

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS**

**Expressão da Proteína do Gene HER2 no Carcinoma Epidermóide**

**Precoce e Invasivo do Esôfago Torácico**

**HAMILTON CARDOSO HILGERT**

**ORIENTADOR: PROF. LUIS FERNANDO MOREIRA, MD**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DEZEMBRO 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS**

**Expressão da Proteína do Gene HER2 no Carcinoma Epidermóide**

**Precoce e Invasivo do Esôfago Torácico**

**HAMILTON CARDOSO HILGERT**

**ORIENTADOR: PROF. LUIS FERNANDO MOREIRA, MD**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DEZEMBRO 2011**

CIP - Catalogação na Publicação

**Cardoso Hilgert, Hamilton**

Expressão da Proteína do Gene HER2 no Carcinoma Epidermóide Precoce e Invasivo do Esôfago Torácico/ Hamilton Cardoso Hilgert. -- 2011.

61 f.

Orientador: Luis Fernando Moreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Câncer de Esôfago. 2. HER2. 3. Imunoistoquímica. 4. Terapia-alvo. 5. Carcinoma de células escamosas. I. Moreira, Luis Fernando II. Título.

It's choice - not chance - that determines your destiny.

**JEAN NIDETCH**

Anyone who has never made a mistake has never tried anything new.

**ALBERT EINSTEIN**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus filhos Ana Luisa e Artur pois ambos são sempre a minha mola propulsora.

Dedico também à Dra. Enilde Eloena Guerra, minha amiga e “irmã” que sempre esteve comigo me ajudando em grandes decisões.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao colega e amigo Dr. Marcelo Pessoa pela ajuda inestimável e pela parceria de muitos anos o que me possibilitou a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Luis Fernando Moreira, que com sua imensa capacidade, dedicação e paciência, viabilizou a conclusão deste trabalho.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me permitir produzir uma contribuição ao mundo da ciência.

Agradeço a minha mãe Lélia Cardoso Hilgert e às minhas irmãs, em especial Liliane Cardoso Hilgert com quem sempre divido minhas dificuldades e alegrias.

Agradeço ao Dr. Marcio Wallace, amigo e profissional competente.

Agradeço à Professora Luise Meurer e Professora Jane K. Ulbrish pela orientação, paciência e dedicação na análise histopatológica e no apoio logístico.

Agradeço à secretária do PPG-Ciências Cirúrgicas, Estela Maris Emer Araripe, por todo auxílio a mim dispensado em todos os momentos deste curso.

Agradeço aos membros da banca, pela disponibilidade de participar desta defesa.

Agradeço ao agora Dr. Diego Sachet Mattana que tornou fácil as dificuldades inerentes ao projeto.

Agradeço aos alunos de Iniciação Científica do Southern Surgical Oncology Research Group (SSORG), Gabriel Tesche Roman, Fabio Rafael Wasem, Ernidio

Luiz Bassani Filho e Fernando Schmidt Fernandes pela ajuda fundamental para realização deste trabalho.

Agradeço à funcionaria Flávia Rejane Giusti sempre pronta, solícita.

Enfim, agradeço a todos que se fizeram presente nesta etapa tão importante de minha vida.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	09
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
REFERÊNCIAS DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	24
ARTIGO (EM PORTUGUÊS).....	25
MANUSCRIPT (EM INGLÊS).....	41



## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer do esôfago é a oitava neoplasia maligna mais incidente do mundo, o terceiro câncer mais frequente do trato gastrointestinal, com pequena taxa de sobrevida, e o que tem a maior variação na distribuição geográfica entre todas as neoplasias (1). No Brasil, o Rio Grande do Sul, especialmente na região da campanha, apresenta uma das mais altas incidências desse câncer quando comparado com outras regiões (2).

Fatores agressores, como álcool, fumo e bebidas quentes, deficiências nutricionais, mais recentemente, o papiloma vírus humano (HPV), a presença de nitrosaminas na dieta e fatores ocupacionais atuam sobre a mucosa normal levando à diferenciação neoplásica e têm sido incriminados como fatores de risco (3).

O tumor de esôfago geralmente acomete o terço médio e inferior do órgão. Embora recentes avanços obtidos quanto ao diagnóstico, ao tratamento cirúrgico e à terapia neoadjuvante, o prognóstico dos pacientes portadores de câncer do esôfago permanece sombrio, com taxas de sobrevida global em 5 anos entre 5% e 15% (4). A esofagectomia segue sendo o principal tratamento para os tumores no estágio T1N0M0, uma vez que a presença de metástases em linfonodos, nesses casos, deve ser considerada (5). Um estudo que comparou radioquimioterapia definitiva com cirurgia não encontrou diferenças estatisticamente significativas em relação à sobrevida global e o intervalo livre de doença, demonstrando que não

havia superioridade de uma modalidade de tratamento sobre a outra, entretanto, recebeu severas críticas, principalmente em relação aos aspectos éticos (6).

A natureza fundamentalmente genética da doença neoplásica está absolutamente reconhecida pela identificação dos diversos genes envolvidos, estabelecendo contribuições funcionais para este estado de malignidade. Nesse sentido, os tumores do aparelho gastrointestinal têm demonstrado ser formidáveis modelos de estudo (7).

O câncer esofágico se desenvolve por processo multifatorial, onde alterações genéticas e epigenéticas levam a uma sequência de alterações histológicas do epitélio, incluindo, esofagite, hipertrofia de células basais, displasia e, finalmente, câncer avançado (8). Variações individuais no risco de câncer têm sido associadas aos polimorfismos de diferentes genes que se encontram presentes em uma proporção significativa da população normal, o que poderia esclarecer as causas e eventos envolvendo a carcinogênese esofágica (9).

O conhecimento sobre carcinogênese, invasão e metastatização do câncer esofágico tem crescido muito com os avanços no campo da biologia molecular. Muitos estudos têm se focado nas alterações de genes e proteínas. Cerca de 214 proteínas encontram-se desreguladas no câncer de esôfago. A maioria está envolvida nos sinais de transdução, regulação da transcrição, ciclo celular e apoptose (10).

Mutações de p53 e a perda da heterozigose do gene APC são achados frequentes no carcinoma de esôfago (11). A incidência de mutação do *ras* é praticamente nula. Sabe-se que o gene da ciclina D1 encontra-se amplificado em

cerca de 20% dos casos de câncer de esôfago, enquanto que a mutação do p16 ocorre em, aproximadamente, 50% dos casos (12). Também a instabilidade de microssatélite tem sido detectada em 16% a 36% dos casos e parece ocorrer precocemente no desenvolvimento do tumor esofágico (13).

Assim, a compreensão da estrutura e função dos genes associados ao câncer esofágico é fundamental para o estabelecimento de métodos para o diagnóstico tumoral antes da ocorrência de invasão e disseminação, para o descobrimento de novos tratamentos e para a monitorização da eficácia de intervenções terapêuticas e preventivas ou mesmo para a testagem de novos agentes monoclonais específicos que tenham bloqueio efetivo de determinada passagem no processo carcinogênico (14).

Nos últimos anos, o melhor entendimento das vias moleculares da biologia do câncer, tem levado à identificação de várias novas moléculas-alvo. Entre essas, *HER2* implicado no desenvolvimento do tumor de esôfago, e em pacientes em cujos tumores ocorre superexpressão tendem a desenvolver doença mais agressiva com piora no prognóstico (15).

HERs são típicos receptores tirosinoquinase que estão implicados com câncer desde o início dos anos 1980, quando o vírus da eritroblastose aviária foi descoberto e codificava uma forma aberrante de um fator de crescimento epidérmico humano, o receptor EGF, também conhecido como *ErbB1*, *HER1* ou *EGFr*. Atualmente, a família é composta por quatro fatores de crescimento – *EGFR* – ou *HER1*, *HER2*, *HER3* e *HER4* (16).

A ação tumorigênica de *HER2* não se encontra limitada ao potencial efeito proliferativo. Tem sido demonstrado que *HER2* é, também, promotor de metástases. O papel chave para a família HER no aumento do potencial

metastático reside nas habilidades em promover a secreção de enzimas que degradam a membrana basal como as metaloproteinases da matriz, as quais determinam modificações na arquitetura tecidual com a quebra da matriz extracelular, com conseqüentes conseqüentes mudanças nas interações célula-célula e célula-matriz (17, 18).

HER2 também está superexpressado em outros tipos de tumores como adenocarcinomas do trato gastrointestinal, carcinoma de ovário, glioblastoma multiforme e carcinoma de pulmão (19). Sabe-se que as alterações de *HER2* já foram demonstradas com importante papel prognóstico e terapêutico na carcinogênese gástrica (20). A superexpressão do HER2 já foi documentada em ate 30,3% dos pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (21). Dessa forma, a imunoterapia contra células T e anticorpos monoclonais HER2-Alvo parecem ser uma abordagem interessante na adjuvância de pacientes com câncer de esôfago (22). Todavia, o real papel do *HER2* em tumor de esôfago ainda não tem sido claramente demonstrado.

Levando-se em consideração esses dados, resolveu-se determinar a expressão imunohistoquímica da proteína do oncogene *HER2* em mucosa esofágica de pacientes com tumor precoce e invasivo, uma vez que a determinação da frequência de ocorrência do *HER2* em tumores de esôfago poderia ser de auxílio na abordagem terapêutica e no prognóstico desses tumores. A compreensão desses eventos moleculares pode ter, em curto prazo, três aplicações clínicas: diagnóstico precoce, determinação de marcador prognóstico mais acurado e precoce, com melhoria terapêutica, com tratamento antitirosinoquinase específico.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O câncer do esôfago é a oitava neoplasia maligna mais incidente do mundo, o terceiro câncer mais frequente do trato gastrointestinal, com pequena taxa de sobrevivência, é o que tem a maior variação na distribuição geográfica entre todas as neoplasias (1, 23). Acomete indivíduos a partir da meia-idade e raramente é demonstrado abaixo dos 25 anos. O tipo epidermoide é ainda o mais frequente, com incidência variando de menos de 5/100.000 habitantes em brancos americanos até mais de 10/10.000 em chineses e iranianos, sendo, nessas áreas, igualmente, incidente entre homens e mulheres (1).

No Brasil, a maior incidência é encontrada no estado do Rio Grande do Sul, principalmente na região da campanha. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram previstos, para o ano de 2010, no Brasil, 7.890 novos casos de neoplasia maligna do esôfago em homens e 2.740 em mulheres (24). O estado do Rio Grande do Sul apresentara, nesse ano, a maior taxa bruta de incidência do país com 18,5 casos/100.000 homens e 7,18 casos/100.000 mulheres, contribuindo com 1.460 novos casos (24).

Fatores agressores, como álcool e fumo (3), deficiências nutricionais, mais recentemente, o papiloma vírus humano (HPV), a presença de nitrosaminas na dieta e fatores ocupacionais (25) atuam sobre a mucosa esofágica, levando à diferenciação neoplásica, sendo descritos como fatores de risco. Hábitos culturais, como a ingestão de certos tipos de bebidas servidas quentes, comuns em algumas regiões de alta incidência de câncer de esôfago e esofagite crônica concomitante,

levaram a considerações sobre o papel da lesão térmica sobre a mucosa esofágica (26, 27).

Embora recentes avanços obtidos quanto ao diagnóstico, ao tratamento cirúrgico e à terapia neoadjuvante, o prognóstico dos pacientes portadores do câncer do esôfago permanece sombrio, com taxas de sobrevida global em 5 anos entre 5% e 15% (4). A esofagectomia segue sendo o principal tratamento para os tumores no estágio T1N0M0, uma vez que a presença de metástases em linfonodos, nesses casos, deve ser considerada (5). Um estudo que comparou radioquimioterapia definitiva com cirurgia não encontrou diferenças estatisticamente significativas em relação à sobrevida global e o intervalo livre de doença, demonstrando que não havia superioridade de uma modalidade de tratamento sobre a outra, entretanto, recebeu severas críticas, principalmente em relação aos aspectos éticos (6).

