FERNANDO SIMIONATO PERROTTA

FDG-PET/CT no adenocarcinoma de esôfago, da junção esôfago gástrica e do estômago: análise da associação de SUV, MTV e TLG com a expressão imuno-histoquímica tecidual do GLUT-1, Ki-67, Hexokinase e Caspase-3

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

Programa em Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Júnior

São Paulo

2020

FERNANDO SIMIONATO PERROTTA

FDG-PET/CT no adenocarcinoma de esôfago, da junção esôfago gástrica e do estômago: análise da associação de SUV, MTV e TLG com a expressão imuno-histoquímica tecidual do GLUT-1, Ki-67, Hexokinase e Caspase-3

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

Programa em Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Júnior

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Perrotta, Fernando Simionato

FDG-PET/CT no adenocarcinoma de esôfago, da junção
esôfago gástrica e do estômago : análise da associação
de SUV, MTV e TLG com a expressão imuno-histoquímica
tecidual do GLUT-1, Ki-67, Hexokinase e Caspase-3 /
Fernando Simionato Perrotta. -- São Paulo, 2020.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Ulysses Ribeiro Júnior.

Descritores: 1.Neoplasias gástricas
2.Adenocarcinoma 3.Marcadores biológicos 4.Imuno-
histoquímica 5.Caspase 3 6.Hexoquinase

USP/FM/DBD-103/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha família, amigos e pacientes, que nos proporcionam a inspiração necessária para projetos como este.

Em especial ao meu filho, Guilherme, e a minha esposa, Silvia.

Ao meu mentor, Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Jr., um exemplo de desprendimento do lugar comum em seu meio em prol da verdadeira ciência.

Ao Prof. Dr. Marcelo Mester por acreditar no projeto e no projetista.

Ao Prof. Dr. Evandro Soboza pelo auxílio nas padronizações e leitura das lâminas de TMA.

Ao Prof. Dr. Heitor Naoki Sado pelo auxílio na revisão dos PET-CT dos pacientes e na realização do cálculo do MTV e TLG de cada um deles.

À Rafaela Brito Bezerra Pinheiro pelo auxílio na revisão, leitura e marcação das lâminas e blocos de parafina de cada um dos pacientes.

Ao Prof. Dr. Marcus Fernando Kodama Pertille Ramos pelas críticas contundentes na qualificação da dissertação.

À Ma. Marina Alessandra Pereira por ter sanado as inúmeras necessidades surgidas no período de execução do presente projeto.

À Vilma Libério pelo apoio à prazos e exigências ao longo do Mestrado.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Epidemiologia das neoplasias de esôfago e estômago	13
1.2. Fatores de risco e aspectos da carcinogênese no câncer de esôfago e estômago	14
1.3. Aspectos relacionados ao tratamento do adenocarcinoma de esôfago e estômago	15
1.4. Considerações no estágio do adenocarcinoma de estômago e esôfago	17
1.4.1. O uso da tomografia por emissão de pósitrons no estágio do adenocarcinoma de esôfago e estômago	17
1.4.2. Outras aplicações do PET-FDG no adenocarcinoma de esôfago e estômago	19
1.5. Princípios biológicos do PET-FDG	20
1.6. Transportadores de glicose (GLUT)	20
1.7. Ki-67	21
1.8. Hexokinase	22
1.9. Caspase	22
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo principal	23
2.2. Objetivos secundários	23
3. MÉTODOS	24
3.1. Casuística	24
3.1.1. Critérios de inclusão	24
3.2. Desenho do estudo	24
3.2.1. Cronologia	24
3.3. Considerações éticas	25
3.4. Coleta de dados	25
3.4.1. Variáveis clínico-patológicas	25
3.5. Análise Anátomopatológica	26

3.5.2. Análise dos blocos de TMA - Técnica histológica convencional	29
3.5.3. Análise dos blocos de TMA – Procedimento imuno-histoquímico	29
3.5.4. Interpretação dos resultados IH	31
3.5.4.1. GLUT-1	32
3.5.4.2. Hexokinase-I	32
3.5.4.3. Ki-67	32
3.5.4.4. Caspase-3	33
3.6. Realização do PET-FDG	33
3.6.1. Protocolo do exame e aspectos técnicos	34
3.7. Análise estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Características clínicas dos pacientes	36
4.2. Características anátomopatológicas	37
4.3. Análise do SUV, MTV e TLG com os marcadores biológicos estudados	38
4.4. Análise do SUV, MTV e TLG com as variáveis clinico-patológicas	42
5. DISCUSSÃO	44
6. PERSPECTIVAS	48
7. CONCLUSÕES	48
8 . REFERÊNCIAS	49
9. ANEXOS	
A. Registro na Plataforma Brasil	56
B. Aprovação pela Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	57
C. Aprovação do Núcleo de Pesquisa do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP)	58
D. Participação do Laboratório de Investivestigação Médica – 14 (LIM 14)	59
E. Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	60
F. Certificado de apresentação do pôster no 39th Congress of the European Association of Surgical Oncology	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
CEC	Carcinoma espinocelular
DP	Desvio padrão
DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
EB	Esôfago de Barrett
FDG	2-Deoxy-2-[18F]fluoroglucose
GLUT	Proteínas transmembrana de transporte de glicose
IC	Intervalo de confiança
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
PET/CT	Positron emission tomography-Computed tomography
SUV	Standardized uptake value
GLUT-1	Glucose transport protein 1
HE	Hematoxilina e Eosina
HK	Hexokinase-1
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IC	Intervalo de Confiança
IH	Imuno-histoquímica
KW	Kruskal-Wallis
Mbq	Megabecquerel
MTV	Metabolic Tumor Volume (cm ³)
MW	Mann-Whitney
Qt	Quimioterapia
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RxT	Radioterapia
SUVmax	Maximum Standardized Uptake Value (g/ml)
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TLG	Total Lesion Glycolysis (g/ml x cm ³)
JEG	Junção esôfago-gastrica

LISTA DE TABELAS

Tabela - 1 Especificações dos anticorpos e clones utilizados	29
Tabela - 2 Características clínicas dos 26 pacientes com adenocarcinoma do esôfago, da JEG e do estômago	36
Tabela - 3 Variáveis anatomopatológicas dos 26 pacientes	37
Tabela - 4 Média, mediana e valor de P do SUVmax, MTV, TLG em relação ao GLUT-1 ..	38
Tabela - 5 Média, mediana e valor de P do SUVmax, MTV, TLG em relação a Caspase-3 ..	39
Tabela - 6 Média, mediana e valor de P do SUVmax, MTV, TLG em relação ao Ki-67	39
Tabela - 7 Média, mediana e valor de P do SUVmax, MTV, TLG em relação a HK	40
Tabela – 8 Correlação entre as variáveis quantitativas, SUV, MTV e TLG	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Equipamento utilizado para construção dos blocos de TMA	26
Figura 2. Lâminas resultantes do bloco receptor	26
Figura 3. GLUT-1 (40x) à esquerda com intensidade fraca, e à direita forte	32
Figura 4. HK (10x) à esquerda com intensidade fraca, e à direita forte	32
Figura 5. Ki-67 (10x), com índice de 9%, 50% e 80% da esquerda para direita	33
Figura 6. Caspase-3 (10x) à esquerda com nenhuma célula positiva e à direita 4%	33
Figura 7. PET/CT modelo Discovery 690® Time of Flight	34
Figura 8. Cálculo do MTV realizado em um dos pacientes do estudo	35

RESUMO

Perrotta FS. *FDG-PET/CT no adenocarcinoma do esôfago, da junção esôfago gástrica e do estômago: Análise da associação de SUV, MTV, TLG com a expressão imuno-histoquímica tecidual do GLUT-1, Ki-67, Hexokinase e Caspase-3*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: A tomografia por emissão de pósitrons (PET/CT) tem sido extensivamente estudada nos diferentes tipos de tumores entretanto, os mecanismos celulares envolvidos na captação do 2-desoxi-2-[18F] fluoroglicose (FDG) e sua associação com o adenocarcinoma do esôfago, da junção esôfago-gástrica (JEG) e gástrico não foram completamente elucidados.

OBJETIVO: O objetivo do presente estudo foi analisar a associação entre captação celular de FDG no adenocarcinoma do esôfago, da JEG e do estômago com a expressão imuno-histoquímica (IH) da proteína de transporte de glicose do tipo 1 (GLUT-1), Hexokinase-1 (HK), Ki-67 e Caspase-3, marcadores do metabolismo de glicose, proliferação celular e apoptose, respectivamente.

MÉTODOS: Identificaram-se retrospectivamente 26 pacientes com adenocarcinoma de esôfago, estômago e JEG confirmados histologicamente e que haviam realizado FDG-PET/CT antes do tratamento oncológico. Coletaram-se amostras de tecido tumoral de cada paciente para realização da análise IH da GLUT-1, HK, Ki-67 e Caspase-3. Verificou-se a associação da expressão IH com o valor máximo padronizado de captação (SUVmax), volume metabólico tumoral (MTV) e glicólise total da lesão (TLG). Como objetivos secundários, analisou-se a associação dos valores de SUV, MTV e TLG com o estágio TNM, dimensões do tumor, localização anatômica, subtipo histológico de *Laurén*, grau de diferenciação celular e com o infiltrado inflamatório tumoral.

RESULTADOS: Verificou-se associação positiva entre GLUT-1 com SUVmax ($p=0.001$) e TLG ($p=0.016$), Caspase-3 com SUVmax ($p=0.023$), grau de inflamação com SUVmax ($p=0.025$) e tamanho do tumor com SUVmax ($r = 0.428$; $p = 0.029$), MTV ($r = 0.661$ $p<0.01$) e TLG ($r = 0.669$ $p<0.01$). Não houve associação dos parâmetros analisados com a HK e Ki-67.

CONCLUSÃO: Identificou-se associação da expressão IH do GLUT-1 e Caspase-3 com a captação de FDG. A utilização do MTV e TLG possibilitou análise mais ampla dos fatores que determinam os seus valores.

Descritores: Adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma de esôfago, e adenocarcinoma da junção esofago-gástrica, 18F-FDG uptake, marcadores biológicos, imuno-histoquímica, Ki-67, Caspase-3, Hexoquinase-1, GLUT-1

ABSTRACT

Perrotta FS. *FDG-PET/CT in Esophageal, gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: Association analysis between SUV, MTV and TLG with GLUT-1, Ki-67, Hexokinase and Caspase-3 tissue immunohistochemistry expression* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

BACKGROUND: The cellular mechanisms involved with 2-Deoxy-2-[18F]fluoroglucose (FDG) uptake in several tumors and its use in Positron Emission Tomography – Computed Tomography (PET/CT) in oncologic practice have been extensively studied however, these cellular mechanisms needs to be better elucidated in esophageal, gastroesophageal junction (GEJ) and gastric adenocarcinoma. **OBJECTIVES:** The aim of the present study was to analyze the association between FDG cell uptake in esophagus, gastroesophageal junction (GEJ) and gastric adenocarcinoma with the immunohistochemical expression (IH) of glucose transport protein 1 (GLUT-1), Ki-67, Caspase-3 and Hexokinase-1 (HK), cellular markers of glucose metabolism, cell proliferation and apoptosis, respectively. **METHODS:** It was retrospectively enrolled 26 patients with histologically confirmed esophageal, GEJ and gastric adenocarcinoma that have been performed FDG-PET/CT before the cancer treatment. It was collected tissue sample of each patient to perform IH analyses of GLUT-1, Ki-67, Caspase-3 and HK. It was verified the association of IH expression with maximum Standardized Uptake Value (SUVmax), Metabolic Tumor Volume (MTV) and Total Lesion Glycolysis (TLG). As a secondary objective it was analyzed the TNM staging system, tumor size, anatomical location, Lauren’s histological subtype, degree of differentiation, tumoral inflammatory infiltrate and their associations with SUV, MTV and TLG. **RESULTS:** It was found a positive association between GLUT-1 with SUVmax ($p=0.001$) and TLG ($p=0.016$), Caspase-3 with SUVmax ($p=0.023$), inflammation with SUVmax ($p=0.025$) and tumor size with SUVmax ($r= 0.428$; $p = 0.029$), MTV ($r= 0.661$ $p<0.01$) and TLG ($r= 0.669$ $p<0.01$). We didn’t find any association between SUVmax, MTV and TLG with HK and Ki-67. **CONCLUSION:** It was identified the association between IH expression of GLUT-1 and Caspase-3 with FDG uptake. The use of MTV and TLG allowed a better analysis of the factors involved with FDG uptake.

