

VALOR PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA DO C-ERB-2

Em doentes sob terapêutica adjuvante com Tamoxifeno por carcinoma primário da mama

ANDREIA ANTUNES, TERESA SILVA, ISABEL GODINHO, NATÁLIA AMARAL, CARLOS OLIVEIRA
Serviços de Ginecologia e de Anatomia Patológica. Hospitais da Universidade de Coimbra. Coimbra

RESUMO

Introdução: O c-erb-2 pertence à família dos receptores de crescimento tipo I, a sua expressão tem sido associada a maior agressividade biológica do tumor e a resistência a alguns tipos de tratamento.

Objectivo: Avaliar o valor prognóstico da expressão do receptor c-erb-2, nas doentes tratadas com Tamoxifeno por carcinoma primário da mama.

Material e Métodos: Examinámos 66 peças histológicas de cancros da mama primários. Todas as doentes foram tratadas por cirurgia e tratamento adjuvante com Tamoxifeno; a 58% das doentes foi também associado tratamento por quimioterapia e/ou radioterapia. Fez-se a determinação por imuno-histoquímica da expressão do c-erb-2, comparando-se a sobrevida e o intervalo livre de doença (ILD) dos positivos versus negativos para o c-erb-2.

Resultados: 43,9% dos tumores expressavam c-erb-2, não se associando essa expressão a um pior prognóstico relativamente à sobrevida ou ILD, valor de $p=0,15$ e $p=0,2$ respectivamente.

Conclusões: Neste estudo não encontramos vantagem na determinação do c-erb-2 como factor prognóstico para recorrência e sobrevida. Tendo em conta que a amostra tinha características de elevada homogeneidade entre os dois grupos, sem diferenças estatisticamente significativas relativamente à idade, estágio, estado ganglionar, grau histológico, dimensões do tumor e expressividade de receptores de estrogéneo, constituía um bom modelo para estudo. Estes resultados corroboram as directivas Europeias relativas ao tratamento adjuvante com tamoxifeno, nas quais se conclui que o c-erb-2 ainda não está completamente reconhecido como factor preditivo a ser usado por rotina na prática clínica.

Palavras-chave: c-erb-2, cancro da mama, terapia endócrina, tamoxifeno.

SUMMARY

PROGNOSTIC VALUE OF C-ERB-2 IMMUNOHISTOCHEMISTRY EXPRESSION IN PATIENTS WITH PRIMARY BREAST CANCER AND ADJUVANT TREATMENT WITH TAMOXIFEN

Introduction: The c-erb2 proto-oncogene is a member of the epidermal growth factor receptor family and has been associated with a more aggressive breast tumour biology and resistance to some types of treatments.

Aims: To evaluate the prognostic value of c-erb-2 receptor, from primary breast cancer

on tamoxifen therapy.

Methods: We examined 66 paraffin-embedded sections from primary breast cancers. Patients were treated with surgery plus adjuvant treatment with tamoxifen; 58% had also received chemotherapy and/or radiotherapy. Membrane staining for c-erb-2 was evaluated by immunohistochemistry and overall survival and relapse-free survival were compared between positives and negatives for c-erb-2.

Results: 43,9% of tumours over expressed c-erb-2 receptor, but this was not associated with a worse prognosis on overall survival either on relapse free-survival, with a p value of 0,15 and 0,2 respectively.

Conclusions: There isn't any advantage to determine c-erb-2 as a prognostic factor on overall survival either on relapse free-survival. Attending the homogenous characteristics between both groups with any statistical differences according age,

INTRODUÇÃO

O oncogene c-erb-2 (ou Her-2, ou c-neu) localizado no cromossoma 17q21 codifica uma glicoproteína com 185Kd., a tirosina-quinase, que pertence à família dos receptores de crescimento epitelial tipo I¹.

A amplificação do gene C-erb-2 origina aumento da expressão da p 185, este fenómeno tem sido associado a pior prognóstico nas mulheres com cancro da mama, devido à maior agressividade biológica destes tumores². Foram apontadas as seguintes correlações:

- Imunopositividade para o c-erb-2 e negatividade para os receptores estrogénicos³⁻⁵.
- Imunopositividade para o c-erb-2 e pior resposta à terapia endócrina com tamoxifeno^{6,7}.

