GLAUCO BAIOCCHI NETO

Perfil da expressão imunoistoquímica dos receptores da família ErbB e seu prognóstico em pacientes com câncer de cólon e reto com alto risco para recorrência após cirurgia radical

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

São Paulo

2008

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1.INTRODUÇÃO 1

1.1 O CÂNCER DE CÓLON E RETO ESTÁDIO II E III..... 3

1.2 RECEPTORES DA FAMÍLIA ERBB 7

2. OBJETIVOS 14

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS 15

3.1 TIPO DE ESTUDO 15

3.2 MÉTODOS 15

3.2.1 COLETA DE DADOS 15

3.2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO 15

3.2.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO 16

3.2.4 VARIÁVEIS COLETADAS 16

3.2.5 DETERMINAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE EGFR, ERBB2, ERBB3 E ERBB4 20

3.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 31

3.3 CASUÍSTICA 32

3.3.1 COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA 32

3.3.2 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS 33

3.3.3 DADOS DE ANATOMIA PATOLÓGICA 33

3.3.4 DADOS DO SEGUIMENTO 38

4. RESULTADOS 40

4.1 TESTES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS 40

4.2 SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA 47

4.3 SOBREVIDA GLOBAL 53

5. DISCUSSÃO 59

6. CONCLUSÕES 70

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71

RESUMO

BAIOCCHI NETO G. **Perfil da expressão imunoistoquímica dos receptores da família ErbB e seu prognóstico em pacientes com câncer de cólon e reto com alto risco para recorrência após cirurgia radical** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 86p.

INTRODUÇÃO: Deve-se considerar que cerca de 70 a 80% dos pacientes portadores de carcinoma colorretal estádio II podem ser curados apenas com cirurgia. Por outro lado, a despeito do tratamento empregado e dos benefícios alcançados com a evolução dos tratamentos adjuvantes, cerca de 20 a 35% dos pacientes tratados com doença em estádio III vêm a falecer por recidiva tumoral. É provável que existam características biomoleculares intrínsecas que possam conferir maior agressividade e resistência ao tratamento adjuvante. A família de proteínas ErbB formam um grupo de receptores de membrana, cuja função é ativar a via de sinalização intracelular em resposta ao sinal extracelular e é formada por quatro receptores: EGFR/ErbB1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 e ErbB4/HER4. O complexo de receptores ErbB é uma das vias de transmissão de sinal celular mais amplamente estudada, porém poucos estudos interessados em avaliar a expressão dos quatro receptores da família ErbB e sua correlação prognóstica no câncer de cólon e reto foram realizados até o momento. Nosso objetivo foi avaliar a expressão imunoistoquímica de EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 e seu papel como fator prognóstico para sobrevida livre de doença e sobrevida global em carcinoma de cólon e reto estádio II de alto risco e estádio III submetidos a tratamento cirúrgico radical. CASUÍSTICA E MÉTODOS:

Trata-se de um estudo retrospectivo que avaliou uma série de 118 indivíduos portadores de adenocarcinoma de colón e reto alto estádio II com fatores de alto risco ou estádio III. Foram analisadas variáveis clínicopatológicas e as expressões de EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 foram determinadas através de imunoistoquímica pelo dispositivo técnico “Tissue Microarray” (TMA). RESULTADOS: O tempo de seguimento mediano foi de 58,8 meses. A sobrevida global da amostra foi de 71,2% em 5 anos. A sobrevida livre de doença foi de 67,8% em 5 anos. As expressões imunoistoquímicas positivas de EGFR, ErbB2, ErbB3, em membrana de ErbB4 e em citoplasma de ErbB4 foram encontradas em respectivamente 59,3%, 7,6%, 71,2%, 10,2% e 20,3% dos casos. Houve diferença significativa na expressão de EGFR em relação à localização da neoplasia, onde 75% dos pacientes com tumor em reto apresentaram expressão positiva, contra 52,4% entre os tumores de cólon (p=0,02). Em relação à expressão ErbB2, houve diferença significativa no que refere ao estadiamento, onde 1,8% dos pacientes com estádio II apresentavam expressão positiva, contra 12,7% entre os pacientes com estádio III (p=0,03). A expressão de ErbB3 teve diferença significativa em relação à presença de embolização linfática, com expressão positiva em 79,5% dos pacientes com ausência de embolização linfática frente a 46,7% dos com presença de embolização linfática (p=0,001). Em relação à expressão de ErbB4, não houve diferença significativa entre todas as variáveis estudadas, tanto para expressão em membrana quanto em citoplasma. Observamos que presença de embolização vascular linfática, presença de invasão perineural, expressão imunoistoquímica negativa de ErbB3 e positiva de ErbB4 em membrana influenciaram negativamente a sobrevida livre de doença em cinco anos na análise univariada. No modelo multivariado, a expressão negativa de ErbB3 (RR:

2,43; IC 95%: 1,26 – 4,66) e a expressão positiva de ErbB4 em membrana (RR: 3,03; IC 95%: 1,31 – 6,98) mantiveram-se como fator independente para risco de recaída. Observamos ainda que idade igual ou maior que 65 anos, presença de embolização linfática e expressão negativa de ErbB3 influenciaram negativamente a sobrevida global em 5 anos na análise univariada. No modelo multivariado, a idade igual ou maior que 65 anos (RR 2,83; IC 95%: 1,36 – 5,90) e a expressão negativa de ErbB3 (RR: 2,52; IC 95%: 1,28 – 4,97) mantiveram-se como fator independente para risco de óbito. CONCLUSÕES: A expressão positiva de ErbB4 em membrana foi variável de risco independente para recidiva e a expressão negativa de ErbB3 foi variável de risco independente para recidiva e óbito. As expressões imunoistoquímicas de ErbB3 e de ErbB4 em membrana podem selecionar pacientes portadores de câncer colorretal estádios II e III submetidos a tratamento cirúrgico radical que tenham maior risco de recidiva e óbito.

Descritores: neoplasias do colo, neoplasias retais, prognóstico, receptor erbB-2, receptor erbB-3, genes erbB-1, imunoistoquímica, análise em microsséries.

SUMMARY

BAIOCCHI NETO G. **Immunohisthochemical expression of ErbB family receptors and their prognostic role in patients with colorectal cancer with high risk of recurrence after radical surgery.** [dissertation]**.** São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 86p.

INTRODUCTION: In spite of multidisciplinary treatment, survival after 5 years in these subgroups is under 60 and 70%. Probably, some patients have recurrence due to microscopic residual disease resistant to the adjuvant treatment received. However, other patients do not have recurrent disease even without adjuvant treatment as they have already been cured by surgery alone. Thus, there is a need to identify biological tumoral characteristics that may predict poor outcome and guide the development of new adjuvant treatments. The epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1), ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 and ErbB4/HER4 are a group of subtype I tyrosine-kinases sharing structural homologies, especially at the intracellular domain. Protein kinases are enzymes that play a key regulation role in nearly every aspect of cell biology. There have been only a few studies that explored the expression of ErbB family in colorectal cancers. The present study was designed to investigate the expression of ErbB family in high risk colorectal cancer (high risk stage II and stage III) submitted to radical surgery and their role as a prognostic factor to recurrence and survival. MATERIALS AND METHODS: We studied 118 individuals with high risk stage II and stage III colorectal cancer submitted to radical surgery. Clinico-pathological data were reviewed. ErbB family protein expression in

tumor tissue was assessed by immunohistochemistry using Tissue Microarray technique. RESULTS: The median follow-up time was 58,8 months. The five-year overall survival was 71,2% and five-year disease free survival was 67,8%. The immunohistochemical expression was considered positive for EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4 membrane and ErbB4 cytoplasmic in respectively 59,3%, 7,6%, 71,2%, 10,2% and 20,3% of the patients. EGFR expression was associated with tumor localization, ErbB2 expression with stage III and ErbB3 negative expression with lymphovascular invasion. Membranous positive ErbB4 expression was an independent prognostic factor only for recurrence. ErbB3 negative expression was an independent prognostic factor for recurrence and survival in the multivariate analysis. EGFR, ErbB2 and cytoplasmic ErbB4 expression was not associated with prognosis. CONCLUSIONS: Membranous positive ErbB4 expression was an independent prognostic factor for recurrence and ErbB3 negative expression was an independent prognostic factor for recurrence and survival. The immunohistochemical expression of ErbB3 and ErbB4 may be used to identify a subgroup of patients with stage II and III colorectal tumors at higher risk of recurrence and death.

Descriptors: colonic neoplasms, rectal neoplasms, prognosis, receptor erbB-2, receptor erbB-3, genes erbB-1, immunohistochemistry, microarray analysis.

1 – INTRODUÇÃO

O câncer de cólon e reto é a terceira neoplasia mais incidente no mundo representando 1.167.020 casos novos estimados para o ano de 2007 (Global Cancer Facts & Figures, 2007). É a terceira neoplasia mais incidente e a terceira causa de morte por câncer em ambos os sexos nos Estados Unidos (American Cancer Society, 2007). O número de óbitos relacionados ao câncer de cólon e reto no Brasil em 2004 foi de 4.416 óbitos para homens e 5.135 para mulheres (Ministério da Saúde, 2006) e o número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil em 2008 é de 12.490 casos para os homens e de 14.500 para as mulheres. Estes valores correspondem a uma taxa bruta estimada de 13,23 casos novos / 100.000 homens e 14,88 / 100.000 mulheres (Instituto Nacional do Câncer, 2008).

A sobrevida esperada em cinco anos, considerando-se todos os estádios, atualmente gira em torno de 66,3% (Surveillance Epidemiology and End Results, 2005a). A sobrevida é influenciada principalmente pelo comprometimento linfonodal e pela profundidade de infiltração da neoplasia na parede intestinal (Gelb e Schrock, 1997; Ratto et al., 1998; Compton et al., 2000). Estes fatores são classificados no sistema TNM de estadiamento e são, até o momento, os únicos elementos que norteiam a indicação de tratamento adjuvante fora de ensaios clínicos (Greene et al., 2002; National Institute of Health, 1990).

O tratamento do câncer de colorretal é multidisciplinar, mas tem a cirurgia como modalidade mais importante quando a intenção do tratamento é curativa (Nelson et al., 2001). A ressecção considerada ideal para tumores do cólon consiste

na retirada do segmento acometido com margem proximal e distal mínima de 5 cm, em monobloco com a cadeia linfática regional, limitada pela origem do tronco arterial daquele segmento (Nelson et al., 2001).

Para os tumores de reto, considera-se ideal a ressecção com margem distal mínima de mucosa de 2 cm, com excisão total do mesorreto e ligadura na origem da artéria mesentérica inferior (Nelson et al., 2001). Em tumores localmente avançados e aderidos a outros órgãos ou estruturas adjacentes, deve-se realizar a ressecção ampliada em monobloco com a estrutura aderida (Vieira et al., 1999; Nelson et al., 2001).

O tratamento adjuvante é empregado em pacientes com alto risco para recidiva após o tratamento cirúrgico de caráter curativo e visa diminuir os riscos de recaída local e à distância. As modalidades de tratamento adjuvante recomendadas são a quimioterapia para tumores do cólon e reto, e a radioterapia, para tumores do reto.

O 5-fluorouracil (5-FU) faz parte da classe das fluoropirimidinas e até a década de 70 havia sido a única droga em que se baseava a quimioterapia para o câncer colorretal (Kemeny et al., 1997; Moore e Haller, 1999). O tratamento adjuvante do câncer colorretal iniciou uma nova fase na década de 80, a partir da utilização do levamisole no tratamento da doença metastática. Sua eficácia como terapêutica isolada não foi confirmada, porém baseado em seu efeito imunomodulador, iniciou-se o uso em combinação com o 5-FU em ensaios clínicos bem delineados. Após os resultados de 2 estudos (Laurie et al., 1989; Moertel et al., 1990), o tratamento com 5-FU e levamisole por 1 ano passou a ser padrão no tratamento adjuvante de pacientes com câncer de cólon estádio III. Outros estudos

mostraram também a eficácia do uso de outro imunomodulador (ácido folínico ou leucovorin) em associação com o 5-FU (Francini et al., 1994; IMPACT, 1995; O'connell et al., 1997). Mais tarde foi comprovada a equivalência do uso de 5-FU e leucovorin por 6 meses quando comparado ao uso de 5-FU e levamisole por 12 meses, sendo que a primeira tornou-se a recomendação para uso em tratamento adjuvante do câncer colorretal estádio III (Moore e Haller, 1999; Ragnhammar et al., 2001).

Em 2003 foram publicados os primeiros resultados de um estudo prospectivo e aleatorizado com 2.246 pacientes que receberam 5-FU e leucovorin ou 5-FU e leucovorin associado a oxaliplatina (FOLFOX4) (De Gramont et al., 2003). Os resultados preliminares aos 37 meses de seguimento mostraram menor recaída a favor do grupo que recebeu FOLFOX4, porém sem ganho em sobrevida global (André et al., 2004). Estes dados sugerem que o uso do esquema FOLFOX4, apesar de associado maior toxicidade é atualmente é uma importante opção no tratamento adjuvante dos pacientes com câncer colorretal estádio III (National Cancer Institute, 2008).

1.1– O CÂNCER DE CÓLON E RETO ESTÁDIOS II E III

Considerando-se os pacientes com estádios II e III, a sobrevida esperada em cinco anos é respectivamente de 79,7% e 58,3% (Surveillance Epidemiology and End Results, 2005b). A indicação de tratamento adjuvante em pacientes com câncer colorretal no estádio II permanece controversa. Pelo menos três grandes estudos prospectivos e randomizados demostraram benefício do tratamento adjuvante apenas

nas análises de subgrupo para o estádio III (Laurie et al., 1989; Moertel et al., 1990; Francini et al., 1994).

O National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP), com o objetivo de avaliar o benefício da quimioterapia adjuvante para o estádio II, analisou em conjunto os dados de quatro estudos conduzidos pelo grupo em que os critérios de inclusão e tempo de seguimento foram similares. Representavam o estádio II, 41% dos casos e nesta análise os benefícios do tratamento adjuvante foram independentes do estádio clínico (Mamounas et al., 1999).

O Cancer Care Ontario Practice Guideline Initiative (CCOPGI) em conjunto com a American Society of Clinical Oncology (ASCO) realizaram em 2003 uma revisão sistemática da literatura publicada (37 estudos randomizados e 11 meta-análises) referente ao tratamento adjuvante do estádio II (Figueredo et al., 2004). Foram incluídos 20.317 pacientes com a proporção média de pacientes com estádio II de 48%. Foi encontrado um pequeno incremento absoluto em sobrevida livre de doença que variou de 5 a 10%, porém sem diferença estatística em sobrevida global. Concluíram que o uso rotineiro de quimioterapia adjuvante no paciente estádio II até o momento não tem benefício claro para ser recomendado de rotina. Ao mesmo tempo sugerem que esforços devem ser feitos para condução de estudos que melhor avaliem o papel prognóstico de alterações biomoleculares. A motivação dos estudos seria melhor estratificar grupos de pacientes com maior risco de recorrência e/ou probabilidade de resposta ao tratamento adjuvante.

É importante lembrar da toxicidade relacionada ao uso de quimioterapia. A mortalidade é cerca de 1% (Rothenberg et al., 2001), principalmente em pacientes idosos. Apesar da publicação pelo European MOSAIC Study ter mostrado benefício

em sobrevida livre de doença em 3 anos no estádio II submetido ao esquema quimioterápico baseado em oxaliplatina (De Gramont et al., 2003), seu uso está associado a neurotoxicidade e que pode ser prolongada e debilitante.

Em relação aos pacientes com tumor estádio clínico II submetidos a tratamento cirúrgico radical, três questões permanecem ainda sem resposta. Todos os pacientes deveriam ser submetidos a tratamento adjuvante de rotina? Quais seriam os fatores de pior prognóstico associados? Os subgrupos de pacientes com estádio II com fatores de pior prognóstico se beneficiariam de quimioterapia adjuvante?

As elevadas taxas de sobrevida observadas em pacientes do estádio II e um reduzido número de eventos de recaída e óbito em relação ao estádio III, dificultam a interpretação dos resultados e tornam-se necessárias amostras maiores e seguimento mais prolongado. Em outras palavras, a falha em documentar benefício estatístico relevante da terapia adjuvante encontra-se no fato do relativo bom prognóstico no estádio II tratado apenas com cirurgia e a necessidade da randomização de um número muito grande de pacientes para se demonstrar uma pequena margem de benefício absoluto em sobrevida e que tenha poder estatístico.

Apesar de parecer que haja um benefício relativo no tratamento adjuvante para o estádio II assim como é estabelecido para o estádio III, é necessário um número de 9.680 pacientes em cada grupo para se detectar a diferença de sobrevida de 2% entre o grupo tratado e o controle (Benson III et al., 2004).

Apesar de estarem sendo identificados marcadores de alto risco para pacientes com estádio II e III, deve-se chamar atenção para o fato que a identificação desses marcadores possa apenas estar indicando um subgrupo de pacientes com risco maior

de recorrência e óbito, sem necessariamente concluir que haja benefício clínico de um determinado tratamento adjuvante.

O estádio II constitui um subgrupo heterogêneo em relação ao prognóstico e alguns autores preconizam uma melhor estratificação (Chapuis et al., 1986; Gelb e Schrock, 1997). A sexta e mais recente versão do estadiamento TNM já traz modificações neste sentido. São separados os tumores T3 (estádio IIA) dos tumores T4 (estádio IIB) (Greene et al., 2002).