A natureza fundamentalmente genética da doença neoplásica está reconhecida pela identificação dos diversos genes envolvidos, estabelecendo contribuições funcionais para este estado de malignidade. Nesse sentido, os tumores gastrointestinais têm demonstrado ser formidáveis modelos clínicos de estudo (7). O câncer colorretal, por exemplo, tem sido considerado modelo humano ideal para a compreensão da carcinogênese devido à disponibilidade tecidual relativamente de fácil acesso, à existência de lesões precursoras e síndromes familiares claramente definidas – as poliposes adenomatosas familiares (FAP) –, tem levado a um avanço no conhecimento do processo de carcinogênese envolvido nesses tumores (28)

O conhecimento sobre carcinogênese, invasão e metastatização do câncer esofágico tem crescido muito com os avanços no campo da biologia molecular. Muitos estudos têm se focado nas alterações de genes e proteínas. Aproximadamente 214 proteínas encontram-se desreguladas no câncer de esôfago, a maioria envolvida nos sinais de transdução, regulação da transcrição, ciclo celular e apoptose (10).

O câncer esofágico se desenvolve por um processo multifatorial onde defeitos genéticos e epigenéticos levam a uma sequência de alterações histológicas no epitélio, incluindo, esofagite, hipertrofia de células basais, displasia e, finalmente, tumor avançado (8). Variações individuais no risco de câncer do esôfago têm sido associadas com polimorfismos de diferentes genes que se encontram presentes em uma proporção significativa da população normal. Tais achados poderiam levar a um esclarecimento quanto as causas e eventos envolvidos na carcinogênese esofágica (9).

Mutações de p53 e a perda da heterozigose do gene *adenomatous polyposis coli (APC)* são achados frequentes no carcinoma de esôfago (11). A incidência de mutação do *ras* é praticamente nula. Não se sabe se há mutação do *ras* ou a ativação do receptor da tirosinoquinase da ciclina com consequente ativação dos complexos ciclina/tirosinoquinase dependente da ciclina. Sabe-se que a ativação dos receptores de tirosinoquinase determina aumento da expressão da ciclina D, que libera fatores de transcrição, acarretando progressão para a fase G1 do ciclo celular, mas podem ser inibidos pela p16, que se encontra mutada em 50% dos casos de carcinomas de células escamosas de esôfago, enquanto a ciclina D1 encontra-se amplificada em cerca de 20% dos casos (12). Portanto, provavelmente a ativação funcional da tirosinoquinase da ciclina D seja

evento necessário para o desenvolvimento de câncer esofágico e pode ser mediado tanto pela superexpressão de ciclina D quanto pela falta de p16 (28).

Em estudo realizado com imunohistoquímica em espécimes cirúrgicos de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago operados com intenção curativa, não foi possível correlacionar a expressão de p27, p53 e pRb com a sobrevida global, entretanto, p21 foi considerado fator prognóstico independente (29, 30). Pacientes que preservam a expressão da caderina E com ausência de ciclina D1 apresentam melhor prognóstico (31). A família da proteína bcl-2 tem papel importante na apoptose. Baixa expressão dessa proteína ocorre em pacientes mais jovens portadores de câncer esofágico, estando relacionada com piora na sobrevida (32). A instabilidade de microssatélite tem sido detectada em 16% a 36% dos tumores esofágicos e parece ocorrer precocemente no desenvolvimento destes tumores (13). HERs são típicos receptores tirosinoquinase que estão implicados com câncer desde o início dos anos 1980, quando o vírus da eritroblastose aviária foi descoberto e codificava uma forma aberrante de um fator de crescimento epidermico humano, o receptor EGF, também conhecido como *ErbB1*, *HER1* ou *EGFr*. Atualmente, a família é composta por quatro fatores de crescimento – *EGFR* – ou *HER1*, *HER2*, *HER3* e *HER4* (16).

Todos os membros possuem um ectodomínio (extracelular) contendo um local para união com o ligante, uma região transmembrana e uma região intracelular (citoplasmática) contendo o domínio tirosinoquinase. Os HERs são expressos em diversos tecidos de origem epitelial, mesenquimal e neuronal. Em condições fisiológicas normais, a ativação dos HERs é controlada pela expressão espacial e temporal dos seus ligantes, que são membros da família EGF dos fatores de crescimento (33). Nenhum dos peptídeos da família EGF se liga ao



*HER2*; entretanto, *MUC4*, membro da família mucina, age como modulador intramembrana da atividade do *HER2* (34).

HERs ativados estimulam muitas vias de sinalização intracelular e, apesar da sobreposição extensiva nas moléculas que são recrutadas aos diferentes receptores ativos, diferentes HERs modulam, preferencialmente, determinadas vias de sinalização, devido às suas propriedades individuais de ligação com proteínas efetoras específicas. As duas principais vias de sinalização ativadas pelos receptores são a quinase de proteína mitogênica-ativada (MAPK) e a quinase do fosfatidilinositol 3 (PI3K) – via de AKT (19, 35, 36).

No tecido normal, o *HER2* que é desprovido de ligante, funciona somente quando dimerizado com algum outro membro da família de receptores, resultando no mais prevalente dímero em vários tecidos humanos. O heterodímero que contém *HER2* gera potente sinalização intracelular, maior que a advinda de outros complexos (37). O oncogene *HER2* está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21-q22) sendo o seu produto, uma proteína de 185 kDa, homologicamente muito semelhante ao receptor do fator de crescimento epidérmico (38).

O aumento na expressão de *HER2* no câncer fortalece e prolonga a sinalização tanto de (PI3K/Akt) quanto de *MAPK* (39, 40) e negativamente induz a regulação dos pontos de controles celulares, associando à elevação na regulação deste receptor com o fenótipo maligno. A hiperativação da via PI3K/Akt, observada em tumores com aumento na atividade *HER2*, e o defeito genético nas moléculas ao longo das vias apoptóticas impedem a apoptose das células tumorais (41).

Já está comprovado que a indução da proliferação celular mamária normal, induzida por *HER2*, necessita da cooperação de outros fatores como os promotores da sobrevivência, dando suporte à ideia de que o tipo de sinal originado da superexpressão de *HER2* depende de defeitos adicionais na atividade genética controladora da supressão do ciclo celular (42). Nos tecidos normais, a sinalização induzida pela família HER é controlada por diversos mecanismos que asseguram uma apropriada sintonia de sinais. Desfosforilação dos receptores, dissociação do ligante/receptor, diminuição da regulação dos receptores por endocitose que podem tornar alvo estas moléculas, tanto a degradação lisossômica, (promovendo o sinal de atenuação e diminuindo a mitogenicidade) ou reciclando o receptor para a membrana plasmática (resultando em potencialização da sinalização pelo receptor). Hiperativação de *HER2* em células cancerosas ativa a cascata na maior parte destes processos (43). Novas vias de regulação negativas da família HER estão emergindo, como as da transdução tardia associada ao receptor (RALT), capazes de suprimir os sinais mitogênicos e de sobrevivência, induzidos pelos HER, através da interação direta com todos os diferentes dímeros HER com diferentes potenciais relativos (44).

A ação tumorigênica de *HER2* não se encontra limitada ao potencial efeito proliferativo. *HER2* também é promotor de metástases, pois tem sido associado com a capacidade invasora *in vitro* e com fenótipo maior *in vivo*. O papel-chave para a família HER no aumento do potencial metastático reside na habilidade em promover a secreção de enzimas que degradam a membrana basal como as metaloproteinases da matriz, as quais determinam modificações na arquitetura tecidual com a quebra da matriz extracelular, com conseqüentes mudanças nas interações célula-célula e célula-matriz (17, 18). Essas alterações, junto com

mudanças nas funções das integrinas e caderinas, frequentemente observadas em células tumorais ativadas por HER, facilitam a sinalização entre as células tumorais, liberando-as do controle do microssistema (41).

*HER2* também está superexpressado em outros tipos de tumores como adenocarcinomas do trato gastrointestinal, carcinoma de ovário, glioblastoma multiforme e carcinoma de pulmão (19). Sabe-se que as alterações de *HER2* já foram demonstradas com importante papel prognóstico e terapêutico na carcinogênese gástrica (20, 45). A superexpressão do *HER2* já foi documentada em até 30,3% dos pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago (21). Desta forma, a imunoterapia contra células T e anticorpos monoclonais HER2-Alvo parecem ser uma abordagem interessante para na adjuvância de pacientes portadores com câncer de esôfago (22). Todavia, o real papel do *HER2* em tumor de esôfago ainda não tem sido claramente demonstrado.

A compreensão da estrutura e função dos genes associados ao câncer esofágico é fundamental para o estabelecimento de métodos para o diagnóstico tumoral antes da ocorrência de invasão e disseminação como também para o descobrimento de novos tratamentos e para a monitorização da eficácia de intervenções preventivas e terapêuticas ou mesmo para a testagem de novos agentes específicos e monoclonais para bloqueio efetivo de determinada passagem no processo carcinogênico (14).

Nos últimos anos, o melhor entendimento das vias moleculares da biologia do câncer tem levado à identificação de várias novas moléculas-alvo. Entre essas, *HER2* implicado no desenvolvimento do tumor de esôfago e, principalmente, em pacientes em cujos tumores ocorre superexpressão tendem a desenvolver doença mais agressiva com piora no prognóstico (15). Além disso, as inovações no

campo do desenvolvimento de drogas permitiram a introdução de agentes que são específicos contra determinados alvos moleculares. Entretanto, os dados atuais disponíveis dos ensaios clínicos avaliando esses agentes ainda são limitados para tumor de esôfago (46). A incorporação desses marcadores em protocolos de rastreamento, de diagnóstico precoce ou em regimes terapêuticos combinados para tumores avançados, como alvo de mecanismos de ação para inibição da família HER, parece levar as pesquisas atuais na direção de novas oportunidades na abordagem do câncer esofágico (47).

## REFERÊNCIAS

1. Eslick GD. Epidemiology of esophageal cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2009 Mar;38(1):17-25, vii.
2. Prolla JC, Dietz J, da Costa LA. [Geographical differences in esophageal neoplasm mortality in Rio Grande do Sul]. *Rev Assoc Med Bras.* 1993 Oct-Dec;39(4):217-20.
3. Yu MC, Garabrant DH, Peters JM, Mack TM. Tobacco, alcohol, diet, occupation, and carcinoma of the esophagus. *Cancer Res.* 1988 Jul 1;48(13):3843-8.
4. Scarpa M, Valente S, Alfieri R, Cagol M, Diamantis G, Ancona E, et al. Systematic review of health-related quality of life after esophagectomy for esophageal cancer. *World J Gastroenterol.* [Review]. 2011 Nov 14;17(42):4660-74.
5. Motoori M, Yano M, Ishihara R, Yamamoto S, Kawaguchi Y, Tanaka K, et al. Comparison Between Radical Esophagectomy and Definitive Chemoradiotherapy in Patients with Clinical T1bN0M0 Esophageal Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012 Feb 1.
6. Chiu PW, Chan AC, Leung SF, Leong HT, Kwong KH, Li MK, et al. Multicenter prospective randomized trial comparing standard esophagectomy with chemoradiotherapy for treatment of squamous esophageal cancer: early results from the Chinese University Research Group for Esophageal Cancer (CURE). *J Gastrointest Surg.* [Comparative Study Multicenter Study Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Jul-Aug;9(6):794-802.
7. Moreira LF, Dillenburg CF. Biologia molecular dos tumores do trato digestivo. *Revista HCPA.* 2001;21(1):59-72.
8. Taghavi N, Biramijamal F, Sotoudeh M, Moaven O, Khademi H, Abbaszadegan MR, et al. Association of p53/p21 expression with cigarette smoking and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma patients. *World J Gastroenterol.* 2010 Oct 21;16(39):4958-67.
9. Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and esophageal cancer risk. *Int J Cancer.* 2007 Oct 15;121(8):1643-58.
10. Lin DC, Du XL, Wang MR. Protein alterations in ESCC and clinical implications: a review. *Dis Esophagus.* 2009;22(1):9-20.
11. Kwong KF. Molecular biology of esophageal cancer in the genomics era. *Surg Clin North Am.* 2005 Jun;85(3):539-53.
12. Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein IB. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res.* 1992 May 15;52(10):2980-3.
13. Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene.* 1994 Jan;9(1):29-32.
14. Becker KF, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol.* 2000 Jul;9(1):5-11.
15. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2003 Mar 10;284(1):99-110.
16. Burden S, Yarden Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron.* 1997 Jun;18(6):847-55.
17. P Oo, Rhys-Evans P, Court WJ, Box GM, Eccles SA. Differential modulation of proliferation, matrix metalloproteinase expression and invasion of human head and neck squamous carcinoma cells by c-erbB ligands. *Clin Exp Metastasis.* 1999;17(7):631-9.
18. Tan M, Yao J, Yu D. Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res.* 1997 Mar 15;57(6):1199-205.

19. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):127-37.
20. LIMA FKCR, A S ; KULCZYNSKI, J. M. ; MATTANA, D. S. ; COREZOLA, K L ; MOREIRA, L. F. . Immunohistochemical expression of HER/neu-c-erbB-2 in patients with adenocarcinoma of the stomach. . *Journal of the Brazilian College of Surgeons.* 2009;36(131-134).
21. Mimura K, Kono K, Hanawa M, Mitsui F, Sugai H, Miyagawa N, et al. Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2005 Apr 11;92(7):1253-60.
22. Maruyama T, Mimura K, Sato E, Watanabe M, Mizukami Y, Kawaguchi Y, et al. Inverse correlation of HER2 with MHC class I expression on oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2010 Aug 10;103(4):552-9.
23. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Aug;19(8):1893-907.
24. (INCA) INdC. Estimativa 2010: Incidência de Cancer no Brasil. 2010 07/07/2010.
25. Kamangar F, Chow WH, Abnet CC, Dawsey SM. Environmental causes of esophageal cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2009 Mar;38(1):27-57, vii.
26. Umbenhauer D, Wild CP, Montesano R, Saffhill R, Boyle JM, Huh N, et al. O(6)-methyldeoxyguanosine in oesophageal DNA among individuals at high risk of oesophageal cancer. *Int J Cancer.* 1985 Dec 15;36(6):661-5.
27. BARROS SGSd, GHISOLFI ES, LUZ LP, BARLEM GG, VIDAL RM, WOLFF FH, et al. Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. *Arquivos de Gastroenterologia.* 2000;37:25-30.
28. Rosen N. *Cancer: Principles and practice of oncology.* 1997:971-80.
29. Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Hatano K, Kitayama J, et al. p21Waf1/Cip1 expression is a prognostic marker in curatively resected esophageal squamous cell carcinoma, but not p27Kip1, p53, or Rb. *Ann Surg Oncol.* 1999 Jul-Aug;6(5):481-8.
30. Contu SS, Contu PC, Damin DC, Fagundes RB, Bevilacqua F, Rosa AS, et al. pRB expression in esophageal mucosa of individuals at high risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. *World J Gastroenterol.* 2007 Mar 21;13(11):1728-31.
31. Prognostic significance of CyclinD1 and E-Cadherin in patients with esophageal squamous cell carcinoma: multiinstitutional retrospective analysis. Research Committee on Malignancy of Esophageal Cancer, Japanese Society for Esophageal Diseases. *J Am Coll Surg.* 2001 Jun;192(6):708-18.
32. Lehrbach DM, Nita ME, Cecconello I. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. *Arq Gastroenterol.* 2003 Oct-Dec;40(4):256-61.
33. Schlessinger J. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science.* 2004 Nov 26;306(5701):1506-7.
34. Ramsauer VP, Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):30142-7.
35. Schroeder JA, Lee DC. Dynamic expression and activation of ERBB receptors in the developing mouse mammary gland. *Cell Growth Differ.* 1998 Jun;9(6):451-64.
36. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 2000 Jul 3;19(13):3159-67.
37. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res.* 2003 Mar 10;284(1):54-65.

38. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*. 1985 Dec 6;230(4730):1132-9.
39. Karunakaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, et al. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J*. 1996 Jan 15;15(2):254-64.
40. Waterman H, Alroy I, Strano S, Seger R, Yarden Y. The C-terminus of the kinase-defective neuregulin receptor ErbB-3 confers mitogenic superiority and dictates endocytic routing. *EMBO J*. 1999 Jun 15;18(12):3348-58.
41. Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa SM, Tagliabue E. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Dec;61(23):2965-78.
42. Debnath J, Mills KR, Collins NL, Reginato MJ, Muthuswamy SK, Brugge JS. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell*. 2002 Oct 4;111(1):29-40.
43. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*. 2000 Dec 11;19(53):6102-14.
44. Anastasi S, Fiorentino L, Fiorini M, Fraioli R, Sala G, Castellani L, et al. Feedback inhibition by RALT controls signal output by the ErbB network. *Oncogene*. 2003 Jul 3;22(27):4221-34.
45. Koretz K, Schlag P, Moller P. Expression of epidermal growth factor receptor in normal colorectal mucosa, adenoma, and carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1990;416(4):343-9.
46. Aklilu M, Ilson DH. Targeted agents and esophageal cancer--the next step? *Semin Radiat Oncol*. 2007 Jan;17(1):62-9.
47. Syrigos KN, Zalonis A, Kotteas E, Saif MW. Targeted therapy for oesophageal cancer: an overview. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Jun;27(2):273-88.

## **HIPÓTESES E OBJETIVOS**

### ***Hipótese Nula***

Pacientes com carcinoma epidermóide precoce do esôfago ou ainda com carcinoma epidermóide invasivo do esôfago não apresentam expressão imunohistoquímica da proteína do oncogene HER2.

### ***Hipótese Operacional***

Pacientes com carcinoma epidermóide precoce do esôfago ou ainda com carcinoma epidermóide invasivo do esôfago apresentam expressão imunohistoquímica da proteína do oncogene HER2.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Determinar a prevalência da expressão imunohistoquímica de HER2 na mucosa esofágica de pacientes portadores de CEE precoce e avançado.

### **Objetivos Secundários**

Relacionar as alterações de expressão de HER2 nos estágios precoce e avançado.

Relacionar as alterações com o grau de diferenciação celular do tumor.

Relacionar as alterações com o estadiamento da doença

Relacionar as alterações com o prognóstico.



## ARTIGO

### Expressão da Proteína do Gene HER2 em Pacientes com Carcinoma Epidermóide Precoce e Invasivo do Esôfago Torácico

Cabeçalho: HER e tumor de esôfago

Hamilton Cardoso Hilgert, MCh  
Diego Sachet Mattana, BS  
Gabriel Tesche Roman, BSc  
Fabio Rafael Wasem, BSc  
Ernidio Luiz Bassani Filho, Bsc  
Fernando Schmidt Fernandes, BSc  
Marcelo Castro Marçal Pessoa, BSc  
Jane Ulbricht Kulczynski, MD  
Luise Meurer, MD  
Luis Fernando Moreira, MD\*

Artigo: 3 tabelas, 2 figuras, 3447 palavras e 39 referências

Sem conflitos de interesse a declarar

\*Separatas e correspondência para:

Luis F. Moreira, MD  
Southern Surgical Oncology Research Group  
Programa de Pós-Graduação em cirurgia  
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul e Departamento de Cirurgia  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital Universitário  
Rua Ramiro Barcelos 2400, 6F sala 600A  
91.035.095 Porto Alegre, RS, Brasil  
Email: lufmoreira@hcpa.ufrgs.br

Porto Alegre, Março 2012

## Resumo

**Introdução:** *HER2* tem sido identificado em muitos tumores e no câncer mamário melhorou significativamente o prognóstico quando utilizada a terapia-alvo. No entanto, pouco se sabe sobre *HER2* no câncer esofágico.

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi investigar a prevalência da expressão de *HER2* no câncer esofágico de células escamosas.

**Pacientes e Métodos:** Estudo preliminar para avaliar *HER2* (Método do ABC, HercepTest®) foi realizado em 10 e 75 amostras aleatórias de tumores precoces e avançados de pacientes submetidos a ressecção cirúrgica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), da Faculdade da Medicina, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

**Resultados:** 60 homens (70%) e 25 mulheres (30%); a mediana de idade (variação) foi 59 (29 a 85) anos. A maioria dos casos eram de estágios mais precoces I-IIb (n=57; 67%), graus I ou II (n=69; 81%), Tis-T2 (n=44; 52%), com linfonodos negativos (n=44; 54%), medindo (DP) 4,7 (2,0) e variando de 2,0 a 9,0 cm. Quanto maior a profundidade de invasão, tanto mais linfonodos envolvidos ( $p < 0,03$ ). Imunoreação citoplasmática de *HER2* ocorreu em 15 (18%) casos. Somente em três casos (3%), houve reação considerada positiva (2+/3+) pelo HercepTest® (todos avançados). Nenhuma diferença significativa foi observada quanto ao *HER2* em relação a diferenciação, profundidade da invasão, metástase linfonodal ou estágio tumoral.

**Conclusão:** *HER2* não parece estar implicado nas fases iniciais da carcinogênese esofágica. A elevada expressão citoplasmática sugere prosseguimento na investigação com a inclusão de adenocarcinomas e avaliação por FISH/CISH.

Palavras-chave: Esôfago; Carcinoma de células escamosas; *HER2*; Carcinogênese; Imunoistoquímica; Oncogene; Terapia-Alvo

## INTRODUÇÃO

O carcinoma do esôfago é a oitava neoplasia maligna mais incidente do mundo, o terceiro câncer mais frequente do trato gastrointestinal (TGI) e com pequena taxa de sobrevida. Os tumores de esôfago são classificados em dois principais tipos histológicos – carcinoma epidermóide e adenocarcinoma. A incidência destes dois tipos revela notáveis variações geográficas, sugerindo, que cada área tem seus próprios fatores de risco ambientais. Tanto o fumo quanto o consumo do álcool são os principais fatores de risco estabelecidos para os carcinomas do tipo epidermóide (1). No Brasil, o Rio Grande do Sul, especialmente, na região da Campanha, possui a taxa de incidência mais elevada do carcinoma epidermóide de esôfago, quando comparado as outras regiões (2). Além disso, anormalidades genéticas nos carcinomas epidermóides de esôfago, como alterações na regulação do ciclo celular, fatores de crescimento e seus receptores e aquelas relacionadas aos sistemas de reparo do DNA, vem sendo investigadas (3).

O tumor de esôfago geralmente acomete os terços médio e inferior do órgão. Não obstante, o diagnóstico seja feito em estágios mais avançados da doença, o prognóstico dos pacientes com carcinoma epidermóide, embora insatisfatório, tem melhorado nestes últimos anos com taxas de sobrevida entre 5 e 20% (4). A esofagectomia permanece sendo o principal tratamento para os tumores epidermóides no estágio clínico T1bN0M0 uma vez que as taxas de linfonodos patologicamente positivos nestes casos não são insignificantes (5). Um estudo que comparou quimiorradioterapia definitiva à cirurgia como tratamento único, não encontrou nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação a sobrevida global ou intervalo livre de doença, demonstrando não haver uma modalidade de tratamento superior a outra, entretanto, este estudo sofreu graves críticas por prescindir de alguns preceitos éticos (6).

Considerando que a sobrevida global após a cirurgia usada como tratamento definitivo segue pobre, abordagens com terapias multimodais tem sido desenvolvidas na tentativa de se melhorar resultados. A cirurgia definitiva como único tratamento, não pode mais ser considerada para pacientes portadores de tumores localmente avançados. Atualmente, o interesse científico está focado na resposta tumoral à indução quimiorradioterápica (7), embora a combinação ideal com melhores resultados não tenha sido ainda claramente definida (8).

O entendimento das alterações em nível molecular na carcinogênese esta provocando uma mudança de paradigma na oncologia. O diagnóstico de alterações moleculares tem sido demonstrado em cada tipo de tumor e futuramente tais alterações poderão ter papel chave no tratamento. Isto permitirá prever a resposta tumoral ao tratamento com substancial aumento na acurácia, permitindo a estratificação de determinados subgrupos ou até mesmo a um eventual tratamento individualizado (9).

*HER2* é membro de uma família composta por quatro membros de receptores dos fatores de crescimento e no câncer de mama e sua testagem rapidamente alcançou *status* de padrão ouro para a avaliação do câncer. Existe um interesse considerável em *HER2* como fator prognóstico e seu uso como terapia alvo nos tumores de Trato Gastrointestinal (10).

A superexpressão de *HER2* já foi documentada em até 30% dos pacientes com tumor epidermóide de esôfago (11) e assim, imunoterapia *HER2*-Alvo parece ser uma abordagem interessante nesses pacientes (12).

