

AVALIAÇÃO DA IMUNO-EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS P53, E-CADERINA, COX-2 E EGFR NO PROGNÓSTICO DO CARCINOMA DE VESÍCULA BILIAR RESSECADO

Evaluation of P53, E-cadherin, Cox-2, and EGFR protein immunexpression on prognostic of resected gallbladder carcinoma

Sergio Renato PAIS-COSTA², José Francisco de Matos FARAH^{1,2}, Ricardo ARTIGIANI-NETO²,
Sandro José MARTINS², Alberto GOLDENBERG²

Trabalho realizado no ¹Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo "Francisco Morato de Oliveira", São Paulo, SP, Brasil e ²Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil.

DESCRITORES - Neoplasias biliares. Adenocarcinoma. Marcadores biológicos de tumor. Antígenos CD. Prognóstico.

Correspondência:

Sergio Renato Pais-Costa
E-mail srenatopaiscosta@hotmail.com

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 13/11/2013
Aceito para publicação: 27/02/2014

HEADINGS - Biliary neoplasms. Adenocarcinoma. Tumor biological markers. Antigens CD. Prognosis.

RESUMO – Racional: O carcinoma de vesícula biliar apresenta mau prognóstico. O tratamento de escolha é a ressecção cirúrgica que está associado à alta morbimortalidade. O melhor conhecimento de fatores prognósticos pode resultar em melhor seleção dos doentes para o tratamento cirúrgico e multimodal. **Objetivos:** Avaliar a imunexpressão tecidual das proteínas P53, E-caderina, Cox-2 e EGFR e correlacionar com a sobrevida do adenocarcinoma de vesícula biliar ressecado. **Método:** Os dados clínicos, laboratoriais, cirúrgicos e anatomopatológicos de uma série de doentes operados por adenocarcinoma de vesícula biliar foram coletados. A casuística total foi de 42 doentes. A mediana de idade foi de 72 anos (35-87). Foram sete homens e 35 mulheres. A distribuição da lesão de acordo com TNM foi a seguinte: T1 (n=2), T2 (n=5), T3 (n=31), T4 (n=4). Vinte três doentes realizaram ressecção radical (R0) enquanto 19 operação paliativa (R1-R2). Um bloco de tissue microarray foi confeccionado com tecido neoplásico de cada doente. para avaliação da imunexpressão das proteínas P53, E-Caderina, COX-2 e EGFR. Esses achados foram correlacionados com prognóstico final dos doentes. **Resultados:** A sobrevida estimada em cinco anos foi de 28%. A mediana de sobrevida global foi de oito meses. Apenas a imunexpressão da proteína EGFR foi considerada variável independente no prognóstico dos doentes. **Conclusão:** Pior prognóstico teve relação com a imunexpressão aumentada da proteína EGFR no tecido tumoral.

ABSTRACT – Background: Gallbladder carcinoma presents a dismal prognosis. Choice treatment is surgical resection that is associated a high levels of both morbidity and mortality. Best knowledge of prognostic factors may result a better selection of patients either for surgical or multimodal treatment. **Aim:** To evaluate tecidual immunexpression of P53, E-cadherin, Cox-2, and EGFR proteins and to correlate these findings with resected gallbladder adenocarcinoma survival. **Methods:** Clinical, laboratorial, surgical, and anatomopathological reports of a series of gallbladder adenocarcinoma patients were collected by individualized questionnaire. Total sample was 42 patients. Median of age was 72 years (35-87). There were seven men and 35 women. Lesion distribution in according TNM state was the following: T1 (n=2), T2 (n=5), T3 (n=31), T4 (n=4). Twenty-three patients underwent radical resection (R0), while 19 palliative surgery (R1-R2). A block of tissue microarray with neoplastic tissue of each patient was confected. It was performed evaluation of P53, E-Cadherine, COX-2, and EGFR proteins immunexpression. These findings were correlated with overall survival. **Results:** Five-year survival was 28%. The median of global survival was eight months. Only immunexpression of EGFR protein was considered independent variable at multivariate analysis. **Conclusion:** Final prognosis was influenced by over-expression of EGFR protein in tumoral tissue.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de vesícula biliar (CVB) representa o sétimo câncer mais comum do trato digestório²². O tratamento curativo tem sido a extirpação cirúrgica e embora os tumores precoces possam ser tratados por colecistectomia simples, a grande maioria dos casos é ainda composta de casos avançados, onde hepatectomia e linfadenectomia regional tornam-se imprescindíveis para o aumento de sobrevida ou mesmo cura^{7,18}. Embora tenha se observado melhoria dos resultados cirúrgicos nas últimas décadas, a mortalidade pós-operatória específica do CVB tem permanecido relativamente alta quando comparada outras neoplasias gastrointestinais¹⁸. Como o ele é doença de idosos que se apresentam com múltiplas doenças associadas, mesmo atualmente tem-se observado alta letalidade pós-operatória²⁰.

O melhor conhecimento de seus fatores prognósticos, assim como de sua biologia tumoral parecem pertinentes, haja vista que poderiam se traduzir em seleção mais adequada dos enfermos que se beneficiariam com tratamento cirúrgico mais agressivo. Dessa maneira poderiam ser poupados riscos e gastos desnecessários, além de melhor auxílio na triagem do seu tratamento multimodal. Diversos fatores prognósticos têm sido estudados, dentre eles os mais importantes tem sido os clinicodemográficos, laboratoriais, cirúrgicos e histopatológicos^{7,18,20,29}.

Em estudo prévio dos autores²⁰, foram identificados alguns desses fatores; no entanto, não foi estudada a imunopressão de proteínas tissulares no tecido tumoral. Na forma de “biomarcadores”, essas proteínas poderiam ampliar ainda mais o espectro de conhecimento de seus fatores prognósticos e, além disso, colaborarem de alguma maneira para estudo de drogas específicas capazes de atuar em determinados receptores. Recentemente em relação ao prognóstico do CVB pouco se tem publicado na implicação prognóstica das proteínas P53^{1,2,9,23,25}, E-caderina (E-CD)^{11,24}, Cicloxigenase 2 (COX-2)^{10,14} e Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)^{4,6,8,26}.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a imunopressão tecidual das proteínas P53, E-CD, COX-2 EGFR no tecido tumoral e correlacioná-las com fatores clinicoepidemiológicos, além de avaliar seu impacto na sobrevivência de doentes com diagnóstico de CVB ressecado em um centro de referência terciário para tratamento de câncer.