Após reunião de consenso sobre fatores prognósticos em câncer colorretal realizada em 1999, o American Joint Committee on Cancer (AJCC) estratificou fatores anatomopatológicos e moleculares já estudados em câncer colorretal em cinco categorias, propostas pelo Colégio Americano de Patologistas de acordo com a qualidade dos estudos publicados (Compton et al., 2000a; Compton et al., 2000b). A categoria I agrupa fatores bem validados em estudos de boa qualidade, já utilizados na prática clínica para nortear condutas e candidatos a possível incorporação ao TNM. A categoria IIA reúne fatores extensamente investigados e com valor prognóstico suficiente para serem descritos nos laudos anatomopatológicos. Na categoria IIB, encontram-se fatores bem estudados, mas não o suficiente para serem estabelecidos nas categorias I ou IIA. A categoria III agrupa fatores ainda pouco estudados. Na categoria IV, estão os fatores largamente investigados e que, definitivamente, não demonstraram significado prognóstico. Nas categorias I e IIA, encontram-se a dosagem sérica pré-operatória do antígeno carcinoembrionário (CEA), o grau histológico, a embolização vascular sanguínea, a embolização linfática e a invasão perineural. Estes fatores auxiliam na seleção de pacientes candidatos a protocolos de tratamento adjuvante e foram utilizados, neste estudo, para definição

de grupos de alto risco para recidiva e óbito dentre os pacientes com doença em estádio II.

Deve-se considerar que cerca de 70 a 80% dos pacientes com estádio II podem ser curados apenas com cirurgia. Quanto a este aspecto, reiteramos a incapacidade atual em identificar o pequeno subgrupo de pacientes que seria beneficiado com o tratamento complementar. Entretanto, a despeito do tratamento empregado e dos benefícios alcançados com a evolução dos tratamentos adjuvantes, cerca de 20 a 35% dos pacientes tratados com doença em estádio III vêm a falecer por recidiva tumoral.

Os pacientes portadores de câncer colorretal estádio II e III, submetidos a tratamento cirúrgico radical adequado deveriam ser mais bem estratificados quanto ao risco de recorrência e óbito. De um lado, a indicação de tratamento adjuvante seria mais seletiva, mas por outro lado é provável que existam características biomoleculares intrínsecas que possam conferir maior agressividade e resistência ao próprio tratamento adjuvante instituido.

1.2– RECEPTORES DA FAMÍLIA ERBB

A família de proteínas ErbB tem seu nome originado na homologia com o Produto Gênico da Eritroblastose Viral (*v*-erbB). Trata-se de receptores de membrana tipo I, cuja função é ativar a via de sinalização intracelular em resposta ao sinal extracelular e é formada por quatro receptores: EGFR/ErbB1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 e ErbB4/HER4 (Yarden e Sliwkowski, 2001; Hynes e Lane, 2005; Grandis e Sok, 2004). O complexo de receptores ErbB é uma das vias de transmissão de sinal celular mais amplamente estudada e um exemplo do poder biológico de um

sinal aberrante (Citri e Yarden, 2006). A estrutura de cada um dos receptores está representada na Figura 1.

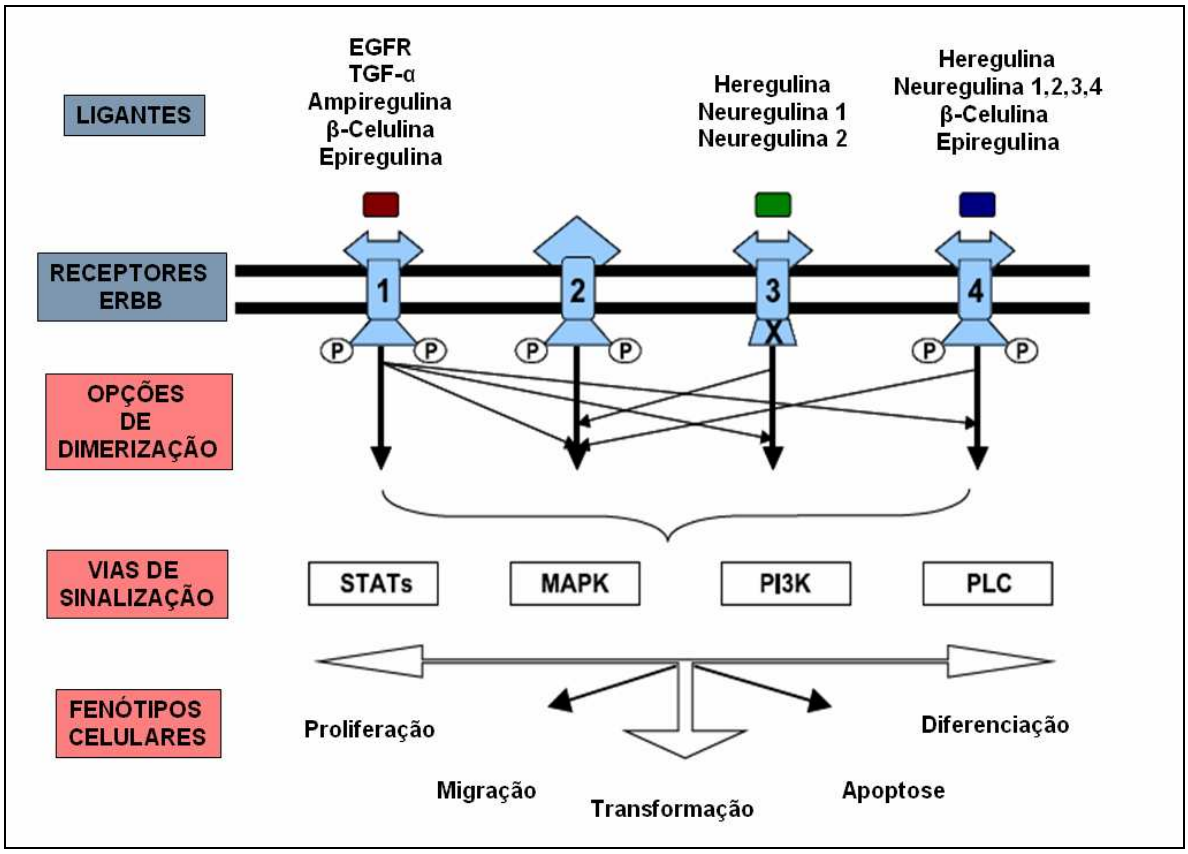


Figura 1. Estrutura dos receptores da Família ErbB. Adaptado de Grandis e Sok, 2004

Todos os membros da família possuem um domínio extracelular, onde se encontram 13 polipeptídeos como sítio de ligação para a molécula sinalizadora, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático com atividade tirosinaquinase. O domínio extracelular das proteínas ErbB pode apresentar-se sob a conformação inibida ou sob a conformação ativa (Finnegan e Carey, 2007; Moasser, 2007). Apesar da família ErbB ser considerada um protótipo no que se refere a atividade

tirosinaquinase, dois membros da família (ErbB2 e ErbB3) não tem atividade autônoma (Citri e Yarden, 2006; Yarden e Sliwkowski, 2001; Hynes e Lane, 2005; Grandis e Sok, 2004).

São conhecidas pelo menos 30 moléculas sinalizadoras, que geralmente são pequenas proteínas secretadas pela célula no espaço intercelular, denominados fatores de crescimento. Todos os fatores de crescimento são sintetizados a princípio como precursores ancorados à membrana e de forma subseqüente são liberados da célula por proteólise (Hynes e Lane, 2005; Finnegan e Carey, 2007).

A interação entre o receptor e o seu fator de crescimento, inicia uma mudança na conformação do seu domínio extracelular de inativo para ativo e promove sua dimerização. Cada receptor homodimérico ou heterodimérico inicia uma complexa cascata de sinalização, que resulta na proliferação celular, diferenciação, migração, adesão e transformação. A seleção de parceiros para dimerização determina a atividade sinalizadora entre as proteínas ErbB (Yarden e Sliwkowski, 2001; Hynes e Lane, 2005; Moasser, 2007).

As duas maiores vias de sinalização da família ErbB é a RAS-RAF-MAPK e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K/AKT) (Yarden e Sliwkowski 2001; Hynes e Lane 2005; Grandis e Sok 2004). RAS-RAF-MAPK (proteína quinase mitógeno ativado) são um grupo de serina-treonina quinases que regulam a proliferação celular, sobrevida e migração no câncer. A PI3K/AKT também é uma serina-treonina quinase. Através de várias etapas intermediárias, a PI3K ativa a enzima AKT, que então age sobre fatores de transcrição no núcleo, regulando as vias de sinalização da apoptose, expressão gênica e proliferação celular (Mendelsohn e Baselga 2000;

Yarden e Sliwkowski 2001; Hynes e Lane 2005; Grandis e Sok 2004). Estas vias de sinalização estão resumidas na Figura 2.

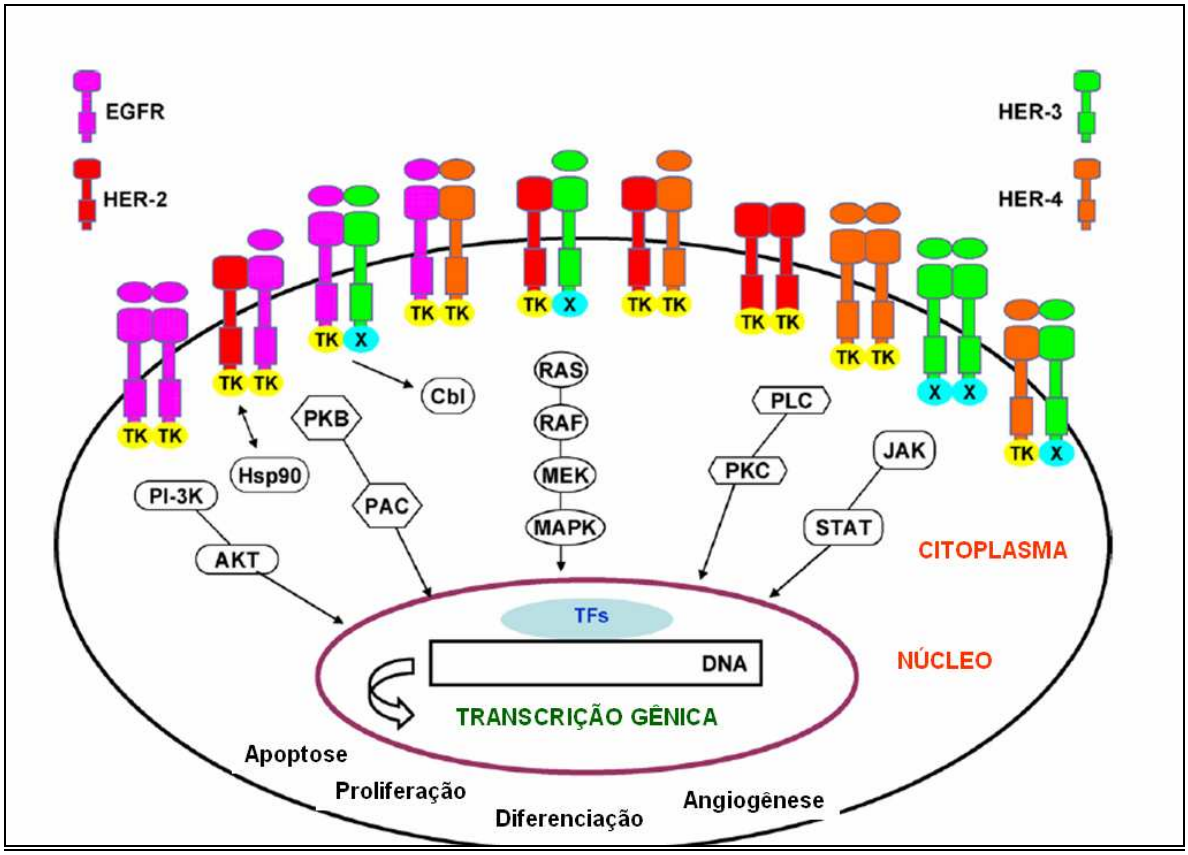


Figura 2. Representação esquemática dos receptores EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4, homodímeros, heterodímeros e vias de sinalização. Adaptado de Karamouzis et al., 2007.

Nas células tumorais, a família de receptores ErbB é ativada por vários mecanismos, incluindo a mutação, a superexpressão e produção autócrina e parácrina dos fatores de crescimento. Na estimulação parácrina dos receptores ErbB, os fatores de crescimento são liberados pelas células do estroma, enquanto que a estimulação autócrina resulta da liberação dos fatores de crescimento ancorados na membrana

celular (Hynes e Lane 2005). Os ligantes da família ErbB podem ser divididos em 3 grupos: o primeiro inclui o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de transformação de crescimento alfa (TGF-alfa) e ampirregulina que ligam ao EGFR. O segundo grupo inclui betacelulina, ligante de heparina – EGF e epiregulina que mostram dupla especifidade e se ligam ao EGFR e ErbB4. O terceiro grupo é composto pelas neuregulinas, sendo que as neuregulinas 1 e 2 se ligam ao ErbB3 e ErbB4 e as neuregulinas 3 e 4 apenas ao ErbB4. A figura 1 também mostra a apresentação esquemática dos ligantes e receptores.

Tanto a superexpressão quanto a alteração estrutural do EGFR são encontrados em diversas neoplasias. A superexpressão de EGFR é frequente em tumores cerebrais e encontradas em 40% dos gliomas. É também detectada nas lesões pré-malignas do epitélio oral, pulmão, próstata e colo uterino (Grandis e Sok 2004). A mutação mais comum (tipo III) é a deleção de parte do domínio extracelular, que torna o receptor estruturalmente ativo (Wong et al., 1992).

O ErbB2 é o único receptor que possui uma conformação do domínio extracelular fixa e que remete a forma ativa, mesmo na ausência de um ligante. É o parceiro preferido para dimerização do EGFR, ErbB3 e ErbB4. A dimerização com ErbB2 aumenta a capacidade transformante de outros receptores da família ErbB (Yarden e Sliwkowski 2001; Finnegan e Carey, 2007; Moasser, 2007). Há uma hierarquia no que se refere à potência do sinal em relação aos dímeros. Os heterodímeros são mais ativos que os homodímeros. Os heterodímeros que contêm ErbB2 são particularmente mais ativos e o heterodímero ErbB2-ErbB3 é considerado como o que confere o sinal mais intenso (Sergina e Moasser, 2007).

O aumento da expressão protéica do ErbB2, seja por amplificação gênica ou através da desregulação transcricional, ocorre em aproximadamente 25 a 30% dos casos de câncer de mama e ovário e confere pior comportamento biológico. No caso do câncer de mama a superexpressão está relacionada a com tamanho do tumor, metástase linfonodal, pior grau histológico, aneuploidia, ausência de receptores de estrógeno e maior índice proliferativo (Slamon et al., 1987a; Ross e Fletcher, 1998). A amplificação do gene ErbB2 parece ser um evento precoce durante a carcinogênese do câncer de mama, sendo demonstrado em cerca de 50% dos carcinomas ductais *in situ* (Badra et al., 2006). O ErbB2 é mantido durante a progressão para doença invasiva e metástase. A superexpressão e amplificação do ErbB2 também ocorrem no câncer gástrico, esofágico e endometrial (Moasser, 2007).

Assim como o ErbB2, o ErbB3 não tem atividade como receptor isolado. O ErbB3 não tem atividade tirosinaquinase funcionante em seu domínio intracelular. Somente adquire potencial de sinalização quando ocorre dimerização com outro receptor da família ErbB. Nenhuma alteração genômica significativa foi encontrada até o momento em neoplasias em relação ao ErbB3 (Jeong et al., 2006). Porém esse fato não exclui sua função na ativação de tumores associados ao EGFR e ErbB2. A superexpressão de ErbB3 é encontrada em 20-30% dos carcinomas invasivos de mama, em cerca de 1/3 dos carcinomas *in situ* e está associado a um pior prognóstico (Badra et al., 2006). A superexpressão simultânea de ErbB2 e ErbB3 em carcinomas invasores de mama é encontrada em 12-50% dos casos e o aumento da resistência a drogas em carcinomas com superexpressão de ErbB2 está relacionada com a superexpressão de ErbB3 e/ou EGFR (Karamouzis et al., 2007).

O ErbB4 é o receptor menos caracterizado da família ErbB. Em contraste com o ErbB3, o ErbB4 pode ser ativado tanto pelos ligantes da família das neuregulinas quanto dos fatores de crescimento epidérmico (EGF). Algumas evidências não implicam sua atividade com a tumorigênese (Sartor et al., 2001). A sua expressão no câncer de mama é menos freqüente que dos outros receptores da família. Porém sua expressão está relacionada com um aumento de positividade de receptores de estrógeno, maior diferenciação e menor proliferação. Estudos de linhagens celulares mostraram que a homodímeros de ErbB4 estimulados por neuregulina estimula apenas a via de apoptose controlada pela PI3K-AKT e não estimula a via de proliferação celular (Yarden e Sliwkowski, 2001), denotando um paradoxo em sua superexpressão.

Poucos estudos interessados em avaliar a expressão dos quatro receptores da família ErbB e sua correlação prognóstica no câncer de cólon e reto foram realizados até o momento. Com o advento do desenvolvimento de novas terapias tipo molécula alvo, surge a necessidade de esclarecimento do papel dessa importante via de sinalização como fator prognóstico na recaída de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico radical.

2 - OBJETIVOS

2.1- Avaliar a expressão imunoistoquímica de EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 em carcinoma de cólon e reto estádio II de alto risco e estádio III submetidos a tratamento cirúrgico radical.

2.2- Avaliar o papel da expressão imunoistoquímica de EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 como fator prognóstico para sobrevida livre de doença e sobrevida global em carcinoma de cólon e reto estádio II de alto risco e estádio III submetidos a tratamento cirúrgico radical.

3 – CASUÌSTICA E MÉTODOS

3.1- TIPO DE ESTUDO

Estudo retrospectivo longitudinal

3.2- MÉTODOS

3.2.1- COLETA DE DADOS

Os dados clínicos e alguns dados anatomopatológicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital do Câncer A.C. Camargo e com tratamento inicial no período de janeiro de 1990 a agosto de 2004.

3.2.2- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Todos os pacientes incluídos no estudo obedeceram aos seguintes critérios de elegibilidade:

a) confirmação de adenocarcinoma de cólon e reto alto, sendo considerado reto alto localização a partir de 8cm acima da linha pectínea;

b) estadiamento patológico (pTNM) III ou;

c) estadiamento patológico (pTNM) II considerado de alto risco, definido pela presença de pelo menos um dos seguintes fatores:

. pT4,

. CEA pré-operatório maior que 10ng/ml,

. grau de diferenciação II ou III,

. presença de embolização linfática,

. presença de invasão perineural,

. presença de embolização vascular sanguínea.

d) disponibilidade de material conservado em parafina para estudo imunoistoquímico.