Descriptors: Gastric adenocarcinoma, esophageal adenocarcinoma, adenocarcinoma of the esophago-gastric junction, 18F-FDG uptake, biological markers, immunohistochemistry, Ki-67, Caspase-3, Hexokinase-1, GLUT-1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia das neoplasias do esôfago e estômago

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o câncer é responsável pela primeira ou segunda causa de mortes prematuras (de 30 a 69 anos) em 134 de 183 países no mundo. Atualmente é o responsável por uma em cada seis mortes a nível global ¹. Estima-se 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer no ano de 2018². No Brasil é a segunda causa de morte, atrás apenas das doenças cardiovasculares ¹.

O câncer de esôfago é o oitavo mais comum e sexta causa de mortalidade dentre os demais ¹. Representou a sétima posição em incidência (572.000 novos casos) e a sexta causa de mortalidade por câncer no mundo (509.000 mortes) em estimativas recentes para o ano de 2018. Este último dado significa que o câncer de esôfago seria responsável por 1 em cada 20 casos de morte por câncer em 2018. Historicamente, sua incidência é maior para o sexo masculino, de maneira que 70% dos casos ocorrerão em homens ². No Brasil, o número de casos novos de câncer de esôfago estimados para cada ano do triênio 2020-2022 será de 8.690 casos em homens e de 2.700 em mulheres ³.

O câncer de estômago representa um número de casos ainda maior em relação aos de câncer de esôfago. Responsável por mais de 1 milhão de novos casos e 783 mil mortes em estimativas para o ano de 2018 no mundo, foi a quinta neoplasia mais frequentemente diagnosticada e a terceira causa de morte por câncer ¹. Assim como no câncer de esôfago, sua incidência também é maior no sexo masculino, tendo sido, em média, duas vezes maior nessa estimativa. Os países com as maiores incidências estão localizados no leste asiático. Para o Brasil, estimam-se para cada ano do triênio 2020-2022, 13.360 casos novos de câncer de estômago para o sexo masculino e 7.860 para o sexo feminino ³.

O câncer de esôfago é representado por dois tipos histológicos, o adenocarcinoma e o carcinoma espinocelular (CEC). No estômago, a neoplasia maligna mais comum é o adenocarcinoma. Historicamente, o CEC de esôfago sempre apresentou maior incidência porém, nos últimos anos, o adenocarcinoma de esôfago vem apresentando aumento da sua incidência. Atualmente, o CEC de esôfago é responsável por cerca de 87% de todos os casos de câncer de esôfago no mundo. Mais da metade ocorre na China e 25% ocorrem na Índia, Sudeste da Ásia e Ásia Central. Em relação ao adenocarcinoma de esôfago, cerca de 44% de todos os casos ocorrem na América do Norte e na Europa Ocidental ¹. Nos Estados Unidos há cerca de 3 décadas o CEC de esôfago era responsável por mais de 90% dos casos e nos dias

atuais cerca de 80% dos casos de neoplasia de esôfago são representados por adenocarcinoma⁴. Essa mudança de incidência observada no tipo histológico relaciona-se a alguns fatores, muitas vezes relacionados, como o aumento da obesidade, doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), diminuição do tabagismo e etilismo entre outros^{5,6}.

1.2. Fatores de risco e aspectos da carcinogênese no Câncer de esôfago e estômago

Os dois tipos histológicos do câncer de esôfago diferem no tipo de população que afetam e apresentam características biológicas distintas. Isso justifica as diferentes distribuições geográficas, tendências mundiais e fatores de risco.

Observam-se algumas semelhanças entre o perfil molecular do CEC de esôfago e o CEC de outros órgãos. No adenocarcinoma de esôfago, essas semelhanças são observadas com o adenocarcinoma de estômago. Existem diferenças moleculares significativas entre o CEC e o adenocarcinoma de esôfago, sejam elas de caráter genético ou epigenético. Esses dois tipos histológicos de câncer de esôfago apresentam diferentes genes, mutações e marcadores prognósticos relacionados¹. Recentemente, os subtipos moleculares tem sido correlacionados com a sobrevida e com diferentes resultados ao mesmo tratamento oncológico⁷.

Os principais fatores de risco para o adenocarcinoma de esôfago são similares ao redor do mundo e incluem DRGE, obesidade (particularmente obesidade visceral), tabagismo e herança genética¹.

Existe forte associação entre DRGE e a metaplasia do epitélio esofágico distal, que se modifica de epitélio estratificado para epitélio colunar como resultado da agressão crônica da mucosa esofágica distal pelo refluxo de conteúdo gástrico no esôfago. Chama-se essa área de epitélio colunar de esôfago de Barrett (EB), em referência ao cirurgião torácico australiano Norman Rupert Barrett. Barrett, que em 1950 na Inglaterra, publicou artigo referindo-se a epitélio colunar no esôfago⁷. Nesse processo de agressão crônica e alteração histológica, pode ocorrer a displasia do epitélio colunar e a mesma progredir até a displasia de alto grau ou adenocarcinoma *in situ* do esôfago. O risco do EB progredir para adenocarcinoma de esôfago é estimado em 50 a 100 vezes maior em comparação a indivíduos sem EB⁹.

No CEC de esôfago os principais fatores de risco são o consumo de tabaco e o etilismo. Os dois são considerados fatores de risco independentes mas quando associados apresentam efeito sinérgico. Os mecanismos moleculares que estão envolvidos nesse processo envolvem o dano direto ao DNA celular causado pelo álcool e no caso do tabaco, a agressão

direta do material genético celular pelos carcinógenos, como aminas aromáticas, nitrosaminas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aldeídos e fenóis¹⁰. Outros importantes fatores de risco para o CEC de esôfago incluem o consumo de bebidas quentes, baixa ingestão de frutas e vegetais e baixo nível socioeconômico¹.

No adenocarcinoma de estômago, o maior fator de risco para seu desenvolvimento é a infecção de longo prazo pela bactéria *Helicobacter pylori*. Outros fatores de risco incluem a ingestão acentuada de sal e a baixa ingestão de frutas, legumes e verduras frescas bem como o consumo de álcool e o tabagismo¹¹.

1.3. Aspectos relacionados ao tratamento do adenocarcinoma de esôfago e estômago

O tratamento padrão curativo para neoplasia de esôfago e estômago é cirúrgico porém, deve-se considerar sua elevada morbidade e mortalidade, e seus resultados pouco expressivos com relação às taxas de cura quando empregado de maneira exclusiva, particularmente na doença avançada. Houve melhora histórica significativa desses índices, resultado da padronização do tratamento cirúrgico promovido em grande parte pelos países orientais, o aprimoramento contínuo das diversas técnicas na cirurgia convencional e o surgimento de técnicas de cirurgia minimamente invasiva como a videolaparoscopia e a cirurgia robótica. Isso possibilitou atingir taxas de mortalidade inferiores a 5% na cirurgia do esôfago em centros especializados e com alto volume cirúrgico¹². Citam-se também o aprimoramento e as novas técnicas de tratamento endoscópico.

Nas últimas décadas observou-se mudança radical no manejo do carcinoma de esôfago e estômago com associação de outras modalidades terapêuticas à cirurgia, inclusive sendo proposto tratamento não cirúrgico com radioterapia (Rxt) e quimioterapia (QT) exclusivos para determinado grupo de pacientes com neoplasia de esôfago. No caso de CEC de esôfago localmente avançado pode-se dizer que o tratamento neoadjuvante com RxT e QT tornou-se conduta padrão. Essa mudança trouxe aumento das taxas de ressecabilidade e melhora da sobrevida. No estudo de fase 3, CROSS, o tratamento do CEC e adenocarcinoma de esôfago e de junção JEG com QT e RxT neoadjuvante seguido de cirurgia comparado com cirurgia exclusiva mostrou melhora na sobrevida livre de doença com diferença absoluta de 22% em 5 anos e um aumento de sobrevida global de 13 %¹³. No estudo de fase 3 CALGB 9781 a sobrevida global em cinco anos para CEC e adenocarcinoma de esôfago e JEG foi de 39 % (95% Intervalo de Confiança (IC), 21% a 57%) e 16% (95% IC, 5% a 33%) comparando tratamento trimodal com tratamento cirúrgico exclusivo, respectivamente. A sobrevida livre

de progressão em cinco anos foi 28% (95% IC, 12% a 47%) e 15% (95% IC, 4% a 33%) para tratamento trimodal versus cirurgia¹⁴. Em uma metanálise publicada em 2007 envolvendo 11 estudos randomizados controlados, 1308 pacientes portadores de CEC e adenocarcinoma de esôfago foram divididos em dois grupos dos quais 659 receberam RxT e QT seguido de cirurgia e 649 receberam apenas cirurgia. O Odds Ratio comparando tratamento trimodal versus cirurgia isolada foi de 1.28 (1.01-1.64, $P = 0.05$) para sobrevida em 1 ano, 1,78 (1.20-2.66, $P = 0.004$) para sobrevida em 3 anos e 1,45 (1.07-1.99, $P = 0.02$) para sobrevida em 5 anos¹⁵. Além dos estudos realizados favorecendo tratamento neoadjuvante para CEC e adenocarcinoma de esôfago, outros estudos validaram o tratamento baseado apenas em RxT e QT para pacientes com CEC não candidatos a cirurgia¹⁶. No adenocarcinoma de estômago e JEG foram realizados grandes estudos validando tratamento neoadjuvante e adjuvante com QT e validando tratamento adjuvante com RxT e QT. No MAGIC trial que avaliou QT perioperatória em pacientes com adenocarcinoma gástrico a sobrevida em 5 anos foi de 36.3% entre os pacientes que receberam QT e 23% entre os pacientes que receberam apenas tratamento cirúrgico¹⁷. Outro grande estudo, um dos primeiros avaliando adição de RxT e QT no tratamento do câncer gástrico, avaliaram-se 556 pacientes com adenocarcinoma gástrico ou de JEG. A sobrevida média do grupo onde realizou-se apenas tratamento cirúrgico foi de 27 meses e do grupo que recebeu RxT e QT adjuvante foi 36 meses¹⁸. Mais recentemente, foram publicados os resultados do estudo alemão multicêntrico, randomizado, de fase 3, FLOT4¹⁹. Nesse estudo, envolvendo 716 pacientes com adenocarcinoma gástrico ou de JEG, comparou-se dois esquemas diferentes de QT perioperatória, um deles já consagrado pelo estudo MAGIC baseado em epirubicina, cisplatina e fluorouracil ou capecitabina (ECX/ECF) e outro esquema baseado em docetaxel, oxaliplatina e fluorouracil/leucovorin (FLOT). Esse novo esquema proposto trouxe incremento ainda maior na sobrevida global (sobrevida global média de 35 meses com ECX/ECF vs. 50 meses com FLOT; Hazard Ratio (HR) 0.77 [0.63 - 0.94]; $P = 0.012$), e na sobrevida livre de progressão (sobrevida livre de progressão média, 18 meses com ECX/ECF vs. 30 meses com FLOT; HR 0.75 [0.62 - 0.91]; $P = 0.004$). A sobrevida global em 3 anos foi 48% com ECF/ECX e 57% com FLOT. Finalmente, estudo prospectivo em andamento avaliando tratamento com RxT e QT neoadjuvante no adenocarcinoma gástrico tem mostrado resultados positivos em análise interina²⁰.

À luz dessas evidências, torna-se clara a importância crescente que vêm sendo dado ao tratamento multimodal, particularmente ao tratamento neoadjuvante, traduzindo-se em melhora nas taxas de cura e sobrevida desses pacientes. Por outro lado, há que se considerar

que a indicação da neoadjuvância em alguns casos pode não melhorar os desfechos clínicos ou até mesmo piorá-los.

1.4 Considerações sobre o estágio do adenocarcinoma de estômago e esôfago

Embora a melhora na sobrevida tenha sido resultado da introdução do tratamento multimodal, o aperfeiçoamento dos exames já existentes e o surgimento de novos exames para estágio do câncer de esôfago e estômago foi fundamental para melhor seleção desses pacientes a determinado tipo de tratamento. Deve-se lembrar que pacientes candidatos a tratamento neoadjuvante não possuem estágio patológico, proveniente do espécime cirúrgico, e sim, apenas estágio clínico, baseado em exames endoscópicos e de imagem. A tomografia computadorizada com contraste oral e endovenoso permanece como exame de imagem padrão no estadiamento do CEC e adenocarcinoma de esôfago e adenocarcinoma de estômago^{21,22}.

