João Diogo Barros Silva

Relevância da sobre-expressão e da amplificação do gene *ERBB2* no adenocarcinoma gástrico

Porto

2007

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE MESTRE APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Artigo 48º, parágrafo 3:
A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação
(Regulamento da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto – Decreto nº19337, 29 de Janeiro de 1931)

Agradecimentos

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Manuel Sobrinho Simões, Director do IPATIMUP e presidente da comissão coordenadora do Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular, assim como a todos os Docentes pelo fomento do interesse pela investigação científica.

Ao Prof. Doutor Manuel Teixeira, Director do Serviço de Genética e do Centro de Investigação do IPO-Porto, pelo rigor científico, disponibilidade, empenho e sapiência com que orientou todas as fases da dissertação.

Ao Prof. Doutor Carlos Lopes, ao Prof. Doutor Fernando Schmitt e ao Dr. Luis Afonso pela sua colaboração crucial para a concretização deste trabalho e ainda pelas "aulas práticas" de introdução à histologia e patologia gástrica.

Ao Prof. Doutor Mário Dinis pelo acompanhamento do tratamento estatístico dos dados de follow-up, pelo tempo dispendido no ensino da ferramenta de software SPSS e pela boleia à estação de Campanhã.

À Drª Dina Leitão pela contribuição fundamental na parte prática deste trabalho.

A Drª Maria Fragoso, Drª Maria José Bento e ao Prof. Doutor Lúcio Santos pela revisão dos registos clínicos dos pacientes.

À Joana pela competente transmissão de conhecimentos técnicos, pela simpatia e apoio; ao Ricardo pela motivação, apoio técnico e pelos inúmeros conselhos práticos e sugestões que acompanharam não só o trabalho prático como também a redacção da dissertação; à Barbara por todo o apoio e pela boa disposição contagiante e, de um modo geral, a todas as pessoas que constituem o Serviço de Genética do IPO - Porto pela amabilidade com que fui recebido.

Ao Ministério da Saúde, pelo Programa Operacional Saúde – Saúde XXI – que financiou este projecto (nº 1636) e à Liga Portuguesa Contra o Cancro pela bolsa atribuída.

À família pelo apoio incondicional.

Aos amigos que estão longe e aos que estão perto.

À Rita porque está sempre perto...

Índice

Abreviaturas **13**

Resumo **17**

Summary **21**

Introdução **25**

1 – Epidemiologia do adenocarcinoma gástrico 25

1.1 – Dados epidemiológicos de Portugal 25

2 – Etiologia do adenocarcinoma gástrico 26

3 – Classificação histológica do adenocarcinoma gástrico 29

3.1 – Classificação de Láuren 30

3.2 – Classificação de Ming 30

4 – Genética do adenocarcinoma gástrico 31

4.1 – Susceptibilidade genética 31

4.2 – Mecanismos moleculares da carcinogénese gástrica 32

4.2.1 – Oncogenes 34

4.2.2 – Genes supressores tumorais 35

5 – Estadiamento e factores de prognóstico 36

6 – Abordagem terapêutica actual 37

6.1 – Tratamento cirúrgico 38

6.2 – Terapia adjuvante e neo-adjuvante 38

6.3 – Eficácia do tratamento actual 39

7 – Terapia dirigida: Um novo paradigma 39

7.1 – O alvo específico: ERBB2 40

7.2 – O agente terapêutico: Herceptin 40

7.3 – Aplicação em carcinoma da mama 41

7.4 – FISH vs IHC 42

7.5 – Amplificação de *ERBB2* em adenocarcinoma gástrico 43

Objectivos **47**

Índice (cont.)

Material e métodos **51**
1 – Desenho do estudo 51
1.1 – Amostras de tecido tumoral 51
1.2– Dados clínico-patológicos 52
2 – Métodos 53
2.1 – Imunohistoquímica 53
2.2 – Hibridação fluorescente *in situ* 54
2.3 – Análise estatística 55

Resultados **59**
1 – Sobre-expressão de ERBB2 59
2 – Amplificação do gene *ERBB2* 60
3 – Caracterização clínico-patológica dos casos com amplificação do gene *ERBB2* 62
4 – Avaliação da sobrevivência 64

Discussão **71**
1 – Detecção da sobre-expressão e amplificação de *ERBB2* 71
2 – Papel da amplificação do gene *ERBB2* nos vários tipos histológicos de adenocarcinoma gástrico 75
3 – Valor prognóstico da amplificação de *ERRB2* 76
4 – Perspectivas para terapia dirigida a ERBB2 em adenocarcinoma gástrico 79

Conclusão **83**

Referências bibliográficas **87**

Abreviaturas

Lista de abreviaturas

Foram usadas ao longo do texto as seguintes abreviaturas, abaixo ordenadas por ordem alfabética:

ADCC	Antibody dependent cell citotoxicity
AJCC	American joint cancer comitee
APC	Adenomatosis polyposis coli
BAC	Bacterial artificial chromosome
CGH	Hibridação genómica comparativa
LOI	Loss of imprint
EGFR	Epithelial growth factor receptor
EGF	Epithelial growth factor
NRG	Neuroregulin
CAG A	Cytotoxin-associated gene A
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
CEP	Centromere-enumeration probes
DAPI	4'-6'-Diamino-2-phenylindole
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog
ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog2 neuro/glioblastoma derived oncogene homolog
ERBB3	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3
ERBB4	V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4
FDA	Food and Drug Administration
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2
FISH	Hibridação fluorescente *in situ*
HDGC	Carcinoma gástrico difuso hereditário
MSI	Instabilidade de microssatélites
HE	Hematoxilina, eosina
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
IARC	Agência internacional para investigação em cancro

IHC	Imunohistoquímica
IL-1β	Interleucina 1β
kb	Kilobases
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MET	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
MLH1	MutL homolog 1
MSH2	MutS homolog 2
MSH6	MutS homolog 6
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
NaSCN	Tiocianato de sódio
NCOA3	Nuclear receptor coactivator 3
OMS	Organização mundial de saúde
PCR	Polymerase chain reaction
PMS2	PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisae)
RARβ	Retinoic acid receptor, beta
RB1	Retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)
RORENO	Registo oncologico regional do norte
ROS	Reactive oxygen species
MUC1	Mucin 1, cell surface associated
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
SMAD 2	SMAD family member 2
SSC	Saline sodium citrate
T4SS	Type IV secretion system family protein
TGFβ1	Transforming growth factor, beta receptor I
TNM	Tumor, node, metastases (staging system)
TP53	Tumor protein p53 gene
TPR	Translocated promoter region
VAC A	Vacuolating cytotoxin A

Resumo

Resumo

Vários estudos científicos têm observado amplificação e sobre-expressão de ERBB2 em diferentes tumores sólidos, incluíndo adenocarcinomas gástricos. No carcinoma da mama, em particular, a amplificação do gene *ERBB2* está hoje confirmada como um factor independente de prognóstico, preditivo de resposta terapêutica, tendo sido aprovado para estes pacientes um protocolo de terapia dirigida com o anticorpo monoclonal humanizado trastuzumab. No caso dos adenocarcinomas gástricos, no entanto, a relevância clínica da amplificação e sobre-expressão de ERBB2 permanece pouco clara. No presente trabalho avaliámos a presença de alterações no número de cópias e nível de expressão do gene *ERBB2* em 463 carcinomas gástricos, usando as técnicas de imunohistoquímica (IHC) e de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), tendo comparado estes dados com as características clinico-patológicas dos tumores e com a sobrevivência dos pacientes.

Dos 463 carcinomas, 43 (9,3%) apresentaram sobre-expressão de ERBB2 por IHC e 38 (8,2%) apresentaram amplificação do gene *ERBB2* por FISH. Observou-se uma correlação IHC/FISH de 100% nos 19 carcinomas classificados como 0 por IHC (todos negativos por FISH) e também para os 25 carcinomas classificados como 3+ por IHC (todos positivos por FISH). Um dos seis carcinomas classificados como 1+ e 12 dos 18 carcinomas classificados como 2+ foram positivos por FISH. A amplificação do gene *ERBB2* foi mais frequente em carcinomas do tipo intestinal (P=0,004) e com crescimento expansivo (P=0,021). A amplificação do gene *ERBB2* foi associada com uma tendência para pior sobrevivência em pacientes com carcinomas gástricos intestinais (P=0,268), difusos (P=0,062) e pacientes com carcinomas gástricos sem invasão dos gânglios linfáticos (P=0,153). Foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a amplificação do gene *ERBB2* e pior sobrevivência em pacientes com carcinomas gástricos de crescimento expansivo (P=0,014).

Estudos subsequentes são necessários para avaliar se os pacientes de adenocarcinoma gástrico cujos tumores apresentem amplificação do gene *ERBB2* podem beneficiar de terapia dirigida com trastuzumab

Summary

Summary

ERBB2 gene amplification and overexpression of ERBB2 protein have been observed in various solid tumors, including gastric carcinomas. In breast cancer ERBB2 amplification is both prognostic and predictive factor and is also a therapeutic target for the humanized monoclonal antibody trastuzumab. Some authors have evaluated ERBB2 overexpression/amplification in gastric cancer but its clinical significance remains unclear.

In this study we evaluated ERBB2 status in 463 gastric carcinomas using immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. We also compared clinico-pathological characteristics with the presence of *ERBB2* amplification. Additionally, we analysed disease-specific survival in all gastric cancer patients with *ERBB2* amplification and compared with 218 randomly chosen gastric cancer patients without *ERBB2* amplification. Among the 463 cases, 43 (9.3%) showed ERBB2 overexpression by IHC and 38 (8.2%) showed *ERBB2* amplification by FISH. Perfect IHC/FISH correlation was found for 19 cases scored as 0 (all negative by FISH) and also for 25 cases scored as 3+ (all positive by FISH). One out of six carcinomas scored as 1+ and 12 out of 18 carcinomas scored as 2+ were positive by FISH. *ERBB2* gene amplification was common in intestinal carcinomas (P = 0.004) and in expansive carcinomas (P = 0.021). *ERBB2* amplification was associated with a trend towards worse survival for patients with intestinal (P = 0.268), diffuse (P = 0.062) and lymph node negative (P = 0.153) gastric carcinomas. A statistically significant association was found between *ERBB2* amplification and worse survival for expansive gastric carcinoma patients (P = 0.014).

Further studies are warranted to evaluate whether gastric carcinoma patients whose tumors present *ERBB2* amplification may benefit from targeted therapy with trastuzumab.

Introdução

Introdução

1. Epidemiologia do adenocarcinoma gástrico

O adenocarcinoma do estômago é um tumor epitelial maligno da mucosa do estômago. É a segunda causa de morte por cancro, contabilizando 700 000 óbitos anualmente, constituindo um sério problema mundial de saúde pública.[1]

Na segunda metade do século XX ocorreu um decréscimo global acentuado das taxas de incidência e mortalidade do adenocarcinoma gástrico.[2] Apesar deste decréscimo, o cancro gástrico é, em termos mundiais, a quarta neoplasia maligna mais frequente (934 000 novos casos estimados para 2002), ultrapassada apenas por cancro do pulmão, cancro da mama e cancro colo-rectal.[1] As taxas de incidência e mortalidade variam consoante o sexo, sendo que o sexo masculino apresenta taxas de incidência e mortalidade superiores. Com efeito, nos homens o cancro gástrico é, mundialmente, a terceira neoplasia maligna mais frequente (depois de pulmão e próstata) e a segunda causa de morte por cancro. Nas mulheres é a quinta neoplasia maligna mais frequente (depois de mama, colo do útero, intestino e pulmão) e a quarta causa de morte por cancro.[3]

A distribuição geográfica da incidência de adenocarcinoma gástrico apresenta um padrão muito heterogéneo (ver figura 1). As taxas de incidência variam entre os valores baixos registados na América do Norte, no norte e leste de África, Europa do Norte e Oceânia e valores altos registados no Sudoeste da Ásia, Europa de Leste e Sul e América Central e do Sul. As taxas de incidência mais elevadas registam-se no Japão: 69,2 por 100 000 habitantes nos homens e 28,6 por 100 000 habitantes nas mulheres.[4]

1.1. Dados epidemiológicos de Portugal

O adenocarcinoma do estômago consta do grupo de doenças oncológicas com maior incidência em Portugal, em particular na Região Norte. Segundo dados da IARC (www.dep.iarc.fr) para 2002 Portugal é o segundo país com maior taxa de incidência ajustada à idade (padrão mundial) de carcinoma de estômago em homens (27,6 novos casos por 100 000 habitantes) da União Europeia, sendo apenas superado pela Estónia (30,5 novos casos por 100 000 habitantes).

O Registo Oncológico Regional do Norte (RORENO), que tem sede no Instituto Português de Oncologia do Porto, é responsável pelo registo de todos os casos novos diagnosticados na Região Norte. A população do registo oncológico é de cerca de 3 milhões de indivíduos. Os dados do RORENO para 2002 indicam uma taxa de incidência de adenocarcinoma de estômago em homens ajustada à idade de 33,4 novos casos por 100 000 habitantes, sendo portanto a maior taxa de incidência de todos os 27 estados membros.

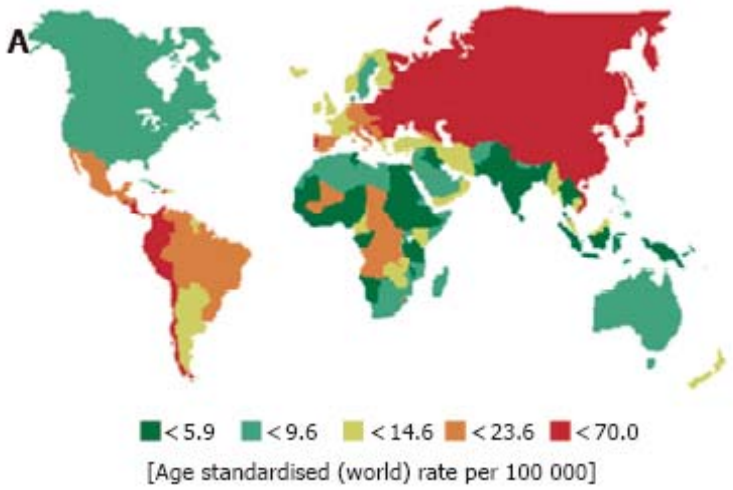

Figura 1: Incidência do carcinoma gástrico em homens. Adaptado de Parkin *et al.*[4]

2. Etiologia do adenocarcinoma gástrico

Os dados actualmente disponíveis que ligam a infecção por *Helycobacter pylori* ao cancro do estômago foram considerados suficientes pela Agência Internacional para Investigação em Cancro (IARC) para classificar esta bactéria como carcinogénio humano.[1] É actualmente aceite que a acção deste agente carcinogénico é indirecta, provocando gastrite, metaplasia e displasia. A infecção é adquirida na infância e a sua prevalência entre a população está relacionada com o estatuto sócio-económico.

Os adenocarcinomas gástricos são, maioritariamente, precedidos de um processo pré-canceroso que se prolonga durante décadas. Baseando-se neste pressuposto e em estudos histopatológicos, Correa[5] propôs uma via de eventos patológicos que precedem o adenocarcinoma gástrico (ver figura 2). Segundo esta cadeia de eventos, a infecção crónica por *H. pylori* progride ao longo de décadas por estados de gastrite crónica, atrofia multifocal, metaplasia intestinal, displasia e cancro.[5] A gastrite crónica poderá causar a perda de tecido glandular especializado (atrofia), o

que por sua vez conduzirá a uma redução de importantes sinais de diferenciação e também à cessação de secreção de ácido gástrico.[6] O aumento do pH gástrico conduz a uma alteração da flora deste órgão possibilitando a colonização do estômago por bactérias anaeróbias. Estas bactérias produzem enzimas denominadas reductases que transformam os nitratos alimentares em nitritos, moléculas que reagem com aminas, amidas e ureias produzindo compostos nitrosados carcinogénicos.[7]

A via proposta por Correa reflecte a sequência de eventos de adenocarcinomas gástricos de tipo intestinal, mas não é a sequência prevalente na morfogénese de adenocarcinomas gástricos de tipo difuso[8] (a classificação histológica dos adenocarcinomas gástricos é abordada em 3.). A gastrite não-atrófica induzida por *H. pylori* é a condição clínica mais comum subjacente ou co-existente em pacientes com adenocarcinoma gástrico de tipo difuso.[8]

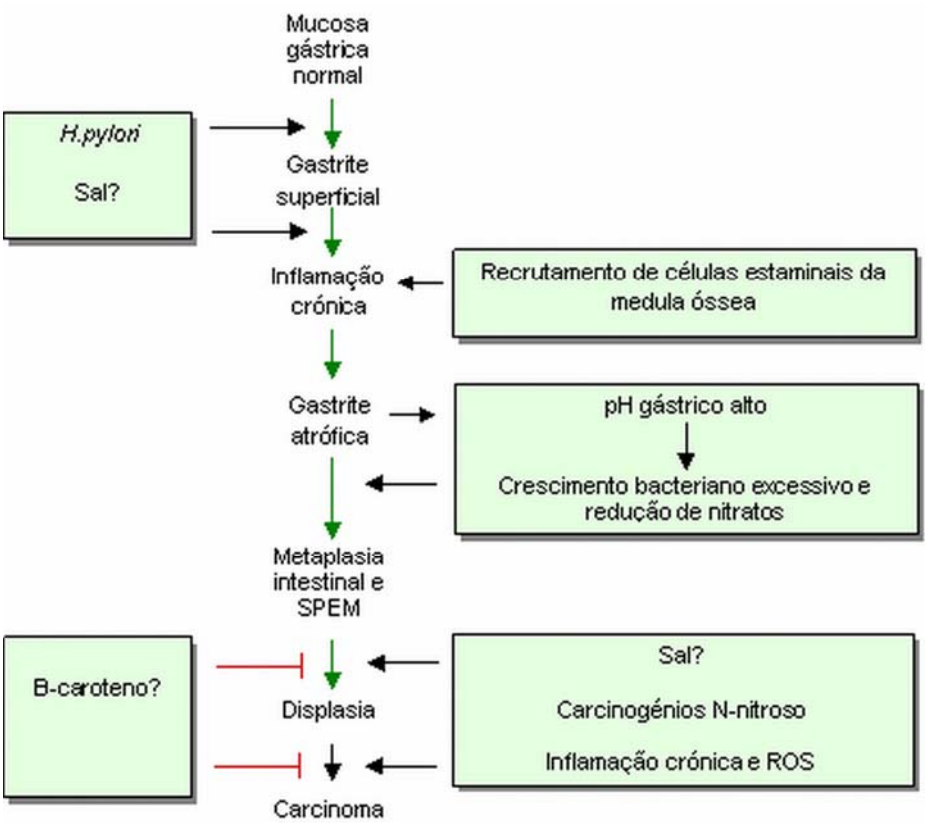

Figura 2: Via de eventos patológicos no adenocarcinoma gástrico proposta por Correa.[5] No carcinoma de tipo intestinal, estudos histológicos indicam que infecção crónica por *H. pylori* progride ao longo de décadas para estádios de gastrite crónica, atrofia, metaplasia intestinal, displasia e cancro. O desenvolvimento de cancro é atribuído a alterações no DNA causadas pela inflamação crónica, recrutamento e enxerto de células derivadas da medula óssea, um desequilíbrio entre a proliferação e apoptose das células epiteliais, e um ambiente de atrofia e acloridria, colonização gástrica por bactérias entéricas com actividade reductase de nitrato, que facilita a formação de nitrosaminas carcinogénicas. A atrofia (perda de células glandulares

especializadas, tais como as células parietais) predominante do corpo gástrico parece ser um passo inicial crítico para a progressão até cancro. Adaptado de Fox.[6]