MÉTODOS

Foi realizada análise retrospectiva de diferentes fatores prognósticos de 42 doentes tratados no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo “Francisco Morato de Oliveira” (HSPE-FMO) com diagnóstico confirmado histologicamente de adenocarcinoma de vesícula biliar. O período compreendido pelo estudo foi de janeiro de 1995 e janeiro de 2006. Esse estudo foi aprovado respectivamente por ambos comitês de ética em pesquisa do HSPE-FMO sob o número de 121/09 e da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob o número 880/09. Todos doentes foram respectivamente identificados pelos registros de câncer do hospital (HSPE-FMO), além do Serviço de Patologia. Foram incluídos apenas doentes com adenocarcinoma, todos os outros subtipos histológicos foram excluídos da amostra. Somente doentes que seguiram tratamento cirúrgico foram considerados para análise final. Tanto os doentes submetidos à operação curativa (R0) quanto os submetidos à paliativas (R1-R2) foram incluídos nessa amostra. Doentes com doença metastática também foram excluídos dessa amostra. Toda informação extraída por meio de fichário individualizado com protocolo foi utilizada para identificação de possíveis fatores prognósticos e consistiram na análise das seguintes variáveis: 1) clínicas (idade, sexo e índice de massa corpórea - IMC); 2) laboratoriais (níveis séricos de albumina, bilirrubinas e de marcadores tumorais – Ca 19,9 e CEA); 3) cirúrgicas (tipo de operação, linfadenectomia, perfuração da peça e transfusão); 4) anatomopatológicas (localização, tipo macroscópico, diagnóstico incidental, estágio TNM, grau de diferenciação, margens cirúrgicas – radicalidade, embolização linfática ou vascular, invasão perineural, processo inflamatório peri-tumoral e presença de necrose); e 5) imunistoquímicas, ou seja, a imunopressão em tecido tumoral das proteínas P53, E-caderina, COX-2 e EGFR. A sétima edição do manual de estadiamento da AJCC-TNM foi utilizada.

Quarenta e dois doentes foram identificados e considerados a amostra desse estudo. Foram 35 mulheres e sete homens. A mediana de idade foi de 72 anos (34- 87). Quarenta doentes eram da raça caucasiana, enquanto dois da negra. A mediana do índice de massa corpórea (IMC) dos doentes foi de 30 kg/m² (18- 38). As variáveis clínicas estudadas estão demonstradas na Tabela 1.

A dosagem de albumina, bilirrubinas e marcadores tumorais foi realizada no período pré-operatório. A distribuição das dosagens séricas dos exames laboratoriais estão demonstradas na Tabela 2.

TABELA 1 - Variáveis clínicas

Número de doentes	42
Gênero	
Masculino	7
Feminino	35
Idade (anos)	
Mediana	72
Variação	(34-87)
Raça	
Caucasiana	40
Não-Caucasiana	2
IMC (kgs/m ²)	
Mediana	30
Variação	(18-38)
Classificação ASA	
ASA I	22
ASA II	12
ASA III	8
Características clínicas	
Cólica biliar	14
Icterícia	13
Colecistite aguda	12
Perda ponderal	5
Colangite aguda	3
Pancreatite aguda	2
Modo de apresentação	
Incidental	34
Não-incidental	8

TABELA 2 – Variáveis laboratoriais

	Mediana (variação)
Bilirrubinas (ng/dl)	0,7 (0,2-28)
Albumina (ng/dl)	3,5 (1,3-4,7)
CEA (ng/dl)	4,5 (0,2-535)
CA 19.9 (ng/dl)	35,6 (1,2-24150)

Todos os doentes dessa série apresentavam colecistolitíase e foram submetidos à colecistectomia sendo que em 37 a via de acesso foi aberta, enquanto em cinco laparoscópica. Em 15 doentes, a colecistectomia foi realizada como procedimento de urgência devido à complicações da colecistolitíase em si, como colecistite aguda (n=12) ou colangite (n=3). Em 19 doentes houve perfuração da vesícula biliar sendo em 14 casos em operação de urgência, enquanto em cinco em colecistectomias eletivas. Vinte e três doentes realizaram hepatectomia complementar além da colecistectomia. Em 20 enfermos, a bissegmentectomia dos segmentos IVB e V foi a ressecção hepática realizada, enquanto em três foi hepatectomia direita ampliada para segmento IV.

A hepatectomia foi realizada no mesmo ato da colecistectomia em oito doentes (todas com diagnóstico pré-operatório por exame de imagem). Em contrapartida, em 15 doentes foi feita em segunda intervenção, ou seja, após a colecistectomia (sendo a mediana de tempo da segunda intervenção foi de 30 dias - 25-120). Dos 12 doentes operados pela primeira vez em regime de urgência por colecistite aguda, cinco realizaram hepatectomia complementar e outros sete não seguiram devido à óbito pós-operatório (n=1), falta de condições clínicas para reintervenção (n=4) ou por se negarem a realizar novo procedimento cirúrgico (n=2). Todos os três casos operados por colangite na urgência (colecistectomia com drenagem a Kehr) devido a falha de seu tratamento por via endoscópica (CPRE), não realizaram ressecção hepática “a posteriori”, haja vista que todos faleceram por ocasião dessas operações. Em 13 doentes, além da hepatectomia, foi realizada ressecção da via biliar principal supra-pancreática até a confluência dos ductos hepáticos associada à confecção de anastomose biliodigestiva. As indicações da ressecção da via biliar foram margem comprometida do ducto cístico (n=8) ou invasão macroscópica do hepatocolédoco (n=2). Dois doentes

ainda submetem-se cada um à colectomia segmentar direita (n=1) e gastroenteroanastomose (n=1).