O efeito do Tamoxifeno depende em parte dos factores de crescimento, pelo que, alterações a nível do c-erb-2 parecem afectar de alguma forma a resposta ao fármaco. Vários estudos concluíram que a positividade para o c-erb-2 representava um marcador de resistência endócrina⁸⁻¹¹, contudo noutros estudos esse efeito adverso não foi confirmado¹²⁻¹⁴. Outros estudos associam essa resistência ao tamoxifeno apenas em grupos determinados de tumor, como a doença avançada^{1,6,15}. Assim, o objectivo deste estudo consistiu em testar o valor prognóstico do c-erb-2 em doentes pós-menopausa, com cancro primário da mama e que foram submetidas a tratamento adjuvante com Tamoxifeno.

MATERIALE MÉTODOS

Foram analisadas retrospectivamente amostras de carcinoma invasivo da mama obtidas de 66 doentes pós-me-

nopausa, submetidas a cirurgia e tratamento adjuvante com Tamoxifeno, no Serviço de Ginecologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, entre Janeiro de 1994 e Dezembro de 1997.

Todas as doentes incluídas no estudo foram submetidas a tratamento cirúrgico (mastectomia radical modificada ou ressecção sectorial com dissecação ganglionar axilar) seguido eventualmente de quimio e/ou radioterapia, de acordo com o estágio da doença.

A indicação para tratamento com Tamoxifeno baseou-se nos seguintes critérios:

- Invasão dos gânglios axilares.
- Tumores maiores que 2cm, com Receptores de Estrogénico positivos sem invasão de gânglios axilares.
- Contra-indicação cirúrgica em doentes exclusivamente submetidas a tumorectomia.

Foram excluídos do estudo: tumores *in situ* ou peças com material muito escasso para permitir a realização da técnica histoquímica em boas condições de leitura.

A gradação histológica foi efectuada segundo os critérios propostos por Bloom e Richardson, com as modificações sugeridas por Elston¹⁶.

A expressão do c-erb-2 foi obtida por técnica de imunohistoquímica: em cortes de 5µm fixados em formalina e embebidos em parafina, obtidos de cassetes do tumor primário, pelo método da streptavidina-biotina (Quadro I). A expressão do c-erb-2 é definida pela coloração da membrana citoplasmática dando a aparência de *rede de capoeira*. Todas as lâminas foram lidas por dois investigadores que desconheciam o resultado do tratamento das doentes. Foram consideradas positivas para o c-erb-2 todas as peças que expressassem o referido padrão independentemente do grau dessa expressão. (figura 1)

Quadro I - Técnica de imuno-histoquímica

MÉTODO DA STREPTAVIDINA - BIOTINA / HRP

- 1 - Desparafinar e hidratar
- 2 - Inibir a peroxidase endógena com H₂O₂ a 3% durante 15 minutos
- 3 - Lavar em água destilada
- 4 - Recuperação antigénica através de microondas, em tampão de citrato de sódio pH 6, durante 14 minutos
- 5 - Deixar o tampão arrefecer durante 10 minutos
- 6 - Lavar em TBS
- 7 - Incubar em soro normal de cabra (Ultra V Block - Labvision) durante 10 minutos
- 8 - Lavar em TBS
- 9 - Incubar no soro primário policlonal C-erb-2 (Dako A485) durante 30 minutos, com uma diluição de 1 / 200
- 10 - Lavar em TBS
- 11 - Incubar no secundário biotilado (cabra anti-polivalente - Labvision) durante 10 minutos
- 12 - Lavar em TBS
- 13 - Incubar em streptavidina com peroxidase (Labvision) durante 10 minutos
- 14 - Lavar em TBS
- 15 - Revelar a marcação Ag / Ac com DAB durante 10 minutos
- 16 - Lavar em água corrente
- 17 - Contrastar com Hematoxilina de Gill durante 2 minutos
- 18 - Azular em água corrente durante 5 minutos
- 19 - Desidratar e montar em meio sintético.

