcl-2 já foram

demonstradas em carcinoma de esôfago e estão relacionadas com a progressão da lesão. Esses fatores oferecem uma possibilidade de novas estratégias terapêuticas nesse tipo de neoplasia (Thomas Jr. CR,1997).

Os tumores originários do esôfago são lesões que, mesmo localmente invasoras, metastatizam precocemente para locais mais distantes, característica que possivelmente contribui para a alta letalidade da doença, oferecendo taxa de sobrevida em cinco anos quase nula.

Os tratamentos disponíveis para tumores malignos do esôfago são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia como agentes únicos ou em combinações comumente conhecidas como multi-modalidades (Kelsen DP, Ilson DH, et al,1995). Porém , no presente momento, esses tratamentos são capazes de oferecer respostas parciais ou incompletas, sem chance de cura.

Em doença localmente invasora o tratamento convencional é a cirurgia. O uso de radioterapia pré- ou pós-operatória oferece melhor controle local comparado à cirurgia e continua sendo assunto de investigação.

Vários agentes citotóxicos tem atividade em câncer de esôfago como os análogos da platina, o 5-fluorouracil, e os taxanos e, cada vez mais, estão fazendo parte do tratamento de tumores do esôfago uma vez que aumentam a sensibilidade à radioterapia e atuam em micrometástases à distância.

Um ganho na sobrevida já foi relatado especialmente em pacientes com adenocarcinomas tratados com quimio e radioterapia pré-operatórios (Leichman L et al,1994). Ressaltamos a necessidade de melhores tratamentos locais e sistêmicos para esta doença.

Neste trabalho, estudou-se a expressão do oncogene HER-2/neu e do gene supressor de tumores p53 com o objetivo de correlacionar a alteração das duas proteínas neste tumor. Essa provável correlação permite um melhor entendimento da carcinogênese esofágica e talvez um novo alvo para abordagem terapêutica.

1.2- Patologia do Adenocarcinoma esofágico e junção esôfago-gástrica

Os adenocarcinomas primários de esôfago são incomuns. Em trabalhos publicados há mais de 30 anos somente 10% dos carcinomas de esôfago eram adenocarcinomas e apenas 1% eram lesões primárias. (Raphal HA, 1966). A maioria dos adenocarcinomas ocorria no esôfago distal . Estas eram consideradas lesões gástricas que invadiam o esôfago secundariamente. Este conceito mudou drasticamente a partir da década de 1970.

Atualmente parece bem claro que muitos adenocarcinomas do segmento inferior do esôfago são primários e originados no epitélio metaplásico de Barrett. Mesmo que este epitélio não esteja presente nos cortes microscópicos da neoplasia, esse pode ter sido destruído pela lesão invasora. Estes tumores constituem cerca de 30 a 50% dos tumores em alguns países ocidentais, incluindo os Estados Unidos (Johnston BJ & Reed PI, 1991 ; Blot WJ et al, 1991; Streitz JM Jr et al, 1991).

Quando os tumores são originados na porção superior ou mediana do esôfago, a neoplasia também pode estar associada a epitélio do tipo gástrico ou a glandular superficial. Ocasionalmente os adenocarcinomas do esôfago ocorrem na sua porção mediana (Jernstrom P&Brewer LA, 1970) e estão associados a restos congênitos de epitélio superficial ou epitélio gástrico heterotópico. De qualquer forma, quanto aos aspectos morfológicos e clínicos, o adenocarcinoma nas regiões proximais do esôfago não tem fatores notoriamente que o diferencie dos do esôfago inferior.

Os adenocarcinomas do esôfago se originam do epitélio colunar da mucosa e ocorrem freqüentemente na porção distal do esôfago, podendo invadir o cárdia adjacente ao estômago (Naef, AP. 1975). Raramente a metaplasia de Barrett pode ser tão extensa que origina um carcinoma no esôfago superior, além da possibilidade de estarem associados a história de refluxo e epitélio de Barrett extenso.

Apesar de suas diferentes possibilidades de origem, os adenocarcinomas de esôfago mostram muitos aspectos morfológicos comuns. A endoscopia, nas fases mais avançadas, usualmente as lesões são planas (raramente são polipóides),

medindo até 4,5 cm. A maioria está num estágio bastante avançado no momento do diagnóstico, mostrando extenso envolvimento intramural e da adventícia. Em muitos casos epitélio benigno de Barrett está presente na periferia do tumor, usualmente distal ao mesmo (Paraf F et al, 1995)

A grande maioria dos adenocarcinomas de esôfago apresentam-se com padrão tubular, do tipo moderadamente ou bem diferenciados (Grau histológico I ou II). Em uma bem detalhada descrição Paraf et al em 1995 entre 67 adenocarcinomas relatou que 40% eram bem diferenciados, 31% moderadamente diferenciados, 15% pouco diferenciados, 7% mucinosos e 6% do tipo com células em anel de sinete. O carcinoma era intramucoso em 13 %, submucoso em 18%; na muscular própria em 12%, na adventícia em 33% e envolvendo o tecido periesofágico em 24%.

Entre outros fatores prognósticos a serem informados no laudo anatomopatológico deve sempre constar a invasão neural e vascular. As metástases em linfonodos podem ocorrer entre a metade ou $\frac{3}{4}$ dos casos, mesmo se o tumor envolver somente a mucosa ou submucosa. O padrão de infiltração é igualmente dividido entre os tipos expansivo e infiltrativo. O padrão difuso infiltrativo pode ser com células em anel de sinete (Chejfec G, 1981)

Nos termos da classificação de Lauren para adenocarcinomas gástricos, aplicada ao esôfago a maioria é denominada do tipo intestinal, restando alguns para tipo difuso ou não classificado.

Outros tumores também podem ocorrer no epitélio de Barrett, incluindo carcinoma epidermóide, carcinoma adenoescamoso, adenocarcinóide e mucoepidermóide. A ocorrência destes tipos de tumores apoia o ponto de vista que o epitélio de Barrett pode se originar em células totipotenciais (Smith RRL, 1984). Este fato poderia explicar alguns casos em que coexiste adenocarcinoma de Barrett com carcinoma epidermóide identificado em separado, no epitélio escamoso do mesmo esôfago (Allan NK, 1986)

O sistema de estadiamento dos adenocarcinomas segue o mesmo do carcinoma epidermóide proposto pelo American Joint Commission on Cancer (AJCC), conhecido como sistema TNM que é baseado no status do tumor primário (T)

comprometimento linfonodal (N) e metástases a distância (M). O estadiamento do pelo sistema TNM para os tumores de esôfago pode ser visto na sua íntegra no Anexo 1.

Como em outras versões deste sistema de estadiamento, o tamanho do tumor primário e a formação de fístulas não são considerados tão importantes. As lesões mais agressivas são agrupadas juntamente com as intramucosas menos agressivas, como T1. Embora essas duas lesões sejam superficiais, e como tal estágio I da doença, a presença de linfonodos e/ou metástases a distância transforma o carcinoma para um estágio mais avançado.

Alguns investigadores usam N1 para descrever metástases para um até quatro linfonodos regionais e N2 para cinco ou mais linfonodos (Tang CT, 1998). Metástases a linfonodos distantes (fora da região que o carcinoma tem sua origem), como por exemplo, linfonodos abdominais em carcinomas do terço médio, são consideradas metástases à distância. No estadiamento existe ainda em uma avaliação em cTMN e pTMN, para o estadiamento clínico e patológico, respectivamente.

Entre 61 pacientes com adenocarcinoma relatados por Streitz et al em 1991, 6,7% estavam no estágio 0, 16,7% no estágio I, 28,3% no estágio II, 41,7% no estágio III e 6,7% no estágio IV. A sobrevida geral em cinco anos foi de 23,7%. Resultados correspondentes foram relatados por Lerut et al em 1994: estágio 0 e I 38,3%; estágio II, 20,6%, estágio III 22,2% e no estágio IV, 19%. Os estágios de adenocarcinoma são melhores no momento do diagnóstico quando os pacientes vem fazendo acompanhamento endoscópico. Num outro trabalho de Peters et al em 1994 os tumores que estão em estágio precoce em 12 de 13 pacientes acompanhados por endoscopia e em somente 10 de 35 pacientes que não fizeram acompanhamento endoscópico.

Estudos em citometria em carcinoma originado em epitélio de Barrett revelam que ocorre aneuploidia em 70 a 100% dos tumores (Rabinovitch PS, 1988; Reid BJ, 1991; Khan M, 1994; Nakamura T, 1994; Krishnadath KK, 1995). A análise do cariótipo tumoral mostra muitas alterações cromossômicas, tanto estruturais quando numéricas (Garewal HS, 1989; Rodriguez E, 1990; Hunter S, 1993; Rao,

PH, 1993). A perda do cromossomo Y é comumente observada (Garewall HS, 1989; Hunter S, 1993; Rao PH, 1993; Krishmadath, KK, 1995) tendo sido notada em 93% dos adenocarcinomas no estudo de Hunter em 1993.

O gene supressor tumoral p 53 é expresso em 50 a 100% dos carcinomas de Barrett (Younes M, 1993; Hardwick RH, 1994; Rice TW, 1994; Symmans PJ, 1994; Duhaylongsod FG, 1995; Schneider PM, 1996). Entre os casos estudados por Rice et al em 1994 a expressão de p53 mutante estavam presentes em 67% de adenocarcinomas intramurais e em 40% de casos submucosos. Uma perda de heterozigosidade ou perda de alelos no local 17p, onde o p 53 está localizado ocorreu entre 56 a 100% dos carcinomas (Ramel et al, 1992; Blount et al, 1994; Swift et al, 1995; Barrett et al, 1996). Uma perda do alelo do gene da adenopoliopose coli (APC) no local 5q é notada em cerca de 80% dos tumores (Barrett MT et al, 1996). Adicionalmente, perdas de alelos são vistas nos locais 9p (64%), 17q (56%), 13q (43%) e 1 p (41%) (Barrett MT, 1996; Swift A et al, 1995). A proteína H-*ras* está presente em 4 de 10 carcinomas e em um entre 10 epitélio de Barrett (Schneider PM, 1996), e HER-2/neu está expresso em 15 a 43% dos carcinomas (Al-Kasspoles M et al, 1993; Nakamura T et al, 1995; Duhaylongsod FG, 1995) A oncoproteína H-*ras* estava presente em 4 de 10 carcinomas e em um de 10 epitélio de Barrett (Schneider PM et al 1995), e HER-2/neu foi expresso em 15-43% dos carcinomas (Al-Kasspoles M et al, 1993; Nakamura T et al, 1994; Duhaylongsod FG et al, 1995) A presença de HER-2/neu estava relacionada a taxa de recorrência e a metástases distais do tumor (Nakamura T et al, 1994). A oncoproteína bcl-2, um inibidor da apoptose, nunca foi detectada em adenocarcinoma originado em epitélio de Barrett ou epitélio displásico (Goldblum JR & Rice TW, 1995).

Instabilidade de microsátélites foi detectada em um trabalho (Meltzer SJ et al, 1994), quando estava presente em 7% do epitélio de Barrett, 22% de adenocarcinomas e em 2% de carcinomas epidermóides. Em outro trabalho, ela estava presente em todos os 17 carcinomas testados (Gleeson CM et al, 1996). Nesta amostra somente um tumor mostrou alterações difusas, envolvendo 45,3%

dos locais testados, enquanto outros tumores mostram alterações em somente 0,8% a 8,1% dos locais testados.

Os receptores de fator de crescimento tumoral alfa (TGF-alfa) e o fator de crescimento epitelial estão expressos em carcinoma de Barrett (Jankowski J et al, 1992; Al- Kasspooles M, 1993; Brito MJ et al, 1995). A expressão de TGF alfa é positiva mais frequentemente em carcinomas tubulares do que nos tumores com células com anel de sinete (Brito MJ et al,1995) .

A maioria dos tumores na Junção esôfago-gástrica (JEG) são adenocarcinomas. Os carcinomas epidermóides e os carcinomas anaplásicos constituem cerca de 10% dos tumores nesta localização (Webb JN & Busuttil A, 1978). Casos ocasionais de adenoacantoma, carcinoma mucoepidermóide e carcinomas com componentes duplos também já foram relatados (Ming SC, 1973).

Não há barreira para a invasão carcinomatosa na JEG. Os carcinomas podem invadir rapidamente do esôfago para o estômago e vice-versa por contiguidade intramural ou através de vasos linfáticos. Já foi relatado que dois terços dos adenocarcinomas da JEG se originam no estômago e um terço do esôfago (Potet F et al, 1991; Sarbia M et al, 1993) , mas os aspectos histológicos desses carcinomas são essencialmente os mesmos (Kalish RJ et al, 1984; Wang HH et al, 1986). Algumas vezes torna-se difícil especificar a origem desses carcinomas baseados apenas em aspectos patológicos. A base para a diferenciação é circunstancial, considerando-se alguns fatores como a localização do centro do tumor e a presença de estruturas específicas dos respectivos órgãos. É claro que esta conceituação não pode ser aplicada a espécimes de biópsia. Em alguns casos, a presença de epitélio com metaplasia intestinal neste local fornece, com alguma certeza, a chave para a localização esofágica da lesão.

O receio desta dificuldade é diminuído algumas vezes pela observação de que adenocarcinomas do esôfago distal, JEG e cárdia são tão parecidos em alguns fatores patológicos e epidemiológicos que podem formar uma única entidade, distinta do carcinoma epidermóide do esôfago e do adenocarcinoma do estômago distal. (Thompson JJ et al, 1983; Kalish RJ et al, 1984; Morstyn G et al, 1985; Wang HH et al, 1986; Duhaylongsd FG & Wolfe WG, 1991). Os fatores incluem

uma idade mais jovem (sexta versus sétima década), predominância em homens, alta incidência em fumantes e alcoolistas, presença de sintomas complexos relacionados a hérnia hiatal e esofagite de refluxo e uma baixa incidência de carcinoma com células em anel de sinete. As evidências patológicas que suportam o conceito de uma única entidade é a alta prevalência de epitélio de Barrett em associação com adenocarcinomas na JEG em 67% dos casos com carcinomas de 6 cm ou menos em comprimento, sendo somente 17% dos casos com tumores maiores (Cameron AJ et al, 1995).

Associado ao aumento da incidência de adenocarcinoma no esôfago nos últimos anos há também um aumento na incidência de carcinoma no cárdia, levando a índices de até 50% de todos os tumores gástricos em alguns estudos (Blot WJ et al, 1991). O epitélio de Barrett esteve presente em 42% dos casos envolvendo carcinoma de cárdia e em somente 5% dos casos envolvendo a região sub-cárdica (Clark GW et al, 1994). O epitélio de Barrett nestes casos era do tipo curto (média de 2,7 cm versus 7,4 cm em casos de adenocarcinoma esofágico) e pode não ser reconhecido endoscópicamente.

As rotas de disseminação metastática do adenocarcinoma são similares às do carcinoma epidermóide do esôfago e, entre elas, está principalmente a localização do tumor primário mais do que na biologia intrínseca das células tumorais.

A disseminação intramural dos adenocarcinomas pode ser por continuidade ou via linfática. A disseminação por linfáticos pode resultar na formação de nódulos satélites lembrando tumores primários diferentes. A disseminação transmural do tumor ocorre em 60 a 88% dos adenocarcinomas (Tytgat GN & Hameeteman W, 1994). As metástases em linfonodos ocorrem em 51 a 74% dos adenocarcinomas originados em epitélio de Barrett (Tytgat GN & Hameeteman W, 1994; Paraf F et al, 1995). Nesta pesquisa de Tytgat os pacientes que fizeram acompanhamento endoscópico tem menos metástases em linfonodos do que os que não o fizeram – 26,5% em acompanhados contra 78% em não acompanhados.

A frequência de metástases em linfonodos é relacionada com a profundidade de invasão. Entre 43 casos relatados por Clark et al em 1994, linfonodos metastáticos

estavam presentes em 33% de casos localizados intramucosa, 67% em casos com invasão intramural e 89% em casos com invasão transmural.

Os linfonodos mais comumente invadidos localizavam-se na pequena curvatura do estômago em 42%, 35% eram peri-hiatais , 28% periesofágicos e 21% em tronco celiaco. Os linfonodos supraclaviculares foram envolvidos em 10% dos casos. 62% dos carcinomas da JEG tem metástases em linfonodos, a maioria intraabdominais. Os linfonodos torácicos estão envolvidos em 7% dos casos.

O prognóstico do adenocarcinoma de esôfago não é influenciado pela morfologia macroscópica ou pelo grau histológico do tumor.

Os achados patológicos que influenciam a evolução da doença são estágio, metástases em linfonodos e o número de linfonodos envolvidos por análise multivariada (Ming SC, 1993).

A expressão de genes supressores, oncogenes e fatores reguladores da biologia tumoral podem também afetar a sua evolução.