A maior precisão no estágio das neoplasias em última análise traduz-se por melhora do desfecho terapêutico, diminuição de gastos desnecessários empregados no tratamento que não alteram o curso da doença e mitigação do sofrimento dos pacientes ao evitar o emprego de medidas fúteis com prejuízo na qualidade de vida.

1.4.1 O uso da tomografia por emissão de pósitrons no estágio do adenocarcinoma de esôfago e estômago

Segundo as recomendações mais atuais do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), a tomografia computadorizada, e a tomografia por emissão de pósitrons (PET/CT) após a administração de 2-Deoxy-2-[18F]fluoroglicose (FDG) fazem parte dos exames de imagem indicados para o estágio de câncer de esôfago, JEG e câncer gástrico, com a ressalva de que não deve haver evidência de doença metastática nos demais exames e procedimentos realizados²¹.

Num encontro de especialistas realizado na cidade de St. Gallen na Suíça em 2012 definiu-se que o FDG-PET/CT não deve ser utilizado no estágio de rotina no adenocarcinoma de estômago, seu uso no estágio de rotina no CEC de esôfago é incerto e a maioria concordou que deve ser utilizado no estágio de rotina no adenocarcinoma de TEG²².

A despeito de suas indicações formais na literatura, o FDG-PET/CT consagrou-se de grande utilidade no estágio do CEC e AD de esôfago e TEG na prática clínica, especialmente de casos avançados e duvidosos com relação a possibilidade de doença metastática. Também,

é ferramenta importante no planejamento do tratamento radioterápico quando esse é empregado. Em nosso meio, seu uso rotineiro no estágio do adenocarcinoma gástrico ainda não é realizado.

Seu valor na identificação de doença locorregional e à distância é diretamente proporcional ao estágio da doença, sendo a sensibilidade do método maior em estágios mais avançados. No câncer gástrico, a sensibilidade para sua detecção é relativamente baixa em comparação com o câncer de esôfago.

Em estudo retrospectivo realizado no Japão, envolvendo 149 pacientes com adenocarcinoma e CEC de esôfago, no qual todos os pacientes possuíam avaliação com FDG-PET/CT, 81 dos pacientes foram submetidos a esofagectomia sem tratamento neoadjuvante. O FDG-PET/CT detectou a lesão primária em 43% dos tumores pT1. A sensibilidade foi de 61% para doença pT1b comparada com 18% para pT1a. A positividade do FDG-PET/CT aumentou conforme eram os maiores níveis de invasão tumoral, com 83% para as lesões T2, 97% para as lesões T3 e 100% para as lesões T4 ²³. Considera-se que o desempenho para detecção de metástase linfonodal locorregional é um pouco menor devido a falta de resolução para identificação de linfonodos comprometidos próximos à lesão primária. Numa revisão sistemática publicada em 2004, incluíram-se 12 estudos que avaliaram a sensibilidade e especificidade do FDG-PET/CT no adenocarcinoma e CEC de esôfago. Com relação a avaliação de doença linfonodal, o valor agrupado desses estudos resultou em uma sensibilidade de 51% (IC95%, 8-92%) e especificidade de 84% (IC95%, 67-100%). Para avaliação de metástases à distância, a sensibilidade foi de 67% (IC95%, 58-76%) e a especificidade foi de 97% (IC95%, 90-100%)²⁴. Outros dois estudos retrospectivos realizados no Japão avaliaram a utilização do FDG-PET/CT incluindo apenas pacientes com adenocarcinoma gástrico. Um deles incluiu 90 pacientes com diagnóstico de câncer gástrico sendo que todos realizaram FDG-PET/CT previamente ao tratamento cirúrgico. O FDG-PET/CT detectou a lesão primária em 71 dos 90 (sensibilidade de 78,9%). Nesse mesmo estudo, a sensibilidade, especificidade e acurácia para o FDG-PET/CT detectar metástases linfonodais foi 64.5, 85.7, e 71.1 %, respectivamente ²⁵. O segundo estudo avaliou 117 pacientes com câncer gástrico sendo que houve captação significativa de FDG no tumor primário em 83 pacientes (70,9%) e a sensibilidade e especificidade para identificação de metástase linfonodal foi de 22.7% e 90.5% respectivamente ²⁶.

Aspectos já conhecidos e bem estudados que afetam a avidéz do FDG no câncer de estômago, são o tamanho do tumor, o tipo histológico, e a expressão de proteínas transmembrana de transporte de glicose (GLUT) do tipo 1. Tumores de maior dimensão, do

tipo intestinal de Laurén e com uma maior expressão IH de GLUT 1 apresentam maior avidade ao FDG ²⁷.

1.4.2 Outras aplicações do FDG-PET/CT no adenocarcinoma de esôfago e estômago

Além do seu papel no estágio do adenocarcinoma de esôfago e estômago, o FDG-PET/CT pode ter outras aplicações. Pode ser utilizado no planejamento do tratamento radioterápico, como marcador prognóstico e ainda na avaliação de resposta à neoadjuvância ou tratamento radio e quimioterápico exclusivos.

A sua utilização como ferramenta para planejamento radioterápico no carcinoma de esôfago permite que seja melhor racionalizada a dose de radiação dirigida ao tumor e consequentemente minimiza seus efeitos deletérios nas estruturas adjacentes como coração e pulmão ²⁸. Possibilita delineamento mais preciso da área do tumor a ser irradiada e permite que seja incluído no campo de radiação, áreas com acometimento linfonodal evidenciadas pelo FDG-PET/CT e não identificadas por outros estudos de imagem.

Como marcador prognóstico no carcinoma de esôfago, em uma metanálise envolvendo 12 estudos, em 7 deles foi demonstrado que quanto maior os valores de SUV menor foi a sobrevida ²⁹.

Com a introdução rotineira da neoadjuvância no tratamento do adenocarcinoma de esôfago e estômago para pacientes com tumor localmente avançado, a identificação de fatores que permitam selecionar aqueles que irão beneficiar-se dessa estratégia tem se mostrado de grande importância. Isso possibilita evitar que os pacientes recebam tratamentos desnecessários ou ineficazes em detrimento do tratamento cirúrgico. Esses fatores tem sido constantemente buscados, seja na avaliação de resposta ao tratamento neoadjuvante baseado em aspectos morfológicos e metabólicos nos exames de imagem ou mais recentemente no perfil molecular desses tumores.

Inicialmente, apenas o aspecto morfológico do tumor era avaliado como indicador de resposta terapêutica através do RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)³⁰. Com o emprego do FDG-PET/CT a avaliação do aspecto metabólico desses tumores tornou-se possível.

Um dos primeiros estudos prospectivos realizados para avaliar a relação dos valores do FDG-PET/CT e a resposta ao tratamento envolveu 40 pacientes com adenocarcinoma de JEG. Os pacientes com resposta patológica ao tratamento neoadjuvante mostraram diminuição

média de três vezes no SUV. A resposta foi associada a maior sobrevida, sendo que os não respondedores tiveram sobrevida em dois anos de 37% e os respondedores de 60%³¹.

1.5 Princípios biológicos do PET-FDG

O FDG-PET/CT consiste basicamente na avaliação da atividade metabólica celular *in vivo* e no fato de as células tumorais possuírem atividade metabólica aumentada. Como a oxidação da glicose é o principal mecanismo celular de produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) nos mamíferos, a sua captação pela célula é diretamente proporcional ao seu metabolismo. A glicose marcada radioativamente com Flúor-18 (FDG) cuja fórmula química é 2-desoxi-2-(¹⁸F)fluoro-D-glicose e seu registro quantitativo possibilita distinguir as células tumorais das demais células dos tecidos. Como o FDG possui estrutura molecular muito semelhante à glicose, sua incorporação pela célula é realizada pelo mesmo mecanismo que a glicose. Isso envolve a necessidade das GLUT que facilitam a entrada de glicose do meio extracelular para o intracelular. Antes de ser utilizada para geração de ATP a glicose inicialmente passa pela etapa celular. De forma análoga ao que ocorre com a glicose, a FDG é fosforilada em FDG-6-fosfato pela hexoquinase (HK). Contudo, de forma distinta do que ocorre com a glicose-6-fosfato, a FDG-6-fosfato não entra no ciclo de Krebs para produção energética pois não é submetida a ação da fosfo-hexose-isomerase. Dessa forma a FDG não segue a via glicolítica e fica retida no meio intracelular por tempo suficiente para se adquirir imagens tomográficas do corpo inteiro. O grau de acúmulo nos tecidos depende, portanto, principalmente da taxa de transporte e da glicólise, ambos os fatores relacionados à taxa de metabolismo celular.

Pode-se inferir que a captação de FDG é influenciada pela quantidade de GLUT. Também, poder-se-ia esperar que a HK bem como outros fatores relacionados a proliferação celular e a apoptose como Ki-67 e a Caspase, respectivamente, exerceriam alguma influência na captação de FDG.

1.6 Transportadores de glicose

Identificaram-se 14 membros da família de facilitadores de transporte da glicose sendo denominados GLUT-1 a GLUT-12, GLUT-14 e HMIT (transportador H⁺/myo-inositol)^{32,33}. Essas proteínas de membrana facilitadoras do transporte da glicose possuem diferentes expressões nos diversos tecidos e são influenciadas por hormônios e pelo processo

metabólico. Cada uma dessas proteínas possuem diferente afinidade pela glicose e por outras hexoses como a frutose.

A captação de glicose pelas células neoplásicas malignas é amplamente realizada pelo GLUT-1 e sua expressão está aumentada em muitos tumores, incluindo tumores hepáticos, pancreáticos, mama, esofágico, cerebral, renal, pulmonar, cutâneo, colorretal, endometrial, ovariano e colo de útero ³³. É provável que esse aumento em sua expressão seja um mecanismo relevante no crescimento tumoral, possibilitando que ocorra além do limite glicolítico daquela massa celular.

A expressão da GLUT-1 pode ser avaliada de maneira simples e de forma rotineira através da IH, um processo realizado com baixo custo. A sua coloração nas células tumorais apresenta diferentes padrões, podendo ocorrer na membrana celular e no citosol, em maior ou menor proporção e com diferentes intensidades. Esses padrões variam a depender da localização do tumor, seu tipo histológico e do seu tamanho, ou, em última análise, seu estágio.

Diversos estudos tem demonstrado em diferentes tipos de tumores que a maior expressão do GLUT-1 nas células tumorais apresenta associação com o crescimento tumoral e com pior prognóstico. Além dessa associação com prognóstico e desenvolvimento do tumor, estudos tem demonstrado que quanto maior a expressão de GLUT-1 maior a captação de FDG pela célula tumoral e portando maiores os valores de SUV, MTV e TLG.

Taylor et al. em estudo prospectivo envolvendo 67 pacientes com CEC e AC de esôfago demonstrou correlação positiva significativa entre a expressão de GLUT-1 e os valores de SUVmax ³⁴. Outro estudo realizado em pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico mostrou que a expressão de GLUT-1 foi o fator que mais influenciou na captação do FDG³⁵.

1.7 Ki-67

A proteína Ki-67 é encontrada em vertebrados. Em humanos é codificada pelo gene MKI67. Está presente no núcleo celular, e sua presença está relacionada a determinadas fases do ciclo celular. A presença da proteína Ki-67 pode ser identificada através do anticorpo monoclonal Ki-67. Esse anticorpo reage com a proteína Ki-67 presente no núcleo celular das células em proliferação. Essa proteína encontra-se ausente em células quiescentes. No ciclo celular essa proteína é expressa nas fases G1, S, G2, e mitose, mas não no G0 ³⁶.

Através da microscopia óptica e IH, é possível contar o número de células por campo, que estão coradas gerando o cálculo de um índice denominado índice de proliferação celular (Ki-67 Index). É expresso em porcentagem e representa o número de células coradas em relação ao número total de células. Esse índice nos permite inferir o grau de proliferação celular e vem sendo utilizado amplamente para diversos tipos de tumores como ferramenta diagnóstica e marcador prognóstico³⁷.

Estudos demonstraram que, em alguns tumores, um alto índice proliferativo de Ki-67 nas células mostra associação direta com maior SUVmax no FDG-PET/CT^{38,39}.