Levando-se em consideração esses dados, resolveu-se determinar a expressão imunistoquímica da proteína do oncogene HER2 em mucosa esofágica de pacientes com carcinoma epidermóide precoce e invasivo, uma vez que a determinação da frequência de ocorrência do *HER2* nas amostras de pacientes da região de maior incidência do Brasil (Sul) pode resultar em maior entendimento das alterações dos mecanismos moleculares associados ao processo carcinogênico multifatorial, bem como pode ser de auxílio na abordagem terapêutica e no prognóstico desses pacientes. A compreensão desses eventos moleculares pode ter, em curto-prazo, três aplicações clínicas: diagnóstico precoce, determinação de marcador prognóstico mais acurado e, talvez melhoria na terapêutica com a associação antitiroquinase específico aos regimes de quimiorradioterapia se expressão elevada desta proteína for encontrada.

## PACIENTES E MÉTODOS

Foram revisados os registros de 85 pacientes obtidos de forma aleatória em que havia comprovação histopatológica de carcinoma epidermóide primário precoce ou avançado de esôfago e que foram à ressecção cirúrgica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período entre janeiro de 2000 e dezembro de 2010. Foram incluídos neste estudo preliminar, após a aprovação no comitê de ética da instituição (#09225#). Este trabalho faz parte da linha de pesquisa do Southern Surgical Oncology Research Group (SSORG) e do programa de Pós-Graduação em Cirurgia da referida universidade. Foram excluídos da amostra todos os casos de pacientes que tivessem outras neoplasias malignas com exceção de carcinoma basocelular ou epidermóide de pele ou que tivessem recebido quimio ou radioterapia previamente a cirurgia. Todos os pacientes foram submetidos à esofagectomia transhiatal ou transtorácica radical com dissecação linfonodal em dois campos.

Características demográficas e epidemiológicas como idade, sexo, tamanho e localização do tumor, grau de diferenciação, número de linfonodos ressecados e metastáticos, bem como o estadiamento clínico e patológico foram investigados. Cortes dos blocos de parafina das peças cirúrgicas armazenadas e fixadas em formalina, foram submetidos à análise histopatológica pela coloração de hematoxilina-eosina e para determinar a expressão de *HER2* pela imunistoquímica. Os tumores foram classificados segundo a American Joint Committee on Cancer (AJCC 2010) sistema TNM 7ª. edição (14). As características clinicoepidemiológicas dos pacientes são mostradas na Tabela 1.

A análise imunistoquímica foi efetuada utilizando-se anticorpos “anti-human c-erbB-2 oncoprotein” (Dakocytomation-CA, USA) que reconhecem o oncogene *cerbB-2* / *HER2* (Dakocytomation-CA, USA). Os cortes de tecido tumoral foram testados em relação à expressão de *HER2* pelo método da imunistoquímica de acordo com a rotina técnica do laboratório do Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com o anticorpo primário previamente referido. Após desparafinização e reidratação, a recuperação antigênica foi realizada em sessões de banho-Maria com água a 95°C por 40 min. com tampão de citrato. Para o bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 5% diluído em água destilada por dois períodos de 5 min. Depois as lâminas foram lavadas com água destilada e por mais 3 minutos em SST. Para bloquear a atividade inespecífica de outras proteínas as lâminas foram deixadas em solução de leite em pó desnatado a 5% diluído em SST por 20 min. e, após, foram lavadas com água destilada. Após novo banho em SST, foram incubadas em câmara úmida e escura por 1h a 2h com os anticorpos primários anti-*cerbB-2* (Dako) diluídos a 1:200 em SST. A seguir, as lâminas foram lavadas separadamente com água destilada. A leitura das lâminas foi realizada por dois patologistas (JUK e LM) que desconheciam a identidade dos pacientes, condição do tumor ou desfecho clínico ( $\kappa < 5\%$ ). Para determinar a positividade destes anticorpos foi utilizado o método ABC (complexo avidina-biotina-peroxidase-kit LSAB DAKO); o produto da reação final foi visualizado pelo uso do diaminobenzeno (DAB) como cromógeno. A contra-coloração foi realizada com a hematoxilina de Harris. Amostras de adenocarcinoma de mama, sabidamente positivos para *HER2* foram utilizadas como controle.

As lâminas foram classificadas de acordo com HercepTest® em um escore de 0 a 3 + utilizando-se os critérios sugeridos pelo fabricante e usados para o câncer de mama, onde zero significa ausência de coloração

ou coloração na membrana em menos de 10% das células tumorais, incluindo aquelas em que foi demonstrada somente coloração citoplasmática, as quais foram anotadas, mas não consideradas; 1+, fracamente positivo i. é, aquelas com fraca coloração perceptível em mais de 10% das células tumorais; 2+, moderadamente positivo, apresentando fraca a moderada coloração completa perceptível da membrana em 10% das células tumorais; e, 3+, fortemente positivo com coloração forte e completa da membrana observada em mais de 10% das células tumorais. Ambos os escores Zero e 1+ foram considerados como negativos; 2+ e 3+ combinados foram considerados positivos para a expressão de *HER2* (Figura 1).

Para análise qualitativa da amostra foram calculados a média, a mediana, desvio-padrão, os valores máximos e mínimos. Percentagens e frequências foram usadas para variáveis categóricas. O teste exato de Fischer foi utilizado na comparação da expressão de *HER2* em relação ao sexo e tipo histológico. O teste t de student foi usado na comparação de *HER2* ao tamanho, idade e número de linfonodos metastáticos. O estágio patológico foi comparado ao *HER2* pelo teste do qui-quadrado ( $P \leq 0,05$  será considerado estatisticamente significativo para todos os testes com IC de 95%). A análise estatística foi realizada com a utilização do Statistical Package for Professional Sciences, SPSS for Windows, 18<sup>a</sup>. ed.

## RESULTADOS

Oitenta e cinco casos de carcinoma epidermóide primário de esôfago, precoce (n = 10) e avançado (n = 75) foram estudados. Destes 57 (67%) eram homens e 23 (33%) mulheres. A mediana da idade (DP) foi 58 (10) anos variando dos 29 aos 85 anos.

Os tumores estavam localizados principalmente no terço inferior do esôfago torácico em 62 casos (73%). A maioria dos pacientes foi submetida à ressecção esofágica trans-torácica com média (DP) de permanência hospitalar de 35 (23) dias, mediana de 30 dias e que variou entre 7 a 144 dias. A grande maioria dos pacientes permaneceu internado por um período maior de 19 dias (n=66; 79%). Quanto maior o estágio (III-IV vs. I-II) e pior o estado nutricional (albumina <2.9 vs. >3.0 e escore prognóstico de Glasgow >1 vs. <1; dados não apresentados) tanto maior a permanência hospitalar (37 vs. 9 dias), a qual também foi maior quando comparados os casos complicados com os sem complicações (37 vs. 20 dias) que foram estatisticamente significativos para um valor de p de 0,02 e 0,05, respectivamente.

O tamanho médio dos tumores (DP) foi 4.7 (2.7), variando de 2 a 9 cm, sendo significativamente menores para tumores precoces – 2,8 cm – do que para avançados – 4,9 cm (p < 0,05). O grau histológico da grande maioria dos tumores (n=61; 72%) era moderadamente diferenciados e menos de 10% (8 casos) eram carcinomas pouco diferenciados de células escamosas de acordo com a classificação tumoral e de profundidade de invasão da Organização Mundial da Saúde. A mediana de gânglios linfáticos (LN) dissecados foi 9 e na maioria dos casos era sem comprometimento LN (n = 49; 57%). Trinta e nove (46%) casos tinham entre um a três LN positivos. A maioria dos casos eram de estágios iniciais I e II de acordo com o estadiamento patológico da AJCC sétima edição de 2010. Apenas um caso estágio IV foi incluído no estudo. Estes e outros dados encontram-se na Tabela 2.

Coloração citoplasmática à imunoistoquímica ocorreu em 15 casos (18%). Reação imunoistoquímica fortemente positiva (3+) produzida pelo anticorpo *HER2* ocorreu em um único caso (Figura 2) e todos os três (3%) casos positivos eram de estágios avançados. Nenhum dos casos de carcinoma precoce demonstrou nem mesmo reação citoplasmática. Além disso, a positividade para *HER2* não revelou qualquer significância estatística quando comparada a idade, sexo, tamanho do tumor, metástase linfonodal e estadiamento patológico. Estas características histopatológicas e a expressão imunoistoquímica para *HER2* são mostradas na Tabela 2 e 3, respectivamente.

## DISCUSSÃO

O prognóstico do câncer de esôfago permanece sombrio. Ressecção endoscópica em carcinomas precoces e displasia de alto grau (15, 16) ou outras abordagens como quimioterapia, quimiorradioterapia, em combinação ou não com cirurgia, (7) fazem parte de estratégias e esforços que tentam mudar esta situação. Entretanto, a sobrevida em 5 anos raramente ultrapassa 10%-20% mesmo nas melhores séries em países ocidentais (17).

Um dos indicadores prognósticos mais poderosos no câncer de esôfago é a presença de metástases em LN. Estudos recentes tem procurado analisar o impacto da presença de metástases em LN e os investigadores parecem concordar que não se trata apenas da presença ou ausência da doença linfonodal. Mais importante do que isso parece ser a quantidade de LNs envolvidos (18). Entretanto, de maneira geral, a grande maioria dos pacientes parece não ser submetida a uma dissecação adequada e que atinja o objetivo de dissecação LN em quantidade satisfatória (19, 20).

Devido às diferenças na extensão e nos métodos de dissecação linfonodal adotado nos diferentes centros, o número de LNs dissecados difere enormemente de um procedimento para outro. Os cirurgiões japoneses removem o maior número de LNs por procedimento com média de 43 e 90 LNs para cirurgias realizadas em um ou dois campos, respectivamente (19). Baseado na literatura disponível, tanto para o carcinoma epidermóide quanto o adenocarcinoma, alguns autores recomendam um número que varie entre 12 a 23 LNs para uma dissecação adequada (21). O AJCC recomenda que sejam retirados tantos quantos LNs forem possíveis; além disso, quanto maior o estágio patológico, maior a quantidade de LNs a ser ressecada (22). Em nosso estudo, a baixa média de LNs dissecados encontra-se abaixo do número mínimo esperado para um procedimento oncológicamente adequado, sugerindo que os campos e sítios dissecados devam ser revisados.

A maioria dos pacientes foi submetida a ressecção transtorácica. A permanência hospitalar, definida como a quantidade de dias entre o dia da internação e o dia da alta aponta uma mediana de 30 dias, variando entre 7 a 144 dias, um pouco além da ideal. Um ensaio clínico randomizado que incluiu 220 pacientes com o adenocarcinoma dos terços médio, distal ou adenocarcinoma do cárdia mas que envolvesse o esôfago distal, mostra uma mediana de 19 dias de permanência hospitalar com variação entre 7-154 dias (23). Em nosso estudo, usando métodos para a avaliação nutricional, a percentagem de pacientes desnutridos foi 66%, que parece razoável, uma vez a maioria dos pacientes com câncer tem tumores extensos quando do diagnóstico (dados não apresentados). Além disso, a perda de peso e os níveis de albumina sérica encontram-se fracamente associados à permanência hospitalar (24). Em nosso hospital, Rx de esôfago contrastado com bário era utilizado até recentemente para localização tumoral. Entretanto, em 2004 a endoscopia foi definitivamente incorporada para a confirmação do sítio do tumor de forma mais precisa, e este fato pode explicar os 73% de casos localizados no terço inferior desta série.



Desde que isolado há cerca de 25 anos, o cDNA do receptor do fator de crescimento epitelial (*EGFR*), intensas pesquisas tem levado a importantes descobertas nos mecanismos moleculares de funcionamento dos receptores tirosinoquinases (RTQ), que quando mutados ou alterados, tornam-se potentes oncoproteínas (25). Alterações nos membros da família HER tem papel importante no desenvolvimento e progressão de vários tumores em seres humanos. Em diversos estudos, a hiperexpressão ou amplificação de HER2 em diferentes tumores e linhagens de células cancerosas tem sido observadas (26).

Existem evidências crescentes que o *HER2* possa ser importante biomarcador e tenha papel crucial na tumorigênese do câncer gástrico, com estudos demonstrando a amplificação ou hiperexpressão em 7% a 34% dos tumores (27, 28). *HER2* tem sido investigado no nosso grupo de pesquisa (SSORG) e nos adenocarcinomas de estômago demonstrou aumento na expressão similar àqueles estudos (29). De fato, em nosso estudo, *HER2* foi expresso somente nos casos de tumores de esôfago avançados, sugerindo que *HER2* se estiver implicado na carcinogênese esofágica, deve estar presente somente naqueles estágios mais tardios do processo. Ademais, nos pacientes com tumores gástricos ou da junção esofagogástrica avançados, a adição do bloqueador anti-HER – trastuzumab – à quimioterapia melhorou significativamente a sobrevida global daqueles pacientes (30).