A bactéria *H. pylori* possui uma série de características que possibilitam a sua sobrevivência e colonização de um meio hostil para a maioria dos organismos vivos, como é o estômago: a capacidade de produzir grandes quantidades da enzima urease que hidrolisa ureia em amoníaco e dióxido de carbono, neutralizando deste modo o ácido gástrico circundante; a presença de flagelo confere mobilidade à bactéria, permitindo colonizar a camada de muco que cobre o epitélio gástrico; capacidade de produzir enzimas que quebram a camada surfactante que cobre o epitélio gástrico, permitindo o acesso aos componentes nutricionais do hospedeiro. Estudos realizados em vários países indicam que mais de metade dos indivíduos na 5ª década de vida, escolhidos aleatoriamente, têm gastrite.[9] É sabido que a bactéria *H. pylori* infecta 50% da população mundial sendo esta infecção adquirida na infância e à qual se segue uma longa fase quiescente em que existe gastrite de intensidades variáveis mas com sintomas mínimos. A infecção com *H. pylori* não é suficiente para induzir cancro gástrico, sendo necessária a presença de outros factores, nomeadamente factores genéticos da bactéria e do hospedeiro, sendo por isso muito variável o curso natural de infecção com esta bactéria.[6]

Entre as diferentes estirpes de *H. pylori* existe uma grande variabilidade genética, nomeadamente entre os factores de virulência, o que explica as diferentes consequências da infecção por *H. pylori*. Infecções com estirpes que contenham o ilhéu de patogenicidade *cag* (*cag PAI*), segmento de DNA de 40kb que codifica *Cag A* e o complexo proteico T4SS, conferem maior risco de desenvolver cancro do estômago do que infecções com estirpes *cag PAI* negativas.[10,11] Ao contrário de *cag PAI*, o gene *vac A* está presente em todas as estirpes de *H. pylori*. No entanto, a variabilidade genética desempenha aqui também um papel importante uma vez que existem polimorfismos neste gene, estando as estirpes *vac A s1/m1* associadas a maior inflamação, constituindo por isso maior risco de desenvolver cancro gástrico.[12-15]

Embora os factores bacterianos tenham um papel importante na patogénese da doença, a maioria das evidências sugerem que os factores do hospedeiro são fulcrais para determinar a progressão para cancro gástrico.[6] O risco de desenvolver cancro gástrico aumenta 3 vezes em indivíduos com um familiar de primeiro grau com cancro gástrico e 10% dos casos apresentam agregação familiar.[16] É provável que a infecção com *H. pylori* ocorra em toda uma família e assim parte da ocorrência familiar estaria relacionada com transmissão intrafamiliar de *H. pylori*. Mesmo quando a infecção com *H. pylori* é controlada, a história familiar de cancro gástrico permanece um factor de

risco de desenvolver a doença, indicando a importância da genética do hospedeiro. Contudo, apenas uma pequena parte da agregação familiar de cancro gástrico é devido a síndromes familiares (abordados em 4.1.). Em vez disso, a observação de que os familiares dos pacientes de cancro gástrico têm uma maior prevalência de atrofia e hipocloridria sugere predisposição genética para o desenvolvimento de atrofia, precursor do adenocarcinoma gástrico. Esta prevalência aumentada de atrofia só se verifica em indivíduos infectados com *H. pylori*[17], levantando a hipótese de os factores genéticos causarem uma resposta imune mais intensa a *H. pylori* resultando em gastrite atrófica. Os estudos genéticos iniciais de famílias com uma incidência aumentada de alterações pré-cancerígenas focaram-se na citocina pró-inflamatória *IL-1β*, que é também um poderoso inibidor da secreção de ácido gástrico, tendo sido demonstrado que alguns polimorfismos no agregado genético (*gene cluster*) de *IL-1β* aumentam a probabilidade de resposta hipoclorídrica crónica à infecção de *H. pylori* e o risco de carcinoma gástrico.[13,17,18] Outros estudos reforçam a importância da genética do indivíduo no desenvolvimento da doença**.** Por exemplo, foi demonstrado que a incidência de carcinoma gástrico é maior em indivíduos do grupo sanguíneo A, comparando com indivíduos de grupo sanguíneo B ou O.[19] Outros estudos demonstraram que indivíduos com pequenos genótipos para *MUC1* têm um risco acrescido de desenvolverem carcinoma gástrico.[20]

Entre os factores ambientais que se presumem ter influência no desenvolvimento de cancro gástrico destacam-se as dietas com elevadas quantidades de sal e pobres em frutas e legumes ricos em anti-oxidantes como ácido ascórbico e β-caroteno. Pensa-se que a alteração dos hábitos alimentares e o melhoramento da conservação alimentar possam explicar o declínio observado na prevalência desta doença na maioria dos países.[21,22]

3. Classificação histológica do carcinoma gástrico

Do ponto de visto morfológico, os adenocarcinomas do estômago são muito heterogéneos. Tal facto reflecte-se na diversidade de sistemas de classificação existentes (Goseki, Ming, Carneiro, OMS e Laurén) que se baseiam em diferentes critérios, como o perfil histológico, grau de diferenciação, histogénese e padrão de crescimento.

3.1. Classificação de Laurén

A classificação de Laurén[23] provou ser útil na avaliação da história natural do carcinoma gástrico, especialmente no que concerne à sua associação a lesões precursoras, tendência de incidências e factores ambientais. As lesões são classificadas em dois grandes tipos: intestinal ou difuso. Tumores que contêm regiões aproximadamente iguais de padrão intestinal e difuso são denominados carcinomas mistos. Os carcinomas que pelo seu grau de diferenciação reduzido não se enquadram em nenhuma das categorias acima descritas são classificados como indeterminados.

O carcinoma de tipo intestinal (ou glandular – Carneiro *et al* 1997[24]) é caracterizado por células coesivas formando estruturas glandulares, tem normalmente um padrão de crescimento expansivo e pode originar metástases que se propagam pelo sistema sanguíneo. Estas lesões tendem a ocorrer no estômago distal, afectam pacientes de faixas etárias mais avançadas, principalmente homens, e ocorre com mais frequência em regiões geográficas de com alto risco de carcinoma gástrico (ver figura 1). Este tipo de adenocarcinoma é normalmente precedido de gastrite atrófica crónica e metaplasia intestinal, particularmente nas áreas geográficas de alta incidência.[25]

O carcinoma de tipo difuso (ou células isoladas – Carneiro *et al* 1997[24]) é caracterizado por células isoladas dispersas no estroma, tem normalmente um padrão de crescimento infiltrativo e tende a invadir tecidos envolventes e a disseminar-se para os nódulos linfáticos regionais através dos vasos linfáticos. Em comparação com os carcinomas de tipo intestinal, os carcinomas difusos são menos relacionados com influências ambientais, não são associados a metaplasia intestinal, a sua incidência relativa tem aumentado e afectam pessoas mais jovens (em particular mulheres).

Estas duas entidades parecem ter diferentes vias genéticas subjacentes ao diferente fenótipo apresentado.[21,24,26]

3.2. Classificação de Ming

No que concerne o padrão de crescimento, muitos tumores são relativamente circunscritos, mas cerca de um terço a metade de todos os carcinomas gástricos evidenciam uma perda de crescimento coesivo e invadem os tecidos adjacentes como células individuais, pequenos agregados, ou pequenas glândulas.[27] Alguns tumores apresentam heterogeneidade intratumoral destas características morfológicas. De

acordo com os diferentes padrões de crescimento, Ming *et al* propôs uma classificação dos carcinomas gástricos pelos tipos expansivo e infiltrativo.[28] Conforme o termo sugere, os carcinomas expansivos crescem por alargamento de massas coesivas tumorais, com uma periferia bem definida; os carcinomas infiltrativos crescem como células isoladas, pequenos agregados, ou glândulas separadas e dispersas, exibindo um forte potencial invasivo com infiltração extensiva do estroma.

4. Genética do carcinoma gástrico

A maioria dos carcinomas gástricos são esporádicos. De facto, os carcinomas gástricos com cariz hereditário não vão além dos 8-10%.[29] Em todo o caso, tanto os carcinomas gástricos esporádicos como os familiares são o resultado de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas que transformam células normais do epitélio gástrico em neoplasias malignas.[30]

4.1. Susceptibilidade genética

Conforme acima descrito, uma pequena porção dos adenocarcinomas do estômago resultam de síndromes hereditários que conferem predisposição para adenocarcinoma gástrico. Entre estes estão incluídos a Síndrome de cancro do cólon hereditário não-polipóide (também conhecido como Síndrome de Lynch ou HNPCC), Carcinoma gástrico difuso hereditário (HDGC) e síndromes polipóides gastrointestinais (Síndrome de Peutz-Jeghers e Polipose adenomatosa familiar).

O HNPCC é causado por mutações germinativas num dos genes *mismatch repair* (por exemplo, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) e é caracterizado pela predisposição para cancro do cólon e também vários outros cancros, nomeadamente do endométrio, ovário, estômago, pâncreas, tracto uroepitelial superior e cérebro. Os tumores que surgem associados a esta síndrome exibem uma forma de instabilidade genética denominada instabilidade de microssatélites (MSI)[30]. Os cancros do estômago surgem em 11% das famílias com HNPCC com mutações germinativas nos genes *MLH1, MSH2* ou *MSH6.*[31,32] Segundo Aarnio *et al*[31], a maioria destes carcinomas são de tipo intestinal.

Mutações germinativas no gene que codifica a proteína de adesão celular caderina-E (*CDH1*) levam a predisposição autossómica dominante para carcinoma gástrico, conhecido como Carcinoma gástrico difuso hereditário (HDGC).[33,34] As

mutações germinativas em *CDH1,* originando principalmente proteínas truncadas, estão dispersas ao longo do gene sem que se registem *hotspots.*[33-36] Os tumores HDGC são adenocarcinomas difusos, infiltrativos, pouco diferenciados, apresentando células em anel de sinete.[33-35]

A síndrome de Li-Fraumeni é causada por mutações germinativas no gene *TP53* e resulta numa marcada predisposição para sarcomas de tecidos moles, leucemia, tumores cerebrais, carcinoma da supra renal, carcinoma da mama e também carcinoma gástrico nalgumas famílias. Pelo menos uma família com uma mutação germinativa em *TP53* (R158G, G→C471) apresenta primariamente uma agregação com carcinoma gástrico.[37] Os carcinomas que surgem no quadro deste síndrome apresentam tanto um padrão histológico do tipo intestinal como difuso.[37,38]

4.2. Mecanismos moleculares de carcinogénese gástrica

Embora se desconheça a natureza e sequência exactas das múltiplas alterações genéticas e epigenéticas que levam ao desenvolvimento de um carcinoma, foram identificadas várias anomalias afectando a estrutura e/ou expressão de um cada vez maior número de genes. A análise por hibridação genómica comparativa de adenocarcinomas do estômago é uma ferramenta extremamente útil para avaliar alterações genómicas, uma vez que permite identificar regiões cromossómicas mais frequentemente afectadas por perdas e ganhos de material genético (ver figura 3).

Vários oncogenes, genes supressores tumorais e genes relacionados com metástases têm sido implicados na carcinogénse gástrica. O distinto padrão de alterações genéticas nos dois principais tipos histológicos de cancro gástrico (intestinal e difuso) abaixo enunciadas (4.2.1. e 4.2.2.) apoia a hipótese da existência de duas vias genéticas distintas subjacentes a estas duas entidades.[24]

Oncogenes são formas alteradas de genes celulares normais, denominados proto-oncogenes. Os produtos dos proto-oncogenes são importantes reguladores do normal crescimento celular e diferenciação. Nos cancros humanos, a expressão destes genes é alterada por diferentes alterações genéticas, entre as quais translocações, mutações pontuais e amplificações, activando o seu potencial oncogénico. As alterações nos proto-oncogenes resultam num ganho de função que actua de um modo dominante em relação ao gene normal.

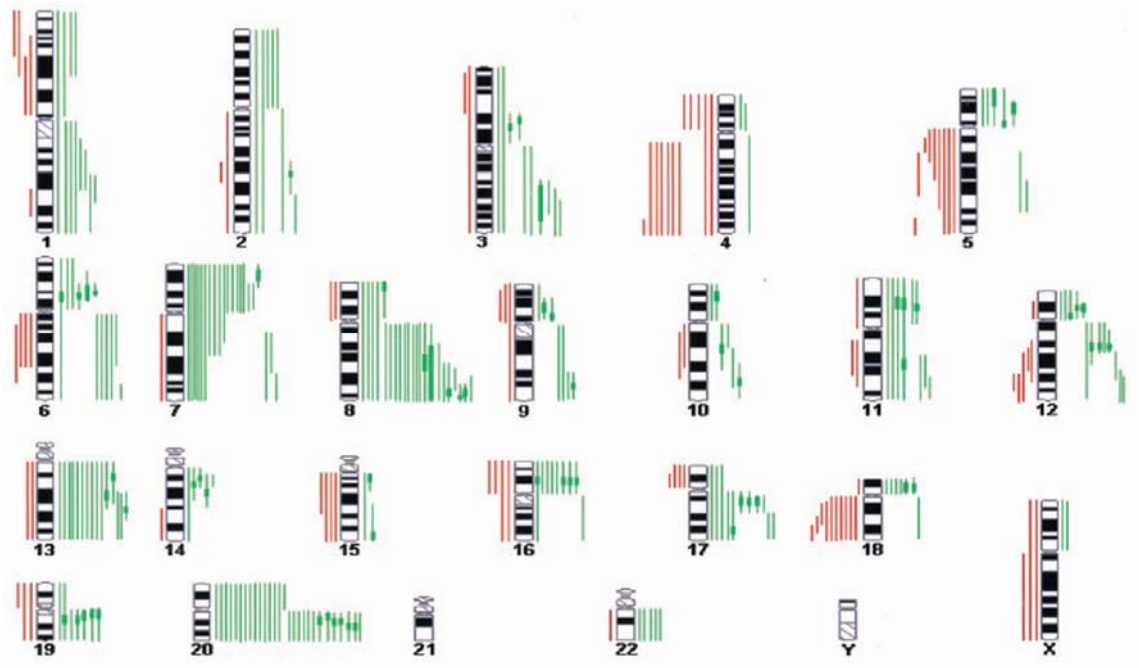

Figura 3: Perfil das alterações cromossómicas do adenocarcinoma gástrico. Os ganhos são representados pelas linhas verdes à direita do cromossoma e as perdas são representadas pelas linhas vermelhas à esquerda do cromossoma. As fracções mais espessas das linhas representam regiões altamente amplificadas. Adaptado de Tay *et al.*[39]

O conceito de gene supressor tumoral surgiu de estudos epidemiológicos de Knudson sobre retinoblastoma em crianças.[40] Knudson documentou a necessidade de ocorrerem dois eventos num gene supressor tumoral para a formação de tumor. Sugeriu que algumas crianças herdaram um alelo mutado do gene *RB1* e que uma segunda mutação somática no outro alelo daria origem a cancro. As mutações em genes supressores tumorais implicam perda de função, actuando de um modo recessivo em relação ao gene normal, pelo que são necessárias duas mutações independentes para inactivar ambos os alelos.[41] Isto pode suceder através de uma mutação num alelo seguida de uma redução a hemizigotia, deixando apenas o alelo mutante[42], por silenciamento epigenético do segundo alelo ou por mutação nos dois alelos. As alterações genéticas podem alterar directamente a estrutura do gene ou podem actuar no sentido de desactivar os elementos reguladores, impedindo deste modo a transcrição do gene. A maioria dos genes supressores tumorais previnem a formação de tumores através da inibição do crescimento celular ou da promoção da morte celular, outros ainda ao perderem função favorecem o aparecimento de mutações em genes de reparação de lesões de DNA causando instabilidade genética.

4.2.1. Oncogenes no carcinoma gástrico

Alterações na estrutura e função de genes que codificam factores de transcrição e receptores com actividade cinase de tirosina estão envolvidas no desenvolvimento e progressão de carcinomas gástricos, nomeadamente:

- A amplificação do gene *MET*, localizado no braço longo do cromossoma 7 (7q), está implicada nos dois tipos histológicos de carcinoma gástrico, principalmente em casos avançados e está associado a agressividade biológica (invasão).[24,43-47]

- Rearranjos *TPR-MET*, levando à activação de *MET*, são por vezes detectados em carcinomas do tipo intestinal.[48]

- O gene *FGFR2*, localizado no cromossoma 10q26, é amplificado em linhas celulares de carcinoma gástrico Kato-III e em carcinomas de tipo difuso.[49]

- A activação de oncogenes por amplificação e mutação é também observada em genes que codificam factores de transcrição como *MYC* (localizado em 8q).[44,50,51]

- O gene *NCOA3* (gene co-activador de receptor nuclear) é apontado como o alvo da amplificação 20q em carcinoma gástrico.[52] Para além da amplificação é também apontada como mecanismo de activação deste oncogene a sobre-expressão, que está associada à ocorrência de metástases de gânglios linfáticos e a mau prognóstico em carcinomas gástricos de tipo intestinal.[53]

- O gene *KRAS*, localizado no cromossoma 12p12.1, é frequentemente sobre-expresso em carcinomas gástricos de tipo intestinal, mas não em carcinomas de tipo difuso.[47,54,55]

- A amplificação do gene *ERBB2* está associada a carcinomas gástricos de tipo intestinal,[46,47,49,56] correlaciona-se com a agressividade do tumor[56] e com fases avançadas de progressão tumoral.[45] A função e alterações deste proto-oncogene são discutidas em 7.1 e 7.3.