Foi realizada linfadenectomia hilar em 27 doentes. Destes, 25 realizaram operações com intenção curativa, enquanto outros dois foram operados paliativamente. O tempo cirúrgico variou de 60 a 390 min com mediana de 220 min. As variáveis cirúrgicas estão demonstradas na Tabela 3. O tempo de internação variou de dois a 45 dias com mediana de 15. Trinta e um doentes foram transfundidos. Observou-se perfuração da vesícula biliar em 19 doentes no intra-operatório. Houve complicações gerais pós-operatórias em 22 doentes (morbidade de 52%) sendo que em oito doentes houve necessidade de reoperação (20%). A complicação mais comum foi fístula biliar (n=10) seguida de pneumonia (n=9) e sepsis (n=7).

A mortalidade no pós-operatório imediato (até um mês) foi de 12% (n=5). As causas de óbito foram: complicações infecciosas com sepsis (n= 4) e infarto agudo do miocárdio (n=1). Desses óbitos, quatro tinham sido operados em regime de urgência devido à colangite (n=3) ou colecistite aguda (n=1) sendo que em nenhum deles foi realizado qualquer tipo de hepatectomia. Apenas um doente que foi submetido à hepatectomia direita de maneira eletiva foi a óbito por choque séptico no pós-operatório devido à sequência de hemorragia, abscesso hepático e reoperação. Somente um doente dessa série em estágio T3N1M0 foi submetido à quimioterapia adjuvante (último dessa amostra).

TABELA 3 - Variáveis anatomopatológicas

Numero de doentes	42
Grau do tumor	
I	18
II/III	24
Estadio do tumor	
T1	2
T2	5
T3	31
T4	4
Características macroscópicas	
Local da lesão:	
Fundo	29
Colo	0
Infundibulo	8
Difuso	5
Tipo macroscópico	
Papilifero-fungoide	11
Nodular	6
Infiltrativo	21
Ulcerado	4
Características microscópicas	
Invasão peri-neural	27
Embolização vascular	26
Embolização linfática	26
Inflamação peri-tumoral	13
Necrose	23
Perfuração	19
Linfonodos	
No	17
N1	19
Nx	6

O tumor foi encontrado mais frequentemente na porção fúndica da víscera (n=29), no infundíbulo (n=8) e difuso (n=5). O tipo macroscópico mais comum foi o esquizoideinfiltrativo (n=21) seguido do vegetantexofítico (n=11), nodular (n=6) e infiltrativoulcerado (n=4). Em relação à radicalidade das operações baseada nas margens cirúrgicas houve a seguinte distribuição: R0 (n=20), R1 (n=16) e R2 (n=6). Os tumores operados foram estadiados de acordo com a classificação da sétima edição da AJCC-TNM (2010) em relação ao grau de penetração na parede do órgão e

ao acometimento linfonodal. A distribuição em relação ao T foi a seguinte: T3 (n=31), T2 (n=5), T4 (n=4) e T1 (n=2). Dezenove doentes apresentavam linfonodos comprometidos. Em relação ao grau de diferenciação celular dos tumores, observou-se a seguinte distribuição: bem diferenciado (n=5), moderadamente diferenciado (n=18) e pouco diferenciado (n=19). Em relação as variáveis microscópicas observadas na microscopia (HE), elas estão demonstradas na Tabela 4.

TABELA 4 - Análise multivariada: modelo de riscos proporcionais de Cox

	p	Odds Ratio	CI 95% to Exp(B)	
			Inferior	Superior
Albumina (< 3ng/dl)	0,006	21,943	2,472	1947,51
Perfuração da vesícula biliar	0,000	20,712	3,864	111,010
Necrose	0,000	20,712	3,864	111,010
Imunoexpressão EGFR	0,000	8,903	2,653	29,875

Para análise imunoistoquímica foram utilizados quatro biomarcadores pela técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase com os anticorpos monoclonais P53, E-Caderina, COX-2 e EGFR. Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais humanos: anti-P53 (Clone DO-7, Dako corporation, Denmark), anti-E-caderina (clone NCL- E-Cad P, Novocastra Corporation, Denmark) ambos na diluição de 1:40; além do anti-COX-2 (Clone CX-294, Dako corporation, Denmark) e Anti-EGFR (Clone EP38Y, Dako Corporation, Denmark), na diluição de 1:1000. Os dois primeiros foram realizados no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de São Paulo, enquanto os demais no Laboratório de Patologia do Hospital do Câncer de São Paulo (Hospital A.C. Camargo). Para interpretação do painel imunoistoquímico foi considerado positivo para os anticorpos em estudo o aparecimento da cor marrom na área citoplasmática ou nuclear da célula. Foram usadas como controle positivo lâminas contendo cortes histológicos comprovados anteriormente como positivos para os marcadores a serem utilizados. A avaliação da imunoexpressão das proteínas foi realizada no tecido tumoral e na mucosa normal obtida das margens cirúrgicas adjacentes ao tumor. Avaliou-se o percentual de células com reação positiva (400x) e aquelas com coloração duvidosa e as não-tumorais foram excluídas da avaliação dos marcadores. Nas lâminas usadas como controle negativo, subtraiu-se o anticorpo primário da reação.

Na avaliação da proteína P53 utilizou-se o método preconizado por Wee et al.³⁰ onde se consideraram a intensidade da marcação da coloração e o número de células positivas. A intensidade da coloração variou de uma escala de 0 a 3, sendo o 0 considerado negativo, 1 coloração fraca, 2 coloração intermediária e 3 coloração forte. Em relação ao número de células positivas à escala também variou de 0 a 3, onde seguiu-se a seguinte distribuição: 0 correspondeu a nenhuma das células neoplásicas coradas, 1 correspondeu até 10 %, 2 de 10 a 50% e 3 correspondeu a mais de 50% das células neoplásicas coradas. O escore definitivo foi dado pelo número da intensidade de coloração multiplicado pelo número referente ao índice de células coradas. Dessa maneira o grupo negativo (0) foi definido quando resultado do produto foi 0, de 1 até 3 foi considerado fracamente positivo (1+), 4-5 foi moderadamente positivo (2+) e igual ou maior que 6 foi fortemente positivo (3+).