Uma baixa sobrevida, recorrência tumoral, profundidade da invasão e o risco de metástases em linfonodos no adenocarcinoma de esôfago estão relacionados com a aneuploidia das células tumorais (Schneeberger AL et al, 1990; Nakamura T et al, 1994).

Khan et al em 1994 analisaram a ploidia do DNA de células tumorais de 30 carcinomas de Barrett e observaram que 80% eram aneuplóides e 20% diplóides . A sobrevida média em 5 anos era de 20,4 meses para os tumores diplóides e 10,6 meses para os tumores aneuplóides.

A expressão de p53 é relacionada à recorrência tumoral e não com a sobrevida (Duhaylongsod FG et al, 1995). Outro relato, mostra que a sobrevida era maior para pacientes com p 53 positivo do que em pacientes com p 53 negativo- 28 versus 13,5 meses (Sauter ER et al, 1995).

A expressão de HER-2/neu tem sido relatada com a sobrevida em 5 anos- 60% para tumores positivos contra 10% para tumores negativos (Duhaylongsod FG, 1995).

1.3 Oncogenes e genes supressores de tumores:

Os genes importantes em câncer são atingidos por mecanismos bem conhecidos como mutações de ponto, lesões em porções cromossômicas, ampliações gênicas e interferências por proteínas virais (Krontiris TG,1995). Tais alterações levam a uma perda ou ganho de função da proteína codificada pela seqüência alterada influenciando no controle da proliferação celular, na diferenciação e na morte das células.

Tanto os oncogenes como genes supressores de tumores estão expressos nos tumores de esôfago (Carcinoma epidermóide e adenocarcinomas) (Stemmermann G et al, 1994) . Uma perda de heterozigosidade dos genes supressores tumorais como o p53, pRb, APC, MCC (mutado nos Canceres de cólon) ou deletado nos canceres de cólon (DCC) tem sido encontrados isoladamente ou em combinação com carcinoma epidermóide de esôfago (Huang, Y et al, 1993)

Nas últimas décadas, centenas de proteínas já foram identificadas como causadoras de tumores assim como proteínas capazes de suprimir o fenótipo maligno em experimentos que testam a função de um gene transfectado ou deletado.

Existem diferentes métodos desenvolvidos e aplicados ao estudo genético de neoplasias malignas em peças cirúrgicas. As alterações moleculares podem ser estudadas em nível de DNA, RNA e proteínas sendo que as informações são utilizadas para diagnóstico, prognóstico e tratamento (Watson JD, Gilman, et al;1992).

Na patogênese dos adenocarcinomas do esôfago, notoriamente nos originados em epitélio metaplásico de Barrett uma seqüência de eventos moleculares ocorre desde o início das agressões até o desenvolvimento do Adenocarcinoma, como pode ser visto na figura 4.

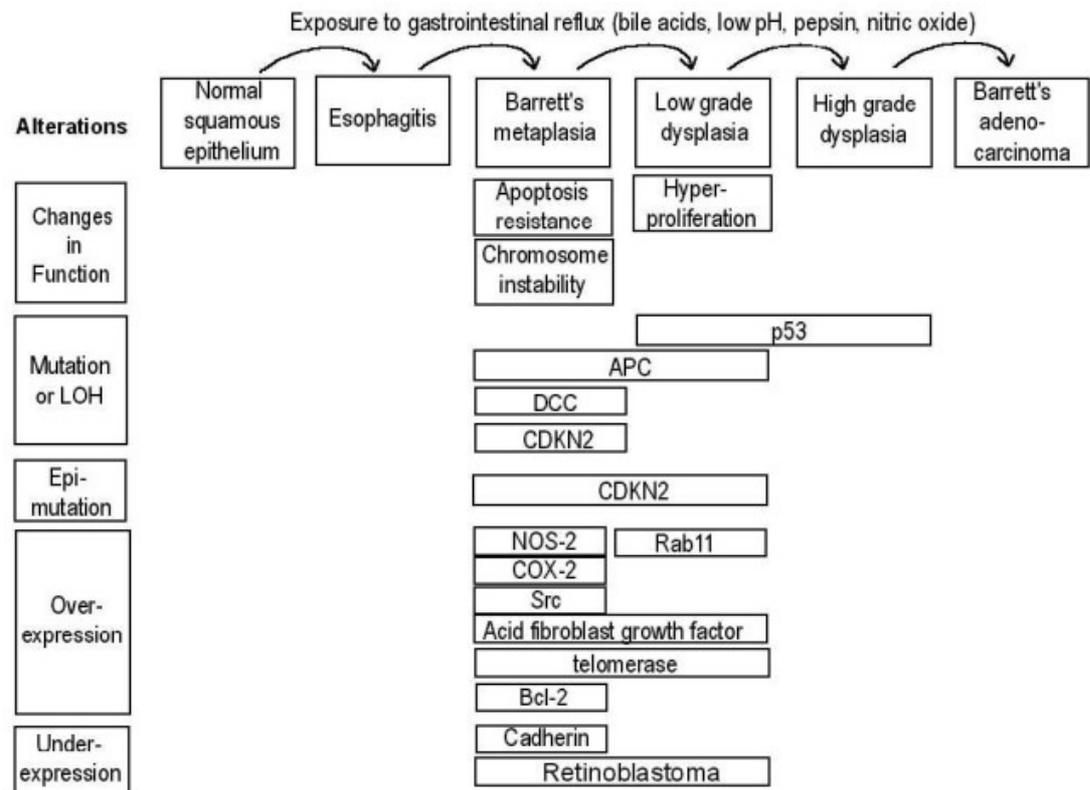


Figura 4- Progressão de eventos moleculares no adenocarcinoma esofágico originado em epitélio de Barrett. As alterações estão indicadas nos estágios nos quais elas são inicialmente observadas. (Figura copiada na íntegra do site [www. EJB.org/content/vol3/full/1/f6.jpg](http://www.EJB.org/content/vol3/full/1/f6.jpg)).

Em vários tumores humanos sólidos o estudo molecular de peças cirúrgicas já é feito de rotina e tem ajudado no manejo terapêutico dos pacientes. Em carcinoma de mama, por exemplo, amplificação de HER-2/neu com aumento de expressão da proteína está relacionada à um pior prognóstico, com aumento

de resistência à quimioterapia e diminuição de sobrevida (Muss HB, Thor A, et al;1994).

Outros exemplos de marcadores moleculares utilizados na clínica, podem ser citados por exemplo em carcinoma de células transicionais de bexiga, nos quais, p53 e RB quando mutados levam a um aumento da invasividade e ajudam a decisão terapêutica por um tratamento mais agressivo versus abordagem mais conservadora (Cordon-Cardo C & Dalbagni G, et al;1992).

Em leucemia existem vários exemplos, em que produtos de translocações cromossômicas auxiliam em decisões terapêuticas. Um dos exemplos, são pacientes com leucemia linfocítica aguda BCR/ABL positivos são pacientes de alto risco e tem aumento de sobrevida se transplantados após indução (Ochs J;1996).

O estudo do DNA de peças cirúrgicas para detecção de lesões ou ampliações é feito por várias técnicas como *southernblot*, reação de polimerase em cadeia “polimerase chain reaction (PCR)” e hibridização in situ com detecção por fluorescência (FISH) . O DNA pode ser extraído de biópsias, digerido com enzimas de restrição ou amplificado e localizado no gel de eletroforese por seqüências complementares conhecidas específicas para as alterações estudadas.

O estudo de expressão gênica tem sido incorporado em análise clínica e pode ser feito pelo conteúdo de RNA que geralmente é estudado após transcrição reversa pela enzima transcriptase reversa. As informações retiradas do estudo de RNA oferecem dados sobre aumento ou diminuição de expressão bem como mutações ou variações em seqüências codificadoras de mensagem(Cortner J;2000).

O estudo de proteínas oferece informações sobre aumento, diminuição e localização celular. No estudo de biópsias os métodos mais utilizados são imunohistoquímica, imunofluorescência e *westernblot* sendo que os métodos imunoenzimáticos (ELISA) são os mais utilizados para detecção de proteínas séricas em pacientes com câncer.

O estudo de proteínas alteradas foi muito simplificado com o desenvolvimento de imunohistoquímica empregando anticorpos policlonais ou monoclonais e se aplica ao estudo de oncogenes.

O aumento de expressão de p53, por exemplo, ocorre por acúmulo intranuclear da proteína após mutações que provocam diminuição da degradação protéica. Anticorpos anti-p53 detectam aumento de proteína que em trabalhos clínicos tem sido relacionados com caracter mais agressivo dos tumores quando hiperexpresso no núcleo celular.

Assim como p53, HER-2/neu também pode ser detectado por imunohistoquímica, sendo que aumento de detecção na membrana celular significa aumento de expressão deste gene, relacionado com pior prognóstico em algumas neoplasias. (Sklar JL & Costa JC;2000)

1.4 Caracterização de Her-2/neu:

Her-2/neu ou C-erbB-2 está caracterizado como um oncogene devido à sua capacidade de promover transformação celular. HER-2/neu foi clonado de células de carcinoma de mama e faz parte da família de 4 fatores de crescimento (epidermal growth factor-receptor (EGF-R), erbB-2 (HER-2/neu, erbB-3 e erbB-4) que possuem atividade intrínseca de tirosina quinase (Klapper LN et al,1999). HER-2/neu, apresenta extensa homologia com o fator de crescimento epitelial (FCE)- Epidermal growth factor(EGF).

Neu foi primeiramente clonado de ratos com neuroglioblastomas induzidos com ethyl-nitrosoureas (neu gene). HER-2/neu e neu diferem de seus proto-oncogenes por uma única mutação tendo aumento na atividade intrínseca da tirosina quinase (Yamamoto T et al;1983). O aumento de atividade quinase ocorre também por outros dois mecanismos: amplificação gênica e modificação na regulação de translação da proteína (Child SJ et al;1999).

HER-2/neu codifica uma proteína de 185.000 Daltons localizada na membrana celular, tendo um domínio intracelular um ponto de ancoragem e um domínio

extra-celular. O gene está localizado no cromossoma 17 q21 (Fukushige SI et al, 1986).

Os estudos com a indução de HER-2/neu mostram que este gene é altamente regulável como ocorre em fatores de crescimento implicados em proliferação celular (Hudson LG, Ertl AP, et al;1990).

A maioria dos fatores de crescimento tem atividade de tirosina quinase sendo capazes de autofosforilar seus domínios intra-celulares nos resíduos de tirosina e desta forma tornarem-se capazes de reagir com outras proteínas. HER-2/neu tem atividade de tirosina quinase estando permanentemente ativado nas células que o expressam.

Estes dados mostram que a capacidade de transformação celular induzida por HER-2/neu é diretamente relacionada a atividade catalítica da proteína sob os resíduos de tirosina (autoquinase) (Segatto O et al, 1988). Estudos mais recentes, tem investigado os mecanismos de fosforilação de HER-2/neu e interação com os outros receptores da mesma família induzindo ativação de MAPK, o principal mediador de sinalização intracelular desta família de oncogenes com conseqüente aumento de proliferação celular (Klapper LN et al, 1999).

HER-2/neu, está alterado nas células malignas por três mecanismos: amplificação gênica com aumento do número de cópias, mutação de ponto com permanente ativação da atividade catalítica e aumento de expressão por alteração de translação na unidade ribossômica.

Após a primeira clonagem de HER-2/neu, vários estudos foram feitos comparando estas seqüências com outras retiradas de espécimes cirúrgicos mostrando apenas uma modificação neutra na posição 655 (isoleucina para valina), as demais bases são idênticas.

Com isto conclui-se que a hiper-expressão que ocorre em tumores, ocorre por aumento de transcrição de uma forma idêntica a linhagens celulares de carcinoma de mama (Di Fiori PP et al;1987).

Com o surgimento de anticorpos anti-HER-2/neu foram possíveis estudos em espécimes cirúrgicos correlacionando expressão e prognóstico.

Em carcinoma de mama Slamon et al em 1989 estudaram 668 peças cirúrgicas por imunohistoquímica e mostraram que HER-2/neu, é um fator de pior prognóstico quantificando-se tempo livre de doença $p < 0.006$ e sobrevida global $p < 0.041$ destes pacientes. Os mesmos autores, mostraram haver correlação entre amplificação gênica e aumento de expressão comparando *southernblots* a *westernblots* e imunohistoquímica em espécimes cirúrgicos. É conveniente salientar que ocorre discordância entre *Westernblot* e *southernblot* devido à quantidade de estroma nos tecidos tumorais (Slamon DJ, Godolphin W, et al;1989).

Em carcinoma de ovário o aumento de expressão de HER-2/neu também está relacionado com pior prognóstico mas com uma diferença menor se comparado ao controle em análise multivariada (Rubin SC, Finstad CL, et al;1993) .

Através de *southernblot* e imunohistoquímica foram estudados vários tumores quanto a expressão de HER-2/neu. Além de carcinoma de mama e ovário, glioblastoma multiforme, adenocarcinoma de estômago e carcinoma de pulmão, também mostraram aumento de expressão desta proteína (Tsai CM et al,1993 ; Nishikawa R, et al,1994 ; Allgayer Het al, 2000).

Recentemente HER-2/neu tem sido objetivo de estudo em carcinoma de esôfago principalmente adenocarcinomas originados do terço inferior do órgão onde foi encontrada hiperexpressão em 30%-70% dos casos (Brien TP et al; 2000) , certamente visando sua aplicação na prática oncológica.

Vários receptores para fator de crescimento, incluindo receptores com atividade de tirosina quinase geram formas solúveis por proteólise, rearranjo genético ou corte alternativo do RNA. Receptores conhecidos com tais características são: interleucina-2, fator de crescimento de hepatócito, fator de crescimento do nervo e fator estimulador de colônias. Assim como as demais proteínas citadas acima, O HER-2/neu também produz formas solúveis do receptor (Hooper NM et al, 1997). O FCE, secreta o domínio extracelular por rearranjo gênico e corte do RNA. A função do domínio extra-celular é distinta da região de trans-membrana e do domínio intracelular. Com o objetivo de analisar o domínio extracelular de HER-2/neu, foram criados anticorpos que

reagem especificamente com esta porção sendo que o experimento pode ser lido por teste imunoenzimático (ELISA).

Lin YZ et al., descobriram um fragmento de 130 kDa relacionado a p185 em carcinoma de mama (células BT474). Através deste anticorpo, que não reage com a forma completa da proteína, é possível determinar-se a concentração sérica do domínio extra-celular. O estudo do meio de cultura desta células mostrou que em 24 horas ocorre um derrame de p130 equivalente a 10% da quantidade total de p185 sendo estável durante este período (Lin YZ & Clinton GM;1991).

Com a intenção de avaliar o mecanismo que causa a liberação do domínio extracelular, Codony-Servat et al., analisaram a concentração do domínio extracelular de Her-2/neu em presença de inibidores de protease. Observaram que EDTA, leupeptina, pepstatina e E64 inibem em cerca de 50% a liberação da porção amino terminal na circulação (Codony-Servat J et al, 1999).

Posteriormente, vários reagentes em escala comercial surgiram para dosagem do domínio extracelular de HER-2/neu e estudos tem sido feitos em carcinoma de mama. Em câncer de mama, até 50% dos pacientes, tem níveis aumentados na circulação que se alteram conforme modificação do número de células tumorais. Em um estudo recente publicado na forma de resumo, Carney e col, compararam dois anticorpos para o estudo dos níveis séricos da fração extracelular de HER-2/neu, o anticorpo 4D5, que é o precursor da molécula “Herceptin”, e o anticorpo NB-3. O domínio extra-celular, não reage da mesma forma com o anticorpo 4D5 comparando-se ao receptor sendo NB-3 capaz de detectar HER-2/neu em menores concentrações. Os casos estudados de carcinoma de mama apresentavam expressão forte de HER-2/neu por imunohistoquímica havendo correlação com os níveis de HER-2/neu na circulação.(Carney W & Hamer PJ, 2000).

HER-2/neu, está relacionado em aumento do fenótipo maligno da célula tumoral e que é importante funcionalmente em carcinoma de mama e ovário onde foram melhor estudados (Slamon DJ et al, 1989). O bloqueio de HER-2/neu por anticorpos foi capaz de inibir o crescimento tumoral em modelos

animais. Para estudos em humanos foi preciso que se desenvolvessem anticorpos humanizados com a intenção de evitar a formação de anti-anticorpos.

Carter et. al., construíram um anticorpo monoclonal anti-HER-2 humanizado a partir de um anticorpo murino Ab4D5. Os genes para cadeias pesadas e leves foram, isolados de hibridomas por PCR sendo que os “primers” para, a fita de DNA complementar foram feitas por seqüência de consenso para resíduos FR da imunoglobulina murina. Os genes foram clonados em pUC 119 e humanizados por inclusão de seqüências humanas gerando uma molécula humanizada, com retenção de seqüências humanas na região de complementaridade. Uma das variantes do anticorpo resultante, hum-Ab4D5-8, foi 250 vezes mais seletiva que a molécula com humanização máxima. Este anticorpo foi testado contra epitélio normal de pulmão (WI-38) e tumor de mama (SK-BR-3) mostrando 100% de atividade antiproliferativa em uma concentração de 4 microg/ml. O desenvolvimento posterior deste anticorpo, deu origem ao anticorpo Herceptin, que foi desenvolvido para uso clínico em pacientes que hiperexpressam HER-2/neu. Os clones iniciais deram origem a alguns anticorpos para uso experimental (Carter P et al, 1992).