3.2.3- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Serão considerados ineligíveis para o estudo os pacientes que:

a) receberam tratamento cirúrgico ou quimioterápico em outra instituição;

b) desenvolveram segunda neoplasia primária cinco anos antes ou até cinco anos após o diagnóstico do câncer colorretal, excetuando-se neoplasias de pele não melanoma;

c) tumores primários de reto médio ou baixo, sendo considerados reto médio ou baixo localização até a distância de 8cm acima da linha pectínea;

d) foram submetidos a tratamento com radioterapia;

e) pacientes portadores de câncer colorretal hereditário.

3.2.4- VARIÁVEIS COLETADAS

a) Variáveis demográficas e clínicas, compreendendo os itens apresentados a seguir:

- Idade: arbitrariamente agrupada em duas categorias (igual ou maior que 65 anos e menor que 65 anos).
- Sexo: masculino ou feminino.

- Localização: cólon ou reto. Definida pela descrição do exame endoscópico anotado no prontuário médico. Considerado reto o segmento até 12 cm acima da linha pectínea (Nelson et al., 2001).
- Tipo de cirurgia: ressecções segmentares clássicas e ampliadas. Definiu-se como ressecção ampliada a retirada do órgão acometido (segmento do cólon ou reto alto), em monobloco com outros órgãos ou estruturas adjacentes aderidos ao tumor.
- Realização de quimioterapia adjuvante com 5FU e leucovorin: sim ou não.
- Nível sérico pré-operatório de do antígeno carcinoembrionário (CEA): variável obtida a partir de anotação nos prontuários médicos.

b) Variáveis anatomopatológicas, compreendendo os itens abaixo:

- Estadiamento TNM: utilizou-se a classificação TNM com base nos dados obtidos dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos. A classificação foi feita de acordo com a última edição do TNM, proposta pelo American Joint Comittee on Cancer (AJCC) (Greene et al., 2002). Os quadros 1 e 2 descrevem esta classificação.

Quadro 1 – Classificação TNM para tumores de cólon e reto – 2002

Tx	Tumor primário não avaliável
T0	Sem evidência de tumor
Tis	Carcinoma *in situ*
T1	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor ultrapassa a muscular própria até a subserosa ou invade gordura pericólica (seguimentos não peritonizados)
T4	Tumor invade outros órgãos ou estruturas e/ou perfura o peritôneo visceral
Nx	Linfonodos regionais não avaliáveis
N0	Ausência de metástases linfonodais
N1	Metástases em 1 até 3 linfonodos
N2	Metástase em 4 ou mais linfonodos
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância

Quadro 2 – Agrupamento da classificação TNM por estádios - 2002

ESTÁDIO	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1	M0
IIIB	T3-T4	N1	M0
IIIC	Qualquer T	N2	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

- Grau de diferenciação: utilizou-se a classificação padronizada no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, que segue a classificação preconizada por Broders (1925), adaptada para três categorias: grau 1: bem diferenciado; grau 2: moderadamente diferenciado; grau 3: pouco diferenciado. Para fins de análise estatística, optamos por agrupar os graus 2 e 3 em uma única categoria. Esta variável foi obtida a partir da descrição dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos.
- Invasão perineural: presença ou ausência. Variável obtida a partir da descrição dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos.

- Embolização linfática: presença ou ausência. Variável obtida a partir da descrição dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos.
- Embolização vascular sanguínea: presença ou ausência. Variável obtida a partir da descrição dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos.
- Determinação da expressão imunoistoquímica de EGFR.
- Determinação da expressão imunoistoquímica de ErbB2.
- Determinação da expressão imunoistoquímica de ErbB3.
- Determinação da expressão imunoistoquímica de ErbB4.

3.2.5- DETERMINAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE EGFR, ERBB2, ERBB3 E ERBB4.

Os blocos de parafina contendo fragmentos de tumor foram pesquisados no Serviço de Arquivo de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo e encaminhados para realização de reação imunoistoquímica no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

A pesquisa dos antígenos EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 foi realizada utilizando-se o dispositivo técnico chamado de “Tissue Microarray” (TMA) (Beecher Instruments, silver springs, EUA). Para construção do TMA o patologista selecionou nas lâminas de rotina as áreas do tumor a serem amostradas nos blocos de parafina. Foram obtidos cilindros de 0,6 mm da área tumoral posteriormente montados em um novo bloco de parafina com posição bidimensional separada por espaço de 0,2mm,

determinada e gravada pelo equipamento. A partir deste novo bloco foram preparados cortes histológicos em 4 lâminas de diferentes níveis do TMA, separados por pelo menos 125µm de distância entre dois cortes e garantindo amostras celulares diferentes para cada tumor. Os cortes do bloco receptor foram realizados com micrótomo manual e transferidos em fita adesiva para as lâminas adesivas especiais (Instrumentics Inc, Hackensack, NJ). Nestas foram executadas as reações de imunohistoquímica com os anticorpos pesquisados pelas técnicas habituais de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO®). Os passos técnicos realizados foram já tradicionalmente descritos na literatura (Alves et al., 1999).

Resumidamente, as lâminas foram previamente revestidas por solução de silano (APTS-Sigma® A3648), diluido a 4% em acetona. Os cortes obtidos foram de 3µm de espessura após microtomia mecânica. Os cortes foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol, sendo submetidos a recuperação antigênica pelo calor com panela de pressão a 98°C por 15 minutos, utilizando-se tampão citrato (pH 6,0). Uma vez preparados os cortes, foi realizado o bloqueio da peroxidade endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, seguida de incubação com o anticorpo primário específico.

As reações foram sempre acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado e dois controles negativos. O primeiro deles foi realizado pelo não uso do anticorpo primário e o segundo através da retirada do anticorpo secundário durante os passos da reação.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio ótico comum e os resultados classificados em relação à intensidade da reação positiva.

O anticorpo primário utilizado para pesquisa do EGFR foi proveniente da empresa Novocastra Laboratories LTDA, New Castle, UK (clone EGFR 113 - mouse monoclonal antibody NCL-EGFR). A coloração pelo anticorpo produziu um padrão citoplasmático granular. Não houve expressão em membrana ou núcleo. As figuras de 3 a 6 mostram exemplos de expressão de EGFR.

O anticorpo primário utilizado para pesquisa do ErbB2 foi proveniente da empresa Dako Corporation, Carpinteria, USA (anti-human c-erbB-2 oncoprotein – polyclonal rabbit #A0485). A coloração pelo anticorpo produziu reação em membrana celular. Não houve expressão em citoplasma ou núcleo. As figuras de 7 a 9 mostram exemplos de expressão de ErbB2.

O anticorpo primário utilizado para pesquisa do ErbB3 foi proveniente da empresa Lab Vision, Fremont, USA (epitope specific rabbit antibody #RB-9211). A coloração pelo anticorpo produziu um padrão citoplasmático granular. Não houve expressão em membrana ou núcleo. As figuras de 10 a 13 mostram exemplos de expressão de ErbB3.

O anticorpo primário utilizado para pesquisa do ErbB4 foi proveniente da empresa Lab Vision, Fremont, USA (# RB-9045). A coloração pelo anticorpo produziu reação em membrana e um padrão citoplasmático granular. Não houve expressão em núcleo. As figuras de 14 a 16 mostram exemplos de expressão de ErbB4.

Todas as lâminas foram lidas por um mesmo patologista (R.A.C.).

Dos 118 pacientes com tumores primários estudados, foram analisados 4 fragmentos de cada tumor em 100 pacientes, 3 fragmentos em 12 pacientes e 2 fragmentos em 6 pacientes.

A expressão citoplasmática de cada uma das amostras imunoistoquímicas de tumor obtidas pelo TMA foi interpretada através de padronização semi-quantitativa de “0 ou negativo” a “3+” segundo a técnica padronizada por Kountourakis et al. (2006). Foi graduado como “negativo” quando não houve reação imunoistoquímica ou reação fraca em menos de 10% das células neoplásicas; “1+” quando houve fraca intensidade de reação imunoistoquímica em mais de 10% das células neoplásicas; “2+” quando houve moderada intensidade de reação imunoistoquímica em mais de 10% das células neoplásicas e “3+” quando houve forte intensidade de reação imunoistoquímica em mais de 10% das células neoplásicas.

A expressão em membrana celular de cada uma das amostras imunoistoquímicas de tumor obtidas pelo TMA foi interpretada através de padronização semi-quantitativa segundo a técnica padronizada por Jacobs et al. (1999). Foi graduado como “negativo” quando não houve reação imunoistoquímica ou em menos de 10% das células neoplásicas; “1+” quando houve fraca intensidade de reação imunoistoquímica e parcial de membrana em mais de 10% das células neoplásicas; “2+” quando houve fraca ou moderada intensidade de reação imunoistoquímica em toda membrana em mais de 10% das células neoplásicas e “3+” quando houve forte intensidade de reação imunoistoquímica em toda membrana celular em mais de 10% das células neoplásicas.

Após exclusão das amostras sem tumor, os valores de cada uma das amostras do TMA foram somados e o resultado então divido pelo número de amostras de tumor estudadas. Obteve-se então uma média de intensidade das amostras imunoistoquímicas. As amostras de tumores que tiveram os valores da média compreendidos entre 0 e 0,25 foram arbitrariamente considerados como reação

“negativa”; valores entre 0,26 e 1,4 foram considerados como “fraca intensidade”; valores entre 1,5 e 2,4 foram considerados como “moderada intensidade” e de 2,5 a 3 considerados como “forte intensidade”. Então ao final os tumores com média de expressão considerada “negativa” ou “fraca intensidade” (média entre 0 e 1,4) foram categorizados como “expressão negativa” e os com média de expressão “moderada intensidade” e “forte intensidade” (média entre 1,5 e 3) foram categorizados como “expressão positiva”.

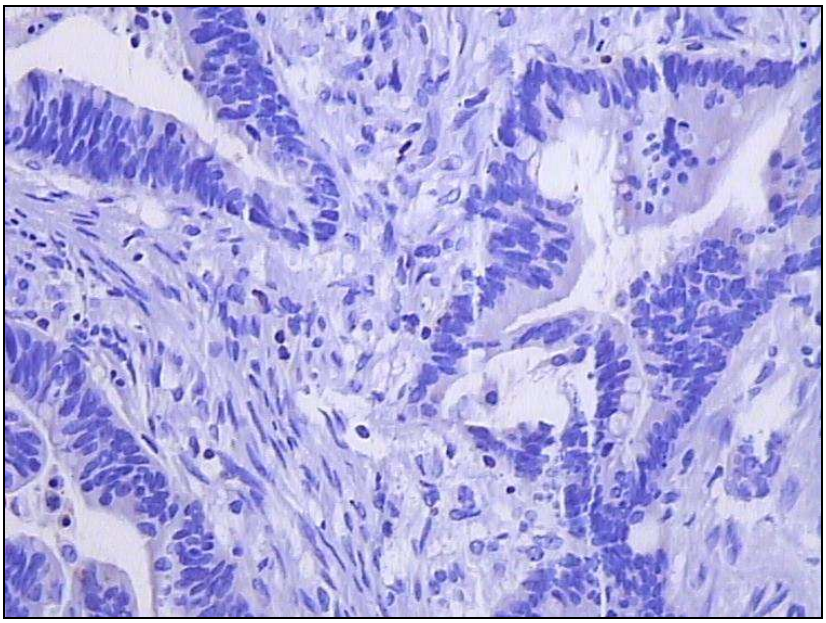


Figura 3. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo ausência de expressão do anticorpo para EGFR.

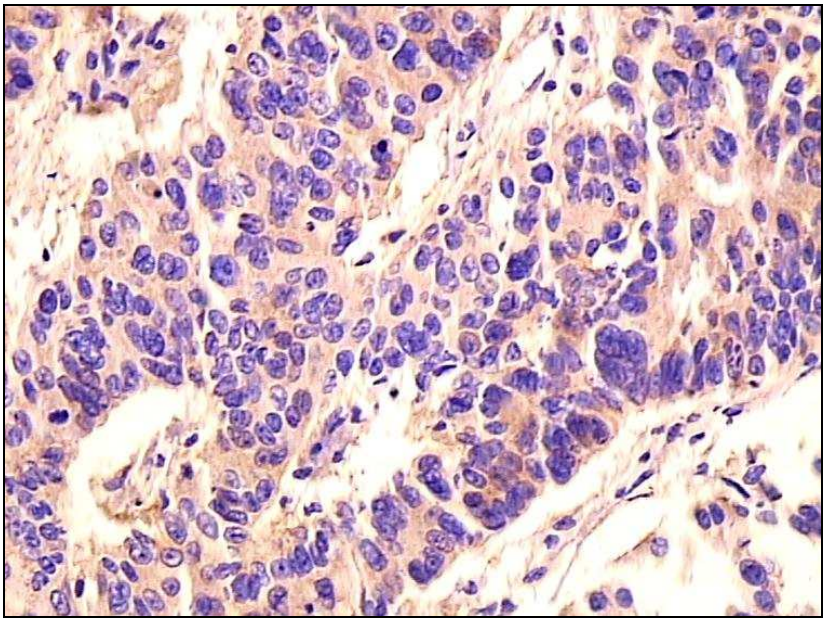


Figura 4. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo expressão "1+" do anticorpo para EGFR.

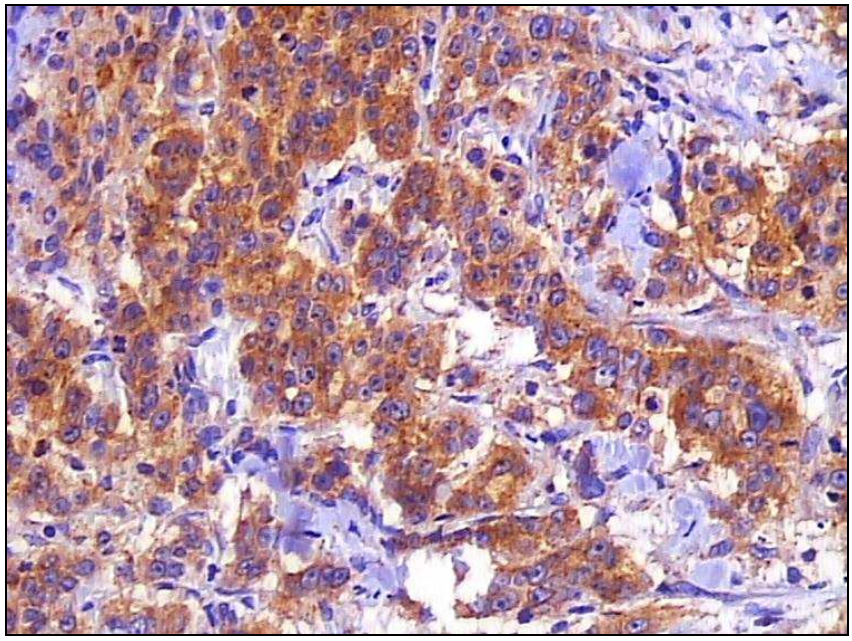


Figura 5. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo expressão "2+" do anticorpo para EGFR.

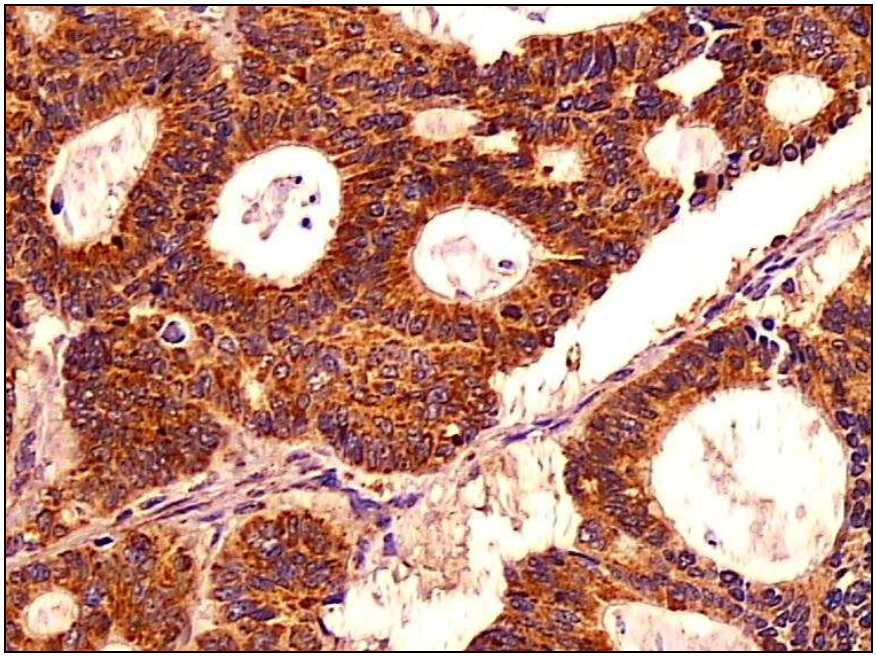


Figura 6. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo expressão "3+" do anticorpo para EGFR.