Para além de receptores e factores de transcrição, é também frequente a sobre-expressão de factores de crescimento e citocinas em carcinomas gástricos.[47,57] Foi observada sobre-expressão do factor de crescimento IGF2 em carcinomas gástricos devido à perda de imprinting (LOI) do locus *IGF2* no cromossoma 11p. Foi posteriormente demonstrado que este evento é mais frequente em carcinomas de tipo difuso.[58,59] Outro factor de crescimento com efeito inibitório no crescimento em células normais é TGFβ1 (cromossoma 19q), cuja sobre-expressão foi demonstrada em carcinomas gástricos do tipo difuso.[47]

4.2.2. Genes supressores tumorais no carcinoma gástrico

Vários genes supressores tumorais têm sido implicados na carcinogénese gástrica, nomeadamente:

- O gene *TP53* (localizado em 17p13) é um dos genes mais frequentemente implicados em cancro em geral, estando alterado tanto em carcinomas gástricos de tipo intestinal como de tipo difuso.[47] A inactivação de p53 ocorre em estádios iniciais de desenvolvimento da neoplasia maligna, antes da expansão clonal.[60]

- O gene *APC*, localizado em 5q21, está frequentemente mutado em cancro do cólon.[61] No cancro gástrico, o locus *APC* é frequentemente delectado em carcinomas de tipo intestinal, tanto em estádios iniciais como avançados, mas não em carcinomas de tipo difuso.[44,62]

- O gene da E-caderina (*CDH1*), localizado em 16q22.1, é inactivado por uma mutação germinativa em carcinomas difusos hereditários, desempenhando um papel na susceptibilidade de cancro gástrico.[35] A inactivação de *CDH1*, geralmente por metilação do alelo *wild-type*[63] está associada ao desenvolvimento e invasão do carcinoma gástrico difuso.

- O receptor TGFβRII (localizado em 3p22) foi considerado gene supressor tumoral na carcinogénese gástrica e do cólon e está significativamente associado a carcinomas gástrico de tipo intestinal com instabilidade de microssatélites.[64,65] Anormalidades na expressão e função dos receptores de TGFβ impossibilitam a correcta função desta molécula, levando a uma vasta variedade de patologias humanas.

- Recentemente, o gene *SMAD*, localizado em 18q, foi indicado como um gene supressor tumoral na carcinogénese gástrica.[66,67]

- Outros genes supressores tumorais inactivados em cancro gástrico são os inibidores de CDK, CDKN1A e CDKN. Dados apontam a hipermetilação das ilhas CpG na região promotora do gene como provável causa da perda de função destes genes.[68,69]

- A hipermetilação e reduzida expressão do gene *RARβ* (receptor nuclear do ácido retinóico-β) são observadas em 64% dos carcinomas intestinais, sendo rara ou inexistente no subtipo difuso.[70]

- Perdas de heterozigotia no braço longo do cromossoma 1 e 7 (1q e 7q) são frequentemente associadas a carcinomas do tipo intestinal enquanto que o braço curto do cromossoma 1 (1p) está normalmente afectado em carcinomas difusos avançados.[71]

- A perda de função do gene *RUNX3* por hipermetilação das ilhas CpG do promotor é observada em diferentes tipos de cancro, incluindo 64% dos carcinomas gástricos. A metilação de *RUNX3* é também uma característica de 8% das gastrites crónicas, 28% de metaplasias intestinais e 27% de adenomas gástricos.[72]

5. Estadiamento e factores de prognóstico

Existem vários sistemas internacionais de estadiamento dos tumores malignos. No cancro gástrico, é amplamente utilizada a classificação TNM (ver tabela 1)[73,74], em que T indica a profundidade da invasão tumoral, N denota a presença ou ausência de envolvimento dos gânglios linfáticos e M indica a presença ou ausência de metástases. Este sistema fornece importante informação de prognóstico. O valor prognóstico dos diferentes parâmetros abordados por este sistema é corroborado em vários estudos.[75-77] Roder *et al*[75] publicou dados que apoiam o valor deste sistema de classificação, em particular no que concerne ao envolvimento dos gânglios linfáticos. Estes autores demonstraram que, para pacientes com metástases em 1-6 gânglios linfáticos (pN1) a taxa de sobrevivência aos 5 anos é de 44% comparado com 30% de taxa de sobrevivência aos 5 anos para pacientes com metástases em 7-15 gânglios linfáticos (pN2). Pacientes com metástases em mais de 15 gânglios linfáticos metastáticos (pN3) têm uma taxa de sobrevivência ainda mais reduzida (11%). Infelizmente, a maioria dos pacientes com carcinoma avançado apresenta metástases nos nódulos linfáticos na altura do diagnóstico.[78]

Em carcinomas gástricos iniciais (Early Gastric Cancer), lesões na pequena musosa (small mucosa), superficiais e Pen B (margem tumoral penetra a muscular da mucosa em múltiplos locais) têm uma baixa incidência de invasão de vasos e metástases nos nódulos linfáticos e um bom prognóstico após cirurgia (cerca de 90% dos pacientes sobrevive 10 anos). Por outro lado, as lesões com margens tumorais que penetram a muscular da mucosa destruindo-a completamente (Pen A) são caracterizadas por um incidência relativamente alta de invasão de vasos e metástases de gânglios linfáticos e mau prognóstico após cirurgia (64,8% sobrevivência aos 5 anos). A evidência de invasão linfática e vascular é indicadora de mau prognóstico, sendo frequente nos casos avançados.

Tabela 1: Classificação TNM de adenocarcinoma gástrico American Joint Committee on Cancer (AJCC) Classification of Gastric Cancer (5th edition)

T = tumor primário	
Tx	Impossível avaliar tumor primário
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
T1	Invade lâmina própria/submucosa
T2	Invade muscularis própria/subserosa
T3	Penetra serosa
T4	Invade estruturas adjacentes
N = nódulos linfáticos	
Nx	Impossível avaliar nódulos linfáticos regionais
N0	Sem nódulos linfáticos regionais envolvidos
N1	Metástase em 1-6 gânglios linfáticos regionais
N2	Metástase em 7-15 gânglios linfáticos regionais
N3	Metástase em + 15 gânglios linfáticos regionais
M = metástase à distância	
Mx	Impossível avaliar metástase à distância
M0	Sem metástase à distância
M1	Com metástase à distância

Estadiamento

Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio IA	T1	N0	M0
Estádio IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio II	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
Estádio IIIB	T3	N2	M0
Estádio IV	T4	N1,N2,N3	M0
	T1, T2, T3	N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

Adaptado de Dicken B. *et al* [79]

6. Abordagem terapêutica actual

O tratamento do carcinoma gástrico encerra diferentes procedimentos, sendo o mais relevante a cirurgia, podendo esta ser complementada com quimioterapia adjuvante ou neo-adjuvante. Conforme se pode constatar na tabela 2, o sucesso terapêutico está fortemente relacionado com a detecção precoce da doença.

6.1 Tratamento cirúrgico

A cirurgia tem como objectivo principal a remoção total do tumor (cirurgia curativa) ou o alívio de sintomas e tratamento de complicações (cirurgia paliativa).

O tratamento cirúrgico do carcinoma gástrico compreende a ressecção do tumor primário e órgão adjacentes envolvidos, como cólon, intestino delgado ou lobo esquerdo do fígado. A gastrectomia radical implica uma margem proximal de segurança maior que 6 cm nos tumores de tipo intestinal e maior de 8 cm nos tumores de tipo difuso. A margem distal deve ser de pelo menos 1 cm. O grande e pequeno epiplon são removidos com a peça cirúrgica bem como as áreas de drenagem (gânglios perigástricos e regionais). No entanto, a dimensão da linfadenectomia é ainda controversa, embora seja recomendada a linfadenectomia D2 (alargada). Um esvaziamento adequado deve conter no mínimo 15 gânglios.

A ressecção cirúrgica é a melhor forma de paliação e permite uma qualidade de vida aceitável, com taxas de complicações reduzidas. Está indicada em situações de obstrução, hemorragia, perfuração e ainda na correcção de situações de grande desconforto.

Verificou-se recentemente que mutações germinativas do gene da caderina-E em jovens pertencentes a famílias com cancro gástrico difuso hereditário, se associavam a um elevado risco de desenvolver carcinoma do estômago, pelo que a gastrectomia total profilática deve ser equacionada nestes casos.

6.2. Terapia adjuvante e neo-adjuvante

Ainda não está comprovado o valor da terapêutica adjuvante ou neo-adjuvante (pré-operatória) utilizando quimioterapia, radioterapia ou a sua combinação. Embora muitos ensaios terapêuticos, utilizando variados regimes de quimioterapia, tenham logrado uma resposta clínica em cerca de 30% dos doentes, não há evidência científica de benefício na sobrevivência aos 5 anos. Apesar disso, muitos autores defendem a implementação de terapêutica adjuvante, no âmbito de protocolos rigorosos conduzidos por centros de referência.

6.3. Eficácia do tratamento actual

A sobrevivência de pacientes com carcinoma gástrico permanece fraca, com uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de cerca de 20% (todos os estádios)[80]. A ressecção cirúrgica é a única modalidade de tratamento curativo para tumores gástricos primários. No entanto, a maioria dos pacientes com cancro gástrico são diagnosticados em estádios avançados[81], resultando num mau prognóstico (ver tabela 2). Ensaios clínicos com o intuito de avaliar a relevância da quimioterapia adjuvante e neo-adjuvante nos casos mais avançados apresentam resultados modestos ou negativos, havendo por isso alguma discordância quanto à relevância desta modalidade de tratamento.

Os dados acima referidos reforçam a importância da identificação de marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico para o adenocarcinoma gástrico, assim como a identificação de novos alvos terapêuticos.

Tabela 2: Taxa de sobrevivência aos 5 anos de cancro gástrico por estádio

Estádio	Sobrevivência aos 5 anos (%)
0	90
IA	78
IB	58
II	34
IIIA	20
IIIB	8
IV	7

Adaptado de Hundahl SA *et al*[81]

7. Terapia dirigida – Um novo paradigma

Os novos conhecimentos da biologia do cancro têm levado a um novo paradigma relativamente ao tratamento quimioterápico do cancro. Novos agentes terapêuticos têm como alvo directo proteínas envolvidas em cascatas de sinalização fundamentais para diversos processos celulares (tais como proliferação, migração, metabolismo, diferenciação e sobrevivência celular)[82], exercendo o seu efeito citostático e citotóxico de uma forma altamente selectiva. Um exemplo paradigmático é

o anticorpo monoclonal trastuzumab (Herceptin®), cujo alvo é uma glicoproteína transmembranar com actividade de cinase de tirosina chamada ERBB2.

7.1. O alvo específico: ERBB2

O gene *ERBB2* está situado no cromossoma 17 (17q12-q21) e codifica uma proteína de 185 kDa.[83] O receptor celular ERBB2 é membro da família de receptores de factor de crescimento epidermal (EGFR) ou ERBB que compreende quatro elementos: EGFR/ERBB1, ERBB2, ERBB3 e ERBB4. Todos os membros têm uma região extra-celular de ligação a um ligando (factor de crescimento epidermal, EGF; neuregulina, NRG), uma região transmembranar e um domínio citoplasmático com actividade de cinase de tirosina. Os receptores ERBB são expressos em vários tecidos de origem epitelial, mesenquimal e neuronal. Em condições fisiológicas normais, a activação dos receptores ERBB é controlada espacialmente e temporalmente pela expressão dos seus ligandos. A ligação ligando-ERBB induz a formação de homo- e heterodímeros de receptores e a activação do domínio intrínseco com actividade cinase, resultando daí a fosforilação em resíduos de tirosina específicos na cauda citoplasmática. Estes resíduos fosforilados servem de locais de atracamento para um conjunto de proteínas, cujo recrutamento leva a activação das vias de sinalização intracelulares.[84]

Ao contrário de todos os outros membros da família ERBB, o ERBB2 não tem qualquer ligando específico.[85] Todavia, este receptor desempenha um papel muito importante uma vez que, sendo o parceiro preferencial de heterodimerização dos receptores (ver figura 4), potencia a sinalização celular e aumenta a afinidade dos receptores aos seus ligandos.[86] As diferentes vias de sinalização celular despoletadas pela dimerização dos receptores ERBB estão representadas no esquema da figura 5.

7.2. O agente terapêutico: Herceptin

O trastuzumab (Herceptin®) é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga à região extra-celular de ERBB2 e inibe o crescimento de células com sobre-expressão de ERBB2.[87] A sua actividade anti-tumoral tem sido atribuída a diferentes mecanismos, incluindo inibição do receptor, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), entre outros. Em estudos iniciais na década de 1990, o trastuzumab demonstrou indução de regressões tumorais em pacientes com

metástases avançadas de cancro de mama para as quais todas as terapias existentes falharam. Estudos subsequentes indicaram que existem benefícios significativos na utilização de trastuzumab em pacientes com metásteses de cancro de mama com sobre-expressão de ERBB2[88] e que a utilização de trastuzumab em conjunto com quimioterapia aumenta a sobrevivência.[89]

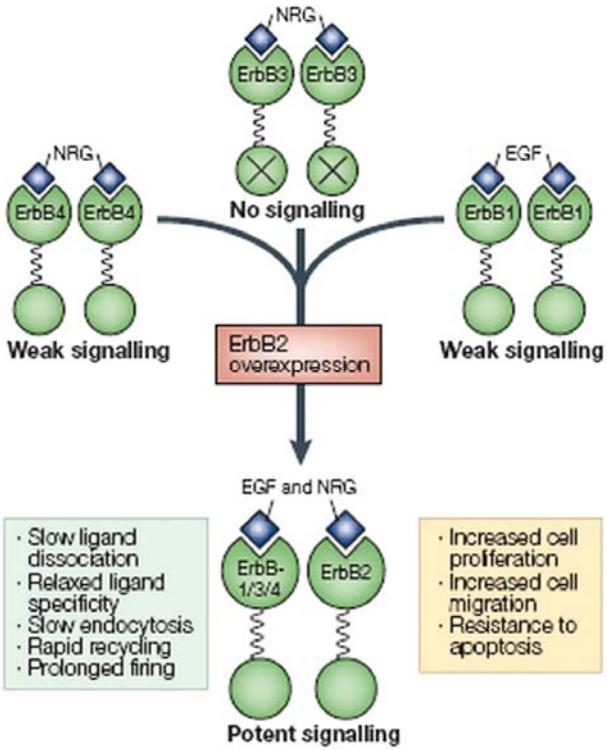

Figura 4. Sinalização dos homodímeros de ERBB em comparação com a sinalização resultante de heterodímeros contendo ERBB2. A ligação do ligando (EGF ou NRG) ao domínio extra-celular de ERBB1, ERBB3 ou ERBB4 induz a formação de homodímeros. O sinal resultante da homodimerização de receptores é muito reduzido ou inexistente (homodímeros de ERBB3). Quando o ERBB2 está sobre-expresso formam-se preferencialmente heterodímeros com este receptor, sendo que estes heterodímeros têm capacidade de prolongar e potenciar a sinalização celular a jusante, potenciando subsequentemente os resultados dessa sinalização: aumento da proliferação celular, aumento na migração celular e resistência a apoptose. Adaptado de Yarden *et al.*[90]

7.3. Aplicação deste novo paradigma na terapia de cancro da mama

O papel da amplificação e consequente sobre-expressão do gene *ERBB2* está hoje em dia bem estabelecido em cerca de 25% dos carcinomas da mama, traduzindo-se em informação clinicamente relevante para esta neoplasia.[91] Por um lado, a amplificação do *ERBB2* é um factor de prognóstico independente, associado com

sobrevivência reduzida. Por outro lado, esta alteração molecular é um factor predictivo de resposta ao tratamento quimioterápico, associando-se nomeadamente a uma maior sensibilidade às antraciclinas. Por último, a proteína ERBB2 constitui um bom alvo terapêutico por ser funcionalmente importante para o crescimento do cancro da mama, sendo a sobre-expressão exclusiva das células neoplásicas e ainda por ser um receptor facilmente acessível na superfície membranar.

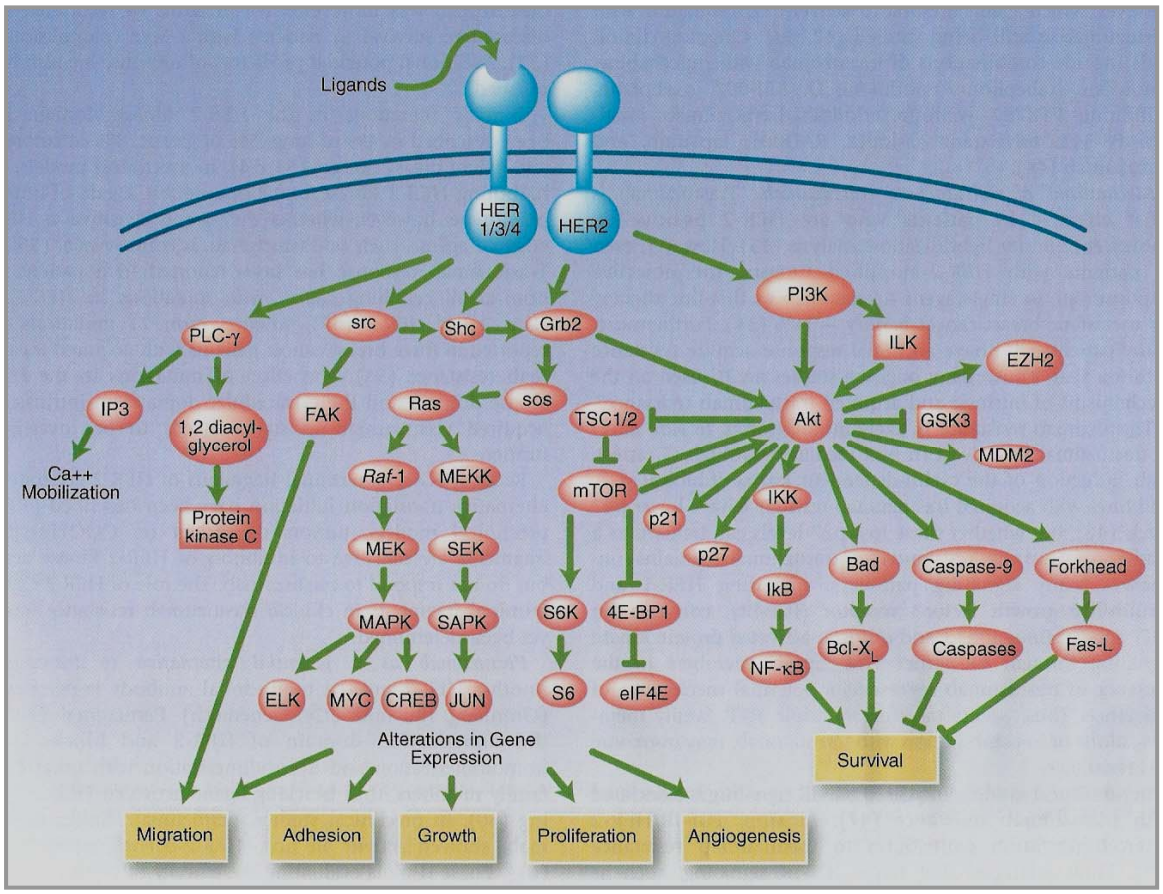

Figura 5. Esquema representativo das vias de sinalização celular de ERBB2. O receptor ERBB2 interage com os diferentes membros da família ERBB, despoletando vias com diferentes resultados finais (migração, adesão, proliferação, angiogénese e anti-apoptótico). Adaptado de Meric-Bernstam *et al.*[92]

7.4. Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) *vs* Imunohistoquímica (IHC)