Vários métodos tem sido usados para avaliar alterações genéticas em peças cirúrgicas conforme já descrito (Sklar JL et al, 2000). HER-2/neu pode ser estudado da mesma forma. As técnicas mais utilizadas são avaliação do número de cópias do gene por hibridização in situ e mensuração da concentração de proteína intracelular que pode ser medida por *westernblot* e imunohistoquímica.

Recentemente alguns autores tem proposto um sistema de padronização para mensuração de HER-2/neu devido ao seu ganho de importância em modelos de análises multivariadas e univariadas de prognóstico. É recomendado que para HER-2/neu, considere-se positivos os casos que tiverem intensidade de expressão de 2+ ou 3+ em uma escala de 0-3. A padronização foi feita baseada em dados funcionais do receptor que apresenta importância clínica somente nestes níveis. Tumores que expressam níveis inferiores de HER-2/neu, não

apresentam resposta ao uso de Herceptin (Dillman RO;1999). Por isto é importante que para estudos futuros se escolha uma técnica padrão para análise de peças cirúrgicas. Jacobs TW et al., estudaram uma série de 90 casos de câncer de mama comparando imunohistoquímica e hibridização in situ, havendo uma concordância dos resultados em 91.1% dos casos sendo altamente significativa. A hibridização in situ requer em seu processamento mais tempo (10.4 horas em dois dias vs. 6 horas em um dia). A hibridização in situ requer também maior disponibilidade de tempo do patologista para leitura (8.9 minutos Vs. 2.5 minutos) e custa mais caro (Jacobs TW et al, 1999). Devido a sua simplicidade escolheu-se a técnica de imunohistoquímica para análise dos casos de adenocarcinoma de esôfago e cárdia nesse estudo. Alguns cuidados foram tomados como escolha de um anticorpo adequado e bem estudado e uso da técnica de estreptavidina-biotina que oferece maior sensibilidade seguindo alguns padrões já estabelecidos na literatura.

1.5 p53:

O segundo fator estudado nesta pesquisa é o p53, conhecido como um gene supressor de tumores, devido a sua função inibitória sobre a proliferação celular e capacidade de induzir morte celular programada. O p53 é uma proteína identificada no início da década de 70 com função de proteger o genoma de agressões físicas, químicas e biológicas sendo considerado um guardião celular e uma das proteínas com mutações mais frequentes em tumores humanos.(Pennisi et al, 1996) . Mutações esporádicas no gene supressor de tumores p53 são a alteração genética mais comum nos canceres humanos.

Esta proteína foi eleita pela revista Science em 1993 com a molécula do ano devido a importantes funções no mecanismo de proliferação, diferenciação, reparo e morte celular tendo também considerável importância clínica uma vez que mutações de p53 induzem maior instabilidade genômica, alterando o

prognóstico dos pacientes. Observação comprovada em tumores de cólon e bexiga.

Mutações de p53 nas células germinativas são encontradas em pacientes com a síndrome familiar de Li-Fraumeni onde indivíduos com alteração de alelos deste gene estão mais predispostos a desenvolver vários tumores malignos na infância e na idade adulta. Mutações adquiridas nesta proteína durante a carcinogênese dos órgãos leva à um aumento da invasividade das células transformadas devido ao aumento da instabilidade genômica (Li FP et al, 1988). Algumas situações clínicas já foram bem documentadas em que alterações de p53 estão relacionadas com piora de prognóstico como por exemplo correlação entre mutações de p53 e invasão muscular por células transitórias de bexiga com aumento da chance de metástases para linfonodos comparando-se a tumores sem este tipo de mutação (Dalbagni G et al;1993).

Na carcinogênese do epitélio esofágico, p53 sofre mutações precocemente com acúmulo intra-celular (Coggi G et al;1997). As alterações podem ser observadas em até 15% de células do epitélio de Barrett sendo que em displasia de alto grau estão relacionadas com aumento de até 4-8 vezes no risco de transformação para carcinoma estando presente em 50-90% dos casos (Dolan K et al;1999).

O p53 está relacionado com múltiplas funções celulares com real objetivo de manter intacto o genoma através do aprisionamento do ciclo celular nos pontos de restrição G1/S e G2/M de células lesionadas ou sob efeito inibitório sobre o ciclo celular. O p53 auxilia no processo de mitose por ação de mecanismos de armação do fuso celular e duplicação do centrossomos, coordenando segregação cromossômica durante a mitose. Por isso é denominado de gene supressor de tumores (Sherr CJ;1994).

Após exposição a radiação, por exemplo, as células de um tecido mamífero sofrem parada do ciclo celular no ponto 1 ou 2 que pode ser observada por um aumento do conteúdo de DNA característicos destes pontos. Os dois pontos sofrem interferência de p53 através da inibição que esta proteína promove em proteíno-quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (Kastan MB et al;1991).

Em tecidos desprovidos da função desta proteína, ocorre acúmulo de lesões genômicas que aumentam o fenótipo maligno, surgindo aumento de proliferação, indiferenciação e resistência à morte celular. O ponto de restrição em G1/S é controlado pelo acoplamento de CDK4 e CDK6 com a ciclina D (Elledge SJ, 1994) que promovendo catálise da fosforilação da proteína do retinoblastoma leva à liberação de E2F que atua como fator de transcrição para dihidrofolato redutase-DHF, timidina quinase (TQ), timidilato sintetase, DNA polimerase alfa, CDC2(CDK1) e finalmente aumento de transcrição de ciclina E e possivelmente A, fechando a alça de controle do ponto de restrição 1 tornando o ciclo a partir deste ponto mitógeno independente (Sherr CJ & Weinberg RA;1996). O p53 atua sobre este ponto de restrição por ser o principal indutor de p21, um inibidor das ciclinas D,E e A e o efetor da proteína p53. A ciclina D acopla com CDKs 4,6 e ciclina E e A acoplam com CDK2. Para que ocorra controle do acoplamento de CDKs e ciclinas existem fatores inibitórios de CDKs (INK4), p27, p21 e p57 que atuam sobre a ciclina D (Sherr CJ,1994). Convém salientar que linhagens celulares sem função de p21 ainda são capazes de sofrer aprisionamento em G1 se tiverem atividade de p53 assim como múltiplas fases S ocorrem sem haver ligação com a mitose. A fosforilação de Rb se mantém até que termine a mitose. Assim como controle de G1, p53 exerce função sobre o ponto de restrição G2, no entanto, a função de p53 neste caso é menos importante. Células que contêm perda de função de p53 e p21 deixam o ponto G2 mais rapidamente quando irradiadas (Bunz F et al;1998). O controle do ponto G2 ocorre por fosforilação de Cdc-25C pela quinase 1 do ponto de restrição (Chk1) que promove inibição de Cdc-2. Mais acima na cascata de controle do ciclo celular deve-se mencionar a fosforilação da serina 20 da molécula de p53 que por sua vez promove estabilização da proteína induzida pela quinase 2 do ponto de restrição esta por sua vez é ativada pela proteína codificada pelo gene da ataxia-teleangiectasia (ATM).(Brown JP et al, 1997)

Outra função importante de p53 é na mediação de apoptose ou morte celular programada que ocorre quando a quantidade de mediadores de apoptose se

eleva além do nível necessário para inibição do ciclo celular. Estímulos mais reconhecidos ligados à apoptose como lesão de DNA, retirada de fatores de crescimento, expressão do oncogene *myc* e de E1A. A apoptose neste caso é dita dependente de p53 e ocorre após indução através de p53 dos genes BAX e *igf-Bp3* que desencadeiam a cascata proteolítica da morte celular. Outra forma de demonstrar importância de p53 em morte celular é a prevenção da apoptose por inibição de p53 por E1B, uma proteína viral de 19-kDa com atividade de promover replicação viral (Agarwal ML et al;1998).

A regulação de p53 ocorre mais por modificação da proteína com alteração de função e quantidade do que por alteração da transcrição do gene.

A regulação de p53 é importante no contexto deste trabalho uma vez que a técnica de detecção por imunohistoquímica é positiva quando ocorre acúmulo intra-nuclear de proteína conseqüente de mutações somáticas do gene ou diminuição de degradação quando ocorre diminuição da ubiquitinação e proteólise de p53.

Outras alterações de p53 ocorrem por glicosilação, corte alternativo do RNA, acetilação e ligação com proteínas virais tipo E6 do papiloma vírus humano (Oren M;1999).

Mutações de p53 levam à uma menor capacidade de degradação da proteína com conseqüente acúmulo intracelular que pode ser detectado e comparado com tecidos normais ou com quantidade não alteradas. A imunohistoquímica, é a técnica mais utilizada por sua simplicidade e aceitável sensibilidade e especificidade para detecção de acúmulo de p53 (Rosen N, 2000). Em cerca de $\frac{3}{4}$ dos casos de aumento na intensidade de coloração, encontram-se mutações de ponto que codificam uma molécula de função alterada. Nos casos restantes, o acúmulo ocorre com proteína não alterada.

Em vários tumores incluindo carcinoma epidermóide de esôfago o p53 está alterado por imunohistoquímica e está correlacionado à mudança de histologia, prognóstico, aumento da agressividade da lesão e resistência ao tratamento.

Em uma série de 42 tumores estudados Ribeiro Jr U. et al em 1998, mais de 80% dos tumores continham mutações do tipo *missense* nos exons 5-8. Apenas

1 a 2% das mutações são encontradas fora destas regiões do gene. Nesta série de pacientes, os pacientes que apresentaram tumores com mutações de p53, tiveram sobrevida global inferior aos pacientes sem alteração do gene (Ribeiro Jr U et al, 1998).

As modificações de p53 se correlacionam também com alterações em outros genes envolvidos nas etapas de carcinogênese e aumento de instabilidade de microssatélites. Em carcinoma de cólon, modelo bem estudado por Vogelstein et al citado por Walch AK em 2000, as alterações de p53 determinam capacidade de microinvasão. Em carcinoma epidermóide de esôfago, p53 pode estar alterado mais precocemente com alterações que podem ser vistas no epitélio displásico de Barrett (Walch AK, 2000)

Outros autores mostraram em uma série de 88 pacientes que anticorpos anti-p53 podem ser detectados no soro de pacientes com carcinoma de esôfago e esôfago de Barrett podendo predizer o diagnóstico de malignidade (Cawley HM et al, 1998).

2.0 Objetivos:

- 1- Avaliar a frequência de expressão de HER-2/neu celular em adenocarcinomas de esôfago e cárdia usando a técnica de imunohistoquímica em peças cirúrgicas armazenadas em parafina de pacientes operados no HCPA.
- 2- Avaliar a frequência de expressão de p53 nas mesmas peças usando a mesma técnica.
- 3- Determinar o nível de correlação entre os dois achados acima descritos.

3.0 Justificativa do Estudo:

HER-2/neu é um oncogene que codifica uma proteína que promove crescimento celular. Recentemente, foi introduzido na clínica um anticorpo monoclonal anti-HER-2/neu denominado Herceptin que é capaz de induzir respostas, bem como sensibilizar tumores que hiperexpressam HER-2/neu à ação de quimioterapia. Os tumores de mama respondem bem quando ocorre hiperexpressão de HER-2/neu determinada por imunohistoquímica que tem alto grau de correlação com amplificação gênica determinada por hibridização in situ. Os tumores com expressão leve ou moderadamente aumentada são resistentes ao uso de Herceptin. Nos últimos anos, vários oncogenes foram detalhadamente estudados sendo que algumas destas proteínas passaram a ter utilidade clínica como auxílio diagnóstico, determinantes de prognóstico e alvos de novos tratamentos. O ganho de importância de HER-2/neu em carcinoma de mama, despertou o interesse para a potencial importância desta proteína em outros tumores. HER-2/neu vem sendo estudado em neoplasia de ovário, melanoma, sarcomas, tumores gastrointestinais com objetivos semelhantes aos estudados em câncer de mama. Neste estudo investiga-se a frequência de expressão de HER-2/neu em espécimes clínicos de tumores esofágicos e do cárdia pela técnica de imunohistoquímica usando métodos de semi-quantificação e anticorpos comerciais padronizados pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos. Tenta-se também estabelecer-se uma correlação dos achados com alterações de p53 de frequência elevada nos mesmos tumores.

4.0 Material e Métodos:

4.1 Pacientes:

4.1.1 Critérios de inclusão:

Vinte e dois casos de pacientes diagnosticados e com adenocarcinoma de esôfago e cárdia no período entre julho de 1990 e dezembro de 1999 foram selecionados dos prontuários do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os tumores estavam armazenados em blocos parafina no Serviço de Patologia do HCPA e foram localizados após pesquisa de prontuários no Serviço de Arquivo Médico do HCPA (SAMIS) conforme protocolo simplificado anexo. (Anexo 2)

4.1.2 Critérios de exclusão:

Casos que continham dano no material de biópsia incluso em parafina ou casos com prontuários incompletos.

4.2 Delineamento:

Este é um estudo longitudinal retrospectivo de casos onde o fator em estudo é a expressão de p53 e HER-2/neu em adenocarcinomas de esôfago e cárdia.

4.3 Imunohistoquímica:

Para a técnica de imunohistoquímica, foi usado um anticorpo monoclonal de camundongo como primário da marca BioGenex anti-HER-2/neu (Clone CB11 e um anticorpo monoclonal primário de camundongo anti-proteína p53 humana (Clone DO7) da marca DAKO Corporation seguido do sistema estreptavidina-biotina imunoperoxidase ligado a anticorpo secundário para

identificação da localização celular dos marcadores (kit Large Volume DAKO LSAB+ peroxidase) Para detecção da atividade de peroxidase utilizou-se Diaminobenzidina (DAB – DAKO Corporation- sistema líquido DAB de substrato cromógeno) em diluição 1:20.

Três cortes de cada caso foram desparafinizados e rehidratados em meio alcoólico de vários graus. O primeiro corte foi usado para coloração com hematoxilina & eosina (HE) para confirmação do diagnóstico histológico. As demais lâminas foram usadas para a reação de imunohistoquímica conforme protocolo descrito a seguir. Antes de proceder-se ao experimento principal com cada anticorpo, determinou-se a qualidade dos reagentes, diluição e a técnica em cortes de carcinoma de mama positivos para HER-2/neu e p53.

4.3.1 Protocolo de imunohistoquímica:

Os cortes histológicos foram desparafinizados em 1 banho de xilol por 10 minutos e dois banhos em xilol por 5 minutos seguidos de banho em álcool por 5 minutos e lavados em água corrente seguido de água destilada e finalmente solução de tampão fosfato (PBS) pH 7,2 por 5 minutos.

As lâminas foram então levadas ao forno de microondas imersas em solução com tampão de citrato pH 6.0 por dois períodos de 8 minutos com intervalo de dois minutos. A cada descanso foi renovado o banho de solução tampão. Após uso do forno de microondas (recuperação antigênica), as lâminas ficaram em descanso por 20 minutos no próprio forno e 15 minutos fora. A seguir lavou-se o material em água corrente, água destilada e PBS por 5 minutos.

Após esta etapa incubou-se as lâminas em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 5% por 20 minutos duas vezes em câmara escura seguido de lavagem em água corrente destilada e PBS por 5 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Na etapa seguinte, incubou-se o material em leite desnatado a 5% em PBS por 40 minutos em câmara escura seguido de lavagem em águas corrente e destilada e em solução de PBS.

Os cortes foram então circulado com caneta DAKO para delinear a área de contato com o anticorpo. O anticorpo primário foi preparado em diluição 1:50 em PBS sendo que a solução final foi gotejada sobre a área marcada na lâmina e incubada em câmara úmida por 1 hora. Após esta etapa as lâminas foram lavadas com PBS em cuba em 3 banhos de 5 minutos. As lâminas foram então lavadas uma a uma com PBS por 3 jatos consecutivos sendo então gotejado na área circulada o anticorpo secundário ligado ao complexo estreptavidina biotina peroxidase e incubados em câmara úmida por mais 30 minutos seguido de lavagem em PBS 3 banhos de 5 minutos. A seguir gotejou-se DAB 1:20 e incubou-se em câmara escura por 3 minutos seguido de lavagem em água destilada.

As lâminas foram então contra-coradas em hematoxilina de Harris por 30 segundos e mergulhadas em água amoniacal a 2% seguido de montagem em bálsamo do Canadá. O protocolo descrito foi usado para os dois anticorpos. Em todas as reações, efetuou-se sempre um controle negativo em que não utilizava-se o anticorpo primário e um controle positivo com corte de mama positivo para os dois anticorpos testados.