Na avaliação da proteína E-Caderina utilizou-se o método preconizado por Zhang et al.²⁹ onde também consideraram-se a intensidade da marcação da coloração e o número de células positivas. A primeira, variou de uma escala de 0 a 3, sendo o 0 considerado negativo, 1 coloração fraca, 2 coloração intermediária e 3 coloração forte. Na segunda, para o número de células positivas a escala também variou de 0 a 3, onde seguiu-se a seguinte distribuição: 0 correspondeu a

menos de 5 % das células neoplásicas coradas, 1 de 5-25%, 2 de 26-50% e 3 a mais de 50%. O escore definitivo foi dado pelo número da intensidade de coloração multiplicado pelo número referente ao índice de células coradas. Dessa maneira o grupo negativo (0) foi definido quando resultado do produto foi 0; de 1 até 3 fracamente positivo (1+); 4-5 moderadamente positivo (2+); e igual ou maior que 6 fortemente positivo (3+).

Já na avaliação da proteína COX-2 foi preconizado o método descrito por Kim et al.¹⁰ onde foi considerado apenas a intensidade da marcação da coloração em escala de 0 a 3, sendo o 0 considerado negativo, 1+ coloração fraca, 2+ coloração intermediária e 3+ coloração forte.

Na avaliação da proteína EGFR, o método foi baseado também na intensidade da marcação das células tumorais que foi novamente dividida em quatro categorias de acordo com estudo descrito por Kountarakis et al.¹² em uma escala de coloração que variou de 0 a 3. A distribuição considerada foi à seguinte: 0 negativo onde nenhuma marcação ou marcação fraca de menos de 10 % das células tumorais; 1 + marcação com intensidade fraca, em parte de seu citoplasma, em mais de 10 % das células; 2+ marcação completa do citoplasma de intensidade fraca a moderada em mais de 10 % das células; e 3 + marcação de intensidade forte em mais de 10 % das células (Figura 1).

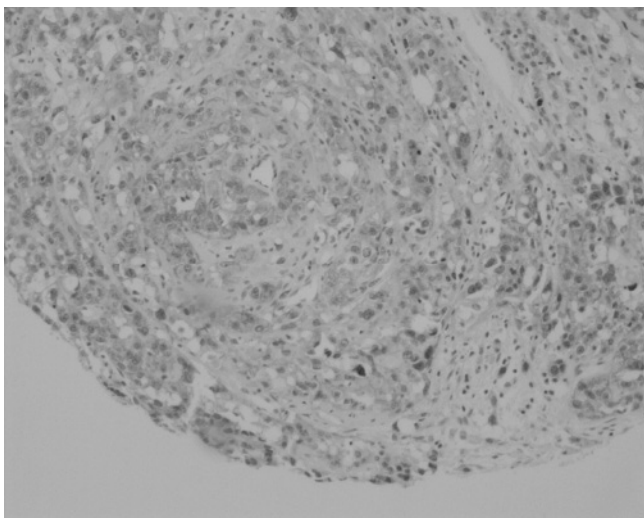


FIGURA 1 - Fotomicrografia de mucosa vesícula biliar neoplásica com imunopositividade para o marcador EGFR (Imunohistoquímica, 100x)

Dessa maneira, em relação aos achados de imunohistoquímica foi possível avaliar a imunopositividade tecidual da proteína P53 em 41 doentes. A distribuição segundo o escore de 0 a 3 foi a seguinte: 0 + = 4 casos, 1 + = 10 casos, 2+ = 6 casos e 3+ = 21 casos. A imunopositividade tecidual de proteína E-Caderina foi possível de ser avaliada em 40 doentes. A distribuição segundo o escore de 0 a 3 foi a seguinte: 0 + = 9 casos, 1 + = 15 casos, 2+ = 12 casos e 3+ = 4 casos. A imunopositividade tecidual de proteína COX-2 foi possível de ser avaliada em 40 doentes. A distribuição segundo o escore de 0 a 3 foi a seguinte: 0 + = 9 casos, 1 + = 15 casos, 2+ = 12 casos e 3+ = 4 casos. Já a imunopositividade tecidual de proteína EGFR foi possível de ser avaliada em 39 doentes. A distribuição segundo o escore de 0 a 3 foi a seguinte: 0 + = 19 casos, 1 + = 9 casos, 2+ = 7 casos e 3+ = 4 casos.

Para avaliação da sobrevida global foi considerada a data da operação até o óbito por câncer ou última consulta de seguimento. O seguimento ambulatorial foi considerado até último retorno ou morte. Os critérios prognósticos foram representados pelos seguintes parâmetros: ocorrência de recidivas, mortalidade global, sobrevivência e tempo livre

de doença. À ocorrência de recidivas nos doentes operados com intenção curativa foi constatada por meio de exames complementares ou por laparotomia.

Para análise estatística, as curvas de sobrevida foram estimadas usando o método de Kaplan-Meier e comparadas se utilizando o teste de Log-rank. O modelo de riscos proporcionais de Cox foi realizado para determinação das variáveis significantes. Para análise entre as diferentes variáveis entre si foi realizado o Teste de correlação não-paramétrica de Spearman. Foi considerado para análise valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significante. Todas as análises estatísticas foram realizadas com a utilização do software PASW statistics, versão 18 (SPSS Inc, 2009).

RESULTADOS

A mortalidade global dos 42 enfermos com seguimento completo até o final do estudo foi de 88 % (n=37). Um doente teve causa de óbito não relacionada com a doença (infarto agudo do miocárdio aos 13 meses de seguimento) e não houve perda de seguimento na presente amostra. O índice de sobrevivência foi dividido em períodos mensais, onde se observou a seguinte distribuição: sobrevida até três meses (n=11); entre quatro a seis meses (n=9); entre sete a 12 meses (n=12); entre 13 e 24 meses (n=4); e mais que 25 meses (n=8).

