

**PERDA DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE
REPARO (MLH1,MSH2,MSH6 E PMS2) ANALISADOS
EM PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER
GÁSTRICO**

**RAFAEL SODRÉ DE ARAGÃO VASCONCELLOS
PEREIRA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação da Fundação Antônio Prudente em
Oncologia em Parceria com a Associação
Matogrossense de Combate ao Câncer AMCC
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Maria Dirlei Ferreira de
Souza Begnami**

**São Paulo
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Pereira, Rafael Sodré de Aragão Vasconcellos

Perda de expressão de proteínas de reparo (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) analisados em pacientes portadores de câncer gástrico/ Rafael Sodré de Aragão Vasconcellos Pereira - São Paulo; 2017.

47p.

Dissertação(Mestrado)-Fundação Antônio Prudente em Parceria com a Associação Matogrossense de Combate ao Câncer AMCC

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Descritores: 1. Reparo do DNA/DNA Repair. 2. Neoplasias Gástricas/ Patologia/Stomach Neoplasms/pathology. 3. Proteínas/Proteins

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ana Luiza e Jovino, pela formação ética e apoio incondicional.

À minha, esposa pelo apoio e compreensão

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Laudemi Moreira Nogueira, por permitir a realização da pós-graduação e apoio durante toda a execução deste projeto.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, por proporcionar condições de levar a pós-graduação em oncologia ao Mato Grosso.

À Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami, pela excelência acadêmica, disposição e apoio em todos os momentos.

À Haracelli Leite, pela dedicação e disposição em implementar a pós-graduação no Hospital de Câncer de Mato Grosso.

À Carolina Parucce, pelo apoio e elaboração do questionário em câncer gástrico.

À Sra. Suely Francisco, pela ajuda na formatação final da tese.

As Sras. Ana Maria Alves Kuninari, Luciana Costa Pitombeira Castelano e Cíntia Souza, pelas orientações durante todo o curso de pós-graduação.

A todos os profissionais do departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center, pelo trabalho de qualidade desempenhado.

Aos funcionários do Hospital de Câncer de Mato Grosso, pelo apoio e dedicação aos pacientes.

RESUMO

Pereira RSAV. **Avaliação da perda de proteínas de reparo do DNA - MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 e p53 nos carcinomas gástricos.** São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente em Parceria com a Associação Matogrossense de Combate ao Câncer AMCC].

Introdução: A neoplasia gástrica é a terceira causa de morte por câncer no mundo e no Brasil encontra-se entre as 4 primeiras. Apesar da detecção precoce ser a principal forma de diminuir a mortalidade da doença uma grande parte dos pacientes, mesmo aqueles que foram diagnosticados precocemente, não evoluem de forma satisfatória. Sabe-se que o adenocarcinoma gástrico se divide em subgrupos genômicos dentre os quais se encontram aqueles com perda de expressão das proteínas de reparo. Entender se esses perfis de pacientes possuem desfechos distintos poderia estimular o desenvolvimento de ensaios clínicos com o objetivo de desenvolver terapias mais eficazes. **Objetivos:** Avaliar a expressão das proteínas de reparo do DNA - MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 e p53 nos carcinomas gástricos correlacionando com variáveis clínicas e histopatológicas. **Métodos:** Estudo epidemiológico transversal descritivo de 29 pacientes operados por câncer gástrico no HCAN – MT no período de 2010 a 2015. Foram descritas variáveis clínicas e histopatológicas, associadas à perda de expressão ou não das proteínas de reparo bem como analisada a presença de EBV, p53 e inflamação. Os resultados foram estudados numa plataforma estatística. **Resultados:** A localização antropilórica foi a mais comum n=15 (51,9%); a perda de expressão de MLH1 e PMS2 foi identificada em 4 (13,8%) pacientes; EBV positivo em 4 (13,8%) pacientes; a hiperexpressão do p53 foi identificada em 9 (31%) pacientes; apenas um (3,4%) paciente apresentou tumor com ausência de inflamação. Na análise univariada a mortalidade foi maior em pacientes EC

IV. O Adenocarcinoma do tipo tubular foi fator de risco para perda de expressão de MLH1/PMS2. A positividade de p53 foi estatisticamente maior em homens do que em mulheres. Na análise multivariada a idade se mostrou como fator de risco de mortalidade. A mediana de sobrevida foi de 28 meses. **Conclusão:** A instabilidade de microssatélite demonstrada pela perda de expressão de MLH1 e PMS2 está presente em 13,8% dos pacientes do estudo. O subtipo histológico tubular parece ser indicativo da perda de expressão das proteínas de reparo..

SUMMARY

Pereira RSAV. [Evaluation of Loss of DNA Repair Proteins - MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 and p53 in the gastric carcinomas]. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação Fundação Antônio Prudente em Parceria com a Associação Matogrossense de Combate ao Câncer AMCC].

Introduction: Gastric neoplasm is the third cause of cancer death in the world and in Brazil it is among the first 4. Although early detection is the main way to reduce disease mortality, a large proportion of patients, even those diagnosed early, do not progress satisfactorily. It is known that gastric adenocarcinoma is divided into genomic subgroups among which are those with loss of expression of repair proteins. Understanding whether these patient profiles have distinct outcomes could stimulate the development of clinical trials with the goal of developing more effective therapies.

Objectives: To evaluate the expression of DNA repair proteins - MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 and ep53 in gastric carcinomas correlating with clinical and histopathological variables **Methods:** Descriptive cross - sectional epidemiological study of 29 patients operated on by gastric cancer in HCAN - MT in the period of 2010 To 2015. Clinical and histopathological variables, associated with loss of expression or not of repair proteins, as well as the presence of EBV, p53 and inflammation, were analyzed. The results were studied on a statistical platform. **Results:** The antropiloric site was the most common n = 15 (51.9%); Loss of expression of MLH1 and PMS2 was identified in 4 (13.8%) patients; Positive EBV in 4 (13.8%) patients; The overexpression of p53 was identified in 9 (31%) patients; Only one (3.4%) patient had no inflammation. In the univariate analysis, mortality was higher in EC IV patients. Tubular adenocarcinoma behaved as a risk factor for loss of MLH1 / PMS2 expression. The positivity of p53 was statistically higher in males than in females. In the multivariate analysis, age was shown to be a

risk of mortality. Median survival was 28 months. **Conclusion:** Microsatellite instability is present in the study patients. The tubular subtype may be indicative of the loss of repair proteins. A molecular classification of gastric adenocarcinoma is necessary.

LISTA DE QUADRO, TABELAS E FIGURAS

Quadro 1	Anticorpos primários utilizados no estudo.....	12
Tabela 1	Distribuição percentual e análise univariada da expressão de MLH1 e PMS2 em pacientes com câncer gástrico em Cuiabá/MT: 2012-2015.....	24
Tabela 2	Distribuição percentual e análise univariada da expressão de EBV e p53 em pacientes com câncer gástrico em Cuiabá/MT: 2012-2015.....	25
Tabela 3	Análises univariadas de associação entre as variáveis estudadas e o óbito dos pacientes com câncer gástrico operados em Cuiabá/MT: 2012-2015.....	27
Tabela 4	Resultados da regressão de Poisson com variância robusta em relação ao óbito em pacientes com câncer gástrico em Cuiabá/MT: 2012-2015.....	29
Figura 1	Resultados da regressão de Poisson com variância robusta em relação ao óbito em pacientes com câncer gástrico em Cuiabá/MT: 2012-2015.....	20
Figura 2	Probabilidade de sobrevida em pacientes com câncer gástrico (Cuiabá/MT: 2012-2015) segundo classificação da OMS.....	21
Figura 3	Probabilidade de sobrevida em pacientes com câncer gástrico (Cuiabá/MT: 2012-2015) segundo a realização de quimioterapia neoadjuvante.....	22
Figura 4	Probabilidade de sobrevida em pacientes com câncer gástrico (Cuiabá/MT:20122015).....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ACRG	do inglês, Asian Cancer Research Group
AJCC	do inglês, American Joint Committee on Câncer
CG	Cancer gástrico
CIN	Instabilidade cromossômica
CISH	hibridização <i>in situ</i> cromogênica
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EBV	Vírus do Epstein Barr
EMT	Transição epitelio mesênquima
GS	Geneticamente estável
H-Pylori	<i>Helicobacter Pylori</i>
HE	Hematoxilina - eosina
HRP	do inglês, horseradish peroxidase
IQR	intervalos interquartis
JAK2	do inglês Janus kinase 2
MSI	Instabilidade Microsatelite
OMS	Organização Mundial de Saúde
PD-L1	do inglês, Programmed cell death ligand 1
PD-L2	do inglês, Programmed cell death ligand 2
RNA	Acido ribonucleico
SUS	Sistema Unico de Saúde
TCGA	do inglês, The Cancer Genome Atlas Research Group
TMA	do inglês, Tissue Microarray

