



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA
Pós-Graduação em Oncologia**

IVANIR MARTINS DE OLIVEIRA

**VALOR PROGNÓSTICO DA SUPEREXPRESSÃO DE HER2 NOS
ADENOCARCINOMAS GÁSTRICO E DA JUNÇÃO ESOFAGOGÁSTRICA**

Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Co-orientador: Prof. Dr. Leila Maria Cardão Chimelli

**RIO DE JANEIRO
2018**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA
Pós-Graduação em Oncologia**

IVANIR MARTINS DE OLIVEIRA

VALOR PROGNÓSTICO DA SUPEREXPRESSÃO DE HER2 NOS
ADENOCARCINOMAS GÁSTRICO E DA JUNÇÃO ESOFAGOGÁSTRICA

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação strictu-sensu em Oncologia do
Instituto Nacional de Câncer, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de
Doutor em Oncologia**

Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Co-orientador: Prof. Dr. Leila Maria Cardão Chimelli

**RIO DE JANEIRO
2018**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

AUTOR: IVANIR MARTINS DE OLIVEIRA

**VALOR PROGNÓSTICO DA SUPEREXPRESSÃO DE HER2 NOS
ADENOCARCINOMAS GÁSTRICO E DA JUNÇÃO ESOFAGOGÁSTRICA**

Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Co-orientador: Prof. Dr. Leila Maria Cardão Chimelli

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Andreia Cristina de Melo - INCA
Prof. Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira - INCA
Prof. Dra. Vera Lúcia Nunes Pannaim – UFRJ
Prof. Dr. Heitor Siffert Pereira de Souza- UERJ
Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira - INCA
Prof. Dra. Andre Luiz Mencialha - UERJ

**RIO DE JANEIRO
2018**

DEDICATÓRIA

À minha família e aos amigos pela união e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto pela determinação, estímulo e excelência para o desempenho técnico.

À Prof^a. Dr. Leila Maria Cardão Chimelli pelo exemplo e qualidade profissional.

Ao Prof. Dr. Pedro Nicolau pela disponibilidade e colaboração na formatação do texto, confecção das tabelas e organização das figuras, realização do PCR em Tempo Real e apresentação da tese.

À Prof^a. Dra. Tatiana Simão inestimável contribuição e orientação na redação e correção do texto, na análise dos resultados e conclusão final da tese.

À Prof^a. Dr. Sheila Coelho pela colaboração na orientação da redação e correção do texto e na análise dos resultados.

À Prof^a. Dr. Nathallia Meireles pela colaboração e orientação na apresentação da tese.

À Prof^a. Dr. Anke Bergman pela colaboração e orientação nas análises estatísticas e pelo carinho e disponibilidade.

À Juliana Tobar pela dedicação e empenho na coleta dos dados e colaboração na confecção das planilhas e tabelas das análises estatísticas.

À Naiara Alexandre Soares e Tatiana Lavigne Salles pela qualidade do desempenho na realização da técnica de imuno-histoquímica.

Aos servidores do Arquivo Médico do HCl.

Aos funcionários do arquivo de blocos e lâminas da DIPAT.

Aos bolsistas do Setor de Suporte à Pesquisa da DIPAT.

Enfim, a todos que contribuíram e colaboraram direta ou indiretamente para a realização da minha tese.

EPÍGRAFE

“Não tenho nenhum talento especial, apenas sou apaixonadamente curioso.”
(Albert Einstein escreveu essa frase em uma carta a Carl Seelig em 1952)



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

Valor Prognóstico da Superexpressão de HER2 nos Adenocarcinomas Gástricos e da Junção Esôfago Gástrica.

RESUMO

O câncer de estômago é o quinto câncer mais incidente no mundo e a terceira causa de morte, sendo no Brasil o quarto mais frequente em homens e o sexto entre mulheres. As informações sobre a expressão do HER2 em adenocarcinomas gástricos (ADG) e de junção esofagogástrica (ADE) podem contribuir para estabelecer condutas terapêuticas mais eficazes. O objetivo principal deste estudo é analisar o impacto da superexpressão de HER2 em ADG e ADE. Este estudo teve como base uma coorte retrospectiva de 1999-2006 de pacientes operados no INCA, com inclusão de 270 casos, sendo 227 pacientes com diagnóstico de ADG primário e 43 com diagnóstico de ADE primário. Os dados clinicoepidemiológicos dos pacientes foram obtidos dos prontuários, e feitas revisões de lâminas em HE para coleta dos dados histopatológicos e seleção dos blocos de parafina para imuno-histoquímica (IHC), para avaliação da expressão de HER2. As variáveis clinicoepidemiológicas e morfológicas foram analisadas e os resultados mostraram associação significativa entre gênero e grau histológico do tumor ($p=0,003$), sendo o diagnóstico de baixo grau mais comum entre homens (67,2%) em comparação as mulheres (32,8%). Apresentação avançada do tumor foi mais frequente entre pacientes com baixa escolaridade ($p=0,026$) e nos tumores maior ou igual a 5 cm ($p<0,001$). Invasão neoplásica dos vasos linfáticos foi associada à baixa escolaridade ($p=0,016$), tumor maior ou igual a 5 cm ($p<0,001$) e em casos de limites cirúrgicos comprometidos ($p=0,003$). Invasão perineural foi significativamente associada com idade do paciente menor que 50 anos ($p=0,018$), tumor maior que 5 cm ($p=0,018$) e diagnóstico de alto grau ($p<0,001$). Tumores do tipo difuso foram mais comuns entre as mulheres ($p=0,002$). Indivíduos de baixa escolaridade também apresentaram associação com a positividade de linfonodos ($p=0,028$). Linfonodos positivos foram mais comuns nos tumores maior ou igual a 5 cm ($p<0,001$), com invasão linfática ($p<0,001$), com limites cirúrgicos comprometidos ($p=0,017$), com apresentação avançada ($p<0,001$) e com invasão perineural ($p<0,001$). O pTNM avançado foi observado com maior frequência nos tumores maior ou igual a 5 cm ($p<0,001$), com invasão linfática ($p<0,001$), com forma de apresentação macroscópica avançada ($p<0,001$) e com invasão perineural ($p<0,001$). A expressão do HER2 por IHC foi positiva em 27 amostras, tendo associação significativa com o tipo intestinal de Lauren ($p = 0,045$). A expressão proteica de HER2 foi correlacionada significativamente com a expressão gênica ($p < 0,0001$) e a expressão de HER2 por PCR em Tempo Real evidenciou potencial uso clínico demonstrando que foi capaz de distinguir uma amostra 3+ das demais com 84% de acurácia, apresentando sensibilidade de 80% e especificidade de 78%. Comparando somente amostras 3+ e 2+, a expressão de HER2 foi capaz de distinguir amostras 3+ com 78% de acurácia, sensibilidade de 73% e especificidade de 82%. Assim, os pacientes com ADG ou ADE em estágios avançados na nossa população poderiam se beneficiar de mais um método para serem encaminhados ao tratamento personalizado com o anticorpo monoclonal.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

Prognostic Value of HER2 Overexpression in Gastric and Esophagogastric Junction Adenocarcinomas.

ABSTRACT

Stomach cancer is the fifth most common cancer in the world and the third leading cause of death, being in Brazil the fourth most frequent in men and the sixth among women. Information on the expression of HER2 in gastric adenocarcinomas (GA) and esophagogastric junction (EGA) may contribute to more effective therapeutic behaviors. The main objective of this study is to analyze the impact of HER2 overexpression on GA and EJA. This study was based on a 1999-2006 retrospective cohort of patients operated at INCA, including 270 cases, of which 227 were patients diagnosed with primary GA and 43 with a diagnosis of primary EGA. The clinical and epidemiological data of the patients were obtained from the medical records, and HE slides were revised to collect the histopathological data and to select the paraffin blocks for immunohistochemistry (IHC) to evaluate HER2 expression. Clinical, epidemiological and morphological variables were analyzed and the results showed a significant association between gender and histological grade of the tumor ($p = 0.003$), being the low grade the common diagnosis among men (67.2%) compared to women (32.8 %). Advanced tumor presentation was more frequent among patients with low schooling ($p = 0.026$) and in tumors greater than or equal to 5 cm ($p < 0.001$). Neoplastic invasion of lymphatic vessels was associated with low schooling ($p = 0.016$), tumor greater than or equal to 5 cm ($p < 0.001$) and in cases of positive surgical margins ($p = 0.003$). Perineural invasion was significantly associated with age of the patient younger than 50 years ($p = 0.018$), tumor greater than 5 cm ($p = 0.018$) and diagnosis of high grade ($p < 0.001$). Lauren's diffuse type tumours were more common among women ($p = 0.002$). Subjects with low schooling also had an association with lymph node positivity ($p = 0.028$). Positive lymph nodes were more common in tumors greater than or equal to 5 cm ($p < 0.001$), with lymphatic invasion ($p < 0.001$), with positive surgical margins ($p = 0.017$), with advanced presentation ($p < 0.001$) and perineural invasion ($p < 0.001$). The pTNM was more frequently observed in tumors greater than or equal to 5 cm ($p < 0.001$), with lymphatic invasion ($p < 0.001$), with an advanced macroscopic presentation ($p < 0.001$) and with perineural invasion ($p < 0.001$). Overexpression of HER2 by IHC was positive in 27 samples, with a significant association with Lauren's intestinal type ($p = 0.045$). Protein expression of HER2 was significantly correlated with gene expression ($p < 0.0001$) and HER2 expression by Real Time PCR showed potential clinical use demonstrating that it was able to distinguish a 3+ sample from the others with 84% accuracy, with sensitivity of 80% and specificity of 78%. Comparing only 3+ and 2+ samples, HER2 expression was able to distinguish 3+ samples with 78% accuracy, 73% sensitivity and 82% specificity. Thus, patients with advanced GA or EGA in our population could benefit from one more method to be referred for treatment with the monoclonal antibody.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE	Adenocarcinoma da Junção Esofagogástrica
ADG	Adenocarcinoma Gástrico
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	Protein Kinase B (PKB)
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BARF0	Gene Encoded by Epstein-Barr Virus
BARF1G	Gene Encoded by Epstein-Barr Virus 1G
BRAF	Human Gene that Encodes B-Raf protein
CDH1	E-Cadherina 1
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CEN17	Centrômero17
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CECPS	Carcinomas Escamosos de Cabeça e Pescoço
CGP	Câncer Gástrico Precoce
DAB	Diaminobenzidina
DES	Dissecção Endoscópica Submucosa
DFS	Disease Free Survival
DGCG	Dutch Gastric Cancer Group
DIPAT	Divisão de Patologia
DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
D1	Dissecção de linfonodos paralelos à pequena e à grande Curvaturas
D2	Dissecção de linfonodos paralelos à pequena e à grande curvaturas, ao longo dos vasos principais do tronco celíaco, do grande epíplon e da bolsa omental
EDL	Extensão na Dissecção de Linfonodos
EBV	Epstein-Barr Virus
EBER-1	Epstein-Barr Virus Encoded Small RNA-1
EBER-2	Epstein-Barr Virus Encoded Small RNA-2
EBNA1	Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	European Medical Agency
EPIC	European Prospective Investigation Into Cancer And Nutrition
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
5-FU	5-Fluorouracil
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphatehydrogenase
GGCS	German Gastric Cancer Study
GLOBOCAN	WEB-Portal for International Cancer Research
HER2/ErbB2	Human Epidermal Receptor 2
HER3/ErbB3	Human Epidermal Receptor 3
HER4/ErbB4	Human Epidermal Receptor 4
HCI	Hospital do Câncer I
HNPCC	Hereditary Nonpoliposis Colorectal Cancer

HDGC	Hereditary Diffuse Gastric Cancer
IARC	International Agency for Research on Cancer
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IGCLC	Consórcio Internacional de Câncer Gástrico
IUCC	International Union Against Cancer
JEG	Junção Esofagogástrica
JGCA	Japan Gastric Cancer Association
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LM/LI	Linfonodos Metastáticos/Linfonodos Isolados
LMP2A	Latent Membrane Protein 2 (A)Terminal Cytoplasmic Domain
mAbs	Monoclonal Antibodies
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MRC	Medical Research Council
MS	Ministério da Saúde
NNC	N-Nitroso Compound
NCI	National Cancer Institute
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCRq	Polymerase Chain Reaction quantitative
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog Gene/Protein
RAF	Família das Kinases das 3 Proteínas Kinases Específicas
RAS	Oncogene Codifica 3 Proteínas H-RAS, K-RAS e N-RAS
REM	Ressecção Endoscópica Mucosa
RNA	Ribonucleic Acid
R0	Ressecção Cirúrgica com margens proximal, distal circunferencial
SPSS	Statistical Package For Social Sciences (Software IBM-SPSS)
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCPS	Tumores de Cabeça e Pescoço
TKIS	Tirosino-Kinases Inhibitors
ToGA	Trastuzumab For Gastric Cancer Trial
UICC	União Internacional Contra o Câncer
UV	Ultra-Violenta
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Mapa de incidência do câncer gástrico no mundo	20
Figura 1.2	Subsítios anatômicos gástrico	23
Figura 1.3	Classificação macroscópica do carcinoma gástrico precoce (CGP)	31
Figura 1.4	Classificação macroscópica de Borrmann para carcinoma gástrico avançado	33
Figura 1.5	Fotomicrografias de adenocarcinomas gástricos segundo a diferenciação.	37
Figura 1.6	Fotomicrografias de adenocarcinomas pouco diferenciados com células em anel de sinete gástrico na Classificação da OMS e tipo difuso na Classificação de Lauren	38
Figura 1.7	Fotomicrografias de adenocarcinomas pouco diferenciados gástrico com células soltas, sem coesão, na Classificação da OMS e tipo difuso na Classificação de Lauren	39
Figura 1.8	Cascatas de sinalização ativadas pelos receptores HER/ErbB	50
Figura 1.9	Exemplos de marcação imuno-histoquímica HER2, escore 3+	56
Figura 3.1	Exemplo de eletroforese para seleção das amostras que foram incluídas na análise de expressão gênica.	72
Figura 4.1	Distribuição das frequências das principais características etio-epidemiológicas e clínicas	76
Figura 4.2	Distribuição das frequências clinicomorfológicas	78
Figura 4.3	Distribuição das frequências histopatológicas em relação à diferenciação, grau e classificação de Lauren	79
Figura 4.4	Distribuição das frequências histopatológicas em relação à invasão, tipo de infiltrado peritumoral e presença de desmoplasia	80
Figura 4.5	Distribuição das frequências dos linfonodos isolados, dos linfonodos metastáticos e das metástases à distância	82
Figura 4.6	Classificação Patológica (pTNM) dos adenocarcinomas	83

Figura 4.7	Distribuição das frequências das lesões associadas na mucosa não tumoral – 1	84
Figura 4.8	Detecção de <i>Helicobacter pylori</i> no muco superficial da mucosa gástrica associada ao adenocarcinoma gástrico	85
Figura 4.9	Fotomicrografias representativas dos escores da expressão proteica de HER2 nos adenocarcinomas gástricos e da JEG	102
Figura 4.10	Fotomicrografia representativa do escore 3+ da expressão proteica de HER2, com padrão de marcação característico basolateral e lateral nos adenocarcinomas gástricos e da JEG	103
Figura 4.11	Curva de sobrevida comparando pacientes HER2 positivos e HER2 negativos	105
Figura 4.12	Curva de sobrevida comparando pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (classificação de Lauren) HER2 positivos e HER2 negativos.	106
Figura 4.13	Curva de sobrevida comparando pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo difuso (classificação de Lauren) HER2 positivos e HER2 negativos	107
Figura 4.14	Expressão de HER2 nos adenocarcinomas gástricos e de JEG	109
Figura 4.15	Análise de correlação entre a expressão gênica de <i>HER2</i> por qPCR e a expressão proteica por imuno-histoquímica	110
Figura 4.16	Potencial uso da expressão gênica de HER2 por qPCR para determinar superexpressão proteica de HER2 em adenocarcinoma gástrico e de JEG.	111

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1	Estimativas de novos casos de câncer no Brasil para o ano de 2018.	21
Quadro 1.2	Classificação Histológica dos Tumores Gástricos segundo OMS (2010).	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Distribuição dos casos operados e selecionados de acordo com o ano de matrícula no INCA	61
Tabela 4.1	Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com o grau de diferenciação dos tumores (alto ou baixo graus)	87
Tabela 4.2	Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com a forma do tumor	89
Tabela 4.3	Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com invasão linfática	91
Tabela 4.4	Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com invasão perineural	93
Tabela 4.5	Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com o tipo difuso de Lauren	95
Tabela 4.6	Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com linfonodos positivos	97
Tabela 4.7	Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com a classificação pTNM	99
Tabela 4.8	Avaliação da expressão de HER2 por imuno-histoquímica dos pacientes com adenocarcinoma gástrico	101
Tabela 4.9	Análise das associações da expressão de HER2 e das variáveis epidemiológicas e clinicomorfológicas	104

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 EPIDEMIOLOGIA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DO CÂNCER GÁSTRICO	19
1.2 FATORES DE RISCO	24
1.2.1 <i>Helicobacter pylori</i>	24
1.2.2 Vírus Epstein-Barr	25
1.2.3 Fatores dietéticos	25
1.2.4 Consumo de álcool	26
1.2.5 Tabagismo	27
1.2.6 História Familiar	28
1.2.7 Atividades Ocupacionais	28
1.2.8 Condições Predisponentes	29
1.3 ASPECTOS PATOLÓGICOS DO CÂNCER GÁSTRICO	29
1.3.1 Aspectos Macroscópicos do Câncer Gástrico	29
1.3.2 Classificação do Carcinoma de Junção Esofagogástrica	34
1.3.3 Tipos Histológicos de Carcinoma Gástrico	34
1.3.4 Vias de Disseminação do Carcinoma Gástrico	39
1.4 FATORES PROGNÓSTICOS DO CÂNCER GÁSTRICO	41
1.4.1 Idade	41
1.4.2 Localização do tumor	42
1.4.3 Tipo Histológico e grau de diferenciação	42
1.4.4 Tamanho do tumor	43
1.4.5 Profundidade de invasão na parede	43
1.4.6 Número de linfonodos metastáticos e número de linfonodos retirados	43
1.4.7 Invasão linfática e invasão vascular sanguínea	44

1.4.8 Tipo de ressecção cirúrgica	44
1.4.9 Margens de ressecção cirúrgica	45
1.5 TRATAMENTO DO CARCINOMA GÁSTRICO E DA JUNÇÃO ESOFAGOGÁSTRICA	46
1.6 A FAMÍLIA DE RECEPTORES DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO E OS TUMORES GASTROINTESTINAIS	48
2. OBJETIVOS.....	59
2.1 Objetivo principal	59
2.2 Objetivos Específicos	59
3. MATERIAL E MÉTODOS	60
3.1 Critérios de Inclusão e de Exclusão dos Pacientes	60
3.2 Seleção dos pacientes	61
3.3 Coletas das informações clínico-epidemiológicas e anatomo- patológicas	62
3.4 Amostras	64
3.5 Expressão Proteica de HER2	65
3.5.1 Método de Imuno-histoquímica Automatizada	65
3.5.1.1 Cortes Histológicos	65
3.5.1.2 Acondicionamento das Lâminas na Máquina BENCHMARK XT (Ventana Medical Systems-Roche Group, EUA)	66
3.5.1.3 Protocolo Automatizado para CERB, segundo descrito por Ventana Medical Systems-Roche Group, EUA)	66
3.6 Análise das Lâminas de HER2	69
3.7 Análise da Expressão Gênica	70
3.7.1. Extração de RNA	70
3.7.2. Quantificação de RNA	71
3.7.3. Reação de Transcrição Reversa	71

3.7.4. Avaliação da integridade do RNA por PCR.....	72
3.7.5. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa	73
3.8 Análise Estatística.....	73
4. RESULTADOS	75
4.1 Caracterizações epidemiológica e clinicopatológica dos pacientes incluídos no estudo	75
4.2. Avaliação de lesões associadas na mucosa não tumoral da peça cirúrgica e da presença de infecção pelo <i>Helicobacter pylori</i>	83
4.3 Avaliação da evolução clínica dos pacientes.....	85
4.4. Avaliação da associação entre as características epidemiológicas e clinicopatológicas dos pacientes e fatores prognósticos conhecidos para o câncer gástrico	86
4.4.1 Avaliação de fatores associados ao grau histológico do tumor	86
4.4.2. Avaliação de fatores associados à forma de apresentação do tumor	88
4.4.3 Avaliação de fatores associados à invasão linfática	90
4.4.4 Avaliação de fatores associados à invasão perineural	92
4.4.5 Avaliação de fatores associados à classificação de Lauren	94
4.4.6. Avaliação de fatores associados à ocorrência de linfonodos positivos	96
4.4.7. Avaliação de fatores associados ao TNM patológico	98
4.5. Análise da expressão de HER2	100
4.5.1 Avaliação da associação entre as características epidemiológicas e clinicomorfológicas dos pacientes e expressão de HER2.....	103
4.5.2 Avaliação da sobrevida e expressão proteica de HER2	105
4.6. Expressão gênica de HER2 em adenocarcinomas gástricos e de JEG.....	107

4.7 Correlação entre a expressão gênica e a expressão proteica de HER2	109
4.8 Potencial uso da expressão de HER2 para identificar superexpressão proteica em adenocarcinoma gástrico e de JEG	110
5. DISCUSSÃO	112
6. CONCLUSÕES	126
7. REFERÊNCIAS	127
8. ANEXOS	153
ANEXO 1	153
ANEXO 2	154
ANEXO 3	159
ANEXO 4	160
ANEXO 5	161
ANEXO 6	162
ANEXO 7	163
ANEXO 8	164
ANEXO 9	165
ANEXO 10	166
ANEXO 11	167
ANEXO 12	168
ANEXO 13	169
ANEXO 14	170

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ANATÔMICAS DO CÂNCER GÁSTRICO

Em 2012 foi estimada a ocorrência de 952.000 novos casos de câncer gástrico no mundo (6,8% do total), representando o quinto câncer mais comum, sendo os mais frequentes, os de pulmão, mama, colorretal e próstata. Em estimativa global é a terceira causa de morte em ambos os sexos, e responsável por 8,8% do total de mortes por câncer. Nas últimas décadas houve uma grande mudança, já que nos anos 70, as estimativas apontavam esse câncer como o mais comum (FERLAY *et al.*, 2012. GLOBOCAN). Mais de 70% dos casos de câncer gástrico ocorrem nos países em desenvolvimento e a metade do total ocorre no leste da Ásia. A República da Coreia tem a maior taxa de incidência de câncer gástrico, seguida pelos países Mongólia e Japão. As mais altas incidências são observadas na Ásia, América Latina e Caribe, e as mais baixas incidências na África e América do Norte (FERLAY *et al.*, 2012. GLOBOCAN) (**Figura 1.1**).

No Brasil, a estimativa é da ocorrência de aproximadamente 600.000 novos casos de câncer por ano, para o biênio 2018-2019, excetuando-se o câncer de pele não melanoma. A estimativa epidemiológica brasileira é semelhante àquela dos países da América Latina e do Caribe, na qual o câncer de próstata (68.000) nos homens e o câncer de mama (60.000) nas mulheres serão os mais frequentes (**Quadro 1.1**). Os tipos de cânceres mais frequentes nos homens serão os de próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os mais frequentes serão os de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%), tireóide (4,0%) e estômago (3,8%) (INCA/MS, 2017). Estes dados indicam que, no Brasil, o câncer de estômago é mais frequente no sexo masculino, o que também é observado em praticamente todos os países do mundo, ocorrendo de duas a quatro vezes mais do que no sexo feminino (YEOLE, 2008; JEMAL *et al.*, 2011).

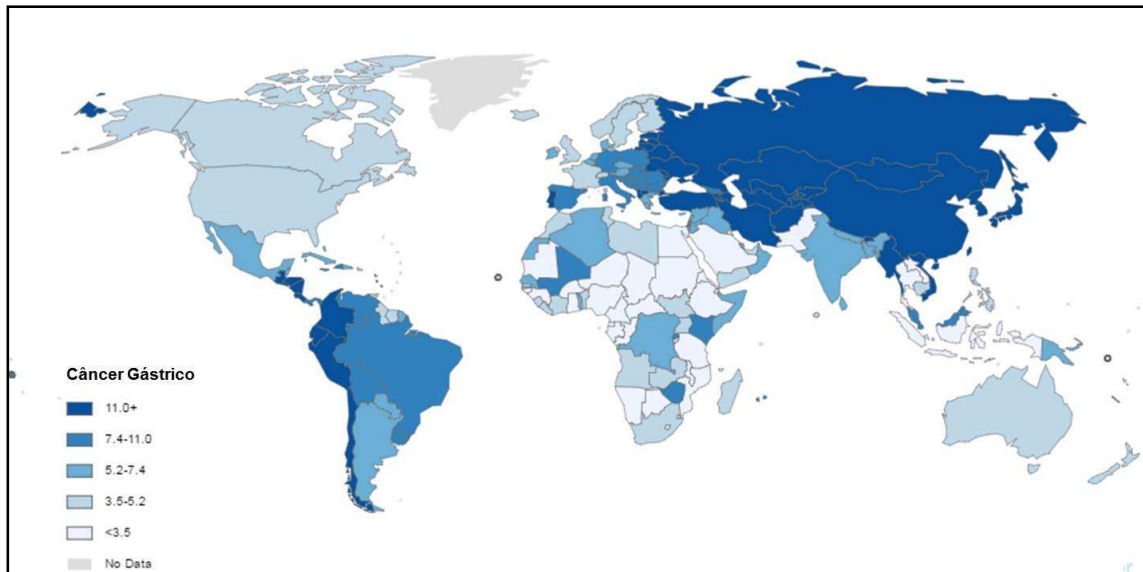


Figura 1.1 Mapa de incidência do câncer gástrico no mundo. Os diferentes tons de azul indicam as taxas de incidência por 100.00 habitantes de cada região mundial em ambos os sexos, ajustadas por idade (adaptado do GLOBOCAN, 2012).

A incidência do câncer gástrico aumenta com a idade, sendo que a maior incidência ocorre da sétima a nona décadas de vida. Os casos em indivíduos com 30 anos ou menos são muito raros e estão associados a predisposição genética (THEUER *et al.*, 1996; NAKAMURA *et al.*, 1999; NAGINI, 2012).

O câncer gástrico pode se originar na metade proximal e na metade distal do estômago (**Figura 1.2**). Aqueles que se originam na metade distal do estômago são mais frequentes nos países em desenvolvimento, em indivíduos negros e nos grupos de baixo desenvolvimento socioeconômico. Os fatores de maior risco para o aparecimento dos tumores distais são os fatores dietéticos e a infecção por *Helicobacter pylori*. Os adenocarcinomas que se originam na região proximal gástrica, na junção esôfago gástrica (JEG) e no esôfago distal são mais comuns nos países desenvolvidos, em indivíduos brancos e nas classes sociais mais altas, tendo como fatores de risco a Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE), a obesidade, o Esôfago de Barrett, o tabagismo e dieta pobre em frutas e vegetais

(ENGEL *et al.*, 2003; CREW E NEUGUT, 2006; WHITEMAN *et al.*, e THE AUSTRALIAN CANCER STUDY, 2008; SHOHEEN E RICHTER, 2009).

Quadro 1.1 Estimativas de novos casos de câncer no Brasil para o ano de 2018. Taxas brutas e ajustadas de incidência de câncer por 100.000 habitantes e o número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária (INCA/MS, 2017).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	68.220	66,12	67,82	15.720	70,76	66,31	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,33	51,29	19.920	80,33	63,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,43	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,33	21,05	12.530	11,81	9,22	3.710	15,06	11,44
Cólon e Reto	17.380	16,83	20,03	5.630	25,34	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	3.240	14,55	10,95	7.750	7,32	5,96	2.210	8,92	5,34
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,38	12,03	3.500	3,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,31	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,30	0,92
Bexiga	6.690	6,43	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,63	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,73	1.450	6,46	7,04	2.550	2,38	1,67	540	1,85	1,38
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,43	1,14	550	2,19	1,93	1.050	0,96	0,92	400	1,33	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.370	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glândula Tireoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.340	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,63	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.600	6,22	5,44	2.370	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.920	2,82	2,69	800	3,34	3,31	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,62	43,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,39
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,32	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Pele não Melanoma	85.170	82,53	-	17.020	76,60	-	80.410	75,84	-	17.230	69,60	-
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,86	-	69.430	312,52	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registro	324.580	314,55	-	-	-	-	310.300	292,74	-	-	-	-

*População padrão mundial (1960). / *Números arredondados para múltiplos de 10.

A incidência do adenocarcinoma gástrico distal diminuiu em todo o mundo, embora existam variações na magnitude desse declínio entre os diversos países. As causas desse declínio não estão totalmente explicadas, mas podem ser atribuídas a eventos como refrigeração adequada e disponibilidade de frutas e vegetais frescos melhor conservados, diminuição na prática de conservar

alimentos pela defumação e com sal e redução da infecção crônica por *Helicobacter pylori* por meio dos programas de saúde (JEMAL *et al.*, 2009; ANDERSON *et al.*, 2010).

O adenocarcinoma gástrico da cárdia ou junção esofagogástrica (ADE) tem apresentado aumento de incidência nos Estados Unidos e em vários países da Europa. Esse aumento na incidência tem sido associado ao aumento na ocorrência da DRGE devido ao número elevado de indivíduos obesos, o que vem alcançando proporções epidêmicas entre os norte-americanos e europeus. A melhora na distinção adequada do adenocarcinoma gástrico da cárdia e adenocarcinoma do esôfago inferior através da classificação internacional padronizada é outro fator que tem contribuído para o aumento na incidência do adenocarcinoma gástrico da cárdia (FOCK, 2014).

Os adenocarcinomas constituem aproximadamente 95% das neoplasias do estômago (SARBIA, BECKER E HÖFLER, 2004). O câncer gástrico originado distal à cárdia não se comporta como uma única doença, mas como várias doenças afetando as diversas regiões do estômago e apresentando aspectos histológicos diferentes. O Sistema de Classificação de Lauren (1965) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) descreveram dois tipos de câncer no estômago distal, que apresentam características clínicas e epidemiológicas distintas, o tipo intestinal e o tipo difuso.

O tipo intestinal ou bem/moderadamente diferenciado forma estruturas tubulares ou glandulares neoplásicas semelhantes às intestinais, são mais frequentes no sexo masculino, em indivíduos idosos de regiões de alto risco, é do tipo epidêmico e tem melhor prognóstico. Tem origem em lesões pré-malignas na sequência de gastrite crônica atrófica, metaplasia intestinal e displasia, estando associadas a fatores ambientais, como a infecção pelo *Helicobacter pylori*, obesidade e fatores dietéticos. São frequentemente ulcerados e mais propensos à disseminação hematogênica e metástases hepáticas. Já o tipo difuso ou pouco diferenciado é caracterizado por crescimento infiltrativo com espessamento da parede gástrica, sem formação de massa tumoral, sendo constituído por células neoplásicas soltas em meio a estroma desmoplásico abundante, tem prognóstico

desfavorável, é propenso à disseminação peritoneal e menos propenso a produzir metástase hepática.

O tipo difuso é mais frequente em áreas endêmicas, em mulheres, indivíduos mais jovens, e em associação ao grupo sanguíneo A, o que indica susceptibilidade genética. A distinção entre os tipos intestinal e difuso do câncer gástrico tem sido comprovadamente de valor nos estudos epidemiológicos, e em estabelecer o prognóstico tumoral. Ambos os tipos de câncer gástrico ocorrem em populações de alto risco, mas a proporção de carcinomas do tipo difuso é maior nos grupos de baixo risco. Adenocarcinomas do tipo misto, compostos por características dos tipos intestinal e difuso, também podem ocorrer (LAUREN, 1965; CORSO, SERUCA, ROVIELLO, 2012).

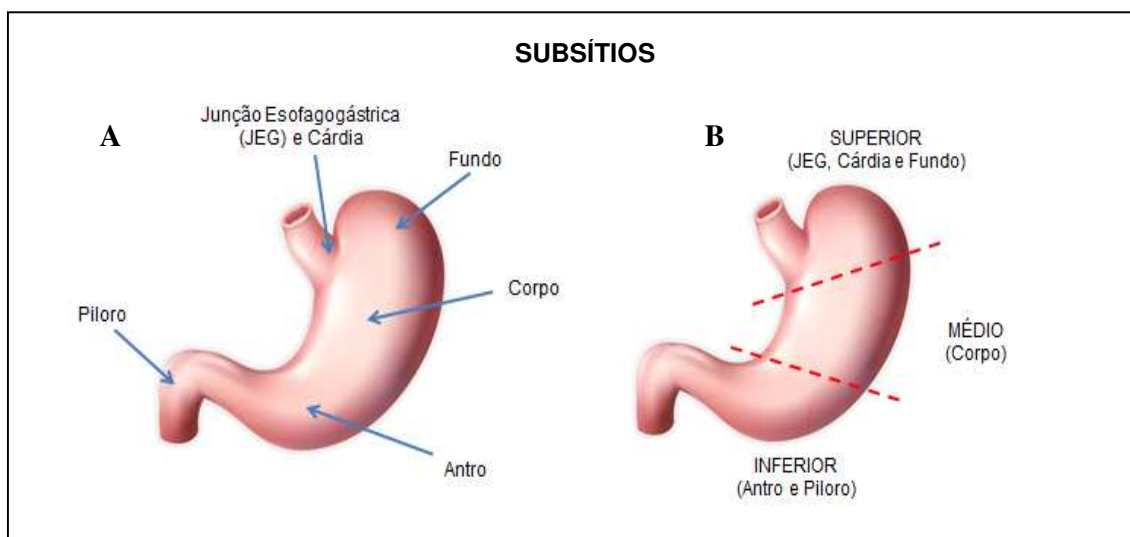


Figura 1.2 Subsitios anatômicos gástrico. Regiões funcionais: Junção esofagogástrica (JEG), cárdia, fundo, corpo, antro e píloro (A). Subdivisões gástricas em terços: superior (JEG, cárdia e fundo), médio (corpo) e inferior (antro e píloro) (B) (modificado de [www.fotosearch.com/CSP992/K14151341/Human stomach, eps10](http://www.fotosearch.com/CSP992/K14151341/Human%20stomach,%20eps10). View Large Clip Art Graphic, © Can Stock Photo).

1.2 FATORES DE RISCO

1.2.1 *Helicobacter pylori*

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (do inglês *International Agency for Research on Cancer*, IARC), em 1994, reconheceu a infecção por *Helicobacter pylori* como uma causa primária do adenocarcinoma gástrico, baseada em evidência epidemiológica. As lesões pré-neoplásicas associadas ao *Helicobacter pylori* são características do câncer gástrico do tipo intestinal e não do tipo difuso, que está mais provavelmente relacionado à etiologia genética. Apesar de 80% dos casos de adenocarcinoma gástrico serem atribuídos à infecção por *Helicobacter pylori*, a etiologia desse câncer é multifatorial, e fatores dietéticos, hábitos de vida, fatores genéticos, fatores socioeconômicos e outros fatores também contribuem para a carcinogênese gástrica.

A evolução da infecção pelo *Helicobacter pylori* varia individualmente e apenas um número pequeno de pessoas infectadas irá desenvolver câncer gástrico, cerca de 3 casos por ano para cada 10.000 pessoas infectadas (CORREA P, 2014). Por outro lado, diversos estudos concluíram que a infecção pelo *H. pylori* eleva em aproximadamente duas vezes o risco de desenvolver câncer gástrico (HOUGHTON E WANG, 2005; ESLICK, 2006).

A evidência de que o *Helicobacter pylori* é um fator de risco para a carcinogênese gástrica tem despertado grande interesse na pesquisa dos mecanismos pelos quais este patógeno induz a carcinogênese. A associação da virulência da cepa, o ambiente favorável e o hospedeiro geneticamente suscetível são considerados fundamentais para o bacilo induzir o câncer gástrico (HOFMAN *et al*, 2004; KIM *et al.*, 2011). O *Helicobacter pylori* secreta diferentes agentes que causam dano à mucosa gástrica, como a urease, protease, fosfolipase, amônia e acetoaldeído, que rompem a barreira funcional da mucosa via ativação da miosina II mediada pela urease (WROBLEWSKI *et al.*, 2009). Tem sido sugerido que o *Helicobacter pylori* desencadeia uma cascata de eventos que promovem a sequência progressiva, que se inicia com lesão ao epitélio da mucosa normal,

gastrite crônica atrófica, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma. O estresse oxidativo produzido é um fator virulento nos pacientes infectados por *H. pylori*. Sendo assim, embora o *Helicobacter pylori* não seja mutagênico, poderia levar à formação de substâncias mutagênicas através de mediadores inflamatórios ou do bloqueio de vias de reparo (KIM *et al.*, 2011).

1.2.2 Vírus Epstein-Barr

O Epstein-Barr vírus (EBV) também é detectado em 2 a 16% dos adenocarcinomas gástricos no mundo todo, sendo a sua maior frequência associada aos tumores localizados nos terços proximal e médio do estômago. Os genes relacionados ao EBV, como os EBER-1, EBER-2, EBNA1, LMP2A, BARF0 e BARF1 são expressos nos cânceres gástricos, mas o seu papel na carcinogênese gástrica não está estabelecido (CORREA, 2014).

1.2.3 Fatores dietéticos

A ingestão excessiva de sal e de alimentos conservados com sal (peixes, vegetais e carne enlatada) tem papel importante na carcinogênese gástrica com base em dados de estudos epidemiológicos e experimentais (D'ELIA *et al.*, 2012). Estudos apontam para o aumento do risco de câncer gástrico em duas vezes quando o consumo desses alimentos é frequente (SHICATA *et al.*, 2006). O risco aumentado está associado com a infecção pelo *Helicobacter pylori* e com a gastrite atrófica (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2007). O sal induz hipergastrinemia e mutações endógenas promovendo proliferação celular epitelial, que eventualmente leva à perda de células parietais e progressão para o câncer gástrico (KIM *et al.*, 1997; VELMURUGAN, MANI, NAGINI, 2005).

Já os nitratos podem ser encontrados de forma natural em alimentos como repolho, couve-flor, cenoura, cereais, rabanete e espinafre, ou podem ser adicionados aos alimentos para conservação. Ainda contribui para a dieta o nitrato

encontrado nos fertilizantes, no solo e na água. O nitrito, o nitrato e os agentes nitrosaminados podem ser sintetizados por via endógena através de reações mediadas por bactérias e/ou por macrófagos ativados. O suco gástrico ácido converte o nitrato da dieta em composto N-nitroso (NNC) carcinogênico, que aumenta o risco para o câncer gástrico (SUZUKI *et al.*, 2005; LIU E RUSSEL, 2008). Deve-se ainda ressaltar que algumas formas de preparo dos alimentos também estão associadas ao aumento do risco para câncer gástrico, como grelhar a carne, assar, fritar, secar ao sol, salgar e condimentar, uma vez que levam à formação aumentada de NNC. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como o benzo[a]pireno, formado em alimentos defumados, também são citados como fatores de risco em várias regiões com altas taxas de câncer gástrico (JEDRYCHOWSKI, 2003; WOGAN *et al.*, 2004).