Em relação ao tempo livre de doença, a maioria dos doentes submetidos à operação evoluiu com recidiva (90%) e apenas quatro (10%) não (o tempo de seguimento variou de 18 até 120 meses). Dos doentes que apresentaram recidiva, o sítio mais frequente foi o peritônio (n=12) seguido do fígado (n=8); em sete doentes a recidiva foi considerada múltipla.

A média do tempo de seguimento dos doentes foi de 25,4 meses (1-120). Em relação aos doentes operados R1, a média de seguimento foi de 36,4 meses (1-120). A mediana global de sobrevida nessa série foi de oito meses, enquanto a global em cinco anos, estimada pela Curva de Kaplan-Meier, foi de 26,2% (Figura 2).

Análise dos fatores prognósticos

Vinte e seis variáveis foram consideradas para análise univariada como possíveis fatores prognósticos. Dentre elas, apenas as que apresentaram significância menor que 0,1 foram triadas para análise multivariada. Foram estatisticamente significantes na análise univariada as seguintes variáveis: albumina, CEA, Ca 19,9, radicalidade, perfuração da peça, transfusão, localização do tumor, estágio T e N, grau de diferenciação, presença de necrose, embolização linfaticovascular, invasão perineural, imunopositividade da proteínas P53, E-CD e EGFR. No entanto, ao ser realizada a análise multivariada, apenas quatro variáveis se mantiveram como independentes em relação ao prognóstico final: nível sérico de albumina, perfuração da peça, necrose e EGFR (Tabela 4). O gráfico de sobrevida (Kaplan-Meier), segundo as diferentes expressões da proteína EGFR, está demonstrado na Figura 2.

Correlação não-paramétrica dos biomarcadores

Em relação a imunopositividade da proteína P53 foi observado correlação direta com a de EGFR ($p=0,002$) e o estágio N ($p=0,0011$). Já em relação a imunopositividade da proteína E-CD foi vista correlação direta com o grau histológico ($p=0,015$) e padrão histológico esquizoide/infiltrativo ($p=0,03$). Em contrapartida, em relação a imunopositividade da proteína COX-2 foi observado correlação direta com níveis altos de bilirrubinas ($p=0,034$), com a localização da neoplasia no fundo da vesícula ($p=0,012$) e com presença de necrose ($p=0,002$). Finalmente, em relação à imunopositividade da proteína EGFR foi observado correlação direta com os níveis séricos de marcadores tumorais CEA ($p=0,004$) e CA 19,9 ($p=0,016$), além dos estadiamentos T ($p=0,016$) e N ($p=0,029$).

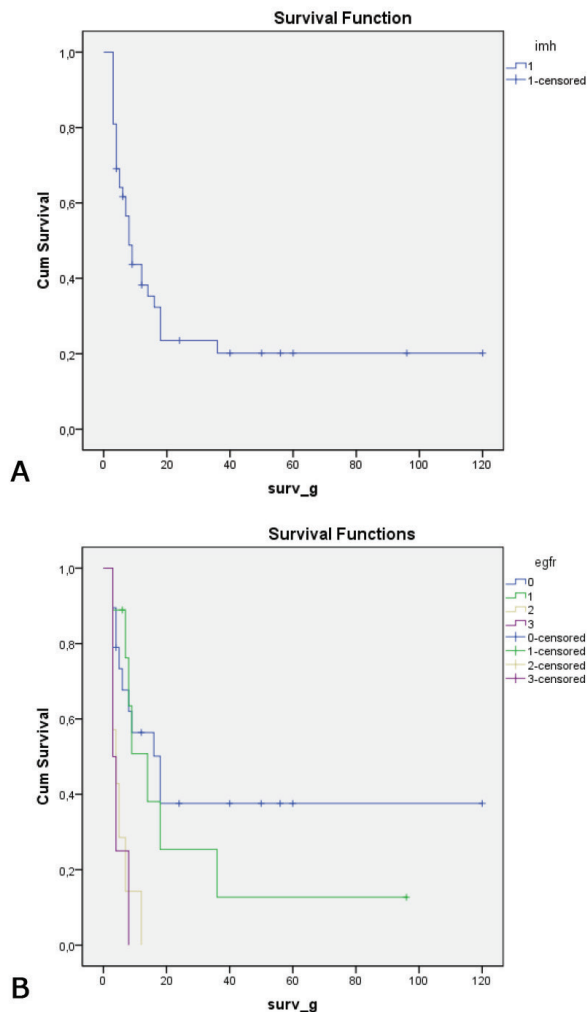


FIGURA 2 - A) Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) da amostra global; B) Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) segundo a imunopositividade de EGFR

DISCUSSÃO

Desde a primeira publicação realizada por Kamel et al.⁵ em 1993 para se avaliar por imunohistoquímica a presença de expressão da proteína p53 no CVB, pouco se tem estudado sobre esse assunto, e os achados bastante variáveis. Além disso, tem-se observado resultados controversos em relação à associação dessa mutação com o próprio prognóstico dos portadores^{1,2,23,25}.

Rocha et al.²⁵ em casuística de 60 doentes no Brasil encontraram índice de positividade de 56,5% bem próximo ao achado no presente estudo. Segundo estes autores, a positividade de achado da imunopositividade da proteína p53 tem variado entre 36,9-95%. As variações em diferentes casuísticas podem ser explicadas por situações específicas como o tipo de anticorpo utilizado, amostra de estudo e a própria maneira utilizada na classificação. Casos mais avançados tendem a ter maior positividade do que os precoces, sugerindo que a imunopositividade da proteína P53 no CVB seja associada a um evento tardio na carcinogênese²³. Roa et al.²³ em casuística de 191 casos, onde 45 % da amostra expressavam o P53, observaram maior frequência da expressão nas lesões avançadas (n=122) do que nas precoces (n=22). No entanto, devido à pequena casuística de lesões precoces não puderam afirmar com certeza esta correlação. O fato de ocorrer maior imunopositividade em casos avançados pode sugerir, como observado na presente casuística, maior associação ao estadiamento N (observado na correlação não-paramétrica de Spearman) onde a variável N

foi associada com a imunopositividade de P53. Talvez esse achado possa estar correlacionado com estadiamento T3 ou T4, haja vista que esses casos foram a maioria absoluta da presente casuística e sabidamente apresentam maior grau de comprometimento linfonodal que tumores T2 ou T1.