1.8 Hexoquinase

A grande família de enzimas que catalisam a transferência de grupos fosforil tendo o trifosfato de adenosina (ATP) como doador é chamada de kinase (do grego kinein, “mover”). Na primeira etapa da glicólise, a glicose é ativada para as reações subsequentes pela fosforilação em C-6 formando glicose-6-fosfato. Esta reação irreversível em condições intracelulares é catalisada pela HK. A HK é uma proteína solúvel e citosólica e está presente em praticamente todos os organismos. Quatro diferentes isoformas da HK denominadas HK1, HK2, HK3 e HK4 são codificadas por genes diferentes e catalisam a mesma reação. Essas quatro isoformas são expressas em níveis variados nos tecidos porém a HK2 apresenta maior expressão em diversos tipos de tumores⁴⁰.

Conforme abordado anteriormente, a FDG é fosforilada em FDG-6-fosfato pela HK porém, de forma distinta da glicose-6-fosfato, a FDG-6-fosfato não entra no ciclo de Krebs para produção energética pois não é submetida à ação da fosfo-hexose-isomerase. Isso faz com que a FDG fique retida no meio intracelular. Sugere-se que o nível de atividade da HK contribui para o acúmulo intracelular de FDG em diversos tumores malignos⁴¹. A sua quantificação no tecido tumoral pode ser realizada pela intensidade e extensão de sua coloração na IH.

1.9 Caspases

As caspases (cysteine aspartate-specific proteinases) são uma família de proteases que mediam eventos de clivagem proteolítica nas células apoptóticas. Baseado na estrutura de seus prodomínios e de suas funções, os genes da família das caspases possuem quinze membros nos mamíferos e formam um sistema em cascata que possui papel central na

indução, transdução e amplificação dos sinais de apoptose intracelular⁴². São armazenadas nas células como pró-caspases e sua ativação através de clivagens sucessivas desencadeia esse sistema em cascata. O desenvolvimento das neoplasias está associado a supressão da apoptose. A maioria das células cancerígenas possuem componentes chave do processo de apoptose bloqueados para, em última análise, evitar a morte celular. O processo de apoptose envolvendo as caspases pode ser desencadeado tanto pelo ambiente extracelular (via intrínseca), quanto pelo intracelular (via intrínseca). A procaspase-3 pode ser ativada tanto pela via extrínseca quanto pela via intrínseca ao longo dos processos apoptóticos no meio intracelular, sendo convertida em caspase-3 em uma fase já final do início do processo que iniciarão a degradação de elementos celulares vitais levando ao fenótipo celular apoptótico⁴².

Estudos que possibilitem o melhor entendimento de fatores intrínsecos às células tumorais que levem a captação do FDG são de grande importância não só para melhor aplicação do método, como para o melhor entendimento do desenvolvimento das neoplasias, em particular, o melhor entendimento dos aspectos metabólicos da carcinogênese.

A possibilidade da análise IH de determinadas proteínas no tecido tumoral do material proveniente da biópsia diagnóstica dos tumores pode ser útil para racionalizar a solicitação do FDG-PET/CT visto seu custo elevado e sua disponibilidade limitada para demanda, especialmente em nosso meio.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Avaliar a associação entre a expressão IH de GLUT-1, Ki-67, Caspase-3 e HK no tecido tumoral com os valores de SUV e de outros parâmetros metabólicos adicionais de captação do FDG em pacientes portadores de adenocarcinoma de esôfago, JEG e estômago.

2.2. Objetivos secundários

Avaliar, em pacientes portadores de adenocarcinoma de esôfago, JEG e estômago, a associação dos valores de SUV, MTV e TLG com o estágio T e N da AJCC, tamanho do tumor, localização do tumor, tipo histológico segundo classificação de *Laurén*, infiltrado inflamatório tumoral e grau de diferenciação celular.

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

Incluíram-se no estudo vinte e seis pacientes com o diagnóstico de adenocarcinoma do esôfago, JEG e estômago, tratados no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) entre o ano de 2010 e 2015.

3.1.1. Critérios de inclusão

- Diagnóstico histológico de adenocarcinoma do esôfago, JEG e do estômago.
- Material histológico representativo da lesão primária proveniente de biópsia ou espécime cirúrgico com (lâminas e blocos de parafina) disponíveis, provenientes do arquivo da Divisão de Anatomia patológica do ICESP-HCFMUSP e em condições de utilização para realização dos estudos anatomopatológicos e IH.
- FDG-PET/CT realizado em data próxima à época em que foi obtido o tecido utilizado para as análises histológicas e IH.

3.2. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo descritivo transversal. Retrospectivamente, identificaram-se pacientes com diagnóstico de AC de esôfago, JEG e estômago que haviam realizado FDG-PET/CT no processo de estadiamento ou da avaliação de sua doença no ICESP-HCFMUSP.

3.2.1.Cronologia:

- Busca de pacientes que haviam realizado FDG-PET/CT nos arquivos do setor de medicina nuclear do ICESP-HCFMUSP com os diagnósticos de neoplasia maligna de esôfago e neoplasia maligna de estômago através do código de classificação internacional de doenças (CID) C15 e C16;

- Análise e exclusão dos pacientes com diagnóstico histopatológico diferente de adenocarcinoma;
- Coleta de dados do prontuário eletrônico do ICESP-HCFMUSP;
- Busca e seleção das lâminas e blocos de parafina junto aos arquivos da Divisão de Anatomia Patológica (DAP) do ICESP-HCFMUSP;
- Análise microscópica e marcação das áreas de interesse nas lâminas dos pacientes selecionados, coradas com hematoxilina e eosina (HE);
- Marcação dos blocos de parafina dos pacientes selecionados em correspondência com as lâminas previamente marcadas, para posterior realização do *Tissue Microarray* (TMA);
- Confecção do TMA no laboratório de investigação médica (LIM 14);
- Realização de coloração convencional do TMA com HE e IH com os quatro anticorpos de interesse;
- Análise microscópica do TMA;
- Análise dos resultados.

3.3. Considerações éticas

O estudo foi aprovado pela Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sua 199^a reunião ordinária, em 2015.

Foi também aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número do parecer 1.247.107 em 28 de setembro de 2015.

O Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) foi submetido na Plataforma Brasil em 14 de setembro de 2015 sob o número 48695415.5.0000.0065 e encontra-se aprovado.

Todos os esforços para obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram realizados.

3.4. Coleta de dados

3.4.1. Variáveis clínico-patológicas

Selecionaram-se as seguintes variáveis com os respectivos critérios de avaliação para compor o estudo:

- a) **Idade:** Determinada em anos, no momento em que foi realizado o diagnóstico anátomo-patológico.
- b) **Sexo:** Qualitativamente determinado como masculino ou feminino.
- c) **Realização de terapia neoadjuvante:** Determinado como sim ou não, seja ela quimioterapia ou quimioterapia associada a radioterapia.
- d) **Localização do tumor:** Classificada em proximal (esôfago e JEG), intermediária (fundo e corpo) e distal (antro) de acordo com a localização descrita na endoscopia para os pacientes que possuíam apenas a biópsia endoscópica, e, quanto tratavam-se de pacientes que possuíam também a peça cirúrgica, na análise conjunta da descrição endoscópica e da descrição da macroscopia no exame anatomopatológico.
- e) **Tamanho do tumor:** Determinado em centímetros, a partir da avaliação realizada durante o exame macroscópico do espécime cirúrgico no exame anatomopatológico.
- f) **Tipo histológico de Laurén⁴³:** determinado como intestinal, difuso, misto ou indeterminado (não classificável).
- g) **Grau de diferenciação histológica:** classificados como bem diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2) e pouco diferenciado (G3).
- h) **Estádio T e N da AJCC⁴⁴:** para fins de análise estatística, agrupou-se o estágio patológico pT1a e pT1b em T1, e o estágio pT4a e pT4b em T4. Os demais mantiveram-se conforme a classificação original.
- i) **Infiltrado inflamatório tumoral:** Determinado por meio de avaliação qualitativa/semi-quantitativa como leve, moderado e acentuado.
- j) **Maximum Standard Uptake Value (SUVmax):** Considerado o valor aferido apenas na lesão tumoral primária e calculado através do peso corporal
- k) **Metabolic Tumor Volume (MTV):** Foi definido pelo limiar de isocontorno com base nas porcentagens de SUVmax no tumor primário, utilizando o software PET VCAR no AW Server 3.2 Ext.1.2 (General Electric Company, Connecticut, EUA).
- l) **Total Lesion Glycolysis (TLG):** O software PET VCAR automaticamente calculou os valores de TLG.

3.5. Análise Anatomopatológica

Toda a análise anatomopatológica foi realizada por dois patologistas sem o conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo.

A classificação histológica segundo classificação de Laurén foi revista em todos os casos incluídos no estudo.

Avaliou-se a quantidade de infiltrado inflamatório tumoral e o grau de diferenciação celular na lâmina corada por Hematoxilina e Eosina (HE) correspondente ao bloco de parafina utilizado para a confecção do TMA.

O TMA e as reações IH foram todos realizados no LIM 14 da FMUSP.

3.5.1. Confecção dos blocos de TMA

O arranjo em matriz tecidual (do inglês, *Tissue Microarray*- TMA) constitui um método que redistribui numerosos fragmentos cilíndricos teciduais de blocos de parafina convencionais (blocos doadores) em um novo bloco (bloco receptor). Através do TMA, pequenas amostras representativas de regiões específicas de tecidos de múltiplos pacientes podem ser submetidas a estudos moleculares simultâneos.

Para a confecção dos dois blocos de TMA utilizados no presente estudo, revisaram-se todas as lâminas de cada um dos pacientes e identificaram-se aquelas mais representativas do tumor primário no estômago ou no esôfago. A partir das lâminas, selecionaram-se os blocos de parafina. As lâminas selecionadas coradas por HE foram revisadas e, as áreas de interesse para construção dos blocos de TMA foram marcadas sobre as mesmas endereçando a área de interesse no tumor. Nessa ocasião, foram realizadas de uma a seis marcas por paciente, a depender da quantidade de tecido disponível para análise na lâmina selecionada, procurando sempre realizar o maior número de marcas possíveis. Transferiu-se então as marcas na lâmina para o bloco de parafina correspondente. Extraíram-se cilindros de 1,0 mm (ou spots) de diâmetro das áreas marcadas nos blocos de parafina dos doadores e transportados para os blocos de parafina receptores utilizando equipamento MTA1 (Manual Tissue Microarray, Beecher Instruments, Silver Springs, MD, EUA), com espaçamento de 0,3 mm entre os cilindros (Figura 1).

Figura 1. Equipamento utilizado para construção dos blocos de TMA

Dos 26 pacientes foram obtidos um total de 172 cilindros. Para efeito de orientação de posição, na primeira linha horizontal e nas primeiras três posições da primeira coluna foram dispostos tecidos renais obtidos de necropsia.

Alocou-se cada cilindro amostral no bloco receptor em uma posição definida através de um sistema cartesiano de coordenadas. Os blocos receptores foram confeccionados com parafina Histosec em pastilhas (Merk, EUA). Na Figura 2 encontra-se as 4 lâminas confeccionadas a partir do bloco receptor de cada um dos anticorpos estudados.

Figura 2. Lâminas resultantes do bloco receptor

Durante a construção do bloco de TMA preparou-se o mapa em planilha Excel com a localização e identificação das amostras de tecidos, objetivando orientar a leitura posterior das reações IH.

3.5.2. Análise dos blocos de TMA - Técnica histológica convencional

Secções histológicas de 4 μ M de espessura foram obtidas de cada bloco de TMA e submetidas a protocolo de coloração HE de acordo com as seguintes etapas:

1. Desparafinização em xilol a 60°C por 10 min em temperatura ambiente;
2. Hidratação em etanol absoluto, etanol 95% e etanol 80%, respectivamente (três passagens);
3. Hidratação em água corrente e água destilada;
4. Hematoxilina de *Harris* por 3 minutos;
5. Lavagem em água corrente e água destilada;
6. Passagens sucessivas em etanol 50%, etanol 80% e etanol absoluto;
7. Eosina por 2 minutos;
8. Quatro passagens em etanol absoluto para desidratação;
9. Diafanização em xilol (4 passagens);
10. Montagem em *Entellan* (Merck, EUA).

3.5.3. Análise dos blocos de TMA – Procedimento imuno-histoquímico

As informações referentes aos anticorpos primários utilizados na avaliação encontram-se descritos na Tabela - 1.