Atualmente se dispõe de três métodos para quantificação de *HER2*. A IHQ, o mais amplamente utilizado, identifica a expressão do gene na superfície da célula, FISH (*fluorescence in situ hybridization*) mede o grau da amplificação gênica. Naqueles tumores que produzem um escore considerado ambíguo (IHQ 2+), existe a recomendação de serem re-testados pelo FISH (31). O método, porém apresenta algumas desvantagens, é mais caro, há demora na obtenção do resultado, além de não ser um teste disponível em todos os laboratórios. O CISH (*chromogenic in situ hybridization*) é semelhante ao FISH, pois também identifica o grau da amplificação de *HER2*, porém sua leitura é obtida com um microscópio de luz comum. CISH, portanto, pode potencialmente ser utilizado no lugar de FISH casos IHQ 2+ (32), como se pretende testar em nossos casos ambíguos.

O carcinoma epidermóide de esôfago, tipo histológico mais prevalente entre nós, está invariavelmente associado a pior prognóstico por ser frequentemente diagnosticado em estágio clínico avançado e já com alta ocorrência de metástases LNs (33). Nossos resultados não demonstraram que a expressão de *HER2* tem valor prognóstico no câncer de esôfago. Apesar de haver concordância entre os resultados de FISH e IHQ, a amplificação de forma isolada parece afetar o prognóstico (34). Todavia, o significado clínico da amplificação ou hiperexpressão do *HER2*, nos tumores de esôfago ainda não se encontra totalmente compreendido.

Diversos estudos tem demonstrado que *HER2* encontra-se hiperexpressado no câncer de esôfago. Entretanto, a ampla discrepância relatada, com frequências entre 0 a 64%, reflete um considerável impacto da metodologia nos resultados possivelmente como resultado da variabilidade entre os testes empregados (amplificação gênica vs. expressão da proteína), os diferentes escores utilizados ou tecidos dos pacientes vs. espécimes cirúrgicos (35). A expressão positiva de *HER2* foi observada em três (3.5%) casos: imunoreação moderada (2+) em dois (2.3%) e hiperexpressão (3+) somente em um (1.2%) caso. Reação citoplasmática observada em 15 casos (18%) foi considerada inespecífica e não foram incluídas no escore. Estes achados encontram-se dentro do limite mínimo de publicações prévias (35-37). Além disso, ao contrário da literatura, os casos de amostra de conveniência se encontravam em estágios iniciais, a maior parte moderadamente ou bem diferenciados, linfonodos negativos ou tendo somente pequeno número de LNs envolvidos, o que pode explicar a baixa prevalência de casos claramente positivos. Assim a frequência da hiperexpressão de *HER2* no câncer de esôfago parece ser baixa, sugerindo um papel limitado deste receptor como alvo para o tratamento do câncer de esôfago.

Assim o protocolo de avaliação da expressão do *HER2* no nosso estudo foi utilizado conforme preconizado e aprovado pelo FDA, como a imunistoquímica com o Herceptest®, uma vez que a IHQ a nosso ver, é método fácil, amplamente estabelecido, de baixo custo, confiável e que apresenta resultados reprodutíveis na tentativa de tornar mais amplamente comparáveis os resultados quando utilizada de forma cuidadosamente controlada permitindo determinar substancial correlação com ensaios com o método FISH (38). Um estudo de validação de um sistema de escore de *HER2* para adenocarcinoma gástrico, que difere do escore utilizado no de câncer de mama, foi recentemente publicado com algumas modificações para IHQ, tendo em conta algumas peculiaridades específicas da mucosa gástrica (27). Usando o escore Herceptest® para o câncer de mama, nossos achados podem parecer algo diferente, e ao nosso conhecimento, até a presente data, nenhum estudo em particular, apesar do sistema de escore recentemente proposto por Hu et al. para adenocarcinoma esofágico (39), foi validado para análise de *HER2* para o carcinoma epidermóide de esôfago, o uso desse escore para o adenocarcinoma, adaptado para o carcinoma epidermóide pode vir a ser tentado.

Apesar do número reduzido de reação positiva ao *HER2*, a expressão ambígua (equivocal) deve ser verificada por FISH ou preferencialmente por CISH, devido à facilidade e custo-benefício, bem como amostras de adenocarcinoma devem ser incluídas. A taxa mais elevada de expressão citoplasmática sugere continuidade na investigação e reavaliação de toda a amostra usando o escore de *HER2* para tumor adenocarcinoma esofágico como recentemente proposto. Em conclusão, nossos resultados sugerem que o *HER2* parece não estar implicado nas fases iniciais da carcinogênese do carcinoma epidermóide do esôfago e terapia-alvo específica anti-HER pode ser aventada naqueles indivíduos de *HER2* positivamente testados por FISH/CISH em futuros ensaios clínicos se esses resultados forem confirmados.

**Tabela 1. Características Clínicoepidemiológicas dos Pacientes**

<b>Características</b>	<b>N (85)</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Sexo (masculino:feminino)	60:25	71:29
Idade (anos)		
Media (DP*)	57 (10)	
Mediana		
Variação	29-85	
Raça		
Branços	68	80
Não Brancos	17	20
ASA PS 2010**		
ASA PS I	8	9
ASA PS II	59	70
ASA PS III	18	21
Estadiamento (AJCC 2010†)		
Ia	4	5
Ib	8	9
IIa	25	29
IIb	20	23
IIIa	16	19
IIIb	5	6
IIIc	6	7
IV	1	1

\*DP, desvio padrão; \*\*ASA PS, Anesthesiologists Physical Status Classification;

†AJCC, American Joint Committee on Cancer revised classification.

**Tabela 2. Características Histopatológicas**

<b>Características</b>	<b>N (85)</b>	<b>Percentagem (%)</b>
Localização Tumor		
Terço Superior	2	2
Terço Médio	17	20
Terço Inferior	66	78
Tamanho do Tumor (cm)		
Média (DP*)	4.6 (2.0)	
Mediana	4.5	
Variação	2.0-9.0	
Grau de Diferenciação		
Bem Diferenciados	8	9
Moderadamente Diferenciados	61	72
Pouco Diferenciados	16	19
TNM-AJCC 2010**		
Tis/T1	10	12
T2	34	40
T3	37	43
T4	4	5
N0	47	55
N1	23	27
N2	12	14
M0	84	99
M1	1	1

\*DP, Desvio Padrão, \*\* AJCC, American Joint Committee on Cancer revised classification.

Tabela 3. Frequências de *HER2* detectadas pelo HercepTest®

<b>Escores*</b>	<b>N (%)</b>
<b>NEGATIVO</b>	
0+	81(95)
1+	1(1)
<b>POSITIVO</b>	
2+	2(2)
3+	1(1)

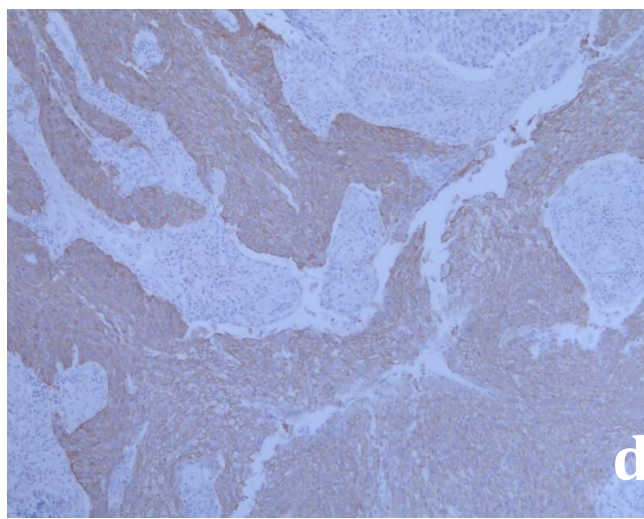
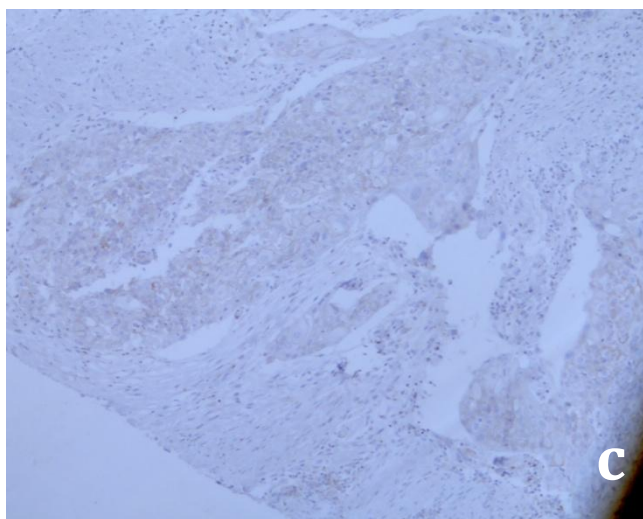
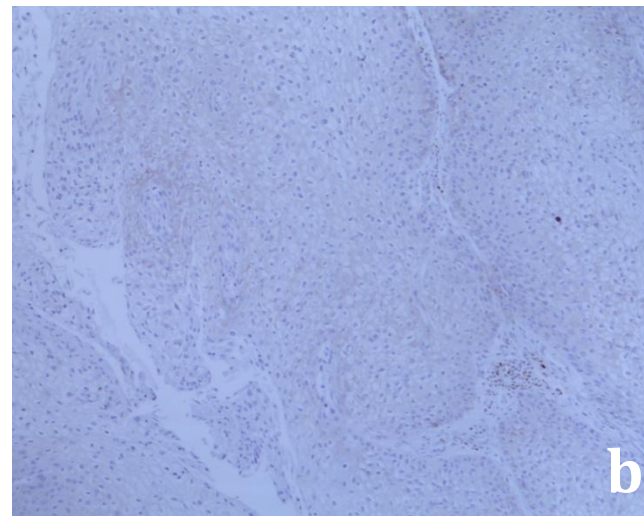
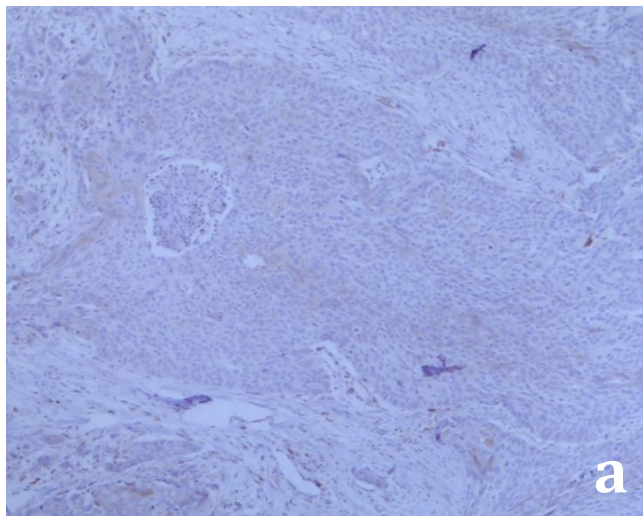
\*Imunoistoquímica