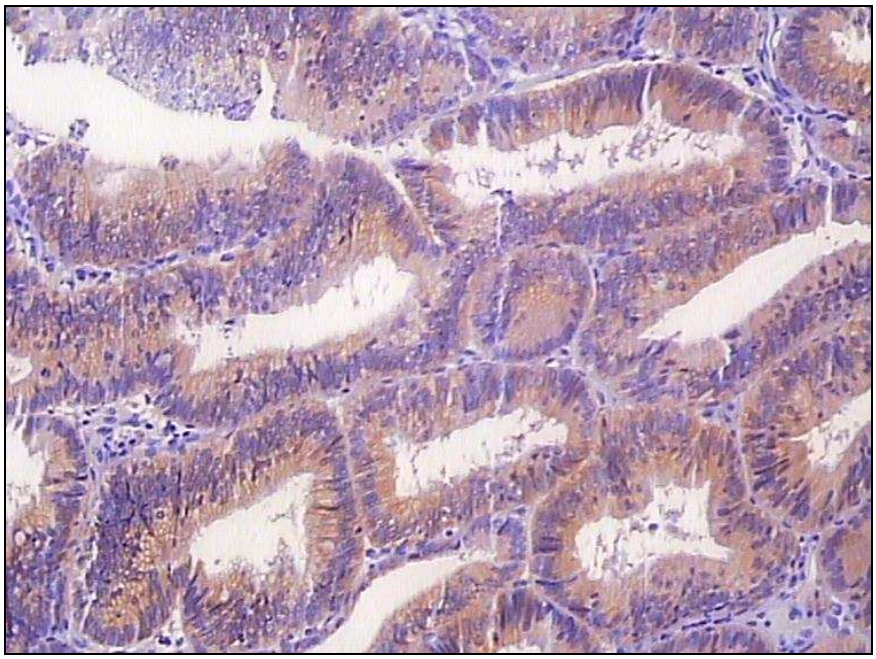


Figura 7. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo expressão "1+" do anticorpo para ErbB2.

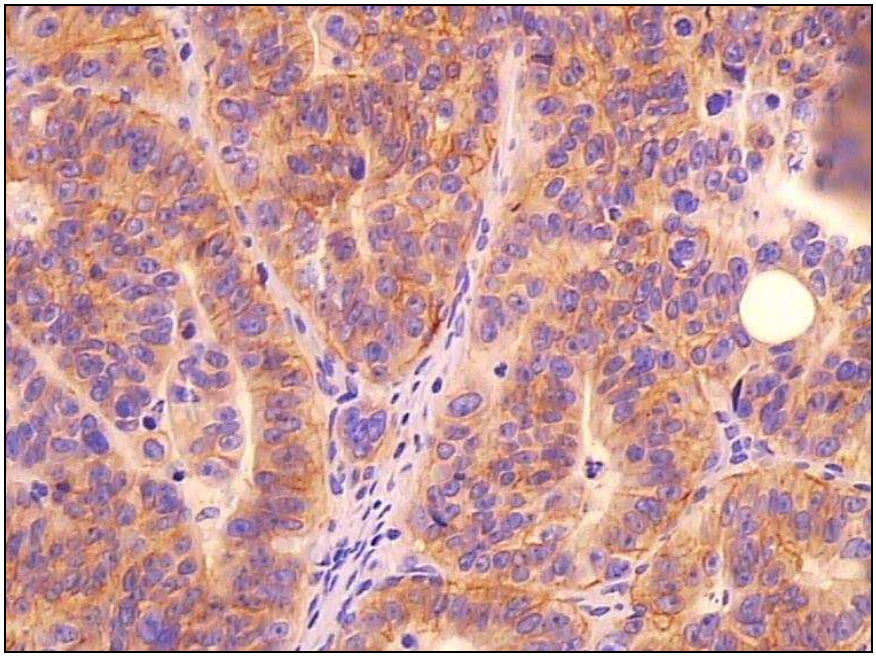


Figura 8. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo expressão "2+" do anticorpo para ErbB2.

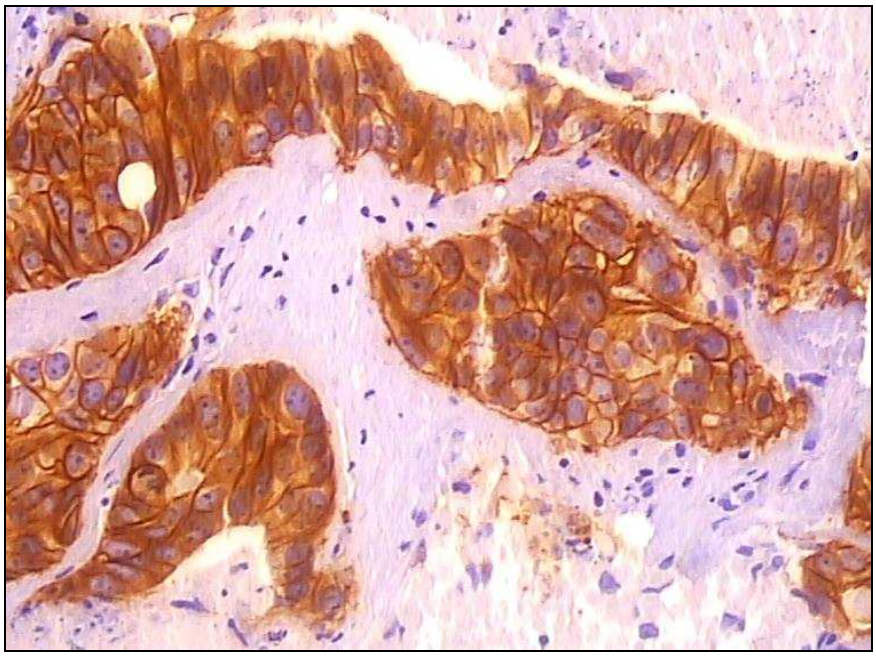


Figura 9. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo expressão "3+" do anticorpo para ErbB2.

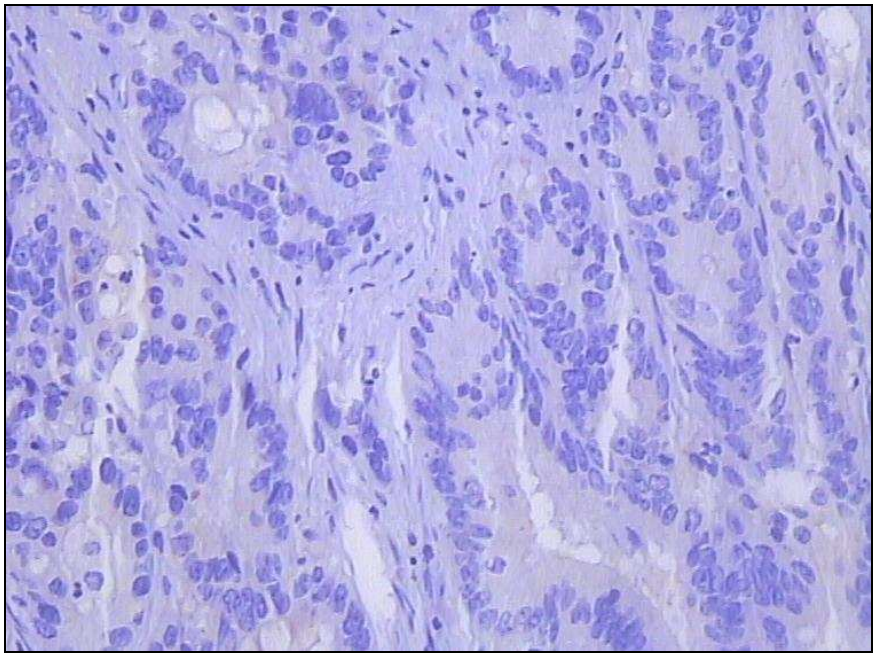


Figura 10. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo ausência de expressão do anticorpo para ErbB3.

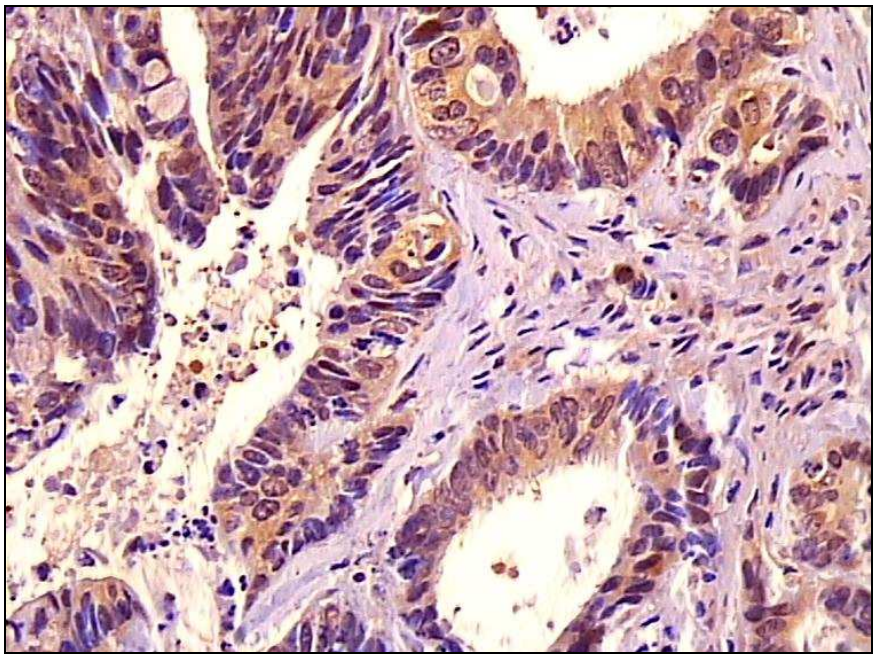


Figura 11. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo expressão “1+” do anticorpo para ErbB3.

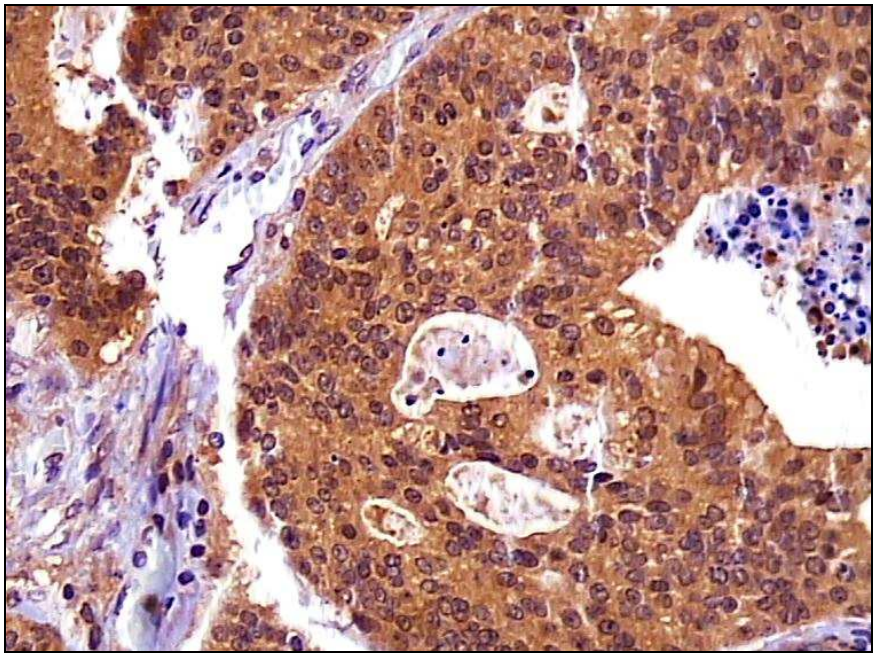


Figura 12. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo expressão "2+" do anticorpo para ErbB3.

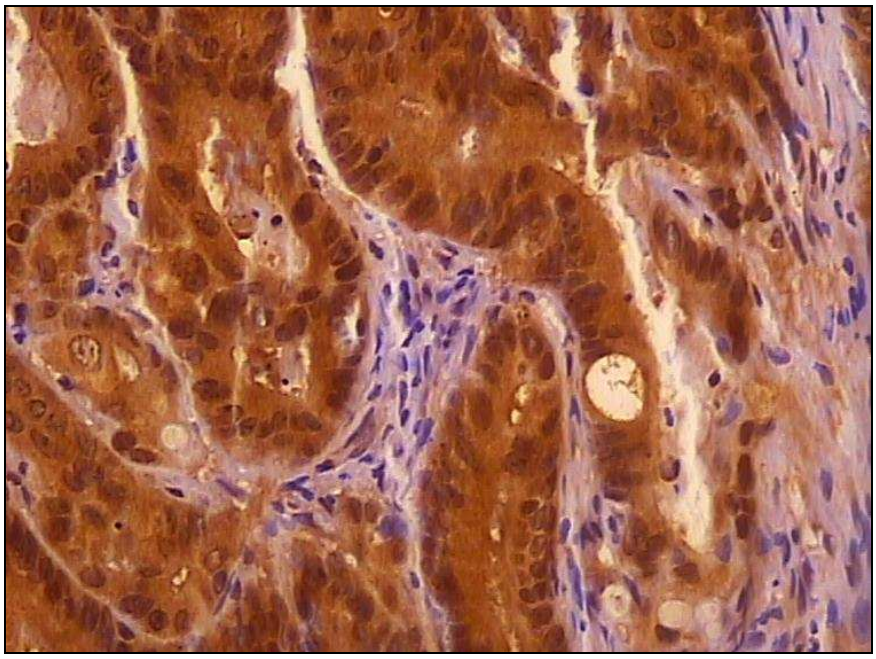


Figura 13. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo expressão "3+" do anticorpo para ErbB3.

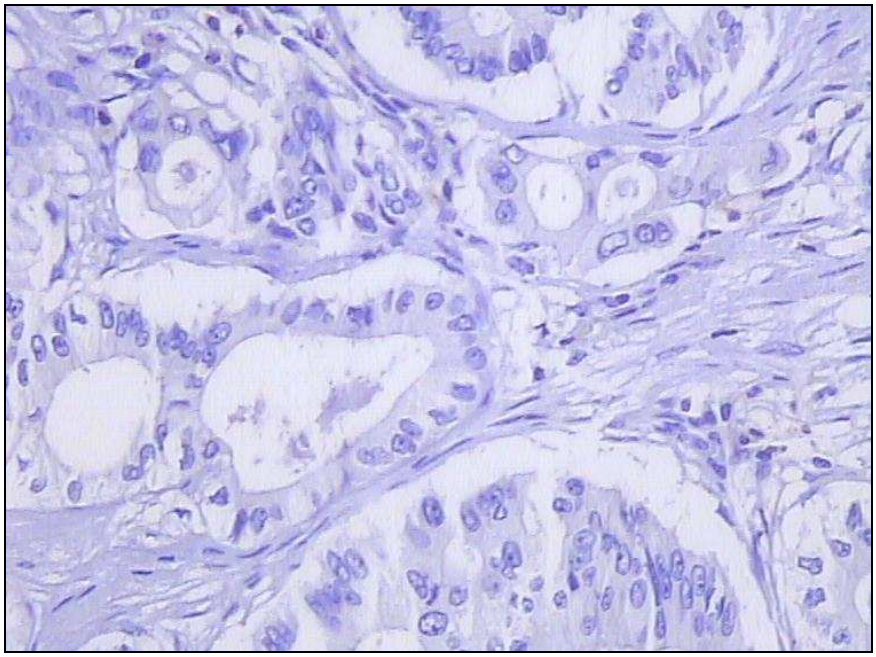


Figura 14. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo ausência de expressão do anticorpo para ErbB4.

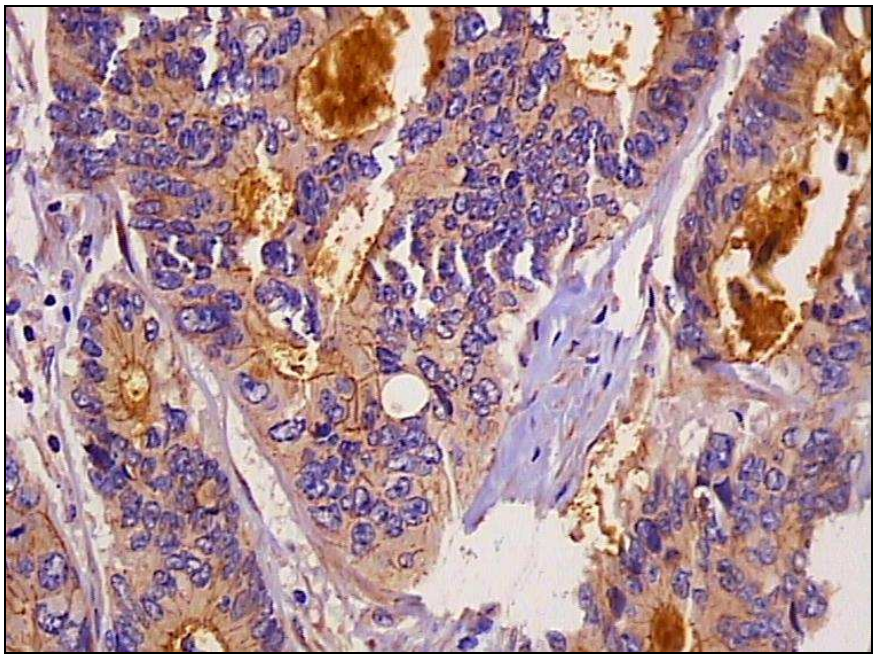


Figura 15. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo expressão “1+” em membrana e citoplasma do anticorpo para ErbB4.

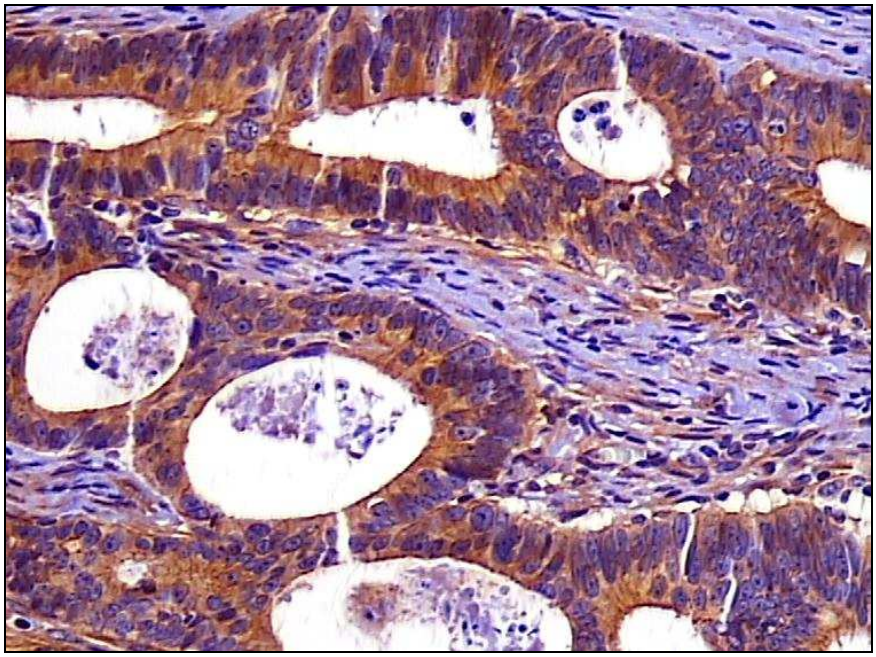


Figura 16. Fotomicrografia de adenocarcinoma de cólon exibindo expressão "3+" em membrana e citoplasma do anticorpo para ErbB4.