Tabela - 1 Especificações dos anticorpos e clones utilizados no método imuno-histoquímico

Anticorpo	Marca/Referência	Clone / cod / lot / ref
GLUT-1	Neomarkers	RB-9052-P1; lot 9052P807B
Ki-67	Ventana Medical Systems	lot G05617; ref 790-4286

Hexokinase-1	Biorbyt	256602; lot CB 2257
Caspase-3 clivada	Cell Signaling	cod 9661; lot 23

A pesquisa IH consistiu nas seguintes etapas:

1. Desparafinização dos cortes de 3 μ de espessura, do material incluído em parafina: Incubação com xilol a 60°C por 20 minutos seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 20 minutos;
2. Hidratação dos cortes em concentrações de etanol a 100% com 3 banhos de 30 segundos cada, etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada;
3. Recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de tampão citrato pH 6.0 (PMB1-125, Spring Bioscience), ou solução tampão Tris-EDTA, pH 9.0 (PMB4-125, Spring Bioscience), em panela a vapor, após a fervura da água da panela com a cuba de solução de recuperação, colocado o suporte de lâminas por 35 minutos. Resfriado por 20 minutos à temperatura ambiente. Lavagem em água corrente e água destilada;
4. Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída em metanol, em três banhos de 10 minutos cada. Lavagens em água corrente e água destilada. Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos;
5. Bloqueio de proteínas com Cas Block™ (Invitrogen by Life Technologies cat. n° 00-8120) por 10 minutos a 37° C. Escorrimento e incubação com o anticorpo primário;
6. Incubação das lâminas com anticorpo primário, específico para o antígeno, diluído em solução de albumina bovina (BSA, SIGMA, EUA) a 1,0% e azida sódica NaN₃ (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 min. a 37° C e, em seguida, 18 horas (overnight) a 4° C. Lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada;
7. Incubação com o bloqueador pós-primário (Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Ltd, Ref. RE7 159) por 30 minutos a 37° C. Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada;
8. Incubação com polímero (NovoLink Polimer Leica Biosystems, Newcastle Ltd Ref. RE7 161), por 30 minutos a 37° C. Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada;

9. Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, EUA) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (Labsynth) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37 °C. Lavagens em água corrente e água destilada;

10. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada;

11. Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol (3 trocas de 1 minuto cada) e montagem em meio permanente (Entellan, Merck, cod. 1.07961.0100) com laminula;

Os controles utilizados na reação IH compreenderam um controle positivo sabidamente positivo para o anticorpo em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos IH.

3.5.4. Interpretação dos resultados IH

Como havia uma variação no número de cilindros do TMA de cada paciente incluído no estudo, sendo essa variação de um até o máximo seis cilindros para o mesmo paciente, considerou-se, para fins de análise, a marcação mais forte do GLUT-1 e HK. Para a análise do Ki-67, considerou-se o maior valor dentre todos os cilindros e, de maneira similar ao Ki-67, para a análise da Caspase-3 foi sempre considerada a maior porcentagem dentre todos os cilindros. Maiores detalhes dos critérios utilizados para análise IH são abordados a seguir.

3.5.4.1. GLUT-1

Para interpretação do GLUT-1, o parâmetro utilizado na análise foi a intensidade da marcação pelo anticorpo. Utilizaram-se critérios modificados já descritos anteriormente por Higashi et. al.⁴⁵ em sua publicação sobre a relação da expressão de Glut-1 e FDG-PET/CT. A intensidade, portanto, foi classificada em duas categorias sendo elas “fraca” e “forte”. Na Figura 2 encontram-se as fotografias da microscopia óptica de dois pacientes incluído no estudo, com aumento de 40x, à título de exemplo.

Figura 3. GLUT-1 (40x) à esquerda com intensidade fraca e à direita forte

3.5.4.2. Hexokinase-1

De maneira similar ao critério utilizado para análise do GLUT-1, para HK utilizou-se a intensidade da marcação pelo anticorpo, sendo assim definido duas categorias, uma com intensidade “fraca” e a outra com intensidade “forte” (Figura 3). Tal critério baseou-se em estudos prévios sobre a influência da HK sobre a captação de FDG, com algumas modificações para o presente estudo ⁴⁶.

Figura 4. HK (10x) à esquerda com intensidade fraca e à direita forte

3.5.4.3. Ki-67

Na análise do Ki-67, além da sua representação em porcentagem, foi utilizado um escore baseado no intervalo da porcentagem de células neoplásicas positivas na microscopia, como já adotado em estudos prévios para esse propósito⁴⁵. Esse escore consistiu em três categorias, sendo elas menor que 10%, entre 10 e 50% e maior que 50%. Nos pacientes com mais de um cilindro analisado, foi considerado o maior valor do Ki-67 dentre todos eles. Na

Figura 5 encontram-se as fotografias da microscopia óptica de três pacientes do estudo, um com valor menor que 10%, o outro entre 10 e 50% e o outro com valor maior que 50%.

Figura 5. Ki-67 (10x), com índice de 9%, 50% e 80% da esquerda para direita

3.5.4.4. Caspase-3

A Caspase-3 foi analisada através da porcentagem de células positivas para o anticorpo. Foram definidas duas categorias sendo elas maior que 1% de células positivas e menor ou igual a 1% de células positivas. Tal valor de corte foi definido por análises preliminares dos resultados encontrados na população estudada, de maneira que fosse possível extrair uma maior significância dos resultados encontrados. Na figura 5 encontram-se as fotografias da microscopia óptica de dois pacientes do estudo, um com porcentagem $< 1\%$ e outro com porcentagem $\geq 1\%$.

Figura 6. Caspase-3 (10x) à esquerda com nenhuma célula positiva e à direita 4%

3.6. Realização do FDG-PET/CT

Os exames foram realizados no ICESP-HCFMUSP. A seguir é descrito as especificações do aparelho e o protocolo do exame.

3.6.1. Protocolo do exame e aspectos técnicos

Os estudos de FDG-PET/CT foram realizados em um equipamento do modelo Discovery 690® Time of Flight (General Electric, Waukesha, Wisconsin, EUA). Na Figura 7 encontra-se uma fotografia do aparelho utilizado para realização do FDG-PET/CT.

Figura 7. PET/CT modelo Discovery 690® Time of Flight

Os pacientes receberam injeções de FDG correspondente a uma atividade média de 344 Megabecquerel (MBq) após jejum por pelo menos 8 horas.

O nível de glicose no sangue foi inferior a 180 mg / dL (média de 96 mg / dL). Cerca de 60 minutos após a injeção (média de 73 minutos), todos os pacientes foram submetidos à aquisição tridimensional de PET/CT da cabeça aos pés. As imagens de emissão foram obtidas a 3 min por posição da mesa do aparelho. (campo de visão axial de 15 cm com sobreposição de 3 cm). As imagens tomográficas foram obtidas através da aplicação do protocolo de diagnóstico sem contraste intravenoso e protocolo de baixa dose para correção da atenuação. A reconstrução da imagem PET foi realizada utilizando-se técnica iterativa (OSEM) com o mesmo número de iterações e subconjuntos para todos os estudos. A reconstrução das imagens tomográficas baseou-se no método convencional de projeção reversa filtrada com filtro GE STD.

Os dados anteriores do FDG-PET/CT foram revisados por médico especialista em Medicina Nuclear com experiência em PET/CT. O SUVmax foi calculado com base na massa

corporal. O MTV foi definido pelo limiar de isocontorno com base nas porcentagens de SUVmax no tumor primário, utilizando-se o software PET VCAR no AW Server 3.2 Ext.1.2 (General Electric Company, Connecticut, EUA). Essas porcentagens variaram de lesão para lesão (variam de 30% a 97%) e foram definidas por análise visual de forma que os volumes de interesse (VOIs) delimitassem adequadamente a lesão tumoral. O cálculo dos valores de TLG foi realizado automaticamente pelo software PET VCAR. Na Figura 8 observa-se o cálculo do MTV sendo realizado em um dos pacientes do estudo pelo software PET VCAR.

Figura 8. Cálculo do MTV realizado em um dos pacientes do estudo

3.7. Análise estatística

O processo de análise de dados iniciou-se com uma exploração descritiva, incluindo frequência absoluta dos atributos qualitativos com valores de média, desvio padrão (DP), mediana, percentil 25 (P25) e 75 (P75) de SUV, MTV e TLG.

Utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade das variáveis analisadas. Para avaliar a hipótese de que a distribuição de SUV, MTV e TLG eram iguais entre as categorias das variáveis qualitativas, o teste U de Mann-Whitney (MW) ou o teste de Kruskal-Wallis (KW) ajustado para correção de Bonferroni para múltiplos testes foi utilizado. Diagramas de caixa ou “box plot” foram gerados para estudar a distribuição de SUV, MTV e TLG segundo as categorias do parâmetro GLUT-1, Caspase-3 e inflamação, parâmetros esses

significativos na análise anterior. A correlação entre SUV, MTV e TLG e as variáveis quantitativas foram analisadas por meio do coeficiente de correlação de postos de Spearman ou ρ de Spearman.

Todos os testes realizados consideraram um α bidirecional de 0.05 e intervalo de confiança (IC) de 95% e foram realizados com apoio computacional dos softwares IBM SPSS 25 (*Statistical Package for the Social Sciences*) e Excel 2010® (Microsoft Office).

4. RESULTADOS

4.1. Características clínicas dos pacientes

Incluíram-se 26 pacientes no estudo. A média de idade foi de 70 anos sendo que 24 (92,3%) eram do sexo masculino e 2 (7,7%) eram do sexo feminino. A localização proximal do tumor foi a mais frequente, sendo que em 21 (80,8%) encontrava-se no esôfago e na JEG. Nove dos 26 (34,6%) pacientes incluídos no estudo realizaram neoadjuvância, no entanto, apenas em um desses nove pacientes foi utilizado amostra do tumor após a neoadjuvância. A análise IH dos demais 8 pacientes foi realizada em tecido que não havia sido submetido à ação de Rxt e/ou Qt. A frequência das características clínicas encontram-se descritas na Tabela - 2.

Tabela - 2 Características clínicas dos 26 pacientes

VARIÁVEIS CLÍNICAS	n=26	%
Idade (anos)		
Média	70	-
Min-Máx	52-90	-
Sexo		
Masculino	24	92,3
Feminino	2	7,7
Localização do tumor		
Proximal	21	80,8
Intermediária	2	7,7

Distal	3	11,5
Neoadjuvância		
Sim	9	34,6
Não	17	65,4

4.2. Características anatomopatológicas

A maior parte dos pacientes apresentava o subtipo histológico intestinal da classificação de Laurén, diagnosticado em 20 (70,9%) pacientes.

O tecido utilizado para análise IH no TMA foi proveniente de biópsia endoscópica em 10 (38,46%) pacientes sendo que nos demais 16 (61,53%) pacientes, o tecido utilizado para análise IH foi proveniente dos espécimes cirúrgicos. A frequência de todas as características anatomopatológicas encontra-se descritas na Tabela - 3.

Tabela – 3 Variáveis anatomopatológicas dos 26 pacientes

VARIÁVEIS PATOLÓGICAS	n=26	%
Tamanho tumoral (cm)		
Médio	4,5	-
Min-Máx	0,4 – 10,5	-
Tipo histológico de Lauren		
Intestinal	20	76,92
Difuso	5	19,23
Não classificável	1	3,84
Estádio T		
T1	5	19,2
T2	6	23,1
T3	12	46,2
T4	3	11,5
Infiltrado inflamatório		
Leve	5	19,2
Moderado	18	69,2

Acentuado	3	11,5
Diferenciação celular		
Bem	2	7,7
Moderadamente	14	53,8
Pouco	10	38,5

4.3. Análise do SUV, MTV e TLG com os marcadores biológicos estudados

A média e o valor mediano do SUVmax para todos os 26 pacientes foi de 10,5 e 9,2 respectivamente (valor absoluto mínimo e máximo de 2,9 e 30). O MTV mediano foi de 16,6 cm³ (valor absoluto mínimo e máximo de 0,9 e 122). O valor de TLG mediano foi de 84,8 g/ml x cm³ (valor absoluto mínimo e máximo de 3 e 884,8).

Os valores de SUVmax, MTV e TLG para as variáveis qualitativas GLUT-1 e Caspase-3, Ki-67 e HK incluindo a média, mediana e valor de P é apresentada nas Tabelas 4 e 5, 6 e 7 respectivamente.