## LEGENDA DAS FIGURAS

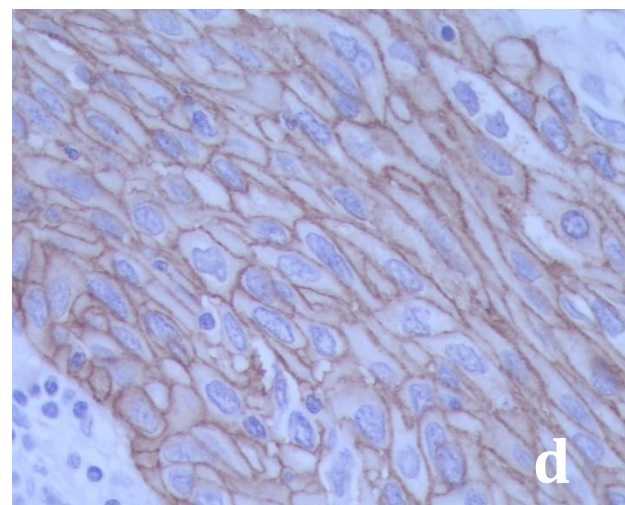
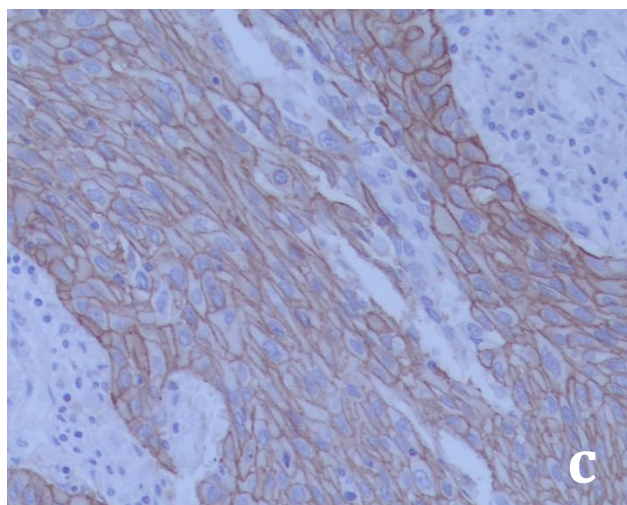
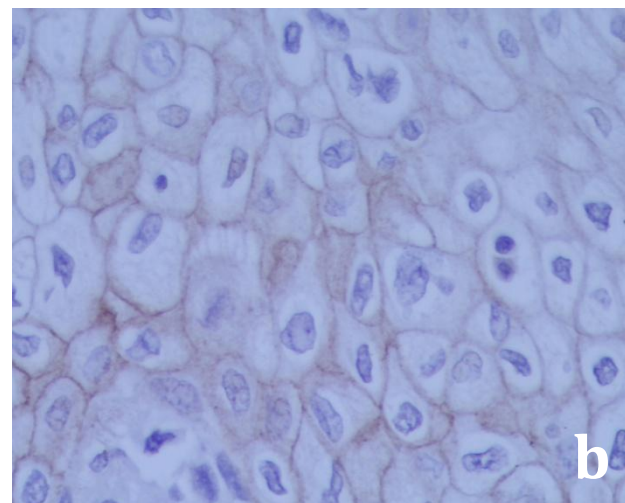
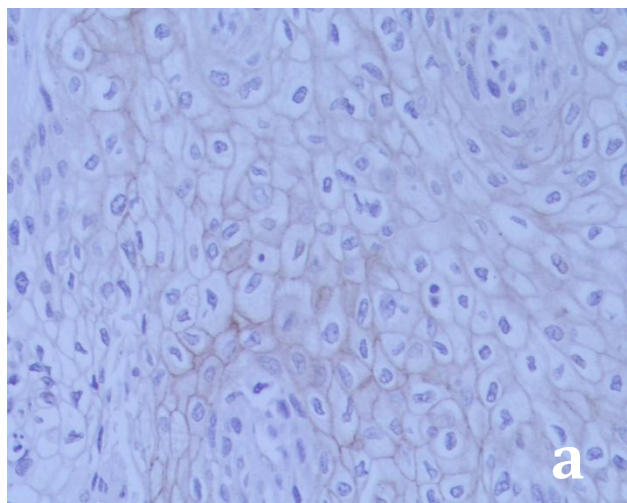
Figura 1 – Amostra representativa de tumores de esôfago. Imunohistoquímica HER2, HercepTest® 1+ (a), 2+ *equivocal* (b e c) and 3+ (1d) escores. Método ABC, magnificação de 50X.

Figura 2 – Amostra representativa de tumores de esôfago de imunohistoquímica para HER2. HercepTest® 2+ *equivocal* (a e b) and 3+ (c e d) escores. Método ABC; magnificação de 200X e 400X, respectivamente.

**FIGURA 1**



**FIGURA 2**





# MANUSCRIPT

## Expression of *HER2* Protein in Patients with Early and Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Thoracic Oesophagus

Running Head: HER and oesophageal tumour

Hamilton Cardoso Hilgert, MCh

Diego Sachet Mattana, BS

Gabriel Tesche Roman, BSc

Fabio Rafael Wasem, BSc

Ernidio Luiz Bassani Filho, Bsc

Fernando Schmidt Fernandes, BSc

Marcelo Castro Marçal Pessôa, BS

Jane Ulbricht Kulczynski, MD

Luise Meurer, MD

Luis Fernando Moreira, MD\*

Manuscript: 3 tables, 2 figures, 3188 words and 39 references

No conflicts of interest to declare

\*Request off-prints and correspondence to:

Luis F. Moreira, MD  
Southern Surgical Oncology Research Group  
Post-Graduate Programme of Surgery  
Faculty of Medicine, Rio Grande do Sul Federal University and Department of Surgery,  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre University Hospital  
Rua Ramiro Barcelos 2400, 6F room 600A  
91.035.095 Porto Alegre, RS, Brazil  
Email: lufmoreira@hcpa.ufrgs.br

Porto Alegre, March 2012

## ABSTRACT

**Background:** *HER2* has been identified in many tumours and has significantly improved outcome in breast cancer patients as target-therapy. However, little is known about *HER2* in oesophageal cancer.

**Aim:** The purpose of this study was to investigate the prevalence of *HER2* expression in oesophageal squamous cell cancers.

**Patients and Methods:** A preliminary study was performed to assess HER immunoreactivity (ABC method, HercepTest®) on 10 early and 75 advanced samples randomly obtained from patients who underwent surgical resection at the HCPA University Hospital, Faculty of Medicine, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Results:** There were 60 (70%) males and 25 (30%) females; median (range) age of 59 (29 to 85) years. The majority of the cases were earlier stage I-IIb tumours (n=57; 67%), grade I or II (n=69; 81%), Tis-T2 (n=44; 52%), negative lymph nodes (n=47; 54%), average (SD) size of 4.7 (2.0) and ranging from 2.0 to 9.0 cm. The deeper the tumour the greater the lymph node involvement ( $p < 0.03$ ). Overall, *HER2* cytoplasmic immunoreactivity occurred in 15 (18%) cases. However, only 3 (3%) cases, all advanced, were definitely positive (2+/3+) by the HercepTest®. However, no statistically significant differences were observed between *HER2* non- and expressing tumours regarding differentiation, depth of invasion, lymph node metastasis or tumour stage.

**Conclusion:** *HER2* seems to be not implicated in earlier stages of oesophageal carcinogenesis. The higher cytoplasmic expression warrants further investigation including adenocarcinoma-type tumours and FISH/CISH assessment. Also, reassessment of this sample, by the recently proposed *HER2* score for oesophageal adenocarcinomas shall be carried out.

Keywords: Oesophagus; Squamous cell carcinoma; *HER2*; Carcinogenesis; Immunohistochemistry; Oncogenes; Target-therapy

## INTRODUCTION

Cancer of the oesophagus is the eighth most frequent malignancy in the world and it is the third most common tumour of the gastrointestinal tract (GIT) with a low survival rate. Oesophageal cancers are classified into two major histological types – squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. The incidence of these two types shows remarkable geographic variations, indicating that each area has its particular environmental risk factors. Both cigarette smoking and alcohol consumption are well established risk factors for oesophageal squamous cell carcinomas (1). In Brazil, in the southern-most (just above Uruguay) Rio Grande do Sul State, especially in its region named the *Campanha* (centre and west side), there is a higher incidence of oesophageal cancer, especially squamous cell-type, when compared to other locations (2). Moreover, genetic abnormalities have also been investigated in oesophageal squamous cell carcinomas, including changes in cell-cycle regulation, growth factors and growth receptors as well as in DNA repair systems (3).

Oesophageal tumours usually affect the middle and lower third of the oesophagus. Despite the usually late diagnosis of the disease, the still remaining poor prognosis of patients with oesophageal squamous cell carcinoma has improved during the last years, with survival rates ranging between 5% and 20% (4). Oesophagectomy remains the mainstay treatment for clinical T1bN0M0 oesophageal cancer because pathological positive lymph node metastases in these patients are not negligible (5). A study comparing definitive chemoradiotherapy to surgery alone found no significant differences for overall survival or disease-free survival showing that none of the two treatment modalities is better, although this study was criticized for ethical inadequacies (6).

Since overall survival following surgery alone is poor, multimodality approaches have been developed in an attempt to improve outcome. At least for patients with locally advanced tumours, surgery alone can no longer be advocated as routine treatment. Nowadays, scientific interest is focused on tumour response to induction chemoradiotherapy (7), though the combination with best results has not been clearly defined yet (8).

Increased understanding of molecular carcinogenesis has begun to change paradigms in oncology. Diagnosis of molecular lesions shown in each tumour will become a key feature of forthcoming clinical care. This will allow to predict tumour response with substantially increased

accuracy, stratification of a particular patient subgroup and an eventually personalised treatment (9).

*HER2* is a component of a four-member family of closely related growth factor receptors and its testing has reached near-standard-of-practice status in breast cancer. There is considerable interest in *HER2* as a prognostic factor and target of therapy in GIT tumours (10). Overexpression of *HER2* has been also reported in as much as 30% of patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus (11) and thus, *HER2* targeting immunotherapy appear to be an interesting treatment approach for such patients (12).

Therefore, taking those reports into account, determining immunohistochemical expression of the *HER2* oncogene protein in oesophageal tumour tissue of patients with early and invasive squamous cell carcinoma was attempted, since prevalence of *HER2* in samples of oesophageal tumours from southern Brazil may help to improve understanding of the molecular mechanisms associated to multi-step oesophageal carcinogenesis as well as to better define therapeutic approaches and prognosis for these patients. Understanding these molecular events may have three clinical implications at a short-range, i. e., to help early diagnosis; to determine a more accurate prognostic marker; and perhaps, to reach therapeutic improvement by associating a specific anti-tyrosine kinase to chemoradiation regimens if a higher expression of such oncogene protein is found.

## PATIENTS AND METHODS

The records of 85 randomly selected patients with primary histologically-proven early (13) or invasive oesophageal squamous cell carcinoma, who underwent tumour resection in the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA – University Hospital), Department of Surgery, Faculty of Medicine, Rio Grande do Sul Federal University, Porto Alegre, RS, Brazil, between Jan. 2000 and Dec. 2010, were enrolled in this preliminary study, after approval by the Institution Review Board (IRB #09225#) of the University Hospital; and this study is part of the research line of the Southern Surgical Oncology Research Group, SSORG, Post-graduate Programme of Surgery. Patients with past history of malignancies other than skin squamous and basal cell tumours or those receiving radio or chemotherapy prior to surgery were excluded. All patients had undergone transthoracic or transhiatal radical oesophagectomy with a routinely two-field lymph node dissection.

Demographic and epidemiological characteristics such as age, gender, tumour site and size, differentiation grade, number of dissected and metastatic nodes as well as clinical and pathological staging were noted from patient records. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks were used for histological and immunohistochemistry (IHC) assessment. Tumours were classified using the American Joint Committee on Cancer (AJCC 2010) TNM system 7th edition (14). The clinicoepidemiological characteristics of the patients are shown in Table 1.

The immunohistochemical analyses used the anti-human c-erbB-2 oncoprotein (Dakocytomation, San Diego, CA, USA) antibody that recognises the *HER2* oncoprotein. Tumour tissue sections were tested for *HER2* expression by immunohistochemistry (IHC) with this primary antibody as routine used in the Pathology Section of the HCPA University Hospital. After deparaffinisation and rehydration, antigenic recovery was performed by heating section in 95°C water bath for 40 minutes with citrate buffer. After, peroxidase and foetal calf serum were used to block endogenous peroxidase activity as well to block other protein expressions; the slides were then incubated in a moist and dark chamber for 1h to 2h with the primary antibody anti-*HER2* (Dako) diluted at 1:200 in PBS. The antibody expression was assessed by two pathologists (JUK and LM) unaware of patient identity, tumour characteristics or clinical outcome following incubation

with the ABC complex (LSAB kit, Dako); and the final reaction was revealed by using the diaminobenzidine (DAB) as a chromogen. The counter-staining was performed with Harris haematoxylin. Samples of breast adenocarcinoma, well-known to express *HER2*, were used as positive controls.