3.2.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados dos prontuários foram transcritos para ficha padronizada e digitados em computador para gerenciamento do banco de dados e análise estatística. A confecção do banco de dados e as análises foram feitas no programa estatístico "Statistical Package for Social Sciences" versão 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

As variáveis de interesse foram as expressões imunoistoquímicas de EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4. As variáveis de controle foram: idade, sexo, localização, estádio clínico, realização de quimioterapia adjuvante, embolização vascular sanguínea, embolização vascular linfática, invasão perineural e grau de diferenciação histológica. Como o nível sérico de CEA não estava disponível no prontuário de 39 pacientes, esta variável não foi considerada para análise estatística.

Inicialmente foram calculadas freqüências simples de todas as variáveis.

As associações entre as variáveis foram analisadas pelo teste por qui-quadrado bi-caudal e pelo teste de Fisher quando necessário.

As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan e Meier, e a comparação entre as curvas foi realizada pelo teste de log rank (Kaplan e Meier, 1958).

O tempo de seguimento foi calculado a partir da data da cirurgia até a data da última informação objetiva na atualização dos dados. As taxas de sobrevida livre de doença foram analisadas com base na data da primeira recidiva local ou à distância. As taxas de sobrevida global foram calculadas de acordo com a data da última informação objetiva na atualização dos dados.

A análise multivariada foi realizada através do modelo de regressão de Cox (Cox, 1972).

Para todos os testes realizados, considerou-se um erro alfa de até 5% ($p<0,05$).

3.3- CASUÍSTICA

3.3.1- COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA

Dentre 902 pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo por câncer de cólon e reto no período de janeiro de 1990 a agosto de 2004, 118 casos foram elegíveis para o estudo.

3.3.2- DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Para os 118 pacientes estudados, a idade variou de 29 a 88 anos, com mediana de 64,5 anos. Dentre eles, 59 (50%) tinham menos que 65 anos.

Com relação ao sexo, 41 eram do sexo masculino (34,7%) e 77, do sexo feminino (65,3%).

Quanto à localização, 82 pacientes possuíam tumores nos cólons (69,5%) e 36, no reto alto (30,5%).

Em relação às cirurgias realizadas, 100 (84,7%) foram ressecções segmentares clássicas e 18 ressecções ampliadas (15,3%).

No que se refere à quimioterapia adjuvante, 67 pacientes realizaram (56,8%) e 51 não realizaram (43,2%). Dos pacientes do estádio II, 21 realizaram quimioterapia (38,2%) e do estádio III, 46 (73%) com diferença estatística entre os grupos ($p<0,001$). O uso de quimioterapia adjuvante de rotina teve início em 1994. As causas da não realização foram obtidas em 20 pacientes, sendo as principais: baixa performance status, recusa do paciente e complicações pós-operatórias.

A dosagem sérica pré-operatória de CEA foi maior que 10 ng/ml em 24 pacientes. Esta variável não estava disponível em 39 casos (33,1%).

3.3.3- DADOS DE ANATOMIA PATOLÓGICA

Quanto ao estadiamento patológico, 55 casos foram classificados como estádio II (46,6%) e 63, como estádio III (53,4%). A tabela 1 expõe a distribuição dos pacientes em função do estadiamento.

Tabela 1 – Distribuição dos 129 pacientes de acordo com o estadiamento

Estádio Clínico	n (%)
IIA	22 (18,6)
IIB	33 (28,0)
IIIA	7 (5,9)
IIIB	35 (29,7)
IIIC	21 (17,8)
Total	118 (100)

Quanto ao grau de diferenciação, 27 tumores foram considerados bem diferenciados (22,9%); 83, moderadamente diferenciados (70,3%); seis, pouco diferenciados (5,1%) e dois tumores não tinham essa variável disponível em prontuário médico. Diante do pequeno número de tumores classificados como pouco diferenciados, agrupou-se esta classe aos tumores moderadamente diferenciados, constituindo uma única categoria que foi chamada de alto grau. Assim, 27 tumores (22,9%) foram considerados de baixo grau e 89 (75,4%) foram considerados de alto grau.

Quanto a embolização vascular sanguínea de células neoplásicas, estava presente em 16 casos (13,6%) e ausente em 102 casos (86,4%).

Detectou-se embolização vascular linfática de células neoplásicas em 30 casos (25,4%), estando ausente em 88 (74,6%) espécimes.

No que se refere à invasão perineural, estava presente em 23 casos (19,5%) e ausente em 95 (80,5%).

Com relação à expressão de EGFR, 48 pacientes (40,7%) apresentavam tumores com expressão negativa de EGFR, enquanto que 70 (59,3%) apresentavam expressão positiva de EGFR.

Quanto à expressão de ErbB2, 109 pacientes (92,4%) apresentavam tumores com expressão negativa de ErbB2, enquanto que apenas 9 (7,6%) apresentavam expressão positiva de ErbB2.

A expressão de ErbB3 foi negativa em 34 pacientes (28,8%), e positiva em 84 pacientes (71,2%).

Quanto à expressão de ErbB4, 106 pacientes (89,8%) apresentavam tumores com expressão negativa em membrana celular e 94 pacientes (79,7%) em citoplasma. Por outro lado, 12 pacientes (10,2%) apresentavam tumores com expressão positiva em membrana celular e 24 (22,3%) em citoplasma.

A tabela 2 resume as freqüências das variáveis clinicopatológicas e a tabela 3 as freqüências das expressões imunoistoquímicas entre os 118 pacientes.

Tabela 2 – Características clinicopatológicas dos pacientes estudados

Variável	Categoria	n (%)
Idade	<65 anos	59 (50,0)
	>65 anos	59 (50,0)
Sexo	Masculino	41 (34,7)
	Feminino	77 (65,3)
Localização	Cólon	82 (69,5)
	Reto alto	36 (30,5)
Quimioterapia adjuvante	Não	51 (43,2)
	Sim	67 (56,8)
Embolização sanguínea	Ausente	102 (86,4)
	Presente	16 (13,6)
Embolização linfática	Ausente	88 (74,6)
	Presente	30 (25,4)
Invasão perineural	Ausente	95 (80,5)
	Presente	23 (19,5)
Grau histológico	Baixo	27 (23,3)
	Alto	89 (76,7)

Tabela 3 – Frequências das expressões imunoistoquímicas de EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 dos 118 pacientes

Variável	Categoria	n	(%)
EGFR	Negativa	48	(40,7)
	Positiva	70	(59,3)
ErbB2	Negativa	109	(92,4)
	Positiva	9	(7,6)
ErbB3	Negativa	34	(28,8)
	Positiva	84	(71,2)
ErbB4 membrana	Negativa	106	(89,8)
	Positiva	12	(10,2)
ErbB4 citoplasma	Negativa	94	(79,7)
	Positiva	24	(20,3)

3.3.4- DADOS DO SEGUIMENTO

O tempo de seguimento mediano foi de 58,8 meses, variando de 2 a 165,8 meses. Ao final da atualização do seguimento, dos 118 pacientes, 33 (28%) haviam evoluído com recidiva tumoral (8 recidivas locais e 25 metástases à distância), dentre os quais 28 (23,7%) morreram por câncer. Seis pacientes (5,1%) morreram por outras causas, cinco pacientes (4,2%) estavam vivos e com evidência de doença e 75 (63,6%) estavam vivos e sem sinais de recidiva tumoral. Houve perda de seguimento de quatro (3,4%) pacientes. A sobrevida livre de doença foi de 67,8% em 5 anos (gráfico 1). A sobrevida global da amostra foi de 71,2% (gráfico 2) e câncer específico de 72,9% em 5 anos.

Gráfico 1 – Curva de sobrevida livre de doença dos 118 pacientes

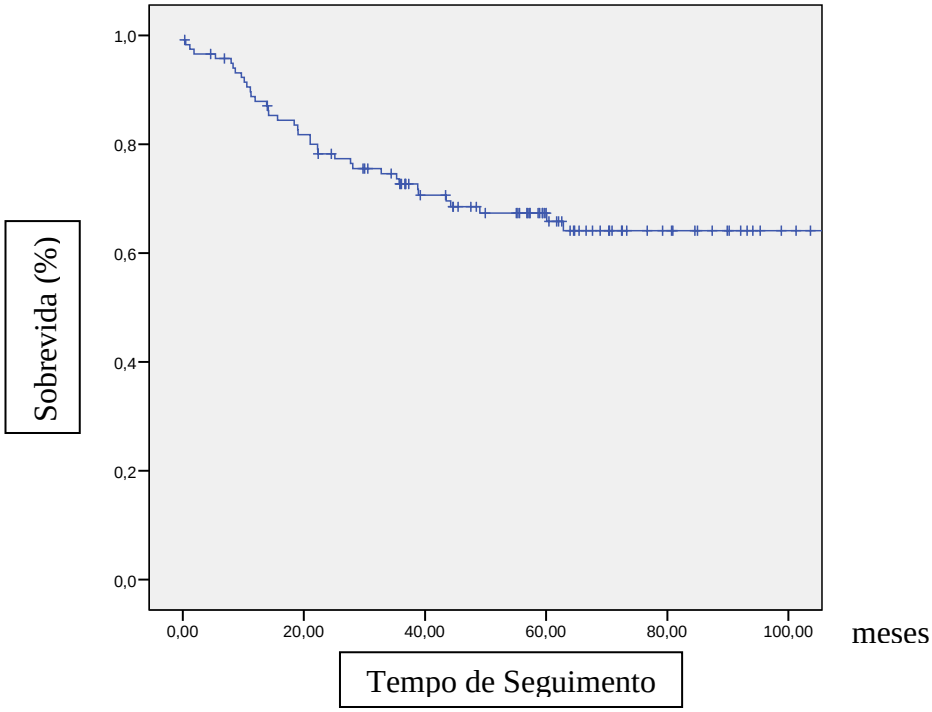
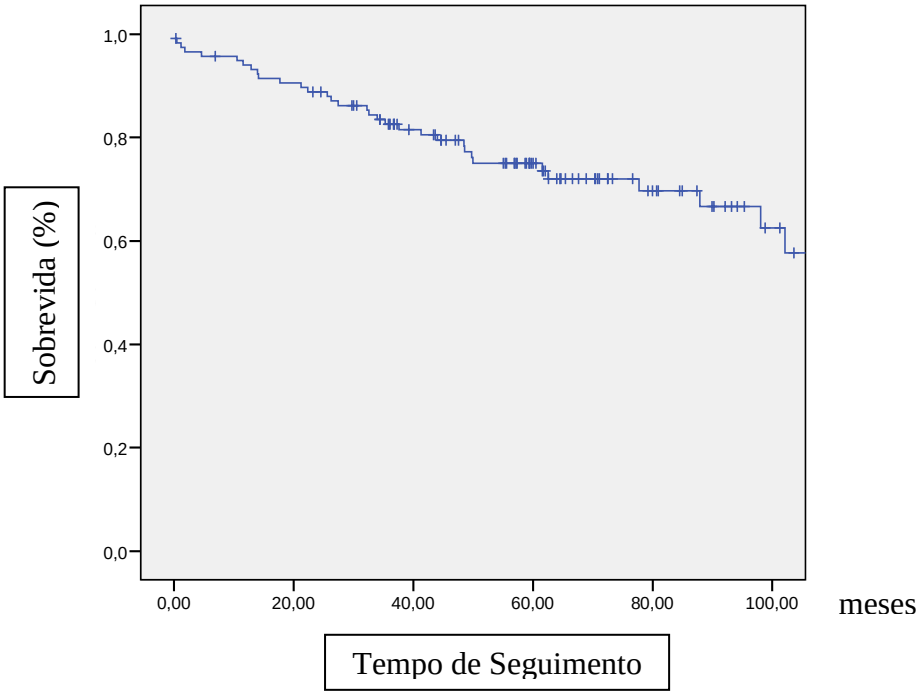


Gráfico 2 – Curva de sobrevida global dos 118 pacientes



4- RESULTADOS

4.1- TESTES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS

Entre os 118 pacientes que compõem a casuística, não houve diferença significativa na distribuição da expressão de EGFR entre as variáveis estudadas, exceto em relação à localização da neoplasia, onde 75% dos pacientes com tumor em reto apresentaram expressão positiva, contra 52,4% entre os tumores de cólon (p=0,02). A tabela 4 mostra a distribuição de EGFR e das outras variáveis na amostra total.

Em relação à expressão ErbB2, não houve diferença significativa na distribuição da expressão entre as variáveis estudadas, exceto no que refere ao estadiamento, onde 1,8% dos pacientes com estádio II apresentavam expressão positiva, contra 12,7% entre os pacientes com estádio III (p=0,03). A tabela 5 mostra a distribuição de ErbB2 e das outras variáveis na amostra total.

A expressão de ErbB3 teve diferença significativa em relação à presença de embolização linfática, com expressão positiva em 79,5% dos pacientes com ausência de embolização linfática frente a 46,7% dos com presença de embolização linfática (p=0,001). Não houve diferença significativa entre as demais variáveis estudadas. A tabela 6 mostra a distribuição de ErbB3 e das outras variáveis na amostra total.

Em relação à expressão de ErbB4, não houve diferença significativa entre todas as variáveis estudadas, tanto para expressão em membrana quanto em citoplasma. As tabelas 7 e 8 mostram a distribuição de ErbB4 e das outras variáveis na amostra total. A tabela 9 mostra a correlação entre as variáveis da família ErbB.

Tabela 4 – Correlação entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão de EGFR

		Expressão de EGFR		
Variável	Categoria	Negativa	Positiva	p
Idade	<65 anos	26	33	0,45
	>65 anos	22	37	
Sexo	Masculino	20	21	0,19
	Feminino	28	49	
Localização	Cólon	39	43	0,02
	Reto	9	27	
Estádio	II	22	33	0,88
	III	26	37	
Embolização sanguínea	Ausente	39	63	0,17
	Presente	9	7	
Embolização linfática	Ausente	33	55	0,22
	Presente	15	15	
Invasão perineural	Ausente	40	55	0,52
	Presente	8	15	
Grau histológico	Baixo	15	12	0,08
	Alto	33	56	

Tabela 5 – Correlação entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão de ErbB2

		Expressão de ErbB2		
Variável	Categoria	Negativa	Positiva	p
Idade	<65 anos	55	4	1,0
	>65 anos	54	5	
Sexo	Masculino	39	2	0,49
	Feminino	70	7	
Localização	Cólon	75	7	0,72
	Reto	34	2	
Estádio	II	54	1	0,036
	III	55	8	
Embolização sanguínea	Ausente	94	8	1,0
	Presente	15	1	
Embolização linfática	Ausente	82	6	0,69
	Presente	27	3	
Invasão perineural	Ausente	87	8	1,0
	Presente	22	1	
Grau histológico	Baixo	24	3	0,43
	Alto	83	6	

Tabela 6 – Correlação entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão de ErbB3

		Expressão de ErbB3		
Variável	Categoria	Negativa	Positiva	p
Idade	<65 anos	13	46	0,10
	>65 anos	21	38	
Sexo	Masculino	15	26	0,17
	Feminino	19	58	
Localização	Cólon	26	56	0,29
	Reto	8	28	
Estádio	II	17	38	0,63
	III	17	46	
Embolização sanguínea	Ausente	27	75	0,23
	Presente	7	9	
Embolização linfática	Ausente	18	70	0,001
	Presente	16	14	
Invasão perineural	Ausente	28	67	0,74
	Presente	6	17	
Grau histológico	Baixo	8	19	0,96
	Alto	26	63	

Tabela 7 – Correlação entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão de ErbB4 em membrana

		Expressão de ErbB4 em membrana		
Variável	Categoria	Negativa	Positiva	p
Idade	<65 anos	52	7	0,54
	>65 anos	54	5	
Sexo	Masculino	36	5	0,59
	Feminino	70	7	
Localização	Cólon	74	8	1,0
	Reto	32	4	
Estádio	II	51	4	0,37
	III	55	8	
Embolização sanguínea	Ausente	93	9	0,20
	Presente	13	3	
Embolização linfática	Ausente	78	10	0,72
	Presente	28	2	
Invasão perineural	Ausente	87	8	0,24
	Presente	19	4	
Grau histológico	Baixo	26	1	0,45
	Alto	79	10	

Tabela 8 – Correlação entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão de ErbB4 em citoplasma

		Expressão de ErbB4 em citoplasma		
Variável	Categoria	Negativa	Positiva	p
Idade	<65 anos	45	14	0,36
	>65 anos	49	10	
Sexo	Masculino	33	8	0,87
	Feminino	61	16	
Localização	Cólon	67	15	0,40
	Reto	27	9	
Estádio	II	46	9	0,31
	III	48	15	
Embolização sanguínea	Ausente	80	22	0,52
	Presente	14	2	
Embolização linfática	Ausente	69	19	0,56
	Presente	25	5	
Invasão perineural	Ausente	74	21	0,40
	Presente	20	3	
Grau histológico	Baixo	20	7	0,36
	Alto	73	16	

Tabela 9 – Correlação entre as expressões imunoistoquímicas de EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 dos 118 pacientes

Expressão Imunoistoquímica		**EGFR**		**ErbB2**		**ErbB3**		**ErbB4 membrana**	
		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
ErbB2	Negativo	44 (37,3%)	65 (55,1%)						
	Positivo	4 (3,4%)	5 (5,2%)						
ErbB3	Negativo	22 (18,6%)	12 (10,2%)	34 (28,8%)	0				
	Positivo	26 (22%)	58 (49,2%)	75 (63,6%)	9 (7,6%)				
ErbB4 membrana	Negativo	45 (38,2%)	61 (51,7%)	99 (83,9%)	7 (5,9%)	31 (26,3%)	75 (63,6%)		
	Positivo	3 (2,5%)	9 (7,6%)	10 (8,5%)	2 (1,7%)	3 (2,5%)	9 (7,6%)		
ErbB4 citoplasma	Negativo	45 (38,2%)	49 (41,5%)	87 (73,8%)	7 (5,9%)	32 (27,1%)	62 (52,6%)	85 (72%)	9 (7,6%)
	Positivo	3 (2,5%)	21 (17,8%)	22 (18,6%)	2 (1,7%)	2 (1,7%)	22 (18,6%)	21 (17,8%)	3 (2,5%)

4.2. SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

À análise univariada, para a amostra total de 118 pacientes, observamos que presença de embolização linfática, presença de invasão perineural, expressão imunoistoquímica negativa de ErbB3 e positiva de ErbB4 em membrana influenciaram negativamente a sobrevida livre de doença em cinco anos (gráficos 3 e 4). As variáveis estádio e quimioterapia adjuvante não tiveram impacto sobre a sobrevida livre de doença. A tabelas 10 e 11 mostram a relação entre as taxas de sobrevida livre de doença em cinco anos para as variáveis estudadas, com os respectivos valores de significância estatística.