1.2.4 Consumo de álcool

Outro fator de risco importante para o câncer gástrico é o álcool. Existem relatos de que o consumo frequente de bebidas alcoólicas aumenta o risco de câncer de estômago em homens e mulheres (ZARIDZE *et al.*, 2000). Em um estudo prospectivo de coorte da população da Noruega, foi concluído que a exposição combinada ao tabaco e ao álcool aumenta o risco de câncer gástrico (SJÖDAHL *et al.*, 2007). Em estudo de coorte realizado pela Investigação Prospectiva Europeia em Câncer e Nutrição (do inglês, *European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition* (EPIC), em 2011, foi concluído que o consumo pesado de álcool (60 g ou mais de etanol/dia), principalmente cerveja, está associado ao risco de adenocarcinoma gástrico não cárdico do tipo intestinal em homens (DUELL *et al.*, 2011). Tramacere e colaboradores (2012), realizaram um estudo de meta-análise sobre o consumo de álcool e câncer gástrico analisando 44 trabalhos caso-controle e 15 estudos de coorte até 2010, concluindo que havia associação positiva entre o consumo pesado de álcool (4 ou mais drinques/dia; sendo que um drink corresponde a 12,5 g de etanol) e o risco de câncer gástrico, principalmente para os adenocarcinomas não cárdicos.

No entanto, não encontraram associação entre o consumo de álcool e o risco de câncer gástrico, quando o consumo de álcool foi moderado (menos de 4 drinques/dia) (TRAMACERE *et al.*, 2012).

Existem algumas hipóteses ainda sendo pesquisadas para explicar porque o álcool aumenta o risco de câncer de diversos tipos (boca, faringe, laringe, fígado, esôfago, mama, colorretal e de estômago). Este aumento poderia estar relacionado ao dano ao DNA nas células saudáveis produzido por um agente químico. O acetaldeído, que é produzido quando o álcool é metabolizado pelo organismo. O álcool pode afetar o bloqueio da secreção de estrogênio, o que aumenta a liberação de estrogênio no sangue. O aumento de estrogênio no corpo é fator de risco para os cânceres de mama, ovário e uterino. A ingestão de álcool pode ainda diminuir a capacidade de absorção de importantes nutrientes, como as vitaminas A, C, D e E, folato e carotenoides. O consumo de álcool também pode aumentar o ganho de peso, o que aumenta o risco de câncer (National Cancer Institute (NCI): Stomach Cancer – Risks Factors and Alcohol and Cancer Risk, Approved by the Cancer. Net Editorial Board, 04/2016).

1.2.5 Tabagismo

Segundo a iniciativa de Investigação Prospectiva Européia em Câncer e Nutrição (do inglês, *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition - EPIC*), existe uma associação significativa entre a intensidade e a duração do consumo de cigarros e o risco de câncer gástrico, e que ocorre um declínio no risco, 10 anos após cessar o consumo de cigarros (GONZÁLEZ *et al.*, 2003). O tabagismo diminui a secreção de prostaglandinas, que normalmente mantêm a integridade da mucosa gástrica, além de induzir o aparecimento de lesões gástricas precursoras como gastrite, ulceração e metaplasia intestinal. Os indivíduos fumantes tendem a apresentar incidência mais elevada de infecção por *H. pylori* e de inflamação gastroduodenal (GONZÁLEZ E LÓPEZ-CARRILLO, 2010). De acordo com a IARC (2004), o tabagismo é responsável por aproximadamente 10% de todos os casos de câncer gástrico, aumentando o risco

de câncer tanto para aqueles localizados na região da cárdia, quanto para os não-cárdicos, sendo mais frequentemente associado aos primeiros.

1.2.6 História Familiar

O câncer gástrico também apresenta uma manifestação de Síndrome Hereditária de predisposição ao câncer em 10% dos casos, semelhante ao Câncer Colorretal Não Polipose Hereditário (HNPCC) e à Síndrome de Li-Fraumeni. Os demais 90% dos cânceres gástricos se manifestam de forma esporádica (BEVAN E HOULSTON, 1999). Em 1964, o câncer de estômago do tipo hereditário foi observado em uma família tribal Maori, na Nova Zelândia, que apresentava um padrão de herança autossômica dominante. Posteriormente, em 1998, foram descritas mutações no gene E-caderina (*CDH1*) em pacientes de três famílias Maori. Nessa época, o Consórcio Internacional de Câncer Gástrico (IGCLC) introduziu a denominação Câncer Gástrico Difuso Hereditário (HDGC). As famílias com múltiplos casos de câncer gástrico difuso, câncer da mama do tipo lobular, ou ambos, podem estar sendo afetadas pela Síndrome de HDGC. Indivíduos da mesma família geralmente estão expostos ao mesmo ambiente e têm condições sócioeconômicas similares. Esses fatores de risco atuam de forma independente ou associados aos fatores genéticos, aumentando o risco para o câncer gástrico (LICHTENSTEIN *et al.*, 2000).

1.2.7 Atividades Ocupacionais

Tem sido descrita correlação entre o risco aumentado para o câncer gástrico e vários tipos de atividades ocupacionais, como mineração, fazenda, refinaria, pesca, além de atividades que processam borracha, madeira e asbestos (STRAIF *et al.*, 2000; KRSTEV *et al.*, 2005). Exposição ocupacional a poeiras e ambientes ocupacionais de altas temperaturas (cozinhas, processamento de madeira e operadores de máquinas) também estão associados ao aumento significativo do risco para o câncer de estômago do tipo difuso (SANTIBAÑEZ *et al.*, 2012).

1.2.8 Condições Predisponentes

A gastrite crônica atrófica, a gastrectomia subtotal (côto gástrico), as síndromes de imunodeficiência, a úlcera gástrica crônica e a doença de Menetrier são condições associadas ao aumento do risco de câncer. A associação dessas doenças é controversa e algumas delas como a gastrite crônica atrófica e o côto gástrico são mais importantes nas áreas de alto risco para o câncer gástrico. A gastrite crônica atrófica associada ao *Helicobacter pylori* é o mais importante precursor do câncer gástrico, e estudos feitos no Japão mostraram que 80% dos carcinomas gástricos originam-se em mucosa gástrica atrófica em áreas apresentando metaplasia intestinal incompleta (SIURALA, LEHTOLA, IHAMAKI, 1974; NAGAYO, 1977; MIYAMOTO *et al.*, 2002; MIYAMOTO *et al.*, 2003). O risco do câncer gástrico surgir no côto gástrico pós gastrectomia parcial com anastomose Billroth II por úlcera gástrica crônica está estimado em 5% a 10%, consequente ao refluxo biliar que leva à inflamação crônica com a formação de pólipos inflamatórios e alterações epiteliais reativas acentuadas (SCHAFER *et al.*, 1983; TOFTGAARD, 1989). O risco de câncer gástrico nas imunodeficiências primárias varia de 2% a 10%, sendo que a maioria dessas neoplasias são linfomas, mas carcinomas gástricos também ocorrem. Embora existam muitos relatos da associação de Doença de Menetrier com o câncer gástrico, essa desordem é mal definida na literatura, sendo necessário utilizar critérios histológicos específicos para estabelecer o diagnóstico diferencial e excluir pólipos hiperplásicos múltiplos (SCHARSCHMIDT, 1977; LAXEN *et al.*, 1982; COFFEY *et al.*, 2007).

1.3 ASPECTOS PATOLÓGICOS DO CÂNCER GÁSTRICO

1.3.1 Aspectos Macroscópicos do Câncer Gástrico

O câncer gástrico, de acordo com critérios clínicos, é classificado em estágio inicial ou avançado para facilitar a determinação do tratamento mais

adequado. O câncer gástrico precoce (CGP) ou superficial é aquele que invade a mucosa ou a mucosa e a submucosa independente da presença de metástase linfonodal.

A Sociedade Japonesa de Endoscopia (1962) descreveu a classificação macroscópica específica que divide o CGP em três tipos: tipo 0-I (polipoide), tipo 0-II (superficial), subdividido em tipo 0-IIa (superficial elevado), tipo 0-IIb (superficial plano) e tipo 0-IIc (superficial deprimido), além do tipo 0-III (superficial escavado ou ulcerado) (modificado da Classificação de 1962 da Sociedade Japonesa de Endoscopia). Muitos CGP apresentam tipos macroscópicos combinados, sendo representado em primeiro lugar o tipo que representa a maior extensão na lesão, seguido pelo tipo menor (por exemplo: tipo IIc + IIa ou Tipo IIc + III). O critério usado para classificar o tipo 0-I é que ele tenha medida de altura de mais de duas vezes a espessura da mucosa normal, e o tipo 0-IIa que tenha a medida de altura menor ou igual a duas vezes a espessura da mucosa normal. O critério usado para classificar o tipo 0-III é que ele tenha medida de profundidade de mais de duas vezes a espessura da mucosa normal, e o tipo 0-IIc que tenha a medida de profundidade menor ou igual a duas vezes a espessura da mucosa normal (The International Gastric Cancer Association and The Japanese Gastric Cancer Association, 2011) (**Figura 1.3**).

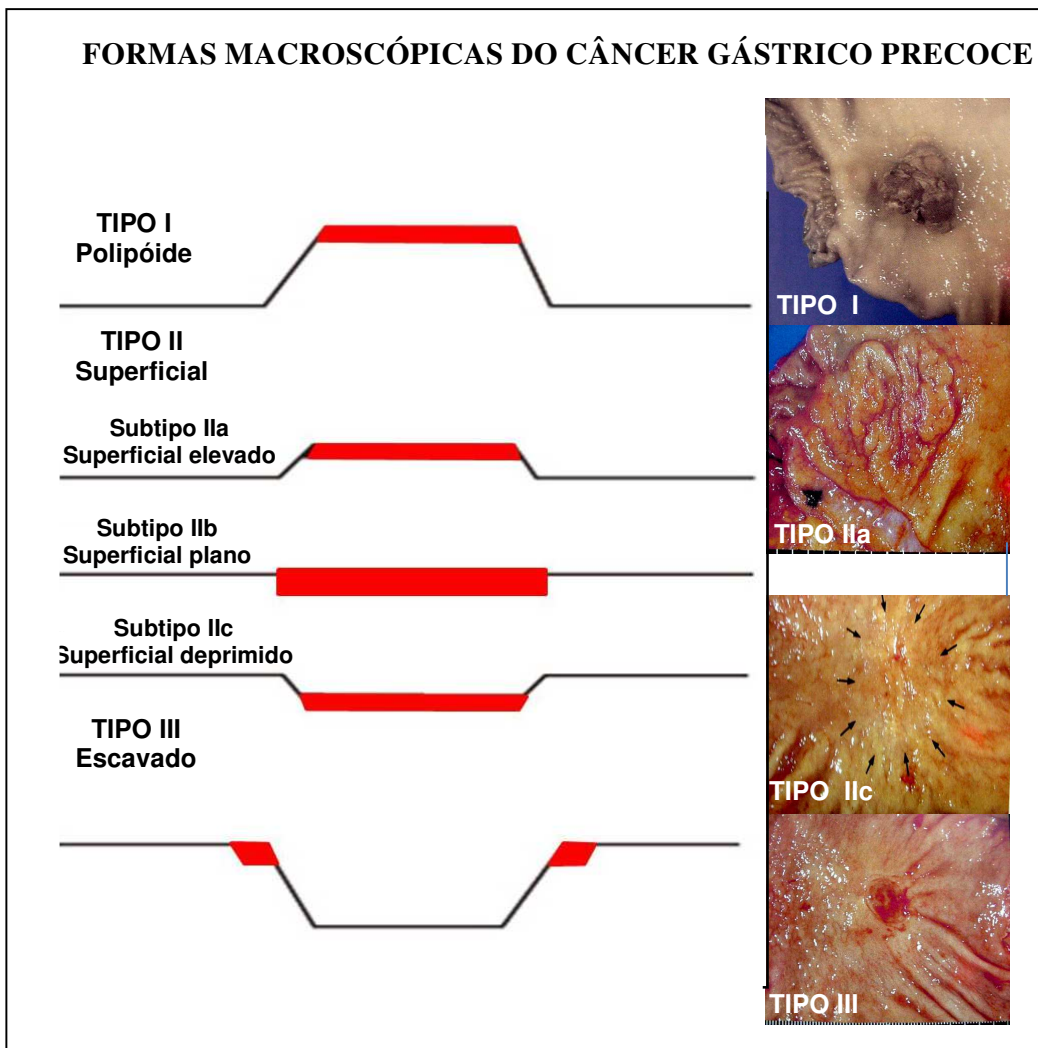


Figura 1.3 Classificação macroscópica do carcinoma gástrico precoce (CGP). Esquema dos tipos macroscópicos com as fotos representativas de macroscopia de peças cirúrgicas correspondentes (exceto tipo IIb). Tipo I: polipoide; tipo IIa: superficial elevado; tipo IIb: superficial plano; tipo IIc: superficial deprimido; tipo III: escavado ou ulcerado. As áreas em vermelho correspondem a carcinoma e as linhas pretas correspondem à mucosa não tumoral adjacente (adaptado de *Japanese Research Society for Gastric Cancer. Japanese classification of gastric carcinoma*. Tokyo: Kanehara & Co, Ltd., 1995 e fotos macroscópicas do acervo da Divisão de Patologia do INCA).

O cirurgião alemão Borrmann (1926) descreveu uma classificação macroscópica para o câncer gástrico avançado, que é utilizada até os dias de hoje, e tem grande importância prática para o planejamento e realização do tratamento cirúrgico (tipo de ressecção cirúrgica). Essa classificação originalmente descreveu quatro tipos. O tipo I ou Borrmann I (1), lesão de aspecto macroscópico vegetante ou fungóide, o tipo II ou Borrmann II (2), lesão ulcerada de bordas elevadas e bem delimitadas, o tipo III ou Borrmann III (3), lesão ulcerada de bordas mal definidas e infiltrativas e o tipo IV ou Borrmann IV (4) lesão difusa de aspecto infiltrativo e mal delimitada. Posteriormente, foi descrito o tipo V (5) de câncer gástrico avançado, que seria aquele carcinoma com aspecto macroscópico misto ou que não poderia ser classificado em nenhuma das categorias descritas acima (Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva) **(Figura 1.4)**.

FORMAS MACROSCÓPICAS DO CÂNCER GÁSTRICO AVANÇADO (CLASSIFICAÇÃO DE BORRMANN)

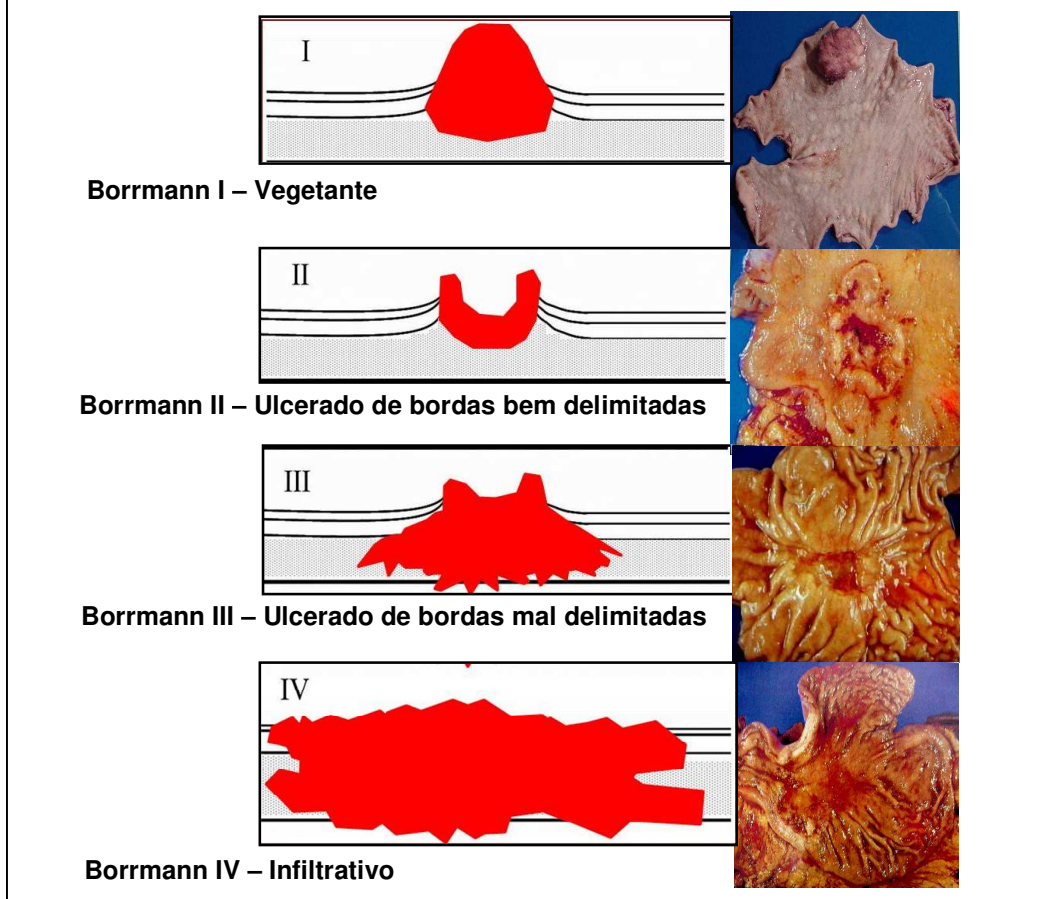


Figura 1.4 Classificação macroscópica de Borrmann para carcinoma gástrico avançado. Esquema dos tipos macroscópicos com as fotos representativas de macroscopia de peças cirúrgicas correspondentes. Borrmann I = vegetante; Borrmann II = ulcerado bem delimitado; Borrmann III = ulcerado mal delimitado e Borrmann IV = infiltrativo; as áreas vermelhas correspondem a carcinoma e as linhas pretas ao tecido não tumoral adjacente (adaptado de *Japanese Gastric Cancer Association. Japanese Classification of Gastric Carcinoma, 2nd English Edition. Gastric Cancer 1998; 1:10* e fotos macroscópicas do acervo da Divisão de Patologia do INCA).

1.3.2 Classificação do Carcinoma de Junção Esofagogástrica

A classificação do câncer gástrico baseada na localização anatômica tem levantado muitas discussões, principalmente quando os tumores estão localizados no estômago proximal ou na cárdia e acometem a junção esofagogástrica (JEG). Várias classificações foram propostas a fim de alcançar o consenso (HU *et al.*, 2012). A Associação Internacional de Câncer Gástrico preconiza a divisão do câncer gástrico em três tipos: o tipo I, representando os tumores do terço distal do esôfago, o tipo II representando os tumores da cárdia e o tipo III, aqueles localizados distal à cárdia (SIEWERT e STEIN, 1998). Essa classificação não define critérios precisos para cada uma das localizações anatômicas descritas. Na classificação do TNM pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) na 7ª edição, houve uma simplificação para a localização dos cânceres gástricos proximais, baseando-se na localização do epicentro dos tumores e no comprometimento da junção esofagogástrica (EDGE *et al.*, 2010). Um tumor que tenha o epicentro localizado a menos de 5,0 cm da junção esofagogástrica e que também se estenda para o esôfago deve ser classificado e estadiado com o esquema de esôfago. Todos os tumores com o epicentro no estômago distando mais de 5,0 cm da JEG, ou aqueles com epicentro a menos de 5,0 cm da JEG, sem extensão para o esôfago, são estadiados usando o esquema de carcinoma gástrico (UICC/AJCC 7ª edição, 2010).

1.3.3 Tipos Histológicos de Carcinoma Gástrico

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2010), os carcinomas gástricos mais comuns podem ser classificados em: adenocarcinoma papilífero, adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma com células em “anel de sinete”, carcinoma com células pouco coesivas (células soltas), carcinoma misto, carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma hepatóide, carcinoma com

estroma linfóide, coriocarcinoma, carcinosarcoma, carcinoma de células parietais, tumor rabdóide maligno, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma de células de Paneth, carcinoma indiferenciado, carcinoma adenoneuroendócrino misto, tumor do seio endodérmico, carcinoma embrionário, tumor do saco vitelino puro gástrico e adenocarcinoma oncocítico (*Tumours of the stomach, WHO histological classification of gastric tumours, 2010*) (**Quadro 1.2**). Essa classificação é baseada em padrões histológicos predominantes apresentados pelos tumores, uma vez que os adenocarcinomas gástricos tendem a apresentar ampla variedade arquitetural e citológica.

Quadro 1.2 Classificação Histológica dos Tumores Gástricos segundo OMS (2010).

<p>I – Tumores epiteliais</p> <ul style="list-style-type: none">- Neoplasia- Adenoma- Carcinomas<ul style="list-style-type: none">Adenocarcinoma tipo intestinal e tipo difusoAdenocarcinoma papilíferoAdenocarcinoma tubularAdenocarcinoma mucinosoCarcinoma com células em “anel de sinete”Carcinoma adenoescamosoCarcinoma de célula escamosa (epidermóide)Carcinoma de células pequenasCarcinoma indiferenciadoOutros- Neoplasia neuroendócrina bem diferenciada (tumor carcinoide) <p>II – Tumores não-epiteliais</p> <ul style="list-style-type: none">- Leiomioma- Schwannoma- Tumor de células granulares- Tumor glômico- Leiomiossarcoma- Tumor de estroma gastrointestinal – GIST (benigno, de potencial maligno incerto ou maligno)- Sarcoma de Kaposi- Outros- Linfomas (Linfoma de célula B de zona marginal tipo MALT, Linfoma do Manto, Linfoma de grandes células B difuso, outros)- Tumores secundários

Utilizando-se os critérios de Lauren (1965), os adenocarcinomas gástricos podem ser classificados em tipo intestinal ou tipo difuso, além do tipo indeterminado ou misto (**Figuras 1.5, 1.6 e 1.7**). O tipo intestinal ocorre em cerca de 54% dos casos, o tipo difuso em cerca de 32% dos casos, e o tipo misto ou indeterminado, em cerca de 14% dos casos. O adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal ocorre com maior frequência associado à metaplasia intestinal e à infecção por *Helicobacter pylori*, enquanto o tipo difuso é mais frequente em mulheres e em indivíduos jovens (LAUREN, 1965; CORREA, 2014).

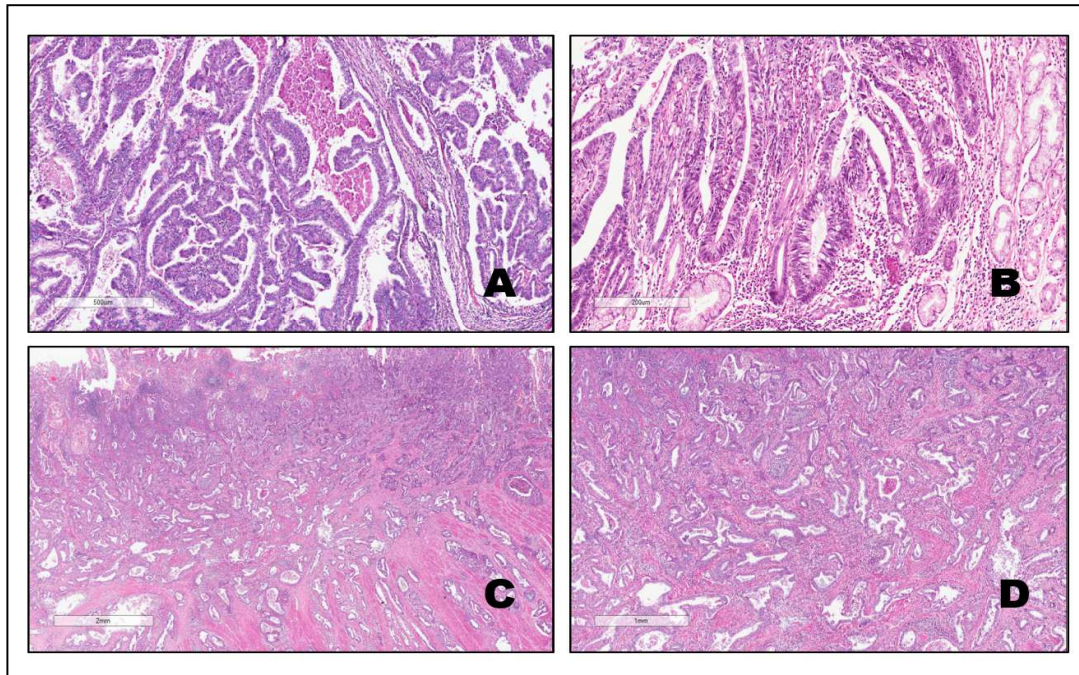


Figura 1.5 Fotomicrografias de adenocarcinomas gástricos segundo a diferenciação. Adenocarcinomas bem diferenciados de padrão papilífero (**A** - 500 μ m) e de padrão tubular (**B** - 200 μ m) e moderadamente diferenciados de padrão tubular (**C** - 2 mm e **D** - 1 mm), de acordo com a Classificação da OMS e tipo intestinal na Classificação de Lauren (H&E); Fotos originais dos casos deste estudo.

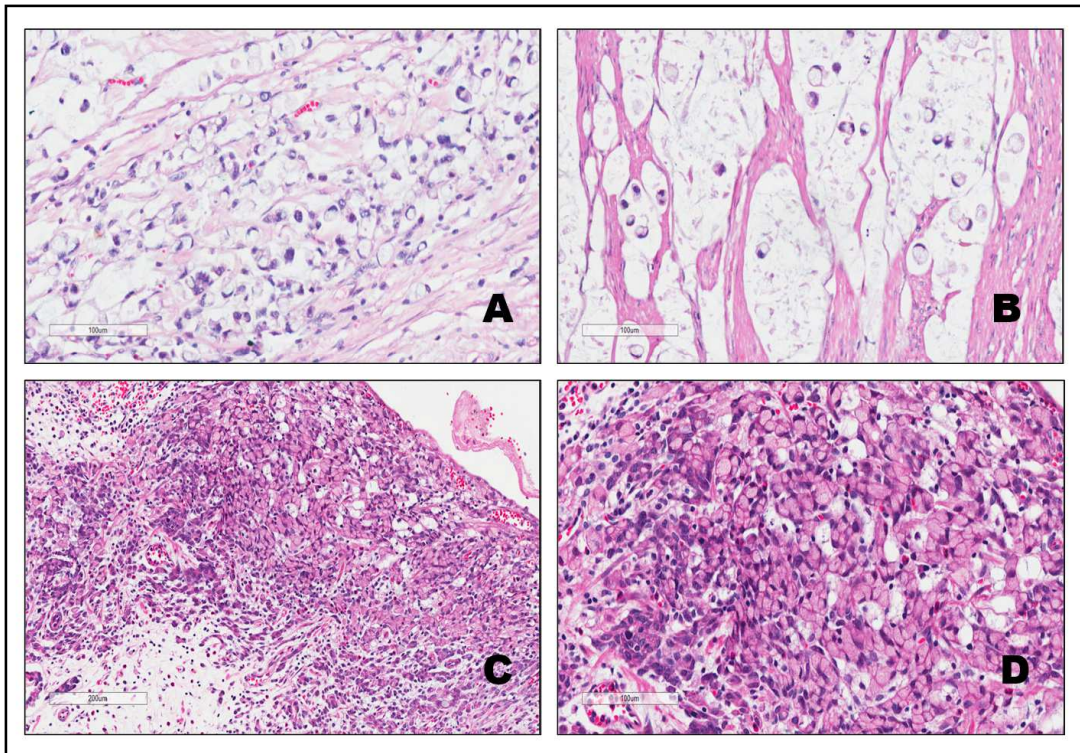


Figura 1.6 Fotomicrografias de adenocarcinomas pouco diferenciados com células em anel de sinete (assinaladas por setas pretas em B) gástrico na Classificação da OMS e tipo difuso na Classificação de Lauren (A - 100 µm; B - 100 µm, C - 200 µm, D - 100 µm) (H&E); Fotos originais dos casos deste estudo.

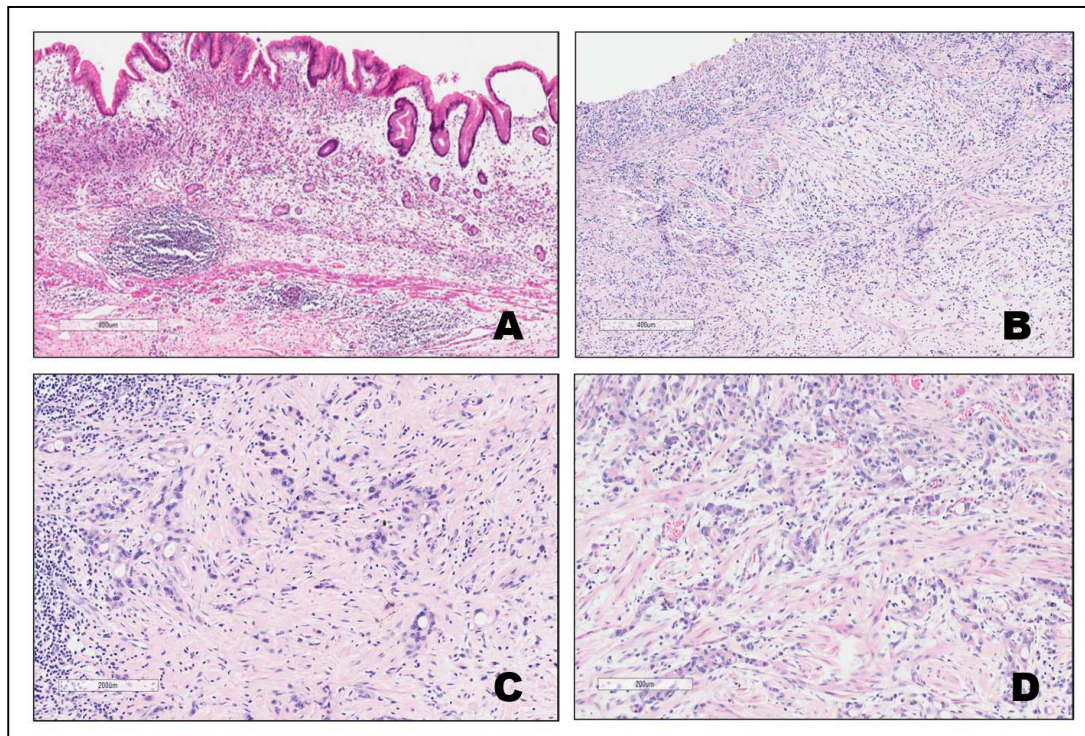


Figura 1.7 Fotomicrografias de adenocarcinomas pouco diferenciados gástrico com células soltas, sem coesão, na Classificação da OMS e do tipo difuso na Classificação de Lauren (A - 400 µm, B - 400 µm, C - 200 µm, D - 200 µm) (H&E); Fotos originais dos casos deste estudo.

1.3.4 Vias de Disseminação do Carcinoma Gástrico

A disseminação do carcinoma gástrico pode ocorrer por extensão direta através das camadas da parede (mucosa, submucosa, muscular própria e subserosa), com perfuração da serosa e infiltração neoplásica de órgãos adjacentes, como o pâncreas, cólon transverso, parede abdominal e hilo hepático. Também pode ocorrer a disseminação por extensão em continuidade para o esôfago e para o duodeno. A disseminação linfática pode ocorrer precocemente, em carcinomas intramucosos e submucosos, devido à rede linfática abundante próxima à muscular da mucosa e na submucosa. A invasão linfática

microscopicamente é comum, e as metástases para linfonodos também ocorrem com elevada frequência, chegando a mais de 90% nos casos de câncer gástrico avançado (RINGERTZ, 1967; MING, 1984; DESAI *et al.*, 2004). O propósito da ressecção cirúrgica de linfonodos (linfadenectomia) é detectar e ressecar metástases, melhorando assim as chances de sobrevivência e permitindo o estadiamento adequado. A invasão vascular sanguínea é raramente demonstrada microscopicamente, embora ela esteja certamente presente quando existe metástase hepática. As metástases de origem hematogênica mais comuns são para fígado e pulmões, em cerca de 35% dos casos. Também podem ocorrer metástases via hematogênica para qualquer outro órgão, como osso e pele. A idade, o gênero e o tipo histológico influenciam o padrão de disseminação à distância. Os carcinomas do tipo intestinal geralmente ocorrem no terço distal gástrico e em homens idosos, e metastatizam com frequência para o fígado (ESAKI *et al.*, 1990).

Os carcinomas difusos, que predominam em mulheres pré-menopausa, tendem a disseminar por via transperitoneal. As metástases para ovários por via transperitoneal ocorrem em cerca de 10% dos casos, estando associadas ao carcinoma do tipo difuso de Lauren (Tumor de Krukenberg), e as metástases para ovários por via hematogênica, ocorrem nos carcinomas do tipo intestinal (LERWILL E YOUNG, 2006). Quando o carcinoma atinge a superfície serosa, existe a possibilidade de ocorrerem implantes no grande omento e disseminação até o peritônio pélvico. O comprometimento neoplásico transperitoneal, combinado à obstrução linfática, pode levar ao desenvolvimento de ascite (MUHAMMAD, IMRAN, MUHAMMAD, 2009). A disseminação peritoneal do câncer gástrico ocorre em cerca de 55 a 60% dos pacientes e a carcinomatose peritoneal resultante é a manifestação clínica mais comum e importante, levando ao prognóstico adverso (CHAMBERS, GROOM, MACDONALD, 2002; FACCHIANO *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2011).

1.4 FATORES PROGNÓSTICOS DO CÂNCER GÁSTRICO

A melhor e mais importante forma de estimar o prognóstico do câncer gástrico é por meio do estadiamento na época do diagnóstico. Atualmente, o Sistema de Estadiamento padrão utilizado é o TNM, publicado pela OMS. A *American Joint Committee on Cancer / International Union Against Cancer (AJCC/UICC)* revisou e publicou a Classificação dos Tumores Malignos - TNM (sétima edição) para câncer gástrico em 2010, baseada em várias evidências clínicas de valor prognóstico, obtidas de centros médicos de todo o mundo, nos últimos anos (SOBIN, 2002; SOBIN, 2010).

Outros fatores prognósticos relevantes incluem idade, localização do tumor, tamanho do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação, profundidade de invasão do tumor na parede, invasão linfática e vascular sanguínea, números de linfonodos metastáticos, número de linfonodos retirados, taxa de linfonodos metastáticos, tipo de ressecção cirúrgica, ressecção cirúrgica radical, quimioterapia adjuvante, e outros (WANG *et al.*, 2010).

1.4.1 Idade

O valor prognóstico da idade no câncer gástrico é controverso, pois alguns pesquisadores relatam ser um fator prognóstico independente (ZHANG *et al.*, 2004; AN *et al.*, 2010; DENG *et al.*, 2010), enquanto alguns autores acreditam que os pacientes mais jovens têm pior prognóstico do que os mais idosos devido ao pior comportamento biológico dos tumores e do tipo histológico (PARK *et al.*, 2009). Outros autores relatam que os pacientes idosos têm pior prognóstico porque são submetidos a ressecções cirúrgicas menos extensas, com ressecção limitada de linfonodos e baixa tolerância à quimioterapia (SAITO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010).

1.4.2 Localização do tumor

Um trabalho de análise de prognóstico de pacientes com câncer gástrico relatou que pacientes com câncer gástrico proximal apresentam prognóstico significativamente pior do que aqueles com câncer gástrico distal, sendo esse fator correlacionado com o tamanho do tumor, profundidade de invasão na parede e tipo de metástase linfonodal (principalmente metástase para o mediastino) (ZHANG *et al.*, 2004). Wang e colaboradores (2010) verificaram que, embora o câncer gástrico proximal tenha pior prognóstico que o câncer distal em análise univariada, a localização do tumor não é um fator prognóstico independente em uma análise multivariada.

1.4.3 Tipo Histológico e grau de diferenciação

O tipo histológico do tumor e o grau de diferenciação também podem afetar a sobrevida do paciente significativamente, visto que a sobrevida global em cinco anos dos pacientes com carcinomas bem diferenciados é de 50%, daqueles com carcinomas moderadamente e pouco diferenciados é de 18%, e se for tipo linite plástica é de 3% (OHMAN, WETTERFORS, MOBERG, 1972). Ainda não é muito bem explicado se as variações no comportamento dos carcinomas gástricos devido aos estágios e aos graus são causados por fatores independentes ou interligados. Hermanek (1987) demonstrou diferenças na sobrevida de acordo com o grau do carcinoma, nos tumores avançados. O mesmo não foi observado nos carcinomas gástricos precoces. A análise estágio por estágio dos carcinomas gástricos avançados ressecados cirurgicamente demonstrou que a taxa de sobrevida em cinco anos para os carcinomas do tipo intestinal foi significativamente melhor do que para os do tipo difuso. Nos carcinomas tipo intestinal T2 foi de 64% e nos carcinomas tipo difuso T2 foi de 45%; nos tipo intestinal T3 foi 42%, e nos tipo difuso T3 foi de 17% (HERMANEK, 1987).

1.4.4 Tamanho do tumor

A medida do tumor tem sido relatada como sendo de significado prognóstico, em vários trabalhos retrospectivos (YOKOTA *et al.*, 2000; ADACHI *et al.*, 2000). Esses relatos sugerem que o crescimento tumoral está associado com metástases linfonodais e com a sobrevida em cinco anos. Wang e colaboradores (2010) relataram que pacientes com tumores menores que 2,5 cm tinham melhor prognóstico do que aqueles com tumores medindo de 3,0 a 5,0 cm, e aqueles maiores que 5,0 cm.

1.4.5 Profundidade de invasão na parede

Os carcinomas gástricos caracteristicamente progridem em crescimento vertical através da parede invadindo as camadas mucosa, submucosa, muscular própria, serosa e podem invadir órgãos e estruturas adjacentes. A profundidade de invasão na parede está relacionada à probabilidade de metástases para linfonodos regionais e reduz a sobrevida em cinco anos. Pacientes com câncer gástrico superficial (precoce) restrito à mucosa e submucosa têm sobrevida em cinco anos de cerca de 95%. Quando invade a camada muscular própria, a sobrevida cai para 80% a 60%, e quando invade a subserosa e serosa cai para menos de 50% (YOSHIKAWA E MARUYAMA, 1985; ISHIGAMI, NATSUGOE, MIYAZONO *et al.*, 2004).