4.3.2 Leitura das lâminas:

A leitura das lâminas de p53 foi realizada seguindo-se um escore de 0 a 5 + conforme pode ser visto na figura 5 sendo que a coloração considerada foi a do núcleo celular. Para efeitos desta pesquisa os elementos de diagnóstico que constam dos itens zero e um foram enquadrados em negativos. Os casos com mais de 10% de núcleos com coloração amarronada foram considerados positivos.

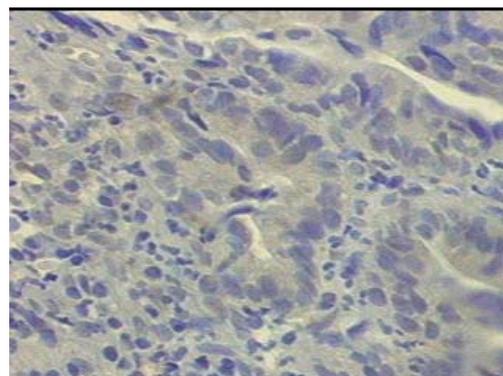
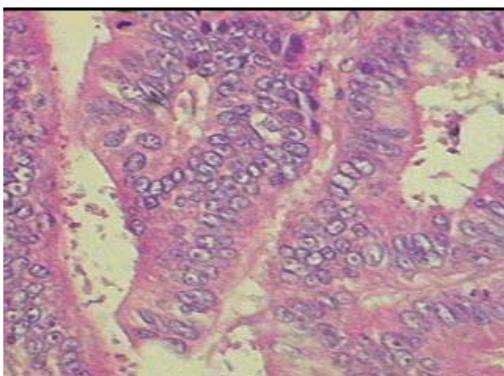
A leitura das lâminas para HER-2/neu foi feita seguindo um escore de 0 a 3+: zero, completamente negativo; 1+ fracamente positivo ou no citoplasma celular; 2+ moderadamente positivo; 3+ fortemente positivo em mais de 10% das células. A coloração considerada positiva foi a de membrana celular e

para esta pesquisa somente os itens 2 e 3 foram contados como positivos ao menos para um observador.

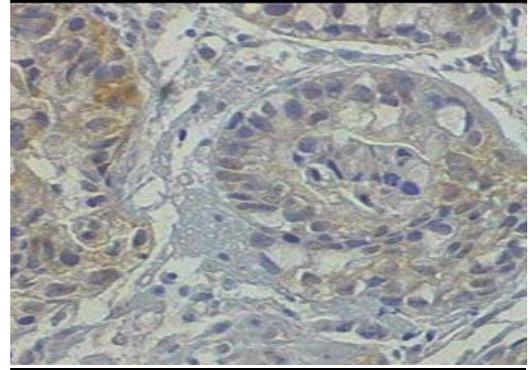
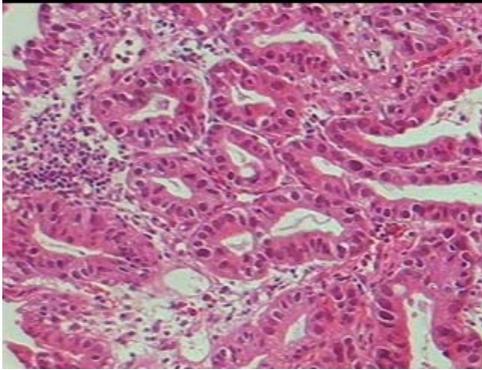
Abaixo na figura 5 e 6, estão exemplificados os escores para p53 e HER-2/neu respectivamente lidos pelo observador 2. Como pode ser observado, há uma imagem a esquerda que corresponde a lâmina do caso corada pelo H&E.

Figura 5 – Escores de P53: esquemas dos escores utilizados;

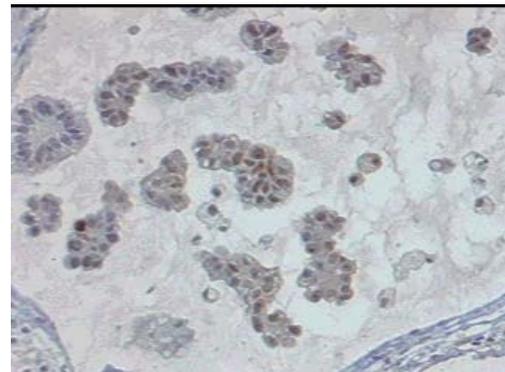
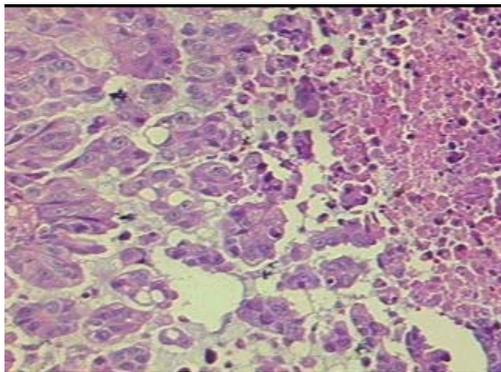
5A - Escore 0- Sem coloração ou quando o núcleo celular não apresentava tonalidade amarronada . Na figura da esquerda a imagem correspondente a caso desta pesquisa na coloração de H&E 400x (no original) e anti-p53 (400x)



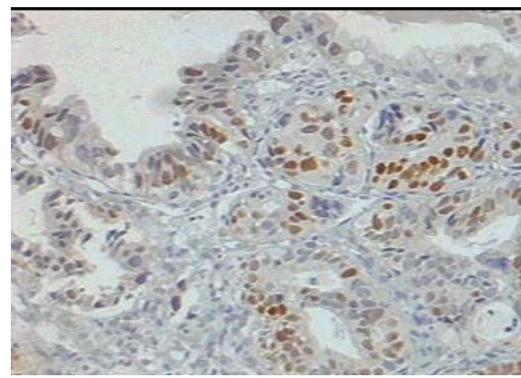
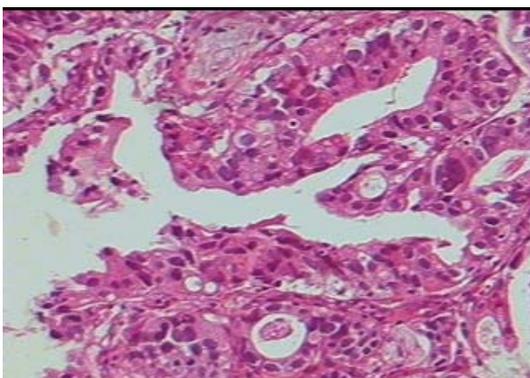
5B- Escore 1 - Positivo em uma cruz (1+) podendo ocorrer alguma coloração esparsa no citoplasma ou nuclear em menos de 10% das células. Nesta pesquisa este padrão foi considerado negativo. Na figura da esquerda a imagem correspondente a caso desta pesquisa na coloração de H&E 250x (no original) e anti-p53 (400x).



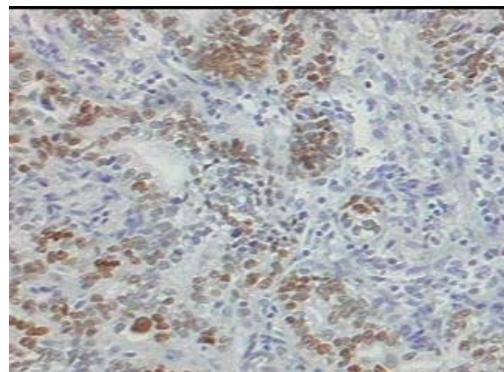
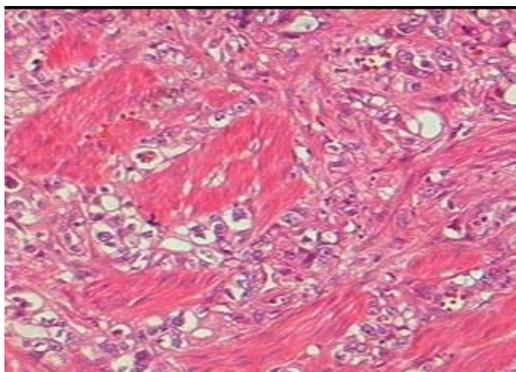
5C- Escore 2- Positivo em duas cruces (2+) Quando ocorria positividade em menos de 10 % dos núcleos das células neoplásicas. Na imagem da esquerda vemos um caso dessa pesquisa corado pelo H&E (250x) e a direita a expressão do anti-p53 (250x).



5D Escore 3 - Positivo em três cruces (3+) Quando ocorria positividade nuclear em 10-33%% das células estudadas, com intensidade mais forte. Na figura da esquerda vemos um caso desta pesquisa corado pelo H&E (400x) e na direita a expressão do anti-p53 (250x).



5E **Score 4-** Positivo em quatro cruces (4+)- quando ocorria positividade nuclear acima de 34-64% das células neoplásicas, com intensidade forte. Na figura da esquerda vemos um dos casos dessa pesquisa corado pelo H&E (400x) e na direita a expressão do anti-p53 (400x).



5F **Score 5-** Positivo em cinco cruces (5+)- quando ocorria positividade nuclear acima de 64% das células neoplásicas, com intensidade forte. Na imagem da esquerda vemos um dos casos dessa pesquisa corado pelo H&E (250x) e na direita a expressão do anti-p53 (400x).

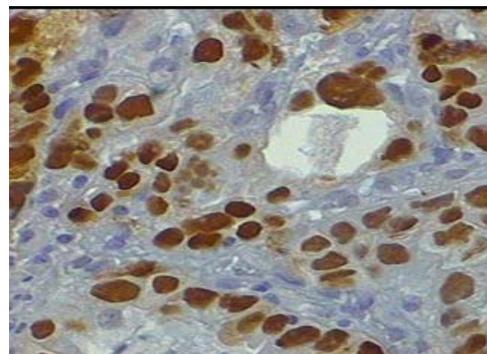
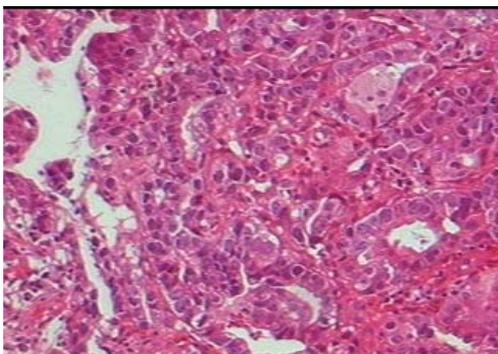
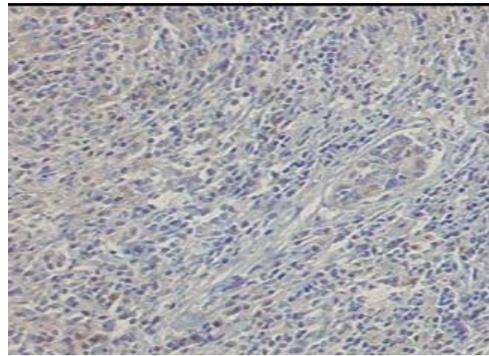
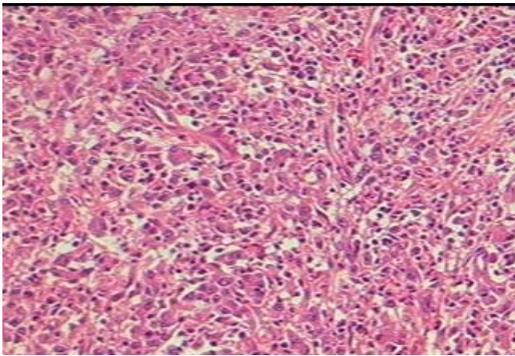
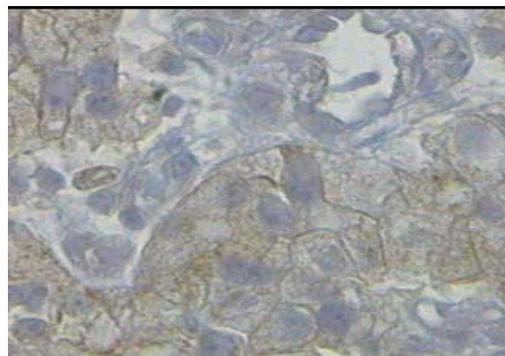
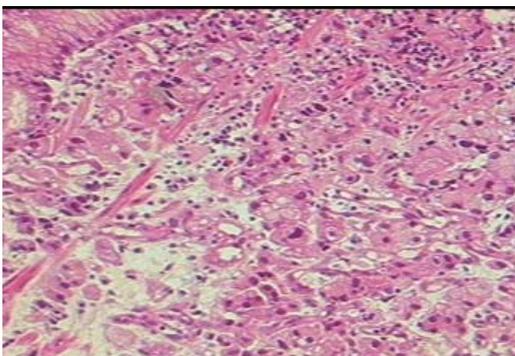


Figura 6 HER-2/neu: Esquemas dos escores utilizados

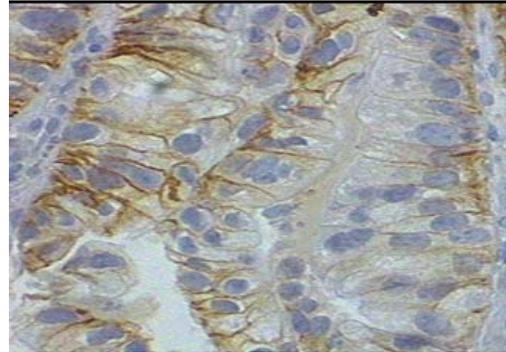
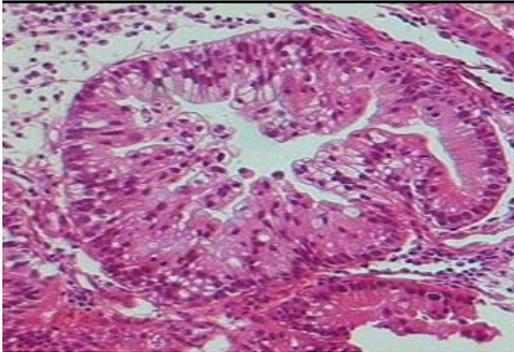
6A Escore 0- Quando não havia coloração citoplasmática ou de membrana nas células neoplásicas. Escore considerado negativo. Na imagem da esquerda um dos casos dessa pesquisa corado pelo H&E (250x) e na imagem da direita o mesmo caso com a expressão do anti-HER-2/neu (250x).



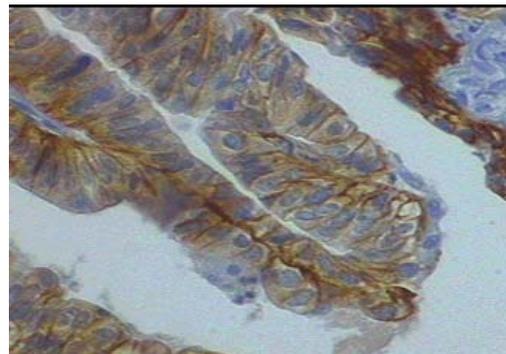
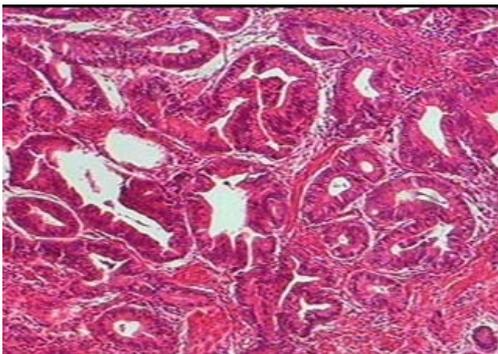
6B Escore 1 Quando ocorria coloração de membrana fraca em até 10% das células. Os escores 0 e 1, nesta pesquisa foram considerados negativos. Na imagem da esquerda um dos casos dessa pesquisa corado pelo H&E (250x) e na imagem da direita o mesmo caso com a expressão do anti-HER-2/neu (400x).



6C Escore 2 Quando a coloração de membrana ocorria em mais de 10% das células, com intensidade moderada. Na imagem da esquerda vemos um caso dessa pesquisa corado pelo H&E(400x) e na imagem da direita o mesmo caso mostrando a expressão de anti-HER-2/neu (400x).



6D Escore 3 – Quando a coloração de membrana ocorria com intensidade forte em mais de 10% das células. Na imagem da esquerda vemos um caso dessa pesquisa corado pelo H&E(250x) e na imagem da direita o mesmo caso mostrando a expressão de anti-HER-2/neu (400x).



4.4 Análise Estatística:

Para estudo de diferenças nas frequências dos marcadores estudados usou-se o teste McNemar e para o teste de correlação entre os marcadores HER-2/neu e p53 foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Para comparação entre a observação dos dois patologistas, utilizou-se o índice Kappa. Para todos os testes escolheu-se um grau de significância de 0.05. Os testes são bicaudais. Para a apresentação de resultados histopatológicos, devido ao pequeno número de casos usou-se a frequência de ocorrências dos eventos procurados.