Tabela – 4 Média, mediana e valor de P do SUVmax, MTV, TLG em relação ao GLUT-1

		Média	Mediana	p*
SUV	Forte	12,6	10,9	0,001
	Fraco	5,7	4,7	
MTV	Forte	31,7	21,2	0,07
	Fraco	13,5	8,2	
TLG	Forte	232,8	108,2	0,016
	Fraco	44,8	35,3	

* Valor de P baseado no teste de Mann-Whitney (2 grupos) ou Teste de Kruskal Wallis(+ 2 grupos)

Tabela – 5 Média, mediana e valor de P do SUVmax, MTV, TLG em relação a Caspase3

		Média	Mediana	p*
SUV	>1%	11,6	10,1	0,023
	≤1%	5,7	4,3	
MTV	>1%	28,7	16,9	0,200
	≤1%	15,4	3,8	
TLG	>1%	205	101	0,079
	≤1%	48,8	17,7	

* Valor de P baseado no teste de Mann-Whitney (2 grupos) ou Teste de Kruskal Wallis(+ 2 grupos)

Tabela – 6 Média, mediana e valor de P do SUVmax, MTV, TLG em relação ao Ki-67

		Média	Mediana	p*
SUV	>50%	10,3	9,6	0,713
	10-50%	11,5	9,5	
	<10%	6,8	6,8	
MTV	>50%	28,2	18,5	0,864
	10-50%	23,6	12,8	
	<10%	24,1	24,1	
TLG	>50%	167,3	98,5	0,852
	10-50%	206,9	59,3	
	<10%	69	69	

* Valor de P baseado no teste de Mann-Whitney (2 grupos) ou Teste de Kruskal Wallis(+ 2 grupos)

Tabela – 7 Média, mediana e valor de P do SUVmax, MTV, TLG em relação a HK

		Média	Mediana	p*
SUV	Forte	9,3	8,3	0,182
	Fraco	12,3	11,5	
MTV	Forte	25,4	13,4	0,363
	Fraco	27,3	24,4	
TLG	Forte	165,7	57,8	0,262
	Fraco	189,8	113,2	

* Valor de p baseado no teste de Mann-Whitney (2 grupos) ou Teste de Kruskal Wallis(+ 2 grupos)

Foi demonstrado significância estatística entre SUVmax e GLUT-1 ($P = 0,001$) bem como entre SUVmax e Caspase-3 (0,023). A análise descritiva desses parâmetros em relação ao SUVmax encontra-se representada em diagramas de caixa ou “box plot” na Figura 9 e Figura 10. Não houve associação entre Ki-67 e HK com SUVmax, MTV e TLG. A análise do Ki-67, dessa vez como uma variável quantitativa, apresentou baixo coeficiente de correlação com todos os parâmetros estudados do FDG-PET/CT (SUV CC 0,11 $P=0,59$; MTV CC 0,21 $P = 0,30$; TLG CC 0,19 $P = 0,33$).

Figura 9. Distribuição de SUVmax de acordo com a intensidade de Glut-1
 P (MW) <0,001

Figura 10. SUVmax de acordo com a positividade da Caspase-3 em porcentagem
 P (MW) = 0,001

O MTV não mostrou associação com nenhum dos quatro marcadores biológicos analisados.

O TLG apresentou associação estatisticamente significativa apenas com GLUT-1 ($P = 0,016$), representada no diagrama de caixa (“box plot”) na Figura 11.

Figura 11. Distribuição de TLG de acordo com a intensidade de Glut-1
 $P (MW) < 0,001$

Não foi evidenciado associação entre SUVmax, MTV e TLG com sistema de estágio TNM, com a localização do tumor, com o subtipo histológico de Laurén e com o grau de diferenciação celular.

4.4. Análise do SUV, MTV e TLG com as variáveis clínico-patológicas

Apenas a inflamação apresentou associação com SUVmax ($P = 0,025$) dentre todas as variáveis clínico-patológicas analisadas (Figura 11), no entanto, a inflamação não apresentou associação com o MTV e TLG. A associação de inflamação com SUVmax encontra-se representada no diagrama de caixa (“box plot”) na Figura 12.

Figura 12. Distribuição do SUVmax de acordo com o infiltrado inflamatório

P (MW) = 0,025

Na análise quantitativa pelo coeficiente de correlação de Spearman, o tamanho do tumor apresentou associação positiva com todos os parâmetros estudados do FDG-PET/CT. Os valores encontram-se na Tabela 6.

Tabela – 8 Correlação entre as variáveis quantitativas, SUV, MTV e TL

	SUV	MTV	TLG
Tamanho (cm)			
Coeficiente de Correlação*	0,428	0,661	0,669
p-valor	0,029	<0,01	<0,01
N	26	26	26

* Coeficiente de correlação de postos de Spearman

5. DISCUSSÃO

A associação entre a captação do FDG e a expressão proteica de GLUT-1 nas neoplasias malignas é um fenômeno bem conhecido. Vários estudos demonstraram que quanto maior a expressão IH de GLUT-1, maior a captação de FDG em tumores de diferentes sítios como pulmão, pâncreas, estômago, esôfago, mama, entre outros^{46,49,50,51}.

Diversos métodos foram utilizados em estudos experimentais e estudos clínicos para avaliação dessa associação. Dentre eles podemos citar o estudo IH, a reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR), o northern blot, entre outros, cada um deles com suas vantagens e desvantagens. A maior parte dos estudos não experimentais utilizou-se do método IH.

Outro aspecto relevante das análises realizadas em estudos prévios refere-se à maneira de interpretar os resultados IH do GLUT-1 de modo à quantificá-lo, permitindo assim avaliar a associação entre essa proteína e o SUV de FDG. O método IH não é um método quantitativo em princípio, portanto, a metodologia utilizada na criação de uma escala pode ser realizada de diferentes maneiras. A mais frequentemente utilizada é a avaliação de intensidade e distribuição do anticorpo no tecido tumoral a ser avaliado. Alguns autores utilizaram-se de escalas semi-quantitativas criadas através da multiplicação da intensidade e distribuição sendo formado então um produto e, a partir desse produto, criado uma escore de imunoreatividade que permite quantificar a proteína de interesse. Outro ponto relevante relacionado à metodologia refere-se à utilização do TMA para avaliação de um número grande de pacientes de maneira mais rápida e simples.

Avril et al.⁵², por exemplo, não encontrou associação entre a expressão imuno-histoquímica de GLUT-1 e SUV no FDG-PET/CT avaliando 46 pacientes portadoras de câncer de mama, utilizando-se de um escore semi-quantitativo adaptado, originalmente criado para avaliação de receptores de estrógeno. De maneira distinta do estudo citado, a maior parte deles demonstra uma associação positiva entre o GLUT-1 e SUV para carcinoma de mama. Esse resultado divergente dos demais estudos pode ter sido gerado, portanto, por uma questão metodológica.

Temos ainda aspectos relacionados à quantificação da captação de FDG pelos tumores. A maior parte dos estudos utilizou o valor numérico de SUV para avaliar a associação com a expressão de determinada proteína, na tentativa de verificar sua influência na captação do FDG. No entanto, existe uma série de limitações relacionado ao SUV. O SUV representa a concentração tecidual de FDG dividido pela atividade total injetada do

radioisótopo, multiplicado pelo peso do paciente. Diversos fatores afetam o SUV como composição corpórea, níveis glicêmicos plasmáticos, efeitos de volume parcial, coeficiente de recuperação dentre outros⁵³. Alguns fatores são controlados na prática clínica como por exemplo o índice glicêmico no momento da execução do exame. Outros, como efeito de volume parcial e coeficiente de recuperação não são passíveis de correção sendo inerentes ao SUV. Por fim, o SUVmax representa o valor de um único pixel, que reflete a atividade máxima de FDG no tumor e ignora a carga metabólica total e as mudanças na distribuição do radioisótopo na lesão. Dessa forma, o uso do MTV e TLG, parâmetros metabólicos baseados em volume, podem refletir de maneira mais acurada a real atividade metabólica de um determinado tumor, permitindo assim análise mais precisa do fenômeno biológico. E quando avaliamos fatores biológicos relacionados à captação de FDG isso é de fundamental importância.

Portanto, a análise dos parâmetros MTV e TLG no FDG-PET/CT, tende a representar melhor o metabolismo tumoral e possibilita o melhor entendimento da influência de fatores clínicos e biológicos relacionados ao FDG. Desta maneira, os valores de MTV e TLG poderiam ser incorporados nos laudos finais do FDG-PET/CT na prática clínica.

Além das limitações relacionadas às questões metodológicas encontradas em estudos anteriores, outra importante limitação na avaliação da associação de GLUT-1 com o FDG-PET/CT é o pequeno número de pacientes avaliados em todos eles.

Poucos estudos avaliaram a associação de fatores biológicos como o GLUT-1 com a captação de FDG nos adenocarcinomas esofagogástricos. Os dados que foram encontrados na literatura avaliando GLUT-1 e FDG nos adenocarcinomas esofagogástricos são equivalentes aos dados revelados no presente estudo. Yamada et al.³⁵, avaliando 35 pacientes com adenocarcinoma gástrico demonstrou que o GLUT-1, através da análise de sua expressão IH, foi o fator mais influente na captação de FDG quando analisado em conjunto com outros fatores incluindo-se subtipos histológicos e profundidade de invasão, através de regressão linear múltipla. Nesse estudo, utilizou-se uma escala subjetiva para quantificação da captação de FDG nas imagens obtidas no FDG-PET/CT, minimizando os fatores relacionados ao uso isolado do valor numérico de SUV.

No presente estudo, não foi realizada análise multivariada com os demais fatores avaliados porém, o GLUT-1 demonstrou boa associação com a captação de FDG quando analisado através do SUV e do TLG. Apesar de haver associação positiva com os valores de SUV e TLG, o MTV não demonstrou o mesmo. Foi considerado um valor variável de porcentagem para o cálculo do limiar de isocontorno através do SUVmax de acordo com as

características anatômicas e metabólicas do tumor. Essa metodologia pode ter reduzido a associação de GLUT-1 com o MTV. Outro aspecto relevante é que a análise de GLUT-1 foi realizada no local do tumor com maior expressão IH no TMA. O cálculo de MTV é baseado no SUV médio de todo volume do tumor considerado. Isso quer dizer que são incluídos virtualmente áreas com expressão maior e menor de GLUT-1. Talvez essa seja outra justificativa para não ter sido constatado associação do GLUT-1 com MTV.

O pequeno número de pacientes e a heterogeneidade da população estudada são algumas limitações deste estudo. No entanto, há que se considerar que tais achados nos permite constatar não só de maneira mais evidente a associação da captação de FDG com o GLUT-1 mas também, as valiosas informações que podem ser obtidas através da análise do MTV e TLG ao invés de apenas SUV. E isso se estende ao estudo dos demais fatores biológicos relacionados a captação de FDG.

Conforme já discutido, o Ki-67 representa, em última análise, a taxa de proliferação celular. Seria, portanto, de se esperar que valores elevados de Ki-67 para os tumores de maneira geral estariam relacionados a maior captação de FDG pela célula devido à sua maior atividade metabólica, requerida na replicação celular. Para alguns tumores essa relação diretamente proporcional entre captação de FDG e Ki-67 pôde ser demonstrada, porém, em alguns tipos de tumores não foi possível identificar-se essa associação. Isso aplica-se aos adenocarcinomas de esôfago e de estômago. Para esses tumores, nenhuma correlação foi demonstrada em estudos anteriores^{44,48}. Kameyama R et al.⁵⁴, ao avaliar 21 pacientes com câncer gástrico não demonstrou correlação significativa entre o Ki-67 e os valores de SUV, embora este estudo não tenha sido desenhado para esse fim específico. Uma metanálise avaliou a existência de associação entre o SUV de FDG e expressão de Ki-67 em diferentes tipos de tumores, demonstrando uma associação positiva moderada quando considerado todos os sítios tumorais. No entanto, ao analisar os subgrupos, incluindo apenas estudos com câncer de esôfago ou gástrico, revelou-se um baixo coeficiente de correlação⁵⁵. Esses achados em estudos anteriores vão de encontro aos achados do presente estudo. Mesmo na avaliação do MTV e TLG com o Ki-67, não realizada em estudos anteriores, não evidenciou qualquer correlação. Tais avaliações poderiam minimizar as limitações do valor numérico isolado de SUVmax.