1.4.6 Número de linfonodos metastáticos e número de linfonodos retirados

O número de linfonodos metastáticos e de linfonodos retirados é o fator prognóstico mais importante em pacientes que foram submetidos ao tratamento cirúrgico curativo. A sobrevida é melhor quando os linfonodos examinados são negativos. A sobrevida em cinco anos para pacientes classificados como pN1 (um a dois linfonodos comprometidos) é de 76%, pN2 (três a seis linfonodos comprometidos) é de 57% e pN3 (mais de seis linfonodos comprometidos) é de

26%, na Coréia e, 62%, 33% e 17%, respectivamente, nos Estados Unidos (STRONG, *et al.*, 2010). Um estudo japonês propôs a avaliação da taxa entre o número de linfonodos metastáticos e o número de linfonodos isolados (LM/LI) como um novo fator prognóstico nos carcinomas gástricos em estágio IV (KODERA, *et al.*, 1997). Na literatura mais atual, existem estudos sugerindo que a taxa de LM/LI seria um fator prognóstico mais efetivo para avaliar a sobrevida, quando comparada ao número de linfonodos metastáticos apenas, levando à melhoria no Sistema de Estadiamento utilizado (MARCHET *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2009).

1.4.7 Invasão linfática e invasão vascular sanguínea

Recentemente, a presença de êmbolos neoplásicos linfáticos e vasculares tem sido observada como potencial indicador prognóstico independente, e influencia significativamente a recorrência tumoral e a evolução para o óbito após a ressecção curativa (YOKOTA *et al.*, 1999; YOKOTA *et al.*, 2000; MAEHARA *et al.*, 2002). Alguns autores como Wang e colaboradores (2010) e Liu e colaboradores (2010), descrevem a invasão linfática e a invasão venosa como fatores prognósticos independentes, mesmo no câncer gástrico precoce, em análise multivariada.

1.4.8 Tipo de ressecção cirúrgica

A única opção de tratamento curativo para o adenocarcinoma gástrico avançado é a ressecção cirúrgica, cuja finalidade principal é a remoção da neoplasia primária com margens de ressecção cirúrgica proximal, distal e circunferencial negativas (ressecção cirúrgica classificada como sendo tipo R0). Já a extensão da linfadenectomia é um assunto bastante discutido no tratamento cirúrgico do câncer gástrico.

A discrepância entre as taxas de sobrevida em estudos realizados nos grandes centros do Japão e do Ocidente sobre a extensão na dissecação de

linfonodos (EDL) levou à realização de ensaios multicêntricos randomizados: o *Dutch Gastric Cancer Group (DGCG)*, o *German Gastric Cancer Study (GGCS)* e o *Medical Research Council (MRC) Trial*. No DGCG, os autores compararam os tipos de cirurgia com dissecação de linfonodos D1 (linfonodos localizados paralelos à pequena e à grande curvaturas) e D2 (linfonodos localizados paralelos à pequena e à grande curvaturas, ao longo dos vasos principais do tronco celíaco, do grande epíplon e da bolsa omental), e concluíram que os resultados não justificavam a extensão na dissecação de linfonodos a D2. No entanto, no GGCS, a análise dos subgrupos mostrou que houve diferença significativa entre os pacientes em Estádio II e aqueles em Estádio IIIA, quando submetidos à dissecação D2 (SIEWERT *et al.*, 1998; BONENKAMP *et al.*, 1999). Os resultados do MRC demonstraram diferença significativa entre os grupos submetidos a cirurgias com dissecação de linfonodos à D2 e à D1 em relação à mortalidade (13% x 6,5%; P=0.04) e morbidade pós-operatória (46% x 28%; P<0.001), sem diferenças na sobrevida global em cinco anos para D2 e D1 (33% x 35%) (CUSCHIERI *et al.*, 1999).

Em 1998, a Japanese Gastric Cancer Association (JGCA) criou uma classificação para os linfonodos perigástricos baseada na localização. Estudos prospectivos bem conduzidos demonstraram que a extensão na dissecação de linfonodos não está associada ao aumento da morbidade e da mortalidade, quando as cirurgias são realizadas em centros especializados, e melhoram a sobrevida à longo prazo dos pacientes em estádios II, IIIA e talvez IIIB (HARRISON, KARPEH, BRENNAN, 1998).

1.4.9 Margens de ressecção cirúrgica

Alguns estudos relatam que a margem cirúrgica comprometida pelo carcinoma está associada à diminuição da sobrevida global (FUJIMOTO *et al.*, 1997; HARTGRINK, BONENKAMP, VAN DE VELDE, 2000). A extensão da ressecção cirúrgica depende principalmente da localização do tumor e a distância do tumor até a margem cirúrgica de ressecção é importante. Nos tumores de antro

gástrico, sendo possível manter margem de ressecção cirúrgica proximal livre de neoplasia, distando 6,0 cm do tumor, e não existindo infiltração neoplásica de outros órgãos, as taxas de sobrevida em cinco anos para gastrectomia subtotal e gastrectomia total são semelhantes, sendo de 65,3% e de 62,4%, respectivamente (BOZZETTI *et al.*, 1999).

1.5 TRATAMENTO DO CARCINOMA GÁSTRICO E DA JUNÇÃO ESÔFAGOGÁSTRICA

O diagnóstico da doença em fase inicial e o tratamento precoce são fundamentais para o prognóstico do câncer gástrico. A detecção do carcinoma gástrico precoce (CGP) ou superficial depende do exame endoscópico acurado. Métodos de tratamento minimamente invasivos como a ressecção endoscópica mucosa (REM) e a dissecação endoscópica submucosa (DES) têm sido a escolha preferencial para o tratamento dos carcinomas gástricos superficiais. Embora a cura completa do CGP seja obtida com a ressecção cirúrgica radical, tem sido estimulado o desenvolvimento de métodos endoscópicos menos invasivos que levem à cura completa com segurança (YADA, YOKOI, UEMURA, 2013). O tratamento principal do câncer gástrico e de tumores da junção esofagogástrica (JEG) continua sendo a ressecção cirúrgica e leva à cura nos casos de câncer em estádios iniciais. No entanto, as taxas de sobrevida dos pacientes com carcinomas avançados e ressecáveis do estômago e da JEG permanecem muito baixas, apesar das novas estratégias de tratamento, como a quimioterapia perioperatória ou quimiorradioterapia adjuvante (MACDONALD *et al.*, 2001; CUNNINGHAM *et al.*, 2006).

A escolha do procedimento cirúrgico adequado para a ressecção do câncer gástrico é baseada no tamanho e na localização do tumor, além da facilidade técnica para obtenção de margens cirúrgicas livres (macroscópica e microscópica) de doença. Vários estudos europeus mostraram que para obter margens cirúrgicas adequadas, sem doença, é necessário que o tumor esteja localizado no mínimo a 5,0 cm de distância da margem cirúrgica mais próxima nos casos de

adenocarcinoma do tipo intestinal e a 10 cm, nos casos de adenocarcinoma do tipo difuso (BOZZETTI *et al.*, 1982; WILLIS *et al.*, 2000; BOZZETTI, 2001; PIERIE E OTT, 2001; DICKEN *et al.*, 2005).

Os tumores localizados no terço superior (proximal) do estômago geralmente são tratados com gastrectomia total e aqueles que comprometem a JEG com esofagogastrectomia, para assegurar margens cirúrgicas de ressecção adequadas. Já pacientes com carcinomas localizados nos terços médio e inferior gástrico (ou médio e distal) podem ser submetidos a gastrectomias subtotal ou total, pois apresentam a mesma sobrevida em cinco anos (BOZZETTI *et al.*, 1999).

Bozzetti e colaboradores (1982; 2001) concluíram que quando o câncer gástrico compromete órgãos adjacentes, esses órgãos devem ser ressecados em bloco com o estômago, permitindo, dessa forma, a ressecção de margens cirúrgicas livres de doença. Assim, o protocolo empregado é gastrectomia total ou subtotal, laparoscópica ou tradicional com dissecação linfonodal regional, com quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante, empregando 5-FU (5-fluoracil), doxorubicina e cisplatina.

Nos países Ocidentais, a maioria dos ADG E ADE é diagnosticada na fase avançada da doença, quando não são mais ressecáveis cirurgicamente. Nesses casos, o principal tratamento é o quimioterápico, pois permite prolongar a sobrevida com qualidade de vida. Muitos agentes quimioterápicos e combinações são utilizados na doença metastática. Taxas objetivas de resposta variam de 10% a 30% nos tratamentos com uma única droga ou com terapias combinadas, respectivamente (SASTRE, GARCIA-SAENZ, DIAZ-RUBIO, 2006).

A sobrevida dos pacientes com carcinomas gástricos avançados tratados com quimioterapia paliativa permanece baixa. Neste contexto, novas terapias estão surgindo e a compreensão das bases moleculares do câncer está contribuindo para o desenvolvimento de terapias-alvo, determinadas pelo racional molecular. As terapias-alvo interferem com as vias de sinalização envolvidas na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (GRAVALOS E JIMENO, 2008).

1.6 A FAMÍLIA DE RECEPTORES DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO E OS TUMORES GASTROINTESTINAIS

Um dos grandes alvos em foco no desenvolvimento de terapias-alvo para as neoplasias são os receptores do fator de crescimento epidérmico. O *EGFR*, primeiro membro da família descrito, foi identificado na década de 1980 (SHIMIZU, BEHZADIAN, SHIMIZU, 1980), sendo relacionado a processos carcinogênicos em carcinomas espinocelulares (epidermóides) depois de sua caracterização (TAGUCHI *et al.*, 2008).

O *EGFR* faz parte de uma família de receptores tirosina quinase (família dos receptores *HER/ErbB*), que apresenta quatro membros conhecidos: o *EGFR* (*HER1/ErbB1*), *HER2/ErbB2*, *HER3/ErbB3* e o *HER4/ErbB4*. Tais membros possuem como características em comum a sua estrutura e seus mecanismos de ativação. A estrutura destes receptores conta com um domínio extracelular que interage com seus respectivos ligantes solúveis no meio; uma região transmembrana hidrofóbica; e um domínio intracelular, onde se encontra seu domínio com atividade tirosina quinase, capaz de fosforilar outros receptores, no processo de ativação, e moléculas no citosol que desempenham o papel de segundos mensageiros na cascata de sinalização (YARDEN, 2001). No processo de ativação, todas estas estruturas precisam passar por duas etapas cruciais: o primeiro passo consiste na dimerização, em que um determinado membro da família pode interagir com um membro igual a ele (formando homodímeros) ou pode se ligar a qualquer outro membro (formando heterodímeros). Após a dimerização, o segundo passo da ativação é iniciado com um processo bioquímico de transfosforilação, em que cada membro do dímero se fosforila, ativando os receptores para iniciar a cascata de sinalização intracelular. Para interromper a sinalização, este receptor é internalizado, podendo ser direcionado à degradação via proteossoma, ou pode ser reciclado, voltando à membrana celular (YARDEN, 2001).

No entanto, existem características peculiares entre estes membros da Família *HER/ErbB*. Os genes que codificam estes receptores estão localizados em

cromossomos diferentes: o gene *EGFR/HER1* está localizado no cromossomo 7, o *HER2* está no cromossomo 17, o *HER3* se encontra no cromossomo 12 e o *HER4* no cromossomo 2 (NIELSEN *et al.*, 2009). Além desta distinção, estes membros possuem outras diferenças entre si. Os receptores *EGFR* e *HER4* são dependentes de ligantes presentes no meio extracelular, podendo formar homo ou heterodímeros, para então iniciar suas cascatas de sinalização. O *HER2* não possui ligantes solúveis no meio extracelular, se tornando ativo pelo seu alto potencial de formação espontânea de heterodímeros com os outros membros da família, sem precisar que estes membros interajam com seus respectivos ligantes. Já o receptor *HER3 (ErbB-3)* não possui capacidade de gerar a cascata de sinalização quando forma homodímeros, devido à falta de atividade catalítica em seu domínio tirosina quinase. Portanto, este receptor precisa de um dos outros componentes da família para iniciar uma cascata de fosforilação no citosol (BUBLIL E YARDEN, 2007).

As cascatas de sinalização ativadas pelos receptores *HER/ErbB* constituem um sistema complexo de possibilidades de fosforilação, responsáveis por uma série de eventos carcinogênicos como proliferação celular, angiogênese, evasão à apoptose, entre outros (YARDEN, 2001). Entre tantas vias ativadas, destacam-se a via de PI3K–AKT, associada à progressão do ciclo celular e inibição da apoptose, a via do fator de transcrição STAT3, e principalmente a via RAS–RAF - MAPK, associada ao estímulo de proliferação celular (**Figura 1.8**) (ODA *et al.*, 2005).

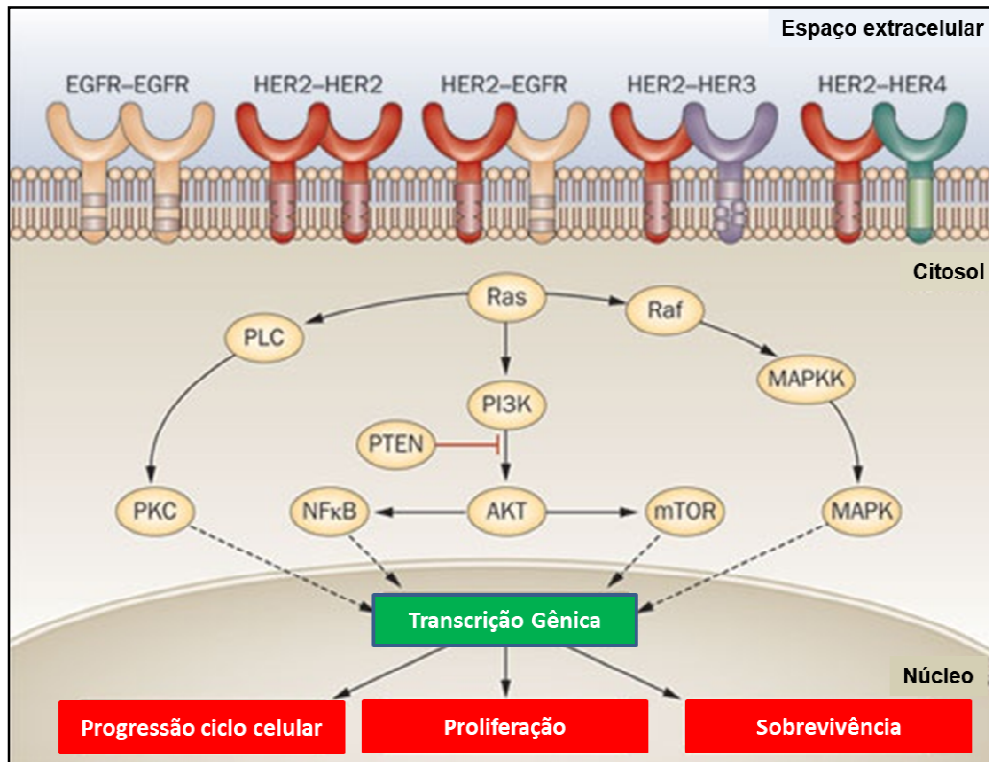


Figura 1.8 Cascatas de sinalização ativadas pelos receptores *HER/ErbB*. A estrutura desses receptores conta com um domínio extracelular que interage com seus respectivos ligantes solúveis no meio, uma região transmembrana hidrofóbica e um domínio intracelular com atividade tirosina quinase capaz de fosforilar outros receptores. Durante o processo de ativação sofrem dimerização (homodimerização ou heterodimerização), posteriormente ocorre o processo de transfosforilação, ativando os receptores para iniciar a cascata de sinalização intracelular, responsáveis por uma série de eventos carcinogênicos como proliferação celular, sobrevivência e progressão do ciclo celular (Adaptado Fornaro *et al.*, 2011).

A superexpressão de *EGFR* é observada em 33% a 50% dos tumores epiteliais humanos (SEBASTIAN *et al.*, 2006). Dentre estes, os carcinomas escamosos de cabeça e pescoço (CECPs) estão entre os mais estudados, nos quais os 4 membros da família *HER* encontram-se superexpressos. O *EGFR* encontra-se superexpresso em 70-90% dos CECPs, mas a expressão é um pouco

menor em tumores de laringe, quando comparados àqueles de mucosa oral ou faringe (SEBASTIAN *et al.*, 2006).

Cerca de 10 a 30% dos CECP mostram amplificação do gene *EGFR* e mutações pontuais do *EGFR* são descritas em apenas 1 a 7% dos pacientes (LOEFFLER-RAGG *et al.*, 2006; TEMAM *et al.*, 2007). A intensidade de expressão proteica, avaliada por imuno-histoquímica, tem sido relacionada à indicação de mau prognóstico, assim como o número de cópias do gene *EGFR* (ANG *et al.*, 2002; LICITRA *et al.*, 2011). No entanto, o número de cópias do gene não tem sido demonstrado ser um biomarcador preditivo eficaz para a terapia-alvo anti-EGFR, diferente das mutações específicas observadas nos carcinomas de células não-pequenas de pulmão (SUH, AMELIO, GUERRERO URBANO, 2013). Nos CECP, a mutação somática do *EGFR* localizada no exon 19 pode contribuir para uma resposta clínica limitada à terapia com cetuximabe associada à radioterapia e a superexpressão do gene *EGFR* pode ser utilizada como um indicador independente de resposta clínica favorável ao tratamento com terapia alvo anti-EGFR associada à radioterapia (SMILEK *et al.*, 2012).

Diversas estratégias foram desenvolvidas para bloquear estes receptores. Para isso, já foram obtidas duas classes de fármacos capazes de reprimir a atividade do receptor: os inibidores tirosina quinase (TKIs) e os anticorpos monoclonais (mAbs) (SEQUIST *et al.*, 2006).

Os TKIs são moléculas de baixo peso molecular que atravessam a membrana celular por difusão passiva e atuam competindo pelo sitio de ligação do ATP, apresentando uma maior afinidade por este sitio. Desta forma, estes fármacos impedem a função catalítica do EGFR na célula. Alguns destes inibidores (erlotinibe e gefitinibe) já foram aprovados pela agência americana responsável pelo controle de novos fármacos (*US Food and Drugs Administration - FDA*) e aplicados no tratamento de alguns tumores, incluindo câncer de pulmão de células não-pequenas metastático, câncer pancreático, câncer colorretal, e TCPs, apresentando bons resultados com o aumento da sobrevida global dos pacientes (FRY, 2003; HARARI, 2004; DRAGOVICH E CAMPEN, 2009).

Os anticorpos monoclonais (mAbs) foram desenvolvidos para atuar sobre as estruturas do domínio extracelular do EGFR, competindo com seu ligante no meio e induzindo sua degradação (BOSE E ZHANG, 2009). Alguns destes mAbs (cetuximabe e panitumumabe) também já foram aprovados pela FDA e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA, 2009) e também já estão sendo aplicados na clínica (WALTHER *et al.*, 2009).

No Brasil, o cetuximabe está disponível para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço localmente avançado, associado ao tratamento radioterápico (BONNER *et al.*, 2006). Também é utilizado no tratamento do câncer colorretal metastático refratário a tratamentos anteriores e ao Irinotecano, sendo que a adição do cetuximabe tem a possibilidade de reverter à resistência a esse quimioterápico (CUNNINGHAM *et al.*, 2004). O cetuximabe tem sido utilizado no tratamento dos carcinomas não pequenas células do pulmão em estágio avançado, no entanto é necessária a seleção do grupo de pacientes que podem se beneficiar com o uso desse anticorpo monoclonal (SGAMBATO *et al.*, 2014). Tian e colaboradores (2015), em estudo de revisão sistemática e de meta-análise, concluíram que não existe evidência disponível na literatura, que confirme a efetividade e a segurança do tratamento com cetuximabe combinado ao tratamento padrão (quimiorradioterapia) para os pacientes com câncer de esôfago (STENGER, 2017; TIAN *et al.*, 2015).

Um fator essencial para a avaliação da resposta de pacientes ao tratamento com TKIs ou mAbs são as mutações que ocorrem na via oncogênica RAS-RAF-MAPK, ou na via alternativa PI3K-PTEN-AKT. Mutações no gene *KRAS* já estão estabelecidas como parâmetro essencial para previsão de resposta ao tratamento com mAbs. Mais recentemente, foi sugerido que mutações em *BRAF* e *PI3K* e perda de *PTEN* também auxiliam na predição de resposta à terapia anti-EGFR (YANG *et al.*, 2013; THERKILDSEN *et al.*, 2014; KAMAZOE *et al.*, 2015; BALTRUSKEVICIENE *et al.*, 2016). Estas alterações mencionadas anteriormente conferem uma modificação na estrutura destas proteínas, de forma que suas vias de sinalização se mantenham ativadas de forma permanente. Pacientes que possuem mutações *KRAS* ou *BRAF* são totalmente refratários à terapia anti-

EGFR, pois o bloqueio da atividade de EGFR não interfere na ativação constante desta via oncogênica. De forma curiosa, mutações em *KRAS* e *BRAF* nunca se apresentam em conjunto nos tumores, apresentando um efeito excludente entre si.

Conforme mencionado anteriormente, além do *EGFR*, o *HER2* também é um membro da família dos receptores *ErbBs* muito relacionado com neoplasias. Um dos motivos para tal associação é a propriedade do HER2 de ser mais estável na superfície celular, assim um heterodímero que contenha este membro permanecerá por mais tempo na membrana da célula, prolongando a cascata de sinalização e apresentando um maior potencial em seus efeitos carcinogênicos. Além disso, o heterodímero que contém o HER2 geralmente não é direcionado a degradação proteolítica, mas sim à reciclagem de volta à membrana plasmática (WEINSTEIN E JOE, 2006). Sua expressão gênica exacerbada geralmente está associada à amplificação de seu gene. Este fenômeno é muito observado em tumores como mama, ovário, tumores gástricos, entre outros (HYNES E LANE, 2005).

Assim como ocorre com o EGFR, já foram desenvolvidos fármacos anti-tumorais contra o HER2, tanto inibidores tirosina quinase, quanto anticorpos monoclonais. Estes anticorpos também já foram aprovados e estão sendo aplicados na oncologia clínica, com bons resultados nas taxas de sobrevida dos pacientes. Um exemplo marcante é o trastuzumabe (Herceptin®) que é utilizado no tratamento de câncer de mama que superexpressam HER2 (WEINSTEIN E JOE, 2006; NIELSEN *et al.*, 2009; MIDDLETON *et al.*, 2009; BARTLETT *et al.*, 2011; RAKHA *et al.*, 2014).

A superexpressão do HER2 nas células do câncer de mama tem sido descrita há alguns anos como o maior fator prognóstico negativo (SLAMON *et al.*, 1987; PRAT E BASELGA, 2008). A positividade de HER2 no câncer de mama ocorre em cerca de 15 a 20% dos casos e pode ser detectada através da amplificação gênica por Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH) ou evidência de superexpressão proteica por imuno-histoquímica (HER2 3+) (ROSS *et al.*, 2009; WOLF *et al.*, 2013).

As Diretrizes de 2013 da *American Society of Clinical Oncologia* (ASCO) e do *College of American Pathologists* (CAP) reintroduziram um valor de corte de 2.0 ou maior para a relação HER2/CEP17 e a marcação completa da membrana de mais de 10% das células neoplásicas. Essas mudanças foram bem vindas, pois estavam alinhadas com as recomendações anteriores da FDA dos Estados Unidos. Outras mudanças foram revistas mais criticamente, como as recomendações de que a marcação incompleta ou fraca da membrana da célula neoplásica em mais de 10% devem ser interpretadas como HER2 2+, e a proporção de *HER2/CEP17* de 2.0 ou maior, com menos de quatro cópias de genes *HER2* devem ser contabilizadas como FISH-positivas, e que todos os carcinomas de mama grau III (pouco diferenciados) e com imuno-histoquímica HER2 negativa devem ser retestados com a realização de FISH, uma vez que dados duvidosos devem ser confirmados com o teste reflexo de FISH (WOLF *et al*, 2013).

No câncer de mama, HER2 e os receptores hormonais continuam sendo os fatores preditivos para a seleção de terapias direcionadas. A introdução da terapia com o anticorpo monoclonal humanizado trastuzumabe está associada à melhora na evolução dos pacientes com câncer de mama HER2 positivo. Estudos clínicos tem mostrado que o uso de trastuzumabe associado à quimioterapia, aumenta significativamente a sobrevida livre de recorrência e a sobrevida global no tratamento adjuvante (PICCART-GEBBART *et al*, 2005; GIANNI *et al*, 2011; SLAMON *et al*, 2011; MOJA *et al*, 2012), a taxa de resposta patológica completa como terapia primária sistêmica (BUZDAR *et al*, 2005; GIANNI *et al*, 2010) e também melhora a sobrevida global na doença metastática (SLAMON *et al*, 2001; MARTY *et al*, 2005). Outros fatores como mutações em *PIK3CA* ou *PTEN*, têm sido avaliados para selecionar um grupo de pacientes que poderia se beneficiar da terapia anti-HER2, especialmente na abordagem de bloqueio duplo, mas ainda não entrou na prática clínica de rotina (LOIBL *et al*, 2016).

A frequência da superexpressão do HER2 nos adenocarcinomas gástricos e da junção esofagogástrica varia de 4,4% a 53,4%, ocorrendo em média em 17,9% dos casos, segundo diversos estudos publicados nos últimos 15 anos

(ALLGAYER *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2006; GRABSCH *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2011; JORGENSEN E HERSOM, 2012; JANJIGIAN *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2013; BAYKARA *et al.*, 2015; KUROKAWA *et al.*, 2015).

A análise da superexpressão do *HER2* nos adenocarcinomas gástrico e da junção esofagogástrica difere daquela utilizada para o câncer de mama devido às diferenças relacionadas à biologia da neoplasia. No câncer gástrico e na junção esofagogástrica são observadas na imuno-histoquímica uma heterogeneidade intratumoral da expressão proteica do HER2 e uma coloração incompleta da membrana celular neoplásica (**Figura 1.9**) (ABRAHÃO-MACHADO *et al.*, 2013; ABRAHÃO-MACHADO E SCAPULATEMPO-NETO, 2016).

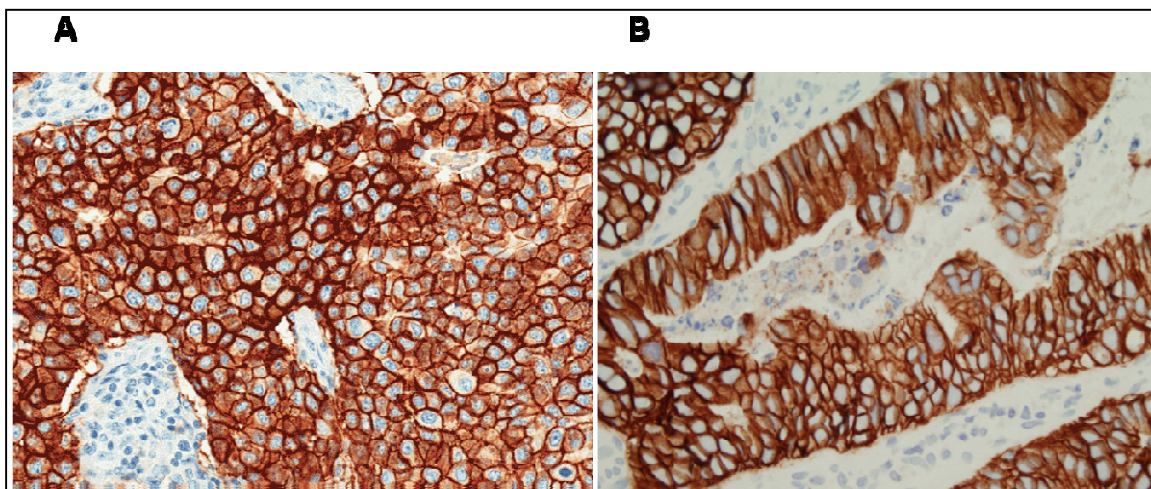


Figura 1.9 Exemplos de marcação imuno-histoquímica HER2, escore 3+, em carcinoma de mama (A) (adaptado de [surveymonkey.com/r/TJKGSV3](https://www.surveymonkey.com/r/TJKGSV3)) e adenocarcinoma gástrico (B) (DAVIDSON E STARLING, 2018). Magnificação de 40x.

Jorgensen e Hersom (2012) fizeram a análise de 42 estudos publicados num total de 12.749 pacientes com câncer gástrico, na qual mostraram que o *status* HER2 positivo, testado por imuno-histoquímica (IHQ) ou hibridização in situ (ISH), adiciona informação sobre o prognóstico da doença. A maioria das publicações analisadas (71%) mostrou que o *status* HER2 positivo estava associado com sobrevida e/ou características clínico-patológicas adversas, como invasão serosa, metástase linfonodal, estágio avançado da doença ou metástase à distância. Nessa análise, foi demonstrado que existe uma clara tendência do papel de HER2 como fator prognóstico negativo no câncer gástrico, sugerindo que a superexpressão proteica e/ou amplificação do *HER2* deve ser uma anormalidade ligada ao desenvolvimento deste tipo de tumor.

Alguns estudos mostraram ainda que a superexpressão e a amplificação do *HER2* estão relacionadas à classificação de Lauren, sendo observados mais frequentemente no tipo intestinal comparado aos tipos difuso e misto (YONEMURA *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2004; BANG *et al.*, 2009; BARROS-SILVA *et al.*, 2009; JORGENSEN E HERSOM, 2012; FAN *et al.*, 2013).

Estes achados foram confirmados no estudo ToGA (2010), no qual a taxa de positividade do HER2 foi de 32,2% nos carcinomas do tipo intestinal, 6,1% no tipo difuso e 20,4% no tipo misto ($P < 0,001$). O grau de superexpressão do HER2 também varia com a localização do carcinoma, sendo mais frequente na parte proximal e na junção esôfagogástrica (JEG), quando comparada com a parte distal do estômago. O programa de rastreamento do estudo ToGA também confirmou esta observação, relatando positividade de HER2 em 33,2% dos tumores localizados na JEG e 20,9% dos tumores localizados no restante do estômago (BANG *et al.*, 2010).

O estudo ToGA (2010) demonstrou que a expressão de HER2 tem valor preditivo para o tratamento com trastuzumabe nos carcinomas gástricos e de junção esofagogástrica avançados (BANG *et al.*, 2010). Pacientes com superexpressão do HER2 apresentam sobrevida significativamente maior quando tratados com trastuzumabe em conjunto com a quimioterapia convencional, quando comparados aos pacientes tratados da mesma maneira, mas que não superexpressam este gene. Este tratamento foi o que apresentou o maior prolongamento de sobrevida em pacientes com tumores gástricos (GRAVALOS E JIMENO, 2008; MEZA-JUNCO *et al.*, 2009; JORGENSEN, 2010; JORGENSEN E HERSOM, 2012).

Entre os pacientes com câncer gástrico HER2 positivo, o tratamento com trastuzumabe associado à quimioterapia representa um novo padrão de tratamento (BANG *et al.*, 2010). O estudo ToGA (2010) deve ser caracterizado como um marco no tratamento do câncer gástrico avançado e tem orientado o caminho para novos compostos anti-HER2, como o pertuzumabe, ado-trastuzumabe entamsine, lapatinibe, afatinibe e dacomitinibe, que estão sendo testados em ensaios clínicos de fases II e III (SATOH *et al.*, 2010; OH *et al.*, 2012; BASELGA *et al.*, 2012; HECHT *et al.*, 2013; JANJIGLIAN *et al.*, 2013; TABERNERO *et al.*, 2013; YAMASHITA-KASHIMA *et al.*, 2013).

Portanto, com o Estudo ToGA (2010), uma nova era de terapia para o câncer gástrico avançado foi iniciada. Em contraste, outros estudos que

investigam agentes biológicos diferentes de trastuzumabe, como o cetuximabe, panitumumabe, bevacizumabe e lapatinibe não foram capazes de replicar os mesmos resultados (OHTSU *et al.*, 2011; HECHT, BANG *et al.*, 2013; LORDICK *et al.*, 2013; WADDELLET *et al.*, 2013; SHEN *et al.*, 2015). Assim, como estas terapias já estão em uso rotineiro na prática clínica em alguns países desenvolvidos, e como estes tumores apresentam prognóstico bastante limitado com os tratamentos disponíveis atualmente, faz-se imprescindível avaliarmos o potencial de tumores gástricos de brasileiros para tratamento com TKIs ou anticorpos monoclonais anti-HER2. Com isso, poderemos dar subsídio ao Sistema Único de Saúde (SUS) sobre o potencial de incorporação futura destes exames para fundamentar a decisão sobre a administração destes medicamentos para tratamento destas neoplasias.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Revelar o perfil da superexpressão de HER2 em adenocarcinomas gástricos e da junção esofagogástrica de pacientes tratados no INCA.

2.2 Objetivos Específicos:

- 1.** Avaliar a expressão proteica de HER2 por imuno-histoquímica
- 2.** Avaliar a expressão gênica de *HER2* em amostras de adenocarcinoma gástrico (ADG) e Adenocarcinoma da junção esofagogástrica (ADE) por PCR em Tempo Real
- 3.** Comparar o resultado da expressão proteica de HER2 com a expressão gênica
- 4.** Correlacionar a expressão de HER2 em adenocarcinomas gástricos e da junção esofagogástrica com o grau histológico, localização, classificação de Lauren, estadiamento (TNM);
- 5.** Avaliar o impacto da expressão de HER2 no prognóstico e sobrevida dos pacientes incluídos no estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Critérios de Inclusão e de Exclusão dos Pacientes

Trata-se de um estudo retrospectivo no qual foram incluídos os casos de adenocarcinomas gástricos (ADG) e de junção esofagogástrica (ADE), segundo os critérios recomendados pela UICC/AJCC na 7ª edição, diagnosticados por exame histopatológico, em diferentes estágios da doença, submetidos à ressecção cirúrgica curativa, atendidos e tratados no Instituto Nacional de Câncer (INCA), no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2006.

Foram excluídos pacientes submetidos a tratamento quimioterápico e/ou radioterápico anterior ao tratamento cirúrgico, pacientes cujos diagnósticos histopatológicos nos espécimes cirúrgicos foram diferentes de adenocarcinoma primário de estômago ou de junção esofagogástrica e pacientes cujas lâminas e/ou blocos de parafina do exame histopatológico do espécime cirúrgico não se encontravam disponíveis no arquivo da Divisão de Patologia (DIPAT) do INCA.

Este projeto foi aprovado no CEP sob o número de protocolo 134/11 (**Anexo 1**). Os pacientes vivos que fazem parte deste trabalho foram contatados por telefone para serem convocados para assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) permitindo o uso do material biológico arquivado na DIPAT/INCA, no entanto devido ao tempo transcorrido entre o tratamento do câncer e o início desse trabalho (início do tratamento dos pacientes em 1999-2006 e início da coleta de dados 2012), cerca de 65% dos números de telefones não existiam mais ou não atendiam as chamadas; cerca de 10% dos prontuários dos pacientes não tinham número de telefone de contato anotado e/ou no sistema Absolute; cerca de 15% dos números de telefone correspondiam a outras pessoas desconhecidas do paciente e apenas cerca de 10% dos que atenderam o telefone eram parentes ou conhecidos dos pacientes, informaram que os pacientes e eles próprios estão muito idosos ou acamados e que não teriam condições de comparecer ao INCA para assinar o termo ou condições de assinar, mesmo que fosse enviado por correio, não sendo possível a assinatura do TCLE, sendo

solicitada a isenção de assinatura do TCLE pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA.

3.2 Seleção dos pacientes

O rastreamento dos casos de adenocarcinomas gástricos e da junção esofagogástrica operados no INCA no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2006 foi feito no Registro de Tumores do INCA através do Sistema Informatizado do Registro de Tumores. Nesse período foram identificados 723 casos de ADG e ADE tratados por ressecção cirúrgica, sendo 635 (87,8) casos de ADG e 88 (12,2%) casos de ADE.

A princípio, selecionamos 200 casos de ADG e 50 casos, utilizando os critérios recomendados pela UICC/AJCC na 7ª edição (2010), que supostamente seriam de ADE, no entanto após revisão dos casos, observamos que alguns tumores não tinham localização na JEG, mas no terço superior gástrico, então acrescentamos novos casos de JEG e mantivemos os demais, chegando a número total de 270 casos para estudo. Foi selecionada então uma amostra de 270 casos, estratificada por ano, de acordo com o percentual de ocorrência dentro de cada extrato e feita uma seleção por meio de geração de números aleatórios no programa Excel 2007 (**Tabela 3.1**).

Tabela 3.1: Distribuição dos casos operados e selecionados de acordo com o ano de matrícula no INCA

Ano	Casos operados	Casos selecionados	ADG	ADE
1999	101	39	33	6
2000	58	22	20	2
2001	42	19	14	5
2002	122	47	35	12
2003	102	37	35	2
2004	124	47	39	8
2005	91	32	28	4
2006	83	27	23	4
Total	723	270 (37.4%)	227 (31.4%)	43 (6%)

3.3 Coletas das informações clínico-epidemiológicas e anatomo-patológicas

Dos pacientes selecionados, foram coletadas informações clínico-epidemiológicas obtidas dos prontuários médicos localizados no arquivo médico do Hospital do Câncer I (HCI) do INCA. A partir dos laudos dos exames histopatológicos arquivados no setor de arquivo da DIPAT/INCA, foram coletadas as informações anatomo-patológicas dos resultados dos exames de macroscopia e de microscopia dos espécimes cirúrgicos examinados na DIPAT.

As informações clínico-epidemiológicas e anatomo-patológicas de interesse para o presente estudo foram organizadas em formulário padronizado e confeccionado especialmente para esse fim.

No formulário específico (Formulário de coletas de dados de adenocarcinoma gástrico, versão 22 de setembro de 2014 - anexo 2), constam as seguintes variáveis: codificação para identificação dos pacientes por número, data de nascimento, idade, número do prontuário, data da matrícula, gênero, cor da pele, escolaridade (baixa escolaridade corresponde ao analfabeto até 1º grau incompleto e alta escolaridade, corresponde ao 1º grau completo até pós-graduação) estado civil, etilismo, tabagismo, história familiar de câncer, *Performance Status (PS)* de acordo com o sistema *ECOG* modificado, comorbidades (escala de comorbidade de *Charlson*, informações da biopsia (diagnóstico): data da confirmação do diagnóstico de câncer; diagnóstico da biopsia; estadiamento clínico (sistema cTNM da UICC/AJCC 7ª edição); localização do tumor na endoscopia digestiva alta (EDA); informações do tratamento: data do início do primeiro tratamento; tratamento inicial; data da cirurgia; tipo de cirurgia; classificação da cirurgia; diagnóstico histopatológico do espécime cirúrgico; tipo histológico e grau de diferenciação; Classificação de Lauren; localização do tumor no espécime cirúrgico; forma do tumor; medida do tumor; invasão neoplásica linfática; invasão neoplásica vascular hematogênica; invasão neoplásica perineural ou neural; tipo de infiltrado peritumoral ou intratumoral; desmoplasia; nível de infiltração na parede do tumor primário; número de linfonodos isolados; número de linfonodos positivos; linfonodos regionais; limites cirúrgicos; estadiamento patológico para adenocarcinoma de

estômago foi utilizado para os tumores não localizados na JEG (sistema pTNM da UICC/AJCC 7ª edição). O estadiamento patológico (pTNM) de esôfago foi utilizado para adenocarcinomas localizados na junção esofagogástrica; lesões associadas: atrofia glandular, metaplasia intestinal, agregados linfoides, folículos linfoides, alterações regenerativas, polipo hiperplásico, cistos de glândulas, adenoma e outros; Infecção por *Helicobacter pylori*.