4.5- Aspectos éticos :

O projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do HCPA. (Processo nº 99023).

5.0 Resultados:

5.1 Pacientes:

Foram estudados 22 casos das peças cirúrgicas selecionadas de uma população com as características demonstradas na tabela 3. Os vinte e dois casos tinham sítio primário em esôfago terminal e cárdia. (Tabela 4)

Tabela 4. Características da População de pacientes com adenocarcinoma de esôfago e cárdia submetidos a ressecção no HCPA .

Idade média	62.04 (45-78)
Sexo Feminino	3
Sexo Masculino	19
Raça Branca	21
Raça Negra	1
Tipo de Cirurgia realizada	
Ressecção curativa	4
Procedimento Paliativo	18
TOTAL DE CASOS	22*

* Os casos estudados não representam o total de cirurgias realizadas no Serviço de Cirurgia do HCPA.

Tabela 5. Descrição do sítio primário dos casos estudados conforme informações obtidas nos prontuários dos pacientes

Sítio primário	Número de Casos
Esôfago	7
JEG	9
Cárdia	5
SOE	1
TOTAL	22

JEG= junção esôfago-gástrica

SOE= origem sem outra especificação

5.2 Diagnósticos:

Todos os casos foram diagnosticados como adenocarcinoma por patologistas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) sendo que a lista dos diagnósticos estão demonstradas na tabela 6. Os diagnósticos histopatológicos foram revisados por dois patologistas independentes que utilizaram lâminas coradas em hematoxilina e eosina. (H&E)

Tabela 6- Diagnósticos anatomopatológicos nos 22 casos de Adenocarcinoma (Adeno) de esôfago e cárdia estudados no Serviço de Patologia do HCPA

DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO	Nº DE CASOS
Adeno mucoprodutor e/ou céls anel de sinete	6
Adeno de cárdia	4
Adeno em epitélio de Barrett	2
Adeno de esôfago	10
TOTAL	22

No anexo 4 podem ser vistos os diagnósticos revisados e avaliados quanto ao estadiamento pelo TNM, local da lesão, grau histológico e expressão de p53 e Her-2/neu.

5.3 Imunohistoquímica:

A imunohistoquímica foi lida conforme os escores descritos no item 4.3.2. Conforme o estadiamento pelo TNM, a expressão de p53 e Her-2/neu pode ser vista na tabela 7.

Tabela 7: Frequência do estadiamento tumoral pelo sistema TNM, de acordo com a sua positividade para p53 e HER-2/neu.

ESTÁDIO TNM	Nº CASOS	P53 (%)	HER-2/neu (%)
T1,T2 e T3	3	2/3 (66,6)	2/3 (66,6)
T4 e TX	19	6/19 (31,5)	8/19 (42,1)
TOTAL	22		

De acordo com o estadiamento TNM, um pior prognóstico deveria estar presente nos estádios mais avançados, verificamos a expressão de p53 e HER-2/neu nos casos que tinham metástases à distância (M1), nos que a metástase não podia ser avaliada (MX) e nos sem metástase à distância (M0). Esta avaliação pode ser vista na tabela 8.

—

Tabela 8 : Frequência de expressão para p53 e HER-2/neu nos casos de adenocarcinoma de esôfago e cárdia, relativamente à presença ou ausência de metástases . Siglas usadas referidas no texto.

METÁSTASES	P53 (%)	HER-2/neu (%)
M1	3/10 (30)	7/10 (70)
MX	4/7 (57,1)	0/7
M0	1/5 (20,0)	3/5 (60)
TOTAL	22	22

De acordo com o local primário da lesão, descrito no prontuário, independente da amostra ter sido de um sítio metastático, podemos analisar os casos quanto a expressão de p53 e HER-2/neu, como pode ser visto na Tabela 9.

Tabela 9- Frequência de expressão de p53 e HER-2/neu com relação ao local primário da lesão, conforme dados do prontuário do paciente.

LOCAL	P53 %	HER2/NEU%	TOTAL
JEG	1/9 (11,1)	6/9 (66,6)	9
CÁRDIA	3/5 (60)	3/5 (60)	5
ESÔFAGO	3/7 (42,8)	3/7 (42,8)	7
SOE	1/1 (100)	0/1	1
TOTAL	8/22 (59,0)	12/22 (54,5)	22

JEG- junção esôfago-gástrica

SOE- local primário na região porém sem outra especificação

Na avaliação inicial nos diagnósticos nos laudos anatomopatológicos constava a graduação histológica de quase todos os tumores. Para este trabalho eles foram revisados novamente pelo observador 2, correlacionados com a expressão de p53 e Her-2/neu e os dados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10- Frequência dos graus de diferenciação histológica nos adenocarcinomas de esôfago e cárdia estudados nesta amostra de acordo com a expressão de p53 e Her2/neu.

GRAU HISTOLÓGICO	p53 (%)	HER-2/neu (%)
I	1/4 (25,0)	2/4 (50)
II	2/12 (16,6)	7/12 (58,3)
III	5/6 (83,3)	1/6 (16,6)
TOTAL	22	22

5.3.1 Frequência de expressão de HER-2/neu e p53:

Os 22 casos foram estudados por imunohistoquímica segundo os escores descritos em material e métodos. Dos 22 casos de esôfago e junção esôfago-gástrica, (JEG) 8 (36,4%) foram positivos para p53 ou seja apresentaram 10% ou mais de núcleos corados e 63.6% foram negativos (Observador 1). Para p53 o observador 2 considerou 8 casos (36,4%) positivos e 14 casos (63,1%) negativos. Para HER-2/neu, 50% foram positivos ou seja as células exibiram coloração de membrana de intensidade moderada a forte e 50% foram negativos (Observador 1). Para o observador 2, 10 casos (45,4%) foram positivos para HER-2/neu e 12 casos (54,6%) foram negativos. (tabela 10) . Dos 22 casos os blocos de parafina correspondem a 3 casos de metástases em linfonodo, 2 casos são de metástases à distância e 4 casos não estão especificados. Os restantes dos cortes tem histologia de sítio primário.

Tabela 11 –Frequência de expressão de p53 e HER-2/neu nos adenocarcinomas de esôfago e cárdia . Relação entre observador 1 e 2

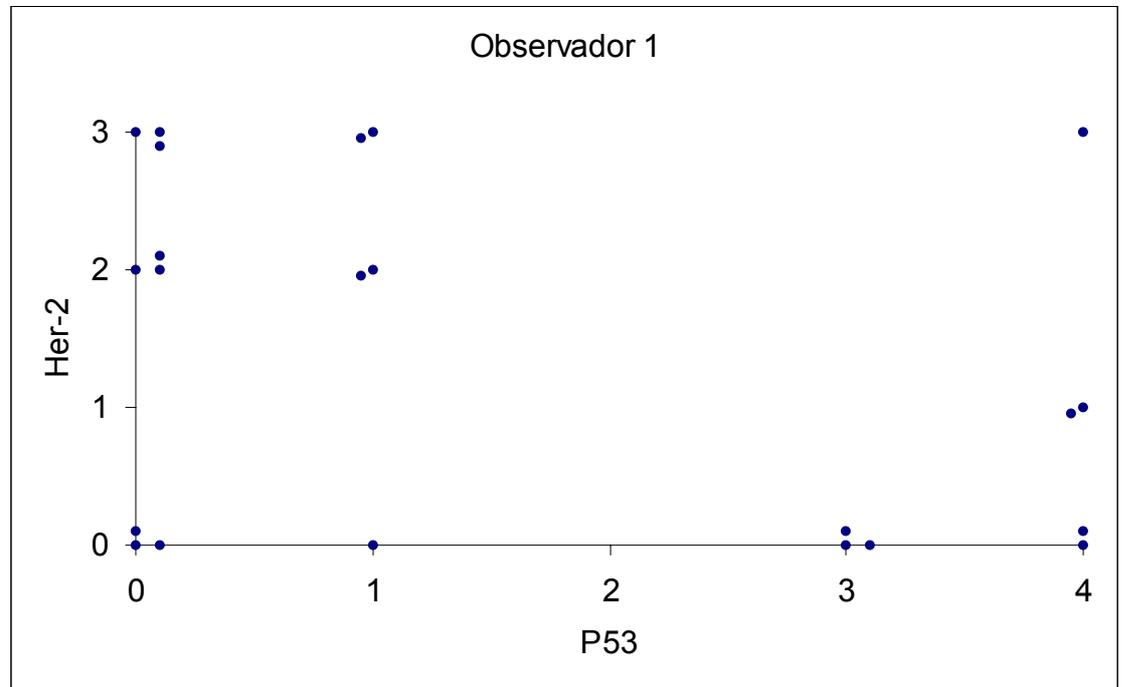
	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
P53	8/8	14/14	
HER-2/neu	11/11	10/12	22

Mcnemar 1/2 P=0.3750/1.0

5.3.2 Correlação entre HER-2/neu e p53:

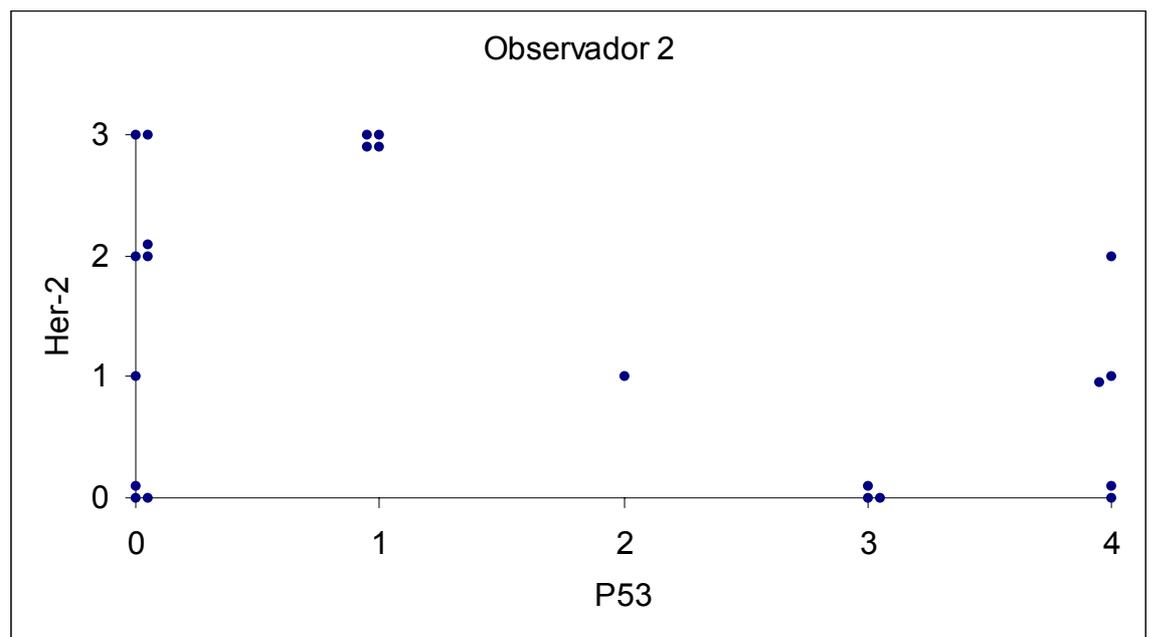
Para o estudo de correlação, os escores de p53 foram transformados em 4 escores sendo que os escores 0 e 1 da leitura foram transformados em 0 e os escore para HER-2/neu permaneceram os mesmos 0 a 3. Para estudo da possível correlação entre os dois marcadores comparou-se os escores de p53 e HER-2/neu para cada caso do anexo 3 sendo que a correlação foi negativa – 0.27 ou seja a expressão dos dois marcadores não aumenta na mesma direção p= 0.22 (figura 2) Para o observador 2, a correlação foi –0,27 com o valor de p=0.2.

Figura 7. Correlação entre expressão de p53 e HER-2/neu (Observador 1).



Spearman= -0.27 p=0.22

Figura 8: Correlação entre a expressão de p53 e HER-2/neu (Observador 2).

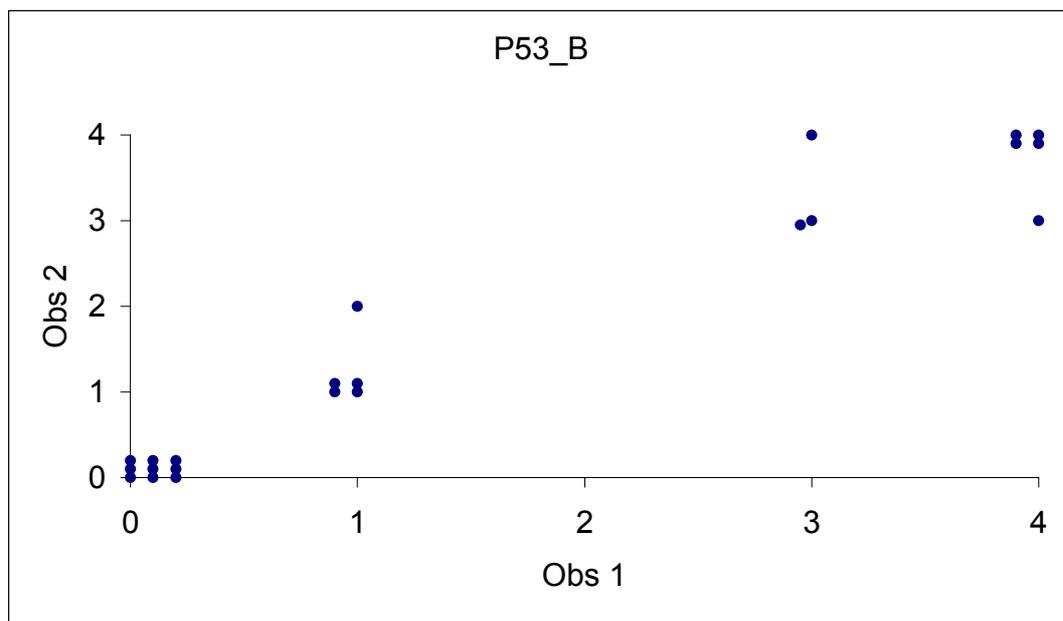


Spearman= -0.27 p=0.20

5.3.3 Comparação entre as duas observações:

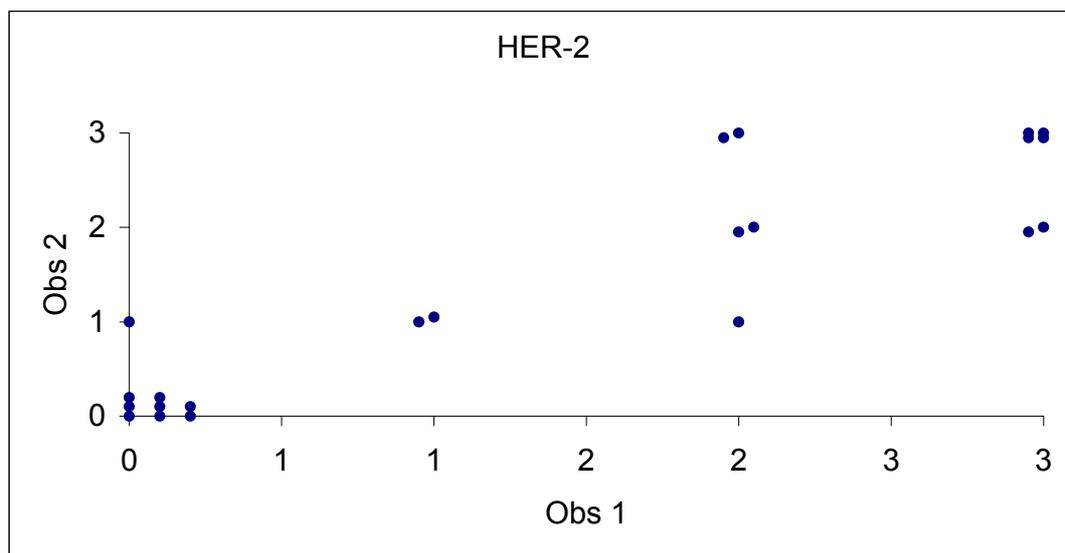
A avaliação do grau de concordância inter-observador para as observações imunohistoquímicas foi efetuada pelo teste de kappa. A comparação de todos os escores de p53 e HER-2/neu entre o observador 1 e o observador 2 foi calculada em separado para cada marcador. Para HER-2/neu o valor foi de 0.62 e para p53 foi de 0.9. Com relação ao primeiro, HER-2/neu ocorreu um grau de concordância moderada e para p53 o grau de concordância foi excelente. Estes dados podem ser observados nas figuras 9 e 10.

Figura 9. Comparação entre os escores do observador 1 e 2 para p53:



kappa=0.90

Figura 10 Comparação entre os escores do observador 1e 2 para HER-2/neu



kappa=0.62

Tabela 5.