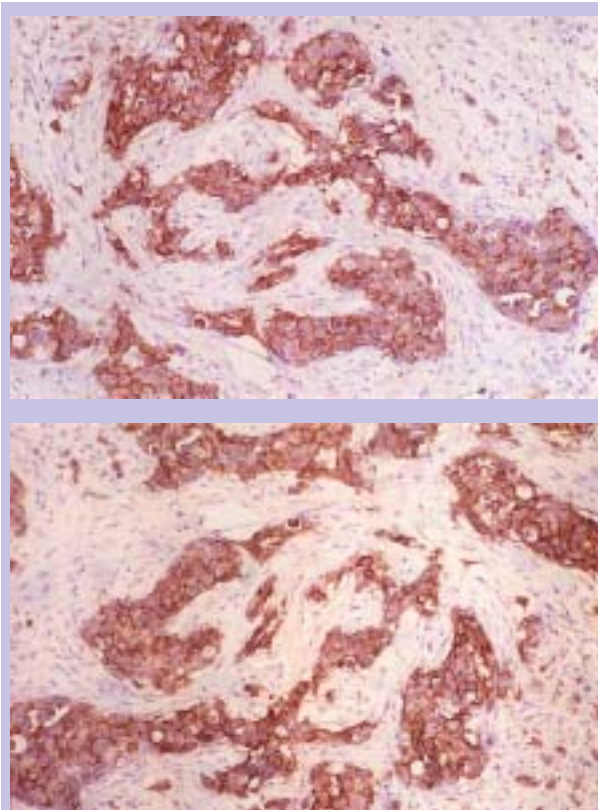


Fig. 1 - Aspecto ampliado de 2 lâminas coradas pelo método estreptavidina-biotina, apresentando o típico aspecto em *rede de capoeira* para o receptor C-erb-2

Na análise estatística, a sobrevida global (SV) e o intervalo livre de doença (ILD) foram estimados pelo método de Kaplan-Meier, sendo o método de Log-rank usado para comparar as curvas de SV e ILD entre os vários grupos. Os valores de p foram calculados pelo teste de Log e pelo teste de Cox. Os vários factores com interferência no prognóstico foram comparados pelo teste do χ^2 .

RESULTADOS

As 66 doentes estudadas tinham idades compreendidas entre os 44 e os 84 anos quando a doença foi diagnosticada, sendo a média etária 65,5 anos. Os tumores variavam entre 1 e 8 cm de maior diâmetro. Foram detectadas metástases nos gânglios axilares em 32 doentes (48,5%). As doentes foram submetidas a vigilância clínica por um período médio de 50,3 meses (mínimo de 11 meses e máximo de 80 meses). Nesta amostra, 43,9% (n=29) de tumores foram positivos para o c-erb-2 e 56,1% (n=37) foram negativos.

Não encontramos diferenças, estatisticamente significativas, entre os tumores c-erb-2 positivos e os negativos para este marcador, relativamente: à metastização ganglionar, expressão de receptores de estrogéneo, distribuição por grupos etários, dimensões do tumor e grau histológico, avaliadas pelo teste χ^2 ($p < 0,05$). (quadro II)

Também não encontramos diferenças com significado estatístico relativamente à sobrevida global e ILD entre os dois grupos. (Figuras 3 e 4).

Assim como, também não se encontraram diferenças

Quadro II – Características dos doentes C-erb-2 positivos e negativos

	c-erb-2 positivo	c-erb-2 negativo
Receptor estrogéneo		
Positivo	25	33
Negativo	4	4
Gânglios		
Positivos	15	14
Negativos	17	20
Idade		
<49 anos	3	4
50 – 59 anos	9	6
60 – 69 anos	9	9
70 – 79 anos	5	10
>79 anos	3	8
Dimensão do tumor		
>2 cm	14	18
2 – 5 cm	6	16
>5 cm	9	3
Tipo histológico		
Ductal grau I	7	12
Ductal grau II	14	12
Ductal grau III	4	7
Outros Tipos	4	6

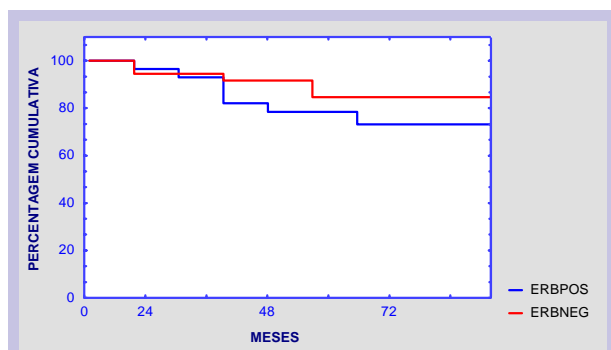


Fig. 3 – Intervalo livre de doença
 Teste de Cox (p=0,15);
 Teste de Log (p=0,15)