A evolução do paciente (seguimento) foi registrada como: recidiva da doença, metástase; óbito; data da última consulta no INCA.

Os critérios utilizados para coletar e classificar as informações sobre etilismo e tabagismo foram aqueles recomendados na publicação do INCA “Registros Hospitalares de Câncer: planejamento e Gestão” de 2010. Sendo classificados como não etilista (nunca): as pessoas que relatam nunca ter feito uso de bebida alcoólica, ou que ao longo da sua vida, tenham feito uso esporádico de apenas uma dose; etilista (sim): as pessoas com histórico de consumo habitual de bebida alcoólica, mesmo que em pequena quantidade (dito consumo social) em períodos anteriores e que permaneçam atualmente; e ex-etilista (ex-consumidor): as pessoas com história de consumo habitual de bebida alcoólica durante um período da sua vida, mas que há pelo menos seis meses estão abstêmios. Em relação ao tabagismo: não tabagista (nunca): pessoas que relatam nunca ter feito uso de tabaco, ou que ao longo de sua vida tenham feito uso esporádico com o objetivo de experimentar; tabagista (sim): pessoas com histórico de consumo habitual de tabaco e seus derivados, mesmo em pequena quantidade e que permaneçam atualmente fazendo uso do tabaco; e ex-tabagista: pessoas com histórico de consumo habitual de qualquer das modalidades do tabaco durante um período de sua vida, mas que, há pelo menos seis meses, abandonou esse hábito (INCA, 2010). A coleta das informações foi retrospectiva, então obtivemos as informações conforme estavam escritas nos prontuários médicos na página da anamnese.

A cada variável especificada acima foi atribuído um número a fim de permitir a transferência dos dados preenchidos em planilhas confeccionadas no programa Excel para análise estatística no programa SPSS.

3.4 Amostras

Os laudos e lâminas contendo cortes de tecido em HE correspondentes dos espécimes cirúrgicos de cada caso selecionado foram revisados ao microscópio óptico para confirmação do diagnóstico histopatológico e para completar informações morfológicas de valor prognóstico e lesões associadas que não constavam nos laudos. Os adenocarcinomas foram classificados quanto ao grau histológico em bem diferenciado (baixo grau), moderadamente diferenciado (baixo grau) e pouco diferenciado (alto grau) com células em anel de sinete ou sem células em anel de sinete, e carcinoma mucinoso, segundo a classificação da OMS, 2010. Os adenocarcinomas e os carcinomas mucinosos também foram classificados em tipo intestinal, tipo difuso e tipo misto, segundo a classificação de Lauren. As variáveis correspondentes a cada caso foram anotadas no formulário específico elaborado para esse trabalho para posterior análise estatística. Nos casos em que não havia informação sobre a presença de *Helicobacter pylori* nos laudos das lâminas de HE examinadas previamente, foram selecionados blocos de parafina representativos da mucosa não neoplásica para realização da técnica de coloração especial pelo método de Waysson. A pesquisa de *Helicobacter pylori* foi considerada positiva quando foram observados bacilos espiralados e corados na cor vermelha no muco superficial da mucosa.

Para a realização da coloração especial pelo Método de Waysson foram feitos cortes histológicos na espessura de 5 micrômetros do bloco de tecido não neoplásico embebido em parafina. Os cortes histológicos foram esticados em lâminas de vidro e deixados na estufa para aderência durante 1 hora no mínimo; posteriormente foram desparafinizados em 4 banhos de xilol durante 5 minutos/banho, desidratados em 4 banhos de álcool absoluto durante 5 minutos/banho e lavados em água corrente por 5 minutos; o corante Waysson foi gotejado sobre o corte histológico e, após 5 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 2 minutos; em seguida, os cortes foram desidratados em 4 cubas de álcool absoluto durante 5 minutos em cada cuba; e clarificadas em 4 cubas de xilol durante 5 minutos em cada cuba.

O Corante Waysson foi feito utilizando-se as seguintes soluções: 190 mL de água destilada, 10 mL de Fenol, 30 mL de etanol absoluto, 0,20 g de Fucsina básica e 0,75 g de Azul de Metileno. No preparo, dissolveu-se a Fucsina básica e o Azul de Metileno em 30 mL de etanol absoluto e posteriormente acrescentou-se 190 mL de água destilada e 10 mL de Fenol.

Após a coloração, os cortes histológicos foram cobertos com Goma de Damar e recobertos com lamínulas. A visualização do *Helicobacter pylori* foi feita ao microscópio óptico, sendo avaliada a presença de bacilos espiralados corados em vermelho no muco superficial da mucosa gástrica.

3.5 Expressão Proteica de HER2

A plataforma de revelação da marcação do anticorpo primário foi a ultraView DAB. O anticorpo primário utilizado foi o anticorpo monoclonal anti-HER-2/-neu (clone 4B5), lote Y10418 com vencimento em 11/11/2018, da *VENTANA PATHWAY*.

3.5.1 Metodo de Imuno-histoquímica Automatizada

3.5.1.1 Cortes Histológicos

Para realização dos cortes histológicos, os blocos foram colocados em um recipiente com gelo para resfriamento. Os tecidos foram cortados a partir dos blocos, na espessura de 3 a 4 μm , colocados em um banho de álcool a 10%, esticados em banho-maria a 56°C e aderidos às lâminas de vidro, previamente tratadas com solução de silano. Em seguida, as lâminas foram deixadas em estufa a 56°C por 24 horas, para a adesão dos cortes. As lâminas foram identificadas com uma etiqueta gerada pelo software da Ventana (*Ventana Medical Systems, Inc., member of Roche Group, EUA*), contendo o número do caso, número do bloco e o anticorpo em questão. Após o corte, todos os blocos foram guardados na caixa de arquivo de blocos da pesquisa do INCA.

3.5.1.2 Acondicionamento das Lâminas na Máquina BENCHMARK XT (Ventana Medical Systems-Roche Group, EUA)

As lâminas devidamente etiquetadas foram encaixadas sobre os *thermopads* da máquina com a etiqueta voltada para o centro da bandeja. Após o fechamento, utilizando o software da Ventana, clicamos e executamos. Conferimos a lista de verificação que aparece na tela e informamos a quantidade de lâminas e quando o aparelho deve iniciar o processo. Após checar se estava tudo correto, clicamos em “iniciar sessão”. Quando o processo terminou, as lâminas foram retiradas e acondicionadas em cestas de plástico e imersas em solução de detergente líquido neutro em água, durante cinco minutos, para a remoção do óleo que cobre as lâminas durante o processo. Em seguida, foram lavadas em água corrente para remoção total do detergente.

3.5.1.3 Protocolo Automatizado para CERB, segundo descrito por Ventana Medical Systems-Roche Group, EUA)

A desparafinização foi feita com Solução EZ Prep a 75°C por 8 minutos no total; a recuperação de antígenos em tampão CC1, de pH alto a 100°C por 60 minutos; feita a aplicação do óleo Liquid Coverslip (BenchMark Special Stains Liquid), que tem como função impedir que os reagentes aquosos evaporem. Feita a incubação com o anticorpo monoclonal anti-HER-2-/neu (clone 4B5) a 37°C por 60 minutos e incubação com o Kit de revelação ultraView DAB. Todas as etapas detalhadas de acordo com as recomendações do fabricante para utilização da máquina da Ventana, Protocolo N° 5: CERB: procedimento: XT ultraView DAB v3, Módulo de Marcação BenchMark XT IHC/ISH. As etapas do procedimento foram as seguintes: selecionar EZ Prep; iniciar passos cronometrados; misturadores desligados; aquecer lâmina a 75 ° C e Incubar durante 4 minutos; aplicar EZPrep Volume Adjust; lavar lâmina; aplicar EZPrep Volume Adjust; lavar lâmina; aplicar EZPrep Volume Adjus; aplicar Coverslip; aquecer lâmina a 76 ° C e incubar

durante 4 minutos; lavar lâmina; aplicar Depar Volume Adjust; aplicar Coverslip; desativar o aquecedor das lâminas; misturadores: ligado; breve - 8 minutos de conditioning; lavar lâmina; aplicar Cell Conditioner 1 prolongado; aplicar CC Coverslip prolongado; seleccionar lavagem SSC; aquecer lâmina a 95 ° C e Incubar durante 8 minutos; curto - 30 minutos de Conditioning; aplicar Cell Conditioner 1; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aquecer lâmina a 100 °C e incubar durante 4 minutos; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1; uma gota corresponde a uma dispensação de reagente; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1 breve; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); aplicar Cell Conditioner 1; aplicar CC intermédio Coverslip sem BB (barcode blowoff); desativar o aquecedor das lâminas; incubar durante 8 minutos; lavar lâmina com Reaction Buffer; ajustar o volume das lâminas com Reaction Buffer; aplicar Coverslip; lavar lâmina com Reaction Buffer; ajustar o volume das lâminas com Reaction Buffer; aplicar Coverslip; procedimento sincronização; aquecer lâmina a 37 ° C e incubar durante 4 minutos; lavar lâmina com Reaction Buffer; ajustar o volume das lâminas com Reaction Buffer; aplicar uma gota de *UV INHIBITOR*, aplicar Coverslip e incubar durante 4 minutos; lavar lâmina com Reaction Buffer; ajustar o volume das lâminas com Reaction Buffer; aplicar Coverslip; aquecer lâmina a 37 ° C e incubar durante 4 minutos; lavar lâmina com Reaction Buffer; ajustar o volume das lâminas com

Reaction Buffer; aplicar Coverslip; aplicar uma gota de PREP KIT 3 (anticorpo) e incubar por 1 hora; lavar lâmina com Reaction Buffer; ajustar o volume das lâminas com Reaction Buffer; aplicar Coverslip; aquecer lâmina a 37 ° C e incubar durante 4 minutos; lavar lâmina com Reaction Buffer; aplicar 200ul + VA Reaction Buffer; aplicar uma gota de UV HRP UNIV MULT, aplicar Coverslip e incubar durante 8 minutos; lavar lâmina com Reaction Buffer; ajustar o volume das lâminas com Reaction Buffer; aplicar Coverslip; lavar lâmina com Reaction Buffer; ajustar o volume das lâminas com Reaction Buffer; aplicar Coverslip; lavar lâmina com Reaction Buffer; ajustar o volume das lâminas com Reaction Buffer; aplicar uma gota de UV DAB e uma gota de UV DAB H2O2, aplicar Coverslip, incubar durante 8 minutos; lavar lâmina com Reaction Buffer; uma gota corresponde a uma dispensação de reagente Impresso em 21/03/2016 20:10:28; ajustar o volume das lâminas com Reaction Buffer; aplicar uma gota de UV COPPER, aplicar Coverslip, e incubar durante 4 minutos; lavar lâmina com Reaction Buffer; ajustar o volume das lâminas com Reaction Buffer; aplicar uma gota de HEMATOXYLIN (Contrastante), aplicar coverslip e incubar por 8 minutos; lavar lâmina com Reaction Buffer; ajustar o volume das lâminas com Reaction Buffer; aplicar Coverslip; lavar lâmina com Reaction Buffer; ajustar o volume das lâminas com Reaction Buffer; aplicar uma gota de *BLUING REAGENT* (Pós-contrastante), aplicar coverslip e incubar por 4 minutos; lavar lâmina com Reaction Buffer; aplicar Coverslip; desativar o aquecedor das lâminas; seleccionar lavagem opcional; seleccionar Lavagem SSC; iniciar passos cronometrados; lavar lâmina com Reaction Buffer.

3.6 Análise das Lâminas de HER2

A análise da superexpressão proteica/amplificação do *HER2* é feita geralmente pela imuno-histoquímica ou por hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Em ambos os métodos podem ser utilizados tecidos de biopsias ou peças cirúrgicas fixados em formol e embebidos em blocos de parafina. O FISH é o método padrão ouro, no entanto seu uso fica limitado aos casos duvidosos de expressão de HER2 (HER2 2+), devido ao alto custo, ao consumo de tempo e a necessidade de equipamentos sofisticados com o microscópio fluorescente. Na literatura existem relatos que confirmam a alta concordância entre os métodos de FISH e imuno-histoquímica. Assim, a análise da expressão proteica de HER2 pela imuno-histoquímica é o método mais utilizado nos laboratórios de patologia cirúrgica.

As lâminas de imuno-histoquímica preparadas com o anticorpo anti-HER2, contendo cortes de tecidos dos tumores foram analisadas ao microscópio óptico. Nas amostras de tumores dos espécimes cirúrgicos foram utilizados os critérios de interpretação do sistema de escore de HER2 para câncer gástrico estabelecidos por Hoffmann e colaboradores, em 2008, ou seja, resultado negativo, escore 0, sem reatividade ou sem reatividade de membrana em mais de 10% das células neoplásicas; resultado negativo, escore 1+, quando havia reatividade fraca ou incompleta da membrana em 10% ou mais das células neoplásicas (células reativas em apenas parte da membrana); resultado duvidoso ou suspeito, escore 2+, quando havia reatividade fraca a moderada completa, basolateral ou lateral da membrana em 10% ou mais das células neoplásicas; resultado positivo, escore 3+, quando havia reatividade forte completa, basolateral ou lateral de membrana em 10% ou mais das células neoplásicas (WOLFF *et al.*, 2007; HOFFMAN *et al.*, 2008; RÜSCHOFF *et al.*, 2012). Por motivos técnicos, os casos cujos escores foram 2+ na imuno-histoquímica, correspondendo aos resultados duvidosos, não puderam ser analisados pela técnica de hibridização *in situ* até a conclusão desse trabalho.

3.7 Análise da Expressão Gênica

3.7.1. Extração de RNA

Foram selecionadas 58 amostras de adenocarcinoma gástrico e de JEG para as análises moleculares. As lâminas foram previamente revistas e a área tumoral delimitada com caneta permanente de retroprojetor, sendo cada lâmina sobreposta ao fragmento de tecido embebido no bloco de parafina para delimitação do tecido tumoral com uma navalha. Posteriormente, foram cortados em micrótomo Leica[®], totalizando cinco secções de 10 µm cada e colocados em um tubo de 1,5 mL, sendo cinco deles acondicionados em tubo eppendorf e 5 cortes em outro tubo eppendorf, previamente identificados. As amostras foram codificadas para que as análises fossem realizadas às cegas. Os blocos (os mesmos utilizados para a análise por IHC). A extração de RNA foi realizada utilizando o kit PureLink™ FFPE RNA Isolation Kit (Thermo). Para desparafinizar as amostras 300 µL *melting buffer* foram adicionados em cada tubo, seguido de incubação a 72°C. Após esse período, 20 µL proteinase K foram adicionados a cada amostra e as mesmas foram incubadas a 65°C por uma hora e meia em banho seco. A cada meia hora o material foi homogeneizado no vortex. Após a digestão das proteínas as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 14.000 rpm, o que permitiu a separação da parafina do líquido contendo os ácidos nucleicos. O líquido foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e foi adicionado a cada um 300 µL de *binding buffer* e 800 µL de etanol absoluto (Merck), seguido de homogeneização em vórtex. Todo o volume foi transferido para a coluna do kit e centrifugado a 800 rpm por 1 min, descartando o volume do tubo coletor. Esse processo foi seguido de três lavagens da coluna com 500 µL de *washing buffer* e por fim o RNA foi coletado das colunas aplicando em cada uma 50 µL de água livre de nuclease seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi descartada e os tubos contendo o RNA extraído foram armazenados a -80°C.

3.7.2. Quantificação de RNA

A quantificação de RNA foi feita com auxílio do aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), um espectrofotômetro simples, capaz de mensurar a quantidade de ácidos nucleicos e proteínas em solução. Precedendo este processo de quantificação, é necessário configurar os parâmetros do aparelho para mensurar ácidos nucleicos, com o comprimento de onda de 260 nm. Em seguida, 1 µL de RNA total foram transferidos para o aparelho. O aparelho já calcula automaticamente a concentração de RNA em ng/µL e verifica o grau de pureza da amostra a partir da razão entre a leitura em 260 nm e a leitura em 280 nm (comprimento de onda necessário para mensuração de proteínas na solução). As amostras foram consideradas puras quando o resultado desta razão foi equivalente ou ultrapassar o valor de 1,7.

3.7.3. Reação de Transcrição Reversa

O RNA total extraído dos 58 tumores armazenados em bloco de parafina foi reversamente transcrito em DNA complementar (cDNA) para análises de expressão gênica utilizando a transcriptase reversa *SuperScript III* (Invitrogen®), conforme orientação do fabricante: em um microtubo de 200 µL foram adicionados 1 µL de hexômeros randômicos do kit, 1 µL de tampão de anelamento, 500 ng RNA alvo e água RNase *Free* suficiente para completar o volume final de 8 µL de reação; a mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C. Em seguida, foram adicionados 10 µL do tampão da enzima transcriptase reversa fornecido pelo fabricante (Invitrogen®) e 2,0 µL da enzima, sendo incubados por 5 minutos a 25°C. As reações foram incubadas no termociclador por 50 minutos a 50°C e a enzima foi inativada a 85°C por 5 minutos. Após a síntese, o cDNA foi armazenado a -20°C.

3.7.4 Avaliação da integridade do RNA por PCR

A amplificação de um fragmento do gene *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* - NM_002046.5) utilizando a reação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada para avaliarmos a integridade das amostras e assim selecionarmos quais seriam incluídas na análise de expressão gênica. Para tanto, os seguintes *primers* foram utilizados: Senso 5' TGTGAACGGATTTGGCCGTA 3' e Antissenso 5' TCGCTCCTGGAAGATGGTGA 3', gerando um fragmento de 220 pares de bases (pb). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando 5 μ L de cada reação, 3 μ L de tampão de carregamento e 1 μ L de Gelred (Biotum) (diluição 3:1000) (**Figura 3.1**).

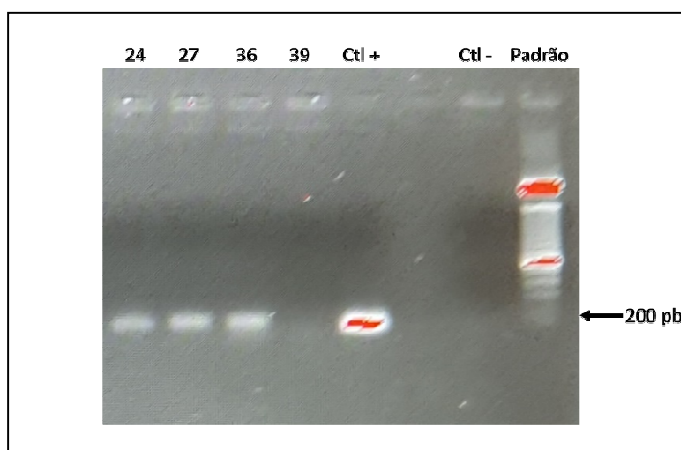


Figura 3.1 Exemplo de eletroforese para seleção das amostras que foram incluídas na análise de expressão gênica. No exemplo as amostras 24, 27 e 36 apresentaram amplificação positiva enquanto que a amostra 39 não apresentou amplificação, não sendo selecionada para as análises posteriores.

Dentre as 58 amostras selecionadas, 45 apresentaram resultado positivo para amplificação de um fragmento do gene *GAPDH* e foram, portanto, incluídas na análise de expressão gênica. Não foi possível estabelecer um paralelo entre a eficiência da reação e a idade do bloco.

3.7.5. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

A análise da expressão gênica foi realizada na plataforma de PCR em tempo real Rotor-Gene (Qiagen). A quantificação da expressão de cada gene foi realizada baseada no sistema de sondas tipo Taqman da Applied Biosystems utilizando pares de *primers* específicos e sondas do tipo MGB marcadas com corante fluorescente FAM na extremidade 5' e *quencher* NFQ na extremidade 3'. O gene *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno. As reações foram realizadas em triplicatas para a quantificação de cada gene em cada amostra em conjunto com dois controles negativos da reação (NTC) e dois controles positivos. Cada reação teve volume final de 10 µL e foi composta de 5,0 µL TaqMan Universal PCR Fast Master Mix (2x) (Applied Biosystems), 0,5 µL do TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) do gene referencia (*GAPDH* - Hs02786624_g1) ou do gene analisado (*HER2* - Hs01001580_m1), 1 µL do cDNA, completado o volume com água *nuclease-free*. As condições de amplificação foram de 50°C por 2 minutos, 95°C por 5 minutos seguidos por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Foi padronizado um limiar de fluorescência normalizada padrão de 0,1 para identificação dos valores de Ct (*cycle threshold*) A diferença entre as médias de três experimentos do gene de interesse (*HER2*) e do gene de referência (*GAPDH*) foi calculada com o auxílio do programa Microsoft Excel e o valor de quantificação relativa foi expresso como $2^{-\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). No caso de amostras com amplificação em *GAPDH* e ausência de amplificação em *HER2* o valor de CT limite, 45, foi utilizado para as análises estatísticas.

3.8 Análise Estatística

As variáveis clínicas, epidemiológicas e morfológicas dos 270 casos estudados estão anotadas nos formulários elaborados especificamente para esse trabalho (anexo 2), foram digitadas em planilhas no Excel 2007, posteriormente foram codificadas e submetidas à análise estatística pelo programa SPSS versão 20. A análise descritiva das variáveis categóricas foi realizada pela frequência

absoluta e relativa, e das variáveis contínuas, pela média e desvio padrão. Para avaliação da associação entre as variáveis independentes e os desfechos categóricos, foi realizado o teste de qui-quadrado de Pearson. Para todas as medidas foi considerado estatisticamente significativo p menor que 0,05.

Para as análises estatísticas dos resultados da PCR quantitativa, em relação à classificação por IHC, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os valores de expressão gênica das amostras eram paramétricos, isto é, se apresentaram uma distribuição normal. Quando os valores não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste de Mann-Whitney, quando apresentaram foi utilizado o teste t não pareado. Para minimizar a probabilidade de resultados falso-positivos, o ajuste de Bonferroni dos valores de p foi aplicado. Foi também analisado se os valores de expressão gênica estavam correlacionados com os de expressão proteica, utilizando a correlação de *Spearman*. A curva ROC (*Receiver operating curve*) foi utilizada para avaliar se os valores de expressão gênica de *HER2* seriam capazes de distinguir as amostras classificadas por IHC como 3+ ou 2+ das demais. Foram considerados estatisticamente significativos testes com p valor menor que 0,05. As análises foram realizadas no programa *Graphpad Prism 5.0*. Para a análise exploratória da sobrevida global, foi utilizado o método de Kaplan-Meier e para avaliar a diferença entre os grupos, foi aplicado o teste de *log-rank*. Para tanto, foi utilizado pacote estatístico SPSS, versão 20.0.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterizações epidemiológica e clinicopatológica dos pacientes incluídos no estudo

Dos 270 pacientes avaliados, 155 (57%) eram do sexo masculino e 115 (43%) do sexo feminino. A média de idade foi de 60 anos e a idade mediana foi de 61 anos, variando de 29 a 88 anos. Cento e oitenta e dois (67,4%) pacientes eram brancos, 44 (16,3%) negros e 44 (16,3%) pardos. A maioria dos pacientes informou ter baixa escolaridade (192 pacientes; 71,1%). Além disso, cento e setenta e nove (66,3%) pacientes declararam ter companheiros (casados ou união estável) e 91 (33,7%) pacientes declararam não ter companheiros (solteiros, divorciados e viúvos). A respeito da exposição aos fatores de risco, cento e dezenove (44,1%) pacientes relataram ser etilistas ou ex-etilistas e 138 (51,1%) pacientes relataram não ser etilistas, enquanto em 13 casos não havia informação sobre consumo de bebida alcoólica. Ainda, cento e cinquenta e três (56,7%) pacientes eram tabagistas ou ex-tabagistas, 109 (40,3%) pacientes não eram tabagistas e em 8 (3,0%) casos não havia informação sobre tabagismo. Já a história familiar de câncer de diversas origens foi relatada por 41,9% (113) dos pacientes. Não havia informação sobre câncer na família no prontuário de 30 pacientes (11,1%) (**Figura 4.1**).

Em relação ao perfil clínico, dois (0,7%) pacientes apresentaram *Performance Status* (PS) 0; 240 (88,9%) apresentaram PS1, 22 (8,1%) PS2 e 06 (2,2) PS3. As comorbidades relatadas foram: infarto do miocárdio em um paciente (0,4%); doença cerebrovascular em um paciente (0,4%); doença pulmonar crônica em 05 pacientes (1,9%); úlcera péptica em 05 pacientes (1,9%); hepatopatia leve em 03 pacientes (1,1%); diabetes sem complicações em 26 pacientes (9,6%); Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em um paciente (0,4%) e hipertensão arterial sistêmica em 80 pacientes (29,6%). Doença coronariana, doença vascular periférica, demência, doença do tecido conjuntivo, diabetes complicada, hemiplegia ou paraplegia, doença renal, leucemia, linfoma e doença

hepática não foram relatadas em nenhum dos 270 pacientes desse estudo (Anexos 3, 4 e 5).

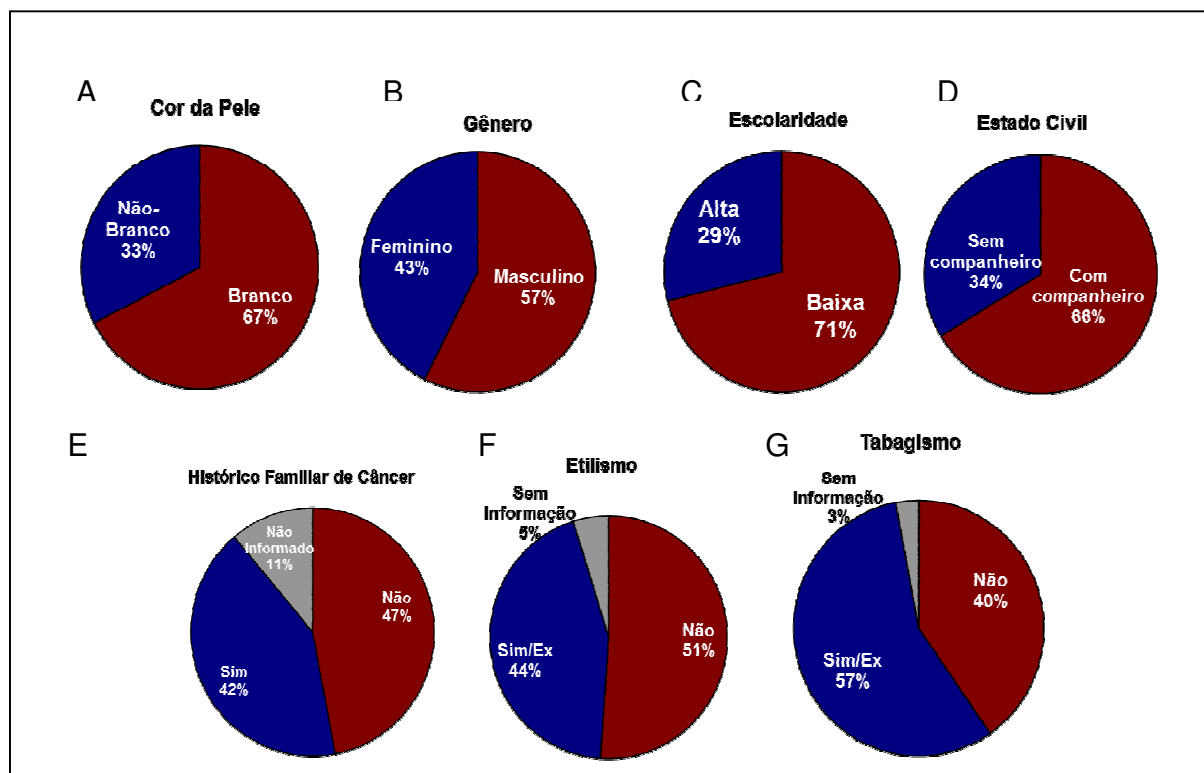


Figura 4.1 Distribuição das frequências das principais características etio-epidemiológicas e clínicas. A - cor da pele (maior frequência de pacientes brancos, 67%); B - gênero (maior frequência de pacientes do sexo masculino, 57%); C - Escolaridade maior frequência de pacientes com baixa escolaridade, 71%); D – Estado Civil (maior frequência de pacientes relatou ter companheiro (a), 66%); E – Histórico Familiar de Câncer (maior frequência de pacientes relatou não ter histórico na família, 47%); F – Etilismo (maior frequência de pacientes relatou não ter habito de consumir bebidas alcoólicas); G- Tabagismo (maior frequência de pacientes relatou ser fumante ou ex-fumante).

Em relação à localização do tumor, avaliada no espécime cirúrgico, quarenta e três (15,9%) tumores estavam localizados na junção esofagogástrica ao exame macroscópico dos espécimes cirúrgicos, 11 (4,1%) tumores estavam

localizados no fundo gástrico, 42 (15,6%) tumores estavam localizados no corpo gástrico, 117 (43,3%) tumores estavam localizados no antro piloro, 45 (16,7%) tumores comprometiam dois terços gástricos e 12 (4,4%) tumores comprometiam os três terços gástricos (superior, médio e inferior) (**Figura 4.2 A. Anexo 6**).

Ao exame macroscópico do espécime cirúrgico, segundo a forma tumoral, 10 (3,7) tumores foram classificados como Borrmann I (vegetante), 63 (23,3%) tumores foram classificados como Borrmann II (ulcerado e bem delimitado), 105 (38,9%) tumores foram classificados como Borrmann III (ulcerado e mal delimitado), 21 (7,8%) tumores foram classificados como Borrmann IV (infiltrativo), 09 (23,0%) tumores foram classificados como Borrmann V (misto) e 62 (23%) tumores foram classificados como tipo superficial (aspecto de carcinoma precoce ou inicial macroscopicamente) (**Figura 4.2 B**). Sendo assim, sessenta e dois (23,0%) adenocarcinomas eram precoces (superficial ou inicial), apresentando invasão da mucosa e ou submucosa independente da presença ou não de metástase linfonodal, e 208 (77%) adenocarcinomas eram avançados, apresentando invasão da parede além da submucosa (**Figura 4.2 C**).

Em relação ao tamanho do tumor, oitenta e nove (33,0%) tumores mediam menos de 5,0 cm nos maiores eixos e 181 (67%) tumores mediam 5,0 cm ou mais de 5,0 cm nos maiores eixos (**Figura 4.2 D**).

O diagnóstico histopatológico também foi avaliado nos espécimes cirúrgicos, sendo que em seis (2,2%) casos o diagnóstico foi de adenocarcinoma bem diferenciado; em 116 (43,0%) o diagnóstico foi de adenocarcinoma moderadamente diferenciado; em 68 (25,2%) o diagnóstico foi de adenocarcinoma pouco diferenciado com células em anel de sinete; em 77 (28,5%) casos o diagnóstico foi de adenocarcinoma pouco diferenciado sem células em anel de sinete e 03 (1,1%) espécimes cirúrgicos tiveram o diagnóstico de carcinoma mucinoso (**Figura 4.3 A**). Dessa forma, cento e quarenta e oito (54,8%) adenocarcinomas eram de alto grau histológico (são os adenocarcinomas pouco diferenciados e os carcinomas mucinosos) e 122 (45,2%) adenocarcinomas eram de baixo grau histológico (são os adenocarcinoma bem e moderadamente diferenciados) (Figura 4.3 A). A avaliação do grau de diferenciação dos

carcinomas gástricos é importante, pois existem diferenças na sobrevida de acordo com o grau do carcinoma, nos tumores avançados (**Figura 4.3 B**). O mesmo não foi observado nos carcinomas gástricos precoces (**Anexo 7**).

Os tumores foram avaliados ainda de acordo com a classificação de Lauren, sendo que cento e quinze (42,6%) dos adenocarcinomas estudados foram classificados como do tipo intestinal de Lauren, 107 (39,6%) como do tipo difuso de Lauren e 48 (17,8%), como tipo misto de Lauren (**Figura 4.3 C**) (**Anexo 7**).

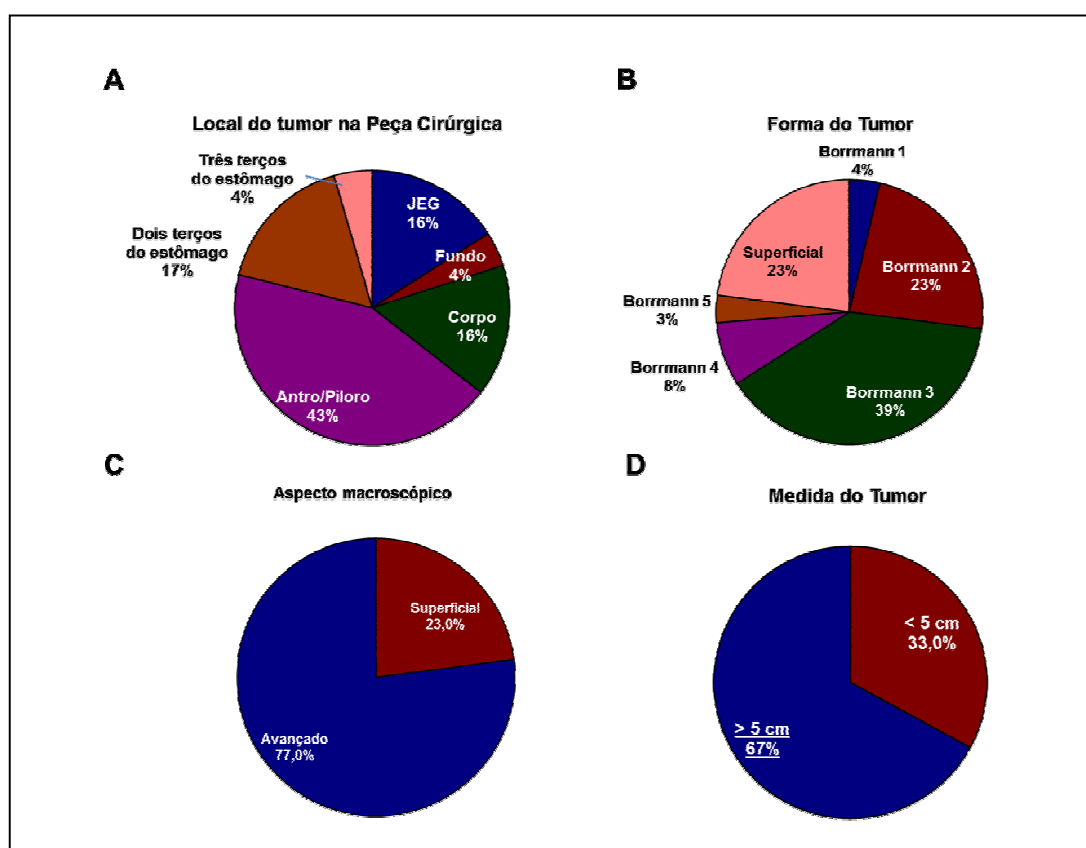


Figura 4.2 Distribuição das frequências clinicomorfológicas. A – Localização do tumor na peça cirúrgica, havendo maior frequência no Antro/Piloro. B – Forma do tumor, com predominância de Borrmann 3 (39%). C – Tumores maiores que 5 cm foram predominantes. D – O aspecto macroscópico avançado correspondeu a 77% dos tumores. JEG: Junção esofagogástrica.

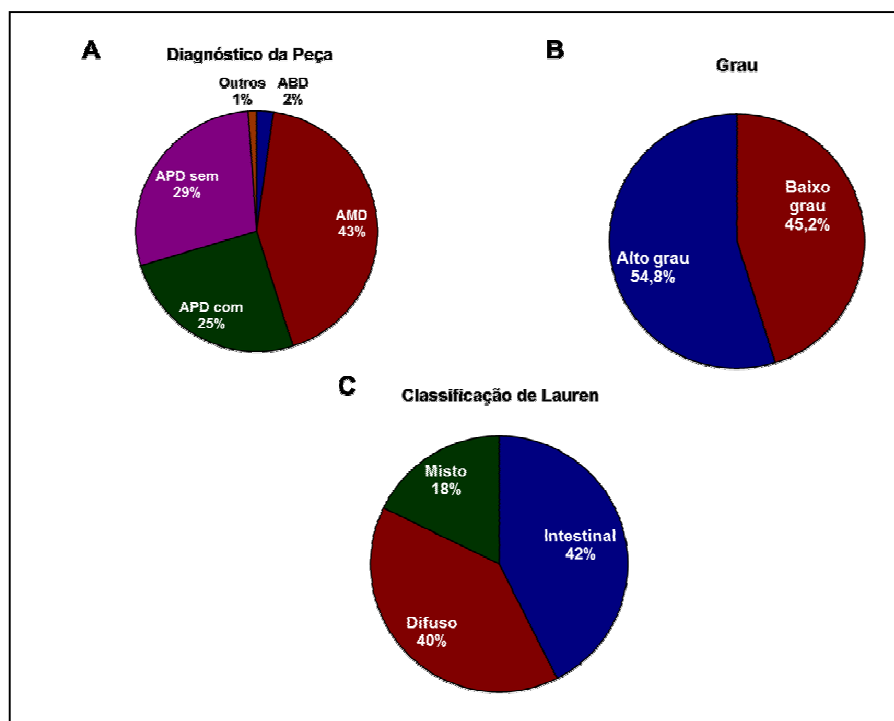


Figura 4.3: Distribuição das frequências histopatológicas em relação à diferenciação, grau e classificação de Lauren A- Diagnóstico da peça. ABD: adenocarcinoma bem diferenciado (2%); AMD: adenocarcinoma moderadamente diferenciado (43%); APD sem: adenocarcinoma pouco diferenciado sem células anel de sinete (29%); APD com: adenocarcinoma pouco diferenciado com células anel de sinete (25%); outros (carcinoma mucinoso, 1%). B – Grau Histológico (maior frequência de alto grau 54,8%). C – Classificação de Lauren (maior frequência do tipo intestinal 42%).