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Etiologia.....	3
1.2	Diagnóstico.....	4
1.3	Fatores Prognósticos.....	4
1.4	Mecanismos de Reparo do DNA (<i>Mismatch Repair</i>).....	6
1.5	Subtipos Moleculares do Câncer Gástrico.....	7
2	OBJETIVOS	8
3	MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1	Protocolo TMA.....	10
3.2	Protocolo das Reações Imuno-Histoquímicas	11
3.2	Interpretação das Reações Imuno-Histoquímicas	12
3.3	Protocolo de Hibridização <i>in situ</i> Cromogênica para EBV (CISH – Zytovision)	13
3.4	Análise Estatística	14
4	RESULTADOS.....	16
4.1	Dados Clínicos e Histopatológicos	16
4.2	Resultados Imuno-Histoquímicos e de Hibridização <i>in situ</i>	19
4.3	Análise da Associação entre as Variáveis Clínicas e Histopatológicas em Relação aos Marcadores Pesquisados	22
4.4	Analises Taxas de Sobrevida Global.....	27
4.4.1	Analises Univariadas	27
4.4.2	Curvas de Sobrevida Global das Analises Univariadas.....	30
5	DISCUSSÃO	35
6	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	42

7	CONCLUSÃO	43
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

ANEXOS

Anexo 1 Classificação TNM

Anexo 2 Reações imunohistoquímicas dos marcadores analisados

1 INTRODUÇÃO

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2011 o número de mortes relacionadas ao câncer já ultrapassou todos os óbitos causados por doenças coronarianas e por acidentes vasculares cerebrais. Dados epidemiológicos têm mostrado um aumento crescente nas taxas globais de incidência de câncer principalmente em regiões de baixo desenvolvimento (FERLAY et al. 2015).

Ademais, a depender do nível de desenvolvimento social das regiões analisadas, tem-se notado uma diminuição na incidência de casos novos dos tumores relacionados a causas infecciosas como, por exemplo, o câncer de estômago e de colo de útero. Em contra partida, percebe-se um aumento na incidência de outros tipos de neoplasias associadas a fatores sócio-culturais principalmente nos países ocidentais como, por exemplo, o câncer de mama, próstata e cólon (BRAY et al. 2012).

Embora tenhamos observado uma queda significativa na sua incidência nos últimos anos, ainda são esperados por ano no mundo, quase um milhão de casos novos de câncer gástrico (951.000 mil / 6,8% do total), tornando-se a quinta neoplasia mais comum no globo, perdendo apenas para o câncer de pulmão, mama, próstata e colón, contrastando com os dados da década de 1975 onde o câncer gástrico era o principal tipo de neoplasia (PARKIN et al. 1984, STRAND et al. 2017).

Atualmente, o câncer gástrico é a terceira causa de morte por câncer em ambos os sexos no mundo, responsável por 723.000 mortes, 8,8% do total (FERLAY et al. 2015).

Nos últimos anos, as mudanças comportamentais e de hábitos de vida como a ingestão de frutas e vegetais, diminuição do uso de cloreto de sódio e tratamento das infecções crônicas pela bactéria *H. Pilory* tiveram um papel importante nesse declínio (PARKIN et al. 2005). No Brasil o painel epidemiológico passa por um período de transição. Com a melhora da expectativa de vida e consequentemente maior envelhecimento da população é de se esperar um aumento natural dos casos oncológicos. Aliado a esse aspecto observa-se uma melhora, por parte de alguns brasileiros, do seu nível social o que acarreta uma maior exposição a agentes cancerígenos o que explica parcialmente o aumento na incidência de cânceres de mama, próstata e colón por exemplo. Por outro lado uma grande parte da população ainda vive em condições atreladas a pobreza o que também se revela com aumento de casos de tumores típicos de países subdesenvolvidos como, por exemplo, os tumores de colo de útero, pênis , estômago e cavidade oral (Ministério da Saúde 2016).

As estimativas para o biênio 2016/2017 são de 596.070 mil novos casos de câncer no Brasil, incluindo câncer de pele não-melanoma, sendo o câncer gástrico responsável por algo em torno de 20 mil casos novos.

No estado de Mato Grosso, segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) são esperados 270 novos casos de câncer gástrico (CG) para 2016 (Ministério da Saúde 2016).

1.1 ETIOLOGIA

O câncer gástrico em sua maioria, cerca de 90%, é representado pelos adenocarcinomas (CREW e NEUGUT 2006). Segundo a classificação histológica de Lauren, os carcinomas gástricos são divididos em 2 tipos principais: os carcinomas do tipo intestinal ou bem diferenciados e os carcinomas do tipo difuso ou pouco diferenciados (LAUREN 1965). Sua etiologia é multifatorial tendo alguns fatores de risco bem conhecidos como a infecção crônica da mucosa gástrica pela bactéria *H. Pylori* que é um bacilo gram-negativo que coloniza o estômago (WARREN e MARSHALL 1983; MARSHALL et al. 1985). Tal infecção crônica leva a uma série de transformações da mucosa gástrica desde a gastrite atrófica passando pela metaplasia, displasia e finalmente o carcinoma invasivo (CORREA 2004).

Outras causas são a dieta rica em sal e pobre em fibra, alimentos defumados, etilismo, obesidade, cirurgia gástrica prévia entre outros (Anonymous 1993).

Mutações e síndromes genéticas também são fatores importantes na gênese de diversos tumores. Mutação do gene *CDH1* aumenta o risco em 80% de desenvolver CG, a polipose adenomatosa familiar, que é uma síndrome relacionada à mutação do gene *APC*, aumenta significativamente o risco de desenvolver carcinomas colorretais e também de câncer gástrico. Outras mutações conhecidas associadas ao desenvolvimento do câncer gástrico são as mutações nos genes *BRCA 1* e *2*, mutações no gene *p53* na Síndrome de Li – Fraumeni,, mutação no gene *STK1* na Síndrome de Peutz

Jeghers e mutações em genes de reparo na Síndrome de Lynch (American Cancer Society-ACS 2017).

1.2 DIAGNÓSTICO

Os sintomas clínicos do CG nos estágios iniciais estão ausentes ou são pouco específicos. Entretanto, a presença de sinais clínicos, principalmente os de alarme como sangramentos, dores ou perdas de peso são indicativos de doença avançada (SOMA 2016).

A realização dos exames de endoscopia digestiva alta proporcionou um grande avanço no diagnóstico precoce das neoplasias gástricas acarretando uma acurácia maior que 80% deste diagnóstico (SANO et al. 1990).

A tomografia computadorizada é um excelente método para a determinação do estadiamento local, linfonodal e à distância, porém para as lesões precoces apresenta baixa sensibilidade (GIGANTI et al. 2016).

1.3 FATORES PROGNÓSTICOS

O tratamento operatório com a ressecção completa do tumor continua sendo a melhor abordagem terapêutica para este tipo de lesão. A adição de quimioterapia pré-operatória ou adjuvante adicionou um aumento de cerca de 40% na sobrevida dos pacientes com CG (MACDONALD et al. 2001; SAKURAMOTO et al. 2007).

O tipo de linfadenectomia realizada para o CG avançado ressecável foi durante muito tempo alvo de controvérsias na literatura (MCCULLOCH et al. 2004).

Em 2010, numa atualização do estudo holandês de 15 anos, foi identificada uma melhor sobrevida no grupo de pacientes submetidos a linfadenectomia do tipo D2 em comparação ao grupo onde foi realizada a linfadenectomia do tipo D1 (SONGUN et al. 2010). Esses dados foram corroborados pelo estudo JCOG 9501 que também provou não ser benéfica a realização de linfadenectomia para-aórtica (KODERA 2016; FUJIMURA et al. 2009).

Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas e nos tratamentos quimioterápicos, os resultados das taxas de sobrevida dos pacientes com CG ainda são muito ruins em comparação a outros tipos de tumores. A taxa de sobrevida global destes pacientes em 5 anos é de 29% (SIEGEL et al. 2016).

A tradicional classificação de tumores malignos TNM (Anexo 1), amplamente usada como parâmetro de prognóstico dos tumores, para o câncer gástrico ainda apresenta algumas lacunas sem resposta. O estudo de AHN et al. de 2009 que comparou 2 grupos de pacientes portadores desta neoplasia observou que o grupo N3/M0 apresentou sobrevida melhor do que o grupo N3/M1 apesar de ambos os grupos serem classificados como EC IV.

A explicação para isso encontra amparo na biologia tumoral. O câncer gástrico é resultado de um acúmulo de danos genéticos que afetam a função

celular normal. A célula tumoral adquire a capacidade de autorreplicação, bloqueia estímulos de redução da capacidade replicativa, perde o mecanismo de apoptose, estimula a angiogênese favorecendo o potencial invasivo e metastático destas células. Essas alterações podem ocorrer por alterações em diversas vias moleculares, sendo duas delas denominadas instabilidades de microssatélites e instabilidades cromossômicas (LENGAUER et al. 1988).