The slides were classified according to the HercepTest® score from 0 to 3+, as provided by the manufacturer and used for breast tumour assessment where a zero score meant no staining at all or membrane staining in less than 10% of the tumour cells, including those cells showing only cytoplasmic staining, which was noted, but not considered; a 1+ weakly positive score, i. e., a faint barely perceptible membrane staining in more than 10% of tumour cells; a 2+ moderately positive score as a weak to moderate complete membrane staining in 10% of the tumour cells; and 3+ strongly positive score as a strong complete membrane staining observed in more than 10% of the tumour cells. Zero and 1+ scores were both regarded as negative, while 2+ and 3+ scores were considered as positive for *HER2* expression (Figure 1).

Qualitative data was described as mean, median, minimum and maximum values and standard deviation. Percentages and frequencies were used for categorical variables. Fischer's exact test was used comparing *HER2* expression to gender and histological type. Student's t test was used comparing *HER2* to size, age and number of positive lymph nodes. Pathological stage was compared to *HER2* using chi-square test. A P value of less than 0.05 was considered for all tests in a 95% confidence interval (CI). Statistical analyses were performed using the IBM Statistical Package for Professional Sciences, SPSS for Windows 18.0, SPSS Inc.

## RESULTS

Eighty-five cases of primary early (n=10) and advanced (n=75) squamous cell carcinoma were studied. There were 57 (67%) males and 23 (33%) females. Overall median (SD) age was 58 (10) years and ranged from 29 to 85 years.

The tumours were mainly located at the lower third of the thoracic oesophagus in 62 (73%) cases. The majority of the patients were submitted to transthoracic oesophageal resection with an average (SD) hospital staying of 35 (23) days, median of 30 days and ranging from 7 to 144 days. The great majority of patients stayed admitted longer than 19 days (n=66; 79%). The greater the stage (III-IV vs. I-II) and lower the nutritional status (albumin <2.9 vs. >3.0 and Glasgow Prognostic Score >1 vs. <1; data not shown) the longer the overall hospital staying, which was also longer when comparing complicated and uncomplicated cases; 37 vs. 9 and 37 vs. 20 days respectively and statistically significant for a p value of 0.02 and 0.05.

Overall average (SD) tumour size was 4.7 (2.7) cm and ranging from 1.9 to 10.2 cm. Early type tumours showed an average size of 2.8 cm, significantly smaller than advanced (4.9 cm) tumours (p>0.05). The great majority of tumours (72%) were of moderately differentiated histological grade and less than 10% (8 cases) were of poorly differentiated squamous cell carcinoma instances according to the World Health Organization classification and depth of invasion. The median (SD) lymph nodes dissected was 9 (5) and most cases were lymph node negative (n=49; 57%). Thirty-nine (46%) cases had one to three positive lymph nodes. Most of the cases were of earlier stages I and II according to the pathological staging by the AJCC 2010 classification. Only one case of stage IV was randomly selected to the study.

Cytoplasmic immunohistochemical staining occurred in 15 (18%) cases. However, definitely positive (3+) immunohistochemical reaction produced by the anti-*HER2* antibody occurred in only one instance (Figure 2) and all 3 (3%) positive instances were advanced cases. None of the early cases have shown even cytoplasmic reaction.

Moreover, positivity to *HER2* did not show any statistical significance when compared to age, gender, tumour size and grade, positive lymph nodes or pathological staging. These histopathological features and immunohistochemical expression for *HER2* are shown in Table 2 and 3, respectively.

## DISCUSSION

Cancer of the oesophagus is still a dismal prognosis disease. Endoscopic mucosal resection for early tumours and high-grade dysplasia (15, 16) or therapeutic approaches, such as chemotherapy or chemo-radiotherapy, either combined or not with surgical resection (7) are great efforts attempting to change this situation. However, great improvements on survival are still lacking, with 5-year survival rates rarely exceeding 10%-20% in the best reported series in western countries (17).

The presence of lymph node (LN) metastasis in oesophageal cancer is one of the most powerful prognostic indicators. Recent studies have further looked at the impact of LN metastases and investigators seem to agree that it is not only a matter of the presence or absence of nodal disease, but more importantly also, the figures of LN involvement (18). However overall, the great majority of patients seems to be not undergoing appropriate LN dissection that met the proposed goal of dissected nodes (19, 20).

Due to differences in the extent and methods of lymph node dissection adopted in different centres, the number of LNs removed per operation greatly differs. Japanese surgeons remove the greatest number of lymph nodes per operation with a mean figure of 43 and 90 LNs for a two- and a three-field lymph node dissection respectively (19). Based on the available literature in both oesophageal squamous cell and adenocarcinoma, some authors recommend anything from 12 to 23 LNs as the appropriate cut-off for an adequate dissection (21). The AJCC recommends for oesophageal cancer resection as many LNs as possible and that more LNs should be dissected as pT stage increases, based on worldwide data (22). In our study, the low average of dissected LNs is below than the expected minimum number to be dissected for an adequate oncological procedure, and therefore, dissected fields and sites must be reviewed.

The majority of the patients were submitted to trans-thoracic oesophageal resection. The hospital staying defined as the number of days from the day of admittance to discharge demonstrated a median of 30 days ranging from 7 to 144 days. A randomized trial, including 220 patients with adenocarcinoma of the mid-to-distal oesophagus or adenocarcinoma of the gastric cardia involving the distal oesophagus showed a median of 19 days ranging from 7-154 (23). In our study, using methods for nutritional assessment, the percentage of unnourished patients was 66%,



which seems reasonable, since most cancer patients had larger tumours at presentation (data not shown). Besides, weight loss and serum albumin levels were weakly associated with length of stay, but as expected, the greater the malnourishment the longer the staying (24). In our hospital, a barium swallow indicated tumour site till recently. Since 2004, however, endoscopy examination has been done to confirm tumour location more precisely, which may explain the 73% of lower third cases in this series.

Since the cDNA of the epidermal growth factor receptor (EGFR) was isolated nearly 25 years ago, intensive research has led to important discoveries at the molecular level in the role of the tyrosine kinases, that when mutated or altered, become potent oncoproteins (25). Alterations in HER family members play a role in the development and progression of many human cancers. In several studies, overexpression or amplification of *HER2* in different tumours and cancer cell lines has been observed (26).

There is growing evidence that *HER2* may be an important biomarker and has a crucial role in gastric cancer carcinogenesis, with studies demonstrating the amplification or overexpression in 7%-34% of tumours (27, 28) *HER2* has been investigated in our research group (SSORG) and its expression was increased in advanced adenocarcinomas of the stomach, a finding similar to those studies (29). Indeed, in this study, *HER2* was expressed only in advanced oesophageal tumours as well suggesting that *HER2*, if implied in the oesophageal carcinogenesis may only act in the later stages of the multi-step carcinogenic process. Furthermore, in patients with advanced gastric tumours or oesophagogastric junction tumours, the addition of the anti-*HER2* blocker – trastuzumab – to chemotherapy significantly improved overall survival (30).

Currently there are three methods for quantifying *HER2*. The most widely used, IHC, identifies gene expression at the cell surface. In those instances that a score was considered equivocal (IHC 2+) such as our two advanced cases, assessment by a second test such as FISH (fluorescence *in situ* hybridization) has been recommended since FISH measures the degree of gene amplification (31). This method, however, has some disadvantage as it is more expensive, results are delayed, and the test is not routinely available in all laboratories. On the other hand, CISH (chromogenic *in situ* hybridization) is similar to FISH, as it also identifies the degree of *HER2* amplification, but

readings can be obtained on an ordinary light microscope. CISH can therefore be potentially used instead of FISH in the cases of IHC 2+ (32) as we intend to recheck over our positive equivocal cases.

Squamous cell carcinoma of the oesophagus, the most common histological type amongst us, is invariably associated with worse prognosis, once it is often diagnosed at advanced clinical stages and has a high frequency of LN metastases (33). Our results did not show that *HER2* expression has a prognostic value in oesophageal cancer. Despite the concordance between the FISH and immunohistochemistry results, only the presence of gene amplification seems to affect prognosis (34). Nevertheless, the clinical significance of *HER2* amplification or overexpression in tumours of the oesophagus has not been yet fully understood.

Several studies have shown that *HER2* is overexpressed in oesophageal cancer. The wide range of reported expression from nil to 64%, reflects a considerable methodical impact on results owing to different testing methods (gene amplification vs. protein expression) and scoring methods or patient and tissue vs. surgical specimens (35). Positive expression of *HER2* was observed in three (3.5%) cases: moderate immunoreactivity (2+) in two (2.3%) and hyperexpression (3+) in only one (1.17%) case. Cytoplasmic staining detected in 15 (18%) cases was considered non-specific and was not included in the scoring. These findings are in the lower range of previous publications (35-37). Moreover, as opposed to the literature, the randomly selected cases in this series, were earlier in stage and mostly moderately or well-differentiated and negative or having few involved LNs, which may explain the lower prevalence of definitely positive cases, indeed. Thus, the frequency of *HER2* overexpression in oesophageal cancer seems to be low, which suggests a limited role of this receptor as a target in the treatment of oesophageal cancer.

In our study the protocol for assessing the expression of *HER2* was used as recommended and approved by the FDA, the IHC with HercepTest®, since we consider IHC an easy, widely established, not too expensive and reliable method that provides reproducible results, thus aiding the generation of more widely comparable results when applied in a careful, controlled manner, allowing to determine substantial correlations with trials using the FISH method (38). A study to validate a *HER2* scoring system for gastric adenocarcinoma, which differs from the breast cancer score, was recently published with some modifications for IHC, taking into account some specific

peculiarities of the gastric mucosa (27). By using the HercepTest® score for breast cancer, our findings might appear somewhat unlike, and since, to our knowledge, up to date, no particular study, despite that score system recently proposed by Hu et al. for oesophageal adenocarcinoma (39), has been validated for any *HER2* analysis for oesophageal squamous cell tumours, the use of that adenocarcinoma score adapted to oesophageal squamous cell tissues may be worth to be attempted.

Despite the reduced number of *HER2* positive scores, equivocal expression should be checked by FISH assessment, preferably by CISH, due to easiness and cost-effectiveness as well as samples of adenocarcinoma type should be included. The higher cytoplasmic expression rate warrants further investigation and reassessment of the entire sample by using the *HER2* score for oesophageal adenocarcinoma tumour as recently proposed. In conclusion, our results suggest that *HER2* seems to be not implicated in earlier stages of oesophageal carcinogenesis in squamous cell carcinomas and specific anti-HER target therapy should be attempted in those HER-positive FISH-CISH-tested individuals in future clinical trials if these results are confirmed.

## REFERENCES

1. Maehara Y. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Clin Oncol*. 2010 Apr;15(2):125.
2. Prolla JC, Dietz J, da Costa LA. [Geographical differences in esophageal neoplasm mortality in Rio Grande do Sul]. *Rev Assoc Med Bras*. 1993 Oct-Dec;39(4):217-20.
3. Toh Y, Oki E, Ohgaki K, Sakamoto Y, Ito S, Egashira A, et al. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: molecular mechanisms of carcinogenesis. *Int J Clin Oncol*. 2010 Apr;15(2):135-44.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008 Mar-Apr;58(2):71-96.
5. Motoori M, Yano M, Ishihara R, Yamamoto S, Kawaguchi Y, Tanaka K, et al. Comparison Between Radical Esophagectomy and Definitive Chemoradiotherapy in Patients with Clinical T1bN0M0 Esophageal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012 Feb 1.
6. Chiu PW, Chan AC, Leung SF, Leong HT, Kwong KH, Li MK, et al. Multicenter prospective randomized trial comparing standard esophagectomy with chemoradiotherapy for treatment of squamous esophageal cancer: early results from the Chinese University Research Group for Esophageal Cancer (CURE). *J Gastrointest Surg*. [Comparative Study Multicenter Study Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Jul-Aug;9(6):794-802.
7. Wolf MC, Stahl M, Krause BJ, Bonavina L, Bruns C, Belka C, et al. Curative treatment of oesophageal carcinoma: current options and future developments. *Radiat Oncol*. [Review]. 2011;6:55.
8. Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Reed CE, Goldberg R, et al. Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 1;26(7):1086-92.
9. Grulich C, von Kalle C. Recent developments and future perspectives of personalized oncology. *Onkologie*. 2012;35 Suppl 1:4-7.
10. Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest*. 2001;19(5):554-68.
11. Mimura K, Kono K, Hanawa M, Mitsui F, Sugai H, Miyagawa N, et al. Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2005 Apr 11;92(7):1253-60.
12. Maruyama T, Mimura K, Sato E, Watanabe M, Mizukami Y, Kawaguchi Y, et al. Inverse correlation of HER2 with MHC class I expression on oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2010 Aug 10;103(4):552-9.
13. Takubo K, Aida J, Sawabe M, Kurosumi M, Arima M, Fujishiro M, et al. Early squamous cell carcinoma of the oesophagus: the Japanese viewpoint. *Histopathology*. [Review]. 2007 Dec;51(6):733-42.
14. Rice TW, Blackstone EH, Rusch VW. 7th edition of the AJCC Cancer Staging Manual: esophagus and esophagogastric junction. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jul;17(7):1721-4.
15. Moreira LF, Kamikawa Y, Naomoto Y, Haisa M, Orita K. Endoscopic mucosal resection for superficial carcinoma and high-grade dysplasia of the esophagus. *Surg Laparosc Endosc*. 1995 Jun;5(3):171-5.
16. Konda VJ, Ferguson MK. Esophageal resection for high-grade dysplasia and intramucosal carcinoma: When and how? *World J Gastroenterol*. [Review]. 2010 Aug 14;16(30):3786-92.