Em cento e trinta e seis (50,4%) tumores foi evidenciada microscopicamente invasão neoplásica dos vasos linfáticos, enquanto em 134 (49,6%) tumores isso não foi observado (**Figura 4.4 A**). A invasão neoplásica perineural foi visualizada à microscopia em cento e cinquenta e três (56,7%) tumores (**Figura 4.4 B**). Além disso, em vinte e oito (10,4%) tumores, foi observada invasão neoplásica vascular venosa à microscopia (**Figura 4.4 C**). Já

Duzentos e dez (77,8%) tumores apresentaram infiltrado peritumoral linfoplasmocitário e 60 (22,2%) tumores apresentaram infiltrado peritumoral do tipo misto (linfoplasmocitário, neutrofílico e eosinofílico) (**Figura 4.4 D**). Duzentos e quarenta e oito (91,8%) dos tumores apresentaram desmoplasia, sendo que em 110 (40,7%) tumores foi leve, em 81 (30,0%) tumores foi moderada e em 57 (21,1%) tumores foi acentuada; 22 (8,1%) tumores não apresentaram desmoplasia (**Figura 4.4 E**) (**Anexo 7**).

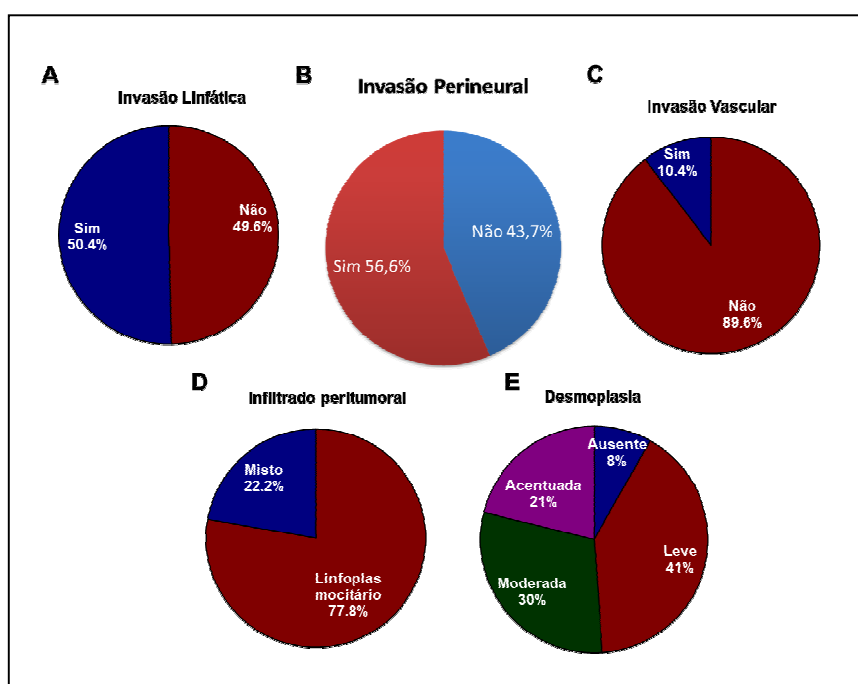


Figura 4.4: Distribuição das frequências histopatológicas em relação à invasão, tipo de infiltrado peritumoral e presença de desmoplasia A- Invasão linfática (presente em 50,4% dos pacientes); B- Invasão perineural (presente em 56,6% dos pacientes). C – Invasão vascular (presente em 10,4% dos pacientes); D- Infiltrado peritumoral (77,8% dos tumores apresentaram infiltrado peritumoral linfoplasmocitário); E - Desmoplasia (presente em 91,8% dos tumores).

O tratamento que estes pacientes receberam também foi avaliado. Noventa (33,3%) pacientes foram submetidos à gastrectomia total, 164 (60,7%) pacientes

foram submetidos à gastrectomia subtotal ou parcial e 16 (5,9%) pacientes foram submetidos à esofagogastrectomia. Destas cirurgias, duzentos e vinte e três (82,6%) foram classificadas como R0, isto é, sem doença residual; 06 (2,2%) cirurgias foram classificadas como R1, isto é, com doença residual microscópica; 08 cirurgias foram classificadas como R2, isto é, com doença residual macroscópica e em 33 (12,2%) cirurgias não houve informação sobre a presença ou não de doença residual. Treze (4,8%) espécimes cirúrgicos apresentaram margens de ressecção cirúrgica comprometidas pela neoplasia. Destes, 07 (2,6%) apresentaram margens de ressecção cirúrgica proximal comprometidas pela neoplasia; 05 (1,9%) espécimes cirúrgicos apresentaram margens de ressecção cirúrgica distal comprometidas pela neoplasia e 01 (0,4%) espécime cirúrgico apresentou margens cirúrgicas proximal e distal comprometidas pela neoplasia. **(Anexo 8).**

Ainda, em cento e sessenta e um (59,6%) casos, linfonodos regionais isolados apresentaram metástases de adenocarcinoma **(Figura 4.5 A)**. Setenta e seis (28,1%) casos apresentaram metástases para órgãos distantes **(Figura 4.5 B)**, tendo sido o fígado o órgão isolado mais afetado (correspondendo a 34% das metástases) **(Figura 4.5 C) (Anexos 9 e 10)**.

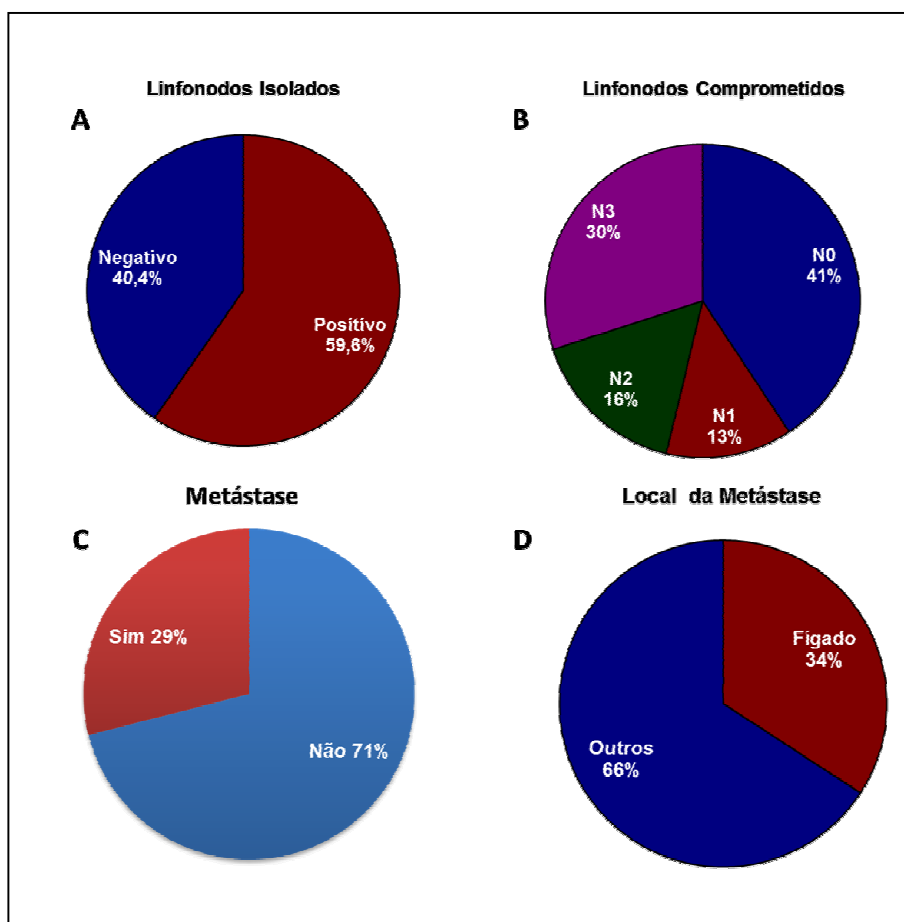


Figura 4.5 Distribuição das frequências dos linfonodos isolados, dos linfonodos metastáticos e das metástases à distância. A - Linfonodos isolados (positivos em 59,6%); B - Linfonodos comprometidos por categoria (dos comprometidos, N3 foi a categoria mais frequente em 30%) C - Metástase à distância em 29%; D – Local da Metástase (Fígado foi o principal órgão acometido: 34%).

Segundo a Classificação pTNM (7ª edição), quarenta e nove (18,1%) adenocarcinomas foram classificados como pT1, uma vez infiltravam a mucosa e/ou a submucosa; 23 (8,5%) adenocarcinomas infiltravam a parede gástrica até a camada muscular própria, sendo classificados como pT2; 31 (11,5%)

adenocarcinomas infiltravam a parede gástrica até a serosa, sendo classificados como pT3; 162 (60,0%) adenocarcinomas infiltravam todas as camadas da parede gástrica e infiltravam o tecido adiposo adjacente, sendo classificados como pT4a; 05 (1,9%) adenocarcinomas infiltravam órgãos adjacentes por contiguidade, sendo classificados como pT4b (**Figura 4.6. Anexo 11**).

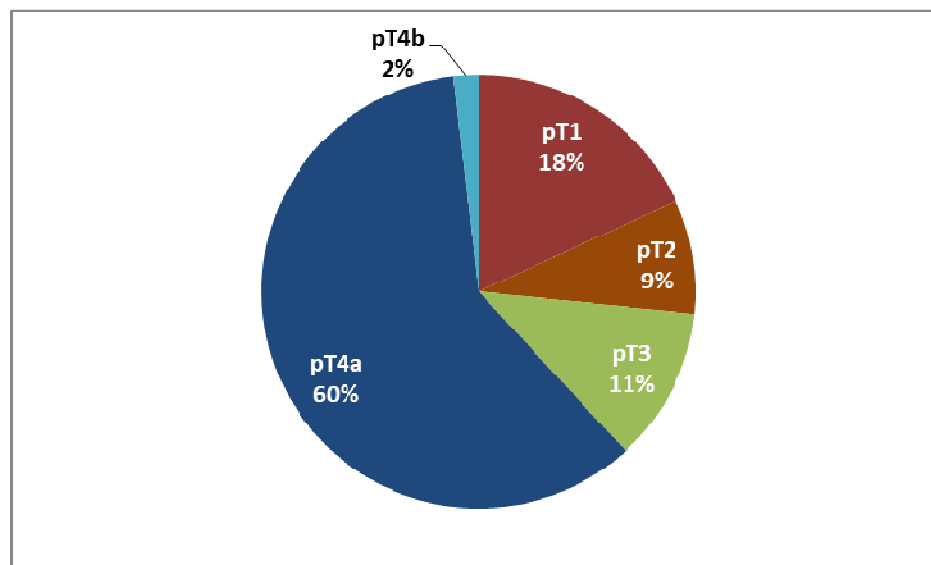


Figura 4.6 Classificação Patológica (pTNM) dos adenocarcinomas. A classificação patológica mais frequente foi a pT4a, presente em 60% dos casos.

4.2. Avaliação de lesões associadas na mucosa não tumoral da peça cirúrgica e da presença de infecção pelo *Helicobacter pylori*

A gastrite crônica foi diagnosticada microscopicamente na mucosa gástrica adjacente em 269 (99,6%) peças cirúrgicas, sendo de graduação leve em 50 (18,5%) casos; moderada em 131 (48,5%) casos e acentuada em 88 (32,6%) casos (**Figura 4.7 A**). A atrofia glandular na mucosa gástrica ocorreu em 238 (88,1%) casos, sendo de graduação leve em 73 (27%) casos; moderada em 88 (32,6%) casos e acentuada em 77 (28,5%) casos. Não foi evidenciada atrofia glandular em 32 (11,9%) casos (**Figura 4.7 B**). A metaplasia intestinal estava presente na mucosa gástrica adjacente em 215 (79,6%) casos, sendo completa

focal em 31 (11,5%) casos; completa multifocal em 115 (42,6%) casos; incompleta focal em 44 (16,3%) casos e incompleta multifocal em 25 (9,3%) casos. Não foi evidenciada metaplasia intestinal em 55 (20,4%) casos (**Figura 4.7 C**) (**Anexo 12**).

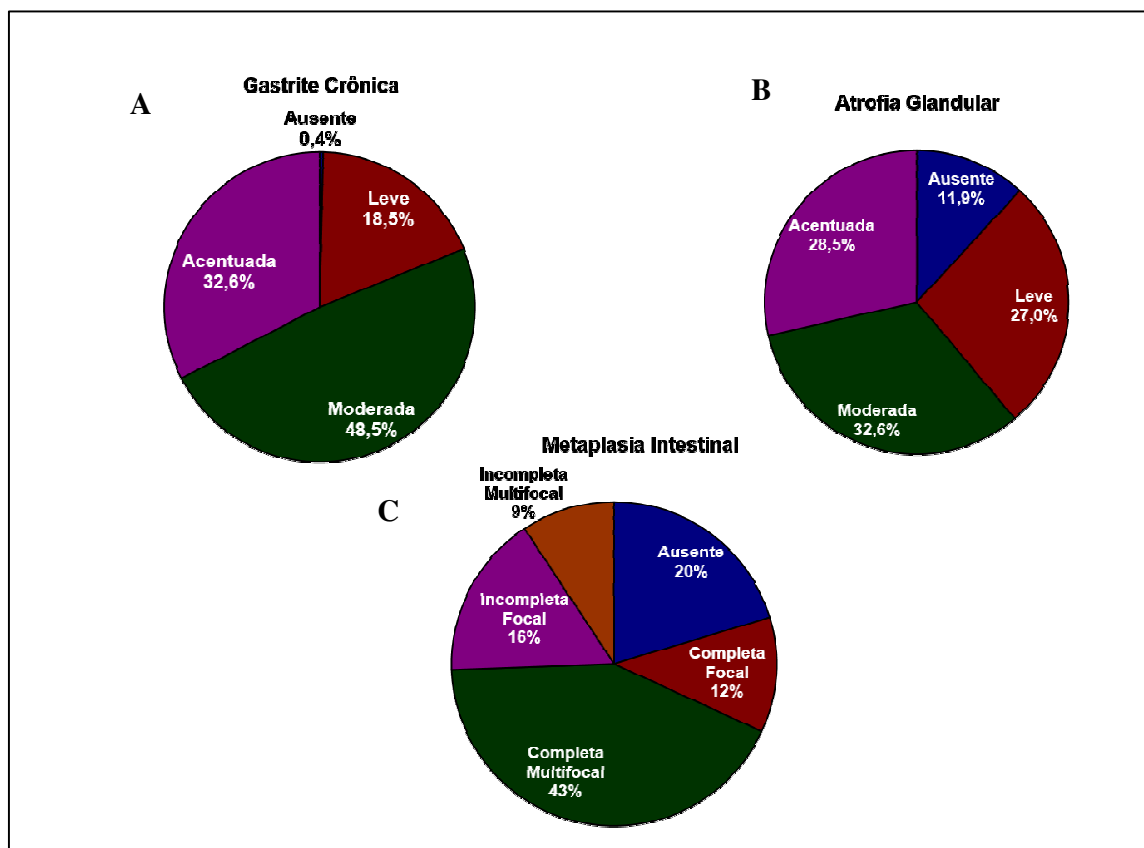


Figura 4.7 Distribuição das frequências das lesões associadas na mucosa não tumoral – 1 A - Gastrite Crônica (presente em 99,6% dos pacientes); B - Atrofia glandular (presente em 88,1% dos pacientes). C – Metaplasia intestinal (presente em 79,6% dos pacientes).

Ainda, foi evidenciada microscopicamente na mucosa gástrica adjacente a formação de agregados linfóides em 240 (88,9%) casos; em 30 (11,1%) casos não havia formação de agregados linfóides. Também foi evidenciada a formação de folículos linfóides em 222 (82,2%) casos. A presença de alterações regenerativas

foi vista em 04 (1,5%) casos (**Anexo 12**). A presença de pólipos hiperplásicos foi observada em 14 (5,2%) casos. A presença de cistos de glândulas gástricas (cárdicas, fúndicas e pilóricas) foi observada em 38 (14,1%) casos (**Anexo 13**).

Foi evidenciada microscopicamente a presença de *Helicobacter pylori* no muco superficial da mucosa gástrica em 141 (52,2%) casos; em 127 (47,0%) casos não havia bacilos de *Helicobacter pylori*; e em 02 (07%) casos não foi possível pesquisar a presença do bacilo devido à qualidade inadequada do material (**Figura 4.8**) (**Anexo 13**).

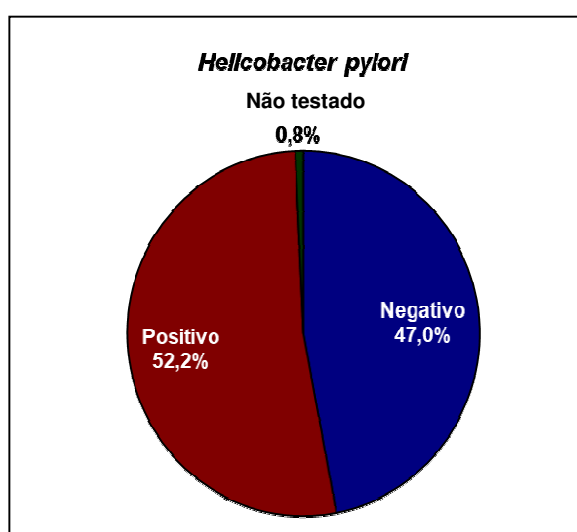


Figura 4.8 Detecção de *Helicobacter pylori* no muco superficial da mucosa gástrica associada ao adenocarcinoma gástrico. Presente em 52,2% dos casos avaliados.

4.3 Avaliação da evolução clínica dos pacientes

Nos 270 pacientes estudados, 16 (5,9%) estavam vivos e com recidiva tumoral na época da coleta dos dados (em 2012). Em dezembro de 2016, quando foi feita atualização dos dados sobre óbito, 178 (65,9%) pacientes dos 270 pacientes desse estudo, tinham evoluído para o óbito e 92 (34,1%) pacientes estavam vivos. Dos 178 óbitos, 107 (60,1%) foram causados por evolução do

câncer, 37 (20,8%) ocorreram por outras causas e em 34 (19,1%) óbitos não havia informação sobre a causa (**Anexo 14**).

4.4. Avaliação da associação entre as características epidemiológicas e clinicopatológicas dos pacientes e fatores prognósticos conhecidos para o câncer gástrico

4.4.1 Avaliação de fatores associados ao grau histológico do tumor

Conforme mencionado anteriormente, 54,8% dos adenocarcinomas dos pacientes incluídos no estudo eram pouco diferenciados ou carcinomas mucinosos (tumores de alto grau histológico) enquanto 45,2% eram bem ou moderadamente diferenciados (tumores de baixo grau histológico). Dentre os parâmetros avaliados, apenas o gênero apresentou uma associação significativa com o grau histológico do tumor ($p = 0,003$), em que o diagnóstico de baixo grau foi mais comum entre homens (67,2%) em comparação às mulheres (32,8%) (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1: Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com o grau de diferenciação dos tumores (alto ou baixo graus)

	Diferenciação				p-valor
	Alto Grau	%	Baixo Grau	%	
Idade 50 anos					
Abaixo de 50 anos	34	23,4%	26	21,3%	0,769
Acima de 50 anos	111	76,6%	96	78,7%	
Sexo Fem/ Masc					
Feminino	74	51,0%	40	32,8%	0,003
Masculino	71	49,0%	82	67,2%	
Raça Não/Branco					
Não Branca	54	37,2%	33	27,0%	0,089
Branca	91	62,8%	89	73,0%	
Escolaridade					
Baixa	106	73,1%	83	68,0%	0,418
Alta	39	26,9%	39	32,0%	
Estado Civil					
Com Companheiro	97	66,9%	81	66,4%	1,000
Sem Companheiro	48	33,1%	41	33,6%	
Etilismo					
Não etilista	79	57,7%	57	48,7%	0,167
Etilista ou ex	58	42,3%	60	51,3%	
Tabagismo					
Não tabagista	62	44,3%	46	38,7%	0,378
Tabagista ou ex	78	55,7%	73	61,3%	
Histórico Familiar					
Sim	61	48,0%	49	44,5%	0,604
Não	66	52,0%	61	55,5%	
Medida do tumor 5,0					
< que 5,0 cm	49	33,8%	40	32,8%	0,897
> / = que 5,0 cm	96	66,2%	82	67,2%	
H pylori					
Sim	79	54,9%	60	49,6%	0,459
Não	65	45,1%	61	50,4%	

4.4.2. Avaliação de fatores associados à forma de apresentação do tumor

Outro fator prognóstico importante para o adenocarcinoma gástrico é a forma de apresentação do tumor, ou seja, se é avançada ou superficial. Dentre os casos incluídos no estudo, 23% eram precoces ou superficiais e 77% eram avançados. Avaliamos então que fatores epidemiológicos e clínicos poderiam estar associados à forma de apresentação do tumor e pudemos observar que a escolaridade dos pacientes e a medida do tumor apresentaram uma associação significativa (**Tabela 4.2**). A apresentação avançada do tumor foi mais frequente entre pacientes com baixa escolaridade ($p=0,026$) e em casos em que os tumores eram maior ou igual a 5 cm ($p<0,001$).

Tabela 4.2: Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com a forma do tumor

	Forma do Tumor				p-valor
	Avançada	%	Superficial	%	
Idade 50 anos					
Abaixo de 50 anos	42	20,2%	18	29,0%	0,164
Acima de 50 anos	166	79,8%	44	71,0%	
Sexo Fem/ Masc					
Feminino	90	43,3%	25	40,3%	0,397
Masculino	118	56,7%	37	59,7%	
Raça Não/Branco					
Não Branca	66	31,7%	22	35,5%	0,644
Branca	142	68,3%	40	64,5%	
Escolaridade					
Baixa	155	74,5%	37	59,7%	0,026
Alta	53	25,5%	25	40,3%	
Estado Civil					
Com Companheiro	137	65,9%	42	67,7%	0,879
Sem Companheiro	71	34,1%	20	32,3%	
Etilismo					
Não etilista	106	53,8%	32	53,3%	1,000
Etilista ou ex	91	46,2%	28	46,7%	
Tabagismo					
Não tabagista	85	42,3%	24	39,3%	0,767
Tabagista ou ex	116	57,7%	37	60,7%	
Histórico Familiar					
Sim	87	47,0%	26	47,3%	1,000
Não	98	53,0%	29	52,7%	
Medida do tumor 5,0					
< que 5,0 cm	51	24,5%	38	61,3%	<0,001
> / = que 5,0 cm	157	75,5%	24	38,7%	
H pylori					
Sim	107	51,9%	34	54,8%	0,772
Não	99	48,1%	28	45,2%	
Diagnóstico Alto/Baixo					
Alto grau	113	55,1%	32	51,6%	0,664
Baixo grau	92	44,9%	30	48,4%	
Limites Comprometidos					
Comprometido	12	5,8%	1	1,6%	0,310
Livre	196	94,2%	61	98,4%	

4.4.3 Avaliação de fatores associados à invasão linfática

A invasão linfática já foi apontada como fator prognóstico independente, mesmo no câncer gástrico precoce. Sendo assim, avaliamos que fatores poderiam estar associados à sua ocorrência. Entre os casos incluídos no estudo, 50,4% apresentaram invasão neoplásica dos vasos linfáticos, sendo esta mais comum em pacientes com baixa escolaridade ($p=0,016$), em casos em que os tumores eram maior ou igual a 5 cm ($p<0,001$) e em casos em que os limites cirúrgicos estavam comprometidos ($p=0,003$) (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.3: Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com invasão linfática

	Invasão Linfática				p-valor
	Sim	%	Não	%	
Idade 50 anos					
Abaixo de 50 anos	24	17,6%	36	26,9%	0,079
Acima de 50 anos	112	82,4%	98	73,1%	
Sexo Fem/ Masc					
Feminino	59	43,4%	56	41,8%	0,807
Masculino	77	56,6%	78	58,2%	
Raça Não/Branco					
Não Branca	52	38,2%	36	26,9%	0,052
Branca	84	61,8%	98	73,1%	
Escolaridade					
Baixa	106	77,9%	86	64,2%	0,016
Alta	30	22,1%	48	35,8%	
Estado Civil					
Com Companheiro	88	64,7%	91	67,9%	0,608
Sem Companheiro	48	35,3%	43	32,1%	
Etilismo					
Não etilista	69	53,9%	69	53,5%	1,000
Etilista ou ex	59	46,1%	60	46,5%	
Tabagismo					
Não tabagista	57	42,9%	52	40,3%	0,708
Tabagista ou ex	76	57,1%	77	59,7%	
Histórico Familiar					
Sim	62	47,7%	51	46,4%	0,897
Não	68	52,3%	59	53,6%	
Medida do tumor 5,0					
< que 5,0 cm	28	20,6%	61	45,5%	<0,0001
> / = que 5,0 cm	108	79,4%	73	54,5%	
H pylori					
Sim	77	57,5%	64	47,8%	0,142
Não	57	42,5%	70	52,2%	
Diagnóstico Alto/Baixo					
Alto grau	78	58,6%	67	50,0%	0,177
Baixo grau	55	41,4%	67	50,0%	
Limites Comprometidos					
Comprometido	12	8,8%	1	0,7%	0,003
Livre	124	91,2%	133	99,3%	

4.4.4 Avaliação de fatores associados à invasão perineural

A invasão neoplásica perineural, observada em 56,7% dos casos incluídos no presente estudo, também já foi correlacionada ao prognóstico de pacientes com câncer gástrico e foi avaliada quanto aos seus fatores associados (**Tabela 4.4**). Entre indivíduos com menos de 50 anos, foi mais comum observar invasão perineural em comparação à sua ausência ($p=0,018$). Além disso, a invasão perineural foi mais frequentemente observada em casos em que os tumores eram maior ou igual a 5 cm ($p=0,018$) e em casos com diagnóstico de alto grau ($p<0,001$).

Tabela 4.4: Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com invasão perineural

	Invasão Perineural				p-valor
	Sim	%	Não	%	
Idade 50 anos					
Abaixo de 50 anos	39	25,5%	21	17,9%	0,018
Acima de 50 anos	114	74,5%	96	82,1%	
Sexo Fem/ Masc					
Feminino	64	41,8%	51	43,6%	0,805
Masculino	89	58,2%	66	56,4%	
Raça Não/Branco					
Não Branca	53	34,6%	36	29,9%	0,434
Branca	100	65,4%	82	70,1%	
Escolaridade					
Baixa	114	74,5%	78	66,7%	0,177
Alta	39	25,5%	39	33,3%	
Estado Civil					
Com Companheiro	106	69,3%	73	62,4%	0,245
Sem Companheiro	47	30,7%	44	37,6%	
Etilismo					
Não etilista	74	51,4%	64	56,6%	0,450
Etilista ou ex	70	48,6%	49	43,4%	
Tabagismo					
Não tabagista	56	37,8%	53	46,5%	0,167
Tabagista ou ex	92	62,2%	61	53,5%	
Histórico Familiar					
Sim	64	47,1%	49	47,1%	1,000
Não	72	52,9%	55	52,9%	
Medida do tumor 5,0					
< que 5,0 cm	41	26,8%	48	41,0%	0,018
> / = que 5,0 cm	112	73,2%	69	59,0%	
H pylori					
Sim	84	55,3%	57	49,1%	0,327
Não	68	44,7%	59	50,9%	
Diagnóstico Alto/Baixo					
Alto grau	99	66,0%	46	39,3%	<0,0001
Baixo grau	51	34,0%	71	60,7%	
Limites Comprometidos					
Comprometido	7	4,6%	6	5,1%	1,000
Livre	146	95,4%	111	94,9%	

4.4.5 Avaliação de fatores associados à classificação de Lauren

A classificação de Lauren, que divide os tumores gástricos entre intestinais e difusos, também apresenta associação com o prognóstico. Portanto, avaliamos fatores que poderiam estar associados à sua ocorrência (**Tabela 4.5**). Nesta análise, apenas o gênero apresentou associação significativa, sendo que os tumores do tipo difuso foram mais comuns entre as mulheres ($p=0,002$).

Tabela 4.5: Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com o tipo difuso de Lauren

	Lauren - Difuso				p-valor
	Difuso	%	Outros	%	
Idade 50 anos					
Abaixo de 50 anos	27	25,2%	33	20,2%	0,371
Acima de 50 anos	80	74,8%	130	79,8%	
Sexo Fem/ Masc					
Feminino	58	54,2%	57	35,0%	0,002
Masculino	49	45,8%	106	65,0%	
Raça Não/Branco					
Não Branca	45	42,1%	43	26,4%	0,008
Branca	62	57,9%	120	73,6%	
Escolaridade					
Baixa	77	72,0%	115	70,6%	0,891
Alta	30	28,0%	480	29,4%	
Estado Civil					
Com Companheiro	71	66,4%	108	66,3%	1,000
Sem Companheiro	36	33,6%	55	37,3%	
Etilismo					
Não etilista	59	57,8%	79	51,0%	0,308
Etilista ou ex	43	42,2%	76	49,0%	
Tabagismo					
Não tabagista	42	4,7%	65	40,9%	0,798
Tabagista ou ex	59	57,3%	94	59,1%	
Histórico Familiar					
Sim	51	52,6%	62	43,4%	0,188
Não	46	47,4%	81	56,6%	
Medida do tumor 5,0					
< que 5,0 cm	34	31,8%	55	33,7%	0,792
> / = que 5,0 cm	73	68,2%	108	66,3%	
H pylori					
Sim	57	53,3%	84	52,2%	0,901
Não	50	46,7%	77	47,8%	

4.4.6. Avaliação de fatores associados à ocorrência de linfonodos positivos

Para compreender quais fatores poderiam contribuir para a ocorrência de metástases linfonodais neste estudo, avaliamos a associação com diferentes características epidemiológicas e clínicas dos pacientes (**Tabela 4.6**). Entre indivíduos com baixa escolaridade, foi mais comum a positividade de linfonodos em comparação à negatividade ($p=0,028$). Ainda, a presença de linfonodos positivos foi mais comum em casos em que os tumores eram maior ou igual a 5 cm ($p<0,001$), em casos com invasão linfática ($p<0,001$), em casos que apresentaram limites cirúrgicos comprometidos ($p=0,017$), em casos de apresentação avançada ($p<0,001$) e em casos com invasão perineural ($p<0,001$).

Tabela 4.6: Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com linfonodos positivos

	Linfonodos				p-valor
	Positivo	%	Negativo	%	
Idade 50 anos					
Abaixo de 50 anos	36	22,4%	24	22,0%	1,000
Acima de 50 anos	125	77,6%	85	78,0%	
Sexo Fem/ Masc					
Feminino	69	42,9%	46	42,2%	1,000
Masculino	92	57,1%	63	57,8%	
Raça Não/Branco					
Não Branca	58	36,0%	30	27,5%	0,149
Branca	103	64,0%	79	72,5%	
Escolaridade					
Baixa	123	76,4%	69	63,3%	0,028
Alta	38	23,6%	40	36,7%	
Estado Civil					
Com Companheiro	111	68,9%	68	62,4%	0,295
Sem Companheiro	50	31,1%	41	37,6%	
Etilismo					
Não etilista	79	52,3%	59	55,7%	0,613
Etilista ou ex	72	47,7%	47	44,3%	
Tabagismo					
Não tabagista	68	43,9%	41	38,3%	0,376
Tabagista ou ex	87	56,1%	66	61,7%	
Histórico Familiar					
Sim	66	45,2%	47	50,0%	0,509
Não	80	54,8%	47	50,0%	
Medida do tumor 5,0					
< que 5,0 cm	37	23,0%	52	47,7%	<0,001
> / = que 5,0 cm	124	77,0%	57	52,3%	
H pylori					
Sim	89	56,0%	52	47,7%	0,213
Não	70	44,0%	57	52,3%	
Invasão Linfática					
Sim	116	72,0%	20	18,3%	<0,001
Não	45	28,0%	89	81,7%	
Limite Comprometido					
Comprometido	12	7,5%	1	0,9%	0,017
Livre	149	92,5%	108	99,1%	
Forma					
Avançado	151	93,8%	57	52,3%	<0,001
Superficial	10	6,2%	52	47,7%	
Invasão Perineural					
Sim	117	72,7%	36	33,0%	<0,001
Não	44	27,3%	73	67,0%	
Diagnóstico Alto/Baixo					
Alto grau	92	58,2%	53	48,6%	0,135
Baixo grau	66	41,8%	56	51,4%	

4.4.7. Avaliação de fatores associados ao TNM patológico

Para avaliar os fatores epidemiológicos e clínicos que poderiam estar associados ao pTNM, os casos incluídos no presente estudo foram divididos em pTNM avançado (pT2, pT3 ou pT4; qualquer N e qualquer M) e inicial (pT1N0M0; pT1N1M0; pT1N2M0 e pT1N3M0). De acordo com nossas análises, o pTNM avançado foi observado com maior frequência em casos em que os tumores eram maior ou igual a 5 cm ($p < 0,001$), em casos com invasão linfática ($p < 0,001$), em casos com forma de apresentação macroscópica avançada ($p < 0,001$) e em casos com invasão perineural ($p < 0,001$) (**Tabela 4.7**).

Tabela 4.7: Análise das associações das variáveis clinicomorfológicas com a classificação TNM

TNM Avançado x Inicial					
	Avançado	%	Inicial	%	p-valor
Idade 50 anos					
Abaixo de 50 anos	50	21,8%	10	24,4%	0,688
Acima de 50 anos	179	78,2%	31	75,6%	
Sexo Fem/ Masc					
Feminino	100	43,7%	15	36,6%	0,493
Masculino	129	56,3%	26	63,4%	
Raça Não/Branco					
Não Branca	78	34,1%	10	24,4%	0,279
Branca	151	65,9%	31	75,6%	
Escolaridade					
Baixa	167	72,9%	25	61,0%	0,136
Alta	62	27,1%	16	39,0%	
Estado Civil					
Com Companheiro	153	66,8%	26	63,4%	0,721
Sem Companheiro	76	33,2%	15	36,6%	
Etilismo					
Não etilista	118	54,4%	20	50,0%	0,613
Etilista ou ex	99	46,6%	20	50,0%	
Tabagismo					
Não tabagista	95	42,8%	14	35,0%	0,388
Tabagista ou ex	127	57,2%	26	65,0%	
Histórico Familiar					
Sim	99	48,5%	14	38,9%	0,366
Não	105	51,5%	22	61,1%	
Medida do tumor 5,0					
< que 5,0 cm	60	26,2%	29	70,7%	0,000
> / = que 5,0 cm	169	73,8%	12	29,3%	
H pylori					
Sim	120	52,9%	21	51,2%	0,867
Não	107	47,1%	20	48,8%	
Invasão Linfática					
Sim	135	59,0%	1	2,4%	<0,001
Não	94	41,0%	40	97,6%	
Limite Comprometido					
Comprometido	13	5,7%	0	0,0%	0,228
Livre	216	94,3%	41	100,0%	
Forma					
Avançado	207	90,4%	1	2,4%	<0,001
Superficial	22	9,6%	40	97,6%	
Invasão Perineural					
Sim	152	66,4%	1	2,4%	<0,001
Não	77	33,6%	40	97,6%	

4.5. Análise da expressão proteica de HER2

A avaliação da expressão de HER2 por imuno-histoquímica foi realizada nos 270 casos (pacientes) incluídos no estudo. O escore HER2 3+, interpretado como positivo, foi observado em 27 casos (10,0%), o escore HER2 2+, interpretado como duvidoso, foi observado em 24 casos (9,0%), o escore HER2 1+, interpretado como negativo, foi observado em 15 casos (5,5%) e o escore HER2 0, também interpretado como negativo, foi observado em 204 casos (75,5%). **(Tabela 4.8) (Figuras 4.9 e 4.10).**

Das 27 amostras que apresentaram superexpressão de HER2 3+, 23 (85,2%) eram ADG e apenas 4 (14,8%) eram ADE; das 24 amostras HER2 2+, 18 (75,0%) eram ADG e 6 (25,0%) ADE; das 15 amostras HER2 1+, 14 (93,3%) eram ADG e 1 (6,7%) ADE e das 204 amostras HER2 escore 0, 172 (84,3%) eram ADG e 32 (15,7%) eram ADE. Devido ao baixo número de amostras de ADE, não foi possível extratificar as análises posteriores por localização do adenocarcinoma (ADG e ADE).

Os casos com escore HER2 2+, interpretados como duvidosos, observados em 24 (9%) casos, não foram submetidos a técnica de hibridização *in situ* (ISH) até o momento da finalização do trabalho, devido à dificuldades em adequar o método a ser utilizado em tecidos embebidos em parafina por longa data e por outras alterações pré-analíticas nos tecidos.

Tabela 4.8: Avaliação da expressão de HER2 por imuno-histoquímica dos pacientes com adenocarcinoma gástrico

Escore de HER2	Nº de pacientes (%)
0	204 (75,5)
1+	15 (5,5)
2+	24 (9,0)
3+	27 (10,0)
Total	270 (100,0)

0 = resultado negativo sem imunorreatividade, 1+ = resultado negativo; 2+ = resultado duvidoso e 3+ = resultado positivo.