1.4 MECANISMOS DE REPARO DO DNA (*MISMATCH REPAIR*)

Em torno de 15% dos tumores gástricos estão associados a deficiência do mecanismo de reparo do DNA

Durante a fase de replicação celular esse sistema reconhece as bases nitrogenadas que estão desemparelhadas e corrige esse defeito adicionando, substituindo ou deletando nucleotídeos. Esse sistema é composto por um complexo de genes e proteínas conhecidas com MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Estes são responsáveis pelos reparos nos DNA defeituosos antes do final do ciclo celular (BACANI et al. 2005).

No câncer gástrico esporádico a causa mais frequente de instabilidade de microssatélite é o silenciamento do gene MLH1 por hipermetilação do seu promotor.

O acúmulo de mutações leva a ativação de oncogênes ou a inativação de genes supressores tumorais ou ambos tornando a célula capaz de crescer e invadir tecidos.

Tais alterações estão associadas a manifestações clínico - patológicas como tumor do tipo intestinal, de localização em antro gástrico, menos doença linfonodal e melhor prognóstico (FLEISHER et al. 1999).

1.5 SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER GÁSTRICO

Em 2014 o projeto *The Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA) analisou 295 pacientes portadores de neoplasia gástrica e através do uso de diversas técnicas moleculares distintas identificou 4 subtipos moleculares: 1. CG positivos para o vírus de Epstein-Barr (EBV), geralmente associados à mutação dos genes da via do *PIK3CA*, com fenótipos de hipermetilação do DNA e ampliações dos genes *JAK2*, *CD274 (PD-L1)* e *PDCD1LG2 (PD-L2)*; 2. CG com instabilidade de microssatélites, que apresentam elevadas taxas de mutações em genes de reparo; 3. CG genômicamente estáveis, relacionados a variante histológica do tipo difuso, apresentam mutações do gene *RHOA* ou fusões envolvendo proteínas de ativação GTPase com a família do gene *RHOA*; 4. CG com instabilidade cromossômica, caracterizados por aneuploidia acentuada e amplificação focal dos receptores de tirosina-quinase.

Tais descobertas abriram um vasto caminho na estratificação dos pacientes de acordo com o comportamento biológico do tumor e obtenção de melhores respostas clínicas ao tratamento sistêmico.

2 OBJETIVOS

- ✓ Avaliar a expressão das proteínas dos genes de reparo do DNA - MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 e p53 nos carcinomas gástricos;
- ✓ Determinar a presença de EBV e de infiltrado inflamatório nos carcinomas gástricos;
- ✓ Correlacionar os resultados das expressões dos marcadores pesquisados e de EBV com as variáveis clínicas e histopatológicas dos pacientes com carcinomas gástricos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de estudo epidemiológico, observacional, analítico, transversal, retrospectivo descritivo, realizado através das análises de prontuários e com material anatomopatológico de amostras de carcinomas gástricos, dispostos em blocos de parafina, de pacientes submetidos a gastrectomia no Hospital de Câncer de Mato Grosso no período de 2010 a 2015.

Os critérios de inclusão foram os pacientes com diagnóstico histológico confirmado de adenocarcinomas gástricos operados com intenção curativa e de exclusão foram tumores gástricos com histologias não-adenocarcinomas e cirurgias paliativas.

Foram estudadas as variáveis clínicas: Idade, sexo, estadiamento, óbito e as variáveis histopatológicas: classificação histológica de Lauren e OMS, grau de diferenciação tumoral, perdas das expressões para MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, expressão de EBV, p53 e quantidade de infiltrado inflamatório intra-tumoral.

Os blocos de parafina representativos das peças cirúrgicas foram recortados para confecção de novas lâminas que foram coradas por hematoxilina e eosina e foram revisadas no departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center para confirmação do diagnóstico de Adenocarcinoma de acordo com a classificação de Lauren e da OMS (LAUREN 1965; FENOGLIO-PREISER 2000; HU et al. 2012).

De acordo com os dados obtidos nos prontuários médicos, os pacientes foram estadiados de acordo com os critérios da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 7º ed., Anexo 1) (EDGE et al. 2010).

3.1 PROTOCOLO DO TMA

Para a realização das reações imuno-histoquímicas e de hibridização *in situ*, as amostras dos carcinomas gástricos estudados foram organizadas em blocos de *Tissue Microarray* (TMA).

Esta técnica permite a análise de vários marcadores em uma amostra pequena de tecidos em a necessidade de muito desgaste do tumor, além de economia de tempo, reagentes e de materiais.

Esta técnica está bem estabelecida e vem sendo utilizada há vários anos no departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center e consta de várias etapas que estão descritas nos parágrafos seguintes.

As amostras de carcinomas gástricos foram submetidas a novos cortes histológicos e corados com hematoxilina – eosina (HE). Utilizando-se da microscopia óptica, as áreas representativas do tumor foram identificadas e marcadas. Seguiu-se, então, a marcação com caneta permanente do bloco de parafina (bloco doador) da área selecionada. Utilizando-se do *tissue microrrayer* (Beecher Instrument, Silver Spring, MD, USA) dois cilindros de 1mm foram extraídos das áreas marcadas, transferindo-os para novos blocos de parafina (bloco receptor). Cada caso foi representado em

duplicata com cilindros de um milímetro cada de duas áreas distintas do tumor. Cortes histológicos foram obtidos e dispostos em lâminas adequadas para realização das reações de imuno-histoquímica e de hibridização *in situ*. Foram utilizados sistemas de coordenadas a partir de tabelas do Excel para a determinação e identificação exatas dos casos de TMA, tendo como referência o cilindro de tecido hepático. As tabelas com a distribuição dos casos deste estudo encontra-se no Anexo 2.

3.2 PROTOCOLO DAS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante para utilização da Benchmark plus, padronizado no Laboratório de imuno-histoquímica e hibridização *in situ* do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center.

Inicialmente as lâminas com os cortes histológicos dos carcinomas gástricos obtidos a partir do bloco de TMA foram identificadas com etiquetas contendo os códigos de barras específicos para cada marcador pesquisado (Quadro 1). Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas com a solução *EZ PREP*. A recuperação antigênica foi feita por calor em solução CCL com pH alto a 96°C em tempo previamente padronizado para cada anticorpo. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 5 minutos utilizando o reagente de bloqueio de peroxidase (Ultra View Universal DAB Inibitor e 3% de H₂O₂), seguido de lavagem das soluções e incubação com os anticorpos primários com os tempos previamente padronizados para cada anticorpo. A

seguir foi realizada nova lavagem seguida da incubação com polímero HRP (HRP Multimer) com subseqüentes lavagens em solução tampão. Foi realizada a incubação com cromógeno Diaminobenzidine (DAB) e passagem em tampão de lavagem com contra coloração com hematoxilina (Hematoxilina II). Foi realizada a lavagem das lâminas e passagem em água com detergente para retirada do LCS sendo então lavadas em água corrente e destilada. Por fim, as lâminas foram banhadas em xilol, álcool e montadas com meio de montagem específico.

Quadro 1 - Anticorpos primários utilizados no estudados

Anticorpo	Clone	Marca	Recuperação antigênica (tempo em minutos)	Incubação (tempo em minutos)
MLH1	G168-728	Cell Marque	64	40
PMS2	A16-4	BD	92	60
MSH2	G19-1129	Cell Marque	64	40
MSH6	44	Ventana	72	32
p53	DO-7	Ventana	36	32

3.3 INTERPRETAÇÃO DAS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Todas as lâminas coradas pelos marcadores pesquisados por imuno-histoquímica foram analisadas por um mesmo patologista e em microscópio óptico comum. Para os anticorpos MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6 foram considerados positivos os casos que apresentaram os núcleos das células neoplásicas marcados pela coloração marrom de qualquer intensidade e em qualquer quantidade de células. Os casos negativos foram aqueles com

ausência completa de marcação marrom nuclear nas células neoplásicas e com a presença de marcação marrom em qualquer intensidade nas células de tecido normal ou em células inflamatórias intra ou peritumoral.

Na avaliação da expressão da proteína p53 os casos foram classificados como positivos aqueles que exibiam marcação marrom nos núcleos das células neoplásicas independentes da quantidade de células marcadas. De acordo com a intensidade de marcação os casos foram classificados como positivos fracos, moderados ou fortes. Os casos foram considerados negativos quando não foi observada qualquer marcação marrom nos núcleos das células neoplásicas

3.4 PROTOCOLO DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* CROMOGÊNICA PARA EBV (CISH – ZYTOVISION)

A reação de hibridização *in situ* cromogênica (CISH) para pesquisa de EBV foi realizada utilizando-se o protocolo que acompanha o kit da Zytovision.