Na avaliação prognóstica final de sobrevida, encontrou-se correlação prognóstica da expressão de P53 apenas na análise univariada; porém, essa associação não se manteve na multivariada. Tanto Rocha et al.²⁵ quanto Ajiki et al.¹ também não encontraram correlação final com a sobrevida, mas semelhante ao presente achado as séries eram fundamentalmente composta de casos avançados. No entanto, Roa et al.²³ encontraram sim correlação prognóstica com a imunopositividade de P53. Assim novos estudos devem ser realizados tentar identificar se a expressão de P53 está ou não associada ao prognóstico final do CVB, independentemente pelo fato de estar associada aos estádios mais avançados, como T3, T4 ou N+.

Na presente amostra houve correlação direta pelo teste de Spearman entre a imunopositividade da proteína P53 com a da proteína EGFR. Essa associação permanece pouco entendida, embora alguns estudos *in vitro* tenham demonstrado papel importante no gene supressor de tumor P53 no controle da angiogênese tumoral¹⁷. Talvez, como a alta expressão de P53 pode estar associada aos estádios mais avançados e com comportamentos biológicos agressivos, ocorra maior tendência de tumores com perfil de maior expressão de EGFR, haja vista que se trata de proteína importante na maior invasão local e metastatização. No entanto, no CVB não tem sido observado tal associação. Em contrapartida, no carcinoma papilífero de tireóide Chen et al.³ observaram correlação entre a imunopositividade da proteína P53 com a da EGFR, ou seja, houve co-superexpressão que também coincidiu com a presença de linfonodos comprometidos, o tamanho do tumor e estadiamentos mais avançados.

Também no presente estudo houve correlação entre a proteína P53 com comprometimento linfonodal. Ajiki et al.¹ não encontraram correlação entre a expressão de P53 e a disseminação linfonodal. No entanto, mais recentemente, Shu et al.²⁷ encontraram também a correlação entre a expressão da proteína P53 no CVB com metástases linfonodais; mas, ao contrário do que foi observado no presente estudo, estes autores observaram ainda correlação entre a expressão positiva e o pior prognóstico final.

As caderinas fazem parte das moléculas de adesão que são fundamentais para o processo de invasão tecidual e metastatização. Existe escassa informação a respeito da implicação prognóstica da E-CD em relação ao CVB. Chang et al.² em casuística de 139 doentes com CVB encontraram alta expressão de E-CD em 96 doentes e diferença de mediana de sobrevida de 14 meses entre os doentes com e sem expressão dessa proteína. Na análise multivariada, a alta expressão de E-Caderina foi fator protetor independente ($p=0,009$). Adicionalmente, na correlação não-paramétrica houve associação com o grau histológico, o estágio M e T. Ou seja, quanto menor a expressão tecidual da E-caderina maior proporção de tumores indiferenciados, de metástases (M) e espessura de invasão da víscera (T). No entanto, no presente estudo não foi achado qualquer correlação prognóstica entre a imunopositividade de E-CD com a sobrevida, assim como em Roa et al.²⁴. Houve correlação prognóstica apenas na univariada, e que não se manteve na univariada talvez pelo tamanho amostral. Em contrapartida, constatou-se associação entre a expressão de e-caderina com o grau histológico e padrão esquisitoinfiltrativo.

Evidências atuais sugerem que o aumento de prostaglandinas via super-expressão de COX2 tem sido encontradas no crescimento de diferentes neoplasias humanas do trato digestório como cólon, estômago, esôfago e menos reconhecidamente no CVB¹⁰. Kim et al.¹¹ em amostra coreana de 67 casos de CVB observaram associação com

a superexpressão da COX-2 tanto com a sobrevida global quanto com a sobrevida livre de doença. Esses autores inclusive também encontraram correlação com fatores sabidamente de mau prognóstico, como invasão vascular ($p < 0,011$), linfática ($p < 0,001$) e perineural ($p < 0,001$), estadiamento TNM ($p = 0,001$) e morfologia não-papilífera ($p = 0,003$). Assim como em Legan et al.¹⁴ com casuística de 56 casos de CVB, não se observou nesse estudo associação com a sobrevida global. Na casuística deste autor, 29 doentes (51%) apresentaram imunoposição positiva ao COX-2. A mediana de sobrevida observada naqueles com expressão positiva foi 10,5 meses contra 18,3 meses dos com expressão negativa ($p = 0,06$). No presente estudo, a imunoposição foi considerada positiva em 16 doentes (40%) e não houve associação com a sobrevida ($p = 0,289$). No entanto, a variável em questão foi associada com a presença de necrose e com tumores com localização fúndica na vesícula. Embora não tenha sido encontrada essas associações na literatura, em relação a necrose há associação lógica, haja vista que a expressão de COX-2 tem sido relacionada com marcadores de angiogênese e neoformação vascular, além de hipóxia tecidual que podem estar associados à necrose.

EGFR e HER2 são receptores de tirosina quinase decodificados por proto-oncogenes. Fatores de crescimento, como o de crescimento epidérmico, se ligam a esses receptores em seu domínio de ligação extracelular e iniciam cascatas de sinalização intracelulares, o que leva à proliferação de células tumorais, migração, invasão, resistência à apoptose e angiogênese. Em um modelo de cancerização experimental alta proporção de ErbB-2(HER2) em ratos transgênicos desenvolveram CVB, o que sugere papel da sinalização do ErbB-2 na carcinogênese biliar^{17,28}.