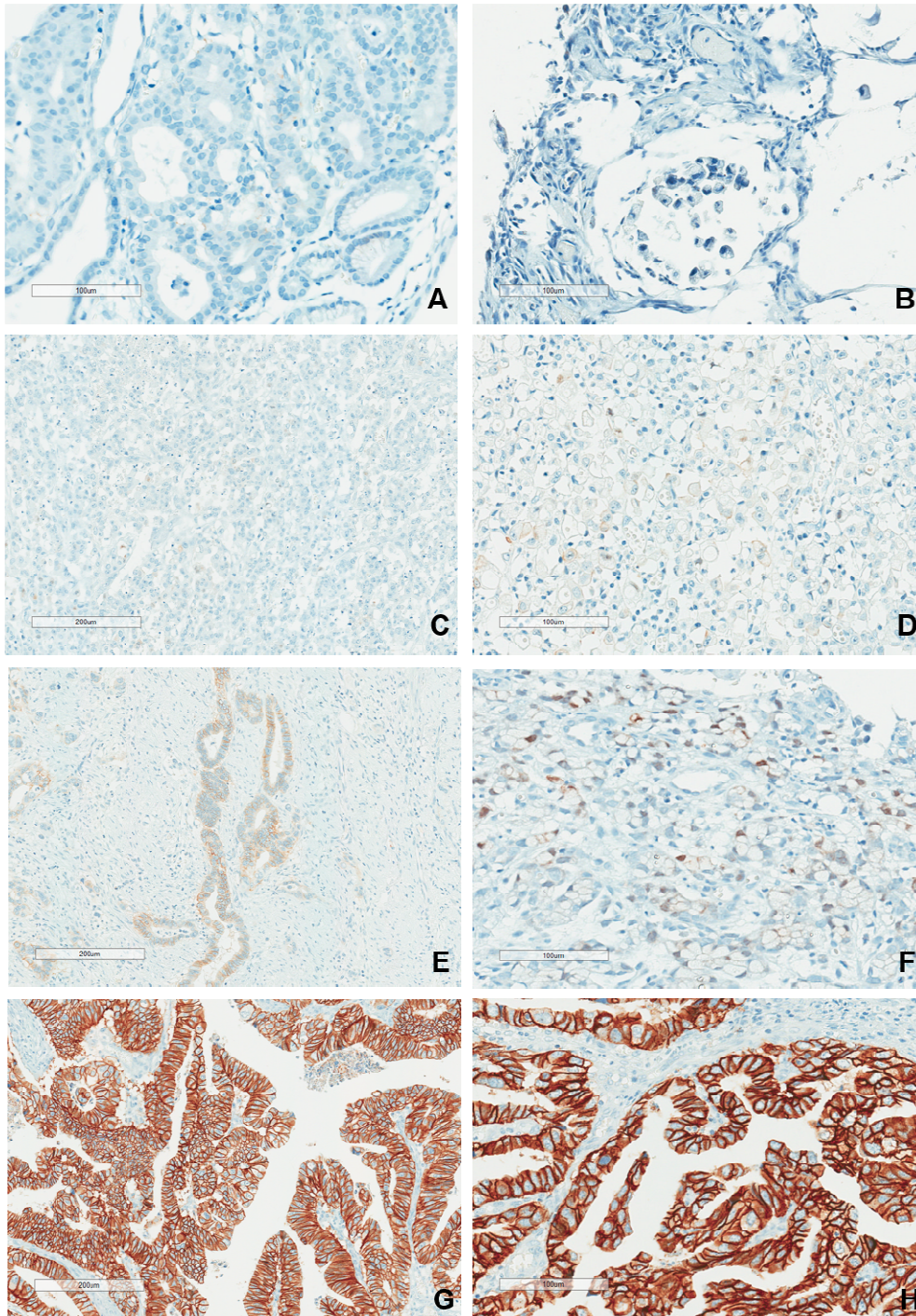


Figura 4.9 Fotomicrografias representativas dos escores da expressão proteica de HER2 nos adenocarcinomas gástricos e da JEG. Técnica de imuno-histoquímica **A** (200 μm) e **B** (100 μm), HER2 escore 0; **C** (200 μm) e **D** (100 μm), HER2 escore 1+ ; **E** (200 μm) e **F** (100 μm), HER2 escore 2+; **G** (200 μm) e **H** (100 μm), HER2 escore 3+.

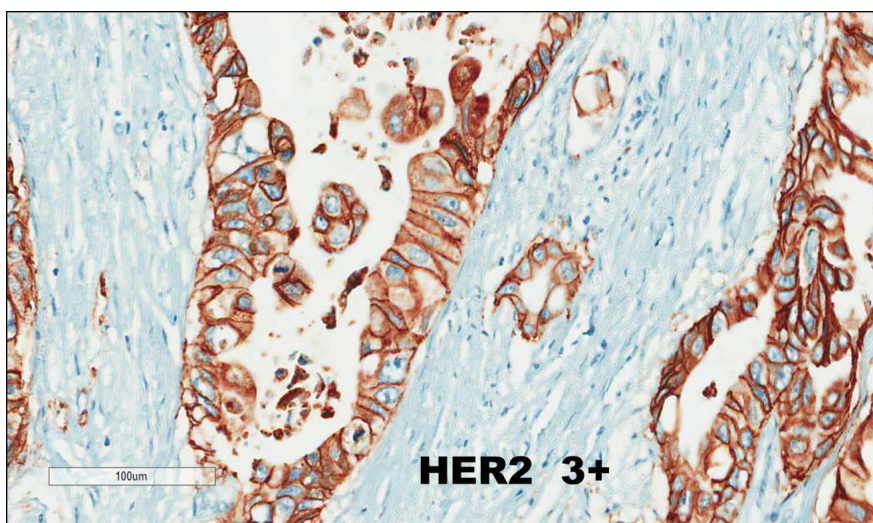


Figura 4.10: Fotomicrografia representativa do escore 3+ da expressão proteica de HER2, com padrão de marcação característico basolateral e lateral nos adenocarcinomas gástricos e da JEG Técnica de imunohistoquímica (100 μ m).

4.5.1- Avaliação da associação entre as características epidemiológicas e clinicomorfológicas dos pacientes e expressão de HER2

Após avaliação da expressão de HER2 por imunohistoquímica, as amostras foram subdivididas em positivas (HER2 3+) e negativas (0 ou HER2 1+), com o intuito de avaliar se os fatores epidemiológicos, clínico-morfológicos poderiam estar associados com a superexpressão de HER2. As amostras com escore HER2 2+, por serem classificadas como duvidosas, foram excluídas dessas análises. Das variáveis analisadas apenas a Classificação de Lauren mostrou significância estatística, mostrando que a superexpressão de HER2 foi mais frequente no tipo intestinal do que no tipo difuso ($p = 0,045$). **(Tabela 4.9).**

Tabela 4.9: Análise das associações da expressão de HER2 e das variáveis epidemiológicas e clinicomorfológicas

	HER2 Imuno-histoquímica				p-valor
	Positivo	%	Negativo	%	
Idade 50 anos					
Abaixo de 50 anos	6	10,7%	50	89,3%	1,000
Acima de 50 anos	21	11,1%	169	88,9%	
Sexo					
Feminino	10	9,3%	98	90,7%	0,539
Masculino	17	12,3%	121	87,7%	
Cor da pele					
Não Branca	5	6,2%	76	93,8%	0,128
Branca	22	13,3%	143	86,7%	
Escolaridade					
Baixa	21	12,0%	154	88,0%	0,505
Alta	6	8,5%	65	91,5%	
Etilismo					
Não etilista	13	10,4%	112	89,6%	0,835
Etilista ou ex	13	12,0%	95	88,0%	
Tabagismo					
Não tabagista	13	9,4%	125	90,6%	0,406
Tabagista ou ex	13	13,0%	87	87,0%	
Histórico Familiar					
Sim	12	11,5%	92	88,5%	0,833
Não	12	10,6%	101	89,4%	
Medida do tumor					
< que 5,0 cm	6	7,3%	76	92,7%	0,279
≥ que 5,0 cm	21	12,8%	143	87,2%	
Classificação de Lauren*					
Intestinal	16	15,0%	91	85,0%	0,045
Difuso	6	6,1%	92	93,9%	
Limite Comprometido					
Comprometido	2	18,2%	9	81,8%	0,353
Livre	22	10,8%	182	89,2%	
Forma					
Avançado	23	12,1%	167	87,9%	0,465
Superficial	4	7,1%	52	92,9%	
Invasão Perineural					
Sim	13	9,2%	128	90,8%	0,312
Não	14	13,3%	91	86,7%	
Metástase					
Sim	9	12,9%	61	87,1%	0,651
Não	18	10,2%	158	89,8%	
pTNM					
Avançado	19	13,3%	124	86,7%	0,216
Inicial	8	7,8%	95	92,2%	
<i>H pylori</i>					
Sim	9	7,3%	115	92,7%	0,081
Não	16	13,6%	102	86,4%	

* o tipo misto não foi incluído nessa análise.

4.5.2- Avaliação da sobrevida e expressão proteica de HER2

Com o conhecimento que a superexpressão de HER2 possui impacto no prognóstico dos pacientes, foi feita uma curva de sobrevida em 60 meses com a finalidade de avaliar esse impacto nos pacientes que fizeram parte desse estudo. Para tanto, da mesma forma que descrito no item anterior, os pacientes foram subdivididos de acordo com a classificação imuno-histoquímica em positivos, quando o escore foi HER2 3+, e negativos, quando o escore foi HER2 0 ou HER2 1+. As amostras com escore HER2 2+, as classificadas como duvidosas, foram excluídas dessas análises. Entretanto não houve diferença na sobrevida dos pacientes que não expressavam HER2 (mediana = 57,9 meses) quando comparados com aqueles que superexpressaram (mediana = 30, 7 meses) ($p = 0,4145$) (**Figura 4.11**).

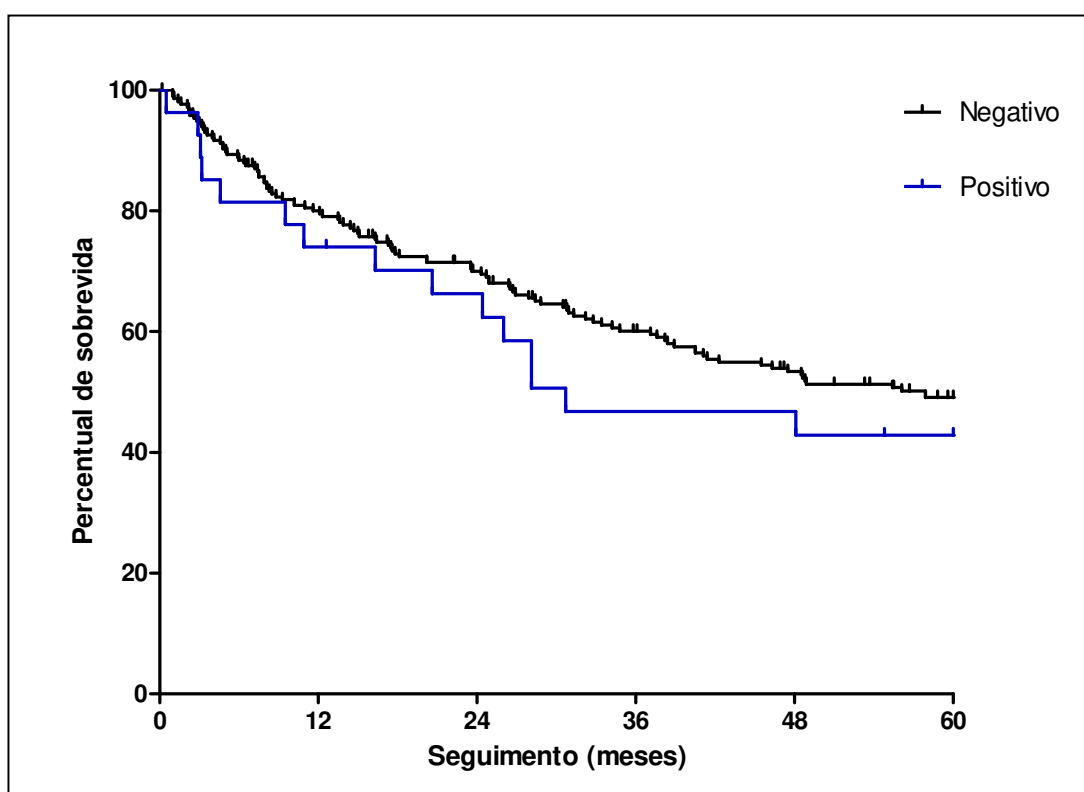


Figura 4.11: Curva de sobrevida comparando pacientes HER2 positivos e HER2 negativos. Positivo:imuno-histoquímica escore HER2 3+(mediana = 30, 7 meses) e negativo: escore 0 ou HER2 1+ (mediana = 57,9 meses) $p = 0,4145$.

Uma vez que houve relação significativa entre a superexpressão de HER2 e a classificação de Lauren, mostrando que o adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal apresentou maior frequência de casos HER2 positivos que o tipo difuso, foi avaliado se HER2 superexpresso impactava na sobrevida desses pacientes, entretanto não foi encontrada significância estatística ($p = 0,4683$), mostrando que a superexpressão de HER2 (mediana = 39,4 meses) em pacientes com adenocarcinoma do tipo intestinal não possuem prognóstico diferente daqueles que não possuem HER2 superexpressos (não alcançaram mediana de sobrevida até 60 meses de seguimento), nesse grupo de pacientes analisados (**Figura 4.12**).

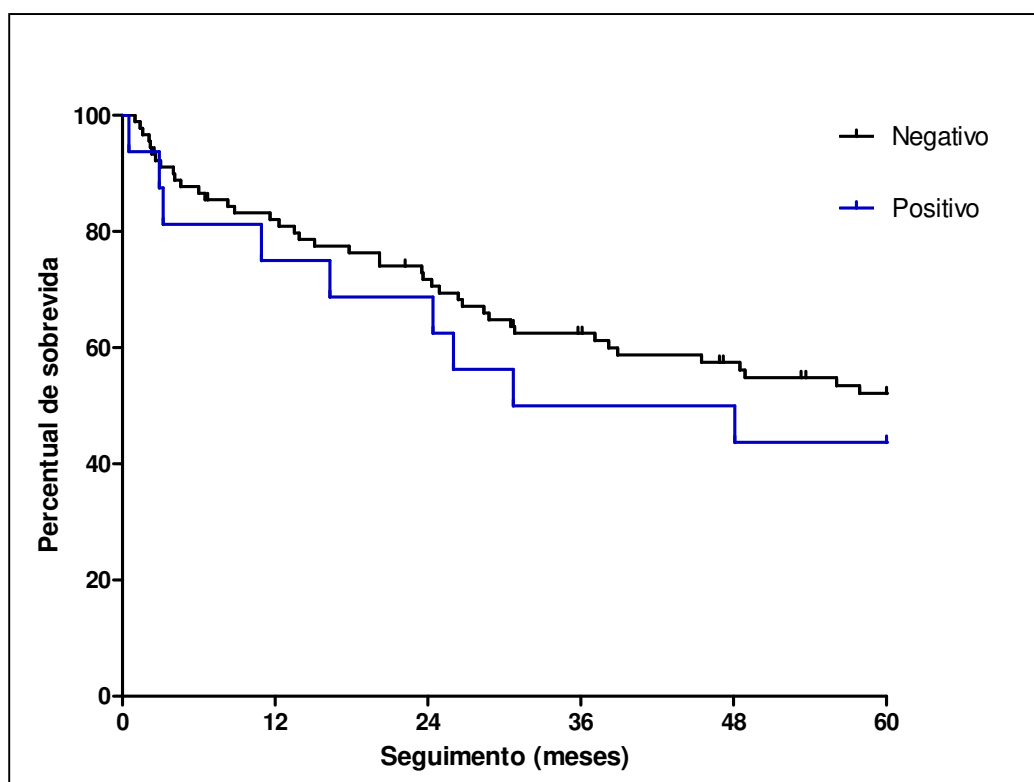


Figura 4.12: Curva de sobrevida comparando pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (classificação de Lauren) HER2 positivos e HER2 negativos. Positivo: imuno-histoquímica escore HER2 3+ (mediana = 39,4 meses) e negativo: escore 0 ou HER2 1+. $p = 0,4683$.

Apesar de poucos casos terem superexpressado HER2, foi feita a curva de sobrevida para os adenocarcinomas do tipo difuso com a finalidade de avaliar se aqueles que apresentaram superexpressão de HER2 (mediana = 44,05 meses) impactaram na sobrevida daqueles que não apresentaram (não alcançaram mediana de sobrevida até 60 meses de seguimento) e não foi encontrada significância estatística ($p = 0,7522$) (**Figura 4.13**).

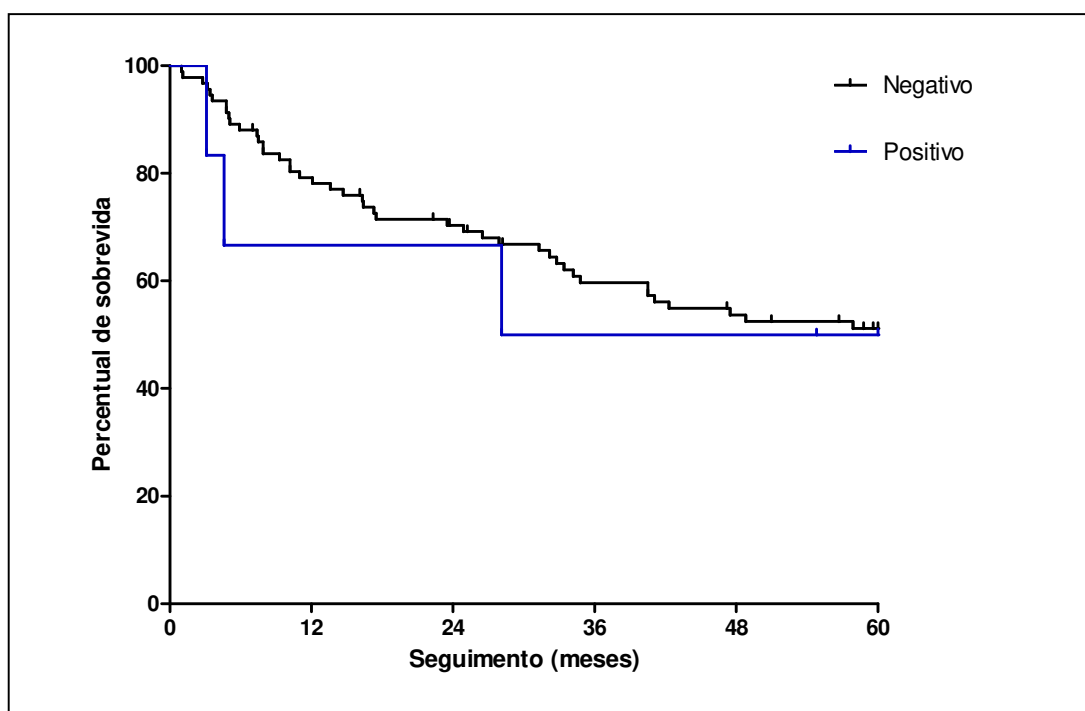


Figura 4.13: Curva de sobrevida comparando pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo difuso (classificação de Lauren) HER2 positivos e HER2 negativos. Positivo: imuno-histoquímica escore HER2 3+ (mediana = 44,05 meses) e negativo: escore 0 ou HER2 1+ $p = 0,7522$.

4.6 Expressão gênica de *HER2* em adenocarcinomas gástricos e de JEG

Foi avaliada a expressão de *HER2* em adenocarcinoma gástricos e de JEG por qPCR utilizando sondas *Taqman*. Dentre as 45 amostras analisadas somente

duas, amostras 8 e 38, não apresentaram amplificação tanto para *GAPDH* quanto para *HER2*. Este fato indica que a seleção prévia das amostras por PCR foi efetiva. Dentre as quatro amostras com score 0 na imunomarcacão somente uma apresentou amplificação para *HER2*. Dentre as oito amostras com escore 1+ na imunomarcacão somente uma amostra apresentou algum nível de amplificação de *HER2*. O panorama para as 17 amostras 2+ foi diferente, no qual 11 apresentaram amplificação de *HER2*. Por fim, somente duas das quinze amostras escore 3+ não apresentaram amplificação de *HER2* pela técnica de qPCR.

A mediana de expressão de *HER2* nos tumores escore 0 foi de 0,0016 (mínimo 0,0011, máximo 0,005) nos tumores 1+ foi de 0,003 (mínimo 0,0005, máximo 0,047), nos tumores 2+ foi de 0,03 (mínimo 0,0005, máximo 198,1), e nos tumores 3+ foi de 2,23 (mínimo 0,0014, máximo 158,7). A expressão dos tumores 3+ foi significativamente maior que os tumores 0, 1+ e 2+, valores de p ajustado 0,036, 0,011 e 0,043 respectivamente. Dentre os outros grupos não foi observada diferença de expressão significativa. A expressão de *HER2* nos adenocarcinomas gástrico e de JEG foi comparada a expressão em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE), no qual é bem estabelecido que *HER2* não é amplificado ou superexpresso. Observa-se que a expressão de *HER2* em CEE é bem semelhante aos tumores 0 e 1+ (**Figura 4.14**).

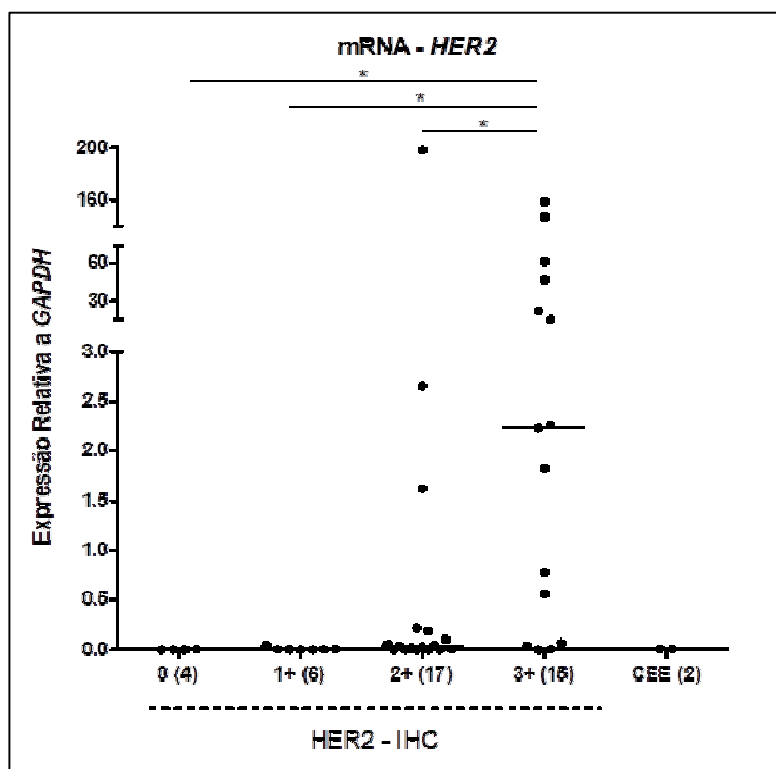


Figura 4.14 Expressão de *HER2* nos adenocarcinomas gástricos e de JEG. A expressão de *HER2* foi comparada entre amostras de adenocarcinomas gástrico e de JEG com diferentes níveis de expressão proteica de *HER2* analisada por imuno-histoquímica. As amostras 3+ apresentaram maior expressão que as amostras dos outros grupos (* $p < 0,05$). A expressão nos carcinomas epidermóides de esôfago (CEE) foi semelhante às amostras 0 e 1+.

4.7 Correlação entre a expressão gênica e a expressão proteica de *HER2*

Visando compreender se os resultados obtidos por qPCR estariam correlacionados aos obtidos por imuno-histoquímica, uma análise de correlação de Spearman foi realizada entre as duas análises. Foi observado que os dados de expressão gênica estavam significativamente correlacionados com os de imuno-histoquímica, apresentando coeficiente de correlação (ρ) de 0,62, $p < 0,0001$ e intervalo de confiança (95%) de 0.3879 a 0.7809 (**Figura 4.15**).

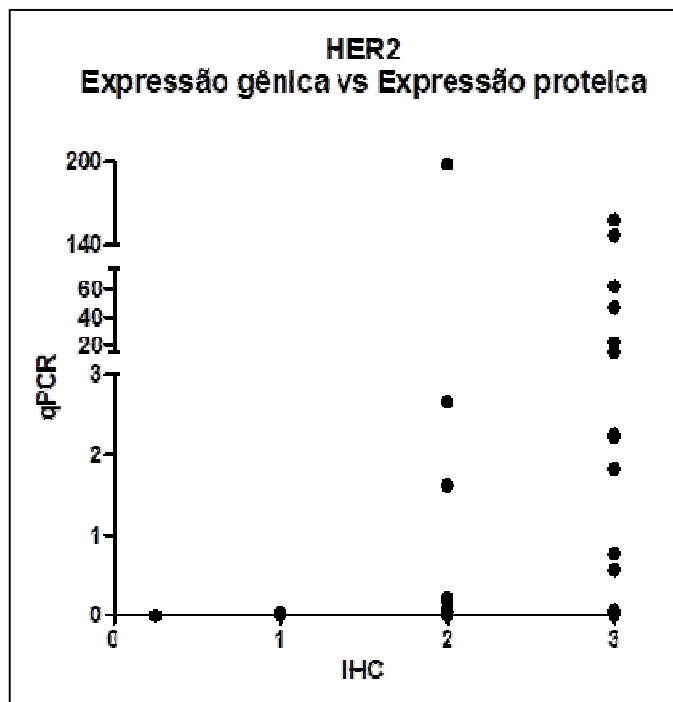


Figura 4.15 Análise de correlação entre a expressão gênica de *HER2* por qPCR e a expressão proteica por imuno-histoquímica. Foi observada uma correlação significativa entre a expressão do gene e da proteína ($p < 0,0001$; $r = 0,62$, intervalo de confiança 95% - de 0,3879 a 0,7809).

4.8 Potencial uso da expressão de *HER2* para identificar superexpressão proteica em adenocarcinoma gástrico e de JEG

Através de curva ROC foi estabelecida a acurácia da análise da expressão de *HER2* por qPCR em determinar se uma amostra é *HER2* 3+ ou não, comparando com os valores de expressão de todas as amostras. Foi observado que a expressão de *HER2* relativa à *GAPDH* por qPCR maior que 0.3916 foi capaz de distinguir uma amostra 3+ das demais com 84% de acurácia ($p = 0,0002$), apresentando sensibilidade de 80% e especificidade de 78%. Comparando somente amostras 3+ e 2+, a expressão de *HER2* relativa à *GAPDH* por qPCR, também maior que 0,3916, foi capaz de distinguir amostras 3+ com

78% de acurácia ($p = 0,007$), com sensibilidade de 73% e especificidade de 82% (Figura 4.16).

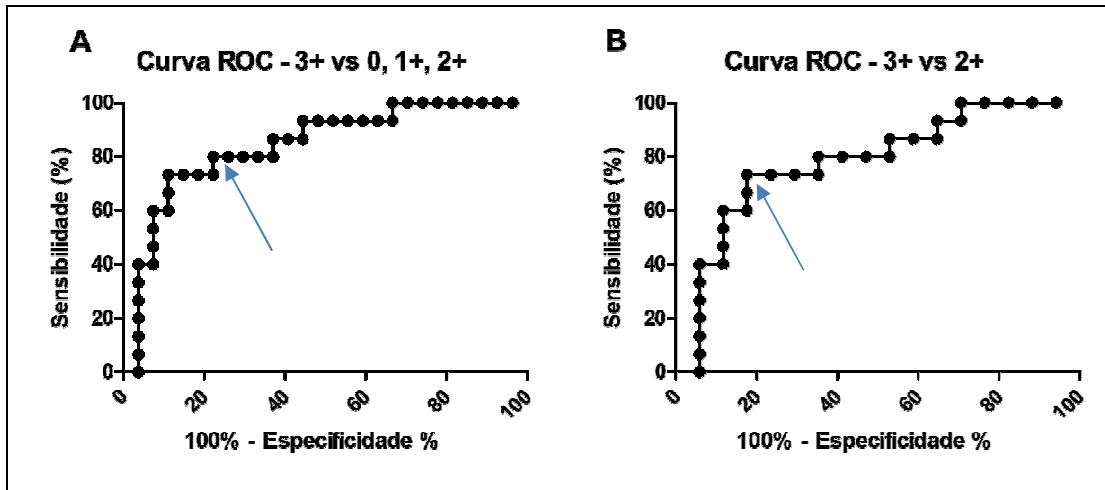


Figura 4.16 Potencial uso da expressão gênica de *HER2* por qPCR para determinar superexpressão proteica de *HER2* em adenocarcinomas gástrico e de JEG. A expressão gênica de *HER2* foi capaz de distinguir tumores *HER2* 3+ dos tumores 0, 1+ e 2+ quanto somente dos tumores 2+. As setas em azul indicam o ponto de corte selecionado.

5. DISCUSSÃO

O câncer de estômago e da junção esôfago gástrica (JEG) ocupam o quinto lugar em incidência tanto no mundo quanto no Brasil, apresentando altas taxas de mortalidade. Em estimativa global é a terceira causa de morte em ambos os sexos, sendo responsável por 8,8% do total de mortes por câncer (GLOBOCAN, 2012). No Brasil, a estimativa de novos casos de câncer para o período de 2018-2019 (INCA/MS, 2017), mostram que o câncer de estômago é o quarto tipo mais frequente nos homens e o sexto tipo mais frequente nas mulheres. Visto a relevância dessa neoplasia, tornam-se importantes estudos que caracterizem e analisem a população atendida pelos principais hospitais-referência em câncer do Brasil, Instituto Nacional de Câncer.

No presente trabalho, foram avaliados 270 pacientes, dos quais 57% eram do sexo masculino, estando de acordo com a frequência descrita no Brasil, onde o câncer de estômago é o quarto câncer mais frequente nos homens. Na maioria dos países do mundo o câncer gástrico também é mais frequente no sexo masculino (YEOLE, 2008; JEMAL *et al.*, 2011).

A média de idade dos pacientes que fizeram parte desse trabalho foi de 60 anos e a mediana de 61 anos, variando de 29 a 88 anos, pois os ADG e o ADE de etiologia adquirida por exposição a fatores ambientais são cânceres mais frequentes nos pacientes idosos. Conforme descrito por diversos autores, a incidência do câncer gástrico aumenta com a idade, sendo que a maior incidência ocorre da sétima a nona décadas de vida. Os casos em indivíduos com 30 anos ou menos são muito raros e estão associados à predisposição genética (THEUER *et al.*, 1996; NAKAMURA *et al.*, 1999; NAGINI, 2012). O valor prognóstico da idade no câncer gástrico é controverso, sendo para alguns autores um fator prognóstico independente (ZHANG *et al* 2004; AN *et al*, 2010; DENG *et al*, 2010), enquanto para outros o seu valor prognóstico está associado a outras variáveis, como tipo histológico e tratamento (PARK *et al*, 2009; SAITO *et al*, 2010; WANG *et al*, 2010).

Em relação a outros fatores epidemiológicos e clínicos avaliados, como a cor da pele, a escolaridade, estado civil, as condições socioeconômicas e a exposição aos principais fatores de risco parecem estar associadas à localização anatômica de aparecimento dos adenocarcinomas no estômago. Nesse estudo, cento e oitenta e dois (67,4%) pacientes eram brancos e 88 (32,6%) não brancos. Embora diversos trabalhos relatem que o câncer gástrico da metade distal ocorra mais frequentemente em indivíduos negros e nos grupos de baixo desenvolvimento socioeconômico, no grupo de pacientes estudados a maioria foi de brancos, provavelmente essa informação não corresponda exatamente a realidade devido a miscigenação étnica brasileira, que dificulta a definição precisa da cor da pele. A maioria dos pacientes informou ter baixa escolaridade (71,1%), o que está em acordo com a maior ocorrência do câncer gástrico da metade distal em indivíduos de baixo desenvolvimento socioeconômico (ENGEL *et al.*, 2003; CREW E NEUGUT, 2006; WHITEMAN *et al.*, e THE AUSTRALIAN CANCER STUDY, 2008; SHOHEEN E RICHTER, 2009).

A respeito da exposição aos fatores de risco, 138 (51,1%) pacientes relataram não serem etilistas, cento e cinquenta e três (56,7%) pacientes eram tabagistas ou ex-tabagistas. Duell e colaboradores (2011), concluíram que o consumo pesado de álcool está associado ao risco de adenocarcinoma gástrico não cárdico do tipo intestinal em homens (DUELL *et al.*, 2011). No presente trabalho a avaliação da associação de etilismo com as demais variáveis clínicas e morfológicas mostrou que não houve associação significativa. De acordo com a IARC (2004), o tabagismo é responsável por aproximadamente 10% de todos os casos de câncer gástrico, aumentando o risco de câncer tanto para aqueles localizados na região da cárdia, quanto para os de localização fora da cárdia, sendo mais frequentemente associado aos primeiros. No entanto, nesse estudo não houve associação significativa do tabagismo com as diversas variáveis clínicas e morfológicas.

A história familiar de câncer de diversas origens foi relatada por 41,9% (113) dos pacientes. No entanto não havia informações específicas no prontuário dos pacientes sobre a ocorrência de câncer gástrico em outros membros da

família, não sendo possível fazer análise com esse dado específico. Os fatores de risco para o câncer gástrico atuam de forma independente ou associados aos fatores genéticos, aumentando o risco para o câncer (LICHTENSTEIN *et al.*, 2000). Os membros da mesma família geralmente estão expostos ao mesmo ambiente e têm condições socioeconômicas similares (BEVAN E HOULSTON, 1999).

Em relação ao perfil clínico, a maioria dos pacientes (240; 88,9%) desse estudo apresentaram *Performance Status* 1 (PS1), sendo essa frequência explicada devido ao fato dos critérios de inclusão desse trabalho incluir somente pacientes que foram submetidos a cirurgia curativa.

Dentre as comorbidades avaliadas, a relatada com maior frequência foi hipertensão arterial sistêmica presente em 80 pacientes (29,6%). Não existe relato na literatura de associação significativa com o câncer gástrico

Em relação à localização do tumor, avaliada no espécime cirúrgico, quarenta e três (15,9%) tumores estavam localizados na junção esofagogástrica e 11 (4,1%) tumores estavam localizados no fundo gástrico, representando a metade proximal do estômago (20%). Quarenta e dois (15,6%) tumores estavam localizados no corpo gástrico e 117 (43,3%) tumores estavam localizados no antro piloro, que juntos representam a metade distal do estômago (58,9%). Os demais carcinomas eram muito extensos e comprometiam dois ou três terços gástricos (20,1%). Os adenocarcinomas de estômago que se originam na metade distal do estômago são mais frequentes nos países em desenvolvimento, sendo os fatores de maior risco para o aparecimento dos tumores distais os fatores dietéticos e a infecção por *Helicobacter pylori*. Os adenocarcinomas que se originam na região proximal gástrica, na junção esôfago gástrica (JEG) e no esôfago distal são mais comuns nos países desenvolvidos, em indivíduos brancos e nas classes sociais mais altas, tendo como fatores de risco a Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE), a obesidade, o Esôfago de Barrett, o tabagismo e dieta pobre em frutas e vegetais (ENGEL *et al.*, 2003; CREW E NEUGUT, 2006; WHITEMAN *et al.*, e THE AUSTRALIAN CANCER STUDY, 2008; SHOHEEN E RICHTER, 2009). Assim, nos casos estudados observamos que o câncer gástrico localizado na metade

distal foi mais frequente, estando em acordo com o relatado na literatura para países em desenvolvimento. Wang e colaboradores (2010) verificaram que, embora o câncer gástrico proximal tenha pior prognóstico que o câncer distal em análise univariada, a localização do tumor não é um fator prognóstico independente em uma análise multivariada, assim como não foi observada nesse trabalho.

A maioria dos pacientes estudados apresentavam carcinomas na fase avançada da doença na época do exame da peça cirúrgica (208; 77%), isto é apresentavam adenocarcinomas que infiltravam além da camada muscular própria, sendo os tumores classificados em relação à forma macroscópica de apresentação do tumor, utilizando a Classificação de Borrmann para o câncer gástrico avançado, e o tipo descrito com maior frequência foi o Borrmann III (ulcerado e mal delimitado), em 105 (38,9%). Os carcinomas gástricos avançados estão associados ao prognóstico adverso, que é diretamente proporcional a profundidade de invasão na parede. O tipo Borrmann III apresenta componente ulcerado e infiltrativo de crescimento que pode dificultar a avaliação macroscópica de extensão tumoral na ressecção cirúrgica e na avaliação das margens cirúrgicas. Dentre os casos incluídos no estudo, 23% eram precoces ou superficiais e 77% eram avançados. Então, foi observado que fatores epidemiológicos e clínicos poderiam estar associados à forma de apresentação do tumor e pode-se observar que a escolaridade dos pacientes e a medida do tumor apresentaram uma associação significativa. A apresentação avançada do tumor foi mais frequente entre pacientes com baixa escolaridade ($p=0,026$) e em casos em que os tumores eram maior ou igual a 5 cm ($p<0,001$). A maior frequência dos tumores avançados em pacientes de baixa escolaridade pode ser explicada pela dificuldade de acesso ao sistema de saúde e atendimento médico e a falta de conhecimento sobre o câncer.

Nesse estudo, 181 (67%) pacientes tinham tumores que mediam 5,0 cm ou mais nos seus maiores eixos. A medida do tumor tem sido relatada como sendo de significado prognóstico, em alguns trabalhos retrospectivos (YOKOTA *et al.*, 2000; ADACHI *et al.*, 2000), sugerindo que o crescimento tumoral está associado

a metástases linfonodais e a sobrevida em cinco anos. Wang e colaboradores (2010) relataram que pacientes com tumores menores que 2,5 cm tinham melhor prognóstico do que aqueles com tumores medindo de 3,0 a 5,0 cm, e aqueles maiores que 5,0 cm.

Em relação ao grau histológico, cento e quarenta e oito (54,8%) adenocarcinomas eram de alto grau histológico e 122 (45,2%) adenocarcinomas eram de baixo grau histológico (são os adenocarcinoma bem e moderadamente diferenciados). A avaliação do grau histológico é relevante, pois pode afetar a sobrevida global em cinco anos significativamente. Visto que o grau de diferenciação do tumor já foi apontado como um importante fator prognóstico para adenocarcinoma gástrico, avaliamos os fatores epidemiológicos e clínicos que poderiam estar associados ao diagnóstico histopatológico de baixo grau, relacionado a um melhor prognóstico, de acordo com a literatura (OHMAN, WETTERFORS, MOBERG, 1972). Porém, ainda não se sabe se as variações no comportamento dos carcinomas gástricos devido ao estadiamento e ao grau de diferenciação são causados por fatores independentes ou interligados. Dentre os parâmetros avaliados, apenas o gênero apresentou uma associação significativa com o grau histológico do tumor ($p = 0,003$), em que o diagnóstico de baixo grau foi mais comum entre homens (67,2%) em comparação às mulheres (32,8%). Essa associação significativa está em conformidade com a literatura, que relata que os adenocarcinomas gástrico do tipo intestinal ou bem/moderadamente diferenciados são mais frequentes no sexo masculino (LAUREN, 1965; CORSO, SERUCA, ROVIELLO, 2012).

De acordo com a classificação de Lauren, os 270 tumores foram avaliados, sendo 115 (42,6%) classificados como tipo intestinal, 107 (39,6%) como do tipo difuso de Lauren e 48 (17,8%), como tipo misto de Lauren. A classificação de Lauren, também apresenta associação com o prognóstico. Já foi mostrado na literatura que o tipo difuso ou pouco diferenciado tem prognóstico desfavorável. Assim foram avaliados fatores que poderiam estar associados à sua ocorrência. Nesta análise, apenas o gênero apresentou associação significativa, sendo que os

tumores do tipo difuso foram mais comuns entre as mulheres ($p=0,002$). Essa associação é compatível com o relatado na literatura (LAUREN, 1965; CORSO, SERUCA, ROVIELLO, 2012).