Iniciou-se com a desparafinização e hidratação dos cortes histológicos, três banhos de dez minutos cada em xilol, três banhos de cinco minutos cada em álcool, seguida do bloqueio da peroxidase endógena com dois banhos de cinco minutos cada com peróxido de hidrogênio (água oxigenada) de dez volumes. As lâminas foram lavadas com água destilada por cinco minutos. Foi realizada a digestão enzimática com pepsina por dez minutos à temperatura de 37°C, seguida da lavagem em água destilada por

cinco minutos. O pré-tratamento foi realizado com EDTA por quinze minutos, seguido pela incubação com sonda por 5 minutos a 75°C (fase de desnaturação) e por sessenta minutos a 55°C (fase de hibridação). Após, foi realizada a remoção da lamínula em tampão Wash Buffer, incubação por 10 minutos em tampão Wash Buffer à temperatura de 55°C, lavagem em tampão Wash Buffer por cinco minutos, incubação com mouse anti-digoxigenina por trinta minutos à 37°C. A seguir foi realizada a lavagem com tampão Wash Buffer, três banhos de cinco minutos cada, a incubação anti-mouse HRP à temperatura de 37°C por trinta minutos, a lavagem em tampão Wash Buffer três banhos de cinco minutos cada, a revelação da reação com cromógeno diaminobenzidina (DAB) por dez minutos (uma gota em 1 ml de diluente), a lavagem em água corrente, contra-coloração com Hematoxilina de Harris por dez segundos, lavagem em água corrente, desidratação com álcool, xilol, e finalmente a montagem em meio permanente.

Todas as reações foram realizadas utilizando-se controles negativos e positivos para EBV.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A sumarização das variáveis categóricas foi realizada por meio de tabelas com seus respectivos percentuais e valores absolutos e das variáveis numéricas por meio de medidas e intervalos de confiança a 95% (IC95%) ou medianas e intervalos interquartis (IQR), dependendo da forma de distribuição (paramétrica ou não-paramétrica), avaliado pelo teste de

Shapiro-Wilk. Foi utilizado o teste *t student* não pareado para avaliar a diferença entre as médias em variáveis categóricas dicotômicas, ou seu análogo não paramétrico teste de *Mann-Whitney*. Para avaliação dos índices em variáveis compostas por três grupos ou mais foi utilizada a ANOVA ou teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

Com intuito de estimar a força da associação utilizou-se a razão de prevalências (RP) e a análise de seus respectivos IC95%. Optou-se por esta medida em detrimento à *odds ratio* uma vez que esta pode superestimar a RP interferindo na inferência das análises. Para determinar o efeito independente das variáveis exploratórias sobre a variável resposta, foi utilizada a regressão de Poisson com variância robusta para ajustar as covariáveis, pois se trata do modelo múltiplo apropriado. As variáveis selecionadas para este método tiveram valor de $p \leq 0,20$ na análise univariada ou plausibilidade biológica.

A probabilidade de sobrevida foi calculada utilizando o tempo (em meses) entre a data do diagnóstico e a data do óbito, sendo este o desfecho utilizado como falha para construção do gráfico Kaplan-Meier. Os pacientes que permaneceram vivos ao final da pesquisa foram classificados como censurados. O teste log-rank foi utilizado para avaliar a igualdade das funções de sobrevida. Considerou-se significativo o valor de $p < 0,05$ no teste bicaudal e todas as análises foram realizadas no pacote estatístico *Stata Statistical Software*® versão 12.0 (College Station, Texas, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Um total de 29 pacientes com diagnóstico de câncer gástrico tratados cirurgicamente foram incluídos neste estudo, sendo 72,4% (n=21) pertencentes ao sexo masculino e 27,6% (n=8) ao sexo feminino. A idade média dos pacientes ao diagnóstico foi de 62,3 anos (IC95%=57,5-67,2), sendo esta média de 64,0 anos (IC95%=58,3-69,8) para os pacientes do sexo masculino e de 57,9 anos (IC95%=48,9-66,8) para os pacientes do sexo feminino.

A localização topográfica do tumor no estômago mais prevalente foi a região do antro/piloro (27,8%; n=8), seguida da região antral (17,2%; n=5) sendo a região de antro em curvatura maior (13,8%; n=4) e em curvatura menor (10,3%; n=3). A região do piloro foi acometida por 2 casos (6,9%), a região do fundo gástrico por um caso (3,4%), bem como a incisura *angularis* (3,4%; n=1) e a região subcárdica (3,4%; n=1). Todos os tumores localizados no antro-curvatura maior, fundo gástrico, incisura *angularis*, piloro e subcárdia ocorreram em pacientes do sexo masculino. Nos pacientes do sexo feminino, a localização mais comum foi o antro/piloro (37,5%; n=3).

Em relação a variável profundidade de invasão do tumor, o tipo mais prevalente foi T3 (48,3%; n=14), seguido de T4 (24,1%; n=7), T1 (13,8%;

n=4) e T2 (13,8%; n=4). Entre os pacientes do sexo masculino foram mais comuns os tamanhos: T4 (85,7%; n=6), T1 (75,0%; n=3), T3 (71,4%; n=10) e T2 (50,0%; n=2). Sendo, dois do subtipo T1b e um T1a, dois T2a, três T4a e dois T4b.

Avaliando a porcentagem dos linfonodos comprometidos ou não comprometidos 41,4%; (n=12) eram N0, seguida de N3 (24,1%; n=7), N1 (20,7; n=6) e N2 (13,8; n=4). Foram mais prevalentes no sexo feminino os tipos: N3 (85,7%; n=6), N0 (75,0%; n=9), N2 (75,0%; n=3) e N1 (50,0%; n=3).

Apresentaram linfonodos comprometidos pelo tumor 57,1% (n=16) dos pacientes, sendo 75,0% (n=12) pertencentes ao sexo masculino e 25,0% (n=4) ao sexo feminino. Considerando o número total de linfonodos retirados e aqueles comprometidos pelo tumor, observou-se percentual médio de comprometimento pelo tumor igual a 19,7% (IC95%=9,9-29,5), sendo 23,3% (IC95%=11,1-35,5) em pacientes do sexo masculino e 8,9% (IC95%=0,1-20,0) em pacientes do sexo feminino.

Apresentaram metástase à distância 10,3% (n=3) dos pacientes, todos do sexo masculino. De acordo com a classificação da AJCC, o estadió clínico II foi o mais comum (38,0%; n=11), seguido do III (31,0%; n=9), I (20,7%; n=6) e IV (10,3%; n=3). Dos pacientes com estadió clínico I, quatro foram subclassificados como IA e dois como IB. Entre aqueles com estadió II, seis foram classificados como IIA e cinco como IIB. O estadió III foi observado em quatro pacientes com o subtipo IIIA, em três pacientes IIIB e em dois pacientes IIIC.

Realizaram quimioterapia adjuvante 65,0% (n=13) dos pacientes, sendo 69,3% (n=9) pertencentes ao sexo masculino e 30,7% (n=4) ao sexo feminino. Realizaram quimioterapia neoadjuvante 10,0% (n=2) dos pacientes, sendo todos pertencentes ao sexo masculino. Nenhum paciente realizou os 2 esquemas de quimioterapias.

Com relação à classificação histopatológica de Lauren 34,6% (n=10) foram do tipo intestinal, 31,0% (n=9) tipo difuso, 24,1% (n=7) do tipo misto e 10,3% (n=3) do tipo inclassificável. Os pacientes do sexo masculino apresentaram maior prevalência do tipo intestinal (33,3%;n=7), mas entre os pacientes do sexo feminino o tipo difuso foi o mais prevalente (50,0%;n=4). Em relação à classificação da OMS, os tipos identificados foram: células isoladas (27,6%;n=8), tubular (27,6%;n=8), misto (24,1%;n=7), tubular papilífero (10,3%;n=3), anel de sinete (6,9%;n=2) e medular (3,4%;n=1). Os tipos misto e tubular representaram 57,1% (n=12) dos tumores em pacientes do sexo masculino entretanto em pacientes do sexo feminino o tipo células isoladas (37,5%;n=3) foi o mais comum. Os carcinomas do tipo misto apresentavam áreas constituídas por mais de um tipo histológico cujo percentual médio do componente de células isoladas foi de 47,1% (range: 5-95), componente do tipo papilar foi de, 60,0% (range: 40-80) e de áreas de padrão tubular foi de 50,0% (range: 5-95).

Quanto ao grau histológico dos tumores, a maioria dos tumores era pouco diferenciados (57,7%;n=15) e 11 tumores (42,3%) apresentaram diferenciação moderada. O grau de diferenciação não foi determinado em 3 casos. Pacientes do sexo masculino apresentaram predomínio de tumores

pouco diferenciados (61,1%;n=11) em comparação aos pacientes do sexo feminino (50,0%;n=4).

A presença de infiltrado inflamatório linfocitário intratumoral foi avaliada em graus de intensidade, sendo o grau de inflamação mais comum o leve (51,8%;n=15), seguida do grau moderado (31,0%;n=9) e intenso (13,8%;n=4). Um caso mostrou ausência de infiltrado inflamatório linfocitário intratumoral (3,4%). Os pacientes do sexo masculino apresentaram 9 dos 15 casos (60,0%) com inflamação de grau leve, 7 dos 9 casos com inflamação moderada (77,8%) e os 4 dos 4 casos com inflamação (100,0%) intensa.