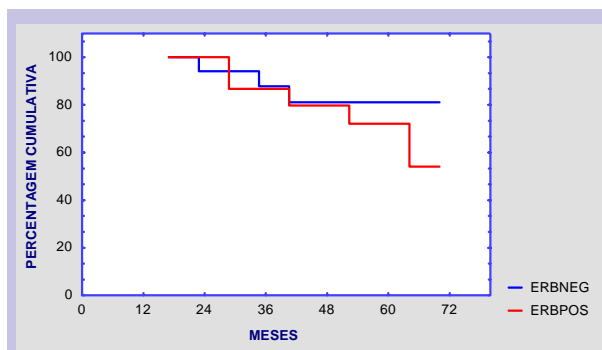


Fig. 6 – Sobrevida nos gânglios positivos
 Teste de Cox (p=0,19)
 Teste de Log (p=0,19)

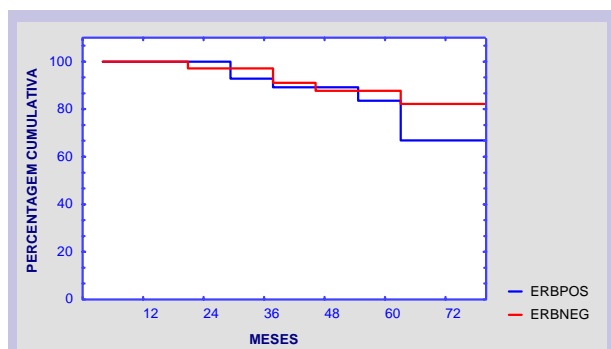


Fig. 4 – Sobrevida global
 Teste de Cox (p=0,21);
 Teste de Log (p=0,21)

Quadro III – Regressão logística

Regressão logística	OR	IC >95%
C-ERB-2	1,606	(0,416 - 6,201)
Gânglios	5,139	(0,945 - 27,942)
Receptor estrogéneo	0,239	(0,030 - 1,937)

nas curvas de sobrevida entre os c-erb-2 positivos e negativos nos subgrupos de tumores com receptores de estrogênio positivos, ou com invasão ganglionar (Figuras 5 e 6).

Considerando o risco relativo calculado por regressão logística, verificamos que a invasão ganglionar é o factor de risco com maior valor prognóstico, seguido da expressão c-erb-2 e dos receptores de estrogéneo (quadro III).

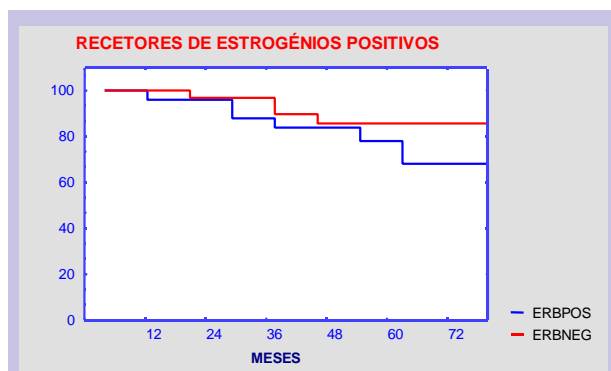


Fig. 5 – receptores de estrogéneos positivos
 Teste de Cox (p=0,15);
 Teste de Log (p=0,15)

DISCUSSÃO

O grau de positividade para o Cerb-2 neste estudo é superior ao que tem sido descrito na literatura, que é de 20-30%. Se tivermos em conta que a técnica imunohistoquímica detecta sobretudo o receptor activo e que a maioria dos estudos se tem dirigido à avaliação dos receptores ao nível dos tecidos metastáticos ou de recidivas, que têm características biológicas diferentes, levamos a propor a hipótese de que o c-erb-2 tem uma maior actividade nos tumores primitivos que nos secundários.

Os resultados deste estudo não demonstraram a hipótese que a expressão do c-erb-2 esteja associada a resistência ao tratamento adjuvante com tamoxifeno ou a maior agressividade biológica.