Quando separamos a amostra total em estádios II e III, a expressão imunoistoquímica de ErbB3 e ErbB4 em membrana ainda assim influenciaram o risco de recaída em cinco anos para cada estádio (respectivamente p=0,006 e p=0,033).

Ao estratificar a amostra total em pacientes submetidos a tratamento adjuvante ou não com quimioterapia, a expressão imunoistoquímica de ErbB3 e ErbB4 em membrana ainda assim influenciaram o risco de recaída em cinco anos para cada grupo (respectivamente p=0,008 e p=0,015).

No modelo multivariado aplicado à amostra, considerando-se embolização linfática, embolização sanguínea, invasão perineural, expressão de ErbB3 e expressão de ErbB4 em membrana, apenas a expressão negativa de ErbB3 (risco relativo: 2,43; intervalo de confiança (95%): 1,26 – 4,66) e a expressão positiva de ErbB4 em membrana (risco relativo: 3,03; intervalo de confiança (95%): 1,31 – 6,98) mantêm-se como fator independente para risco de recaída (tabela 12).

Gráfico 3 – Curvas de sobrevida livre de doença em função da expressão de ErbB3 dos 118 pacientes.

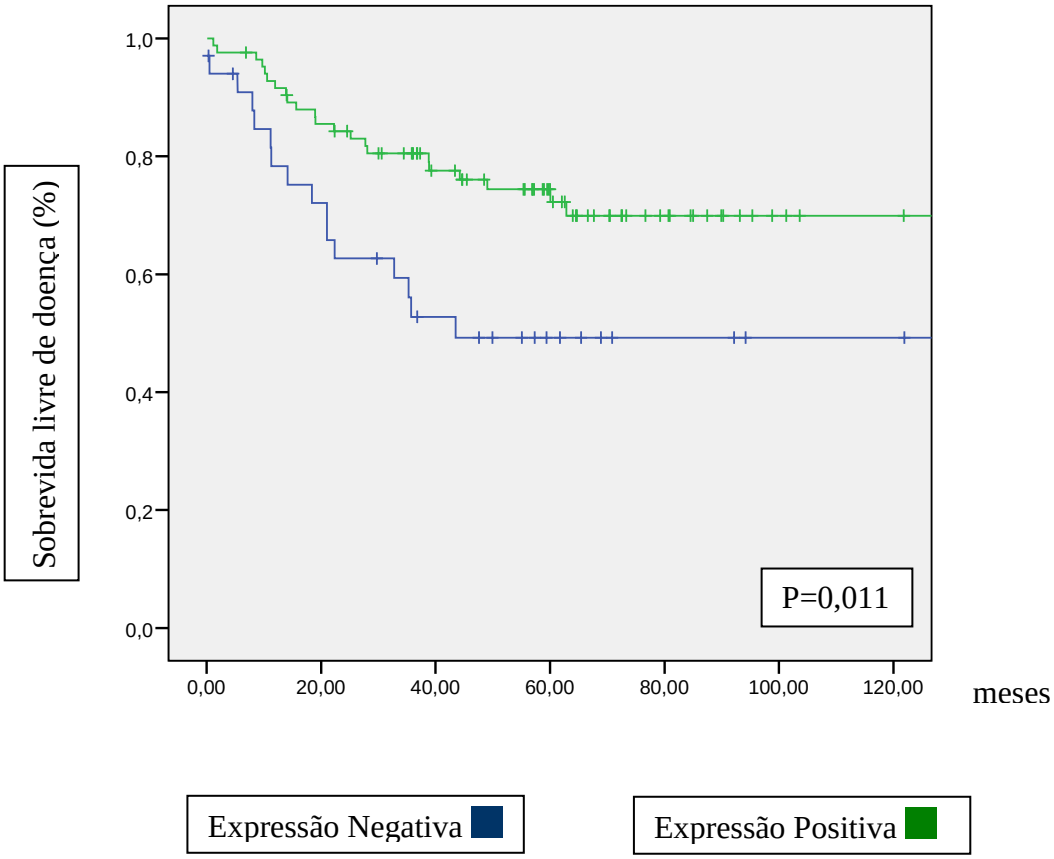


Gráfico 4 – Curvas de sobrevida livre de doença em função da expressão de ErbB4 em membrana dos 118 pacientes.

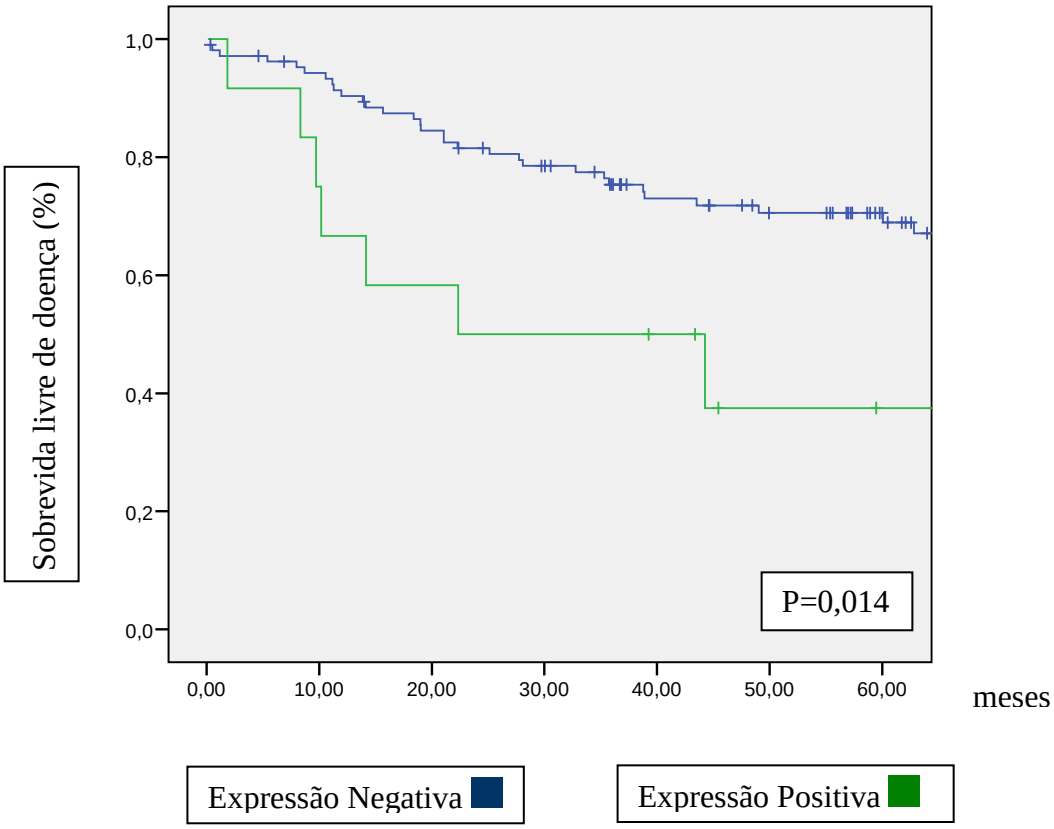


Tabela 10 – Taxas de sobrevida livre de doença (SLD) em função das variáveis clinicopatológicas – Análise univariada

Variável	Categoria	SLD (%) em 5 anos	p
Idade	<65 anos	67,8	0,65
	>65 anos	67,8	
Sexo	Masculino	70,7	0,86
	Feminino	66,2	
Localização	Cólon	70,7	0,39
	Reto	61,1	
Estádio	II	74,5	0,15
	III	61,9	
Embolização sanguínea	Ausente	70,6	0,08
	Presente	50,0	
Embolização linfática	Ausente	75,0	0,004
	Presente	46,7	
Invasão perineural	Ausente	72,6	0,028
	Presente	47,8	
Grau histológico	Baixo	59,3	0,24
	Alto	69,7	
Quimioterapia adjuvante	Não	70,6	0,71
	Sim	65,7	

Tabela 11– Taxas de sobrevida livre de doença (SLD) em função das expressões imunoistoquímicas de EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 – Análise univariada

Variável	Expressão	SLD (%) em 5 anos	p
EGFR	Negativa	70,8	0,44
	Positiva	65,7	
ErbB2	Negativa	67,9	0,98
	Positiva	66,7	
ErbB3	Negativa	52,9	0,011
	Positiva	73,8	
ErbB4 membrana	Negativa	70,8	0,014
	Positiva	41,7	
ErbB4 citoplasma	Negativa	67,0	0,75
	Positiva	70,8	

Tabela 12– Risco de recidiva dos 118 pacientes estudados – Modelo multivariado

Variável	RR	IC 95%	p
Expressão negativa de ErbB3	2,43	1,26 – 4,66	0,007
Expressão positiva de ErbB4 em membrana	3,03	1,31 – 6,98	0,009

4.3- SOBREVIDA GLOBAL

À análise univariada, para amostra de 118 pacientes, observamos que idade igual ou maior que 65 anos, presença de embolização linfática e expressão negativa de ErbB3 influenciaram negativamente a sobrevida global em 5 anos (gráficos 5 e 6). As tabelas 13 e 14 mostram as taxas de sobrevida global em cinco anos para as variáveis estudadas, com os respectivos valores de significância estatística.

Quando separamos a amostra total em estádios II e III, a expressão imunoistoquímica de ErbB3 ainda assim influenciou o risco de óbito em cinco anos (p=0,001).

Ao estratificar a amostra total em pacientes submetidos a tratamento adjuvante ou não, a expressão imunoistoquímica de ErbB3 ainda assim influenciou o risco de óbito em cinco anos (p=0,003).

No modelo multivariado aplicado a toda amostra, considerando-se idade igual ou maior que 65 anos, embolização linfática, invasão perineural, expressão de ErbB3 e expressão de ErbB4 em membrana, apenas a idade igual ou maior que 65 anos (risco relativo 2,83; intervalo de confiança (95%): 1,36 – 5,90) e a expressão negativa de ErbB3 (risco relativo: 2,52; intervalo de confiança (95%): 1,28 – 4,97) mantêm-se como fator independente para risco de óbito.

Gráfico 5 – Curvas de sobrevida global em função da idade dos 118 pacientes

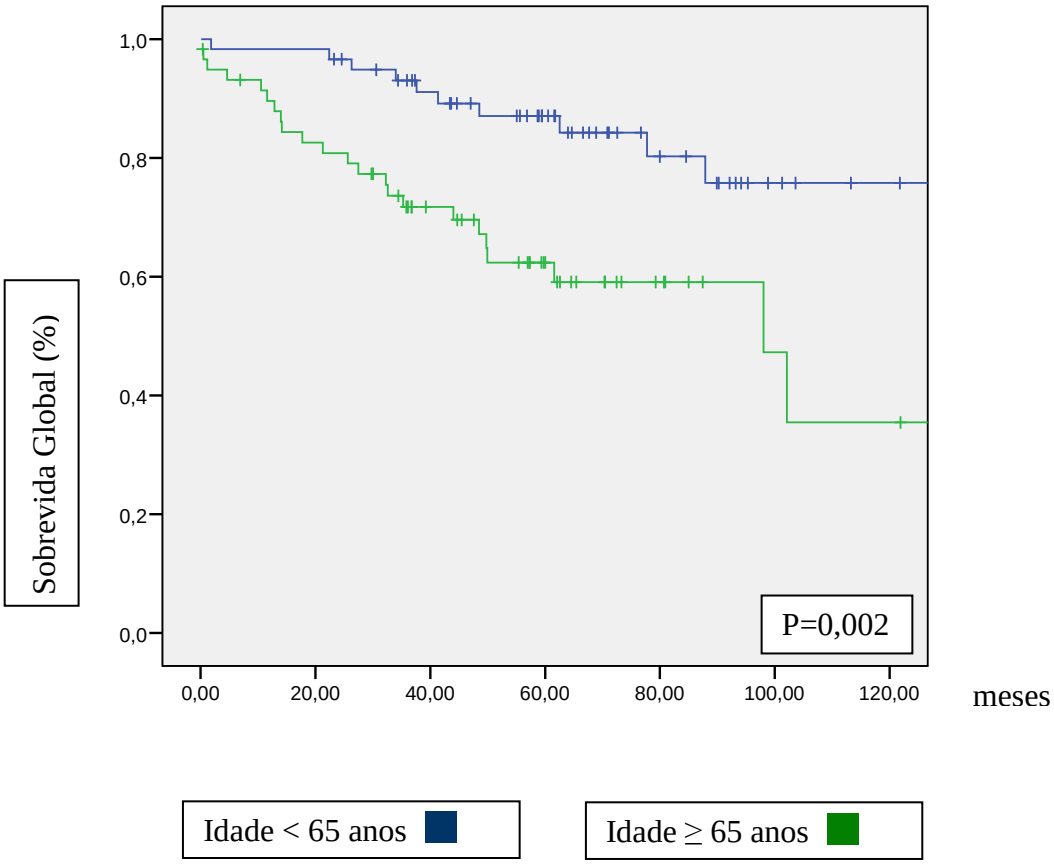


Gráfico 6 – Curvas de sobrevida global em função da expressão de ErbB3 dos 118 pacientes.

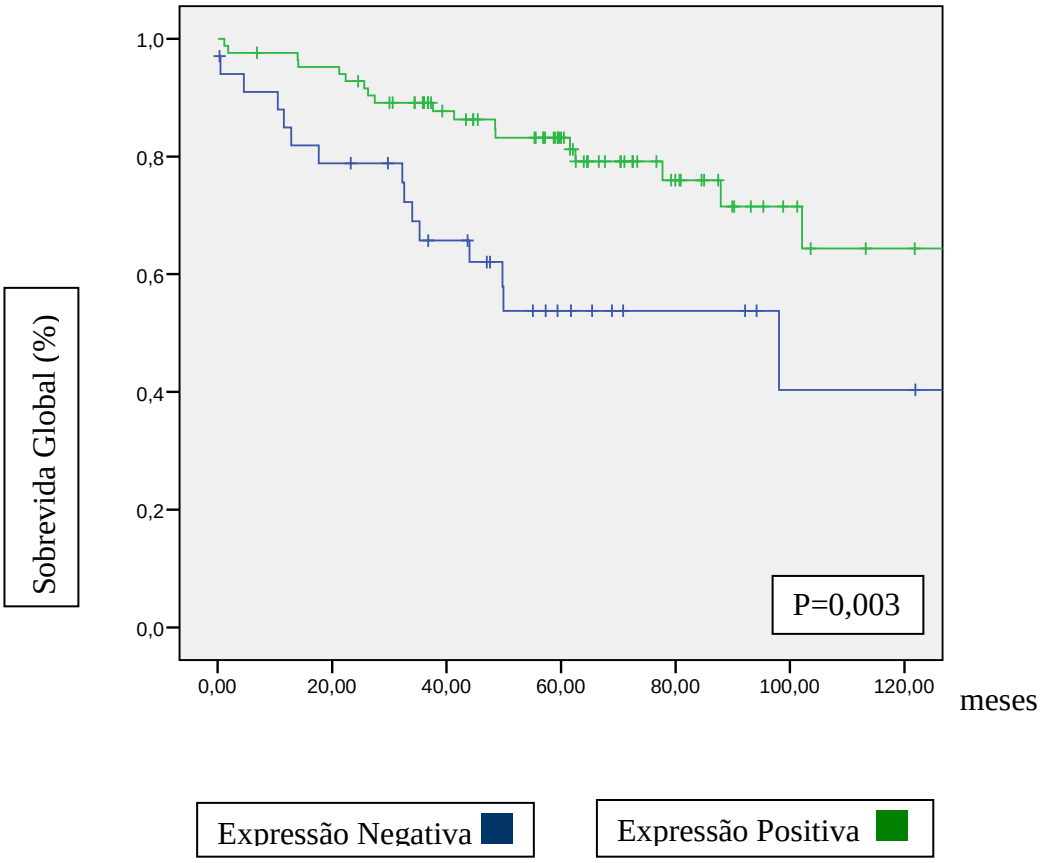


Tabela 13– Taxas de sobrevida global (SOB) em função das variáveis clinicopatológicas – Análise univariada

Variável	Categoria	SOB (%) em 5 anos	p
Idade	<65 anos	81,4	0,002
	>65 anos	61,0	
Sexo	Masculino	73,2	0,99
	Feminino	70,1	
Localização	Cólon	72,0	0,88
	Reto	69,4	
Estádio	II	74,5	0,19
	III	68,3	
Embolização sanguínea	Ausente	72,5	0,43
	Presente	62,5	
Embolização linfática	Ausente	78,4	0,005
	Presente	50,0	
Invasão perineural	Ausente	74,7	0,10
	Presente	56,5	
Grau histológico	Baixo	66,7	0,55
	Alto	73,0	
Quimioterapia adjuvante	Não	64,7	0,39
	Sim	76,1	

Tabela 14– Taxas de sobrevida global (SOB) em função das expressões imunoistoquímicas de EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 – Análise univariada

Variável	Expressão	SOB (%) em 5 anos	p
EGFR	Negativa	77,1	0,28
	Positiva	67,1	
ErbB2	Negativa	72,5	0,30
	Positiva	55,6	
ErbB3	Negativa	52,9	0,003
	Positiva	78,6	
ErbB4 membrana	Negativa	71,7	0,24
	Positiva	66,7	
ErbB4 citoplasma	Negativa	69,1	0,39
	Positiva	79,2	

Tabela 15– Risco de óbito dos 118 pacientes estudados – Modelo multivariado

Variável	RR	IC 95%	p
Expressão negativa de ErbB3	2,52	1,28 – 4,97	0,007
Idade igual ou maior que 65 anos	2,83	1,36 – 5,90	0,005

5- DISCUSSÃO

No presente estudo, foram excluídos pacientes com câncer de reto médio e baixo com o objetivo de uniformizar a modalidade de tratamento locorregional. A utilização da técnica de TMA possibilitou a amostragem de até quatro fragmentos de cada neoplasia, número este suficiente para avaliação semi-quantitativa eficaz mesmo de tumores que apresentam expressão heterogênea de um determinado marcador imunoistoquímico (Goethals et al., 2006).