Entre os pacientes avaliados os graus de diferenciação histológica se comportaram da seguinte maneira. Foi observado que 48,3% (n=14) apresentaram grau 3, seguido do grau 2 em 41,4% (n=12) e grau 1 em 10,3% (n=3) dos pacientes. Entre os pacientes do sexo masculino o mais frequente foi o grau 3 (57,1%; n=12) e entre os pacientes do sexo feminino o grau 2 (62,5%; n=5).

4.2 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS E DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Na avaliação da expressão das proteínas dos genes de reparo, observamos que 4 casos (13,8%) mostraram perdas das expressões de MLH1 e PMS2, o restante dos 25 casos (86,2%) mostraram positividade preservada para estes marcadores. Todos os casos 29 (100%) dos carcinomas gástricos estudados foram positivos para MSH2 e MSH6 (Tabela

1, Figura 1). Os pacientes do sexo masculino não apresentaram associação estatística significativa com relação a expressões de MLH1 (72,0%;n=18), PMS2 (72,0%;n=18), MSH2 (72,4%;n=21), MSH6 (72,4%;n=21) em comparação as expressões destes marcadores nos pacientes do sexo feminino ($p = 0,9$).

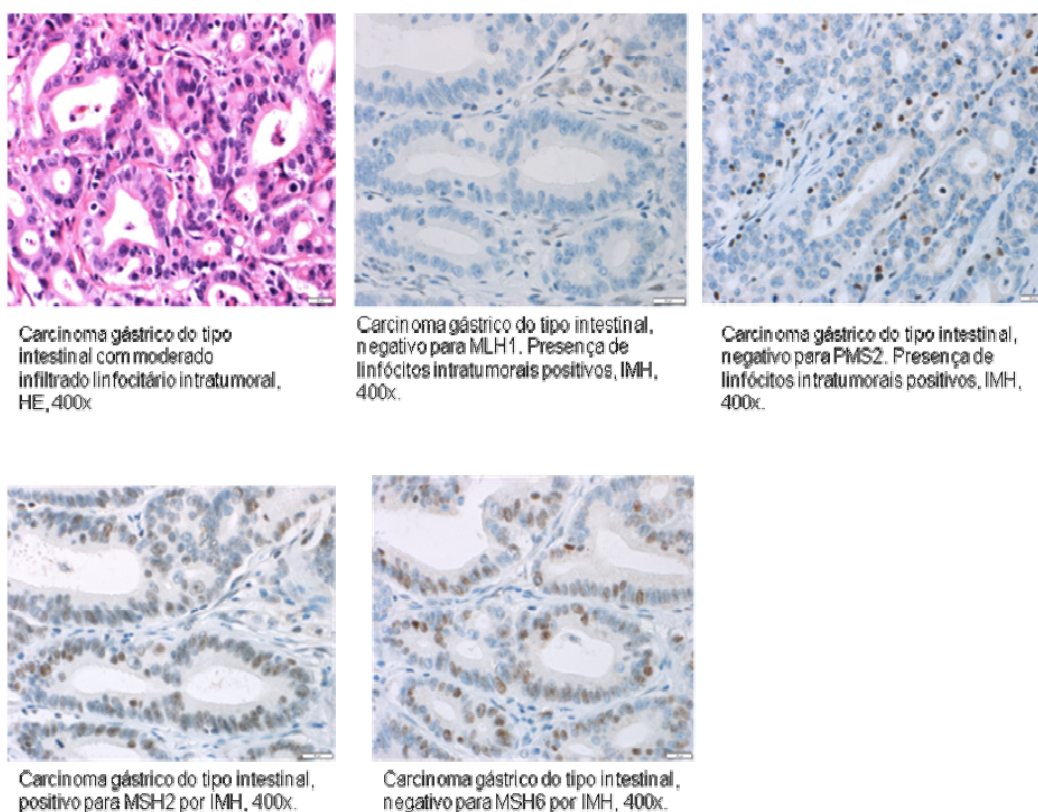
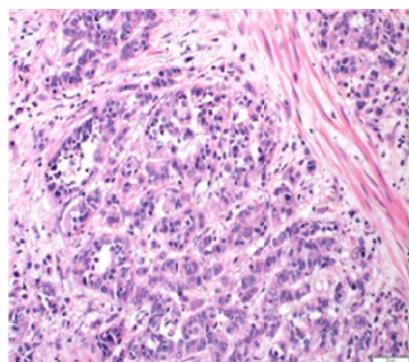


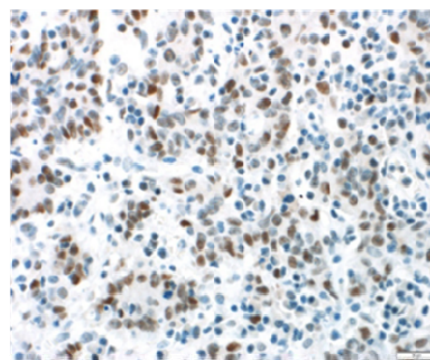
Figura 1 - Imagens representativas de carcinomas gástricos negativos para MLH1 e PMS2 e positivos para MSH2 e MSH6.

Em relação a expressão da proteína p53, 20 casos foram considerados positivos, sendo 31,0% (n=9) classificados como positivos fraco, 24,2% (n=7) como positivos forte e 13,8% (n=4) como positivos moderado. Negatividade para este marcador foi observada em 31,0% (n=9)

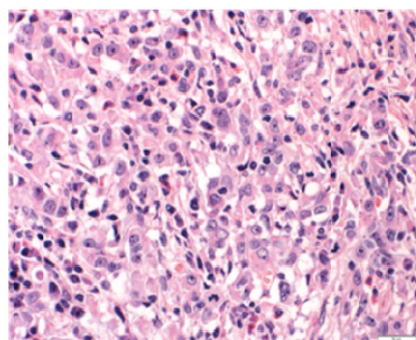
dos casos. (Tabela 2, Figura 2). Em relação ao p53, os pacientes do sexo masculino apresentaram maior prevalência de casos positivos fraco (77,8%;n=7), positivo moderado (75,0%;n=3) e positivo forte (100,0% n=7) que os pacientes do sexo feminino ($p = 0,02$).



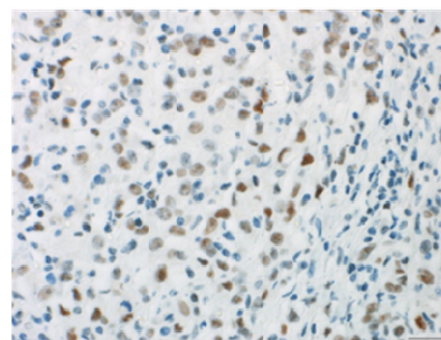
Carcinoma gástrico do tipo intestinal, HE, 200x



Carcinoma gástrico do tipo intestinal, p53+, 200x



Carcinoma gástrico do tipo difuso, HE, 200x



Carcinoma gástrico do tipo difuso, p53+, 200x

Figura 2 - Imagens representativas de carcinomas gástricos positivos para p53

A pesquisa de EBV por hibridização *in situ* cromogênica foi positiva em 13,8% (n=4) dos pacientes (Figura 3).

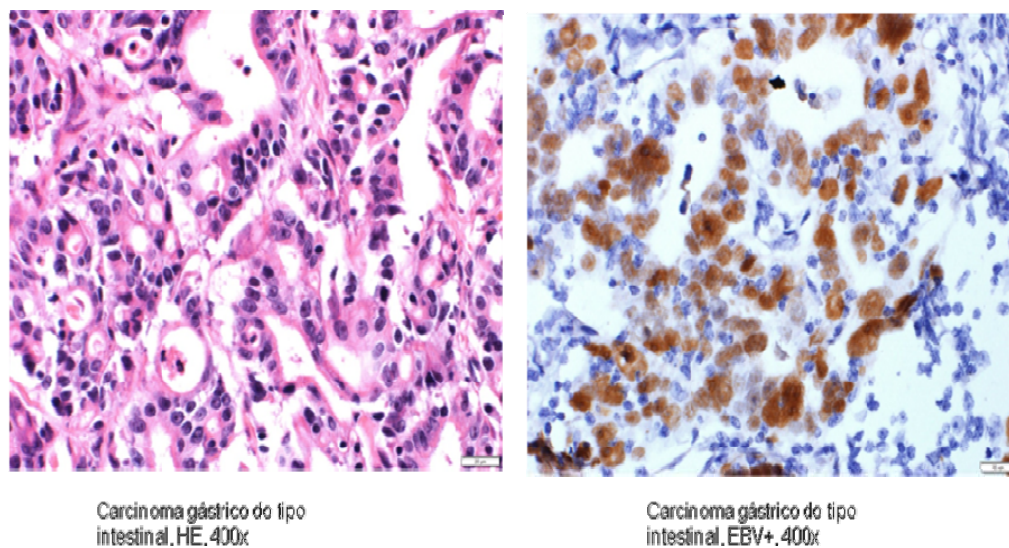


Figura 3 - Imagem representativa de carcinoma gástrico positivo para EBV

4.3 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS EM RELAÇÃO AOS MARCADORES PESQUISADOS

As análises estatísticas de associação entre as variáveis clínicas e histopatológicas estudadas mostraram algumas associações estatisticamente significativas. Observamos associações estatísticas entre a positividade da proteína p53 e o sexo do paciente. Foi demonstrado que a positividade do p53 foi 116% maior nos pacientes do sexo masculino quando comparados a expressão desta proteína nos pacientes do sexo feminino (RP=2,16; IC95%=1,01-5,41; p=0,02).