Escores de imunohistoquímica dos casos individuais observador a e b:

Numero	p53_1	her_1	numeroAP	diagnostico	P53_2	Her_2
1	0	0	235869	Adeno	0	0
2	0	2	234371	Adeno	0	2
3	4	0	126661	Adeno	3	0
4	4	1	247904	Adeno	4	1
5	3	0	180191	Adeno	3	0
6	0	3	207476	Adeno	0	3
7	0	2	244110	Adeno	0	2
8	1	0	154576	Met LN	2	0
9	0	0	102132	Adeno met	0	0
10	4	3	157783	Met LN	4	2
11	0	0	256200	Adeno	0	0
12	4	0	206408	Adeno	5	0
13	4	1	211542	Adeno	4	1
14	0	3	121928	Adeno	0	2
15	1	2	265978	Adeno	1	3

16	3	0	104476	Implante epiplon	4	0
17	1	2	231280	Adeno	1	3
18	0	2	207961	Adeno	0	1
19	3	0	172544	Met LN	3	0
20	1	3	202008	Adeno met	1	3
21	1	3	105495	Adeno	1	3
22	0	3	204385	Adeno	0	3

7.0 Discussão:

A incidência de adenocarcinoma de cárdia e esôfago está aumentando muito por motivos ainda não esclarecidos dependendo da localização geográfica dos pacientes. Por exemplo, em áreas de alta incidência de carcinomas epidermóides, como a China, também são vistos muitos casos de adenocarcinoma no esôfago. O número de casos de adenocarcinoma de esôfago no ocidente ultrapassou o de carcinoma epidermóide sendo que o comportamento da doença é igualmente agressivo com sobrevividas em cinco anos para doença localmente invasiva em torno de 25% (Roth JA et al,1995). A maioria destes tumores tem origem no epitélio de Barrett ou se originam do epitélio normal do esôfago distal e bem menos frequentemente do 1/3 médio do esôfago . O envolvimento neoplásico do cárdia ocorre por extensão a partir do esôfago ou estômago ou como sítio primário. Por ser um grupo de doenças que teve aumento de incidência muito grande nos últimos anos seu estudo tem se tornado foco maior de interesse. Nesta neoplasia ocorre uma maior predominância no sexo masculino, sendo esta de 3 para um até 7 para um, com relação a sua incidência no sexo feminino. Há, do mesmo modo um predomínio em indivíduos de raça branca com 80% ou mais dos casos em contraste com o Carcinoma epidermóide que tem uma predominância em indivíduos de cor negra (6 negros para 1 branco). A idade média de ocorrência é cerca de cinco anos mais elevada nos casos de adenocarcinoma do que para os pacientes com epitélio de Barrett sem carcinoma.

Nesta pesquisa estes dados foram similares aos da literatura.

Os adenocarcinomas de esôfago respondem por cerca de 50% de todas as malignidades primárias do esôfago e estudos recentes mostram que a distribuição por faixa etária, sexo, raça e apresentação clínica, assim como os aspectos histopatológicos mostram similaridades entre os adenocarcinomas originados no epitélio de Barrett e os do cárdia. Há sugestões, frente a esses achados que ocorram fatores etiológicos comuns a estas duas condições, como a presença de refluxo e aumento do consumo de álcool e do uso de tabaco.

Os pacientes com cancer inicial não exibem sintomas clássicos, podendo ser assintomáticos ou apenas apresentar sintomas de refluxo gastro-esofágico. O aparecimento de sintomas, como o de disfagia progressiva é notoriamente um sinal de cancer esofágico mais avançado. Torna-se deste modo muito crítica, para a determinação da possibilidade de cirurgia e do prognóstico que o estágio do paciente seja determinado se possível previamente ou durante a cirurgia.

Os tumores mostram um espectro patológico similar aos do estômago e do cárdia. Virtualmente tumores encontrados em epitélio de Barrett com localização intramucosa ou em submucosa podem ser encontrados e conforme o tumor invade na parede, muscular própria ou adventícia e tecidos moles do mediastino ao redor do esofago podem ser vistas também metástases em linfonodos em cerca de 75% dos casos. A maioria dos adenocarcinomas são do tipo intestinal, mas alguns são do tipo difuso ou a combinação de ambos. Referindo-se ao seu grau de diferenciação, a maioria é do tipo moderadamente diferenciado. Também em espécimes cirúrgicos podem ser vistas invasão perineural e linfática e acúmulos de secreção mucóide dentro e fora dos espaços glandulares, chegando a haver em alguns casos lagos de muco no interstício. Estes aspectos podem dificultar o diagnóstico feito em biópsias, tornando-se muito difícil a diferenciação em casos com displasia de alto grau e adenocarcinoma, quando a biópsia for muito superficial. Este problema pode ser solucionado com a realização de múltiplas biópsias, como parte de um protocolo de vigilância bem como a ultrassonografia endoscópica um sinal de alerta importante para o clínico.

Outro problema importante a ser avaliado é quando um tumor é pouco

diferenciado, tornando difícil precisar a natureza glandular ou escamosa da neoplasia. Em casos onde pode ser observado epitélio de Barrett com ou sem displasia, é mais provável que esta neoplasia seja um adenocarcinoma pouco diferenciado. Na diferenciação de alguns adenocarcinomas originados em esôfago de Barrett curto e em cárdia, torna-se igualmente difícil precisar, pela presença de células intestinais a sua origem, uma vez que nos dois locais o epitélio intestinal pode ocorrer. Similarmente a presença de epitélio gástrico displásico próximo a margem proximal do tumor nos leva a pensar em tumor de origem gástrica, embora a sua presença em epitélio de Barrett com displasia, junto ao cardia usualmente é muito mais esparsa.

Apesar de todos os esforços há um grande número de tumores que se originam na junção esôfago-gástrica que são impossíveis de determinar a sua origem (esôfago terminal ou cárdia). Nestes casos pode ser determinado o epicentro do tumor, verificando-se se este ocorre claramente sobre a linha Z, ou mais de 3 cm acima da junção anatômica entre o esôfago e o estômago, podendo então ser feita uma suposição de que este é originado em epitélio colunar do esôfago. Do ponto de vista mais prático, a diferenciação destes tumores é feita mais por interesse acadêmico, porque o seu comportamento é similar e ambos apresentam características etiopatogênicas semelhantes. Excluindo-se os tumores mais superficiais, os adenocarcinomas apresentam um prognóstico ruim.

A carcinogênese do esôfago, passou a ser melhor entendida a partir da clonagem de genes que controlam o ciclo celular, morte celular e reparo de DNA como é o caso de p16, p53, Rb, HER-2/neu, BCL-2. O estudo de clones celulares permitiu analisar sub-populações de células quanto à modificação na estrutura, regulação e função de genes importantes em câncer sendo que HER-2/neu e p53 mostraram considerável importância na patogênese dos carcinomas de esôfago e cárdia. (Fearon ER et al 2000).

Atualmente HER-2/neu, é uma das oncoproteínas mais estudadas devido ao seu ganho de importância clínica principalmente em carcinoma de mama. Aumento de expressão de HER-2/neu está relacionado à resistência à quimioterapia tipo CMF frequentemente utilizada em tratamentos adjuvantes.

A importância clínica de HER-2/neu está relacionada ao número de cópias do gene contidas nas células tumorais. Por isto técnicas de mensuração foram desenvolvidas e padronizadas. A imunohistoquímica foi validada pela hibridização in situ marcada com fluorescência (FISH) e aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA). Conforme utilizado neste trabalho, o escore padronizado e aceito pelo (FDA), é o escore de 0-3, coloração de membrana em mais de 10% das células. A resposta ao uso de Herceptin, por exemplo ocorre somente nos casos de escore 2 ou 3 não sendo recomendado para pacientes que apresentam biópsias com menor intensidade de coloração na imunohistoquímica ou que a diferença entre o escore de coloração e o de células neoplásicas for igual ou maior que 2. (Jacobs TW et al, 1999;Pauletti G et al 2000)

Her-2/neu já foi estudado em adenocarcinoma de esôfago estando hiperexpresso em cerca de 30% dos casos. Sua expressão está relacionada com a profundidade da invasão tumoral, metástases em linfonodos e grau histológico, porém não está correlacionada com outros achados patológicos como o grau de diferenciação e o tamanho do tumor. Esta correlação pode revelar conseqüentemente uma pior sobrevivência no adenocarcinoma de esôfago (Brien TP et al, 2000) Não existem estudos muito detalhados nesta doença assim como nos caso de carcinoma de mama, sendo que o interesse por este oncogene em adenocarcinoma de esôfago é mais recente.

Um dos objetivos principais deste estudo, foi determinar a frequência de hiperexpressão de HER-2/neu em adenocarcinoma de esôfago e cárdia por imunohistoquímica em peças cirúrgicas do Serviço de Cirurgia do HCPA. Dos 22 casos de adenocarcinoma de esôfago e JEG, 12 (51.1%), foram positivos para HER-2/neu ou seja tiveram escore 2 ou 3, os casos restantes tiveram escore 0 ou 1. Esta frequência de positividade está semelhante ao encontrado na literatura (Chiang PW et al,1999).

O número de casos desta série é pequeno mas mostra que existe uma percentagem semelhante de positividade se comparado à carcinoma de mama . Serão necessários novos estudos com maior número de casos para podermos precisar a frequência de positividade para HER-2/neu em adenocarcinoma de

esôfago e JEG. Deve-se notar também que o maior número de casos tiveram sítio primário em JEG (9 casos). Preferimos apenas relatar a frequência de expressão dos itens estudados como o estadiamento tumoral, presença de metástases, sítio primário e grau histológico sem maiores comentários porque o número de casos estudado é pequeno em cada item para maiores discussões .

Determinou-se a frequência de p53 nesta série de casos com a intenção de estabelecer-se uma correlação entre p53 e HER-2/neu. A hipótese era de que a alteração de p53 estaria correlacionada com aumento de expressão de HER-2/neu. Foram achados 59,0% de casos positivos para p53 dos 22 casos estudados. O ponto de corte para positividade utilizado foi de presença de 10% de células com núcleos positivos, o mesmo utilizado pela maioria dos autores na rotina de patologia cirúrgica. Pode-se dizer com relação a frequência de positividade descrita na literatura para alterações de p53 que este estudo obteve números semelhantes (Costa J et al, 2000) ou discordantes conforme outros estudos, sugerindo que nos casos de adenocarcinoma de esôfago, ocorrendo uma co-expressão de p21 possa estar sendo expressa uma variante mais selvagem de p53, embora este estudo tenha sido efetuado sem esta marcação dos dois oncogenes, porém podendo explicar a diferença com a expressão do HER-2/neu (Trudgill NJ et al, 1999).

P53 é o oncogene mais estudado nos tumores de esôfago mas precisa ser mais melhor estudado com estudos de *follow-up* e estudos de ploidia celular, PCR, sequenciamento de DNA, entre outros (Krishnadath et al, 2001). Neste contexto, o uso de imunohistoquímica é um bom método para avaliar a expressão de p53 como um indicador de mutações de p53 nos tumores de epitélio glandular do esôfago. Num relato de 17 casos de adenocarcinoma de esôfago com mutação de p53, a imunohistoquímica revelou acúmulo intranuclear de p53 em 16 . Embora a mutação de p53 seja detectada mais fortemente em displasia de alto grau que em displasia de baixo grau (77% versus 29%, $p < 0,01$), o acúmulo intranuclear de p53 revelado por imunohistoquímica é detectado em 85% de lesões de alto grau e em 71% de lesões de baixo grau. Muitos casos com mutação de p53 (no estudo em 8 casos dentre 77 amostras), a expressão de p53 por imunohistoquímica

ocorreu também em lesões pré-malignas, notoriamente a displasia de alto grau revelando que por imunohistoquímica há maior concordância entre positivities para p53 em adenocarcinoma e em displasia de alto grau e frequentemente discordância em displasia de baixo grau. Neste estudo os autores não encontraram correlação entre a mutação de p53 ou acúmulo de p53 nuclear com os aspectos clinicopatológicos (Yan-Song B, et al, 2001).

O segundo objetivo deste estudo foi estabelecer-se uma correlação entre HER-2/neu e p53. Analisaram-se os dados de duas formas. A primeira a partir de tabelas 2X2 onde foram testados os pares de achados positivos e negativos para p53 e Her-2/neu pelo teste de McNemar sendo que o resultado foi não significativo ou seja não houve diferença significativa entre a positividade para p53 e HER-2/neu assim como não houve diferença significativa entre as frequências negativas. As frequências são iguais. Para o teste de correlação usou-se os escores dos 22 casos. Escore 0-3 para HER-2/neu e escore 0-4 para p53. Utilizando-se o coeficiente de correlação de Spearman houve uma correlação negativa para o primeiro observador -0.27 , e uma correlação de -0.27 para o segundo observador ou seja, quando ocorreu aumento dos escores de HER-2/neu não ocorreu aumento dos escores de p53. Estes achados foram contrários a hipótese inicial. Convém salientar que o resultado foi não significativo para as duas observações $p=0.22$ e $p=0.20$. O índice kappa de concordância entre os dois observadores para HER-2/neu e p53 foi de 0.62 e 0.9 respectivamente, sendo considerado um excelente índice de concordância entre os dois observadores para p53 e de moderada concordância para HER-2/neu.

O estudo destes dois genes tem sido feito em vários trabalhos clínicos em modelos multivariados de prognóstico sendo que em carcinoma de mama HER-2/neu e p53 quando alterados concomitantemente estão relacionados com pior prognóstico, sendo que o tempo livre de doença é inferior nos pacientes com tais alterações.(Yamauchi H et al,2001) .

Especificamente para adenocarcinoma de esôfago, num trabalho de Duhaylongsod e colaboradores em 1995, realizado em amostras cirúrgicas de adenocarcinoma de esôfago, foi encontrado 79% de positividade para p53 e 43% de positividade para

HER-2/neu. Neste estudo, de coorte, a expressão de p53 teve correlação positiva com a presença de doença residual no espécime cirúrgico, mas não com o intervalo livre de doença posterior. Embora o HER-2/neu tenha se correlacionado negativamente com a doença residual após a ressecção e com uma sobrevida de 10% após 5 anos, o HER-2/neu se correlacionou positivamente com uma sobrevida atuarial de 60% em 5 anos (Duhaylongsdod FG et al, 1995)

Muitos autores concordam que alterações de p53 são acompanhadas de alterações em outros oncogenes devido a instabilidade genômica. No entanto, utilizando-se os termos HER-2/neu e p53 não foi encontrado nenhum estudo estabelecendo um coeficiente de correlação entre estes dois marcadores para alguma neoplasia específica. Os resultados deste trabalho apontam para uma correlação negativa. Ainda assim é possível que exista uma correlação entre HER-2/neu e p53 uma vez que o número de casos deste trabalho é pequeno. Para que ocorra correlação, os dois marcadores tem que estar aumentados no mesmo caso o que não ocorreu nesta série de pacientes.

Com os resultados deste estudo concluímos que HER-2/neu está hiperexpresso em adenocarcinoma de esôfago e cárdia (54,5%)em uma porcentagem equivalente a séries preliminares na literatura e portanto merece estudos futuros podendo ser um potencial marcador de prognóstico e alvo de tratamento nesta neoplasia.

Nesta pesquisa o p53 esteve expresso em 59% dos casos e embora esse oncogene esteja expresso frequentemente em adenocarcinoma de esôfago, no estado atual dos conhecimentos o seu valor prognóstico continua limitado.

Não houve correlação de alteração de p53 com hiperexpressão de Her-2/neu o que sugere que as alterações moleculares que levam à progressão desta doença precisam ser melhor entendidas.

8.0 CONCLUSÕES:

Respondendo aos objetivos propostos nesta pesquisa podemos concluir que:

- 1- Her-2/neu apresenta-se expresso com alta frequência (54,5%) nesta série de casos de adenocarcinoma de esôfago terminal e cárdia indicando haver potencial importância de seu estudo nestes tumores.
- 2- Assim como HER-2/neu, p53 também encontra-se alterado nesta série de casos (59%) reproduzindo dados de literatura uma vez que este gene já foi estudado mais extensivamente em neoplasias de esôfago.
- 3- A correlação entre os dois marcadores foi negativa mostrando que apesar de ocorrer alteração na expressão dos dois genes com frequência semelhante à reportada na literatura, a expressão de p53 e HER-2/neu não ocorrem na mesma direção nestes pacientes.