Na avaliação da HK encontram-se as mesmas limitações observadas para o GLUT-1 em estudos anteriores. Em grande parte desses estudos, foi utilizado a expressão imuno-histoquímica de HK sendo avaliados intensidade e distribuição no tecido tumoral e criado escores semi-quantitativos. Zhao S. et al.⁴⁶, em seu modelo experimental murino, relatou

correlação positiva entre a captação de FDG avaliada por autoradiografia e a expressão imuno-histoquímica de GLUT-1, GLUT-3 e Hexokinase-2. Nesse mesmo estudo, constatou-se a influência da heterogeneidade tumoral na captação de FDG. No presente estudo, não foi demonstrado associação com HK. Assim como para os demais marcadores biológicos estudados, considerou-se o cilindro do TMA com maior expressão de HK para um mesmo paciente, possivelmente diminuindo a influência da heterogeneidade tumoral. A análise do MTV e TLG também foram aspectos que podem ter minimizado a influência da heterogeneidade tumoral porém, também não associaram-se com a expressão IH de HK. Estudos anteriores realizados com adenocarcinoma de esôfago e câncer gástrico também não revelaram correlação positiva entre a captação de FDG e a Hexokinase-2^{48,56}.

Poucos estudos na literatura procuraram avaliar fatores relacionados à apoptose e sua influência na captação de FDG. Westerterp M. et al.⁵¹ analisando a associação da Caspase-3 e o SUV de FDG em 26 pacientes com adenocarcinoma de esôfago e de JEG não revelou correlação alguma. Nesse estudo, os autores utilizaram-se da porcentagem de células positivas para o anticorpo, com quatro categorias, não sendo evidenciado nenhuma associação. No presente estudo, optou-se por se utilizar apenas duas categorias, sendo evidenciado associação de valores maiores de SUVmax nos pacientes com mais que 1% de células positivas para a Caspase-3. O fato de um maior número de células em apoptose poderia estar associado a tumores com maior agressividade e, portanto, a valores mais elevados de SUV.

Kim M et al.⁵⁷, analisando o processo inflamatório intratumoral e a captação de FDG no carcinoma epidermóide oral, verificou que o SUV está positivamente correlacionado com o maior grau de inflamação. O mesmo o foi demonstrado para o MTV e TLG. Semelhante ao estudo anterior, na presente análise observou-se associação positiva entre SUVmax e inflamação, mas não com inflamação e MTV e TLG, sugerindo menor contribuição da inflamação na captação de FDG para os adenocarcinoma de estômago e esôfago.

Westerterp M. et al.⁵¹ além da avaliar marcadores biológicos também avaliou a associação de SUV com o TNM e com o tamanho do tumor. Assim como revelado na presente análise, nenhuma associação entre a captação de FDG e TNM foi demonstrada no estudo conduzido por esse autor, no entanto, uma correlação positiva com o diâmetro do tumor e SUV pode ser observada. Na presente análise ainda foi possível confirmar a importância do uso do MTV e TLG de maneira que o coeficiente de correlação foi maior para esses dois parâmetros do que para o SUVmax.

O presente estudo apresenta algumas limitações, algumas das quais já citadas anteriormente. Foi realizado em um único centro e de forma retrospectiva com um número limitado de pacientes. O FDG-PET/CT não é utilizado rotineiramente no estadiamento de câncer gástrico, o que trouxe grande dificuldade em identificar pacientes que preenchessem os critérios para o estudo. Conforme discutido anteriormente, a IH não é um método quantitativo, no entanto, a criação e validação de escores permitem criar uma boa relação entre a expressão da proteína de maneira quantitativa. Criaram-se escores ajustados para este estudo, o que pode ter exercido algum viés de aferição ^{58,59}.

6. PERSPECTIVAS

Levar-se em consideração alguns fatores inerentes ao tumor como expressão de GLUT-1 bem como a análise conjunta do volume e da carga metabólica tumoral parecem trazer melhores e maiores informações no que diz respeito a avaliação e planejamento terapêutico dos tumores esofagogástricos.

A análise conjunta de características clínicas, anatomopatológicas e moleculares dos tumores permite melhor selecionar a indicação do FDG-PET/CT.

Novos radiotraçadores têm demonstrado resultados promissores no manejo do tratamento dos pacientes com tumores esofagogástricos. Estudos com radiotraçadores dirigidos a alvos moleculares como o receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e o ligante da morte celular programada 1 (PD-L1) tem permitido a análise não invasiva do perfil molecular desses tumores, com grande potencial de aplicabilidade clínica à luz dos resultados terapêuticos em terapias alvo e imunoterapia ^{60,61}.

Por fim, a radiômica do PET/CT possui grande potencial para refinar e melhorar a acurácia do tipo de tratamento sistêmico e prognóstico dos tumores esofagogástricos ⁶².

7. CONCLUSÕES

Dentro das condições de realização do presente estudo, pode-se concluir que:

- Houve associação da expressão imuno-histoquímica do GLUT-1 com o SUVmax e TLG no adenocarcinoma de esôfago, JEG e estômago. A Caspase-3 também associou-se com o SUVmax.

- A inflamação e o tamanho do tumor apresentaram associação e correlação positiva com o SUVmax, respectivamente.

8. REFERÊNCIAS

1. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, editors (2020). World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://publications.iarc.fr/586>. Licence: CC BY-NC-ND 3.0 IGO.
2. Bray F, Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization. 2018.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro: INCA. 2019.
4. Napier KJ, Scheerer M, Misra S. Esophageal cancer: A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. *World J Gastrointest Oncol* 2014. 6(5): 112-120. Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1948-5204/full/v6/i5/112.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.4251/wjgo.v6.i5.112>
5. Kubo A, Corley DA. Body mass index and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006. 15: 872–78.
6. Whiteman DC, Sadeghi S, Pandeya N, et al, and the Australian Cancer Study. Combined effects of obesity, acid reflux and smoking on the risk of adenocarcinomas of the oesophagus. *Gut*. 2008. 57: 173–80.
7. Ramos MFKP, Pereira MA, Amorim LC, et al. Gastric cancer molecular classification and adjuvant therapy: Is there a different benefit according to the subtype? *J Surg Oncol*. 2019. 1–10. <https://doi.org/10.1002/jso.25792>
8. Barrett, N.R. Chronic peptic ulcer of the oesophagus and ‘oesophagitis’. *Br J Surg*. 1950. 38:175–182.
9. Surveillance, Epidemiology, and End Results ProgramTurning. SEER Stat Fact Sheets: Esophageal Cancer. Retrieved November 9, 2013. Available from: URL: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/esoph.html>

10. Muwonge R, Ramadas K, Sankila R, Thara S, Thomas G, Vinoda J, Sankaranarayanan R. Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: a nested case-control design using incident cancer cases. *Oral Oncol.* 2008. 44: 446-454 [PMID: 17933578 DOI:10.1016/j.oraloncology.2007.06.002]
11. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (WCRF/AICR). Continuous Update Project Report: Diet, Nutrition, Physical Activity and Stomach Cancer 2016. Revised 2018. London: World Cancer Research Fund International; 2018. wcrf.org/sites/default/files/Stomach-Cancer-2016-Report.pdf. Accessed June 21, 2018.
12. Fuchs HF, Harnsberger CR, Broderick RC, et al. Mortality after esophagectomy is heavily impacted by center volume: retrospective analysis of the Nationwide Inpatient Sample. *Surg Endosc.* 2017. 31:2491-7.
13. van Hagen P, Hulshof MC, van Lanschot JJ, et al. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N Engl J Med.* 2012. 366:2074-84.
14. Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, et al. Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *J Clin Oncol.* 2008. 26:1086-92.
15. Gebski V, Burmeister B, Smithers BM, et al. Survival benefits from neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy in oesophageal carcinoma: a meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2007. 8:226-34.
16. Stahl M, Stuschke M, Lehmann N, et al. Chemoradiation with and without surgery in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Clin Oncol.* 2005. 23:2310-7.
17. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *New Engl J Med.* 2006. 355(1):11–20. doi:10.1056/NEJMoa055531.
18. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *New Engl J Med.* 2001. 345(10):725–30. doi:10.1056/NEJMoa010187 (Epub 2001/09/08, PubMed PMID: 11547741).
19. Al-Batran SE, Homann N, Schmalenberg H, et al. Perioperative chemotherapy with docetaxel, oxaliplatin, and uracil/leucovorin (FLOT) versus epirubicin, cisplatin,

- and fluouorouracil or capecitabine (ECF/ECX) for resectable gastric or gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma (FLOT4-AIO): A multicenter, randomized phase 3 trial. *J Clin Oncol*. 2017. 35 (15_suppl): 4004.
20. Leong T, Smithers BM, Michael M, et al. TOPGEAR: a randomised phase III trial of perioperative ECF chemotherapy versus preoperative chemoradiation plus perioperative ECF chemotherapy for resectable gastric cancer (an international, intergroup trial of the AGITG/TROG/EORTC/NCIC CTG). *BMC Cancer*. 2015. 15: 532.
 21. National Comprehensive Cancer Network. Gastric Cancer (Version 2.2018). https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/gastric.pdf. Accessed September, 24, 2020.
 22. Lutz MP, Zalcberg JR, Ducreux M, et al. Highlights of the EORTC St. Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of gastric, gastroesophageal and oesophageal cancer – differential treatment strategies for subtypes of early gastroesophageal cancer. *Eur J Cancer*. 2012. 48:2941-53.
 23. Kato H, Miyazaki T, Nakajima M, Takita J, Kimura H, Faried A, Sohda M, Fukai Y, Masuda N, Fukuchi M, Manda R, Ojima H, Tsukada K, Kuwano H, Oriuchi N, Endo K. The incremental effect of positron emission tomography on diagnostic accuracy in the initial staging of esophageal carcinoma. *Cancer*. 2005. 103: 148-156
 24. van Westreenen HL, Westerterp M, Bossuyt PM, Pruim J, Sloof GW, van Lanschot JJ, Groen H, Plukker JT. Systematic review of the staging performance of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in esophageal cancer. *J Clin Oncol*. 2004. 22: 3805-3812
 25. Namikawa T, Okabayshi T, Nogami M, Ogawa Y, Kobayashi M, Hanazaki K. Assessment of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography combined with computed tomography in the preoperative management of patients with gastric cancer. *Int J Clin Oncol*. 2013.
 26. Kudou M, Kosuga T, Kubota T, Okamoto K, Komatsu S, Shoda K, et al. Value of preoperative PET-CT in the prediction of pathological stage of gastric cancer. *Ann Surg Oncol*. 2018. 25:1633–9.
 27. Kaneko Y, Murray WK, Link E, Hicks RJ, Duong C. Improving patient selection for 18F-FDG PET scanning in the staging of gastric cancer. *J Nucl Med*. 2015. 56(4):523-9.

28. Moureau-Zabotto L, Touboul E, Lerouge D, Deniaud- Alexandre E, Grahek D, Foulquier JN, Petegnief Y, Grès B, El Balaa H, Kerrou K, Montravers F, Keraudy K, Tiret E, Gendre JP, Grange JD, Houry S, Talbot JN. Impact of CT and 18F-deoxyglucose positron emission tomography image fusion for conformal radiotherapy in esophageal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005. 63: 340-345
29. Pan L, Gu P, Huang G, Xue H, Wu S. Prognostic significance of SUV on PET/CT in patients with esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009. 21: 1008-1015
30. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors (RECIST guidelines). *J Natl Cancer Inst*. 2000. 92:205–216.
31. Weber WA, Ott K, Becker K, Dittler HJ, Helmberger H, Avril NE, Meisetschläger G, Busch R, Siewert JR, Schwaiger M, Fink U. Prediction of response to preoperative chemo- therapy in adenocarcinomas of the esophagogastric junction by metabolic imaging. *J Clin Oncol*. 2001. 19: 3058-3065
32. H.G. Joost, G.L. Bell, J.D. Best, M.J. Birnbaum, M.J. Charron, Y.T. Chen, H. Doege, D.E. James, H.F. Lodish, K.H. Moley, J.F. Moley, M. Mueckler, S. Rogers, A. Schurmann, S. Seino, B. Thorens, Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 282 (2002) E974–E976
33. L. Szablewski, Expression of glucose transporters in cancers. Review. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1835 (2013) 164–169
34. Taylor MD, Smith PW, Brix WK, Wick MR, Theodosakis N, Swenson BR, Kozower BD, Jones DR. Correlations between selected tumor markers and fluorodeoxyglucose maximal standardized uptake values in esophageal cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009. Apr;35(4):699-705. doi: 10.1016/j.ejcts.2008.11.029. Epub 2009 Jan 10. PMID: 19136271; PMCID: PMC2878130.
35. Yamada A, Oguchi K, Fukushima M, Imai Y, Kadoya M. Evaluation of 2-deoxy-2-[18F] fluoro-D-glucose positron emission tomography in gastric carcinoma: relation to histological subtypes, depth of tumor invasion, and glucose transporter-1 expression. *Ann Nucl Med*. 2006. 20:597–604.
36. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 133: 1710 –1715.