O percentual de p53 positivo foi estatisticamente diferente (p=0,02) e maior entre os pacientes do sexo masculino quando comparado com os pacientes do sexo feminino.

O subtipo histológico tubular pela classificação da OMS se comportou como fator preditor para negatividade dos marcadores para MLH1 e para PMS2 (RP=0,66; IC95%=0,38-0,99; p=0,02).

As distribuições percentuais e análises estatísticas univariadas das condições clínicas de pacientes com câncer gástrico e os marcadores MLH1/PMS2 e EBV e p53 estão discriminadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Distribuição percentual e análise univariada da expressão de MLH1 e PMS2 em pacientes com câncer gástrico em Cuiabá/MT: 2012-2015.

Variáveis	MLH1 n (%)			PMS2 n (%)		
	Positivo	Negativo	p	Positivo	Negativo	p
Sexo						
Masculino	18 (85,7)	3 (14,3)	0,90	18 (85,7)	3 (14,3)	0,90
Feminino	7 (87,5)	1 (12,5)		7 (87,5)	1 (12,5)	
Idade						
≥ 60 anos	15 (83,3)	3 (16,7)	0,57	15 (83,3)	3 (16,7)	0,57
< 60 anos	10 (90,9)	1 (9,1)		10 (90,9)	1 (9,1)	
Lauren						
Inclassificável	2 (66,7)	1 (33,3)	0,12	2 (66,7)	1 (33,3)	0,12
Difuso	9 (100,0)	0		9 (100,0)	0	
Intestinal	7 (70,0)	3 (30,0)		7 (70,0)	3 (30,0)	
Misto	7 (100,0)	0		7 (100,0)	0	
Classificação OMS						
Anel de sinete	2 (100,0)	0	-	2 (100,0)	0	-
Células isoladas	8 (100,0)	0		8 (100,0)	0	
Medular	0	1 (100,0)		0	1 (100,0)	
Misto	7 (100,0)	0		7 (100,0)	0	
Tubular	5 (62,5)	3 (37,5)		5 (62,5)	3 (37,5)	
Tubular papilífero	3 (100,0)	0		3 (100,0)	0	
Diferenciação						
Pouco	13 (86,7)	2 (13,3)	0,73	13 (86,7)	2 (13,3)	0,73
Moderado	9 (81,8)	2 (18,2)		9 (81,8)	2 (18,2)	
Óbito						
Sim	10 (76,9)	3 (23,1)	0,22	10 (76,9)	3 (23,1)	0,22
Não	14 (93,3)	1 (6,7)		14 (93,3)	1 (6,7)	
Tipo de inflamação						
Ausente	1 (100,0)	0	0,12	1 (100,0)	0	0,12
Leve	15 (100,0)	0		15 (100,0)	0	
Moderada	6 (66,7)	3 (33,3)		6 (66,7)	3 (33,3)	
Intensa	3 (75,0)	1 (25,0)		3 (75,0)	1 (25,0)	
Tamanho do tumor						
T1	4 (100,0)	0	0,78	4 (100,0)	0	0,78
T2	3 (75,0)	1 (25,0)		3 (75,0)	1 (25,0)	
T3	12 (85,7)	2 (14,3)		12 (85,7)	2 (14,3)	
T4	6 (85,7)	1 (14,3)		6 (85,7)	1 (14,3)	
Características dos linfonodos						
N0	10 (83,3)	2 (16,7)	0,64	10 (83,3)	2 (16,7)	0,64
N1	5 (83,3)	1 (16,7)		5 (83,3)	1 (16,7)	
N2	3 (75,0)	1 (25,0)		3 (75,0)	1 (25,0)	
N3	7 (100,0)	0		7 (100,0)	0	
Metástase à distância	3 (100,0)	0	0,46	3 (100,0)	0	0,46
Estadiamento						
I	6 (100,0)	0	-	6 (100,0)	0	-
II	7 (63,6)	4 (36,4)		7 (63,6)	4 (36,4)	
III	9 (100,0)	0		9 (100,0)	0	
IV	3 (100,0)	0		3 (100,0)	0	
Localização						
Antro	14 (82,3)	3 (17,7)	0,83	14 (82,3)	3 (17,7)	0,83
Fundo	2 (100,0)	0		2 (100,0)	0	
Corpo	7 (87,5)	1 (12,5)		7 (87,5)	1 (12,5)	
Píloro	2 (100,0)	0		2 (100,0)	0	
Grau						
G1	3 (100,0)	0	0,32	3 (100,0)	0	0,32
G2	9 (75,0)	3 (25,0)		9 (75,0)	3 (25,0)	
G3	13 (92,9)	1 (7,1)		13 (92,9)	1 (7,1)	
Quimioterapia						
Adjuvante	11 (84,6)	2 (15,4)	0,95	11 (84,6)	2 (15,4)	0,95
Neoadjuvante	2 (100,0)	0	0,53	2 (100,0)	0	0,53
Linfonodo comprometido	14 (87,5)	2 (12,5)	0,75	14 (87,5)	2 (12,5)	0,75

Tabela 2 - Distribuição percentual e análise univariada da expressão de EBV e p53 em pacientes com câncer gástrico em Cuiabá/MT: 2012-2015.

Variáveis	EBV n (%)			p53 n (%)		
	Positivo	Negativo	p	Positivo	Negativo	p
Sexo						
Masculino	3 (14,3)	18 (85,7)	0,90	17 (80,9)	4 (19,1)	0,02
Feminino	1 (12,5)	7 (87,5)		3 (37,5)	5 (62,5)	
Idade						
≥ 60 anos	2 (11,1)	16 (88,9)	0,59	11 (61,1)	7 (38,9)	0,24
< 60 anos	2 (18,2)	9 (81,8)		9 (81,8)	2 (18,2)	
Lauren						
Inclassificável	1 (33,3)	2 (66,7)	0,43	2 (66,7)	1 (33,3)	0,99
Difuso	0	9 (100,0)		6 (66,7)	3 (33,3)	
Intestinal	2 (20,0)	8 (80,0)		7 (70,0)	3 (30,0)	
Misto	1 (14,3)	6 (85,7)		5 (71,4)	2 (28,6)	
Classificação OMS						
Anel de sinete	0	2 (100,0)	0,30	1 (50,0)	1 (50,0)	0,72
Células isoladas	0	8 (100,0)		6 (75,0)	2 (25,0)	
Medular	0	1 (100,0)		1 (100,0)	0	
Misto	1 (14,3)	6 (85,7)		5 (71,4)	2 (28,6)	
Tubular	3 (37,5)	5 (62,5)		6 (75,0)	2 (25,0)	
Tubular papilífero	0	3 (100,0)		1 (33,3)	2 (66,7)	
Diferenciação						
Pouco	1 (6,7)	14 (93,3)	0,15	10 (66,7)	5 (33,3)	0,87
Moderado	3 (27,3)	8 (72,7)		7 (63,6)	4 (36,4)	
Óbito						
Sim	1 (7,7)	12 (92,3)	0,35	9 (69,2)	4 (30,8)	0,81
Não	3 (20,0)	12 (80,0)		11 (73,3)	4 (26,7)	
Tipo de inflamação						
Ausente	0	1 (100,0)	-	1 (100,0)	0	0,27
Leve	1 (6,7)	14 (93,3)		8 (53,3)	7 (46,7)	
Moderada	0	9 (100,0)		8 (88,9)	1 (11,1)	
Intensa	3 (75,0)	1 (25,0)		3 (75,0)	1 (25,0)	
Tamanho do tumor						
T1	2 (50,0)	2 (50,0)	0,10	3 (75,0)	1 (25,0)	0,23
T2	0	4 (100,0)		1 (25,0)	3 (75,0)	
T3	2 (14,3)	12 (85,7)		11 (78,6)	3 (21,4)	
T4	0	7 (100,0)		5 (71,4)	2 (28,6)	
Características dos linfonodos						
N0	3 (25,0)	9 (75,0)	0,29	9 (75,0)	3 (25,0)	0,82
N1	0	6 (100,0)		4 (66,7)	2 (33,3)	
N2	1 (25,0)	3 (75,0)		2 (50,0)	2 (50,0)	
N3	0	7 (100,0)		5 (71,4)	2 (28,6)	