ABSTRACT:

The incidence of esophageal adenocarcinoma and proximal gastric carcinoma has increased in the last few decades due to unclear reasons. These are diseases of the western civilization. The incidence of esophageal adenocarcinoma and cardiac carcinoma are now higher than epidermoid carcinoma of the esophagus. The developments in molecular biology and discovery of the oncogenes and tumor suppressor genes allowed new findings and better understanding of the molecular characteristics of esophageal and gastric adenocarcinomas. Novel genes involved in cell cycle, apoptosis, and DNA repair are now important targets to study the pathogenesis of these tumors. HER-2/neu is an oncogene overexpressed in several malignancies and related to bad prognosis. Also p53 is another important gene altered in 50%-70% of solid malignancies with clinical implications for many tumors. This work determines the frequency of HER-2/neu and p53 overexpression using immunohistochemistry and Dako polyclonal and monoclonal antibodies anti-HER-2/neu and anti-p53 respectively. We selected 22 cases of Esophageal adenocarcinoma and cardiac carcinoma and from the department of surgery. Her-2/neu was positive in 47.7% of cases, mean between two investigators and p53 was positive in 36.6% of cases. A correlation among scores of HER-2/neu and p53 was established using Pearson correlation coefficient and showed a negative result -0.27 for the first investigator which was not significant and the same -0.27 for the second also not significant, showing that increase in the expression of HER-2/neu does not correlate with increase in expression of p53. We concluded that the overexpression of HER-2/neu in this group of malignancies warrants further investigation and despite being altered with many other oncogenes, p53 is not correlated with overexpression of HER-2/neu in these case series.

9.0 Referências:

AL-KASSPOOLES M, MOORE JH, ORRINGER MB et al . Amplification and over-expression of the EGFR and erbB-2 genes in human esophageal adenocarcinomas. *Int. J. Cancer* (1993) 54: 213-219.

AGARWAL ML, TAYLOR WR, CHERNOV MV, et al: The p53 network. (1998) *J Biol Chem* 273, 1-4.

ALLAN NK; WEITZNER S; SCOTT L et al Adenocarcinoma arising in Barret's esophagus with synchronous squamous cell carcinoma of the esophagus. *South Med. J.* (1986)79: 1036-1039.

ALEXANDER HR, KELSEN DG, TEPPER JC: Cancer of the Stomach. In: DeVita VT, Hellmann S & Rosemberg SA. *Cancer Principles and Practice of Oncology* 5th eds. Lippicott-Raven pp: 1021-1054. (1995)

ALLGAYER H, BABIC R, GRUETZNER KU, et al: C-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. (2000) *J Clin Oncol* 18, 2201-2209.

BARRET MT; GALIPEAU PC; CANCHEZ CA et al Determination of the frequency of loss of heterogozity in esophageal adenocarcinomas by cell sorting, whole genome amplification and microsatellite polymorphisms. *Oncogene.* (1996) 12: 1873-1878.

BLOT WJ; DEVESA SS; KNELLER RW et al Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia.(1991) *JAMA* 265: 1287-1289.

BLOUNT PL; GALIPEAU PC; SANCHEZ CA et al 17p allelic losses in diploid cells of patients with Barret's esophagus who develop aneuploidy. (1994) *Cancer Res.* 54: 2292-2295.

BRIEN TP, ODZE RD, SHEEHAM CE, et al: HER-2/neu gene amplification by FISH predicts poor survival in Barrett's esophagous-associated adenocarcinoma. (2000) *Hum Pathol* 31, 35

BRITO MJ, FILIPE MI, LINEHAN J et al Association of transforming growth factor alpha (TGFA) and its precursors with malignant change in Barrett's epithelium: biological and clinical variables. (1995) *Int. J. Cancer* 60: 27-32.

BROWN JP, WEI W, SEDIVY JM, et al: Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts (1997) *Science* 277, 831-834.

BUNZ F, DUTRIAUX A, LENGAUER C, et al: Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. (1998) *Science* 282, 1497-1501.

CAMERON AJ; LOMBOY CT; PERA M et al. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction and Barrett's esophagus. (1995). *Gastroenterology* 109: 1541-1546 .

CARNEY W, HAMER P, TENNEY D, et al: Her-2/neu levels in the serum of metastatic breast cancer (MBC) patients correlates with clinical course of disease. (2000) *Proc AACR Abst* 4567.

CARTER P, PRESTA L, CORNELIA GM, et al: Humanization of an anti-p185 HER2 antibody for cancer therapy. (1992) *Proc Natl Acad Sci* 89, 4285-4289.

CAWLEY HM, MELTZER SJ, BENEDETTI V: Anti-p-53 antibodies in patients with Barrett's esophagus or esophageal carcinoma can predate cancer diagnosis. (1998) *Gastroenterology* 115, 19-27.

CHEJFEC G; JABLOKOW VR; GOULD VE Linitis plastica carcinoma of the esophagus. (1981) *Cancer*, 51: 2139-2143.

CHIANG PW, BEER DG, WEI WL, et al: Detection of erbB-2 amplifications in tumors and sera of esophageal carcinoma patients. (1999) *Clin Cancer Res* 5,1381-1386.

CHILD SJ, MILLER MK, GEBALLET AP: Translational control by an upstream open reading frame in the HER-2/neu transcript. (1999) *J Biol Chem* 274, 24335-24341.

CLARK GW; PETERS JH; IRELAND AP et al. Nodal metastasis and sites of recurrence after bloc esophagectomy for adenocarcinoma. (1994) *Ann. Thorac. Surg.* 58: 646-653.

CLARK GW; SMYRK TC; BURDILES P et al Is Barret's metaplasia the source of adenocarcinomas of the cardia? (1994) Arch. Surg. 129: 609-614.

CODONY-SERVAT J, ALBANELLI J, LOPEZ-TALAVERA JC: HER-2 ectodomain is a pervadante-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. (1999) Cancer Res 59, 1196-1201.

COGGI G, BOSARI S, RONCALLI M, et al: p53 protein acumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. (1997) Cancer 79, 425-432.

CORDON-CARDO C, WARTINGER D, PETRYLAC D, et al: Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. (1992) J Natl Cancer Inst 84, 1251-1256.

CORTNER J & VAN WOUDE GF: Essentials of Molecular Biology.(2000) In: DeVita VT, Hellmann S & Rosemberg SA. Cancer Principles and Practice of Oncology. Lippicott-Raven 5th eds. pp3-33.

COSTA J AND CORDON-CARDO C: Cancer Diagnosis: Molecular Pathology.(2000) In: DeVita Jr. VT, Hellmann S, Rosemberg SA. Cancer. Principles and Practice of Oncology. 6th eds. Pp 641-657.

COUSSENS L, YANG-FENG TL, LIAO Y-C, et al: Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromossomal location with neu oncogene. (1986) Science 230, 1132-1138.

DALBAGNI G, PRESTI JC, REUTER VE, et al: Molecular genetic alterations of chromossome 17 and p53 expression in human bladder cancer. (1993) Diag Mol Pathol 2, 4-13.

DI FIORI PP, PIERCE JH, KRAUS MH, et al: erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. (1987) Science 237, 178-182.

DILLMAN RO: Unconjugated monoclonal antibodies for the treatment of hematologic and solid malignancies. (1999) ASCO Educational Book pp461-468.

DOLAN K, GARDE J, WALKER S, et al: LOH at the sites of the DCC, APC and TP53 tumor supressor genes occurs in Barrett's metaplasia and dysplasia adjacent to adenocarcinoma of the esophagous. (1999) Hum Pathol 30, 1508-1514.

DUHAYLONGSOD FG & WOLFE WG Barret's esophagus and adenocarcinoma of the esophagus at the gastroesophageal junction. (1991) *J.Thorac. Cardiovas. Surg.* 102: 36-41.

DUHAYLONGSOD FG; GOTTFRIED MR; IGLEHART JD et al The significance of c-erb B-2 and p53 immunoreactivity in patients with adenocarcinoma of the esophagus. (1995) *Ann. Surg.* 221: 667-683.

ELLEDEGE SJ, HARPER JW: CDK inhibitors on the threshold of checkpoints and development. (1994) *Curr Opin Cell Biol* 6, 847-852.

ELLEDEGE RM, GREEN S, CIOCCA D, et al: HER-2/neu expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: A Southwest Oncology Group Study. (1998) *Clin Cancer Res* 4, 7-12.

FEARON ER: Molecular Biology of Gastrointestinal cancers.(2000) In: De Vita Jr. VT, Hellman S, Rosemberg SA. Principles and Practice of Oncology. 6th eds. Pp1037-1051.

FUKUSHIGE SI, MATSUBARA K-I, YOSHIDA M, et al: Localization of a novel v-erbB-related gene, C-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. (1986) *Mol Cell Biol* 6, 955-958.

GAREWAL HS, SAMPLINER R, LIU Y, et al Chromosomal rearrangements in Barret's esophagus: A premalignant lesion of esophageal adenocarcinoma. (1989) *Cancer Genet Cytogenet* 42: 281-296.

GLEESON CM, SLOAN JM, McGUIGAN JA et al. Ubiquitous somatic alterations at microsatellite alleles occur infrequently in Barret's – associated esophageal adenocarcinoma. (1996) *Cancer Res.* 56: 259-263.

HARDWICK RH; SHEPHERD NA; MOORGHEN M et al Adenocarcinoma arising in Barret's oesophagus; evidence for the participation of p53 dysfunction in the dysplasia/carcinoma sequence. 1994. *Gut* 35: 764-768.

HAYES DF, YAMAUCHI H, STEARNS V, et al: Should all breast cancers be tested for c-erbB-2? (2000) *ASCO 2000 Educational Book* pp257-265.

HIROTA WK, LOUGHNEY TM, LAZAZ DJ, et al: Specialized intestinal metaplasia, displasia and cancer of the esophagus and esophagogastric junction: prevalence and clinical data. (1999) *Gastroenterology* 116, 277-285.

HOOPER NM, KARRAN EH, TURNER AJ: Membrane protein secretases. (1997) *Biochem J* 321, 265-279.

HUANG Y, MELTZER SJ, YIN J et al. Altered messenger RNA and unique mutational profiles of p53 and Rb in human esophageal carcinomas (1995). *Cancer Res.* 53: 1889-1894.

HUDSON LG, ERTL AP, GILL GN: Structure and inducible regulation of the human c-erbB2/neu promoter. (1990) *J Biol Chem* 265, 4389-4393.

HUNTER S, GRAMLICH T, ABBOTT K et al. Y chromosome loss in esophageal carcinoma: An in situ hybridization study (1993) *Genes Chromosom. Cancer* 8: 172-173.

JACOBS TW Specificity of Hercep Test in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J. Clin. Oncol.* (1999) 17: 1983-1987.

JACOBS TW, GOWN AM, YAZIJI H, et al: Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. (1999) *J Clin Oncol* 17, 193-1987.

JANKOWSKI J, HOPWOOD D, WORMSLEY KG Flow-cytometric analysis of growth regulatory peptides and their receptors in Barret's esophagus and oesophageal adenocarcinoma. (1992) *Scand. J. Gastroenterol.* 27: 147-154.

JERNSTROM P; BREWER LA III. Primary adenocarcinoma of the mid-esophagus arising in ectopic gastric mucosa with associated hiatal hernia and reflux esophagitis (Dawson's Syndrome) (1970) *Cancer* 26: 1343-1348.

JOHNSTON BJ; REED PI Changing pattern of oesophageal cancer in a general hospital in the UK. (1970) *Eur. J. Cancer Prev* 1991. 1: 23-25.

KALISH RJ; CLANCY PE; ORRINGER MB et al. Clinical, epidemiologic, and morphological comparison between adenocarcinoma arising in Barret's esophageal mucosa and in gastric cardia. (1984) *Gastroenterology* 86: 461-467.

KASTAN MB, ONYEKWERE D, SIDRANSKY B, et al: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage (1991) *Cancer Res* 51, 6304.

KASTAN MB, SCHAPECK SX: (2000) Molecular Biology of Cancer: The cell cycle. In: De Vita VT, Hellmann S & Rosenberg SA. Cancer Principles and practice of Oncology 6th eds. Lippicott-Raven pp: 33-56.

KELSEN DP, ILSON DH: Chemotherapy and combined-modality therapy for esophageal cancer. (1995) Chest 107, suppl. 224S-232S.

KHAN M, BUI HX, Del ROSARIO A, et al Role of DNA content determination by image analysis in confirmation of dysplasia in Barret's esophagus(1994)Mod. Pathol. 7: 169-174.

KLAPPER LN, GLATHE S, VAISMAN N, et al: The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. (1999) Proc Natl Acad of Sci USA 96, 4995-5000.

KRISHNADATH KK, TILANUS HW, van BLANKESTEIN M et al Accumulation of genetic abnormalities during neoplastic progression in Barret's esophagus. (1995)Cancer Res 55: 1971-1976

KRISHNADATH KK; REID BJ; WANG KK Biomarkers in Barrett's esophagus .Mayo Clin Proc. (2001) 76: 438-446.

KRONTIRIS TG: Oncogenes. (1995) N Engl J Med 333, 303-306.

LANDIS SH, MURRAY T, BOLDEN S, et al: (1998) Cancer Statistics 1998. CA Cancer J Clin 48, 6-29.

LAUREN P: The two histological main types of gastric carcinomas: diffuse and the so-called intestinal-type carcinoma. (1965) Acta Pathol 64,31.

LEICHMAN L, STEIGER Z, SEYDEL HG, et al: Preoperative chemotherapy and radiation therapy for patients with cancer of the esophagus: a potential curative approach. (1994) J Clin Oncol 2: 75-79.

LERUT T; COOSEMANS W; VAN RAE DONCK D et al Surgical treatment of Barret's carcinoma. Correlations between morphologic findings and prognosis (1994) J. Thorac Cardiovasc Surg 107: 1059-1065.

LI FP, FRAUMENI JR, MULVIHILL JJ, et al: A cancer family syndrome in 24 kindreds. (1988) Cancer Res 48: 5358-5362.

MELTZER SJ; YIN J; MANIN B et al Microsatellite instability occurs frequently and in both diploid and aneuploid cell populations of Barret's – associated esophageal adenocarcinomas. (1994) *Cancer Res* . v 54: 3379-3382 .

MENARD S, CASALINI P, CAMPLIGLIO M: HER-2 overexpression in various tumor types, focusing on its relationship to the development of invasive breast cancer. (2001) *Ann Oncol* 12:15-19.

MING SC. Tumours of the esophagus and stomach, second series. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, p 44-57, 1973.

MING SC Adenocarcinoma and other epithelial tumors of the esophagus In: MING SC; GOLDMAN H , Editors Pathology of the gastrointestinal tract. Williams & Wilkins – 1998. Baltimore. Chap 22 p 499-521.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA. www.inca.org.br/epidemiologia.

MORSTYN G; THOMAS RJ; MA J et al. Similarity between adenocarcinoma (AC) arising in Barret's esophagus (BE) and AC arising at the cardioesophageal junction (CEJ). (1985) *Proc. Annu. Meet Am. Assoc Cancer Res*. 26: 147.

MUSS HB, THOR A, BERRY DA, et al: C-erbB-2 expression and S phase activity predict response to adjuvant therapy in women with node-positive breast cancer. (1994) *N Engl J Med* 330, 1260-1266.

NAEF AP; SAVARY M; OZZELLO L. columnar lined lower esophagus. An acquired lesion with malignant predisposition. Report of 140 cases of Barret's esophagus with 12 adenocarcinomas. (1975) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 70: 826-834.

NAKAMURA T, NEKARDA H, HOELSCHER AH, et al Prognostic value of DNA ploidy and c-erbB-2 oncoprotein overexperssion in adenocarcinoma of Barret's esophagus. (1994)*Cancer* 73 1785-1794.

NISHIKAWA R, JI XD, HARMON RC, et al: A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. (1994) *Proc Natl Acad Sci* 91, 7727-7731.

OCHS J: Childhood acute lymphoblastic leukemia. In: Henderson ES, Lister TA & Greaves MS: (1996) *Leukemia*. Saunders 6th eds. 419-445.

OREN M: Regulation of the p53 tumor suppressor protein. (1999) *J Biol Chem* 274, 36031-36034.

PARAF F; FLEJOU JF; PIGNON JP et al Surgical pathology of adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. Analysis of 67 cases. (1995) *Am. J. Surg. Pathol.* 19: 183-191.

PARSONNET J, FRIEDMAN GD, VANDERSTEEN DP, et al: Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. (1991) *N Engl J Med* 325, 1127.

PAULLETI G, DANDEKAR S, RONG HM: Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: A direct comparison of in fluorescence situ hybridization and immunohistochemistry. (2000) *J Clin Oncol* 18, 3661-3664.

PENNISI E: Filling in the blanks in the p53 protein structure. (1996) *Science* 274, 921-922.

PETERS JH; CLARK GW; IRELAND AP et al Outcome of adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus in endoscopically surveyed and non surveyed patients. (1994) *J. Thorac Cardiovasc. Surg* 108: 813-821.

PIETRAS RJ, ARBOLEDA J, REESE DM, et al: HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. (1995) *Oncogene* 10, 2435-2446

POTET F; FLEJOU JF; GERVAZ H et al. Adenocarcinoma of the lower esophagus and the esophagogastric junction. , 1991. *Semin. Diagn. Pathol.* 8: 126-136.

RABINOVITCH PS, REID BJ, HAGGITT RC et al Progression to cancer in Barrett's esophagus is associated with genomic instability. (1988) *Lab. Invest.* 60: 65-71.

RAMEL S; REID BJ; SANCHEZ CA et al Evaluation of p53 proteins in Barrett's esophagus by two parameter flow cytometry. (1992) *Gastroenterology* 102: 1220-1228.