Em 136 (50,4%) dos tumores foi evidenciada microscopicamente invasão neoplásica dos vasos linfáticos e em 28 (10,4%) foi observada invasão vascular venosa neoplásica. A invasão linfática microscopicamente é comum, e as metástases para linfonodos também ocorrem com elevada frequência, chegando a mais de 90% nos casos de câncer gástrico avançado (RINGERTZ, 1967; MING, 1984; DESAI *et al.*, 2004). A presença de êmbolos neoplásicos linfáticos e vasculares tem sido observada como potencial indicador prognóstico independente, e influencia significativamente a recorrência tumoral e a evolução para o óbito após a ressecção curativa (YOKOTA *et al.*, 1999; YOKOTA *et al.*, 2000; MAEHARA *et al.*, 2002). Alguns autores como Wang e colaboradores (2010) e Liu e colaboradores (2010), descrevem a invasão linfática e a invasão venosa como fatores prognósticos independentes, mesmo no câncer gástrico precoce, em análise multivariada. Sendo assim, avaliamos que fatores poderiam estar associados à sua ocorrência. Entre os casos incluídos no estudo, 50,4% apresentaram invasão neoplásica dos vasos linfáticos, sendo a associação da invasão linfática significativa em pacientes com baixa escolaridade ($p=0,016$), em casos em que os tumores eram maior ou igual a 5 cm ($p<0,001$) e em casos em que os limites cirúrgicos estavam comprometidos ($p=0,003$). Esses resultados demonstram que a invasão de vasos linfáticos ocorre com maior frequência nos tumores extensos.

A invasão neoplásica perineural foi visualizada à microscopia em 153 (56,7%) tumores incluídos no presente estudo. Também foi correlacionada ao prognóstico de pacientes com câncer gástrico e foi avaliada quanto aos seus fatores associados. Nessa análise a associação da invasão perineural foi significativa entre indivíduos com menos de 50 anos, em casos em que os tumores eram maior ou igual a 5 cm ($p=0,018$) e em casos com diagnóstico de alto grau ($p<0,001$) (DENG *et al.*, 2014). Assim, observamos que tumores extensos e de alto grau histológico (pouco diferenciados) tem maior potencial infiltrativo e de

invasão de nervos. A associação de invasão perineural em indivíduos com menos de 50 anos pode estar relacionada à maior frequência de adenocarcinomas de alto grau nesses indivíduos.

Nos 270 tumores foram observados à microscopia, infiltrado peritumoral linfoplasmocitário (210; 77,8%) e/ou infiltrado peritumoral do tipo misto: linfoplasmocitário, neutrofílico e eosinofílico (60; 22,2%). A desmoplasia foi observada em 248 (91,8%) dos tumores, sendo classificada em leve, moderada e acentuada, em 110 (40,7%) casos, 81 (30,0) casos e 57 (21,1%) casos, respectivamente; 22 (8,1%) tumores não apresentaram desmoplasia. No entanto, a presença de infiltrado peritumoral e de desmoplasia não possuem valor prognóstico bem definido na literatura (GOODEN *et al.* 2011).

No presente estudo, 59,6% dos pacientes apresentaram linfonodos positivos e, portanto, poderiam apresentar pior prognóstico. Segundo estudos realizados, o número de linfonodos metastáticos e de linfonodos retirados é o fator prognóstico mais importante em pacientes que foram submetidos ao tratamento cirúrgico curativo (KODERA *et al.*, 1997; MARCHET *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2009; STRONG *et al.*, 2010). Para compreensão do que poderia contribuir para a ocorrência de metástases linfonodais nestes casos, a associação com diferentes características epidemiológicas e clínicas dos pacientes foi avaliada. A associação dos linfonodos positivos foi significativa entre indivíduos com baixa escolaridade, ($p=0,028$), nos casos em que os tumores eram maior ou igual a 5 cm ($p<0,001$), em casos com invasão linfática ($p<0,001$), em casos que apresentaram limites cirúrgicos comprometidos ($p=0,017$), em casos de apresentação avançada ($p<0,001$) e em casos com invasão perineural ($p<0,001$). A associação significativa de linfonodos positivos com variáveis cuja presença nos tumores é de valor prognóstico adverso é compatível com a literatura ((YOSHIKAWA E MARUYAMA, 1985; ISHIGAMI, NATSUGOE, MIYAZONO *et al.*, 2004).

O tratamento cirúrgico que os 270 pacientes receberam também foi avaliado, 90 (33,3%) pacientes foram submetidos à gastrectomia total, 164 (60,7%) pacientes foram submetidos à gastrectomia subtotal ou parcial e 16 (5,9%) pacientes foram submetidos à esofagogastrectomia. A maior frequência de

procedimento cirúrgico tipo gastrectomia subtotal se deve ao fato do maior número de tumores estarem localizados na metade distal do estômago, permitindo esse procedimento. Destas cirurgias, duzentos e vinte e três (82,6%) foram classificadas como R0, isto é, sem doença residual macroscópica e microscópica, o que está em acordo com os critérios de inclusão dos pacientes desse estudo, que foram aqueles submetidos a cirurgias com intuito curativo. Assim como a maioria das peças cirúrgicas apresentaram margens de ressecção livres de neoplasia. A única opção de tratamento curativo para o adenocarcinoma gástrico avançado é a ressecção cirúrgica, cuja finalidade principal é a remoção da neoplasia primária com margens de ressecção cirúrgica proximal, distal e circunferencial negativas (ressecção cirúrgica classificada como sendo tipo R0). Alguns estudos relatam que a margem cirúrgica comprometida pelo carcinoma está associada à diminuição da sobrevida global (FUJIMOTO *et al.*, 1997; HARTGRINK, BONENKAMP, VAN DE VELDE, 2000). A extensão da ressecção cirúrgica depende principalmente da localização do tumor e a distância do tumor até a margem cirúrgica de ressecção é importante. Nos tumores de antro gástrico, é possível manter margem de ressecção cirúrgica proximal livre de neoplasia, quando está distante 6,0 cm do tumor, e não existindo infiltração neoplásica de outros órgãos, as taxas de sobrevida em cinco anos para gastrectomia subtotal e gastrectomia total são semelhantes, sendo de 65,3% e de 62,4%, respectivamente (BOZZETTI *et al.*, 1999). Já a extensão da linfadectomia é um assunto bastante discutido no tratamento cirúrgico do câncer gástrico.

Nesse trabalho, as metástases à distância ocorreram em setenta e seis (28,1%) casos, tendo sido o fígado o órgão isolado mais afetado (34% dos casos), dessa forma esses pacientes foram classificados no estágio IV da doença. A presença de metástase à distância foi detectada no seguimento dos pacientes, após o tratamento cirúrgico, uma vez que esses pacientes foram selecionados na época do diagnóstico de câncer gástrico para o tratamento cirúrgico curativo por apresentarem estágios menos avançados da doença. Conforme a literatura descreve as metástases de origem hematogênica mais comuns são para fígado e pulmões, em cerca de 35% dos casos (ESAKI *et al.*, 1990).

Na época da coleta dos dados dos prontuários médicos, setenta e seis (28,1%) dos pacientes foram classificados em estágio IV da doença (por apresentarem metástase à distância). Cento e noventa e quatro (71,9%) foram classificados nos demais estágios (15,2% no estágio IA; 7,4% IB; 6,7 IIA; 13,0% IIB; 7,8% IIIA; 8,5% IIIB e 13,3% IIIC). Para avaliar os fatores epidemiológicos e clínicos que poderiam estar associados ao pTNM, o mais importante fator prognóstico para o câncer gástrico, os casos incluídos no presente estudo foram divididos em pTNM avançado (pT2, pT3 ou pT4; qualquer N e qualquer M) e inicial (pT1N0M0; pT1N1M0; pT1N2M0 e pT1N3M0). De acordo com nossas análises, o pTNM avançado foi observado com maior frequência em casos em que os tumores eram maior ou igual a 5 cm ($p < 0,001$), em casos com invasão linfática ($p < 0,001$), em casos com forma de apresentação macroscópica avançada ($p < 0,001$) e em casos com invasão perineural ($p < 0,001$). Essas associações estão em acordo com a maior frequência de pTNM em estágios avançados da doença relatados nesse estudo, uma vez que os tumores maiores são aqueles que também invadem mais profundamente as camadas da parede gástrica (T), também com maior potencial para invadir vasos linfáticos e nervos (YOSHIKAWA E MARUYAMA, 1985; ISHIGAMI, NATSUGOE, MIYAZONO *et al.*, 2004).

A avaliação das lesões associadas ao câncer gástrico na mucosa não tumoral também foi feita. Alguns estudos relatam que as condições predisponentes estão associadas ao aumento do risco para o câncer gástrico. A gastrite crônica atrófica é uma das condições associadas ao aumento do risco de câncer (SIURALA, LEHTOLA, IHAMAKI, 1974; NAGAYO, 1977; MIYAMOTO *et al.*, 2002; MIYAMOTO *et al.*, 2003). A gastrite crônica foi diagnosticada microscopicamente na mucosa gástrica adjacente em 269 (99,6%) peças cirúrgicas, sendo de graduação leve em 50 (18,5%) casos; moderada em 131 (48,5%) casos e acentuada em 88 (32,6%) casos. A atrofia glandular na mucosa gástrica ocorreu em 238 (88,1%) casos, sendo de graduação leve em 73 (27%) casos; moderada em 88 (32,6%) casos e acentuada em 77 (28,5%) casos. Não foi evidenciada atrofia glandular em 32 (11,9%) casos. A metaplasia intestinal estava

presente na mucosa gástrica adjacente em 215 (79,6%) casos, sendo completa focal em 31 (11,5%) casos; completa multifocal em 115 (42,6%) casos; incompleta focal em 44 (16,3%) casos e incompleta multifocal em 25 (9,3%) casos. Não foi evidenciada metaplasia intestinal em 55 (20,4%) casos. A informação sobre o tipo e a extensão de metaplasia intestinal é importante por estar associada ao potencial de evolução para carcinoma.

Cento e quarenta e um (52,2%) pacientes apresentaram o bacilo *Helicobacter pylori* no muco superficial da mucosa gástrica, o que está em conformidade com a literatura, que refere a infecção por *Helicobacter pylori* e os fatores dietéticos, como fatores de maior risco para o aparecimento dos tumores distais (ENGEL *et al.*, 2003; CREW E NEUGUT, 2006; WHITEMAN *et al.*, e THE AUSTRALIAN CANCER STUDY, 2008; SHOHEEN E RICHTER, 2009).

A gastrite crônica atrófica associada ao *Helicobacter pylori* é o mais importante precursor do câncer gástrico, e estudos feitos no Japão mostraram que 80% dos carcinomas gástricos originam-se em mucosa gástrica atrófica em áreas apresentando metaplasia intestinal incompleta (SIURALA, LEHTOLA, IHAMAKI, 1974; NAGAYO, 1977; MIYAMOTO *et al.*, 2002; MIYAMOTO *et al.*, 2003).

Ainda, foi evidenciada microscopicamente na mucosa gástrica adjacente a formação de agregados linfóides em 240 (88,9%) casos e evidenciada a formação de folículos linfóides em 222 (82,2%) casos. O surgimento do tecido linfóide na mucosa gástrica é adquirido após inflamação crônica (gastrite crônica) e comumente associado à presença do bacilo *Helicobacter pylori* no muco superficial. As alterações regenerativas, polipos hiperplásicos e cistos de glândulas gástricas (cárdicas, fúndicas e pilóricas) também ocorrem associados à gastrite crônica, tendo sido observados em 04 (1,5%) casos, em 14 (5,2%) casos e em 38 (14,1%) casos, respectivamente, nesse estudo.

A avaliação da evolução clínica dos pacientes desse estudo mostrou que havia ocorrido recidiva tumoral em 16 (5,6%) dos pacientes na época da coleta das informações no prontuário médico (em 2012). Em 2016, quando as informações sobre óbito foram atualizadas, dos 270 pacientes desse trabalho, 178 (65,9%) dos pacientes tinham evoluído para o óbito e 92 (34,1%) estavam vivos.

Cento e sete (60,1%) do total de casos de óbito (178) ocorreram por evolução do câncer, 37 (20,8%) ocorreram por outras causas e em 34 (19,1%) óbitos não havia informação sobre a causa. Assim em 2016, o número de pacientes que apresentaram recidiva tumoral subiu para 107 (39,6%). A mediana de sobrevida dos pacientes foi de 48 meses.

O estudo ToGA (2010) demonstrou que a expressão de HER2 tem valor preditivo para o tratamento com Trastuzumabe nos ADG e ADE avançados. Os pacientes com superexpressão do HER2 apresentam sobrevida significativamente maior quando tratados com Trastuzumabe em conjunto com a quimioterapia convencional (BANG *et al.*, 2010). Estudos mostraram que o *status* HER2 positivo estava associado com sobrevida e/ou características clínico-patológicas adversas, como invasão serosa, metástase linfonodal, estágio avançado da doença ou metástase à distância (GRAVALOS E JIMENO, 2008; MEZA-JUNCO *et al.*, 2009; JORGENSEN, 2010; JORGENSEN E HERSOM, 2012).

A avaliação da expressão de HER2 por imuno-histoquímica foi realizada nos 270 casos (pacientes) incluídos no estudo. O escore HER2 3+, interpretado como positivo, foi observado em 27 casos (10,0%), o escore HER2 2+, interpretado como duvidoso, foi observado em 24 casos (9,0%), o escore HER2 1+, interpretado como negativo, foi observado em 15 casos (5,5%) e o escore HER2 0, também interpretado como negativo, foi observado em 204 casos (75,5%). A frequência da superexpressão proteica do HER2 (HER2 escore 3+) nos ADG e ADE vista nesse trabalho está em acordo com a literatura, que relata variação de 4,4% a 53,4%, ocorrendo em média em 17,9% dos casos, nos últimos quinze anos (ALLGAYER *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2006; GRABSCH *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2011; JORGENSEN E HERSOM, 2012; JANJIGIAN *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2013; BAYKARA *et al.*, 2015; KUROKAWA *et al.*, 2015).

Nesse trabalho, foi avaliado se os fatores epidemiológicos, clínico-morfológicos poderiam estar associados com a superexpressão de HER2. Apenas a Classificação de Lauren mostrou significância estatística, mostrando que a

superexpressão de proteica de HER2 foi mais frequente no tipo intestinal do que no tipo difuso ($p = 0,045$). Alguns estudos mostraram que a superexpressão e a amplificação do *HER2* estão relacionadas à classificação de Lauren, sendo observados mais frequentemente no tipo intestinal comparado aos tipos difuso e misto. Estes achados foram confirmados no estudo ToGA (2010), no qual a taxa de positividade do HER2 foi de 32,2% nos carcinomas do tipo intestinal, 6,1% no tipo difuso e 20,4% no tipo misto ($P < 0,001$). Uma vez que o adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal apresentou maior frequência de casos HER2 positivos que o tipo difuso, foi avaliado se HER2 superexpresso impactava na sobrevivência desses pacientes, entretanto não foi encontrada significância estatística, mostrando que a superexpressão proteica de HER2 em pacientes com adenocarcinoma do tipo intestinal não possuem prognóstico diferente daqueles que não possuem HER2 superexpressos. Além disso, foi avaliado o valor prognóstico da superexpressão proteica de HER2 em adenocarcinomas do tipo difuso e não foi encontrada significância estatística.

Com o conhecimento que a superexpressão de HER2 possui impacto no prognóstico dos pacientes, a avaliação da sobrevivência e a expressão proteica de HER2 foi feita através da elaboração de uma curva de sobrevivência, não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes que superexpressavam ou não o receptor HER2, muito embora a sobrevivência dos pacientes que superexpressaram o HER2 (30,7 meses) foi quase a metade daqueles que não superexpressaram (57,9 meses). Esses resultados diferem dos trabalhos analisados por Jorgensen e Hersom (2012), que fizeram a análise de 42 estudos publicados num total de 12.749 pacientes com câncer gástrico, na qual mostraram que o *status* HER2 positivo, testado por imuno-histoquímica (IHQ) ou hibridização *in situ* (ISH), adiciona informação sobre o prognóstico da doença. Nessa análise, foi demonstrado que existe uma clara tendência do papel de HER2 como fator prognóstico negativo no câncer gástrico, sugerindo que a superexpressão proteica e/ou amplificação do *HER2* deve ser uma anormalidade ligada ao desenvolvimento deste tipo de tumor. Os resultados encontrados nesse trabalho, possivelmente divergem da literatura devido ao baixo número de

amostras que superexpressaram HER2, diminuindo o poder estatístico da análise. Ainda assim, faltam analisar por SISH 24 amostras de HER2 2+ (casos duvidosos) e esses dados serão reavaliados, podendo aumentar o número de amostras HER2 positivo.

Em seguida, foi avaliada a expressão gênica de *HER2* nos ADG e ADE por qPCR utilizando sondas *Taqman* e foi observado que a expressão de *HER2* nos tumores classificados como 3+ na imuno-histoquímica foi significativamente maior que os tumores classificados como 0, 1+ e 2+, valores de p 0,036, 0,011 e 0,043 respectivamente. Em seguida, observamos uma correlação entre as expressões genica e proteica de HER2. Em resumo, esses resultados mostraram que as amostras 3+ apresentaram maior expressão que as amostras pertencentes aos demais grupos, bem como os dados de expressão gênica estavam significativamente correlacionados com os de imuno-histoquímica.

Em seguida, através de uma curva ROC, foi observado que a expressão gênica de *HER2* foi capaz de distinguir uma amostra 3+ das demais com 84% de acurácia, sensibilidade de 80% e especificidade de 78%. Comparando somente amostras 3+ e 2+, a expressão de *HER2* foi capaz de distinguir amostras 3+ com 78% de acurácia, 73% de sensibilidade e 82% especificidade. Neste contexto, os pacientes com ADG ou ADE em estágios avançados na nossa população poderiam se beneficiar de mais um método para serem encaminhados ao tratamento personalizado com o anticorpo monoclonal. Ainda assim, é necessário aumentar o número de amostras para análise da expressão gênica a fim de consolidar os resultados desse estudo, especialmente as amostras classificadas com duvidosas na imuno-histoquímica (HER2 2+).

Embora a metodologia da amplificação gênica de *HER2* por SISH nos casos duvidosos (HER2 2+) tenha sido iniciada, não foi obtido sucesso na técnica, possivelmente pela qualidade das condições pré-analíticas do material embebido em bloco de parafina. No entanto, novos protocolos estão em teste para que esse problema seja resolvido.

Tendo em vista o exposto anteriormente, podemos sugerir que a avaliação dos fatores prognósticos e preditivos nos ADG e ADE na população brasileira/local

é de grande importância para o atendimento eficiente na rede pública. O conhecimento do comportamento biológico específico dessa neoplasia e do perfil dos pacientes acometidos poderá contribuir para estabelecer tratamentos mais efetivos e personalizados, principalmente nos estágios avançados da doença, quando o tratamento quimioterápico convencional tem pouco impacto na sobrevida dos pacientes.

6. CONCLUSÕES

- 1- A avaliação da superexpressão proteica de HER2 por imuno-histoquímica nesse estudo revelou que 10% dos casos apresentaram escore HER2 3+ considerados positivos.
- 2- A avaliação da expressão gênica de *HER2* em amostras de adenocarcinoma gástrico (ADG) e Adenocarcinoma da junção esofagogástrica (ADE) por PCR em Tempo Real evidenciou que as amostras 3+ apresentaram maior expressão que as amostras dos outros grupos, havendo correlação entre a expressão gênica e expressão proteica.
- 3- O resultado da expressão de *HER2* por PCR em Tempo Real foi capaz de distinguir as amostra 3+ das demais com alta de acurácia.
- 4- Houve correlação da expressão de HER2 em adenocarcinomas gástricos e da junção esofagogástrica com a classificação de Lauren, mostrando que a superexpressão de HER2 foi mais frequente no tipo intestinal do que no tipo difuso.
- 5- Não foi observado impacto da superexpressão de HER2 no prognóstico dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS

ADACHI, Y. *et al.* **Most Important Lymph Node Information in Gastric Cancer : Multivariate Prognostic Study.** *Annals of Surgical Oncology*, v. 7, n. 7, p. 503–507, 2000.

ABRAHÃO-MACHADO, L. F. *et al.* **HER2 in gastric cancer: comparative analysis of three different antibodies using whole-tissue sections and microarrays.** *World J Gastroenterol.* v. 19, p. 6438-6446, 2013.

ABRAHÃO-MACHADO, L. F., SCAPULATEMPO-NETO, C. **HER2 testing in gastric cancer: An update.** v.22, n. 19, p. 4619-4625, 2016.

ALI, M. A. *et al.* **Expression and mutation analysis of HER2 in head and neck squamous cell carcinoma.** *Cancer Investigation*, v. 28, p. 495-500, 2010.

ALLGAYER, H. *et al.*, **C-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems.** *Journal of Clinical Oncology*, v. 18, n. 11, p. 2201-2209, 2000.

AN, J. Y. *et al.*, **The prognosis of gastric cardia cancer after RO resection.** *The American Journal of Surgery*, v. 199, p. 725-729, 2010.

ANG, K. K. *et al.*, **Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma.** *Cancer Research*, v. 62, p. 7350-7356, 2002.

AGIERO, F *et al.* **Comparative analysis of c-erbB-2 (HER2/eu) in squamous cell carcinoma of the tongue; does over-expression exist? And what is its correlations with traditional diagnostic parameters?** *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 37, p. 145-150, 2008.

ANDERSON, W. F. *et al.* **Age-specific trends in incidence of noncardia gastric cancer in US adults.** JAMA : The Journal of the American Medical Association, v. 303, n. 17, p. 1723 –1728, 2010.

AZEMAR, M. *et al.* **Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the *in vitro* growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression *in vivo*.** International Journal of Cancer, v. 86, p.269-275, 2000.

BANG, Y. J. *et al.*, **Pathological features of advanced gastric cancer (GC): Relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial.** Journal of Clinical Oncology, v. 27, n. 15S, p. 4556, 2009.

BANG, Y. J., *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, randomized controlled trial.** The Lancet, v. 367, p. 687- 697, 2010

BARROS-SILVA, J. D. *et al.*, **Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients.** British Journal of Cancer, v. 100, n. 3, p. 487- 493, 2009.

BARTLETT, A.I., STARCZYNSKI, J., ROBSON, T. *et al.* **Heterogeneous *HER2* gene amplification: impact on patient outcome and clinically relevant definition.** American Journal of Clinical Pathology. 136:266-74, 2011.

BASELGA, J. *et al.*, **Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer.** The New England Journal of Medicine, v. 366, n. 2, p. 109-119, 2012.

BASELGA, J. *et al.* **Advances in the management of HER2-positive early breast cancer.** Critical Reviews in oncology/ Hematology. v. 119; p. 113-122, 2017.

BAYKARA, M. *et al.*, **Clinical Significance of HER2 Overexpression in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancers.** Journal of Gastrointestinal Surgery, v. 19, n. 9, p. 1565-1571, 2015.

BEVAN, S.; HOULSTON, R. S. **Genetic predisposition to gastric cancer.** QJM, v. 92, n. 1, p. 5–10, 1999.

BILOUS, M. **SPHERE HER2 cases with Michael Bilous;** v2; Survey-Taken. <https://pt.surveymonkey.com/r/TJKGSV3>.

BOKU, NARIKAZU. **HER2-positive gastric cancer.** Gastric Cancer, v. 17; p.1-12, 2014.

BONENKAMP, J. J. *et al.* **Extended Lymph-node dissection for gastric cancer.** The New England Journal of Medicine, v. 340, p. 908–914, 1999.

BONNER, J. A. *et al.* **Radiotherapy plus cetuximab for esquamous-cell carcinoma of the head and neck.** N Engl J Med. v. 354; p. 567-578, 2006.

BOSE, R.; ZHANG, X. **The ErbB kinase domain: structural perspectives into kinase activation and inhibition.** Experimental Cell Research, v. 315, n. 4, p. 649–58, 2009.

BOZZETTI, F. *et al.* **Adequacy of Margins of Resection in Gastrectomy for Cancer.** Annals of Surgery, v. 196, n. 6, p. 685–690, 1982.

BOZZETTI, F. *et al.* **Subtotal Versus Total Gastrectomy for Gastric Cancer: five- year survival rates in a multicenter randomized Italian trial.** Italian

Gastrointestinal Tumor Study Group. *Annals of surgery*, v. 230, n. 2, p. 170–178, 1999.

BOZZETTI, F. **Principles of surgical radicality in the treatment of gastric cancer.** *Surgical Oncology Clinics of North America*, v. 10, n. 4, p. 833–854, 2001.

BUBLIL, E. M.; YARDEN, Y. **The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics.** *Current Opinion In Cell Biology*, v. 19, n. 2, p. 124–34, abr. 2007.

BUZDAR, A. U. *et al.* **Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer.** *J. Clin. Oncol.*, v. 23, n. 16, p. 3676-3685, 2005.

CAVALOT, A. *et al.* **Prognostic impact of HER2/neu expression on squamous head and neck carcinomas.** *Head Neck*, v. 29, p. 655-664, 2007.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C., **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.** *Nature Reviews Cancer*, v. 2, p. 563-572, 2002.

COFFEY, R. J. *et al.* **Ménétrier disease and gastrointestinal stromal tumors : hyperproliferative disorders of the stomach.** *The Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n. 1, p. 70–80, 2007.

CORREA, P. **Pathology and Molecular Pathogenesis of Gastric Cancer.** Uptodate, 2014.

CORSO, G.; SERUCA, R.; ROVIELLO, F. **Gastric cancer carcinogenesis and tumor progression**. *Annali Italiani di Chirurgia*, v. 83, n. 3, p. 172–176, 2012.

CREW, K. D.; NEUGUT, A. I. **Epidemiology of gastric cancer**. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, v. 12, n. 3, p. 354–362, 2006.

CUNNINGHAM, D. *et al.* **Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer**. *N Engl J Med*. v. 351; p. 337-345, 2004.

CUNNINGHAM, D. *et al.* **Perioperative Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Cancer**. *The New England Journal of Medicine*, v. 355, n. 1, p. 11–20, 2006.

CUSCHIERI, A. *et al.* **Patient survival after D 1 and D 2 resections for gastric cancer : long-term results of the MRC randomized surgical trial**. *British Journal of Cancer*, v. 79, n. 9/10, p. 1522–1530, 1999.

DAVIDSON, M.; STARLING, N. **Trastuzumab in the management of gastroesophageal cancer: patient selection and perspectives**. *OncoTargets and Therapy*. V.9; p. 7235-7245, 2016.

D'ELIA, L. *et al.* **Habitual salt intake and risk of gastric cancer: a meta-analysis of prospective studies**. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, v. 31, n. 4, p. 489–98, ago. 2012.

DENG, J. *et al.* **Suitability of 7TH UICC N Stage for Predicting the Overall Survival of Gastric Cancer Patients after Curative Resection in China**. *Annals of Surgical Oncology*, v.17, p. 1259-1266, 2010.

DENG, J. *et al.* **Prognostic value of perineural invasion in gastric cancer. A systemic review and meta-analysis**. *Plos One*, n.9; v.2, 2014.

DESAI, A. M. *et al.* **Improving outcomes in gastric cancer over 20 years.** Gastric Cancer, v. 7, p. 196–203, 2004.

DICKEN, B.J. *et al.* **Gastric Adeocarcinoma: review and consideratins for future directios.** Annals of Surgery, v. 241, p. 27-39, 2005.

DRAGOVICH, T.; CAMPEN, C. **Anti-EGFR-targeted therapy for esophageal and gastric cancers: An evolving concept.** Journal of Oncology, v. 2009, p. 8 pages, 2009.

DUELL, E. J. **Alcohol consuption and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort.** The American Journal of Clinical Nutrition, v. 94, p. 1266-1275, 2011

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. **The American Joint Committee on Cancer : the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM.** Annals of Surgical Oncology, v. 17, p. 1471–1474, 2010.

ENGEL, L. S. *et al.* **Population attributable risks of esophageal and gastric cancers.** Journal of the National Cancer Institute, v. 95, n. 18, p. 1404-1413, 2003.

ESAKI, Y.; HIRAYAMA, R.; HIROKAWA, K. **A Comparison of Patterns of Metastasis in Gastric Cancer by Histologic Type and Age.** Cancer, v. 65, n. 9, p. 2086–2090, 1990.

Estimativa 2018: incidencia de cancer no Brasil / Instituto Nacional de Cancer Jose Alencar Gomes da Silva. Coordenacao de Prevencao e Vigilancia. - Rio de Janeiro: INCA, p. 25, p. 58, 2017.

FACCHIANO, E. *et al.* **Laparoscopy hypertermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for the treatment of malignant secondary to unresctable peritoneal**

carcinomatosis from advanced gastric cancer. European Journal of Surgical Oncology, n. 34, p. 154-158, 2008.

FAN, X. S. *et al.* **Differences in HER2 over-expression between proximal and distal gastric cancer in the chinese population.** World Journal of Gastroenterology, v. 19, p. 3316-3323, 2013.

FERLAY, J. *et al.* **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base.** Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>.

FOCK, K. M. **Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer.** Alimentary Pharmacology & Therapeutics, v. 40, p. 250–260, 2014.

FRIER, K. *et al.* **Tissue Microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma.** Cancer Research, v. 63, p. 1179-1182, 2003.

FRY, D. W. **Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors.** Experimental Cell Research, v. 284, n. 1, p. 131–139, 2003.

FUJIMOTO, S. *et al.* **Improved mortality rate of gastric carcinoma patients with peritoneal carcinomatosis treated with intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion combined with surgery.** Cancer, v. 79, n. 5, p. 884-891, 1997.

GIANNI, L. *et al.* **Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomized controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort.** Lancet, v. 375, p. 377-384, 2010.

GIANNI, L. *et al.* **Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a four-year follow-up of a randomized controlled trial.** *Lancet Oncol.*, v. 12, p. 236-244, 2011.

GONZÁLEZ, C. A. *et al.* **Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC).** *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer*, v. 107, p. 629–634, 2003.

GONZALEZ, C. A.; LÓPEZ-CARRILLO, L. **Helicobacter pylori, nutrition and smoking interactions: their impact in gastric carcinogenesis.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 45, n. 1, p. 6–14, 2010.

GOODEN, M. J. M. *et al.* **The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systemic review with meta-analysis.** *Br J Cancer*. N.105; v.1; p. 93-103, 2011.

GRABSCH, H. *et al.*, **HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous an of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series.** *Cellular Oncology*, v.32, n. 1-2, p. 57-65, 2010.

GRANDIS, J. R.; TWEARDY, D. J., **Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer.** *Cancer Research*, v. 53, p. 3579-84, 1993.

GRAVALOS, C.; JIMENO, A. **HER2 in gastric cancer: A new prognostic factor and a novel therapeutic target.** *Annals of Oncology*, v. 19, p. 1523–1529, 2008.

HARARI, P. M. *et al.* **Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology.** *Endocrine-Related Cancer*, v. 11, p. 689–708, 2004.

HARRISON, L. E.; KARPEH, M. S.; BRENNAN, M. E. **Extended Lymphadenectomy Is Associated With a Survival Benefit for Node-Negative Gastric Cancer.** *Journal of Gastrointestinal Surgery*, v. 2, n. 2, p. 126–131, 1998.

HARTGRINK, H. H.; BONENKAMP, H. J.; VAN DE VELDE, C. J. **Influence of surgery on outcomes in gastric cancer.** *Surgical Oncology Clinics of North America*, v. 9, n. 1, p. 97-117, 2000.

HE, C. *et al.* **Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 expression with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer.** *World Journal of Gastroenterology*, v. 19, n. 14, p. 2171-2178, 2013.

HECHT, J. R. *et al.*, **Lapatinib in combination with capecitabine plus oxaliplatin (CapeOx) in Her2-positive advanced or metastatic gastric, esophageal or gastroesophageal adenocarcinoma (AC): the TRIO-013/LOGiG trial.** *Journal of Clinical Oncology*, v. 34, n. 5, p. 443-451, 2013.

HERMANEK P, SCHEIBE O, SPIESSL B, W. G. **TNM classification of malignant tumors: the new 1987 edition.** *Rontgenblatter*, v. 40, n. 6, p. 200, 1987.

HOANG, MP, *et al.* **HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma.** *American Journal of Clinical Pathology*, v. 113, n.6, p. 852-9, 2000.

HOFFMAN, M., *et al.* **Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study.** *Histopathology*, v. 52, p. 797-805, 2008.

HOFMAN, P. *et al.* **Pathogenesis of Helicobacter pylori infection.** *Helicobacter*, v. 9, n. 1, p. 15–22, 2004.

HOUGHTON, J.; WANG, T. C. **Helicobacter pylori and Gastric Cancer: A New Paradigm For Inflammation-Associated Epithelial Cancers.** *Gastroenterology*, v. 128, n. 6, p. 1567–1578, 2005.

HU, B. *et al.* **Gastric cancer : Classification , histology and application of molecular pathology.** *Journal of Gastrointestinal Oncology*, v. 3, n. 3, p. 251–261, 2012.

HYNES, N. E.; LANE, H. A. **ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors.** *Nature Reviews. Cancer*, v. 5, p. 341–354, 2005.

ISHIGAMI, S. *et al.* **Clinical merit of subdividing gastric cancer according to invasion of the muscularis propria.** *Hepatogastroenterology*, v. 51, p. 869–871, 2004.

JANJIGIAN, Y. Y. *et al.* **Prognosis of metastatic gastric and gastroesophageal junction cancer by HER2 status: a European and USA International collaborative analysis.** *Annals of Oncology*, v. 23, p. 2656-2662, 2012.

JANJIGIAN, Y. Y. *et al.* **Monitoring afatinib treatment in HER2-positive gastric cancer with 18F-FDG and 89Zr-trastuzumab PET.** *Journal of Nuclear Medicine*, v. 54, p. 936-943, 2013.

JEDRYCHOWSKI, W. **Contribution of epidemiology in Poland for better understanding of the natural history of diseases in gastrointestinal tract.** *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 54, n. 3, p. 245–261, 2003.

JEMAL, A. *et al.* **Cancer Statistics**. CA: a Cancer Journal for Clinicians, v. 59, n. 4, p. 225–249, 2009.

JORGENSEN, J. T. **Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer**. Oncology, v. 78, p. 26-33, 2010.

JORGENSEN, J.T.; HERSOM, M. **HER2 as a prognostic marker in gastric cancer - a sistematic analisys of data from the literature**. Journal of Cancer, v. 3, p. 137-144, 2012.

KAMAZOE, A. *et al.* **A retrospective observational study of clinicopathological features of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Japanese patients with metastatic colorectal cancer**. BMC Cancer, v. 15, p. 258, 2015.

KHADEMI, B *et al.* **The expression of p53, c-erB-2 molecules and their corelation with progostics markers in patients with head and neck tumors**. Cancer Letter, v. 184, p. 223-230, 2002.

KIM, D. J. *et al.* **Potential preventive effects of Chelidonium majis L. (Papaveraceae) herb extract on glandular stomach tumor development in rats treated with N-methyl-N'-nitro-N nitrosoguanidine (MNNG) and hypertonic sodium chloride**. Cancer Letters, v. 112, n. 2, p. 203–208, 1997.

KIM, K. C. *et al.*, **Evaluation of HER2 protein expression in gastric carcinomas: cmparative analysis of 1,414 cases of whole-tissue sections and 595 cases of tissue microarrays**. Annals of Surgical Oncology, v. 18, n.10, p. 2833-2840, 2011.

KIM, S. S. *et al.* **Helicobacter pylori in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma**. Cancer Letters, v. 305, n. 2, p. 228–38, 2011.

KODERA, Y. *et al.* **Metastatic Gastric Lymph Node Rate Is a Significant Prognostic Factor for Resectable Stage IV Stomach Cancer.** Journal of the American College of Surgeons, v. 185, n. 1, p. 65–69, 1997.

KRSTEV, S. *et al.* **Occupation and risk of stomach cancer in Poland.** Occupational and Environmental Medicine, v. 62, n. 5, p. 318–324, 2005.

KUROKAWA, Y. *et al.* **Multicenter large-scale study of prognostic impact of HER2 expression in patients with resectable gastric cancer.** Gastric Cancer, v. 18, p. 691-697, 2015.

LAUREN, P. **The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt At a Histo-Clinical Classification.** Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, v. 64, p. 31–49, 1965.

LAXEN, F. *et al.* **Gastric polyps; their morphological and endoscopic characteristics and relation to gastric carcinoma.** Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica Series A :Pathology, v. 90, n. 3, p. 221–228, 1982.

LEE, K. E. *et al.* **Prognostic significance of p53, nm23, PCA a c-erbB-2 in gastric cancer.** Japanese Journal of Clinical Oncology, v. 33, p. 173-179, 2003.

LERWILL, M. F.; YOUNG, R. H. **Ovarian metastases of intestinal-type gastric carcinoma: A clinicopathologic study of 4 cases with contrasting features to those of the Krukenberg tumor.** The American Journal of Surgical Pathology, v. 30, n. 11, p. 1382–1388, 2006.

LEWIN, K. J.; WEINSTEIN, W. M.; RIDDELL, R. H. *Inn: Gastrointestinal Pathology and its Clinical Implications*, 2014. Gastric Epithelial Polyps and Tumors, capítulo 14, p. 759.

LICITRA, L. *et al.* **Evaluation of EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the efficacy of cetuximab in combination with chemotherapy in the first-line treatment of recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: EXTREME study.** *Annals of Oncology*. v. 22, p. 1078-1087, 2011.

LICHTENSTEIN, P. *et al.* **Environmental & Heritable Factors in the Causation of Cancer.** *The New England Journal of Medicine*, v. 343, n. 2, p. 78–85, 2000.

LIU, C., RUSSELL, R. M. **Nutrition and gastric cancer risk: An update.** *Nutrition Reviews*, v. 66, n. 5, p. 237–249, 2008.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods*. v. 25, n.4, p. 402-408, 2001.

LOEFFLER-RAGG, J. *et al.* **Low incidence of mutations in EGFR kinase domain in Caucasian patients with head and neck squamous cell carcinoma.** *European Journal of Cancer*, v. 42, p. 109-111, 2006.

LOIBL, S. *et al.* **PIK3CA mutations are associated with reduced pathological complete response rates in primary HER2-positive breast cancer: pooled analysis of 967 patients from five prospective trials investigating lapatinib and trastuzumab.** *Ann Oncol*, v. 27, p.1519-25, 2016.

LOIBL, S., GIANNI, L. **HER2-positive breast cancer.** *Lancet*, v. 389; p. 2415-2429, 2017.

LORDICK, F. *et al.* **Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomized open-label phase 3 trial.** *The Lancet Oncology*, v. 14, p. 490-499, 2013.

MACDONALD, J. S. *et al.* **Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction.** *The New England Journal of Medicine*, v. 345, n. 10, p. 725–730, 2001.

MAEHARA, Y. *et al.* **Therapeutic value of lymph node dissection and the clinical outcome for patients with gastric cancer.** *Surgery*, v. 131, p. 85–91, 2002.

MARCHET, A. *et al.* **The Ratio Between Metastatic and Examined Lymph Nodes (N Ratio) Is an Independent Prognostic Factor in Gastric Cancer Regardless of the Type of Lymphadenectomy: Results From an Italian Multicentric Study in 1853 Patients.** *Annals of Surgery*, v. 245, n. 4, p. 543–552, 2007.