Actualmente, os dois métodos mais comuns de avaliar a sobre-expressão e amplificação do gene *ERBB2* no espectro clínico são IHC e FISH.[91,93-98] A imunohistoquímica (IHC) é o método mais utilizado e implica coloração de tecido

embebido em parafina com um anticorpo específico contra o ERBB2. Quando são utilizados os kits disponíveis comercialmente, tais como HercepTest, a coloração é classificada semi-quantitativamente numa escala de 0 (sem expressão de ERBB2) até 3+ (elevada expressão de ERBB2) na base de comparação com linhas celulares de densidade do receptor ERBB2 conhecida. Os tumores de mama com uma expressão de ERBB2 classificada como 3+ são os que melhor respondem ao trastuzumab.[88,89,94,99] As desvantagens de IHC incluem a interpretação subjectiva e a natureza semi-quantitativa dos resultados.[100] Os kits para IHC actualmente disponíveis fornecem lâminas controlo que permitem comparação. Tal estandardização é essencial para assegurar uma avaliação precisa do estado de expressão de ERBB2.[94]

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) detecta a amplificação do gene *ERBB2* e é mais específica e sensível que IHC.[93,101] É importante salientar que a análise por FISH fornece resultados quantitativos, diminuindo consideravelmente a subjectividade e variabilidade entre laboratórios. Para além disso a análise por FISH permite prever prognósticos e resposta ao trastuzumab de uma forma mais precisa do que a IHC, pois o subgrupo de pacientes cujos tumores têm sobre-expressão ERBB2 na ausência de amplificação do gene tem menos probabilidade de responder a terapia baseada no trastuzumab.[94,99,102] De um modo geral, IHC e FISH demonstram uma taxa de concordância de aproximadamente de 80%.[103-105] A autoridade americana FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a utilização de IHC e FISH para a selecção de pacientes para terapia com trastuzumab em cancro da mama. Embora a IHC seja o método mais utilizado, deve ser realizada uma análise FISH sempre que os tumores sejam classificados 2+ por IHC.[97]

7.5. Amplificação do gene *ERBB2* em carcinoma gástrico

Outras neoplasias malignas para além do cancro da mama apresentam sobre-expressão deste oncogene e, como tal, podem presumivelmente beneficiar do tratamento com trastuzumab. David *et al*[56], usou técnicas de imunohistoquímica e Southern blot para demonstrar a expressão e amplificação de *ERBB2* em carcinomas gástricos primários e suas metástases. Posteriormente, vários investigadores demonstraram amplificação e sobre-expressão de *ERBB2* em 6-18%[46,56,106,106-109] dos adenocarcinomas de estômago, especialmente no tipo intestinal, indicando que o mesmo tipo de mecanismo molecular descrito para o cancro da mama estará envolvido na carcinogénese gástrica. Num estudo preliminar,[110] foi demonstrado que a

sobre-expressão do receptor ERBB2 é um factor de prognóstico independente no carcinoma gástrico, estando associada a invasão venosa da neoplasia.

A existência de uma alteração molecular (amplificação de *ERBB2*), uma alteração genética que é alvo de uma terapia dirigida já existente (anticorpo monoclonal trastuzumab), numa doença oncológica com particular relevância em Portugal, abre novas perspectivas para o tratamento do carcinoma do estômago.

Objectivos

Objectivos

O presente estudo tem como objectivos:

1. Determinar a frequência de sobre-expressão (IHC) e amplificação do gene *ERBB2* (FISH) numa série representativa de carcinomas de estômago.

2. Estabelecer o grau de concordância entre as duas metodologias na análise desta neoplasia.

3. Esclarecer o papel da amplificação de *ERBB2* nos vários tipos histológicos de adenocarcinoma gástrico.

4. Determinar o valor prognóstico da amplificação de *ERBB2* por subtipo histológico e estádio da doença.

Material e Métodos

1. Desenho do estudo

Para atingir os objectivos propostos o estudo foi arquitectado em duas fases. Inicialmente foram seleccionados 463 casos consecutivos de adenocarcinoma gástrico tratado com gastrectomia (realizada entre 1996 e 2000) de modo a determinar a frequência de sobre-expressão e amplificação do gene *ERBB2*. Assim, a primeira fase possibilitou seleccionar do grupo inicial de pacientes (463) aqueles que apresentam amplificação do gene *ERBB2*. Foram obtidos dados de follow-up de todos os casos com sobre-expressão/amplificação, bem como de pacientes sem amplificação do gene *ERBB2* para as curvas de sobrevivência destes dois grupos.

1.1. Dados clínico-patológicos

Para este estudo foram seleccionados 463 casos de adenocarcinoma gástrico tratados com gastrectomia entre 1996 e 2000 (inclusive) no IPO – Porto. As idades dos pacientes na altura do diagnóstico estão compreendidas entre os 26 e 91 anos (mediana de 67 anos). Relativamente ao género, 58,1% dos indivíduos são do sexo masculino e 41,9% do sexo feminino.

Os processos clínicos (de 256 casos) foram revistos por médicos oncologistas, gastrenterologistas, epidemiologistas e cirurgiões, sem conhecimento dos dados genéticos. O tempo de sobrevivência foi calculado a partir da data de cirurgia até à data de último seguimento, sendo classificado num de quatro estados: vivo sem evidência de cancro; vivo com evidência de cancro; morto sem evidência de cancro; morto com evidência de cancro. O tempo médio de follow-up foi de 52,3 meses (mínimo 1 mês, máximo 127 meses).

Todos os adenocarcinomas foram classificados segundo os critérios de Lauren, observando-se as seguintes proporções: 58,2% de tipo intestinal; 23,1% de tipo difuso; 17,5% atípico (14,5% misto, 3% sólido – Fátima Carneiro[24]) e 1,2% inclassificável.

Quanto ao padrão de crescimento, em 29% dos casos foi observado padrão expansivo, em 67,6% dos adenocarcinomas observou-se padrão infiltrativo e em 3,4% dos casos observou-se padrão misto. No que concerne ao estadiamento clínico, a população estudada estava distribuída da seguinte forma: 1,3% estádio 0 (tumor *in situ*), 10,3% estádio IA, 9,4% estádio IB, 19,2% estádio II, 23,4% estádio IIIA, 16,4% estádio IIIB, e 20% estádio IV. Na curva de Kaplan-Meier, representada na figura 6, está caracterizada a sobrevivência dos pacientes em função do estádio clínico aquando da intervenção cirúrgica.

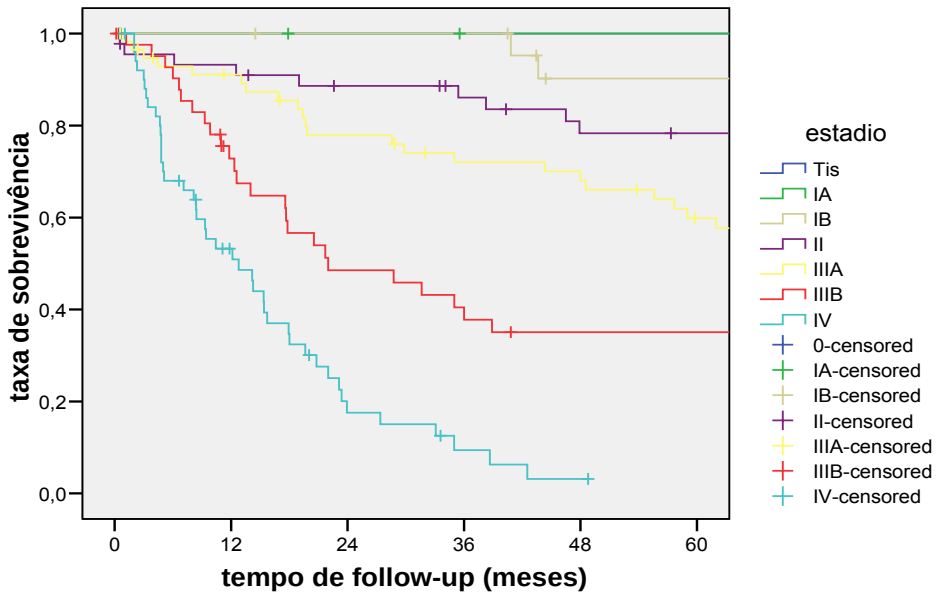

Figura 6. Curva de Kaplan-Meier para a sobrevivência de 256 pacientes tratados com gastrectomia em função do estadiamento clínico da doença.

1.2. Amostras de tecido tumoral

Os tecidos, obtidos no decurso da cirurgia, foram incluídos em parafina como parte do procedimento de rotina do Serviço de Anatomia Patológica do IPO – Porto e classificados por anatomo-patologistas deste Serviço.

As lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE) de cada amostra foram posteriormente revistas por anatomo-patologistas e foram realizados vários cortes de 5 µm dos respectivos blocos de parafina para análise de imunohistoquímica e para FISH.

2. Métodos

2.1. Imunohistoquímica

A expressão do gene ERBB2 foi avaliada em todos os 463 casos por imunohistoquímica no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP). Foi utilizado o anticorpo monoclonal NCL-CB11 (anticorpo monoclonal de ratinho, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK). As secções de tecido foram desparafinadas, e a recuperação antigénica foi realizada em tampão citrato (0,01M pH 6.0) a alta temperatura (banho-maria 98ºC). Após o bloqueio de ligações não específicas, adicionou-se o anticorpo primário numa diluição pré-*standardizada* (1/60) e incubou-se 30 minutos à temperatura ambiente. Para visualização foi utilizada a técnica *standard* complexo avidina-biotina-peroxidase, com diaminobenzina como cromogénio (UltraVision Detection System Anti-Polyvalent, HRP/DAB (Ready-To-Use), LabVision Corporation, Fremont, CA, USA). Seguidamente, as secções de tecido foram coradas com hematoxilina e cobertas com lamela.

Para a análise da sobre-expressão do receptor ERBB2 foram aplicados os critérios Herceptest® (ver tabela 3). Na análise foram incluídos controlos positivos apropriados (carcinoma de mama com sobre-expressão de ERBB2). Cada secção foi avaliada por um patologista.

Tabela 3. Critérios Herceptest® para detecção de sobre-expressão de ERBB2

Score	Padrão de marcação
0	Ausência de marcação membranar, ou marcação em menos de 10% das células tumorais
1+	Marcação membranar incompleta, fraca ou pouco perceptível, em mais de 10% das células tumorais
2+	Marcação membranar completa, fraca a moderada, em mais de 10% das células tumorais
3+	Marcação membranar completa, forte, em mais de 10% das células tumorais

2.2. Hibridação fluorescente *in situ*

Os ensaios de FISH foram realizados no Serviço de Genética do IPO – Porto em todos os casos com marcação 3+, 2+ e 1+ e ainda em 19 casos negativos por IHC. Cortes histológicos de 5 µm de espessura, em lâminas de vidro SuperFrost® Plus, foram desparafinizados em duas séries de xilol seguidos de duas séries de etanol (8 minutos cada), lavados em 2xSSC, e colocados numa solução de NaSCN 1M a 80ºC durante 10 minutos. Seguidamente, as amostras foram digeridas em pepsina (6mg/mL) durante 22 minutos a 37ºC e posteriormente lavadas em 2xSSC e desidratadas numa série de concentrações crescentes de etanol (70%; 96%; 100%). Para avaliar a amplificação do gene *ERBB2* foi utilizada a sonda comercial HER-2/neu(ERBB2)/Alpha Satellite 17 (QBiogene®) específica para o gene *ERBB2*, marcado directamente com rodamina e para o centrómero do cromossoma 17 marcado directamente com fluoresceína. Depois de aplicada a sonda a cada amostra, as lâminas foram colocadas no sistema de desnaturação/hibridação Hybrite. A co-desnaturação realizou-se a 80ºC durante 7 minutos e a hibridização decorreu durante 18 horas a 37ºC, seguidas de lavagens pós-hidridização em 2xSSC/0.5% Igepal a 73ºC durante 5 minutos e 2x SSC/0.1% Igepal à temperatura ambiente durante 3 minutos. Após as lavagens os núcleos foram corados com DAPI. As imagens fluorescentes correspondentes a DAPI, Spectrum Green e Spectrum Orange foram sequencialmente capturadas com uma câmara Cohu 4900 CCD, usando um microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan acoplado a um sistema automático de filtros e utilizando o software CytoVision.

A sonda direccionada ao centrómero do cromossoma 17 constitui um controlo interno e, simultaneamente, define o estado de ploidia deste cromossoma. A amplificação do gene *ERBB2* foi definida pelo rácio ERBB2/CEP17 maior que dois, ou na presença de agregados de sonda *ERBB2*, numa população de 60 células tumorais. Os casos com rácio compreendido entre 2 e 2,2 foram considerados equívocos sendo avaliados com precaução. Para avaliação da amplificação do gene *ERBB2* foram considerados apenas núcleos não sobrepostos.

2.3. Análise estatística

Os dados categóricos foram analisados usando o teste qui-quadrado. Para dados paramétricos foi usado o teste t-student quando comparando duas médias. A probabilidade de sobrevivência para os diferentes subgrupos foi calculada usando o método Kaplan-Meier e o significado estatístico das diferenças foi avaliado pelo log-rank test. Todos os cálculos foram efectuados com o auxílio da ferramenta de software *SPSS for Windows*, v.15.

Resultados

Resultados

1. Sobre-expressão da proteína ERBB2

De um total de 463 casos de adenocarcioma gástrico analisados, 414 foram classificados como 0, seis como 1+, 18 como 2+ e 25 como 3+ (figura 7), correspondendo a marcação membranar completa (2+ e 3+) em 9,3% dos casos (tabela 4). De registar ainda que entre os casos sem marcação membranar (0), 35 apresentaram marcação citoplasmática. As células epiteliais normais adjacentes ao tumor não apresentaram imunoreactividade.

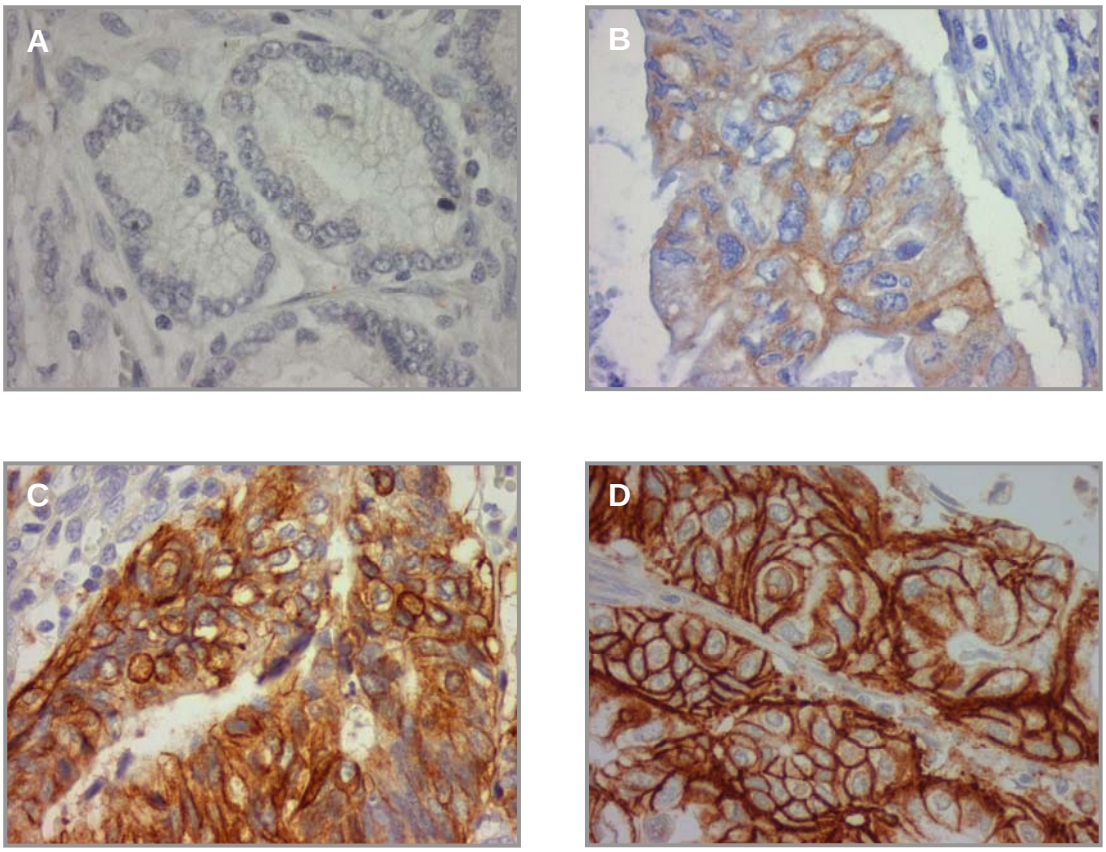

Figura 7: Marcação imunohistoquímica para ERBB2. Imagens de quatro carcinomas de tipo intestinal (ampliação 400x): (A) Sem marcação membranar (0); (B) Com marcação membranar incompleta (1+); (C) Com marcação membranar completa moderada (2+); (D) Com marcação membranar completa forte (3+).

Tabela 4. Resultados de IHC

IHC	n (%)
0	414 (89,4%)
1+	6 (1,3%)
2+	18 (3,9%)
3+	25 (5,4%)

2. Amplificação do gene *ERBB2*

Nas análises por FISH a amplificação foi detectada em 38 casos (ver figura 8). Quando comparados os resultados de FISH com IHC (tabela 5), todos os tumores com marcação 3+ apresentaram amplificação do gene *ERBB2*. Dos 18 tumores com marcação 2+, 12 (66,6%) apresentaram amplificação. De registar ainda que 4 dos 6 casos classificados como 2+ sem amplificação, apresentavam alterações do número de cópias do gene *ERBB2* e do centrómero do cromossoma 17, evidenciando polissomia. Entre os casos classificados como 1+, foi encontrada amplificação do gene *ERBB2* num deles. Dos casos com marcação citoplasmática analisados não foi encontrada qualquer alteração do gene *ERBB2*.

Tabela 5. Resultados das análises de FISH comparados com IHC

IHC	FISH		
	-	+	Total
0	19 (100%)	0 (0%)	19
1+	4 (80 %)	1 (20%)	5
2+	6 (33.4%)	12 (66.6%)	18
3+	0 (0%)	25 (100%)	25

As percentagens de sobre-expressão e amplificação observadas no presente trabalho estão apresentadas na tabela 6, na qual estão também apresentados os resultados obtidos por estudos similares em carcinoma gástrico.