A maioria dos estudos salienta um pior prognóstico para os tumores c-erb-2 positivo, relativamente à sobrevida global, mas não ao ILD, o que tem sido interpretado como uma deterioração da resposta ao tratamento nas recidivas. No nosso estudo não verificámos essa diferença, o que nos permite concluir que os tumores c-erb-2 positivos não desenvolvem maior resistência ao tratamento da doença metastática que os negativos para esse receptor.

Vários investigadores descrevem uma associação entre tumores c.erb-2 positivos e receptor de estrogéneo negativos, sendo esta associação relacionada com uma resistência ao tratamento com Tamoxifeno. Neste estudo a presença de receptores de estrogéneo negativos tive-

ram expressividade idêntica nos tumores c-erb-2 positivos e negativos, pelo que a possível interferência da associação referida foi neutralizada.

CONCLUSÃO

Neste estudo obtivemos uma amostra com características homogêneas entre os dois grupos de tumores positivos e negativos para o c-erb-2 e um longo período de follow-up, contudo dada a natureza retrospectiva do estudo, não podemos excluir viés não controlável neste tipo de estudo mas, apesar desta limitação, os resultados deste estudo não são consistentes com a noção de que a positividade para c-erb-2 esteja associada a pior resposta ao tratamento adjuvante com tamoxifeno nos tumores primários da mama em mulheres pós-menopausa.

AGRADECIMENTOS

O autores agradecem a Vítor Rodrigues o apoio concedido no tratamento estatístico dos dados.

BIBLIOGRAFIA

1. HOUSTON SJ, PLUNKETT TA, BARNES DM et al: Overexpression of c-erb2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 1220-1226
2. ELLEDGE RM, GREEN S, CIOCCA D et al: HER-2 Expression and Response to Tamoxifen in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer: A Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1998; 4: 7-12
3. JI H, LIPPONEN P, AALTOMAA S et al: c-erb-2 oncogene related to p53 expression, cell proliferation and prognosis in breast cancer. *Anticancer Res* 1993; 13: 1147-52
4. CIOCCA DR, FUJIMURA FK, TANDON AK: Correlation of HER-2/neu amplification with expression and with other prognostic factors in 1103 breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1279-1282
5. ELLEDGE RM, GREEN S, HOWES L et al: bcl-2, p53, and response to tamoxifen in ER-positive metastatic breast cancer: A Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1916-1922
6. WRIGHT C, NICHOLSON S, ANGUS B et al: Relationship between c-erb2 protein product expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1992; 65: 118-121
7. CARLOMAGNO C, PERRONE F, GALLO C et al: C-erb-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2702-2708
8. BENZ CC, SCOTT GJ, SARUP JC et al: Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant Tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER-2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 24: 85-95
9. ARCHER S, ELIOPULOUS A, SPANDIDOS D et al: Expression of ras p21, p53, and c-erb-2 in advanced breast cancer and response to first line hormonal therapy. *Br J Cancer* 1995; 72: 1259-1266
10. FERNANDEZ MJ, FARINA GJ, ARANGONCILLO BP: Immunohistochemical expression of p-53 and c-erb-2 in breast carcinoma: relation with epidemiologic factors, histologic features and prognosis. *Gen & Diagnostic Pathol* 1997; 142: 289-96
11. SJOGREN S, INGANAS M, LINDGREN A et al: Prognostic and Predictive Value of c-erb-2 Overexpression in Primary Breast Cancer, Alone and in Combination with Other Prognostic Markers. *J Clin Oncol* 1998; 16: 462-469
12. BORG A, BALDETORP B, FERNO M et al: ERB2 amplification is associated with Tamoxifen resistance in Steroid-receptor positive breast cancer. *Cancer (Lett)* 1994; 8: 137-144
13. ROZAN S, VICENT-SALOMON A, ZAFRANI B et al: No significant predictive value of c-erb-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int J Cancer* 1998; 79: 27-33
14. BECKMANN MW, NIEDERACHER D, MASSENKEIL G et al: Expression analyses of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu : no advantage of prediction of recurrence or Survival in Breast cancer patients. *Oncol* 1996; 53: 441-447
15. YAMAUCHI H, O'NEILL A, GELMAN R et al: Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pre-treatment circulating levels of extra cellular domain of the HER-2/c-neu protein. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2518-25
16. ELSTON CW: The assessment of histological differentiation in breast cancer. *Aust NZ J Surg* 1984; 54: 11-15