Cont/ Tabela 2

Variáveis	EBV n (%)		p	p53 n (%)		p
	Positivo	Negativo		Positivo	Negativo	
Metástase à distância	3 (100,0)	0	0,46	2 (66,7)	1 (33,3)	0,93
Estadiamento						
I	2 (33,3)	4 (66,7)		3 (50,0)	3 (50,0)	
II	1 (9,1)	10 (99,9)		10 (90,9)	1 (9,1)	
III	1 (11,1)	8 (88,9)		5 (55,6)	4 (44,4)	
IV	0	3 (100,0)	0,45	2 (66,7)	1 (33,3)	0,24
Localização						
Antro	17 (100,0)	0		13 (76,5)	4 (23,5)	
Fundo	1 (50,0)	1 (50,0)		2 (100,0)	0	
Corpo	5 (62,5)	3 (37,5)		4 (50,0)	4 (50,0)	
Piloro	2 (100,0)	0	-	1 (50,0)	1 (50,0)	0,39
Grau						
G1	0	3 (100,0)		1 (33,3)	2 (66,7)	
G2	2 (16,7)	10 (83,3)		9 (75,0)	3 (25,0)	
G3	2 (14,3)	12 (85,7)	0,75	10 (71,4)	4 (28,6)	0,36
Quimioterapia						
Adjuvante	0	13 (100,0)	-	10 (76,9)	3 (23,1)	0,79
Neoadjuvante	0	2 (100,0)	0,62	2 (100,0)	0	0,39
Linfonodo comprometido	1 (6,2)	15 (93,8)	0,16	11 (68,7)	5 (31,3)	0,72

Os valores de p nas tabelas representados pelo “-” (hífen) significam que embora o teste possa apresentar valor estatisticamente significativo, não devem ser considerados pertinentes, pois houve pelo menos uma linha com nenhuma informação em uma das colunas o que empobrece o poder estatístico.

4.4 ANÁLISES DAS TAXAS DE SOBREVIDA GLOBAL

4.4.1 Análises Univariadas

A taxa de óbitos em 5 anos (60 meses) dos pacientes deste estudo foi de 46,4%, representando os óbitos ocorridos em 13 dos 29 pacientes estudados. O tempo mediano de sobrevida foi de 28 meses.

Os resultados das análises univariadas realizadas com as variáveis estudadas e o desfecho óbito estão discriminados na Tabela 3.

Tabela 3 - Análises univariadas de associação entre as variáveis estudadas e o óbito dos pacientes com câncer gástrico operados em Cuiabá/MT: 2012-2015.

Variáveis	Óbito n (%)		p
	Sim	Não	
Sexo			
Masculino	11 (52,4)	10 (47,6)	0,26
Feminino	2 (28,6)	5 (71,4)	
Idade			
≥ 60 anos	10 (58,8)	7 (41,2)	0,11
< 60 anos	3 (27,3)	8 (72,7)	
Lauren			
Inclassificável	3 (100,0)	0	0,29
Difuso	3 (33,3)	6 (66,7)	
Intestinal	4 (40,0)	6 (60,0)	
Misto	3 (50,0)	3 (50,0)	
Classificação OMS			
Anel de sinete	1 (50,0)	1 (50,0)	0,46
Células isoladas	3 (37,5)	5 (62,5)	
Medular	0	1 (100,0)	
Misto	3 (50,0)	3 (50,0)	
Tubular	5 (62,5)	3 (37,5)	
Tubular papilífero	0	3 (100,0)	

Cont/ Tabela 3

Variáveis	Óbito n (%)		p
	Sim	Não	
Diferenciação			
Pouco	9 (60,0)	6 (40,0)	
Moderado	3 (30,0)	7 (70,0)	0,14
MLH1 positivo	10 (41,7)	14 (58,3)	0,24
PMS2 positivo	10 (41,7)	14 (58,3)	0,24
EBV positivo	1 (25,0)	3 (75,0)	0,36
p53			
Negativo	4 (50,0)	4 (50,0)	
Positivo fraco	5 (55,6)	4 (44,4)	
Positivo moderado	1 (25,0)	3 (75,0)	
Positivo forte	3 (42,9)	4 (57,1)	0,87
Tipo de inflamação			
Ausente	0	1 (100,0)	
Leve	6 (42,9)	8 (57,1)	
Moderada	5 (55,6)	4 (44,4)	
Intensa	2 (50,0)	2 (50,0)	0,93
Tamanho do tumor			
T1	0	4 (100,0)	
T2	1 (33,3)	2 (66,7)	
T3	7 (50,0)	7 (50,0)	
T4	5 (71,4)	2 (28,6)	0,14
Características dos linfonodos			
N0	4 (33,3)	8 (66,7)	
N1	3 (60,0)	2 (40,0)	
N2	1 (25,0)	3 (75,0)	
N3	5 (71,4)	2 (28,6)	0,34
Metástase à distância	3 (100,0)	0	0,09
Estadiamento			
I	1 (16,7)	5 (83,3)	
II	4 (40,0)	6 (60,0)	
III	5 (55,6)	4 (44,4)	
IV	3 (100,0)	0	0,12
Localização			
Antro	3 (60,0)	2 (40,0)	
Antro curvatura maior	3 (75,0)	1 (25,0)	
Antro piloro	4 (50,0)	4 (50,0)	
Fundo gástrico	0	1 (100,0)	
Curvatura maior	1 (33,3)	2 (66,7)	
Incisura <i>angularis</i>	0	1 (100,0)	
Curvatura menor	1 (33,3)	2 (66,7)	
Piloro	1 (50,0)	1 (50,0)	
Subcardia	0	1 (100,0)	0,93
Grau			
G1	0	3 (100,0)	
G2	5 (45,4)	6 (54,5)	
G3	8 (57,1)	6 (42,9)	0,27
Quimioterapia			
Adjuvante	6 (46,1)	7 (53,9)	0,50
Neoadjuvante	2 (100,0)	0	0,24
Linfonodo comprometido	9 (56,2)	7 (43,7)	0,21

As variáveis MSH2 e MSH6 apresentaram 100% de positividade, portanto, impossibilitando o teste Qui-quadrado ou exato de Fisher.

Nas análises univariadas foi encontrada associação entre a variável estadiamento clínico e a ocorrência de óbito. Observamos que a taxa de óbito foi 150% maior nos pacientes estadios IV em relação aos outros estadios (RP=2,50; IC95%=1,55-4,04; p=0,049).

A Tabela 4 apresenta os resultados das análises múltiplas (multivariadas) pela regressão de Poisson. O teste de bondade do ajuste (*goodness-of-fit test*) de Hosmer & Lemeshow indica que esse modelo de análises múltiplas foi adequado (p=0,91).

Tabela 4 - Resultados da regressão de Poisson com variância robusta em relação ao óbito em pacientes com câncer gástrico em Cuiabá/MT: 2012-2015.

Fatores Associados	RP	IC95%	p
Idade			
≥ 60 anos	2,61	1,01 – 6,84	0,05
< 60 anos	1		
Diferenciação			
Moderado	0,50	0,21 – 1,21	0,12
Pouco	1		
Linfonodo comprometido			
Sim	1,80	0,76 – 4,25	0,18
Não	1		

RP: Razão de Prevalências.

Nestas análises observamos que a idade é um fator de risco importante para o óbito nos pacientes com carcinomas gástricos. O óbito foi 161% maior nos pacientes com idade ≥ 60 anos do que aqueles com idade < 60 anos, independentemente da diferenciação do tumor ou da presença de linfonodos comprometidos.

Este achado é a interpretação do $RP = 2,61$, podendo ser comparada com “redução relativa do risco (RRR)” calculada da seguinte forma: $(RP - 1) \times 100$ e fornecendo o tamanho do risco. Logo: $2,61 - 1 = 1,61 \times 100 = 161\%$.

4.4.2 Curvas de Sobrevida Global das Análises Univariadas

As análises univariadas das taxas de sobrevida global foram realizadas para todas as variáveis estudadas e observamos diferenças estatisticamente significativas para o tipo histológico de acordo com a classificação de Lauren, classificação da OMS e tratamento quimioterápico neoadjuvante.

A probabilidade de sobrevida global em 5 anos para os pacientes com câncer gástrico de acordo com a classificação Lauren revelou que a probabilidade mediana de sobrevida foi de um mês após o diagnóstico para o tipo inclassificável, 27 meses para o tipo difuso, 13 meses para o tipo intestinal e 24 meses para o tipo misto. Estes dados podem ser vistos na Figura 4.