Quanto a variável idade, fazer parte do grupo de pacientes com idade igual ou acima de 65 anos não teve impacto negativo para recidiva, porém teve impacto negativo para sobrevida global. A média e mediana de idade da amostra total foram respectivamente de 61,5 e 64,5 anos. Os tempos de seguimento médio e mediano foram respectivamente de 60,4 e 58,8 meses. A sobrevida global da amostra foi de 71,2% e câncer específico de 72,9% em 5 anos. O impacto negativo na sobrevida global dos pacientes com idade acima de 65 anos pode ser justificado pelo longo tempo de seguimento mediano em uma população com idade mediana acima de 60 anos e com boa sobrevida global em 5 anos.

Quanto à realização de quimioterapia, 38,2% dos pacientes com estádio II foram submetidos à quimioterapia adjuvante ante a 73% dos pacientes com estádio III. A quimioterapia adjuvante realizada durante o período de estudo foi baseada em 5-FU e leucovorin e tanto para os subgrupos estádio II e estádio III quanto para a amostra global, não teve benefício para redução dos eventos recidiva e óbito. Os subgrupos estádio II e III também não tiveram diferença estatística em relação à

sobrevida livre de doença e global. Por um lado haveria a necessidade de um número maior de pacientes para se demonstrar tal diferença, mas por outro lado poderíamos arbitrariamente sugerir que o subgrupo com estádio II associado aos fatores de risco para recaída, poderiam de alguma forma se aproximar do subgrupo com estádio III em relação a risco de recaída e óbito. Porém, esse não foi o objetivo do estudo atual.

O significado da expressão de EGFR já foi investigado para diversos tipos de neoplasias. Já em 1987, Sainsbury et al. (1987) demonstraram a expressão de EGFR em pacientes com câncer de mama como fator prognóstico para recorrência precoce e sobrevida. Posteriormente, outras neoplasias foram investigadas como o câncer de esôfago por Mukaida et al. (1991), o câncer de endométrio por Khalifa et al**.** (1994) e o câncer de colo uterino por Hale et al (1993).

A expressão de EGFR em câncer colorretal e seu impacto no risco de metástase e sobrevida são controversos. Yasui et al (1988) inicialmente mostraram em 45 pacientes dos estadios II e III de cólon, a expressão imunoistoquímica em apenas 26,6% dos casos. Radinski et al. (1995) mostraram através de estudo experimental com injeção de clones celulares com alta e baixa expressão de EGFR em cobaias (camundongos), que a alta expressão de EGFR estaria diretamente relacionada com a habilidade de desenvolver metástases hepáticas. Em outro estudo, Mckay et al (2002a) avaliaram a expressão imunoistoquímica de EGFR em 249 primários colorretais e sua correlação com 42 metástases linfonodais. A expressão foi positiva em 72,7% dos tumores (29,3% em membrana, 37,8% em membrana e citoplasma, 5,6% em citoplasma) e em 30,9% dos linfonodos. Apenas 40,5% dos casos tiveram expressão equivalente em tumor e linfonodo e não houve influência na sobrevida. Assim como o estudo anterior, Scartozzi et al (2004) procuraram avaliar a

expressão no tumor primário e em seus sítios de metástase. Não encontraram em 99 pacientes a relação entre a expressão de EGFR em tumores colorretais primários e em seu sítio de metástase à distância hepática, pulmonar, cerebral e óssea. Importante ressaltar que considerou apenas a coloração imunoistoquímica em membrana celular e como positiva se expressão em um número maior ou igual a 1% das células. Em relação ao tumor primário, 53% dos casos apresentaram expressão positiva e destes 85% tiveram expressão acima de 10% das células tumorais. Em 36% dos casos onde a expressão era positiva no tumor primário, houve correspondente negativo na metástase e em 15% onde a expressão do primário era negativa, havia metástase com expressão positiva.

Em relação ao tumor primário, foi aventada a possibilidade de mudança na expressão de EGFR durante o próprio processo de invasão tumoral. Com o objetivo de sugerir um modelo de expressão e sistema de escore através da avaliação da expressão em 3 diferentes profundidades da invasão tumoral, Goldstein e Armin (2001) estudaram 102 pacientes com câncer de cólon. Observaram reação imunoistoquímica em 75,5% dos casos, porém houve impacto negativo na análise multivariada em relação à recidiva e sobrevida quando a expressão foi moderada ou intensa, ou apenas intensa em localização profunda do tumor.

Outros estudos se propuseram a avaliar a correlação entre expressão imunoistoquímica de EGFR em relação à sobrevida. Steele et al (1990) avaliaram 50 pacientes com câncer colorretal e observaram maior expressão no estádio III e em tumores pouco diferenciados, assim como relação com piora na sobrevida. Spano et al (2004) estudaram o impacto da expressão de EGFR no prognóstico de 150 pacientes com câncer de cólon e reto. A expressão foi avaliada por escore obtido

através da porcentagem e células tumorais e intensidade de expressão. Encontraram alta expressão em 80% dos casos, maior expressão nos tumores classificados como T3 na análise multivariada e não houve impacto em sobrevida global e livre de doença. Por outro lado, Galizia et al (2006) ao estudar 149 pacientes com apenas câncer de cólon, obtiveram resultado divergente. Houve positividade em apenas 35,6% dos casos, mesmo considerando positiva a expressão em um número maior ou igual a 1% das células tumorais. Deste grupo, 126 pacientes foram submetidos a tratamento curativo e a expressão de EGFR foi fator independente para recidiva e sobrevida. Trata-se do único estudo que excluiu pacientes com câncer de reto da amostra e avaliou apenas pacientes com câncer de cólon.

No presente estudo foi encontrada expressão positiva de EGFR em 59,3% dos pacientes com câncer de cólon e reto alto, sendo que houve diferença estatística (p=0,02) em relação à localização da neoplasia, com 75% dos tumores de reto alto apresentando expressão positiva frente a 52,4% dos tumores de cólon.

Rusch et al. (1995) e Piyathilake et al. (2002) avaliaram a expressão imunoistoquímica de EGFR em mucosa brônquica e em câncer de pulmão e consideraram a expressão em citoplasma um fator prognóstico. Cunningham et al. (2005) publicaram estudo com 87 pacientes portadores de câncer colorretal estádio III onde a expressão de EGFR citoplasmática foi fator de melhor prognóstico para pacientes submetidos à radioterapia. No presente estudo, a expressão foi apenas encontrada em citoplasma, fato este que se contrapõe aos achados de outros estudos. A internalização do receptor ou a presença de moléculas do receptor em citoplasma poderia justificar este achado. Assim como na maioria dos estudos publicados, não

houve impacto em sobrevida global e livre de doença apesar da diferença metodológica para avaliação imunoistoquímica entre os estudos.

Quanto ao produto do oncogene ErbB2, sabe-se que está envolvido com o desenvolvimento de neoplasias como mama, ovário e estômago. Wright et al. (1989) demonstraram há mais de uma década que o aumento de sua expressão está associado à recorrência precoce e menor sobrevida no câncer de mama. Slamon et al. (1989b) publicaram dados com impacto no câncer de mama e ovário, e Yonemura et al. (1991) para o câncer gástrico. Atualmente a avaliação da expressão do ErbB2 faz parte da prática clínica no câncer de mama como fator prognóstico. Com o advento da terapia de molécula alvo, passou a ter também papel na conduta terapêutica (American Cancer Society, 2007 e National Comprehensive Cancer Network, 2008).

Em relação ao câncer colorretal, Nathanson et al. (2003) mostraram correlação entre a amplificação gênica através de hibridização in situ por fluorescência (FISH) e a expressão imunoistoquímica de ErbB2 em 139 pacientes com câncer de cólon. Houve expressão em apenas 3,6% dos casos, sem associação com estádio ou sobrevida, sugerindo talvez um papel secundário no desenvolvimento do câncer de cólon. Além da expressão de EGFR, Mckay et al. (2002b) também avaliaram a expressão imunoistoquímica de ErbB2 em 249 pacientes com câncer colorretal primário e em 42 metástases linfonodais. Considerou positiva a expressão moderada (1+) e intensa em membrana (2+) em 81,8% dos pacientes e foi significativamente maior em tumores de cólon. Apenas 52,4% das metástases linfonodais tiveram concordância com o tumor primário. Não houve correlação com sobrevida. Por outro lado, utilizando a mesma metodologia do estudo anterior, Schuell et al. (2006) observaram, em 77 pacientes com câncer colorretal a ausência

de expressão de ErbB2 em 70% dos tumores e 26% tiveram apenas fraca expressão. Para ambos não houve diferença estatística em sobrevida. O mesmo foi encontrado por Ochs et al. (2004) que estudaram 109 casos de tumores de cólon estadio II, onde houve expressão em apenas 11% dos casos, sem diferença em sobrevida. Jesus et al. (2005) estudaram 117 tumores colorretais. Houve expressão de ErbB2 em 48,1% dos casos (considerado positivo acima de 10% das células tumorais coradas), também sem relação com sobrevida.

Dois estudos encontraram expressão de ErbB2 em citoplasma. Essapen et al. (2004) encontraram em 170 tumores colorretais, a expressão em membrana em 41% e em citoplasma em 87% dos casos, sendo este fator independente de melhor prognóstico nos Dukes' C (estádio III). Concluiu que a expressão em citoplasma seria incapaz de transmitir sinal para heterodimerização. Contrastando com o estudo anterior, Osako et al. (1998) ao estudarem 146 pacientes, revelaram expressão em membrana em 3% e citoplasma em 68,5% dos casos. A hiperexpressão em citoplasma foi fator prognóstico negativo para sobrevida em pacientes Dukes' B (estádio II). Sugeriu haver relação entre a sua expressão e a progressão do câncer colorretal.

No presente estudo, a expressão imunoistoquímica de ErbB2 em membrana foi considerada positiva em apenas 7,6% dos casos. Apesar do pequeno número de casos com expressão positiva, houve diferença estatística (p=0,03) para o estádio III (12,7% dos casos) em relação ao estádio II (1,8% dos casos). Sua expressão não teve relação com sobrevida global ou recidiva no grupo estudado, corroborando com a maioria dos estudos publicados.

Outros estudos procuraram avaliar a co-expressão de EGFR e ErbB2. Kluftinger et al. (1992) avaliaram 32 casos de câncer colorretal, e encontraram expressão aumentada de EGFR e ErbB2 em 43% e 38% dos casos respectivamente, com expressão concomitante em apenas 17% dos casos. A expressão de EGFR foi significativamente maior em estádios avançados (Dukes C e D / estádios III e IV) e em tumores pouco diferenciados. Cunningham et al. (2006) avaliaram 87 pacientes com câncer colorretal estádio III. Expressaram EGFR e ErbB2 respectivamente 83% e 89% dos casos. A expressão de EGFR e ErbB2 foi no citoplasma acima de 50% das células tumorais em 63% e 75% dos casos. A co-expressão ocorreu em 75% dos casos e não foi fator de pior prognóstico. No estudo atual, a co-expressão de EGFR e erbB2 ocorreu em apenas 3,4% dos casos e não teve correlação com prognóstico.

Com o objetivo de avaliar a relação entre a expressão da família ErbB em tecido colorretal normal, em pólipos adenomatosos e na neoplasia maligna, foram realizados 3 estudos. Uner et al. (2005) estudaram em conjunto 85 adenocarcinomas colorretais e 37 pólipos adenomatosos. Encontraram expressão significativamente maior de ErbB2 e ErbB3 nos pólipos que nos adenocarcinomas. Maurer et al. (1998) avaliaram 35 pacientes com câncer colorretal. Observaram expressão fraca de ErbB2 e ErbB3 em tecido colônico normal, porém expressão moderada e intensa de ErbB3 (89%) e ErbB2 (83%) tanto por imunoistoquímica quanto por Northern Blots nos adenocarcinomas, e expressão concomitante em 77% dos tumores. Houve expressão imunoistoquímica de ErbB3 tanto em membrana quanto em citoplasma. Não houve expressão importante de EGFR no tecido colônico normal e no tumoral. Sugerem no estudo que a co-expressão suporta a hipótese do papel dos dois receptores através da formação de heterodímeros. Porebska et al. (2000) também compararam a expressão

em adenomas e adenocarcinomas. A expressão de ErbB2 foi mais frequente nos adenomas (87%) que nos adenocarcinomas (54%), ao contrário de ErbB3 que foi mais importante nos adenocarcinomas (65%) que nos adenomas (40%).

Outros autores estudaram em conjunto a expressão dos receptores da família ErbB/HER no câncer colorretal. Lee et al. (2001) publicaram estudo com 125 pacientes submetidos a tratamento cirúrgico curativo. A avaliação da expressão imunoistoquímica de EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 foi estratificada em ausente, 1+ (expressão menor que 20% das células) e 2+ (expressão maior que 20% das células ou coloração intensa). Tiveram expressão ausente 49% para EGFR, 65% para ErbB2, 63% para ErbB3 e 78% para ErbB4. A aumento da expressão isolada de ErbB3 e também quando associada ao ErbB2 foi significativamente maior em estádios precoces (Dukes A e B / estádios I e II), enquanto a expressão isolada de ErbB4 e também quando associada ao ErbB2 foi significativamente maior nos estádios mais avançados (Dukes C e D / estádios III e IV). Os autores argumentam que como a afinidade do ErbB4 ao ligante neuregulina é maior que ao ErbB3, espera-se que o potencial mitogênico quando expresso o heterodímero ErbB2 e ErbB4 seja maior que o heterodímero ErbB2 e ErbB3 e, portanto pior prognóstico. Não houve impacto na recidiva e sobrevida isoladamente, porém a hiperexpressão simultânea de ErbB2 e ErbB4 teve impacto negativo na sobrevida pela análise univariada, provavelmente devido à correlação com os estádios mais avançados.

Kountourakis et al. (2006) mostraram em 106 tumores colorretais, a expressão de ErbB3 em membrana e citoplasma respectivamente em 17% e 28,3% dos casos. Em relação ao ErbB4, respectivamente em 18,2% e 30,2% dos casos. A positividade em citoplasma de ErbB3 estava associada a tumores de grau moderado e

ErbB4 em membrana a envolvimento linfonodal. Sugeriram em seu estudo que a expressão de ErbB4 estaria relacionada com o potencial para disseminação linfonodal. Não houve impacto no risco de recidiva e sobrevida.

Mesmo para os tumores primários não colorretais, o papel prognóstico da expressão imunoistoquímica de ErbB3 aparece na literatura com dados conflitantes. Por um lado, a sua superexpressão foi associada a um pior fenótipo para neoplasia gástrica (Kobayashi et al., 2003), com o crescimento tumoral em mucosa oral (Sakurai et al., 2000), e com a proliferação tumoral em câncer de mama (Tovey et al., 2004). Por outro lado, outros estudos não encontraram correlação da sua expressão com pior prognóstico mesmo em câncer de mama (Esteva et al., 2001) e de cavidade oral (De Vicente et al., 2003).

Encontramos no presente estudo a expressão de ErbB3 apenas em citoplasma, fato este previamente descrito por Kapitanovic et al. (2000), que estudaram a expressão imunoistoquímica de ErbB3 em pólipos colônicos e no adenocarcinoma de cólon. Segundo este estudo, não houve expressão nos pólipos colônicos, porém houve expressão positiva em 78% dos adenocarcinomas. A expressão foi idêntica em todos os casos e exclusivamente em citoplasma. A expressão positiva de ErbB3 teve impacto negativo na sobrevida global em análise multivariada. A expressão de ErbB3 em citoplasma também já foi descrita em outro tumor primário como o câncer de próstata (Koumakpayi et al., 2006).

No presente estudo a expressão positiva de ErbB3 foi maior no grupo com a ausência de embolização linfática. A expressão negativa de ErbB3 teve impacto negativo na recidiva e na sobrevida global dos pacientes tanto na análise univariada quanto na multivariada.

Sabe-se que o receptor ErbB3 tem baixa atividade em comparação aos outros receptores da família. Sua baixa expressão poderia então indiretamente aumentar ou perpetuar o estímulo da divisão celular realizado por outras vias. Outra hipótese reside no fato de a presença de expressão em citoplasma alterar a disponibilidade de formação de heterodímeros em membrana plasmática, fato esse que alteraria a resposta aos ligantes e favoreceria outras vias (Koumakpayi et al., 2006).

Há evidências em literatura que defendem que a heterodimerização dos receptores da família ErbB relacionadas ao ligante são necessárias para diversificação e especificidade das respostas biológicas e que a natureza de transição dos heterodímeros inclui previamente a atuação do ErbB3 como efeito supressor ao sinal induzido e relacionado ao ligante do ErbB4 (Feroz et al., 2002). Talvez o aumento da expressão de ErbB3 poderia por alguma via inibir a transcrição de sinal induzido pelos ligantes da família ErbB.