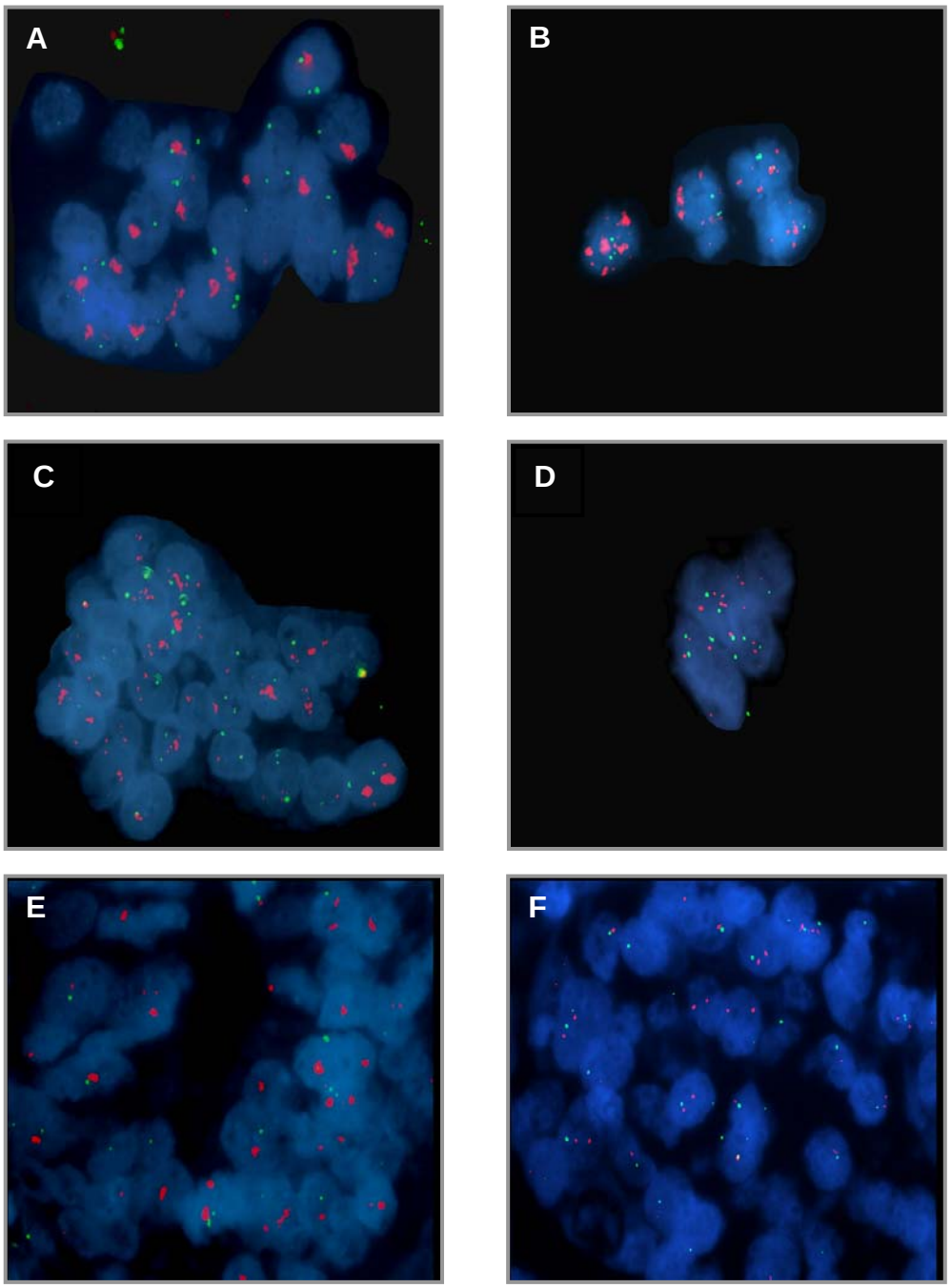

Figura 8: Amplificação do gene *ERBB2* visualizada por FISH. As sondas marcadas com fluorocromo vermelho são dirigidas ao gene *ERBB2* e as sondas marcadas com fluorocromo verde são dirigidas ao centrómero do cromossoma 17. Os núcleos são corados com DAPI. (Ampliação 1000x). A – carcinoma intestinal 3+ com amplificação; B – carcinoma difuso 3+ com amplificação; C – carcinoma intestinal 2+ com amplificação; D – carcinoma intestinal 2+ com polissomia; E – carcinoma intestinal 1+ com amplificação; F – carcinoma intestinal sem amplificação

Tabela 6. Sobre-expressão e amplificação de *ERBB2* em carcinoma gástrico num conjunto de estudos

Estudo		***ERBB2* status**		
Autor	Pacientes estudados (n)	Sobre-expressão IHC (IC 95%)	Amplificação FISH (IC 95%)	Amplificação Southern blot (IC 95%)
Presente estudo	463	9,3 (6,6 – 12)	8,2 (5,6 – 10,7)	-
Kim *et al* 2007	248	22,6 (17,3 – 28)	7,7 (4,3 – 11,1)	
Park *et al* 2006	182	15,9 (10,5 – 21,3)	3.8 (1 – 6,6)	-
Varis *et al* 2004	66	11 (3,3 – 18,7)	7,6 (1,1 – 14,1)	-
Takehana *et al* 2002	352	8,2 (5,3 – 11,1)	7,1 (4,4 – 9,8)	-
Nakajima *et al* 1998	128	16,4 (10 – 23)	-	11,7 (6 – 17,4)
David *et al* 1992	87 ; 30	5,2 (0,72 – 10,7)	-	23,3 (7,9 – 38,7)

3. Caracterização clínico-patológica dos casos com amplificação do gene *ERBB2*

A tabela 7 resume as características clínico-patológicas de todos os casos com marcação membranar completa (2+ e 3+) e incompleta, bem como o respectivo resultado por FISH.

As diferenças clínico-patológicas observadas entre os carcinomas gástricos com e sem amplificação de *ERBB2* estão resumidas na tabela 8. A amplificação está associada com o tipo intestinal de Lauren (*P*=0,004) e com o padrão de crescimento expansivo (*P*=0,021). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre amplificação do *ERBB2* e idade, sexo, estádio patológico ou tipo de cirurgia.

Tabela 7. Caracterização clínico-patológica dos casos com marcação membranar analisados por FISH

Caso	Sexo	Idade	Lauren	Ming	Estadio	pTMN	IHC	FISH
1	F	63	Int.	Exp.	IV	$pT_3N_2M_1$	3+	+
2	F	72	Int.	Exp.	III B	$pT_3N_2M_0$	3+	+
3	F	70	Int.	Exp.	III A	$pT_3N_1M_0$	2+	-
4	F	67	Int.	Inf.	IV	$pT_4N_1M_0$	3+	+
5	M	71	Int.	Exp.	II	$pT_3N_0M_0$	3+	+
6	M	61	Int.	Exp.	III A	$pT_3N_1M_0$	3+	+
7	F	75	Int.	Exp.	III A	$pT_3N_1M_0$	2+	-
8	M	60	Int.	Exp.	IV	$pT_3N_2M_1$	3+	+
9	M	65	Int.	Inf.	I B	$pT_2N_0M_0$	3+	+
10	F	47	Int.	Exp.	I A	$pT_1N_0M_0$	2+	+
11	M	70	Int.	Inf.	II	$pT_3N_0M_0$	3+	+
12	M	69	Int.	Inf.	II	$pT_2N_1M_0$	3+	+
13	F	76	Int.	Inf.	III A	$pT_3N_1M_0$	2+	+
14	M	53	Int.	Inf.	IV	$pT_4N_2M_1$	2+	-
15	F	67	Int.	Inf.	I A	$pT_1N_0M_0$	3+	+
16	F	65	Int.	Inf.	II	$pT_2N_1M_0$	3+	+
17	F	62	Int.	Inf.	III A	$pT_3N_1M_0$	3+	+
18	M	52	Int.	Inf.	IV	$pT_3N_1M_1$	2+	+
19	F	69	Int.	Inf.	III A	$pT_3N_1M_0$	3+	+
20	M	69	Int.	Exp.	III B	$pT_3N_2M_0$	3+	+
21	M	79	Int.	Inf.	II	$pT_3N_0M_0$	2+	-
22	F	77	Int.	Inf.	III A	$pT_3N_1M_0$	2+	-
23	F	69	Int.	Exp.	III A	$pT_3N_1M_0$	3+	+
24	M	82	Int.	Exp.	II	$pT_3N_0M_0$	3+	+
25	M	72	Int.	Exp.	II	$pT_3N_0M_0$	2+	+
26	F	77	Atípico	Exp.	I B	$pT_1N_1M_0$	2+	+
27	F	41	Atípico	Inf.	III B	$pT_3N_2M_0$	3+	+
28	F	60	Int.	Exp.	IV	$pT_4N_3M_0$	3+	+
29	F	75	Int.	Inf.	III B	$pT_4N_1M_0$	2+	+
30	M	80	Int.	Inf.	IV	$pT_4N_2M_1$	3+	+
31	F	44	Atípico	Inf.	III B	$pT_3N_2M_0$	2+	+
32	F	75	Int.	Exp.	II	$pT_3N_0M_0$	2+	-
33	F	56	Atípico	Inf.	IV	$pT_3N_2M_1$	3+	+
34	M	64	Int.	Exp.	II	$pT_3N_0M_0$	2+	+
35	F	33	Dif.	Inf.	IV	$pT_3N_3M_0$	3+	+
36	M	72	Int.	Inf.	III A	$pT_3N_1M_0$	3+	+
37	M	49	Int.	Inf.	IV	$pT_3N_2M_1$	3+	+
38	M	60	Dif	Inf.	IV	$pT_3N_2M_1$	2+	+
39	M	82	Int.	Exp.	III A	$pT_3N_1M_0$	3+	+
40	F	83	Int.	Exp.	I B	$pT_2N_0M_0$	2+	+
41	M	58	Int.	Exp.	III A	$pT_3N_1M_0$	2+	+
42	F	71	Int.	Exp.	III A	$pT_3N_1M_0$	2+	+
43	M	71	Atípico	Inf.	III B	$pT_3N_2M_0$	3+	+
44	F	78	Int.	Inf.	III A	$pT_3N_1M_0$	1+	+
45	M	67	Int.	Inf.	IV	$pT_3N_2M_1$	1+	-
46	F	49	Dif.	Inf.	II	$pT_2N_0M_0$	1+	-
47	F	30	Dif.	Inf.	II	$pT_2N_1M_0$	1+	-
48	F	86	Int.	Inf.	II	$pT_3N_0M_0$	1+	-

Abreviaturas: M – Masculino; F – Feminino, Int. – Intestinal; Dif. – Difuso; Inf. – Infiltrativo; Exp. – Expansivo.

Tabela 8. Comparação de características clinico-patológicas entre casos de carcinoma gástrico com e sem amplificação do gene *ERBB2* (256 casos com follow-up disponível)

	Amplificação de *ERBB2*		*P*
	Negativa (n = 218)	Positiva (n = 38)	
Idade	66 (± 10,8)	63 (± 13,6)	NS (0,330)
Sexo			NS (0,211)
Masculino	127 (58,3%)	18 (47,4%)	
Feminino	91 (41,7%)	20 (52,6%)	
Lauren*			0,004
Intestinal	114 (53,5%)	31 (84,2%)	
Difuso	55 (25,8%)	2 (5,3%)	
Atípico	41 (19,2%)	5 (10,5%)	
Inclass.	3 (1,49%)	-	
Ming*			0,021
Expansivo	56 (26%)	18 (47,4%)	
Infiltrativo	153 (71,2%)	20 (52,6%)	
Misto	6 (2,8%)	-	
Estádio clínico*			NS (0,852)
0-IA	26 (12,1%)	2 (5,3%)	
IB	21 (9,8%)	3 (7,9%)	
II	41 (19%)	7 (18,4%)	
IIIA	50 (23,3%)	10 (26,3%)	
IIIB	35 (16,3%)	7 (18,4%)	
IV	42 (19,5%)	9 (23,7%)	
Tipo de cirurgia*			NS (0,578)
Curativa	141 (72,3%)	23 (67,6%)	
Paliativa	54 (27,7%)	11 (32,4%)	

*Alguns dados clínicos não se encontravam disponíveis para a totalidade dos pacientes estudados.

4. Avaliação da sobrevivência

A análise da sobrevivência foi realizada numa população de 256 pacientes, dos quais 38 apresentavam amplificação do gene *ERBB2*.

Tendo em conta a população total (256), a percentagem de pacientes de adenocarcinoma gástrico que sobrevivem 5 anos após gastrectomia é ligeiramente menor nos pacientes que apresentam amplificação do gene *ERBB2* (50%) do que nos pacientes que não apresentam esta alteração genética (56%). A sobrevivência média dos pacientes com amplificação do gene *ERBB2* (69,9 meses) é menor em 8,5 meses quando comparada com a dos pacientes sem esta alteração genética (78,4 meses). No entanto, as diferenças na curva de Kaplan-Meier que avalia a população total (figura 9) não são estatisticamente significativas (*P*=0,468).

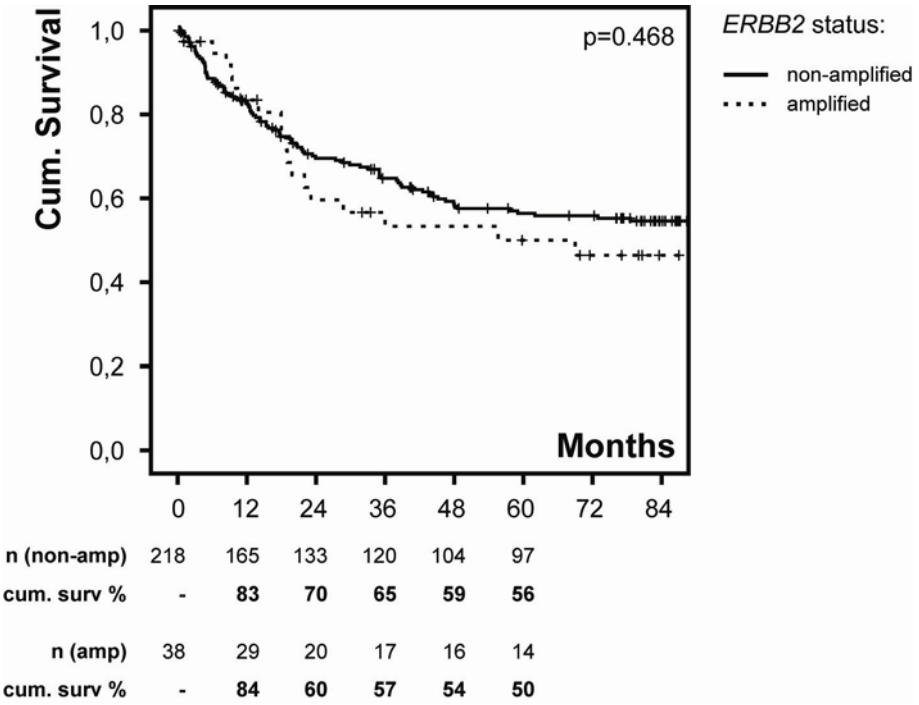

Figura 9: Curva de Kaplan-Meier que compara o evento morte com evidência de cancro no total de indivíduos estudados com carcinoma gástrico tendo em conta a presença/ausência de amplificação do gene *ERBB2.* Months: meses; n: nº de pacientes vivos com (amp) e sem (non-amp) amplificação; Cum. Surv %.: sobrevivência cumulativa.

Estratificando a população de acordo com a classificação histológica de Láuren, observa-se que os pacientes com carcinoma gástrico do tipo intestinal (ver figura 10) com amplificação do gene *ERBB2* apresentam uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de 51%, enquanto que entre os pacientes sem amplificação de *ERBB2* a taxa de sobrevivência após cinco anos é de 62% (*P*=0,268). A tendência para menor sobrevivência dos pacientes com amplificação do gene *ERBB2* verifica-se igualmente nos carcinomas de tipo difuso. O grupo de pacientes que não apresenta amplificação (55 indivíduos) não atinge 50% de mortalidade, enquanto que o grupo de pacientes com amplificação (2 indivíduos) apresenta 50% de mortalidade aos 9,4 meses (figura 11; *P*=0,062).

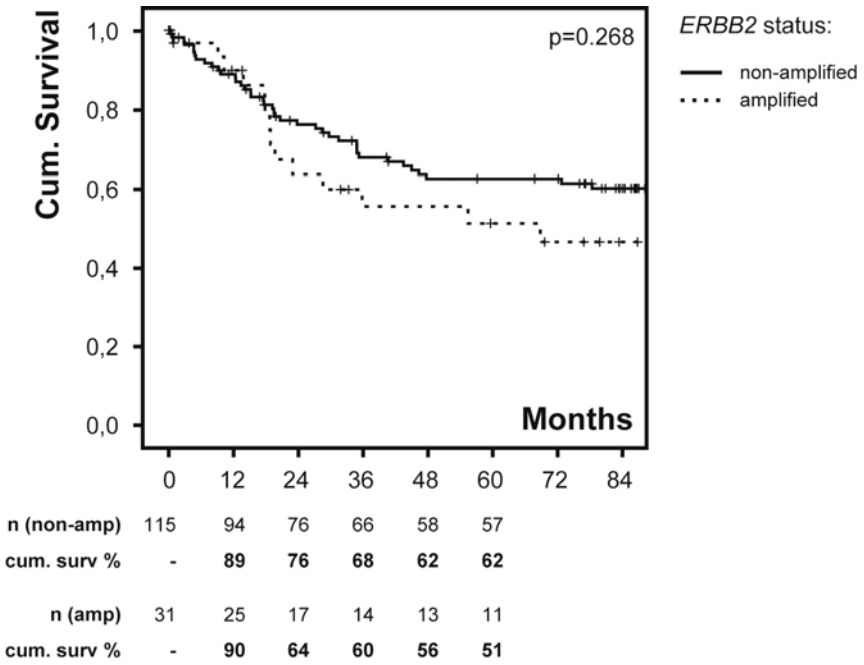

Figura 10: Curva de Kaplan-Meier que compara o evento morte com evidência de cancro nos indivíduos com carcinoma gástrico intestinal tendo em conta a presença/ausência de amplificação do gene *ERBB2.* Months: meses; n: nº de pacientes vivos com (amp) e sem (non-amp) amplificação; Cum. Surv %.: sobrevivência cumulativa

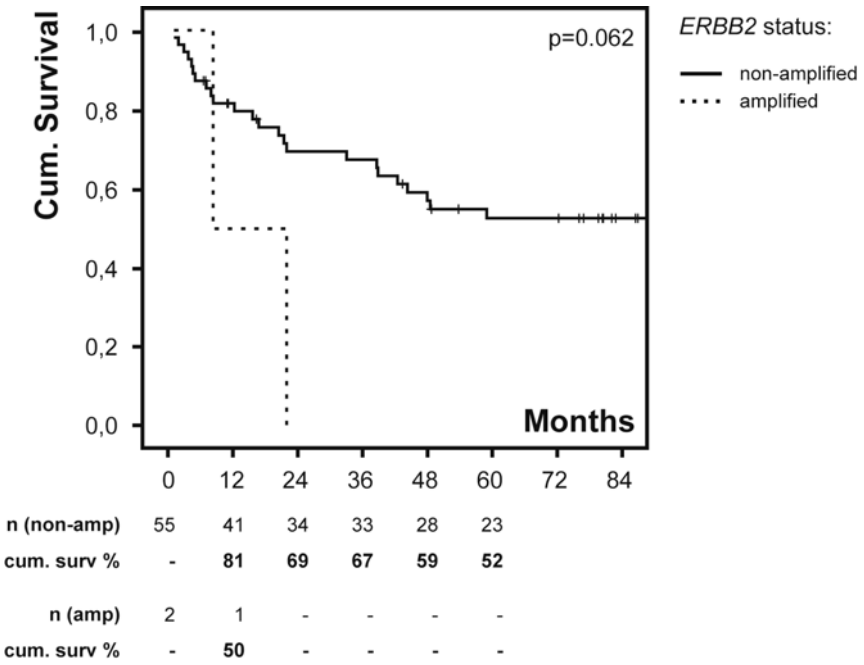

Figura 11: Curva de Kaplan-Meier que compara o evento morte com evidência de cancro nos indivíduos com carcinoma gástrico difuso tendo em conta a presença/ausência de amplificação do gene *ERBB2*. Months: meses; n: nº de pacientes vivos com (amp) e sem (non-amp) amplificação; Cum. Surv %.: sobrevivência cumulativa

A curva de Kaplan-Meier que compara a influência da amplificação do gene *ERBB2* na sobrevivência de pacientes de carcinoma gástrico com padrão de crescimento expansivo (figura 12) demonstra que o grupo de pacientes que não apresenta amplificação (57 indivíduos) não atinge 50% de mortalidade, enquanto que o grupo de pacientes com amplificação (18 indivíduos) apresenta 50% de mortalidade aos 69 meses. A sobrevivência média dos pacientes sem amplificação do gene *ERBB2* (99,3 meses) é superior em 25,8 meses quando comparada com a sobrevivência média dos pacientes com amplificação do gene *ERBB2* (73,5 meses). A comparação entre estes dois grupos é estatisticamente significativa (*P*=0,014). Por outro lado, nos pacientes com carcinoma gástrico com crescimento infiltrativo não se verificou diferenças significativas de sobrevivência entre pacientes com e sem amplificação do gene *ERBB2* (*P*=0,700).