37. Scholzen, T., & Gerdes, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, 182(3), 311–322.
38. Ueda S, Tsuda H, Saeki T, et al. Early metabolic response to neoadjuvant letrozole, measured by FDG PET/CT, is correlated with a decrease in the Ki67 labeling index in patients with hormone receptor-positive primary breast cancer: a pilot study. *Breast Cancer*. 2011;18:299–308.
39. Han B, Lin S, Yu LJ, Wang RZ, Wang YY. Correlation of (1)(8)F-FDG PET activity with expressions of survivin, Ki67, and CD34 in non-small-cell lung cancer. *Nucl Med Commun*. 2009; 30:831–7
40. Shinohara, Y., Yamamoto, K., Kogure, K., Ichihara, J. and Terada, H. (1994). Steady state transcript levels of the type II hexokinase and type 1 glucose transporter in human tumor cells. *Cancer Lett*. 82, 27-32.
41. Aloj L, Caraco C, Jagoda E, Eckelman WC, Neumann RD. Glut-1 and hexokinase expression: relationship with 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake in A431 and T47D cells in culture. *Cancer Res*. 1999. 59:4709–4714.
42. Indrajit Chowdhury, Binu Tharakan, Ganapathy K. Bhat. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008 Sep;151(1):10-27. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.05.010. Epub 2008 Jul 3. PMID: 18602321.
43. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965. 64:31-49.
44. M.B. Amin, S.B. Edge, F.L. Greene, et al. AJCC Cancer Staging Manual (ed. 8), Springer, Cham, Switzerland; 2017.
45. Higashi T, Tamaki N, Honda T, et al. Expression of glucose transporters in human pancreatic tumors compared with increased FDG accumulation in PET study. *J Nucl Med*. 1997;38:1337–1344.
46. Zhao S, Kuge Y, Mochizuki T, Takahashi T, Nakada K, et al. Biologic correlates of intratumoral heterogeneity in 18F-FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase-II in experimental tumor. *J Nucl Med*. 2005; 46:675–682. [PubMed: 15809491]
47. Schreurs LMA, Smit JK, Pavlov K, Pultrum BB, Pruim J, Groen H, et al. Prognostic impact of clinicopathological features and expression of biomarkers related to 18F-FDG uptake in esophageal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(12):3751–7.

48. Higashi K, Ueda Y, Sakurai A, et al. Correlation of Glut-1 glucose transporter expression with (18)F-FDG uptake in non-small cell lung cancer. *Eur J Nucl Med.* (2000) 27:1778– 85. doi: 10.1007/s002590000367
49. Alakus H, Batur M, Schmidt M, et al. Variable 18F-fluorodeoxyglucose uptake in gastric cancer is associated with different levels of GLUT-1 expression. *Nucl Med Commun.* 2010; 31:532–8.
50. Kato H, Takita J, Miyazaki T, et al. Correlation of 18-F-fluorodeoxyglucose (FDG) accumulation with glucose transporter (Glut-1) expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2003;23(4):3263-72.
51. Westerterp M, Sloof GW, Hoekstra OS, et al. 18FDG uptake in oesophageal adenocarcinoma: linking biology and outcome. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008; 134:227–236.
52. Avril N, Menzel M, Dose J, et al. Glucose metabolism of breast cancer assessed by 18F-FDG PET: histologic and immunohistochemical tissue analysis. *J Nucl Med.* 2001;42:9–16.
53. Keyes JW. SUV: Standard uptake or silly useless value? *J. Nucl. Med.* 1995; 36:1836–1839.
54. Kameyama R, Yamamoto Y, Izuishi K, et al. Detection of gastric cancer using ¹⁸F-FLT PET: comparison with ¹⁸F-FDG PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2009; 36: 382.
55. Deng S-m, Zhang W, Zhang B, Chen Y-y, Li J-h, Wu Y-w. Correlation between the Uptake of 18F-Fluorodeoxyglucose (18F-FDG) and the Expression of Proliferation-Associated Antigen Ki-67 in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *PLos ONE.* 2015; 10(6): e0129028.
56. Takebayashi R, Izuishi K, Yamamoto Y, et al. [18F] Fluorodeoxyglucose accumulation as a biological marker of hypoxic status but not glucose transport ability in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2013; 32:34.
57. Kim M, Achmad A, Higuchi T, et al. Effects of intratumoral inflammatory process on 18F-FDG uptake: pathologic and comparative study with 18F-fluoro- α -methyltyrosine PET/CT in oral squamous cell carcinoma. *J Nucl Med.* 2015; 56:16–21.
58. Rempel A, Bannasch P, Mayer D. Differences in expression and intracellular distribution of hexokinase isoenzymes in rat liver cells of different transformation stages. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1219: 660-668

59. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells. Isolation, sequence, and activity of the promoter for type II hexokinase. *J Biol Chem.* 1995; 270:16918-16925.
60. O'Donoghue JA, Lewis JS, Pandit-Taskar N, et al. Pharmacokinetics, biodistribution, and radiation dosimetry for (89)Zr-trastuzumab in patients with esophagogastric cancer. *J Nucl Med.* 2018;59:161-166.
61. Niemeijer AN, Leung D, Huisman MC, et al. Whole body PD-1 and PD-L1 positron emission tomography in patients with non-small-cell lung cancer. *Nat Commun.* 2018;9:4664.
62. Sah, B., Owczarczyk, K., Siddique, M. Et al. Radiomics in esophageal and gastric cancer. *Abdom Radiol* 44, 2048-2058 (2019) <https://doi.org/10.1007/s00261-018-1724-8>.

9. ANEXOS

A. Registro na Plataforma Brasil

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP
---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de fatores celulares envolvidos na captação de 18F-FDG no carcinoma de esôfago e estômago

Pesquisador: Ulysses Ribeiro Junior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 48695415.5.0000.0065

Instituição Proponente: FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.247.107

Apresentação do Projeto:

O projeto descreve estudo retrospectivo, tema de Dissertação de Mestrado e a ser conduzido com recursos próprios. Com base na alta indicação de PET-FDG no manejo de neoplasias do aparelho digestório e na pouca disponibilidade desse método em nosso meio, o referido estudo visa correlacionar expressão de Glut-1, Ki-67, hexokinase e caspase-3 em células neoplásicas do AC e CEC de esôfago e no AC de estômago e com os valores do Standard UptakeValue (SUV) do PET-FDG e características clinicopatológicas obtidos de pacientes tratados no ICESP e HC-FMUSP. A proposta é atual e de interesse científico e seu planejamento metodológico adequado. Os pesquisadores envolvidos apresentam experiência na área em que o estudo se insere.

Objetivo da Pesquisa:

Correlacionar expressão de Glut-1, Ki-67, hexokinase e caspase-3 em células neoplásicas do AC e CEC de esôfago e no AC de estômago e com valores do Standard UptakeValue (SUV) do PET-FDG e características clinicopatológicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos envolvidos, por se tratar de estudo que envolve apenas material biológico humano (blocos de tecido tumoral), resultados de exames e prontuários, oriundos de pacientes já tratados no ICESP e HC-FMUSP. Seus dados podem oferecer subsídios para a melhor compreensão e seleção

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36	
Bairro: PACAEMBU	CEP: 01.246-903
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401	E-mail: cep.fm@usp.br

B. Aprovação pela Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

São Paulo, 08 de outubro de 2015.

Ilmos. Srs.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Junior

Pesquisador executante: Fernando Simionato Perrotta

Prezados Pesquisadores,

Atendendo á solicitação V.Sa., a **Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP**, em sua **199ª Reunião Ordinária de 08 de outubro de 2015**, analisou seu projeto de pesquisa **intitulado: ANÁLISE DE FATORES CELULARES ENVOLVIDOS NA CAPTAÇÃO DE 18F-FDG NO CARCINOMA DE ESÔFAGO E ESTÔMAGO**. Co-autores: Michele Tatiana Pereira Tomitão, Evelise Pellegrinelli Zaidan, Marina Alessandra Pereira, Evandro Sobroza de Melo, Rubens AA Sallum, Bruno Zilberstein, Marcelo Mester, Carlos Alberto Buchpiguel, Venancio Avancini Ferreira Alves, Ivan Ceconello. **Cadastro on-line: 14099.**

Situação: Aprovado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Tomas Navarro Rodriguez
Presidente da Comissão Ético-Científica do
Departamento de Gastroenterologia da FMUSP

C. Aprovação do Núcleo de Pesquisa do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP)

São Paulo, 20 de julho de 2015

Registro: NP 590/2015

Ref. Solicitação de execução de estudo: **Análise de fatores celulares envolvidos na captação de 18F-FDG no carcinoma de esôfago e estômago**

Pesquisador Responsável: Ulysses Ribeiro Junior
Pesquisador Executante: Fernando Simionato Perrotta

CONSIDERAÇÕES

Trata-se de uma pesquisa observacional com objetivo de identificar a expressão de Glut-1, Ki-67, hexokinase caspase-3 nas células neoplásicas do AC e CEC de esôfago e no AC de estômago e verificar a associação com os valores do Standard Uptake Value (SUV) do PET-FDG e com características clinicopatológicas.

Serão selecionados 120 pacientes com diagnóstico de CEC ou adenocarcinoma do esôfago e adenocarcinoma gástrico, histologicamente confirmados, tratados no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) ou no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) formam o grupo estudo da presente pesquisa.

O Trabalho será realizado no Laboratório de Investigação Médica (LIM) 14, com os pesquisadores responsáveis pelos custos da pesquisa.

RESPONSABILIDADES DO PESQUISADOR

- Iniciar as atividades do estudo somente após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP, segundo a Res. 466/12;
- Fornecer ao NP-ICESP uma cópia da Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa;
- Apresentar Relatórios Parciais/Final com ciência do Comitê de Ética em Pesquisa;
- Enviar Publicação, resultados e defesa de teste do estudo;

Informamos que sua solicitação foi DEFERIDA.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo M. Hoff
Diretor Geral

Prof. Dr. Paulo M. Hoff
Diretor Geral
ICESP

D. Participação do Laboratório de Investigação Médica – 14 (LIM 14)

São Paulo, 13 de abril de 2015.

Ao
Comitê de Ética em Pesquisa – FMUSP

Referência: Projeto de Pesquisa: “Análise de fatores celulares envolvidos na captação de 18F-FDG no carcinoma de esôfago e estômago”.

Assunto: Participação do Laboratório de Patologia - LIM-14

Investigador Principal: Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Junior

Instituição: Laboratório de Investigação Médica - LIM-14 Divisão de Anatomia Patológica HC - FMUSP

Prezados Senhores,

Informo que o Laboratório de Patologia (LIM-14) da Divisão de Anatomia Patológica – Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP concorda em participar do estudo citado.

Neste local será realizada a pesquisa imunohistoquímica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Evandro Sobroza de Mello;
Médico Patologista - CRM 95529
Laboratório de Patologia
ICESP

Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves
Responsável pelo Laboratório de Investigação Médica - LIM-14
Divisão de Anatomia Patológica HC - FMUSP

E. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: ☐ M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: ☐ M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Análise de fatores celulares envolvidos na captação de 18F-FDG no carcinoma de esôfago e estômago**

PESQUISADOR : Dr. Ulysses Ribeiro Jr.

CARGO/FUNÇÃO: Médico

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DE SÃO PAULO Nº 56.337

Versão 2.0 - 13/09/2015

Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP - 01246-000 - Tel.: 11 3893.2000 - www.icesp.org.br

F. Certificado de apresentação do pôster no 39th Congress of the European Association of Surgical Oncology

**39th Congress of the European Society
of Surgical Oncology**

9 – 11 October 2019, Rotterdam, The Netherlands

**esso
39**

Certificate of Presentation

The Congress Organisers hereby certify that

Fernando Perrotta

presented a poster presentation titled

**PET-CT in Gastric Adenocarcinoma: It is Always
Unuseful?**

at the

39th Congress of the European Society of Surgical Oncology
held in Rotterdam, The Netherlands, 9-11 October 2019

Dr. Tibor Kovacs
President &
Congress Scientific Chair

Prof. Cees Verhoef
Congress Chair

Prof. Sergio Sandrucci
Education &
Training Committee Chair