A expressão imunoistoquímica do ErbB4 em câncer colorretal foi até o momento menos estudada e não há definição de seu papel como fator prognóstico. No estudo atual, a expressão positiva de ErbB4 apenas em membrana teve impacto negativo na recidiva tanto na análise univariada quanto na multivariada. Porém, não houve impacto na sobrevida global dos pacientes em ambas as análises. Não houve correlação entre recidiva e sobrevida com a expressão de ErbB4 em citoplasma.

As expressões imunoistoquímicas de ErbB3 e ErbB4 em membrana permaneceram como fator prognóstico para recidiva mesmo quando a amostra total foi estratificada em subgrupos estádio II e III, e em subgrupos que receberam ou não quimioterapia adjuvante.

Existem algumas razões para justificar tantos resultados discrepantes entre os diversos estudos. Os sistemas de escore utilizados para o câncer colorretal são habitualmente baseados na proporção de células coradas em combinação com a intensidade de coloração e a interpretação da intensidade de coloração além de ser bastante subjetiva, pode sofrer variações entre os protocolos e até nos procedimentos de fixação de material. O número pequeno de pacientes em alguns estudos, diferentes sistemas de escore, fontes diversas do anticorpo e variações de protocolo do estudo imunoistoquímico tornam a comparação entre os estudos um grande desafio.

O presente estudo foi o primeiro a estabelecer relação prognóstica entre a expressão de ErbB3 e ErbB4 para pacientes estádios II e III após cirurgia curativa e através da técnica de TMA. O presente resultado deverá ainda ser reproduzido por outros estudos, porém nossos achados sugerem um possível papel do ErbB3 e ErbB4 no processo de carcinogênese do câncer colorretal. A melhor estratificação de risco para pacientes estádios II e III é necessária para que no futuro possam receber tratamento complementar adequado e específico.

6- CONCLUSÕES

1. As expressões imunoistoquímicas positivas de EGFR, ErbB2 e ErbB3 foram encontradas em respectivamente 59,3%, 7,6% e 71,2% dos casos estudados.

2. As expressões imunoistoquímicas positivas de ErbB4 em membrana e de ErbB4 em citoplasma foram encontradas em respectivamente 10,2% e 20,3% dos casos estudados.

3. As expressões imunoistoquímicas positivas de EGFR, ErbB2 e em citoplasma de ErbB4 não se associaram a piores taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global.

4. A expressão imunoistoquímica negativa de ErbB3 foi variável de risco independente para recidiva e óbito, identificada pela análise multivariada.

5. A expressão imunoistoquímica positiva de ErbB4 em membrana foi variável de risco independente para recidiva, identificada pela análise multivariada. Entretanto, não esteve associada a piores taxas de sobrevida global.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J. *Manual de imuno-histoquímica*. Sociedade Brasileira de Patologia. São Paulo, 1999.

American Cancer Society – Surveillance Research. Disponível em: < URL: http://www.cancer.org > [20/04/2008].

André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al.: Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350 (23): 2343-51, 2004.

Badra FA, Karamouzis MV, Ravazoula P, Likaki-Karatza E, Tzorakoleftherakis E, Koukouras D, et al. Non-palpable breast carcinomas: correlation of mammographically detected malignant-appearing microcalcifications and epidermal growth factor receptor (EGFR) family expression. *Cancer Lett*. 2006 Nov 28;244(1):34-41.

Benson AB 3rd, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, Krzyzanowska MK, Maroun J, McAllister P, Van Cutsem E, Brouwers M, Charette M, Haller DG. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Aug 15;22(16):3408-19.

Broders AC. The grading of carcinoma. *Minnesota Med* 1925; 8: 726-30.

Chapuis PH, Dent OF, Newland RC, Bokey EL, Pheils MT. An evaluation of the American Joint Committee (pTNM) staging method for cancer of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum*. 1986 Jan;29(1):6-10.

Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. Nat Rev Mol *Cell Biol*. 2006 Jul;7(7):505-16.

Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer*. 2000 Apr 1;88(7):1739-57.

Compton C, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124(7):979-94.

Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc Br* 1972; 34: 187-220.

Cunningham MP, Essapen S, Thomas H, Green M, Lovell DP, Topham C, Marks C, Modjtahedi H. Coexpression, prognostic significance and predictive value of EGFR, EGFRvIII and phosphorylated EGFR in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2005 Aug;27(2):317-25.

Cunningham MP, Essapen S, Thomas H, Green M, Lovell DP, Topham C, Marks C, Modjtahedi H. Coexpression of the IGF-IR, EGFR and HER-2 is common in colorectal cancer patients. *Int J Oncol*. 2006 Feb;28(2):329-35.

De Gramont A, Banzi M, Navarro M, et al.: Oxaliplatin/5-FU/LV in adjuvant colon cancer: results of the international randomized MOSAIC trial. [Abstract] *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology* 22: A-1015, 2003.

De Vicente JC, Esteban I, Germanà P, Germanà A, Vega JA. Expression of ErbB-3 and ErbB-4 protooncogene proteins in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *Med Oral*. 2003 Nov-Dec;8(5):374-81.

Essapen S, Thomas H, Green M, De Vries C, Cook MG, Marks C, Topham C, Modjtahedi H. The expression and prognostic significance of HER-2 in colorectal cancer and its relationship with clinicopathological parameters. *Int J Oncol*. 2004 Feb;24(2):241-8.

Esteva FJ, Hortobagyi GN, Sahin AA, Smith TL, Chin DM, Liang SY, Pusztai L, Buzdar AU, Bacus SS. Expression of erbB/HER receptors, heregulin and P38 in primary breast cancer using quantitative immunohistochemistry. *Pathol Oncol Res*. 2001;7(3):171-7.

Feroz K, Williams E, Riese DJ 2nd. ErbB2 and ErbB3 do not quantitatively modulate ligand-induced ErbB4 tyrosine phosphorylation. *Cell Signal*. 2002 Sep;14(9):793-8.

Figueredo A, Charette ML, Maroun J, Brouwers MC, Zuraw L. Adjuvant therapy for stage I colon cancer: a systematic review from the CancerCare Ontario Program in evidence-based care's gastrointestinal cancer disease site group. *J Clin Oncol*. 2004 Aug 15;22(16):3395-407.

Finnegan TJ, Carey LA. Gene-expression analysis and the basal-like breast cancer subtype. *Future Oncol*. 2007 Feb;3(1):55-63.

Francini G, Petrioli R, Lorenzini L, Mancini S, Armenio S, Tanzini G, Marsili S, Aquino A, Marzocca G, Civitelli S, et al. Folinic acid and 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Gastroenterology*. 1994 Apr;106(4):899-906.

Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, De Vita F, Castellano P, Orditura M, Imperatore V, La Mura A, La Manna G, Pinto M, Catalano G, Pignatelli C, Ciardiello F. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery. *Ann Surg Oncol*. 2006 Jun;13(6):823-35.

Gelb AB, Schrock TR. Prognostic factors in colorectal carcinomas. *Surg Oncol Clin N Am*. 1997 Jul;6(3):463-94.

Global Cancer Facts & Figures 2007 - American Cancer Society. Disponível em: < URL: http://www.cancer.org > [20/04/2008].

Goethals L, Perneel C, Debucquoy A, De Schutter H, Borghys D, Ectors N, Geboes K, McBride WH, Haustermans KM. A new approach to the validation of tissue microarrays. *J Pathol*. 2006 Apr;208(5):607-14.

Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer*. 2001 Sep 1;92(5):1331-46.

Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther*. 2004 Apr;102(1):37-46.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. *AJCC Cancer Staging Manual* – 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002.

Hale RJ, Buckley CH, Gullick WJ, Fox H, Williams J, Wilcox FL. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in cervical carcinoma. *J Clin Pathol*. 1993 Feb;46(2):149-53.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005 May;5(5):341-54.

IMPACT. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet*. 1995 Apr 15;345(8955):939-44.

Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde. Estimativas da Incidência de Câncer no Brasil 2008. Disponível em: < URL: http://www.inca.gov.br/estimativa/2008 > [20/04/2008].

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*. 1999 Jul;17(7):1983-7.

Jeong EG, Soung YH, Lee JW, Lee SH, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. ERBB3 kinase domain mutations are rare in lung, breast and colon carcinomas. *Int J Cancer*. 2006 Dec 15;119(12):2986-7.

Jesus EC, Matos D, Artigiani R, Waitzberg AF, Goldenberg A, Saad SS. Assessment of staging, prognosis and mortality of colorectal cancer by tumor markers: receptor erbB-2 and cadherins. *Acta Cir Bras*. 2005 Nov-Dec;20(6):422-7. Epub 2005 Nov 8.

Kapitanović S, Radosević S, Slade N, Kapitanović M, Andelinović S, Ferencić Z, Tavassoli M, Spaventi S, Pavelić K, Spaventi R. Expression of erbB-3 protein in colorectal adenocarcinoma: correlation with poor survival. J Cancer Res Clin Oncol. 2000 Apr;126(4):205-11.

Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 8: 423-46.

Karamouzis MV, Badra FA, Papavassiliou AG. Breast cancer: the upgraded role of HER-3 and HER-4. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(5):851-6.

Kemeny N, Saltz L, Cohen A. Adjuvant therapy of colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 1997 Oct;6(4):699-722.

Khalifa MA, Abdoh AA, Mannel RS, Haraway SD, Walker JL, Min KW. Prognostic utility of epidermal growth factor receptor overexpression in endometrial adenocarcinoma. *Cancer*. 1994 Jan 15;73(2):370-6.

Kluftinger AM, Robinson BW, Quenville NF, Finley RJ, Davis NL. Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer. *Surg Oncol*. 1992 Feb;1(1):97-105.

Kobayashi M, Iwamatsu A, Shinohara-Kanda A, Ihara S, Fukui Y. Activation of ErbB3-PI3-kinase pathway is correlated with malignant phenotypes of adenocarcinomas. *Oncogene*. 2003 Mar 6;22(9):1294-301.

Koumakpayi IH, Diallo JS, Le Page C, Lessard L, Gleave M, Bégin LR, Mes-Masson AM, Saad F. Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 May 1;12(9):2730-7.

Kountourakis P, Pavlakis K, Psyrri A, Rontogianni D, Xiros N, Patsouris E, Pectasides D, Economopoulos T. Prognostic significance of HER3 and HER4 protein expression in colorectal adenocarcinomas. *BMC Cancer*. 2006 Feb 28;6:46.

Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, Wieand HS, Leigh JE, Rubin J, McCormack GW, Gerstner JB, Krook JE, Malliard J, et al. Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. The North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *J Clin Oncol*. 1989 Oct;7(10):1447-56.

Lee JC, Wang ST, Chow NH, Yang HB. Investigation of the prognostic value of coexpressed erbB family members for the survival of colorectal cancer patients after curative surgery. *Eur J Cancer*. 2002 May;38(8):1065-71.

Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, Bear HD, Atkins JN, Song K, Jones J, Rockette H. Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer: results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04*) J Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1349-55.

Maurer CA, Friess H, Kretschmann B, Zimmermann A, Stauffer A, Baer HU, Korc M, Büchler MW. Increased expression of erbB3 in colorectal cancer is associated with concomitant increase in the level of erbB2. *Hum Pathol*. 1998 Aug;29(8):771-7.

McKay JA, Murray LJ, Curran S, Ross VG, Clark C, Murray GI, Cassidy J, McLeod HL. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer*. 2002 Nov;38(17):2258-64.

McKay JA, Loane JF, Ross VG, Ameyaw MM, Murray GI, Cassidy J, McLeod HL. c-erbB-2 is not a major factor in the development of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2002 Feb 12;86(4):568-73.

Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*. 2000 Dec 27;19(56):6550-65.

Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007 Oct 4;26(45):6469-87.

Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med*. 1990 Feb 8;322(6):352-8.

Moore HC, Haller DG. Adjuvant therapy of colon cancer. *Semin Oncol*. 1999 Oct;26(5):545-55.

Mukaida H, Toi M, Hirai T, Yamashita Y, Toge T. Clinical significance of the expression of epidermal growth factor and its receptor in esophageal cancer. *Cancer*. 1991 Jul 1;68(1):142-8.

Nathanson DR, Culliford AT 4th, Shia J, Chen B, D'Alessio M, Zeng ZS, Nash GM, Gerald W, Barany F, Paty PB. HER 2/neu expression and gene amplification in colon cancer. *Int J Cancer*. 2003 Jul 20;105(6):796-802.

National Comprehensive Cancer Network - NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Disponível em: < URL: http://www.nccn.org > [20/04/2008].

Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, Miedema B, Ota D, Sargent D; National Cancer Institute Expert Panel. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Apr 18;93(8):583-96.

NIH consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA*. 1990 Sep 19;264(11):1444-50.

O'Connell MJ, Mailliard JA, Kahn MJ, Macdonald JS, Haller DG, Mayer RJ, Wieand HS. Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol*. 1997 Jan;15(1):246-50.

Ochs AM, Wong L, Kakani V, Neerukonda S, Gorske J, Rao A, Riggs M, Ward H, Keville L. Expression of vascular endothelial growth factor and HER2/neu in stage II colon cancer and correlation with survival. *Clin Colorectal Cancer*. 2004 Nov;4(4):262-7.

Osako T, Miyahara M, Uchino S, Inomata M, Kitano S, Kobayashi M. Immunohistochemical study of c-erbB-2 protein in colorectal cancer and the correlation with patient survival. *Oncology*. 1998 Nov-Dec;55(6):548-55.

Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Weiss H, Bell WC, Heimburger DC, Grizzle WE. Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung. Clin Cancer Res. 2002 Mar;8(3):734-44. Porebska I, Harlozińska A, Bojarowski T. Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERBB2, ERBB3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour Biol*. 2000 Mar-Apr;21(2):105-15.

Radinsky R, Risin S, Fan D, Dong Z, Bielenberg D, Bucana CD, Fidler IJ. Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 1995 Jan;1(1):19-31.

Ragnhammar P, Hafström L, Nygren P, Glimelius B; SBU-group. Swedish Council of Technology Assessment in Health Care. A systematic overview of chemotherapy effects in colorectal cancer. *Acta Oncol*. 2001;40(2-3):282-308.

Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Doglietto GB, Crucitti F. Prognostic factors in colorectal cancer. Literature review for clinical application. *Dis Colon Rectum*. 1998 Aug;41(8):1033-49.

Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*. 1998;16(6):413-28.

Rothenberg ML, Oza AM, Bigelow RH, Berlin JD, Marshall JL, Ramanathan RK, Hart LL, Gupta S, Garay CA, Burger BG, Le Bail N, Haller DG. Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol*. 2003 Jun 1;21(11):2059-69.

Rusch V, Klimstra D, Linkov I, Dmitrovsky E. Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res*. 1995 Mar 15;55(6):1365-72.

Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet*. 1987 Jun 20;1(8547):1398-402.

Sakurai K, Urade M, Takahashi Y, Kishimoto H, Noguchi K, Yasoshima H, Kubota A. Increased expression of c-erbB-3 protein and proliferating cell nuclear antigen during development of verrucous carcinoma of the oral mucosa. *Cancer*. 2000 Dec 15;89(12):2597-605.

Sartor CI, Zhou H, Kozlowska E, Guttridge K, Kawata E, Caskey L, Harrelson J, Hynes N, Ethier S, Calvo B, Earp HS 3rd. Her4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol*. 2001 Jul;21(13):4265-75.

Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Fabris G, Cascinu S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies. *J Clin Oncol*. 2004 Dec 1;22(23):4772-8.

Schuell B, Gruenberger T, Scheithauer W, Zielinski Ch, Wrba F. HER 2/neu protein expression in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2006 May 8;6:123.

Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med*. 2007 Dec;13(12):527-34. Epub 2007 Nov 5.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989 May 12;244(4905):707-12.

Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, Attar A, Benichou J, Martin A, Morere JF, Raphael M, Penault-Llorca F, Breau JL, Fagard R, Khayat D, Wind P. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol*. 2005 Jan;16(1):102-8.

Steele RJ, Kelly P, Ellul B, Eremin O. Epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer. *Br J Surg*. 1990 Dec;77(12):1352-4.

Surveillance Epidemiology and End Results – Cancer Statistics Review 1975-2000. National Cancer Institute. Disponível em: < URL: http://www.seer.cancer.gov/cgi-bin/csr/1975_2005 > [20/04/2008].

Surveillance Epidemiology and End Results – SEER Survival Monograph. National Cancer Institute. Disponível em: < URL: http://seer.cancer.gov/publications/survival/surv_colon_rectum.pdf > [20/04/2008]

Tovey SM, Witton CJ, Bartlett JM, Stanton PD, Reeves JR, Cooke TG. Outcome and human epidermal growth factor receptor (HER) 1-4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated by bromodeoxyuridine labelling. *Breast Cancer Res*. 2004;6(3):R246-51.

Uner A, Ebinc FA, Akyurek N, Unsal D, Mentes BB, Dursun A. Vascular endothelial growth factor, c-erbB-2 and c-erbB-3 expression in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Exp Oncol*. 2005 Sep;27(3):225-8.

Vieira RA, Lopes A, Almeida PA, Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Melo CA. Prognostic factors in locally advanced colon cancer treated by extended resection. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2004 Dec;59(6):361-8.

Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 1;89(7):2965-9.

Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JR, Cairns J, Gullick WJ, Kelly P, Harris AL, Horne CH. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res*. 1989 Apr 15;49(8):2087-90.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Feb;2(2):127-37.

Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, Kameda T, Ochiai A, Ito H, Tahara E. Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res.* 1988 Jan 1;48(1):137-41.

Yonemura Y, Sugiyama K, Fushida S, Kamata T, Ohoyama S, Kimura H, Yamaguchi A, Miyazaki I. Tissue status of epidermal growth factor and its receptor as an indicator of poor prognosis in patients with gastric cancer. *Anal Cell Pathol*. 1991 Nov;3(6):343-50.