17. Stahl M, Stuschke M, Lehmann N, Meyer HJ, Walz MK, Seeber S, et al. Chemoradiation with and without surgery in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 1;23(10):2310-7.
18. Rizk N, Venkatraman E, Park B, Flores R, Bains MS, Rusch V. The prognostic importance of the number of involved lymph nodes in esophageal cancer: implications for revisions of the American Joint Committee on Cancer staging system. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 Dec;132(6):1374-81.
19. Hu Y, Hu C, Zhang H, Ping Y, Chen LQ. How does the number of resected lymph nodes influence TNM staging and prognosis for esophageal carcinoma? *Ann Surg Oncol*. 2010 Mar;17(3):784-90.
20. Solomon N, Zhuge Y, Cheung M, Franceschi D, Koniaris LG. The roles of neoadjuvant radiotherapy and lymphadenectomy in the treatment of esophageal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Mar;17(3):791-803.
21. Herrera LJ. Extent of lymphadenectomy in esophageal cancer: how many lymph nodes is enough? *Ann Surg Oncol*. [Comment Editorial]. 2010 Mar;17(3):676-8.
22. Rice TW, Blackstone EH, Rusch VW. A cancer staging primer: esophagus and esophagogastric junction. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010 Mar;139(3):527-9.
23. Hulscher JB, van Sandick JW, de Boer AG, Wijnhoven BP, Tijssen JG, Fockens P, et al. Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the esophagus. *N Engl J Med*. [Clinical Trial Multicenter Study Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Nov 21;347(21):1662-9.
24. Cid Conde L, Fernandez Lopez T, Neira Blanco P, Arias Delgado J, Varela Correa JJ, Gomez Lorenzo FF. [Hyponutrition prevalence among patients with digestive neoplasm before surgery]. *Nutr Hosp*. [Comparative Study Evaluation Studies]. 2008 Jan-Feb;23(1):46-53.
25. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004 May;4(5):361-70.
26. Begnami MD, Fukuda E, Fregnani JH, Nonogaki S, Montagnini AL, da Costa WL, Jr., et al. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. *J Clin Oncol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Aug 1;29(22):3030-6.
27. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Buttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008 Jun;52(7):797-805.
28. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol*. 2008 Sep;19(9):1523-9.
29. LIMA FKCR, A S ; KULCZYNSKI, J. M. ; MATTANA, D. S. ; COREZOLA, K L ; MOREIRA, L. F. . Immunohistochemical expression of HER/neu-c-erbB-2 in patients with adenocarcinoma of the stomach. . *Journal of the Brazilian College of Surgeons*. 2009;36(131-134).
30. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010 Aug 28;376(9742):687-97.
31. Hanna WM, Kwok K. Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Mod Pathol*. 2006 Apr;19(4):481-7.

32. van de Vijver M, Bilous M, Hanna W, Hofmann M, Kristel P, Penault-Llorca F, et al. Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study. *Breast Cancer Res.* 2007;9(5):R68.
33. Zhan N, Dong WG, Tang YF, Wang ZS, Xiong CL. Analysis of HER2 gene amplification and protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol.* 2011 Feb 13.
34. Sato-Kuwabara Y, Neves J, Fregnani J, Sallum R, Soares F. Evaluation of gene amplification and protein expression of HER-2/neu in esophageal squamous cell carcinoma using Fluorescence in situ Hybridization (FISH) and immunohistochemistry. *BMC Cancer.* 2009;9(1):6.
35. Schoppmann SF, Jesch B, Friedrich J, Wrba F, Schultheis A, Pluschnig U, et al. Expression of Her-2 in carcinomas of the esophagus. *Am J Surg Pathol.* 2010 Dec;34(12):1868-73.
36. Sunpaweravong P, Sunpaweravong S, Puttawibul P, Mitarnun W, Zeng C, Baron A, et al. Epidermal growth factor receptor and cyclin D1 are independently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004;131:111 - 9.
37. Wei Q, Chen L, Sheng L, Nordgren H, Wester K, Carlsson J. EGFR, HER2 and HER3 expression in esophageal primary tumours and corresponding metastases. *Int J Oncol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Sep;31(3):493-9.
38. Hofmann M, Stoss O, Gaiser T, Kneitz H, Heinmoller P, Gutjahr T, et al. Central HER2 IHC and FISH analysis in a trastuzumab (Herceptin(R)) Phase II monotherapy study: assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy. *J Clin Pathol.* 2007.
39. Hu Y, Bandla S, Godfrey TE, Tan D, Luketich JD, Pennathur A, et al. HER2 amplification, overexpression and score criteria in esophageal adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2011 Jul;24(7):899-907.

**Table 1. Clinicoepidemiological characteristics of the patients**

<b>Features</b>	<b>N (85)</b>	<b>Percent (%)</b>
Gender (male:female)	60:25	71:29
Age (years)		
Mean (SD*)	57 (10)	
Median		
Range	29-85	
Race		
White	68	80
Non White	17	20
ASA RISK 2010**		
ASA P I	8	9
ASA P II	59	70
ASA P III	18	21
Staging (AJCC 2010†)		
Ia	4	5
Ib	8	9
IIa	25	29
IIb	20	23
IIIa	16	19
IIIb	5	6
IIIc	6	7
IV	1	1

\*SD, standard deviation; \*\*ASA, American Society of Anesthesiology; †AJCC; American Joint Committee on Cancer revised classification.

**Table 2. Histopathological characteristics**

<b>Features</b>	<b>N (85)</b>	<b>Percent (%)</b>
Tumour Site		
Upper third	2	2
Middle third	17	20
Lower third	66	78
Tumour Size (cm)		
Mean (SD*)	4.6 (2.0)	
Median	4.5	
Range	2.0-9.0	
Tumour Grade		
Well differentiated	8	9
Moderately differentiated	61	72
Poorly differentiated	16	19
TNM-AJCC 2010**		
Tis/T1	10	12
T2	34	40
T3	37	43
T4	4	5
N0	47	55
N1	23	27
N2	12	14
M0	84	99
M1	1	1

\*, SD, standard deviation; \*\*ASA, American Society of Anesthesiology; \*\*AJCC; American Joint Committee on Cancer revised classification.



Table 3. *HER2* frequencies detected by the HercepTest®

<b>SCORES*</b>	<b>N (%)</b>
NEGATIVE	
0+	81(95)
1+	1(1)
POSITIVE	
2+	2(2)
3+	1(1)

\* by immunohistochemistry

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was fully granted by the Research Fund from Hospital de Clínicas de Porto Alegre University Hospital (FIPE-HCPA) and by the Developing Project for Post-graduate Programmes of the Brazilian Research Council 2003 (PRODOC-CAPES 2003).

## FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Representative samples of oesophageal tumours. immunohistochemistry staining for HER2, HercepTest® 1+ (a), 2+ equivocal (b and c) and 3+ (1d) scores. ABC method, 50X magnification.

Figure 2 – Oesophageal tumour samples of HER2 immunohistochemistry. HercepTest® 2+ equivocal (a and b) and 3+ (c and d) scores. ABC method; 200X and 400X magnification, respectively.

FIGURE 1

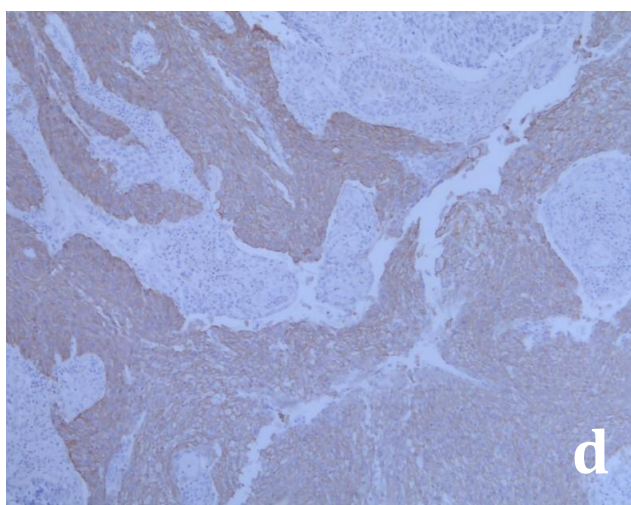
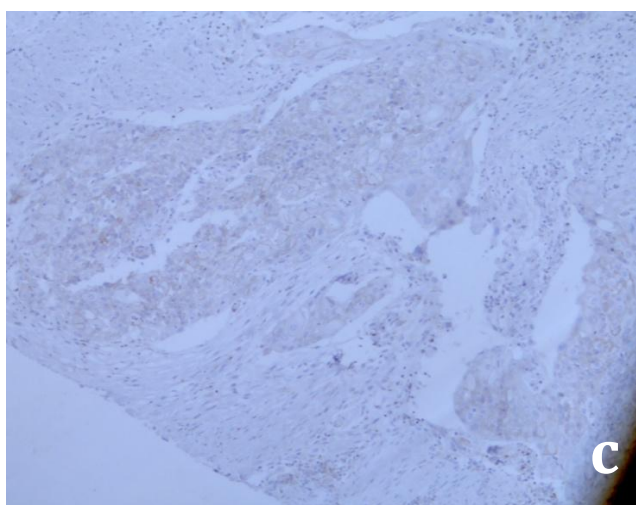
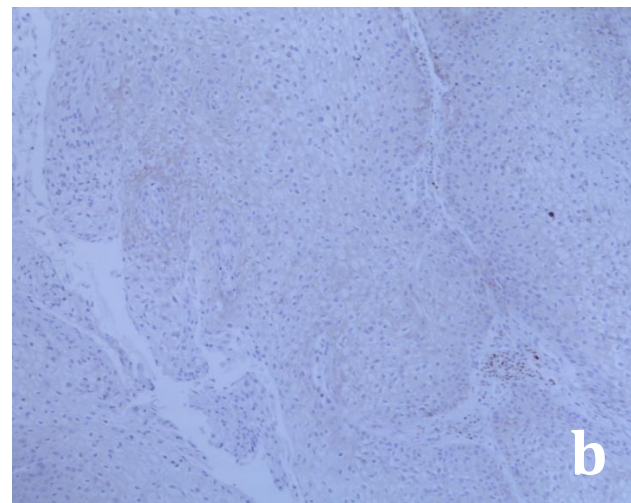
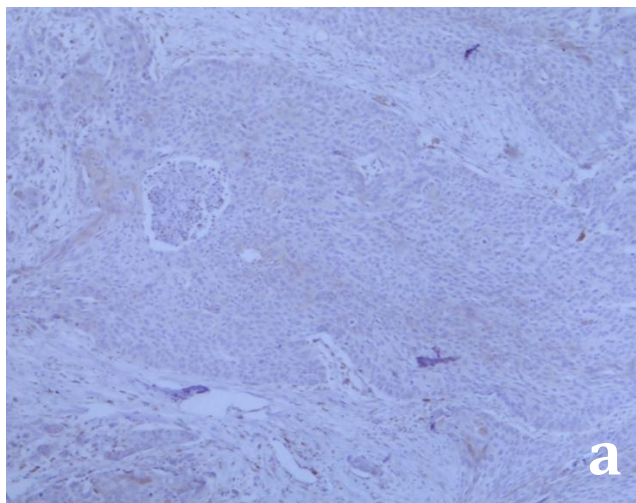


FIGURE 2