De maneira geral, a super-expressão de EGFR e HER2 em células tumorais tem sido associada com prognóstico pífio; no entanto, paralelamente oferece opção terapêutica - denominada de terapia-alvo - utilizando medicações específicas cujo alvo são esses receptores^{15,21}. Atualmente, poucos estudos têm sido feitos para avaliar a imunoposição do EGFR no CVB, e variação de positividade imunistoquímica tem variado de 16-100%^{4,6,8,13,15,21,26}. A super-expressão (2+ e 3+) da presente amostra de 28 % foi próxima ao valor encontrado por Hader et al.⁴, assim como Pignhochino et al.²¹ e representou cerca de um terço do total de toda a sua casuística.

Lee & Pirdas¹³ em 1995 foram os primeiros a descrever a associação de receptores de membrana EGFR no CVB e demais tumores da via biliar, além da sua correlação com a displasia de vesícula biliar e colecistite crônica calculosa. Nesse estudo demonstraram 100% de super-expressão em uma pequena amostra de 13 doentes, o que levantou a hipótese dessa possível correlação. Segundo Leone et al.¹⁵, a inflamação crônica biliar e colestatase levam à produção de citocinas e radicais livres, que por sua vez causam lesão celular e dano irreversível ao DNA. Esse processo leva a transformação maligna dos colangiócitos. Além disso, a presença de ácidos biliares na colestatase crônica funcionalmente ativa a cascata do EGFR via transformação do fator de crescimento alfa levando à ativação das vias que promovem sobrevivência celular, proliferação e inibição da apoptose, que representam os processos mais importantes característicos da colangiocarcinogênese. Assim ao que se indica, existe íntima relação na super-expressão de EGFR com a carcinogênese no CVB.

Kawamoto et al.⁸ em casuística japonesa de 77 casos de CVB observaram alta expressão em 16%, o que leva a crer que diferenças em determinadas amostras devam ocorrer por motivos regionais, epidemiológicos, do uso de reagentes ou ainda classificações diferentes entre os grupos. Posteriormente, Kaufman et al.⁶ em pequena amostra americana de 16 doentes observaram a super-expressão em 75%; todos com imunoposição 3 + apresentaram-se como tumores indiferenciados. Em contrapartida, naqueles com imunoposição 1+ houve número maior de tumores

diferenciados. Os doentes com maior expressão EGFR apresentaram menor sobrevida, o que sugeriu pior prognóstico, embora não totalmente passível dessa conclusão em virtude da pequena amostra. Recentemente, Sergeant et al.²⁶ ao avaliar diferentes biomarcadores de hipóxia (VEGF, HIF1alfa, GLUT1, GLUT3, CA9 e EGFR) no CVB em estudo com 34 doentes, demonstraram alta expressão em metade desses casos. A alta expressão de EGFR foi associada na análise multivariada com a baixa sobrevida global além de ser considerada como variável independente ($p = 0,04$). Doentes com alta expressão de EGFR (>50%) apresentaram mediana de sobrevida de apenas 3,7 meses contra 15,8 meses naqueles com imunoposição inferior a 50 %. O risco de morte nos doentes com EGFR superexpresso foi de duas vezes e meia maior do que no grupo controle (Odds-Ratio=2,50, IC 1,04-6,07), dados semelhantes aos observados no presente estudo, onde a diferença de sobrevida entre os grupos com alta expressão 2 e 3+ foi respectivamente de quatro e três meses comparado com 18 meses naqueles que não apresentaram imunoposição para EGFR ou ainda 14 meses nos que apresentavam escore de 1+. A razão de chances de óbito nos doentes com alta expressão EGFR foi cerca de nove vezes maior do que naqueles com expressão fraca ou nula.

No presente estudo também houve correlação não-paramétrica pelo teste de Spearman entre a alta expressão de EGFR e os níveis pré-operatórios de marcadores séricos CA 19,9 e CEA, assim como tumores em estadiamento mais avançados da classificação TNM-UICC. Em relação aos marcadores séricos CEA e CA 19,9 não tem sido observada essa associação no CVB. A correlação entre EGFR com o estágio TNM no CVB não tem sido observada na literatura, embora nos demais tumores do trato digestório, como colorretal¹⁶ e esofágico¹⁹, essa correlação tem sido bem descrita.

Em suma foi observado correlação prognóstica com a imunoposição da proteína EGFR, o que sinaliza que novos estudos devam ser feitos para avaliarem melhor essa associação. Se positiva, abre-se racional para sua inclusão rotineira na avaliação prognóstica do CVB e, talvez, a indicação do uso de terapia anti-EGFR (terapia-alvo).

CONCLUSÃO

Pior prognóstico teve relação com a imunoposição aumentada da proteína EGFR no tecido tumoral.

REFERÊNCIAS

1. Ajiki T, Onoyama H, Yamamoto M, Asaka K, Fujimori T, Maeda S, Saitoh Y. P53 protein expression and prognosis in gallbladder carcinoma and premalignant lesions. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 521-526.
2. Chang HJ, Yoo BC, Kim SW, Lee BL, Kim WH. Significance of Pml and p53 Protein as Molecular Prognostic Markers of Gallbladder Carcinomas. *Pathol Oncol Research* 2007; 13(4):326-335.
3. Chen BK, Ohtsuki Y, Furihata M, Takeuchi T, Iwata J, Liang SB, Sonobe H. Co-overexpression of P53 protein and epidermal growth factor receptor in human papillary thyroid carcinomas correlated with lymph node metastasis, tumor size and clinicopathologic stage. *Int J Oncol* 1999; 15(5): 1231-1237.
4. Harder J, Waiz O, Otto F, Geissler M, Olschewski M, Weinhold B, et al. EGFR and HER2 expression in advanced biliary tract cancer. *World J Gastroenterol* 2009;28; 15(36):4511-4517.
5. Kammel D, Paakko P, Nuorva K, Vahakangas K, Soini Y. P53 and c-erbB2 protein expression. In adenocarcinoma and epithelial dysplasias of the gallbladder. *J Pathol* 1993; 170: 67-72.
6. Kaufman M, Mehrotra B, Limaye S, White S, Fuchs A, Lebowicz Y, Nissel-Horowitz S, Thomas A. EGFR Expression in Gallbladder Carcinoma in North America. *Int J Med Sci* 2008;5(5):285-291.
7. Kayahara M, Nagakawa T, Nakagawara H, Kitagawa H, Ohta T. Prognostic Factors for Gallbladder Cancer in Japan. *Ann Surg* 2008, 248(5): 807-14.