MARTY, M. *et al.* **Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first line treatment: the MM77001 study group.** *J. Clin. Oncol.*, v. 23, p. 4265-4274, 2005.

MIDDLETON, L.P. *et al.* **Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases *HER2* immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases.** *Archives of Pathology Laboratory of Medicine*. 133:775-80, 2009.

MEZA-JUNCO, J.; AU, H.-J.; SAWYER, M. B. **Trastuzumab for gastric cancer.** *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 9, n. 12, p. 1543–1551, 2009.

MING, S.-C. *et al.* **Gastric Dysplasia Significance and Pathologic Criteria.** *Cancer*, v. 54, n. 9, p. 1794–1801, 1984.

MIYAMOTO, M. *et al.* **Five cases of nodular gastritis and gastric cancer: a possible association between nodular gastritis and gastric cancer.** *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, v. 34, n. 11, p. 819–820, 2002.

MIYAMOTO, M. *et al.* **Nodular Gastritis in Adults Is Caused by Helicobacter pylori Infection.** *Digestive Diseases and Sciences*, v. 48, n. 5, p. 968–975, 2003.

MOJA, L., *et al.* **Trastuzumab containing regimens for early breast cancer.** *Cochrane Database Syst. Rev.* v. 4, CD006243, 2012.

MUHAMMAD, W. S.; IMRAN, A. P. S.; MUHAMMAD, A. S. **Management of ascites due to gastrointestinal malignancy.** *Annals of Saudi Medicine*, v. 29, n. 5, p. 369-377, 2009

NAGAYO, T. **Precursors of human gastric cancer: their frequencies and histological characteristics.** In: *Proceedings Of The 7th International Symposium Of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo.* Baltimore: University Park Press, 1977. p. 151–161.

NAGINI, S. **Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention.** *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, v. 4, n. 7, p. 156–169, 2012.

NAKAMURA, T. *et al.* **A clinicopathological study in young patients with gastric carcinoma.** *Journal of Surgical Oncology*, v. 71, n. 4, p. 214–219, 1999.

NIELSEN, D. L.; ANDERSSON, M.; KAMBY, C. **HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors.** Cancer Treatment Reviews, v. 35, n. 2, p. 121–136, abr. 2009.

ODA, K. *et al.* **A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling.** Molecular Systems Biology, v. 1, p. 2005.0010, 2005.

OH, D.Y. *et al.* **Aphase II open-label trial of dacomitinib monotherapy in patients with HER2-positive advanced gastric after failure of at least one prior chemotherapy regimen.** Journal of Clinical Oncology, v. 30, suppl. 4, abst. 54, 2012.

OHMAN, U.; WETTERFORS, J.; MOBERG, A. **Histologic grading of gastric cancer.** Acta Chirurgica Scandinavica, v. 138, n. 4, p. 384–390, 1972.

OHTSU, A. *et al.* **Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study.** Journal of Clinical Oncology, v. 29, p. 3968-3976, 2011.

PARK, D. I., *et al.* **HER-2/neuamplification is an independent prognostic factor in gastric cancer.** Digestive Diseases and Science, v. 51, p. 1371-1379, 2006.

PARK, J. C. *et al.* **Clinicopathological Aspects and Prognostic Value With Respect to Age : An Analysis of 3.362 Consecutive Gastric Cancer Patients.** Journal of Surgical Oncology, v. 99, p. 395–401, 2009.

PICCART-GEBBART, M. J. *et al.* **Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team, et al.** Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. N. Engl. J. Med., v. 353, p. 1659-1672, 2005.

PIERRE, J., OTT, M. **Gastric Cancer**. In: CAMERON, J. (Ed.). *Current Surgical Therapy*. 7th. ed. St. Louis: Mosby, p. 105–112, 2001.

PRAT, A., BASELGA, J. **The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2**. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, v. 5, p. 531-542, 2008.

PUGLISI, F. *et al.* **Current challenges in HER2-positive breast cancer**. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. v. 98; p. 211-221, 2016.

RAKHA, E.A., *et al.* **Update UK Recommendations for *HER2* assessment in breast cancer**. *Journal of Clinical Pathology*. 0: p. 1-7, 2014.

RINGERTZ, N. **The pathology of gastric carcinoma**. National Cancer Institute monograph, v. 25, p. 275–285, 1967.

ROSS, J. S., *et al.* **The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine**. *Oncologist*, v.14, p. 320-368, 2009.

RUSCHOFF, J. *et al* **Her2 testing in gastric cancer: a practical approach**. *Modern Pathology*, v. 25, p. 637-650, 2012.

SATOH, T. *et al.* **Interim safety analysis from TYTAN: A phase III Asian study of lapatinib in combination with paclitaxel as second-line therapy in gastric cancer**. *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, suppl: abstract 4057, 2010.

SAITO, H. *et al.* **Prognostic indicators in node-negative advanced gastric cancer patients**. *Journal of Surgical Oncology*, v. 101, n. 7, p. 622-625, 2010.

SANTIBAÑEZ, M., *et al.* **Occupational exposures and risk of stomach cancer by histological type.** Occupational and Environmental Medicine, v. 69, n. 4, p. 268–275, 1 abr. 2012.

SARBIA, M.; BECKER, K. F.; HÖFLER, H. **Pathology of upper gastrointestinal malignancies.** Seminars in Oncology. Annals. 2004

SARDARI, Y *et al.* **HER2/neu expressioni head and neck squamous cell carcinoma patients is not significantly elevated.** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 13, p. 2891-2896, 2012.

SASTRE, J. *et al.* **Chemotherapy for gastric cancer.** World Journal of Gastroenterology, v. 12, n. 2, p. 204–213, 2006.

SCHAFFER, L. W., *et al.* **The Risk of Gastric Carcinoma after Surgical Treatment for Benign Ulcer Disease — A Population-Based Study in Olmsted County, Minnesota.** The New England Journal of Medicine, v. 309, p. 1210–1213, 1983.

SCHARSCHMIDT, B. F. **The natural history of hypertrophic gastrophy (Menetrier's disease). Report of a case with 16 year follow-up and review of 120 cases from the literature.** The American Journal of Medicine, v. 63, n. 4, p. 644–652, 1977.

SEBASTIAN, S. *et al.*, **The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1766, n. 1, p. 120-139, 2006.

SEQUIST, L. V., *et al.* **Novel Agents in theT reatment of Lung Cancer : Advances in EGFR-T argeted Agents Epidermal Growth Factor Receptor**

Mutation Testing in the Care of Lung Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, v. 12, n. 14, p. 4403–4409, 2006.

SGAMBATO A. *et al.* **Cetuximab in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): the showdown?** *J Thorac Dis.* v. 6, n.6, p. 578-580, 2014.

SHEN, I. *et al.*, **Bevacizumab plus capecitabine and cisplatin in Chinese patients with inoperable locally advanced or metastatic gastric or gastroesophageal junction cancer: randomized, double-blind, phase III study (AVATAR study).** *Gastric Cancer*, v. 18, p. 168-176, 2015.

SHIKATA, K., *et al.* **A prospective study of dietary salt intake and gastric cancer incidence in a defined Japanese population: The Hisayama study.** *International Journal of Cancer*, v. 119, p. 196–201, 2006.

SHIMIZU, N., *et al.* **Genetics of cell surface receptors for bioactive polypeptides: Binding of epidermal growth factor is associated with the presence of human chromosome 7 in human-mouse cell hybrids.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 77, n.6, p. 3600-3604, 1980.

SHOHEEN, N. J.; RICHTER, J. E. **Barrett's oesophagus.** *Lancet*, v. 373, n. 9666, p. 850-861, 2009.

SIEWERT, J. R.; STEIN, H. J. **Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction.** *British Journal of Surgery*, v. 85, n. 11, p. 1457–1459, 1998.

SIURALA, M.; LEHTOLA, J.; IHAMAKI, T. **Atrophic gastritis and its sequelae.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 9, n. 5, p. 441–446, 1974.

SJÖDAHL, K., *et al.* **Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study.** International journal of Cancer. Journal International du Cancer, v. 120, n. 1, p. 128–132, 2006.

SLAMON, D. J. *et al.* **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/ neu oncogene.** Science, v. 235:177-182, 1987.

SLAMON, D. J. *et al.* **Use of chemotherapy plus monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.** N. Engl. J. Med., v. 344, p. 783-792, 2001.

SLAMON, D. J. *et al.* **Breast Cancer International Research Group, *et al.* Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer.** N. Engl. J. Med., v. 365, p. 1273-1283, 2011.

SMILEK, P. *et al.* **Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and mutations in the EGFR signaling pathway in correlation with anti-EGFR therapy in head and neck squamous cell carcinomas.** Neoplasma, v. 59, n. 5, p. 508-515, 2012.

SOBIN, L. H.; COMPTON, C. C. **TNM Seventh Edition : What ' s New, What ' s Changed.** Cancer, v. 116, n. 22, p. 5336–5339, 2010.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **Internacional Union Against Cancer.** In: TNM Classification of Malignant Tumors. Wiley, New York: [s.n.], 2002.

SONG, H. S. *et al.* **Prognostic significance of immunohistochemical expression of EGFR and C-erbB-2 oncoprotein in curatively resected gastric cancer.** Cancer Research and Treatment, v. 36, p. 240-245, 2004.

STENGER, M. **Addition of cetuximab to concurrent chemoradiation in esophageal cancer.** The ASCO post, <http://www.ascopost.com/News/57849>, 2017.

STRAIF, K., *et al.* **Exposure to Nitrosamines, Carbon Black, Asbestos, and Talc and Mortality from Stomach, Lung, and Laryngeal Cancer in a Cohort of Rubber Workers.** American Journal of Epidemiology, v. 152, n. 4, p. 297–306, 2000.

STRONG, V., *et al.* **Comparison of gastric cancer survival following R0 resection in the United States and Korea using an internationally validated monogram.** Annals of Surgery, v. 251, n. 4, p. 640–646, 2010.

SUH, Y. *et al.* **Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer.** Cell Death and Disease, v. 5, p. 1-9, 2013.

SUZUKI, H., *et al.* **Nitrate and nitrosative chemistry within Barrett's oesophagus during acid reflux.** Gut, v. 54, n. 11, p. 1527–1535, 2005.

TABERNERO, J. *et al.* **Pertuzumab (P) with trastuzumab (T) and chemotherapy (CTX) in patients (pt) with HER2- positive metastatic gastric or gastroesophageal junction (GEJ) cancer: An international phase III study (JACOB).** Journal of Clinical Oncology, v. 31, abstract TPS4150, 2013.

TAGUCHI, T. *et al.* **Involvement of EGFR in the response of squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines to gefitinib.** Oncology reports, v.19, n. 1, p. 65-71, 2008.

TEMAM, S. *et al.* **Epidermal growth factor receptor copy numbers alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer.** Journal of Clinical Oncology, v. 25, p. 2164-2170, 2007.

THE INTERNATIONAL GASTRIC CANCER ASSOCIATION AND THE JAPANESE GASTRIC CANCER ASSOCIATION. **The Classification of Gastric Carcinoma.** Third edition, English edition. Gastric Cancer, n. 14, p. 101-112, 2011.

THERKILDSEN, C. *et al.* **The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis.** Acta Oncologica, v. 53, n. 7, p.852-864, 2014.

THEUER, C. P., *et al.* **Gastric adenocarcinoma in patients 40 years of age or younger.** American Journal of Surgery, v. 172, n. 5, p. 473–477, 1996.

TIAN, X. *et al.* **Cetuximab in patients with esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.** Med oncol, v. 32, n. 127, p. 1-10, 2015.

TOFTGAARD, C. **Gastric Cancer After Peptic Ulcer Surgery A Historic Prospective Cohort Investigation.** Annals of Surgery, v. 210, n. 2, p. 159–164, 1989.

TRAMACERE, I., *et al.* **A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk.** Annals of Oncology, v. 23, p. 28-36, 2012

VELMURUGAN, B.; MANI, A.; NAGINI, S. **Combination of S-allylcysteine and lycopene induces apoptosis by modulating Bcl-2, Bax, Bim and caspases during experimental gastric carcinogenesis.** European Journal of Cancer prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organization (ECP), v. 14, n. 4, p. 387–393, 2005.

WADDELL, T. *et al.* **Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without panitumumab for patients with previously untreated advanced**

oesophagogastric cancer (EAL 3): a randomized, open-label phase 3 trial. The Lancet Oncology, v. 14, p. 481-489, 2013.

WALTHER, A. *et al.* **Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer.** Nature reviews Cancer, v. 9, n. 7, p. 489-499, 2009.

WANG, S. *et al* **Effect of HER-2/neu over-expression on prognosis in gastric cancer: a meta-analysis.** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 12, n. 6, p. 1417-1423, 2011.

WANG, W. *et al.* **Prognosis of 980 patients with gastric cancer after surgical resection.** Chinese Journal of Cancer, v. 29, n. 11, p. 923-930, 2010.

WEI, Q *et al.* **EGFR, HER2 and HER3 expression in laryngeal primary tumors and corresponding metastases.** Annals of Surgical Oncology, v. 15, p. 1193-1201, 2008.

WEINSTEIN, I. B.; JOE, A. K. **Mechanisms of Disease: oncogene addiction - a rationale for molecular targeting inc cancer therapy.** Nature, v. 3, n. 8, p. 448-457, 2006.

WHITEMAN, D. C. *et al* **Combined effects of obesity, acid reflux and smoking on the risk of adenocarcinomas of the oesophagus.** Gut, v. 57, n. 2, p. 173-180, 2008.

WOGAN, G. N., *et al.* **Environmental and chemical carcinogenesis.** Seminars in Cancer Biology, v. 14, n. 6, p. 473–486, 2004.

WOLFF, A. C., *et al.* **American Society of Clinical Oncology/ College of american Pathologist guideline recomendations for human epidermal growth**

factor receptor 2 testing in breast cancer. Journal of Clinical Oncology, v. 25, p. 118-145, 2007.

WOLFF, A. *et al.* **Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist clinical practice guideline update.** Journal of Clinical Oncology, v. 31, p. 3997-4013, 2013.

WORLD CANCER RESEARCH FUND/; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective.** Cancer Research. Annals. Washington, DC: American Institute for Cancer Research, 2007

WROBLEWSKI, L. E., *et al.* **Helicobacter pylori dysregulation of gastric epithelial tight junctions by urease-mediated myosin II activation.** Gastroenterology, v. 136, n. 1, p. 236–46, 2009.

XU, D., *et al.* **Positive Lymph Node Ratio Is an Independent Prognostic Factor in Gastric Cancer After D2 Resection Regardless of the Examined Number of Lymph Nodes.** Annals of Surgical Oncology, v. 16, n. 2, p. 319–326, 2009.

YADA, T.; YOKOI, C.; UEMURA, N. **The current state of diagnosis and treatment for early gastric cancer.** Diagnostic and Therapeutic Endoscopy, v. 2013, p. 1-9, 2013.

YAMASHITA-KASHIMA, Y. *et al.* **Enhanced antitumor activity of trastuzumab emtansine (T-DM1) in combination with pertuzumab in a HER2-positive gastric cancer model.** Oncology Reports, v. 30, p. 1087-1093, 2013.

YANG, X. J. *et al.* **Cytoreductive surgery and hypertermic intraperitoneal chemotherapy improves survival of patients with peritoneal carcinomatosis**

from gastric cancer: final results of phase III randomized clinical trial. *Annals of Surgical Oncology*, v. 18, p. 1575-1581, 2011.

YANG, Z.Y. *et al.* **Promising biomarkers for predicting the outcomes of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: a systematic review with meta-analysis.** *International Journal of Cancer*, v. 133, n. 8, p. 1914-1925, 2013.

YARDEN, Y. **The EGFR family and its ligands in human cancer : signalling mechanisms and therapeutic opportunities.** *European Journal of Cancer*, v. 4, n. 37, p. 3–8, 2001.

YEOLE, B. B. **Trends in cancer incidence in esophagus, stomach, colon, rectum and liver in males in India.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 9, n. 1, p. 97–100, 2008.

YOKOTA, T., *et al.* **Significant prognostic factors in patients with node-negative gastric cancer.** *International Surgery*, v. 84, n. 4, p. 331–336, 1999.

YOKOTA, T., *et al.* **Significant prognostic factors in patients with early gastric cancer.** *International Surgery*, v. 85, n. 4, p. 286–290, 2000.

YONEMURA, Y. *et al.*, **A possible role of cytokines in the formation of peritoneal dissemination.** *Internacional Journal of Oncology*, v. 11, p. 349-358, 1998.

YOSHIKAWA, K.; MARUYAMA, K. **Characteristics of Gastric Cancer Invading to the Proper Muscle Layer—with Special Reference to Mortality and Cause of Death—.** *Japanese Journal of Clinical Oncology*, v. 15 , n. 3 , p. 499–503, 1985.

ZARIDZE, D., *et al.* **Alcohol consumption, smoking and risk of gastric cancer: case-control study from Moscow, Russia.** *Cancer Causes and Control*, v. 11, n. 4, p. 363–371, 2000.

ZHANG, X., *et al.* **Surgical treatment and prognosis of gastric cancer in 2 613 patients.** *World Journal of Gastroenterology*, v. 10, n. 23, p. 3405–3408, 2004.

8. ANEXOS

Anexo 1



Memo 68/15-CEP-INCA



Rio de Janeiro, 10 de agosto de 2015.

A(o): Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP n° 134/11: (Este n° deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Título do estudo: Análise de biomarcadores preditivos de resposta terapêutica em tumores gastrointestinais

CAAE: 0111.0.007.000-11

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer analisou e aprovou o estudo intitulado “Análise de biomarcadores preditivos de resposta terapêutica em tumores gastrointestinais”, em 30 de novembro de 2011.

Conforme Memo 200/14 datado de 13/05/14 ratificamos o disposto na Resolução CNS 466/2012. Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais (apresentado durante a pesquisa demonstrando fatos relevantes e resultados parciais de seu desenvolvimento) e final (apresentado após o encerramento da pesquisa).

Assim, para o acompanhamento do desenvolvimento dos projetos, solicitamos que o(a) pesquisador(a) providencie o mais breve possível os relatórios aqui solicitados.

Atenciosamente,

Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

Anexo 2

FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS ADENOCARCINOMA GÁSTRICO (Versão 22setembro2014)	
Responsável pela coleta dos dados: _____ Data da coleta: ____/____/____	
Numero do paciente: _____	
Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Nº do Prontuário: _____	
DADOS REFERENTES À ABERTURA DA MATRÍCULA HOSPITALAR	
Data da matrícula: ____/____/____	
Sexo	(1) Masculino (2) Feminino
Cor da pele	(1) Branco (2) Negro (3) Pardo (4) Amarelo (5) Vermelho
Escolaridade:	(1) Analfabeto (2) 1º grau incompleto (3) 1º grau completo (4) 2º grau incompleto (5) 2º grau completo (6) superior incompleto (7) superior completo (8) Pós-Graduação
Estado civil	(1) Casado (2) União estável (3) Solteiro (4) Desquitado/Separado (5) Viúvo
COLETA DE INFORMAÇÕES NAS EVOLUÇÕES HOSPITALARES	
Etilismo	(0) não (1) sim (2) ex-etilista (9) Não informado
Detalhamento relatado em prontuário: _____ _____ _____	
Tabagismo	(0) não (1) sim (2) ex-tabagista (9) Não informado
Detalhamento relatado em prontuário: _____ _____ _____	

História Familiar de Câncer		(0) não	(1) sim	(9) Não informado
Detalhamento relatado em prontuário:				

Performance Status (PS - ECOG) na primeira consulta:				
(1) Sintomas da doença, mas deambula e leva seu dia a dia normal				
(2) Fora do leito mais de 50% do tempo				
(3) No leito mais de 50% do tempo, carente de cuidados mais intensivos				
(4) Preso no leito				
Comorbidades (Escala de comorbidades de Charlson)				
Infarto do miocárdio	(0) Não	(1) Sim	Hemiplegia ou paraplegia	(0) Não (1) Sim
Doença coronariana	(0) Não	(1) Sim	Doença renal moderada ou severa	(0) Não (1) Sim
Doença vascular periférica	(0) Não	(1) Sim	Tumor sem metástase (excluir se >5 anos desde o diagnóstico)	(0) Não (1) Sim
Doença cerebrovascular	(0) Não	(1) Sim	Leucemia (aguda ou crônica)	(0) Não (1) Sim
Demência	(0) Não	(1) Sim	Linfoma	(0) Não (1) Sim
Doença Pulmonar Crônica	(0) Não	(1) Sim	Doença hepática moderada ou severa	(0) Não (1) Sim
Doença do tecido conjuntivo	(0) Não	(1) Sim	Tumor sólido com metástase	(0) Não (1) Sim
Úlcera péptica	(0) Não	(1) Sim	SIDA (AIDS)	(0) Não (1) Sim
Hepatopatia leve (ou crônica)	(0) Não	(1) Sim	Hipertensão Arterial Sistêmica	(0) Não (1) Sim
Diabetes sem complicações	(0) Não	(1) Sim	Outras (Descrever):	
Diabetes com complicações (retinopatia ou nefropatia)	(0) Não	(1) Sim		
INFORMAÇÕES DA BIÓPSIA (DIAGNÓSTICO)				

Data da confirmação diagnóstica de câncer (BPO): _____ / _____ / _____
Diagnóstico da biópsia (Nº do Exame: _____) (1) Adenocarcinoma bem diferenciado (2) Adenocarcinoma moderadamente diferenciado (3) Adenocarcinoma pouco diferenciado (com células em anel de sinete) (4) Adenocarcinoma pouco diferenciado (sem células em anel de sinete) (5) Carcinoma mucinoso (6) Outros: _____ _____
Estadiamento clínico (cTNM): (1)IA (2)IB (3)IIA (4)IIB (5)IIIA (6)IIIB (7)IIIC (8)IV (9) Sem Informação
Presença de metástases: (0)M0 (1)M1 Local: _____
Localização do tumor (EDA): (1) JEG (junção esôfago gástrica) (2) Fundo gástrico (3) Corpo gástrico (4) Antro gástrico / piloro
INFORMAÇÕES DO TRATAMENTO
Data do início do primeiro tratamento: _____ / _____ / _____
Tratamento inicial: (1)Cirurgia (2)Radioterapia (3)QT neo-adjuvante (4)QT paliativa (4) Suporte clínico
Data da cirurgia: _____ / _____ / _____
Tipo de cirurgia: (1)Gastrectomia total (2)Gastrectomia parcial (3) Esofagogastrectomia proximal (4) Outra _____ _____
Classificação da cirurgia: (0)R0 (1)R1 (2)R2 (9)Não informado
DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO DO ESPÉCIME CIRÚRGICO (Nº do Exame: _____)
Tipo Histológico e Grau histológico: (1) Adenocarcinoma bem diferenciado (2) Adenocarcinoma moderadamente diferenciado (3) Adenocarcinoma pouco diferenciado (com células em anel de sinete) (4) Adenocarcinoma pouco diferenciado (sem células em anel de sinete) (5) Carcinoma mucinoso (6) Outros: _____ _____

Classificação de Lauren: (1) tipo intestinal (2) tipo difuso (3) misto
Localização do tumor (peça cirúrgica): (1) JEG (junção esôfago gástrica) (2) Fundo gástrico (3) Corpo gástrico (4) Antro gástrico / piloro (5) Dois terços do estômago (6) Três terços do estômago
Forma do Tumor: (1) Borrmann I (2) Borrmann II (3) Borrmann III (4) Borrmann IV (5) Borrmann V (6) Superficial (especificar): _____
Medida do tumor: _____
Invasão: Linfática (0) não (1) sim Vascular hematogênica (0) não (1) sim Perineural (neural) (0) não (1) sim
Tipo de infiltrado peritumoral (intratumoral): (1) Linfoplasmocitário (2) Neutrófilico: (3) Eosinofílico (4) Misto (especificar): _____
Desmoplasia (0) ausente (1) leve (2) moderada (3) acentuada
Nível de infiltração do tumor primário: (0) TIS (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4a (5) T4b (9) Sem Informação
Numero de linfonodos retirados: _____ Numero de linfonodos positivos: _____
Linfonodos regionais: (0) N0 (1) N1 (2) N2 (3) N3 (9) Sem Informação
Limites cirúrgicos: Proximal: (1) Livre (2) Comprometido Distal: (1) Livre (2) Comprometido
Estadiamento patológico (pTNM) estômago: (1) IA (2) IB (3) IIA (4) IIB (5) IIIA (6) IIIB (7) IIIC (8) IV (9) Sem Informação
Estadiamento patológico (pTNM) esôfago: (1) IA (2) IB (3) IIA (4) IIB (5) IIIA (6) IIIB (7) IIIC (8) IV (9) Sem Informação
Lesões associadas: Gastrite crônica (0) Ausente (1) Leve (2) Moderada (3) Acentuada Atrofia glandular (0) Ausente (1) Leve (2) Moderada (3) Acentuada Metaplasia intestinal (0) Ausente (1) Completa focal (2) Completa multi* (3)) Incompleta focal (4) Incompleta multi* Agregados linfóides (0) Ausente (1) Presente Folículos linfóides: (0) Ausente (1) Presente Alterações regenerativas: (0) Ausente (1) Presente Pólipo hiperplásico: (0) Ausente (1) Presente

<p>Cistos de glândulas: (0) Ausente (1) Presente *multifocal</p> <p>Adenoma:</p> <hr/> <hr/> <p>Outras:</p> <hr/> <hr/>
<p>Helicobacter pylori: (0) não (1) sim</p>
<p>Avaliação do HER2 (Imuno-histoquímica) (0) Negativo (1) 1+ (2) 2+ (3) 3+</p>
<p>Avaliação do HER2 (FISH x SISH): Amplificado: (0) não (1) sim</p>
<p>EVOLUÇÃO (SEGUIMENTO)</p>
<p>Recidiva de doença (0) Não (1) Sim Local da recidiva: _____ Data da recidiva: ____/____/____</p>
<p>Metástase (0) Não (1) Sim Local da meta: _____ Data da meta: ____/____/____</p>
<p>Óbito (0) Não (1) Sim, por câncer primário (2) Óbito outras causas (4) Óbito sem informação da causa Data do Óbito: ____/____/____</p>
<p>Última consulta no INCA Data: ____/____/____ Status: (1) Vivo com câncer (2) Vivo sem câncer (9) Sem informação</p>

Anexo 3

Distribuição das frequências etio-epidemiológicas e clínicas

Variavel	Frequencia	(%)
Gênero		
Masculino	155	57,4%
Feminino	115	42,6%
Total	270	100,0%
Cor da Pele		
Branco	182	57,4%
Não-Branco	88	32,6%
Total	270	100,0%
Escolaridade		
Alta	192	71,1%
Baixa	78	28,9%
Total	270	100,0%
Estado Civil		
Com companheiro	179	66,3%
Sem companheiro	91	33,7%
Total	270	100,0%
Etilismo		
Não	138	51,1%
Sim/Ex	119	44,1%
Sem Informação	13	4,8%
Total	270	100,0%
Tabagismo		
Não	109	40,4%
Sim/Ex	153	56,7%
Sem Informação	8	3,0%
Total	270	100,0%
Histórico Familiar de Câncer		
Não	127	47,0%
Sim	113	41,9%
Não Informado	30	11,1%
Total	270	100,0%
Performance Status		
0	2	7,0%
1	240	88,9%
2	22	8,1%
3	6	2,2%
Total	270	100,0%

Anexo 4

Distribuição das frequências de comorbidades 1.

Variavel	Frequencia	(%)
Infarto		
Não	269	99,6%
Sim	1	4,0%
Total	270	100,0%
Doença Coronariana		
Não	270	100,0%
Doença Cerebrovascular		
Não	269	99,6%
Sim	1	4,0%
Total	270	100,0%
Demência		
Não	270	100,0%
Doença Pulmonar Crônica		
Não	265	98,1%
Sim	5	1,9%
Total	270	100,0%
Doença do Tecido Conjuntivo		
Não	270	100,0%
Úlcera Péptica		
Não	265	98,1%
Sim	5	1,9%
Total	270	100,0%
Hepatopatia Leve		
Não	267	98,9%
Sim	3	1,1%
Total	270	100,0%
Diabetes sem Complicações		
Não	244	90,4%
Sim	26	9,6%
Total	270	100,0%
Diabetes com Complicações		
Não	270	100,0%

Anexo 5

Distribuição das frequências de comorbidades 2.

Variavel	Frequencia	(%)
Hemiplegia ou Paraplegia		
Não	270	100,0%
Doença Renal		
Não	270	100,0%
Tumor sem Metástase		
Não	76	28,1%
Sim	194	71,9%
Total	270	100,0%
Leucemia		
Não	270	100,0%
Linfoma		
Não	270	100,0%
Doença Hepática		
Não	270	100,0%
Tumor com Metástase		
Não	194	71,9%
Sim	76	28,1%
Total	270	100,0%
SIDA		
Não	269	99,6%
Sim	1	4,0%
Total	270	100,0%
Sistêmica		
Não	190	70,4%
Sim	80	29,6%
Total	270	100,0%

Anexo 6

Distribuição das frequências clinicomorfológicas

Variavel	Frequencia	(%)
Local da biópsia		
JEG	44	16,3%
Fundo	18	6,7%
Corpo	45	16,7%
Antro/Piloro	163	60,4%
Total	270	100,0%
Diagnóstico da Biópsia		
ABD	10	3,7%
AMD	111	41,1%
APD com células em anel de sinete	78	28,9%
APD sem células em anel de sinete	48	17,8%
Outros	4	1,5%
Adenocarcinoma	15	5,6%
Não tem bx	4	1,5%
Total	270	100,0%
Local do tumor na peça cirúrgica		
JEG	43	15,9%
Fundo	11	4,1%
Corpo	42	15,6%
Antro/Piloro	117	43,3%
Dois terços do estômago	45	16,7%
Três terços do estômago	12	4,4%
Total	270	100,0%
Forma do Tumor		
Borrmann 1	10	3,7%
Borrmann 2	63	23,3%
Borrmann 3	105	38,9%
Borrmann 4	21	7,8%
Borrmann 5	9	3,3%
Superficial	62	23,0%
Total	270	100,0%
Forma - 2 categorias		
Superficial	62	23,0%
Avançado	208	77,0%
Total	270	100,0%
Medida do Tumor		
< que 5,0 cm	89	33,0%
>/= que 5,0 cm	181	67,0%
Total	270	100,0%

Obs.: JEG: junção esofagogástrica; ABD: adenocarcinoma bem diferenciado; AMD: adenocarcinoma moderadamente diferenciado; APD: adenocarcinoma pouco diferenciado.

Anexo 7

Distribuição das frequências histopatológicas

Variavel	Frequencia	(%)
Diagnóstico da Peça		
ABD	6	2,2%
AMD	116	43,0%
APD com células em anel de sinete	68	25,2%
APD sem células em anel de sinete	77	28,5%
Outros	3	1,1%
Total	270	100,0%
Diagnóstico Alto/Baixo		
Baixo grau	122	45,2%
Alto grau	148	54,8%
Total	270	100,0%
Classificação de Lauren		
Intestinal	115	42,6%
Difuso	107	39,6%
Misto	48	17,8%
Total	270	100,0%
Invasão Linfática		
Não	134	49,6%
Sim	136	50,4%
Total	270	100,0%
Invasão Vascular		
Não	242	89,6%
Sim	28	10,4%
Total	270	100,0%
Invasão Perineural		
Não	117	43,3%
Sim	153	56,7%
Total	270	100,0%
Infiltrado Peritumoral		
Linfoplasmocitário	210	77,8%
Misto	60	22,2%
Total	270	100,0%
Desmoplasia		
Ausente	22	8,1%
Leve	110	40,7%
Moderada	81	30,0%
Acentuada	57	21,1%
Total	270	100,0%

Obs.: ABD: adenocarcinoma bem diferenciado; AMD: adenocarcinoma moderadamente diferenciado; APD: adenocarcinoma pouco diferenciado; alto grau: adenocarcinomas pouco diferenciados e mucinoso; baixo grau: adenocarcinomas bem diferenciados e moderadamente diferenciados.

Anexo 8

Distribuição das frequências dos tipos de cirurgias e dos limites cirúrgicos

Variavel	Frequencia	(%)
Tipo da Cirurgia		
Gastrectomia Total	90	33,3%
Gastrectomia Parcial	164	60,7%
Esofagogastrectomia	16	5,9%
Total	270	100,0%
Classificação da Cirúrgica		
R0	223	82,6%
R1	6	2,2%
R2	8	3,0%
Não Informado	33	12,2%
Total	270	100,0%
Limite Cirúrgico Proximal		
Livre	262	97,0%
Comprometido	8	3,0%
Total	270	100,0%
Limite Cirúrgico Distal		
Livre	264	97,8%
Comprometido	6	2,2%
Total	270	100,0%
Limites Cirúrgicos		
Livre	257	95,2%
Comprometido – 1 limite	12	4,4%
Comprometido – 2 limites	1	4,0%
Total	270	100,0%
Limites Cirúrgicos		
Comprometido	13	4,8%
Livre	257	95,2%
Total	270	100,0%

Anexo 9

Distribuição das frequências dos linfonodos isolados e das metástases à distância

Variavel	Frequencia	(%)
Linfonodos Isolados		
Positivo	161	59,6%
Negativo	109	40,4%
Total	270	100,0%
Metástase a distância		
Sim	76	28,1%
Não	194	71,9%
Total	270	100,0%

Anexo 10

Distribuição das frequências da localização das metástases à distância

Variavel	Frequencia	(%)
Local da Metástase		
Bexiga	1	1,3%
Bursa Omental	1	1,3%
Cabeça de Pâncreas	2	2,6%
Cérebro	1	1,3%
Cisto no Rim	1	1,3%
Duodeno	1	1,3%
Entre bexiga e reto	1	1,3%
Epigastrio	1	1,3%
Fígado	26	34,2%
Fígado, baço e Pâncreas	1	1,3%
Flanco	1	1,3%
Hilo hepático e loja pancreática	1	1,3%
Íleo e Colon	1	1,3%
Int estino Delgado e Ovário E	1	1,3%
Jejuno	4	5,3%
Linf onodo da Cabeça do Pâncreas	1	1,3%
Linfonodo Supraclavicular	1	1,3%
Linfonodo Axilar	1	1,3%
Linfonodo Cervical	1	1,3%
Linfonodo Mediastino	1	1,3%
Linfonodo Para-aortico	1	1,3%
Linfonodo Pre-aortico	1	1,3%
Linfonodo Supraclavicular	2	2,6%
Líquido de ascite	1	1,3%
Mama e Fígado	1	1,3%
Ovário	2	2,6%
Pâncreas	1	1,3%
Pâncreas e Peritônio	1	1,3%
Parede Abdominal	2	2,6%
Pelve	1	1,3%
Peritônio	4	5,3%
Peritônio e Fígado	1	1,3%
Pleura	2	2,6%
Pleura visceral	1	1,3%
Pseudo rim	1	1,3%
Pulmão	2	2,6%
Região Retrocaval	1	1,3%
Região Torácica	1	1,3%
Reto	1	1,3%
Total	76	100%

Anexo 11

Distribuição das frequências da Classificação Patológica (TNM)

Variavel	Frequencia	(%)
Nível de Infiltração		
T1	49	18,1%
T2	23	8,5%
T3	31	11,5%
T4a	162	60,0%
T4b	5	1,9%
Total	270	100,0%
Linfonodos Comprometidos		
N0	110	40,7%
N1	35	13,0%
N2	44	16,3%
N3	81	30,0%
Total	270	100,0%
Estadiamento TNM		
IA	41	15,2%
IB	20	7,4%
IIA	18	6,7%
IIB	35	13,0%
IIIA	21	7,8%
IIIB	23	8,5%
IIIC	36	13,3%
Total	270	100,0%
TNM Avançado x Superficial		
Avançado	229	84,8%
Superficial	41	15,2%
Total	270	100,0%
TNM Metastático		
Metastático	76	28,1%
Outros	194	71,9%
Total	270	100,0%
TNM 3 categorias		
Metastático	76	28,1%
Outros	153	56,7%
Superficial	41	15,2%
Total	270	100,0%

Anexo 12

Distribuição das frequências das lesões associadas na mucosa não tumoral

- 1

Variavel	Frequencia	(%)
Gastrite Crônica		
Ausente	1	4,0%
Leve	50	18,5%
Moderada	131	48,5%
Acentuada	88	32,6%
Total	270	100,0%
Atrofia Glandular		
Ausente	32	11,9%
Leve	73	27,0%
Moderada	88	32,6%
Acentuada	77	28,5%
Total	270	100,0%
Metaplasia Intestinal		
Ausente	55	20,4%
Completa Focal	31	11,5%
Completa Multifocal	115	42,6%
Incompleta Focal	44	16,3%
Incompleta Multifocal	25	9,3%
Total	270	100,0%
Agregado Linfoide		
Ausente	30	11,1%
Presente	240	88,9%
Total	270	100,0%
Folículo Linfoide		
Ausente	48	17,8%
Presente	222	82,2%
Total	270	100,0%
Alteração Regenerativa		
Ausente	266	98,5%
Presente	4	1,5%
Total	270	100,0%

Anexo 13

Distribuição das frequências das lesões associadas na mucosa não tumoral - 2 e da infecção pelo *Helicobacter pylori*

Variavel	Frequencia	(%)
Pólipo Hiperplásico		
Ausente	256	94,8%
Presente	14	5,2%
Total	270	100,0%
Cistos de Glândulas		
Ausente	232	85,9%
Presente	38	14,1%
Total	270	100,0%
Helicobacter pylori		
Negativo	127	47,0%
Positivo	141	52,2%
Não testado	2	7,0%
Total	270	100,0%

Anexo 14

Distribuição das frequências da evolução clínica dos pacientes

Variavel	Frequencia	Porcentagem (%)
Recidiva		
Não	163	60,4%
Sim	107	39,6%
Total	270	100,0%
Óbito e Causas		
Não óbito	92	34,1%
Sim por câncer	107	39,6%
Sim outras causas	37	13,7%
Sim sem informação	34	12,6%
Total	270	100,0%
Óbito - Sim/Não		
Não	92	34,1%
Sim	178	65,9
Total	270	100,0%

O48v Oliveira, Ivanir Martins de.

Valor prognóstico da superexpressão de HER2 nos adenocarcinomas gástrico e da junção esofagogástrica / Ivanir Martins de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2018. 170 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018.

Orientador: Luis Felipe Ribeiro Pinto.

Co-orientador: Leila Maria Cardão Chimelli.

1. Neoplasias Gástricas. 2. Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico Tipo 2. 3. Junção Esofagogástrica. 4. Prognóstico. I. Pinto, Luis Felipe Ribeiro (Orient.). II. Chimelli, Leila Maria Cardão (Co-orient). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99433