RAPHAL HA; ELLIS FH Jr ; DOCKERTY MD. Primary adenocarcinoma of the esophagus: 18 year review and review of literature. (1966) *Ann. Surg.* 164:785-796.

RAO PH , MATHEW S, LAUWERS G et al. Interphase cytogenetis of gastric and esophageal adenocarcinomas. (1993) *Diagn. Mol. Pathol.* 2: 264-268.

REID BJ Barret's esophagus and esophageal adenocarcinoma. (1991) *Gastroenterol Clin North Am* . 20: 817-834.

RICE TW; GOLDBLUM JR; FALK GW et al p53 immunoreactivity in Barret's metaplasia, dysplasia and carcinoma. (1994) *J. Thorac. Cardiovasc Surg* 108: 1132-1137.

RIBEIRO U, FINKELSTEIN SD, SAFATLE-RIBEIRO A: p53 sequence analysis predictis treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. (1998) *Cancer* 83, 7-18

RODRIGUEZ E, RAO PH, LADANYI M et al 11p13-15 is a specific region of chromosomal rearrangement in gastric and esophageal adenocarcinomas . (1990) *Cancer Res.* 50: 6410-6416.

ROSEN N: Molecular Biology of gastrointestinal cancers. (2000) In: DeVita VT, Hellmann S & Rosemberg SA. *Cancer Principles and Practice of oncology* 5th rds Lippicott-Raven pp971-980.

ROTH JA, PUTNAN JB JR., RICH TA, et al: (1995) Cancer of the Esophagus. In: Devita VT, Hellmann S & Rosemberg SA. *Cancer Principles and Practice of Oncology* 5th eds. Lippicott-Raven pp: 980-1021.

RUBIN SC, FINSTAD CL, WONG GY, et al: Prognostic significance of HER-2/neu expression in advanced epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis. (1993) *Am J Obstet Gynecol* 168, 162-169.

SANCHEZ E, CHACON I, PLAZA I et al: Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell cycle regulator proteins. (1998) *J Clin Oncol* 16, 1931-1939.

SARBIA M; BORCHARD F; HENGELS KJ. Histogenetical investigations on adenocarcinomas oc the esophagogastric junction. An immunohistochemical study. (1993) *Pathol. Res.* 189: 530-535.

SAUTER ER; KELLER SM; ERNER SM. P53 correlates with improved survival in patients with esophageal adenocarcinoma. (1995) *J. Surg. Oncol.* 58: 269-273.

SCHNEEBERGER AL; FINLEY RJ; TROSTER M et al. The prognostic significance of tumor ploidy and pathology in adenocarcinoma of the esophagogastric junction. (1990) Cancer 65: 1206-1210.

SCHOLL S, BEUZEBOC, POUILLART P: Targeting HER-2 in other tumor types. (2001) Ann Oncol 12: 89-94.

SEGATTO O, KING R, PIERCE JH, et al: Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the C-erbB-2 gene. (1988) Mol Cell Biol 8: 5570-5574.

SHERR CJ: G1 phase progression: cycling on cue. (1994) Cell 79, 551-555.

SHERR CJ: Cancer cell cycles. (1996) Science 274, 1672-1677.

SCHNEIDER PM; CASSON AG; LEVIN B et al Mutations of p53 in Barret's esophagus and Barret's cancer. A prospective study of ninety-eight cases (1996) J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 111: 331-333.

SKLAR JL, COSTA JC: Principles of Cancer management: Molecular Pathology.(2000) In: DeVita VT, Hellmann S & Rosemberg SA. Cancer Principles and Practice of Oncology. Lippicott-Raven 5th eds. Pp259-281.

SLAMON DJ, GODOLPHIN W, JONES LA, et al: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. (1989) Science 244, 707-712.

SMITH RRL; HAMILTON SR; BOINOTT JK et al The spectrum of carcinoma arising in Barret's esophagus. A clinicopathologic study of 26 patients. (1984) Am. J. Surg. Pathol 8: 563-573.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA (SBOC): projeto câncer no Brasil 2000; 215-221.

SPECHLER SJ: The role of gastric carditis in metaplasia and neoplasia at the gastroesophageal junction. (1999) 117, 218-228.

STEMEMERMANN G, HEFFELFINGER SC., NOFFSINGER A et al. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors : oncogenes, tumor supressor genes and growth factors. (1994) Hum. Pathol. V 25: 968-981.

STRITZ JM; ELLIS FH Jr; GIBB SP et al Adenocarcinoma in Barret's esophagus. A clinicopathologic study of 65 cases. (1991) Ann Surg 213: 122-125.

SWIFT A; RISK JM; KINGSNORTH AN et al Frequent loss of heterozygosity on chromosome 17 and 17q11.2q12 in Barret's adenocarcinoma. (1995) Br. J. Cancer. 71: 995-998.

SYMMANS PJ; LINEHAN JM; BRITO MJ et al p53 expression in Barret's oesophagus, dysplasia and adenocarcinoma using antibody DO-7. (1994) J Pathol. 173: 221-226.

TANAKA S, MORI M, AKIYOSHI T, et al: co-expression of GRB7 with epidermal growth factor receptor or HER2/erbB2 in human esophageal carcinoma. (1997) Cancer Res 57, 28-31.

TANG CK ; MING SC Squamous cell carcinoma and variants of the esophagus In: MING SC; GOLDMAN H , Editors Pathology of the gastrointestinal tract. Williams & Wilkins (1998). Baltimore. Chap 21 p 475-497.

THOMAZ CR Jr.: Biology of esophageal cancer and the role of combined modality therapy. (1997) Surgery of the esophagus. In: Surg Clin North Am 77, 1139-1167.

THOMPSON JJ; ZINSSER KR; ENTERLINE HT: Barret's metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. (1983) Hum. Pathol. 14: 42-61.

TYTGAT GN & HAMEETEMAN W. The neoplastic potential of columnar-lined (Barret's) esophagus. (1994) World J. Surg. 16: 308-312.

TRUDGILL NJ; ROYDS JA; SUVARNA SK; RILEY SA Cell cycle regulation in patients with intestinal metaplasia at the gastroesophageal junction. Gut (1999) 44(1): 106A. (Abstract)

TSAI CM, CHANG KT, PERNG RP, et al: Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small cell lung cancer cell lines with HER-2/neu gene expression but not with ras gene mutations. (1993) J Natl Cancer Inst . 85, 897-901.

TYTGAT GN & HAMEETEMAN W. The neoplastic potential of columnar-lined (Barrett's) esophagus. (1994) World J. Surg. 16: 308-312.

WANG HH, ANTONIOLLI DA, GOLDMAN H. Comparative features of esophageal and gastric adenocarcinoma: Recent changes in type and frequency. (1986)Hum. Pathol. 17: 482-487.

WALCH AK, ZITZELSBERGER HF, BRUCH J, et al: Chromosomal imbalances in Barrett's adenocarcinoma and metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. (2000) Am J Pathol 156, 555-566.

WATSON JD, GILMAN M, WITKOWSKI J, et al: Recombinant DNA. (1992) Scient Am Books 2nd eds.

WEBB JN & BUSUTTIL A. Adenocarcinoma at the esophagus and the esophagogastric junction. (1978)Br. J. Surg. 65: 475-479.

WEINBERG RA: The retinoblastoma protein and cell cycle control (1995) Cell 85, 323-330.

WILLETT WC: Goals for nutrition in the year 2000. (1999) CA Cancer J Clin 49, 331-352.

YAMAMOTO T, IKAWA S, AKIYAMA T, et al: Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. (1986) Nature 319, 230-234.

YAMAMOTO T, NISHIDA T, MYAJIMA N, et al: The ErbB gene of avian erythroblastosis virus, is a member of the src gene family. (1983) Cell 35, 71-78.

YAMAUCHI H, STEARNS V AND HAYES DF: When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictor factor in breast cancer. (2001) J Clin Oncol 19,2334-2354.

YAN-SONG B; OSTERHEL MC; BOSMAN FT; BENHATTAR J; FONTOLLIET C p53 gene mutation and protein accumulation during neoplastic progression in Barrett's esophagus . Mod Pathol (2001) 14: 397-403.

YOUNES M; LEBOVITZ RM; LECHAGO LV et al p53 protein accumulation in Barret's metaplasia, dysplasia and carcinoma: a follow up study. (1993) Gastroenterology 105: 1637-1642.

YIN YZ, CLINTON GM: A soluble protein related to HER-2/neu proto-oncogene.(1991) Oncogene 6, 639-643.

**ANEXO I: ESTADIAMENTO DOS TUMORES - CLASSIFICAÇÃO
DOS TUMORES MALIGNOS DO ESÔFAGO (TNM)- FONTE INCA- 2001**



TNM - CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES MALIGNOS



Localização primária

Localização anatômica

Exibir

TNM

**Esôfago
(CID CID-O C15)**

Regras para Classificação

A classificação é aplicável somente para os carcinomas. Deve haver confirmação histológica da doença e divisão dos casos por tipo histológico.

Os procedimentos para avaliação das categorias T, N e M são os seguintes:

Categorias T

Exame físico, diagnóstico por imagem, endoscopia (inclusive broncoscopia)
e / ou exploração cirúrgica

Categorias N

Exame físico, diagnóstico por imagem e / ou exploração cirúrgica

Categorias M

Exame físico, diagnóstico por imagem e / ou exploração cirúrgica

Regiões e SubRegiões Anatômicas

1. Esôfago cervical (C15.0): começa na borda inferior da cartilagem cricóide e termina no estreito superior do tórax (incisura jugular), a aproximadamente 18 cm dos dentes incisivos superiores.

2. Esôfago intratorácico

i) A porção torácica superior (C15.3) estende-se desde o estreito superior do tórax até o nível da bifurcação traqueal, a aproximadamente

24 cm dos dentes incisivos superiores.

ii) A porção torácica média (C15.4) é a metade proximal do esôfago entre a bifurcação traqueal e a junção esôfago-gástrica. O nível inferior está a aproximadamente 32 cm dos dentes incisivos superiores.

iii) A porção torácica inferior (C15.5), com aproximadamente 8 cm de comprimento (inclui o esôfago abdominal), é a metade distal do esôfago entre a bifurcação traqueal e a junção gastro-esofágica. O nível inferior está a aproximadamente 40 cm dos dentes incisivos superiores.

Linfonodos Regionais

Os linfonodos regionais são, para o esôfago cervical, os linfonodos cervicais, incluindo os supraclaviculares, e, para o esôfago intratorácico, os mediastinais e perigástricos, excluindo os linfonodos celíacos.

TNM - Classificação Clínica

T - Tumor Primário

TX

O tumor primário não pode ser avaliado

T0

Não há evidência de tumor primário

Tis

Carcinoma *in situ*

T1

Tumor que invade a lâmina própria ou a submucosa

T2

Tumor que invade a muscular própria

T3

Tumor que invade a adventícia

T4

Tumor que invade as estruturas adjacentes

N- Linfonodos Regionais

NX

Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0

Ausência de metástase em linfonodos regionais

N1

Metástase em linfonodos regionais

M - Metástase à Distância

MX

A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

M0

Ausência de metástase à distância

M1

Metástase à distância

Para os tumores do esôfago torácico inferior

M1a Metástase em linfonodos celíacos.

M1b Outra metástase à distância.

Para os tumores do esôfago torácico superior

M1a Metástase em linfonodos cervicais.

M1b Outra metástase à distância.

Para os tumores do esôfago torácico médio

M1a Não aplicável

M1b Metástase em linfonodo não regional ou outra metástase à distância.

pTNM - Classificação Patológica

As categorias pT, pN e pM correspondem às categorias T, N e M.

pN0 O exame histológico do espécimen de uma linfadenectomia mediastinal incluirá, geralmente, 6 ou mais linfonodos.

Graduação Histopatológica

GX

O grau de diferenciação não pode ser avaliado

G1
Bem diferenciado

G2
Moderadamente diferenciado

G3
Pouco diferenciado

G4
Indiferenciado

Grupamento por Estádios

Estádio 0
Tis
N0
M0

Estádio I
T1
N0
M0

Estádio IIA
T2
N0
M0

T3
N0
M0

Estádio IIB
T1
N1
M1

T2

N1
M0

Estádio III
T3
N1
M0

T4
Qualquer N
M0

Estádio IV
Qualquer T
Qualquer N
M1

Estádio IVA
Qualquer T
Qualquer N
M1a

Estádio IVB
Qualquer T
Qualquer N
M1b

Resumo Esquemático

Esôfago

T1
Lâmina própria, submucosa

T2
Muscular própria

T3
Adventícia

T4
Estruturas adjacentes

N1
Regional

M1
Metástase a distância

Tumor do esôfago torácico inferior

M1a
Linfonodos celíacos

M1b
Outra metástase à distância

Tumor do esôfago torácico superior

M1a
Linfonodos cervicais

M1b
Outra metástase à distância

Tumor do esôfago torácico médio

M1b
Metástase à distância incluindo linfonodos não regionais

ANEXO 2: Protocolo para pesquisa de prontuários do SAMIS do HCPA e para identificação das avaliações histológicas e imunohistoquímicas.

Nome:.....Registro:.....

Idade:..... Sexo:..... Raça:.....

Número AP:----- Data do AP:-----

Diagnóstico anatomopatológico:-----

Tipo de Cirurgia realizada: () curativa
() paliativa

Estágio: T----- N----- M-----

Diagnóstico revisado do AP:-----

Escore de p53: -----

Escore de Her-2/neu:-----

ANEXO 3- Escores de imunohistoquímica dos casos individuais observador 1 e 2:

Numero	p53_1	her_1	numeroAP	diagnostico	P53_2	Her_2
1	0	0	235869	Adeno	0	0
2	0	2	234371	Adeno	0	2
3	4	0	126661	Adeno	3	0
4	4	1	247904	Adeno	4	1
5	3	0	180191	Adeno	3	0
6	0	3	207476	Adeno	0	3
7	0	2	244110	Adeno	0	2
8	1	0	154576	Met LN	2	0
9	0	0	102132	Adeno met	0	0
10	4	3	157783	Met LN	4	2
11	0	0	256200	Adeno	0	0
12	4	0	206408	Adeno	4	0
13	4	1	211542	Adeno	4	1
14	0	3	121928	Adeno	0	2
15	1	2	265978	Adeno	1	3
16	3	0	104476	Implante epiplon	4	0
17	1	2	231280	Adeno	1	3
18	0	2	207961	Adeno	0	1
19	3	0	172544	Met LN	3	0
20	1	3	202008	Adeno met	1	3
21	1	3	105495	Adeno	1	3
22	0	3	204385	Adeno	0	3

ANEXO 4- Diagnósticos Anatomopatológicos revisados e avaliados quanto ao estadiamento , local da lesão, grau histológico, e expressão de p53 e Her-2/neu.

Nº caso	Estadio TNM	Local lesão	Grau Histológico	p53	HER-2/NEU
1	T4N1MX	JEG	II	NEGATIVO	NEGATIVO
2	T4NXM1	CARDIA	II	NEGATIVO	POSITIVO
3	T4N0MX	ESOF	II	POSITIVO	NEGATIVO
4	T2N0M0	JEG	II	POSITIVO	NEGATIVO
5	T4NXMX	ESOF	III	POSITIVO	NEGATIVO
6	TXNXM1	JEG	II	NEGATIVO	POSITIVO
7	TXNXM1	JEG	II	NEGATIVO	POSITIVO
8	T4N1MX	CARDIA	II	NEGATIVO	NEGATIVO
9	TXN1M0	JEG	III	NEGATIVO	NEGATIVO
10	TXNXM1	CARDIA	III	POSITIVO	POSITIVO
11	TXNXM1	JEG	II	NEGATIVO	NEGATIVO
12	T4NXMX	ESOF.	III	POSITIVO	NEGATIVO
13	T4NXMX	CARDIA	III	POSITIVO	NEGATIVO
14	TXNXM1	ESOF.	I	NEGATIVO	POSITIVO
15	TXNXM1	JEG	II	NEGATIVO	POSITIVO
16	TXNXM1	CARDIA	III	POSITIVO	NEGATIVO
17	T1N0M0	JEG	I	NEGATIVO	POSITIVO
18	T4NXM0	ESOF	II	NEGATIVO	POSITIVO
19	T4NXM1	SOE	I	POSITIVO	NEGATIVO
20	T4NXM1	ESOF.	II	NEGATIVO	POSITIVO
21	T3N0M0	JEG	II	NEGATIVO	POSITIVO
22	T4NXMX	ESOF.	I	NEGATIVO	NEGATIVO

ESOF= ESOFAGO; JEG= JUNÇÃO ESOFAGO-GÁSTRICA; TNM- GRAUS DE ESTADIAMENTO DO TUMOR T= TUMOR, N= NÓDULOS LINFÁTICOS E M= METÁSTASES A DISTÂNCIA. X- NÚMERO DESCONHECIDO