8. Kawamoto T, Krishnamurthy S, Tarco E, Trivedi S, Wistuba II, Li D, Roa I, Roa JC, Thomas MB. HER Receptor Family: Novel Candidate for Targeted Therapy for Gallbladder and Extrahepatic Bile Duct Cancer. *Gastrointestinal Canc Res* 2006; 1(6):221-227.
9. Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9: 963-969
10. Kim H, Song JY, Cho JY, Yoon YS, Han HS, Lee HS, Ryu HS, Choe G. Strong cytoplasmatic expression of Cox-2 at the invasive fronts of gallbladder cancer is associated with a poor prognosis. *J Clin Pathol* 2010; 63:1048-1053.
11. Kim WB, Han HJ, Lee HJ, Park SS, Song TJ, Kim HK, Suh SO, Kim YC, Choi SY. Expression and Clinical Significance of Cell Cycle Regulatory Proteins in Gallbladder and Extrahepatic Bile Duct Cancer. *Ann Surg Oncol* 2009;16:23-34.
12. Kountourakis P, Pavlakis K, Psyrri A, Rontagianni D, Xiros N, Patsouris D, et al. Clinicopathologic significance of EGFR and HER-2- NEU in Colorectal Carcinomas. *Cancer J* 2006; 12(3): 229-36.
13. Lee CS & Pirdas A. Epidermal Growth Factor Receptor Immunoreactivity in gallbladder and Extrahepatic Biliary Tract Tumours. *Path Res Pract* 1995;191:1087-1091.
14. Legan M, Luzar B, Marolt F. Expression of Cyclooxygenase-2, glucose transporter-1 and angiogenesis in gallbladder carcinomas and their impact on prognosis. *Scand journal of Gastroenterol* 2009;44:101-1108.
15. Leone F, Cavalloni G, Pignochino Y, Sarotto I, Ferraris R, Piacibello W, Venesio T, Capussotti L, Risio M, Aglietta M. Somatic Mutations of Epidermal Growth factor receptor in Bile Duct and Gallbladder Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(6): 1680-1685.
16. Lu Y, Jingyan G, Baorong S, Peng J, Xu Y, Cai S. Expression of EGFR, Her2 predict lymph node metastasis (LNM)-associated metastasis in colorectal cancer. *Cancer Biomark* 2012; 11(5): 219-26.
17. Ménard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa SM, Tagliabue E. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Lifes Sci* 2004; 61: 2965-2978.
18. Miura F, Asano T, Amano H, Toyota N, Wada K, Kato K, et al. New prognostic factor influencing long-term survival of patients with advanced gallbladder carcinoma. *Surgery* 2010; 148(2): 271-7.
19. Navarini D, Gurski RR, Madalosso CA, Aita L, Meurer L, Fornari F. Epidermal growth factor receptor expression in esophageal adenocarcinoma: relationship with tumor stage and survival after esophagectomy. *Gastroenterol Res Pract.* 2012; 2012: 1-5.
20. Pais-Costa SR, Farah JFM, Artigiani-Neto R, Franco MIF, Martins SJ, Goldenberg A. Adenocarcinoma da Vesícula biliar: avaliação dos fatores prognósticos em 100 casos ressecados no Brasil. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2012; 25(1): 13-19.
21. Pignochino Y, Sarotto I, Peraldo-Neia C, Penachioni JY, Cavalloni G, Migliardi et al. Targeting EGFR-HER2 pathways enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in biliary tract and gallbladder carcinomas. *BMC Cancer* 2010;10:631: 1-14.
22. Reddy SK, Clary MM. Surgical Management of Gallbladder Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2009; 18: 307-24.
23. Roa I, Villaseca M, Araya J, Roa J, de Aretxabala X, Melo A, Ibacache G. P53 tumor supressor gene protein expression. In early and advanced gallbladder carcinoma. *Histopathology* 1997; 31: 226-330.
24. Roa, I; Ibacache, G; Melo, A; Morales, E; Villaseca, M; Araya, J; Roa, J; Guzmán, P; Aretxabala, X. Carcinoma subseroso de la vesícula biliar: expresión del complejo caderina-catenina. *Rev Med Chile* 2002;130:1349-1357.
25. Rocha AO, Coutinho LMB, Leboutte LDP, Scholl JG. Expressão imuno-histoquímica e valor prognóstico da proteína p53 no carcinoma de vesícula biliar: estudo de 60 casos. *J Bras Patol Med Lab* 2004;40 (6):403-410.
26. Sergeant G, Lerut E, Ectors N, Hendrickx T, Aerts R, Topal B. The prognostic relevance of tumor hypoxia markers in resected carcinoma of the gallbladder. *EJSO* 2011;37:80-86.
27. Shu GS, Lv F, Yang ZL, Miao XY. Immunohistochemical study of PUMA, c-Myb and p53 expression in the benign and malignant lesions of gallbladder and their clinicopathological significances. *Int J Clin Oncol.* 2012 Jun 21. [Epub ahead of print].
28. Volpert OV, Dameron KM, Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 1997; 14: 1495-1502.
29. Zhang HK, Zhang QM, Zhao TH, Li YY, Yi YF. Expression of mucins and E-cadherin in gastric carcinoma and their clinical significance. *World J Gastroentrol* 2004; 10 (20): 3044-47.
30. Wee A, Teh M, Raju GC. Clinical importance of P53 protein in gallbladder carcinoma and its precursor lesions. *J Clin Pathol* 1994; 47: 453-6.