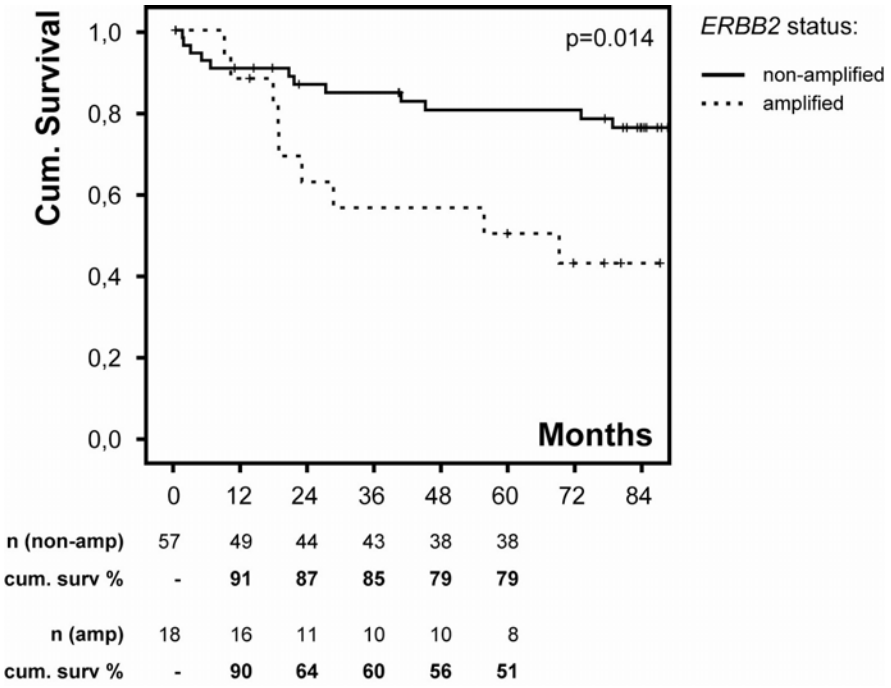

Figura 12: Curva de Kaplan-Meier que compara o evento morte com evidência de cancro nos indivíduos com carcinoma gástrico com crescimento expansivo tendo em conta a presença/ausência de amplificação do gene *ERBB2.* Months: meses; n: nº de pacientes vivos com (amp) e sem (non-amp) amplificação; Cum. Surv %.: sobrevivência cumulativa

Para além dos critérios histológicos foi também estudada a relevância da amplificação do gene *ERBB2* em pacientes com ou sem invasão dos gânglios linfáticos regionais. A curva de Kaplan-Meier que compara a influência da amplificação do gene *ERBB2* na sobrevivência de pacientes de carcinoma gástrico sem invasão dos gânglios linfáticos regionais (figura 13) demonstra que quer o grupo de pacientes

que não apresenta amplificação (70 indivíduos) como também o grupo de pacientes com amplificação (9 indivíduos) não atingem 50% de mortalidade no período de follow-up estudado. A sobrevivência média dos pacientes sem amplificação do gene *ERBB2* (112,9 meses) é superior em 22,6 meses quando comparada com a sobrevivência média dos pacientes com amplificação do gene *ERBB2* (90,3 meses). As diferenças encontradas não são estatisticamente significativas (*P*=0,153).

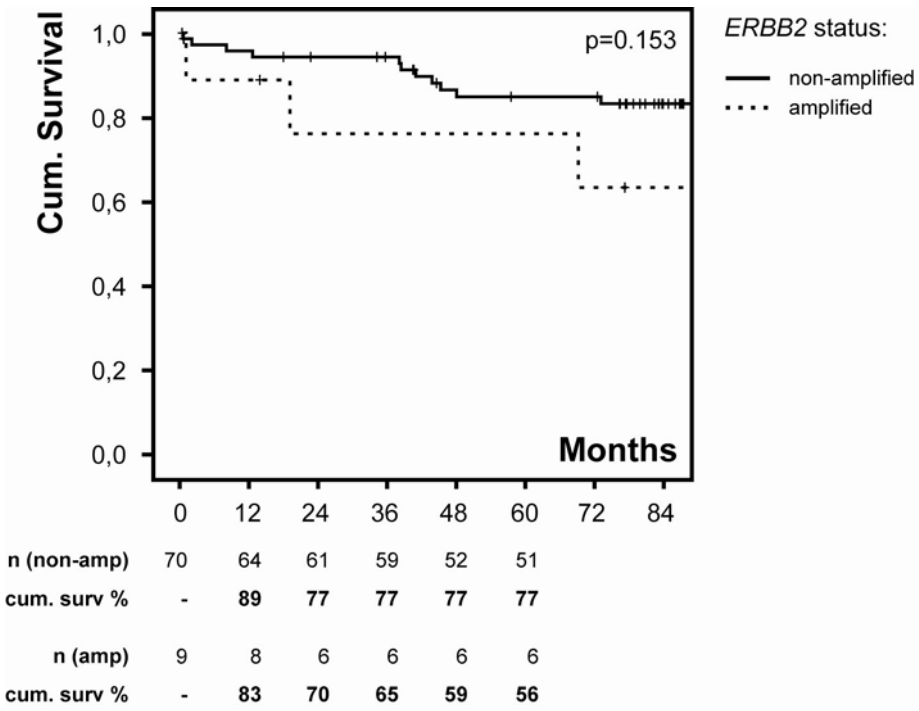

Figura 13: Curva de Kaplan-Meier que compara o evento morte com evidência de cancro nos indivíduos com carcinoma gástrico sem invasão dos gânglios linfáticos (N0) tendo em conta a presença/ausência de amplificação do gene *ERBB2.* Months: meses; n: nº de pacientes vivos com (amp) e sem (non-amp) amplificação; Cum. Surv %.: sobrevivência cumulativa

A curva de Kaplan-Meier que compara a influência da amplificação do gene *ERBB2* na sobrevivência de pacientes de carcinoma gástrico com invasão dos gânglios linfáticos regionais (N1, N2 e N3) demonstra que não existe diferença entre os grupos com e sem amplificação (*P*=0,777).

Discussão

Discussão

A pesquisa de sobre-expressão e amplificação do *ERBB2* é já efectuada por rotina para identificar doentes com cancro da mama que podem beneficiar de quimioterapia específica com o anticorpo monoclonal trastuzumab. Está demonstrado que este tratamento aumenta a taxa e duração de resposta objectiva em doentes com cancro da mama metastático com sobre-expressão de ERBB2, resultando numa redução do risco relativo de morte de 20% após uma média de seguimento de 30 meses.[89] Recentemente, Romond *et al*[111] comparando tratamento composto exclusivamente por quimioterapia sistémica com tratamento similar acrescido de terapia com anticorpo monoclonal trastuzumab, em dois grupos de pacientes com carcinoma da mama com evidência de sobre-expressão da proteína ERBB2 (marcação 3+ por IHC) ou amplificação por FISH, observou uma taxa de sobrevivência livre de doença três anos após cirurgia de 87% nos pacientes aos quais foi administrada terapia combinada com trastuzumab contra 75% nos pacientes com terapia convencional. A adição de trastuzumab à terapia convencional resultou numa redução de 52% de recorrência da doença num período de quatro anos após a cirurgia. Num outro ensaio, Piccart-Gebhart *et al*[112] demonstrou também que a adição de trastuzumab à terapia adjuvante convencional resulta numa redução em 46% do risco de recorrência dois anos após cirurgia.

A identificação de um subgrupo de doentes com adenocarcinoma do estômago associado a amplificação do *ERBB2* poderá eventualmente permitir que estes doentes possam beneficiar de terapêutica dirigida a este receptor membranar.

1. Detecção de sobre-expressão e amplificação do gene *ERBB2*

Existe actualmente um leque variado de metodologias que possibilitam detectar a presença de sobre-expressão e amplificação de *ERBB2* em carcinomas. A abordagem pode ser feita a diferentes níveis: as técnicas de FISH, PCR quantitativo e Southern blot fornecem informação sobre alteração do número de cópias do gene. A nível da transcrição, a técnica de RT-PCR quantitativo permite avaliar os níveis de RNA mensageiro, fornecendo deste modo informação sobre os níveis de expressão. Por último, a pesquisa pode ser feita procurando avaliar os níveis da proteína ERBB2. Para tal efeito pode recorrer-se a técnicas de imunohistoquímica (IHC) ou Western blot.

O primeiro objectivo do presente estudo consistiu em determinar a

percentagem de casos com amplificação do gene *ERBB2* numa amostra significativa de pacientes com adenocarcinoma gástrico (n=463). Para tal efeito foi realizada uma primeira triagem envolvendo todos os casos, recorrendo à avaliação da expressão da proteína ERRB2 por imunohistoquímica. Seguidamente, todos os casos com marcação membranar completa (2+ e 3+) e incompleta (1+) foram seleccionados para análises por FISH para ser avaliada a amplificação do gene *ERBB2*. Adicionalmente, 19 casos sem marcação membranar seleccionados aleatoriamente foram também avaliados por FISH. Como as amostras disponíveis eram de material de arquivo de peças de gastrectomia, o método de detecção a utilizar neste estudo teria obrigatoriamente que ser exequível em secções de tecido arquivadas, fixadas em formaldeído e embebidas em parafina. Outro requisito importante é a capacidade de preservar os detalhes morfológicos do tecido. As metodologias que melhor preenchem estes requisitos são as metodologias *in situ* (imunohistoquímica e hibridização fluorescente *in situ*). Comparada com FISH, a IHC requer menos tempo, o procedimento é relativamente simples e é menos dispendiosa. No entanto, esta metodologia encerra algumas desvantagens, uma vez que os seus resultados podem ser influenciados pela fixação do tecido, processamento e recuperação antigénica. Embora a classificação da marcação membranar seja realizada segundo critérios internacionais (Herceptest) um estudo de Tsuda *et al*[112] revela que existe variabilidade na classificação da marcação membranar entre observadores. Neste trabalho, de modo a minimizar as fragilidades desta técnica, esta foi realizada num centro (IPATIMUP) com vasta experiência neste procedimento e os resultados analisados por um patologista igualmente experiente.

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) permite a visualização directa da amplificação genética no núcleo, assim como uma contagem objectiva de genes e cromossomas. Esta técnica é actualmente considerada *gold standard* para a detecção de amplificação do gene *ERBB2,* já que apresenta alta sensibilidade (96.5%) e alta especificidade (100%).[113] Estudos paralelos de IHC e FISH em carcinoma de mama revelaram que a marcação 3+ por IHC tem uma concordância com a amplificação detectada por FISH que varia entre 89% e 94%, enquanto que apenas 24-25% dos casos com marcação 2+ apresentam amplificação do gene *ERBB2.*[114,115] Está também determinado que a amplificação tem mais valor preditivo do que a sobre-expressão relativamente à sensibilidade ao anticorpo monoclonal trastuzumab.[91] Pacientes de carcinoma gástrico da mama com amplificação detectada por FISH apresentam maior benefício de terapia dirigida com trastuzumab.[102]

O presente estudo é o maior até agora realizado com o objectivo de avaliar a presença e relevância clínica da sobre-expressão e amplificação do gene *ERBB2* em

pacientes com adenocarcinoma do estômago. Os resultados do rastreio inicial de sobre-expressão da proteína ERBB2 revelaram que 90,7% dos adenocarcinomas gástricos não apresentam sobre-expressão de ERBB2. A percentagem de casos com marcação membranar completa por IHC (2+ e 3+) obtidos no presente estudo (9.3%) está de acordo com a maioria dos estudos até hoje realizados em adenocarcinoma gástrico (ver tabela 6). Foi pesquisada amplificação do gene *ERBB2* em 25 casos negativos para a sobre-expressão proteica de ERBB2 (seis casos 1+ e dezanove casos 0), sendo que apenas um caso com marcação 1+ por IHC apresentou amplificação do gene *ERBB2* por FISH. A opção de rastreio inicial por IHC é sustentada com base na consensual evidência da literatura no que concerne à correlação entre IHC e FISH para casos que não apresentem sobre-expressão proteica (0/1+). A título de exemplo, Dowsett *et al*[116] estudou a correlação entre IHC (Herceptest) e FISH em 426 adenocarcinomas de mama (estudo realizado em três centros de referência do Reino Unido) e demonstrou que 99.3% dos casos negativos por imunohistoquímica (0/1+) não apresentam amplificação do gene *ERBB2*, o que não difere significativamente da taxa de falsos negativos da IHC detectada neste estudo (4% vs 0,7%; P=0,234).

Relativamente aos casos com marcação membranar completa fraca a moderada (2+) em mais de 10% das células malignas (18 no total), foi encontrada amplificação em 12 casos (63,2%). Dos seis casos 2+ negativos para amplificação, quatro apresentaram alterações no número de centrómeros (CEP17 > 2) e de cópias do gene *ERBB2* (LSI 17q11-q12 > 2), mas com um rácio *ERBB2*/CEP17 inferior a 2. Polissomia do cromossoma 17 pode justificar a sobre-expressão proteica moderada detectada nestes casos. Nos restantes dois carcinomas 2+ sem amplificação ou polissomia, a detecção de sobre-expressão proteica poderá ser explicada por outro mecanismo que não a amplificação ou poderá tratar-se de falsos positivos por motivos inerentes à metodologia de IHC.

Este estudo demonstrou uma correlação perfeita entre as análises por IHC e FISH nos adenocarcinomas gástricos com marcação 0 e 3+. Na literatura, com a excepção de Park *et al*[117] que observou uma correlação de apenas 45,5%, todos os restantes estudos que utilizaram as técnicas de IHC e FISH para avaliar expressão e amplificação de *ERBB2* em carcinomas gástricos registaram uma correlação de 100% entre a marcação 3+ por IHC e a amplificação do gene *ERBB2* detectada por FISH.[107,118,119] Nos estudos acima enunciados os critérios para classificar uma célula com amplificação por FISH não foram os mesmos. Enquanto Park *et al*[117] e Takehana *et al*[107] consideraram amplificação quando a célula neoplásica apresenta mais de 10 sinais *ERBB2* ou um agregado de sinal, Kim *et al*[118] considerou amplificação quando

uma célula apresentasse um rácio dos sinais *ERBB2*/CEP17 maior ou igual a 2. Assim, a menor correlação entre carcinomas 3+ e amplificação por FISH verificada por Park *et al* não pode ser justificada pelo diferente critério usado para classificar amplificação, pois Takehana *et al* utilizou o mesmo critério, obtendo no entanto uma correlação perfeita entre casos IHC 3+ e amplificação por FISH. Alguns autores não encontraram amplificação de *ERBB2* nos carcinomas classificados como 0 e 1+ por IHC[107,117], no entanto importa referir que nesses estudos não foram avaliados por FISH todos os carcinomas classificados como 1+. Por outro lado, tal como no presente estudo em que se registou um carcinoma 1+ com amplificação do gene *ERBB2*, Kim *et al* analisou por FISH todos os casos 1+ obtidos, registando amplificação do gene *ERBB2* em 4% dos carcinomas. Assim, tendo em conta os dados do presente trabalho e da restante literatura, recomenda-se que todos os adenocarcinomas gástricos com marcação 2+ ou 1+ sejam analisados por FISH para evitar os falsos positivos (2+) e os falsos negativos (1+) por IHC.

O estudo de David *et al*[56] foi pioneiro em Portugal na pesquisa de sobre-expressão e amplificação do gene *ERBB2* em adenocarcinomas gástricos primários e suas metástases, usando as técnicas de imunohistoquimica para avaliar os níveis de expressão da proteína ERBB2 e Southern blot para avaliar a amplificação. Numa série de 87 carcinomas gástricos, seis tumores (6.9%) apresentaram sobre-expressão e amplificação nos tumores primários e/ou nas respectivas metástases (ganglionares e hepáticas), sendo que num caso foi apenas observada sobre-expressão na metástase ganglionar. Foi possível realizar análise Southern em cinco dos seis casos com sobre-expressão da proteína ERBB2 tendo-se observado amplificação de *ERBB2* em todos os casos analisados. Adicionalmente observou-se amplificação de ERBB2 em tumores primários que não apresentaram sobre-expressão proteica. Com base na caracterização histológica, foi também documentado que a amplificação do gene *ERBB2* identifica um grupo de adenocarcinomas gástricos agressivos que partilham entre si características como invasão venosa e linfática.

Recentemente, Kim *et al*[118] e Park *et al*[117], utilizando IHC e FISH, avaliaram a expressão e amplificação do gene *ERBB2* em populações de 248 e 182 pacientes com adenocarcinoma gástrico, respectivamente. Ambos os autores detectaram uma percentagem de marcação membranar completa (2+ e 3+) superior à do presente estudo (9,3%), Kim *et al* em 22,6% dos carcinomas estudados e Park *et al* em 15,9%. No entanto, a percentagem de carcinomas com amplificação do gene *ERBB2* (Kim *et al* 7,7%, Park *et al* 3,8%) é inferior aos 8,2% registados no nosso estudo. Os diferentes anticorpos anti-ERBB2 utilizados para detecção da sobre-expressão de ERBB2 nestes estudos, Kim *et al* (A0485, DAKO, Carpinteria, CA) e Park *et al* (Zymed Labs, South

San Francisco, CA), poderão justificar o maior número de falsos positivos por IHC, para além de possíveis diferenças na classificação realizada pelo patologista.

2. Papel da amplificação do gene *ERBB2* nos vários tipos histológicos de adenocarcinoma gástrico

Na carcinogénese gástrica estão documentadas alterações genéticas que são exclusivas de determinados fenótipos, como por exemplo as mutações do gene CDH1, que codifica a proteína de adesão E-caderina, que são características de carcinomas difusos.[120,121] Vários autores consideram que a amplificação do gene *ERBB2* é somente observada em carcinomas intestinais.[107,122] Os resultados deste estudo não corroboram essa observação, já que dos 38 carcinomas com amplificação, 31 são do tipo intestinal, 5 são atípicos e dois são de tipo difuso. Na literatura, alguns autores detectaram igualmente esta alteração genética em carcinomas difusos, sendo em todos os estudos um evento pouco frequente.[108,117,118]

Os carcinomas gástricos mistos constituem um excelente modelo para analisar no mesmo tumor a sobre-expressão e amplificação do gene *ERBB2* em regiões com padrão histológico divergente. No presente estudo observou-se em dois carcinomas mistos marcação membranar completa por IHC tanto nas células isoladas como no componente sólido, sendo a amplificação posteriormente comprovada por FISH. Uma vez que se trata do mesmo carcinoma, este terá possivelmente a mesma origem clonal. Se as células malignas com diferentes fenótipos possuem a mesma alteração, então essa alteração terá ocorrido num estádio inicial da carcinogénese, anterior às alterações genéticas e/ou epigenéticas que originaram as diferenças fenotípicas observadas. Foi também detectada amplificação do gene *ERBB2* em dois carcinomas intestinais em estádio inicial da progressão tumoral ($T_1N_0M_0$) o que reforça a hipótese de se tratar de uma alteração inicial na carcinogénese gástrica. Na literatura vários autores detectaram também amplificação do gene ERBB2 em carcinomas gástricos em estádios iniciais.[56,117,118]

As diferenças fenotípicas entre os carcinomas gástricos têm motivado diversos estudos. Recentemente, Carvalho *et al*[123] postulou que a alteração no número de cópias de DNA pudesse explicar a diferença fenotípica observada em carcinomas gástricos mistos. Para verificar esta hipótese, estudou 12 carcinomas gástricos mistos por array-CGH analisando separadamente os componentes distintos (intestinal e difuso) de cada tumor. Não foram encontradas diferenças significativas no número de cópias de DNA entre os componentes intestinal e difuso do mesmo tumor.

Curiosamente, num caso de carcinoma gástrico misto foi detectada amplificação de uma região do cromossoma 17q complementar ao BAC RP11-94L15, aonde está localizado o gene *ERBB2*. A amplificação do gene *ERBB2* foi observada na região intestinal do tumor e também no componente difuso. Este resultado vai de encontro ao observado no presente trabalho em que também se observa amplificação em diferentes componentes de um carcinoma gástrico misto.

Do mesmo modo, van Grieken *et al*[124] não encontrou quaisquer diferenças no número de cópias de DNA comparando carcinomas com padrão unicamente intestinal ou difuso. Excluindo diferenças no padrão da alteração do número de cópias de DNA, as diferenças fenotípicas patentes nos adenocarcinomas gástricos poderão ser explicadas por mutações pontuais, micro-delecções, translocações equilibradas, e alterações epigenéticas.

3. Valor prognóstico da amplificação do gene *ERBB2*

Terminada a caracterização da população estudada quanto à sobre-expressão e amplificação do gene *ERBB2*, a última fase deste estudo tinha como objectivo inferir sobre a relevância prognóstica da alteração genética que foi com sucesso detectada e caracterizada. Para tal efeito, procedeu-se à análise estatística dos dados de follow-up recolhidos. A classificação TNM da população estudada demonstrou correlação significativa com prognóstico (figura 6), indicando deste modo que a população estudada é representativa da população geral de pacientes de adenocarcinoma gástrico. Na comparação entre os casos com e sem amplificação *ERBB2* não foram observadas diferenças em termos de idade, sexo, estádio clínico e tipo de cirurgia.

A primeira abordagem consistiu em comparar a sobrevivência de todos os casos com amplificação do gene *ERBB2* (38) com a sobrevivência de 218 pacientes sem amplificação deste gene escolhidos aleatoriamente do conjunto inicial de 463 pacientes (figura 10). Pese embora os pacientes com amplificação apresentarem indicadores como menor sobrevivência média e menor taxa de sobrevivência aos cinco anos (ver *Resultados - 5.3*), as diferenças observadas não são estatisticamente significativas (P=0,468). A realização da mesma análise comparando pacientes com e sem sobre-expressão do receptor ERBB2 revelou ser menos eficaz na distinção de pacientes com pior prognóstico (P=0,591). De facto, segundo Pauletti *et al*, que estudou a relação IHC/FISH para avaliar a alteração de ERBB2 em 900 pacientes de carcinoma da mama, a probabilidade de sobrevivência de pacientes com sobre-

expressão de ERBB2 mas sem amplificação genética é indistinguível estatisticamente da de pacientes que são negativos para ambas as técnicas.[91]

A heterogeneidade clínico-patológica dos dois grupos de pacientes comparados com base na amplificação do gene *ERBB2* minimizou as diferenças ao serem incluídos no grupo de pacientes sem amplificação indivíduos com doença de cariz agressivo (por exemplo carcinomas de tipo difuso) e consequentemente pior prognóstico. Este resultado preliminar direccionou a análise de sobrevivência para a comparação entre pacientes com o mesmo tipo histológico.

A curva de sobrevivência de pacientes com carcinoma gástrico de tipo intestinal, (figura 11) demonstra uma tendência para pior prognóstico dos pacientes com amplificação do gene *ERBB2*, embora a diferença não seja estatisticamente significativa (*P*=0,263). Resultado similar foi obtido por Kim *et al* ao associar carcinomas gástricos intestinais com amplificação do gene *ERBB2* a prognóstico desfavorável, ainda que a diferença também não tenha sido estatisticamente significativa (*P*=0,152). Também o critério para identificação de amplificação utilizado pelo autor foi similar ao do presente trabalho (rácio ERBB2/CEP17> 2). A correlação entre a amplificação do gene *ERBB2* e o tipo histológico intestinal é uma observação transversal na literatura. Este facto indica que os pacientes deste subgrupo histológico serão os que potencialmente mais benefícios obteriam da terapia dirigida ao gene *ERBB2*, sendo espectável um aumento da qualidade e esperança de vida destes pacientes.

Em relação aos carcinomas gástricos de tipo difuso foi observado pior prognóstico para pacientes com amplificação de *ERBB2* (*P*=0,062). Contudo, como foram avaliados apenas dois casos com amplificação, esta relação carece de posterior confirmação comparando um maior número de casos. Para além disso, os dois carcinomas difusos estão numa fase avançada da doença (estádio clínico IV) o que poderá por si só justificar a menor sobrevivência observada. Os pacientes incluídos neste subgrupo específico poderão obter benefícios da terapia dirigida, particularmente se este evento ocorrer precocemente na carcinogénese gástrica.

Os carcinomas gástricos com padrão de crescimento expansivo são caracterizados por melhor prognóstico comparativamente com carcinomas infiltrativos.[125] Neste estudo os pacientes com carcinoma gástrico expansivo com amplificação do gene *ERBB2* (figura 13) têm pior prognóstico em comparação com os que não apresentam amplificação, sendo a diferença de sobrevivência aos 5 anos superior a 20%. O subgrupo que apresenta amplificação atinge os 50% de mortalidade aos 69 meses enquanto que o grupo de pacientes que não apresenta amplificação não chega a atingir 50% de mortalidade. A diferença encontrada é estatisticamente

significativa (*P*=0,014). Assim, a pesquisa de amplificação do gene *ERBB2* num carcinoma gástrico expansivo permite discriminar pacientes que poderão ter pior prognóstico e que, caso seja equacionada terapia adjuvante, poderão eventualmente beneficiar de terapia dirigida com o anticorpo monoclonal trastuzumab.

Relativamente aos pacientes com carcinoma gástrico infiltrativo, a comparação da sobrevivência dos pacientes com e sem amplificação do gene *ERBB2* (*P*=0,904) indica que a presença de amplificação de *ERBB2* nas células malignas com crescimento infiltrativo não lhes confere vantagem evolutiva face às células malignas que não apresentam essa alteração genética

Outro parâmetro patológico em que foi avaliada a relevância da amplificação do gene *ERBB2* foi a presença/ausência de invasão dos gânglios linfáticos regionais. Apesar da diferença não ser estatisticamente significativa (*P*=0,153) a curva de sobrevivência dos pacientes com amplificação do gene *ERBB2* exibe uma clara tendência para uma menor sobrevivência no grupo de doentes sem metástases ganglionares. Num estudo similar em carcinoma de mama, Pauletti *et al*[91] observou igualmente uma tendência para menor sobrevivência entre os pacientes sem invasão dos gânglios linfáticos com amplificação de *ERBB2* (*P*=0,189). Em relação ao grupo com invasão dos gânglios linfáticos regionais (pN1; pN2; pN3) não foram observadas quaisquer diferenças entre os pacientes que apresentam e os que não apresentam amplificação de *ERBB2.*

Park *et al*[117] avaliou a sobrevivência de 182 pacientes de carcinoma gástrico tratados com gastrectomia e observou que a taxa de sobrevivência aos cinco anos nos pacientes (7) nos quais foi detectada amplificação do gene *ERBB2* por FISH foi de 21,4%, ao passo que 63% dos pacientes sem amplificação (175) estavam vivos ao fim de cinco anos ($P < 0,05$).[117] A principal diferença destes dados com os obtidos no presente trabalho reside na percentagem de pacientes que sobreviveram cinco anos após cirurgia (21,4% em Park *et al*, 50% no presente estudo). Os dados indicam que o grupo de pacientes com amplificação obtido por Park *et al* têm pior prognóstico do que os pacientes seleccionados pelo presente estudo, o que indica que os critérios que definem amplificação utilizados pelo autor são mais eficazes na identificação de pacientes com pior prognóstico. Por outro lado, é possível que a utilização deste critério exclua pacientes que poderão beneficiar de terapia dirigida.

De um modo geral, neste estudo a amplificação do gene *ERBB2* revelou valor prognóstico essencialmente em subgrupos que teriam à partida um prognóstico mais favorável. Em casos de doença avançada, o valor prognóstico de indicadores como o estadiamento TNM sobrepõe-se à importância da amplificação do gene *ERBB2*. No entanto a conjugação destes indicadores de prognóstico poderá ser útil, uma vez que

permite segregação entre grupos com características clínico-patológicas semelhantes, obtendo deste modo uma informação de prognóstico mais específica.

Ao longo da discussão foram já abordadas as limitações inerentes às técnicas seleccionadas, assim como a forma como foram minimizadas. No entanto, é também relevante discutir as limitações do desenho do estudo. A abordagem retrospectiva depende da análise de processos clínicos arquivados de pacientes, alguns deles já falecidos. Assim, constituem a única informação sobre os pacientes. No entanto, é de realçar que na grande maioria dos casos foi possível obter a informação pretendida.

4. Perspectivas para terapia dirigida ao gene *ERBB2* em carcinoma gástrico

Estudos recentes indicam que o anticorpo trastuzumab poderá ter efeito anti-tumoral noutras neoplasias malignas para além do carcinoma da mama. Estudos em linhas celulares gástricas demonstram que o trastuzumab não só inibe a proliferação das células tumorais com sobre-expressão da proteína ERBB2, como também aumenta a citotoxicidade dos agentes quimioterapeuticos convencionais.[126] Tanner *et al*[108] comparou a resposta a trastuzumab de uma linha celular gástrica (N87) e de mama (SKBR-3), sendo que ambas apresentaram níveis elevados de amplificação de *ERBB2* detectada por FISH. Nesta experiência observou que o anticorpo monoclonal trastuzumab foi igualmente eficaz na inibição do crescimento tanto da linha celular de mama como da linha celular gástrica. Posteriormente, verificou *in vivo* a inibição do crescimento das células tumorais gástricas (N87) usando doses mensais de trastuzumab em tumores enxertados em ratinhos.[108]

A somar às evidências experimentais acima enunciadas, Rebischung *et al*[127] reportou um caso clínico em que foi administrado trastuzumab em combinação com agentes terapêuticos convencionais a uma paciente com adenocarcinoma de estômago (de tipo intestinal) com sobre-expressão da proteína ERBB2 (3+), tendo observado uma resposta superior à média dos pacientes tratados com quimioterapia convencional.

Actualmente, está a decorrer um ensaio clínico (ToGA study) levado a cabo por uma empresa farmacêutica multinacional que pretende avaliar a resposta dos pacientes com adenocarcinoma de estômago avançado com metástases nos gânglios linfáticos regionais, comparando para tal dois grupos. Um dos grupos será tratado com uma combinação de agentes quimioterápicos convencionais e trastuzumab, ao passo que ao outro grupo de pacientes apenas serão administrados agentes quimioterápicos convencionais. Neste ensaio clínico participam hospitais de mais de 20 países

(Portugal incluído) dos cinco continentes. São esperados resultados deste ensaio clínico (fase III) no ano de 2008. A confirmar-se o aumento da sobrevivência dos pacientes que receberam terapia combinada (trastuzumab + agentes convencionais), será uma melhoria no tratamento desta doença. A terapia dirigida a alvos específicos é uma nova abordagem que está a revolucionar a terapia do cancro, uma vez que procura actuar exclusivamente nas células tumorais, minimizando deste modo os efeitos colaterais da terapia nos pacientes.

Conclusão

Conclusão

O presente trabalho permitiu comprovar a eficácia da identificação de pacientes que poderão beneficiar da terapia dirigida com o anticorpo trastuzumab, utilizando para tal efeito técnicas de imunohistoquímica (IHC) e hibridação fluorescente *in situ* (FISH). A detecção de alterações no número de cópias do gene *ERBB2* (FISH) mostrou ser mais eficaz na identificação de pacientes com pior prognóstico do que a detecção de sobre-expressão do receptor ERBB2 (IHC). De facto, a análise por FISH distingue subgrupos de pacientes com pior prognóstico, apresentando diferenças de sobrevivência estatisticamente significativas.

Os resultados do presente estudo podem contribuir para uma melhoria do tratamento actual do carcinoma do estômago, uma vez que, ao permitir seleccionar adequadamente doentes para uma quimioterapia específica já disponível no mercado, é plausível que aumente a taxa e o tempo de resposta ao tratamento de uma doença com particular relevância em Portugal. Com efeito, no quadro da União Europeia, Portugal apresenta das taxas de incidência de carcinoma gástrico mais elevadas.

À luz dos dados de incidência de cancro gástrico da IARC para 2002 e tendo em conta a percentagem de pacientes que apresentam amplificação do gene *ERBB2* observada neste trabalho, dos 2670 de portugueses que são anualmente diagnosticados com esta doença, 229 poderão vir a beneficiar de terapia dirigida a este alvo molecular.

Referências bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J & Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* **55**, 74-108 (2005).

2. Parkin DM, Pisani P & Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int. J. Cancer* **54**, 594-606 (1993).

3. Ferlay J., Bray F & Pisani P. GLOBOCAN 2002: *Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 2.0*. IARC Press, Lyon (2004).

4. Parkin DM. International variation. *Oncogene* **23**, 6329-6340 (2004).

5. Correa P. Is gastric carcinoma an infectious disease? *N. Engl. J. Med.* **325**, 1170-1171 (1991).

6. Fox JG & Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J. Clin. Invest* **117**, 60-69 (2007).

7. Yang D, Tannenbaum SR, Buchi G & Lee GC. 4-Chloro-6-methoxyindole is the precursor of a potent mutagen (4-chloro-6-methoxy-2-hydroxy-1-nitroso-indolin-3-one oxime) that forms during nitrosation of the fava bean (Vicia faba). *Carcinogenesis* **5**, 1219-1224 (1984).

8. Vauhkonen M, Vauhkonen H & Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **20**, 651-674 (2006).

9. Siurala M, Isokoski M, Varis K & Kekki M. Prevalence of gastritis in a rural population. Bioptic study of subjects selected at random. *Scand J. Gastroenterol.* **3**, 211-223 (1968).

10. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N & Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. *Gut* **40**, 297-301 (1997).

11. Enroth H, Kraaz W, Engstrand L, Nyren O & Rohan T. Helicobacter pylori strain types and risk of gastric cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **9**, 981-985 (2000).

12. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Perez-Perez GI, Flores-Gutierrez JP & Tijerina-Menchaca R. Association of gastric cancer, HLA-DQA1, and infection with Helicobacter pylori CagA+ and VacA+ in a Mexican population. *J. Gastroenterol.* **39**, 1138-1142 (2004).

13. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, Capelinha AF, Quint W, Caldas C, van Doorn LJ, Carneiro F & Sobrinho-Simoes M. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 1680-1687 (2002).

14. Bravo LE, van Doom LJ, Realpe JL & Correa P. Virulence-associated genotypes of Helicobacter pylori: do they explain the African enigma? *Am. J. Gastroenterol.* **97**, 2839-2842 (2002).

15. Perez-Perez GI, Garza-Gonzalez E, Portal C & Olivares AZ. Role of cytokine polymorphisms in the risk of distal gastric cancer development. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**, 1869-1873 (2005).

16. Koh T & Wang T. Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, managment. M Feldman, L.Friedman & M.Sleisenger (eds.), pp. 829-855 (W.B. Saunders Co, Philadelphia, Pennsylvania USA,2002).

17. El Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF, Jr. & Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* **404**, 398-402 (2000).

18. Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C, Amorim A, Seruca R, Caldas C, Carneiro F & Sobrinho-Simoes M. Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* **121**, 823-829 (2001).

19. Mourant AE, Kopec AC & Domaiewska-Sobczak K. Blood group and diseases. A study of associations of diseases with blood groups and other polymorphisms. *In Oxford, Oxford Medical Publications.* (1978).

20. Carvalho F, Seruca R, David L, Amorim A, Seixas M, Bennett E, Clausen H & Sobrinho-Simoes M. MUC1 gene polymorphism and gastric cancer--an epidemiological study. *Glycoconj. J.* **14**, 107-111 (1997).

21. Fuchs CS & Mayer RJ. Gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **333**, 32-41 (1995).

22. Black RJ, Bray F, Ferlay J & Parkin DM. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur. J. Cancer* **33**, 1075-1107 (1997).

23. Lauren T. Two histologic main types of gastric cancer. *Acta Pathol Microbiol Scand* **64**, 34 (1965).

24. Carneiro F. Classification of gastric carcinomas. *Curr Diag Pathol* **4**, 51-59 (1997).

25. Imai T, Kubo T & Watanabe H. Chronic gastritis in Japanese with reference to high incidence of gastric carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **47**, 179-195 (1971).

26. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* **52**, 6735-6740 (1992).

27. Ming SC. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: A critical review. *Gastric. Cancer* **1**, 31-50 (1998).

28. Ming SC. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer* **39**, 2475-2485 (1977).

29. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S & Gentile A. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer* **70**, 50-55 (1992).

30. Lynch HT, Grady W, Suriano G & Huntsman D. Gastric cancer: new genetic developments. *J. Surg. Oncol.* **90**, 114-133 (2005).

31. Aarnio M, Salovaara R, Aaltonen LA, Mecklin JP & Jarvinen HJ. Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Int. J. Cancer* **74**, 551-555 (1997).

32. Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, Kleibeuker JH, Taal BG, Griffioen G, Nagengast FM, Meijers-Heijboer EH, Bertario L, Varesco L, Bisgaard ML, Mohr J, Fodde R & Khan PM. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* **110**, 1020-1027 (1996).

33. Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, Markowitz SD, Willis J, Lynch H, Rajput A, Wiesner GL, Lindor NM, Burgart LJ, Toro TT, Lee D, Limacher JM, Shaw DW, Findlay MP & Reeve AE. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum. Mutat.* **14**, 249-255 (1999).

34. Gayther SA, Gorringe KL, Ramus SJ, Huntsman D, Roviello F, Grehan N, Machado JC, Pinto E, Seruca R, Halling K, MacLeod P, Powell SM, Jackson CE, Ponder BA & Caldas C. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res.* **58**, 4086-4089 (1998).

35. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A & Reeve AE. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* **392**, 402-405 (1998).

36. Richards FM, McKee SA, Rajpar MH, Cole TR, Evans DG, Jankowski JA, McKeown C, Sanders DS & Maher ER. Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 607-610 (1999).

37. Oliveira C, Ferreira P, Nabais S, Campos L, Ferreira A, Cirnes L, Alves CC, Veiga I, Fragoso M, Regateiro F, Dias LM, Moreira H, Suriano G, Machado JC, Lopes C, Castedo S, Carneiro F & Seruca R. E-Cadherin (CDH1) and p53 rather than SMAD4 and Caspase-10 germline mutations contribute to genetic predisposition in Portuguese gastric cancer patients. *Eur. J. Cancer* **40**, 1897-1903 (2004).

38. Sugano K, Taniguchi T, Saeki M, Tsunematsu Y, Tomaru U & Shimoda T. Germline p53 mutation in a case of Li-Fraumeni syndrome presenting gastric cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **29**, 513-516 (1999).

39. Tay ST, Leong SH, Yu K, Aggarwal A, Tan SY, Lee CH, Wong K, Visvanathan J, Lim D, Wong WK, Soo KC, Kon OL & Tan P. A combined comparative genomic hybridization and expression microarray analysis of gastric cancer reveals novel molecular subtypes. *Cancer Res.* **63**, 3309-3316 (2003).

40. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **68**, 820-823 (1971).

41. Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 623-651 (1993).

42. Vogelstein B & Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **9**, 138-141 (1993).

43. Kuniyasu H, Yasui W, Yokozaki H, Kitadai Y & Tahara E. Aberrant expression of c-met mRNA in human gastric carcinomas. *Int. J. Cancer* **55**, 72-75 (1993).

44. Seruca R, Santos NR, David L, Constancia M, Barroca H, Carneiro F, Seixas M, Peltomaki P, Lothe R & Sobrinho-Simoes M. Sporadic gastric carcinomas with microsatellite instability display a particular clinicopathologic profile. *Int. J. Cancer* **64**, 32-36 (1995).

45. Tsugawa K, Yonemura Y, Hirono Y, Fushida S, Kaji M, Miwa K, Miyazaki I & Yamamoto H. Amplification of the c-met, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: correlation to clinical features. *Oncology* **55**, 475-481 (1998).

46. Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, Matsuda M, Sakaguchi T, Hirao T & Nakano H. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* **85**, 1894-1902 (1999).

47. Tahara E, Semba S & Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin. Oncol.* **23**, 307-315 (1996).

48. Soman NR, Correa P, Ruiz BA & Wogan GN. The TPR-MET oncogenic rearrangement is present and expressed in human gastric carcinoma and precursor lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 4892-4896 (1991).

49. Tsujimoto H, Sugihara H, Hagiwara A & Hattori T. Amplification of growth factor receptor genes and DNA ploidy pattern in the progression of gastric cancer. *Virchows Arch.* **431**, 383-389 (1997).

50. Kim YJ, Ghu HD, Kim DY, Kim HJ, Kim SK & Park CS. Expression of cellular oncogenes in human gastric carcinoma: c-myc, c-erb B2, and c-Ha-ras. *J. Surg. Oncol.* **54**, 167-170 (1993).

51. Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Nakaizumi A, Uehara H & Taniguchi H. Expression of c-myc mRNA as an aid in histologic differentiation of adenoma from well differentiated adenocarcinoma in the stomach. *Cancer* **73**, 1795-1799 (1994).

52. Nessling M, Solinas-Toldo S, Wilgenbus KK, Borchard F & Lichter P. Mapping of chromosomal imbalances in gastric adenocarcinoma revealed amplified protooncogenes MYCN, MET, WNT2, and ERBB2. *Genes Chromosomes. Cancer* **23**, 307-316 (1998).

53. Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, Fujita Y, Nakanishi M, Masuda K, Kimura A, Nakamura Y, Inazawa J, Abe T & Yamagishi H. Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int. J. Cancer* **89**, 217-223 (2000).

54. Motojima K, Furui J, Kohara N, Izawa K, Kanematsu T & Shiku H. Expression of Kirsten-ras p21 in gastric cancer correlates with tumor progression and is prognostic. *Diagn. Mol. Pathol* **3**, 184-191 (1994).

55. Hongyo T, Buzard GS, Palli D, Weghorst CM, Amorosi A, Galli M, Caporaso NE, Fraumeni JF, Jr. & Rice JM. Mutations of the K-ras and p53 genes in gastric adenocarcinomas from a high-incidence region around Florence, Italy. *Cancer Res.* **55**, 2665-2672 (1995).

56. David L, Seruca R, Nesland JM, Soares P, Sansonetty F, Holm R, Borresen AL & Sobrinho-Simoes M. c-erbB-2 expression in primary gastric carcinomas and their metastases. *Mod. Pathol.* **5**, 384-390 (1992).

57. Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. *Cancer* **75**, 1410-1417 (1995).

58. Wu MS, Wang HP, Lin CC, Sheu JC, Shun CT, Lee WJ & Lin JT. Loss of imprinting and overexpression of IGF2 gene in gastric adenocarcinoma. *Cancer Lett.* **120**, 9-14 (1997).

59. Shiraishi T, Mori M, Yamagata M, Haraguchi M, Ueo H & Sugimachi K. Expression of insulin-like growth factor 2 mRNA in human gastric cancer. *Int. J. Oncol.* **13**, 519-523 (1998).

60. Strickler JG, Zheng J, Shu Q, Burgart LJ, Alberts SR & Shibata D. p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: when guardians fail. *Cancer Res.* **54**, 4750-4755 (1994).

61. Fearon ER & Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767 (1990).

62. Sanz-Ortega J, Sanz-Esponera J, Caldes T, Gomez dlC, Sobel ME & Merino MJ. LOH at the APC/MCC gene (5Q21) in gastric cancer and preneoplastic lesions. Prognostic implications. *Pathol Res. Pract.* **192**, 1206-1210 (1996).

63. Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, Seruca R, Carneiro F & Sobrinho-Simoes M. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene* **20**, 1525-1528 (2001).

64. Kim YS, Yi Y, Choi SG & Kim SJ. Development of TGF-beta resistance during malignant progression. *Arch. Pharm. Res.* **22**, 1-8 (1999).

65. Oliveira C, Seruca R, Seixas M & Sobrinho-Simoes M. The clinicopathological features of gastric carcinomas with microsatellite instability may be mediated by mutations of different "target genes": a study of the TGFbeta RII, IGFII R, and BAX genes. *Am. J. Pathol* **153**, 1211-1219 (1998).

66. Takaku K, Miyoshi H, Matsunaga A, Oshima M, Sasaki N & Taketo MM. Gastric and duodenal polyps in Smad4 (Dpc4) knockout mice. *Cancer Res.* **59**, 6113-6117 (1999).

67. Xu X, Brodie SG, Yang X, Im YH, Parks WT, Chen L, Zhou YX, Weinstein M, Kim SJ & Deng CX. Haploid loss of the tumor suppressor Smad4/Dpc4 initiates gastric polyposis and cancer in mice. *Oncogene* **19**, 1868-1874 (2000).

68. Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH & Bang YJ. Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16(INK4a) expression in gastric adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **87**, 236-240 (2000).

69. Shim YH, Kang GH & Ro JY. Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab Invest* **80**, 689-695 (2000).

70. Hayashi K, Yokozaki H, Goodison S, Oue N, Suzuki T, Lotan R, Yasui W & Tahara E. Inactivation of retinoic acid receptor beta by promoter CpG hypermethylation in gastric cancer. *Differentiation* **68**, 13-21 (2001).

71. Sano T, Tsujino T, Yoshida K, Nakayama H, Haruma K, Ito H, Nakamura Y, Kajiyama G & Tahara E. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. *Cancer Res.* **51**, 2926-2931 (1991).

72. Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, Lee M, Kim JW, Bang YJ & Kang GH. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* **84**, 479-484 (2004).

73. AJCC Cancer Staging Manual. Lippincott, Philadelphia (1997).

74. Anon. UICC:TNM classification of malignant tumors. Wiley Press, (1997).

75. Roder JD, Bottcher K, Busch R, Wittekind C, Hermanek P & Siewert JR. Classification of regional lymph node metastasis from gastric carcinoma. German Gastric Cancer Study Group. *Cancer* **82**, 621-631 (1998).

76. Harrison JC, Dean PJ, Vander ZR, el Zeky F & Wruble LD. Adenocarcinoma of the stomach with invasion limited to the muscularis propria. *Hum. Pathol* **22**, 111-117 (1991).

77. Yoshikawa K & Maruyama K. Characteristics of gastric cancer invading to the proper muscle layer--with special reference to mortality and cause of death. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **15**, 499-503 (1985).

78. C.Fenoglio-Preiser, F.Carneiro, P.Correa, P.Guilford, R.Lambert, F.Megraud, N.Muñoz, S.M.Powell, M.Rugge, M.Sasako, M.Stolte & H.Watanabe. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Hamilton S.R. & Aaltonen L.A. (eds.), pp. 37-52 (IARC Press, Lyon,2002).

79. Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA & Hamilton SM. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Ann. Surg.* **241**, 27-39 (2005).

80. Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K & Edwards BK. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer* **88**, 2398-2424 (2000).

81. Hundahl SA, Menck HR, Mansour EG & Winchester DP. The National Cancer Data Base report on gastric carcinoma. *Cancer* **80**, 2333-2341 (1997).

82. Gschwind A, Fischer OM & Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 361-370 (2004).

83. Popescu NC, King CR & Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics* **4**, 362-366 (1989).

84. Hynes NE & Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 341-354 (2005).

85. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM & Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* **16**, 1647-1655 (1997).

86. Baselga J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* **312**, 1175-1178 (2006).

87. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME & Shepard HM. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 4285-4289 (1992).

88. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ & Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **20**, 719-726 (2002).

89. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J & Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **344**, 783-792 (2001).

90. Yarden Y & Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 127-137 (2001).

91. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R & Slamon DJ. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J. Clin. Oncol.* **18**, 3651-3664 (2000).

92. Meric-Bernstam F & Hung MC. Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6326-6330 (2006).

93. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY & Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in

a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J. Clin. Oncol.* **20**, 3095-3105 (2002).

94. Leonard DS, Hill AD, Kelly L, Dijkstra B, McDermott E & O'Higgins NJ. Anti-human epidermal growth factor receptor 2 monoclonal antibody therapy for breast cancer. *Br. J. Surg.* **89**, 262-271 (2002).

95. Joensuu H, Isola J, Lundin M, Salminen T, Holli K, Kataja V, Pylkkanen L, Turpeenniemi-Hujanen T, von Smitten K & Lundin J. Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. *Clin. Cancer Res.* **9**, 923-930 (2003).

96. Bilous M, Ades C, Armes J, Bishop J, Brown R, Cooke B, Cummings M, Farshid G, Field A, Morey A, McKenzie P, Raymond W, Robbins P & Tan L. Predicting the HER2 status of breast cancer from basic histopathology data: an analysis of 1500 breast cancers as part of the HER2000 International Study. *Breast* **12**, 92-98 (2003).

97. Fornier M, Risio M, Van Poznak C & Seidman A. HER2 testing and correlation with efficacy of trastuzumab therapy. *Oncology (Williston. Park)* **16**, 1340-1342 (2002).

98. Schaller G, Evers K, Papadopoulos S, Ebert A & Buhler H. Current use of HER2 tests. *Ann. Oncol.* **12 Suppl 1**, S97-100 (2001).

99. Esteva FJ, Valero V, Booser D, Guerra LT, Murray JL, Pusztai L, Cristofanilli M, Arun B, Esmaeli B, Fritsche HA, Sneige N, Smith TL & Hortobagyi GN. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1800-1808 (2002).

100. Nahta R & Esteva FJ. HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. *Clin. Cancer Res.* **9**, 5078-5084 (2003).

101. Persons DL, Bui MM, Lowery MC, Mark HF, Yung JF, Birkmeier JM, Wong EY, Yang SJ & Masood S. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study. *Ann. Clin. Lab Sci.* **30**, 41-48 (2000).

102. Mass RD, Press MF, Anderson S, Cobleigh MA, Vogel CL, Dybdal N, Leiberman G & Slamon DJ. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clin. Breast Cancer* **6**, 240-246 (2005).

103. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ & Schnitt SJ. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J. Clin. Oncol.* **17**, 1983-1987 (1999).

104. Harris LN, Liotcheva V, Broadwater G, Ramirez MJ, Maimonis P, Anderson S, Everett T, Harpole D, Moore MB, Berry DA, Rizzeri D, Vredenburgh JJ & Bentley RC. Comparison of methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **19**, 1698-1706 (2001).

105. Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ, Tan L, Kaptain S, Bach A, Panageas KS, Arroyo C, Valero V, Currie V, Gilewski T, Theodoulou M, Moynahan ME, Moasser M, Sklarin N, Dickler M, D'Andrea G, Cristofanilli M, Rivera E, Hortobagyi GN, Norton L & Hudis CA. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J. Clin. Oncol.* **19**, 2587-2595 (2001).

106. Ishikawa T, Kobayashi M, Mai M, Suzuki T & Ooi A. Amplification of the c-erbB-2 (HER-2/neu) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence in situ hybridization. *Am. J. Pathol.* **151**, 761-768 (1997).

107. Takehana T, Kunitomo K, Kono K, Kitahara F, Iizuka H, Matsumoto Y, Fujino MA & Ooi A. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immuno-sorbent assay. *Int. J. Cancer* **98**, 833-837 (2002).

108. Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, Kapanen AI, Tommola S, Soini Y, Helin H, Salo J, Joensuu H, Sihvo E, Elenius K & Isola J. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann. Oncol.* **16**, 273-278 (2005).

109. Yonemura Y, Ninomiya I, Ohoyama S, Kimura H, Yamaguchi A, Fushida S, Kosaka T, Miwa K, Miyazaki I, Endou Y & . Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma. Immunoreactivity for c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short-term prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* **67**, 2914-2918 (1991).

110. Pinto-de-Sousa J, David L, Almeida R, Leitao D, Preto JR, Seixas M & Pimenta A. c-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma. *Int. J. Surg. Pathol.* **10**, 247-256 (2002).

111. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP,

Lingle WL, Klein PM, Ingle JN & Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1673-1684 (2005).

112. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS & Gelber RD. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1659-1672 (2005).

113. Pauletti G, Godolphin W, Press MF & Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* **13**, 63-72 (1996).

114. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, Yamamori S & Sakamoto G. Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer* **92**, 2965-2974 (2001).

115. Owens MA, Horten BC & Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin. Breast Cancer* **5**, 63-69 (2004).

116. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, Watters AD, Cooke T, Paish C, Wencyk PM & Pinder SE. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J. Pathol* **199**, 418-423 (2003).

117. Park DI, Yun JW, Park JH, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Yoo CH, Son BH, Cho EY, Chae SW, Kim EJ, Sohn JH, Ryu SH & Sepulveda AR. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig. Dis. Sci.* **51**, 1371-1379 (2006).

118. Kim MA, Jung EJ, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK & Kim WH. Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Hum. Pathol* **38**, 1386-1393 (2007).

119. Kimura M, Tsuda H, Morita D, Ichikura T, Ogata S, Aida S, Yoshizumi Y, Maehara T, Mochizuki H & Matsubara O. A proposal for diagnostically meaningful criteria to classify increased epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 gene copy numbers in gastric carcinoma, based on correlation of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical measurements. *Virchows Arch.* **445**, 255-262 (2004).

120. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR & Hofler H. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res.* **54**, 3845-3852 (1994).

121. Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, Wiesner G, Ferguson K, Eng C, Park JG, Kim SJ & Markowitz S. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat. Genet.* **26**, 16-17 (2000).

122. Varis A, Zaika A, Puolakkainen P, Nagy B, Madrigal I, Kokkola A, Vayrynen A, Karkkainen P, Moskaluk C, El Rifai W & Knuutila S. Coamplified and overexpressed genes at ERBB2 locus in gastric cancer. *Int. J. Cancer* **109**, 548-553 (2004).

123. Carvalho B, Buffart TE, Reis RM, Mons T, Moutinho C, Silva P, van Grieken NC, Grabsch H, Van de Velde CJ, Ylstra B, Meijer GA & Carneiro F. Mixed gastric carcinomas show similar chromosomal aberrations in both their diffuse and glandular components. *Cell Oncol.* **28**, 283-294 (2006).

124. van Grieken NC, Weiss MM, Meijer GA, Hermsen MA, Scholte GH, Lindeman J, Craanen ME, Bloemena E, Meuwissen SG, Baak JP & Kuipers EJ. Helicobacter pylori-related and -non-related gastric cancers do not differ with respect to chromosomal aberrations. *J. Pathol* **192**, 301-306 (2000).

125. Luebke T, Baldus SE, Grass G, Bollschweiler E, Thiele J, Dienes HP, Hoelscher AH & Moenig SP. Histological grading in gastric cancer by Ming classification: correlation with histopathological subtypes, metastasis, and prognosis. *World J. Surg.* **29**, 1422-1427 (2005).

126. Gong SJ, Jin CJ, Rha SY & Chung HC. Growth inhibitory effects of trastuzumab and chemotherapeutic drugs in gastric cancer cell lines. *Cancer Lett.* **214**, 215-224 (2004).

127. Rebischung C, Barnoud R, Stefani L, Faucheron JL & Mousseau M. The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. *Gastric. Cancer* **8**, 249-252 (2005).