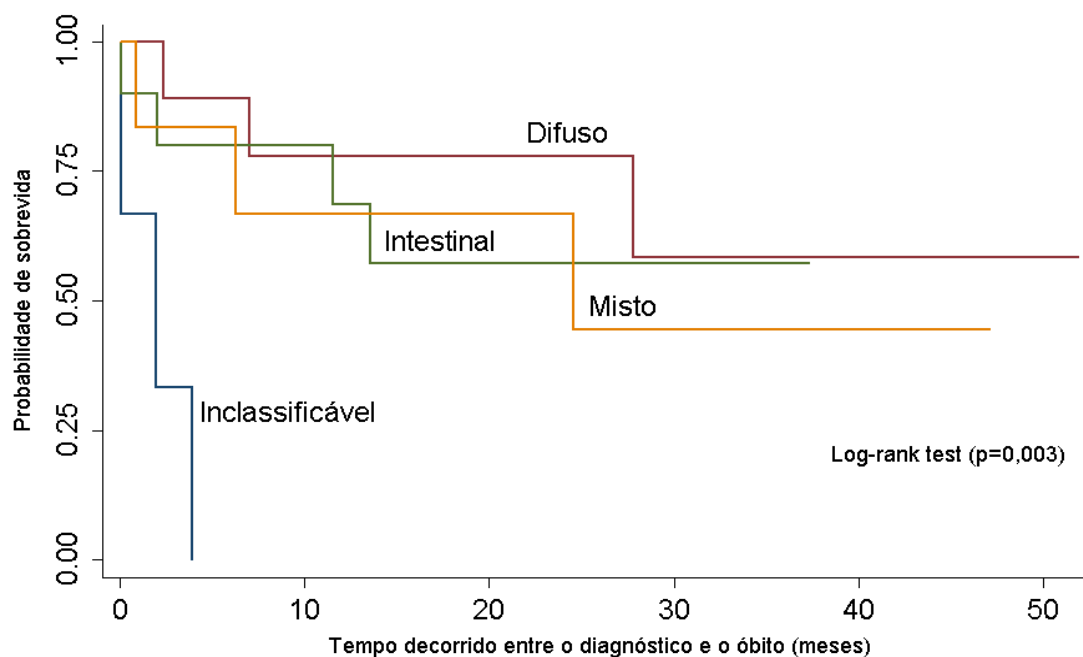


Figura 4 - Probabilidade de sobrevida global em 5 anos dos pacientes com câncer gástrico (Cuiabá/MT: 2012-2015) segundo classificação histopatológica de Lauren.

As análises da probabilidade de sobrevida dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a classificação da OMS mostrou que a probabilidade mediana de sobrevida para o tipo anel de sinete foi de dois meses (60 dias) após o diagnóstico, 27 meses para o tipo de células isoladas, 24 meses para o tipo misto, 11 meses para o tipo tubular e menos que um mês para o tipo medular. Não houve óbitos nos pacientes classificados como tubular papilífero. As curvas de sobrevida destes pacientes estão demonstradas na Figura 5.

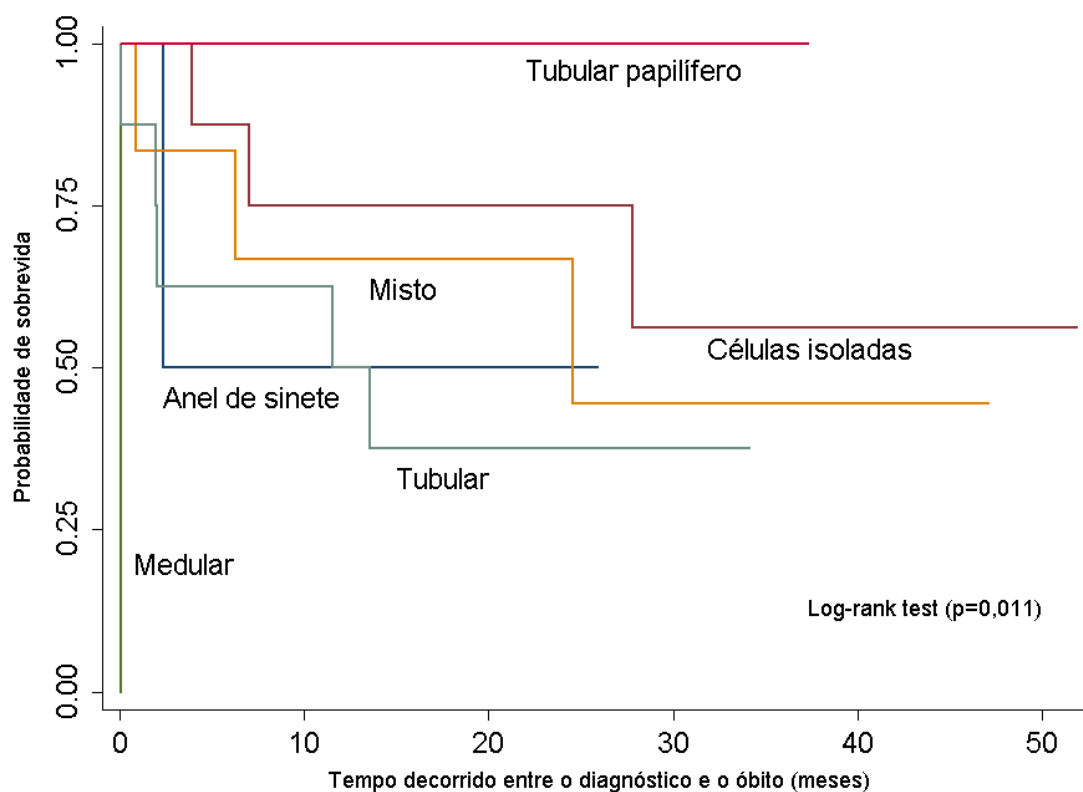


Figura 5 - Probabilidade de sobrevida em pacientes com câncer gástrico (Cuiabá/MT: 2012-2015) segundo classificação da OMS.

O tratamento quimioterápico neoadjuvante foi um fator que mostrou associação com a probabilidade de sobrevida em pacientes com câncer gástrico. A probabilidade mediana de sobrevida para os pacientes que não realizaram a quimioterapia neoadjuvante foi de 27 meses após o diagnóstico de câncer gástrico, mas entre os que fizeram quimioterapia neoadjuvante foi de um mês após o diagnóstico. As curvas representativas destes dados podem ser vistas na Figura 6.

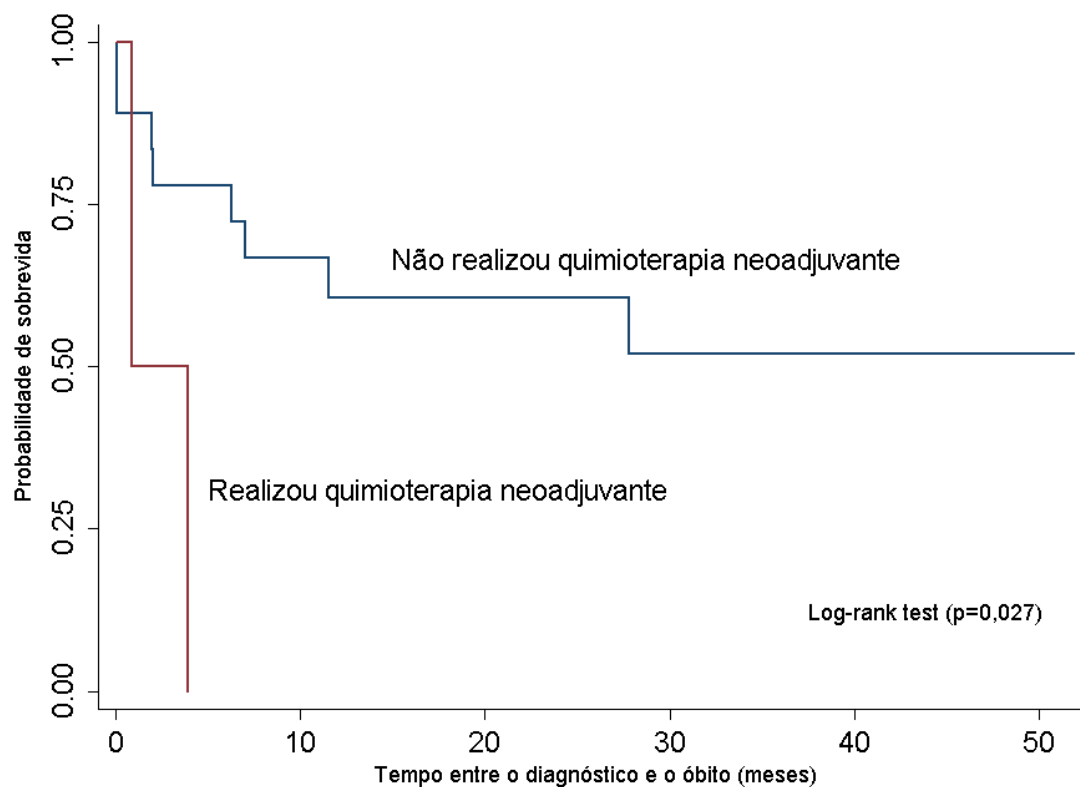


Figura 6 - Probabilidade de sobrevida em pacientes com câncer gástrico (Cuiabá/MT: 2012-2015) segundo a realização de quimioterapia neoadjuvante.

A probabilidade mediana de sobrevida entre pacientes com câncer gástrico ocorreu com 28 meses (IC95%=27-66) após o diagnóstico (Figura 7).

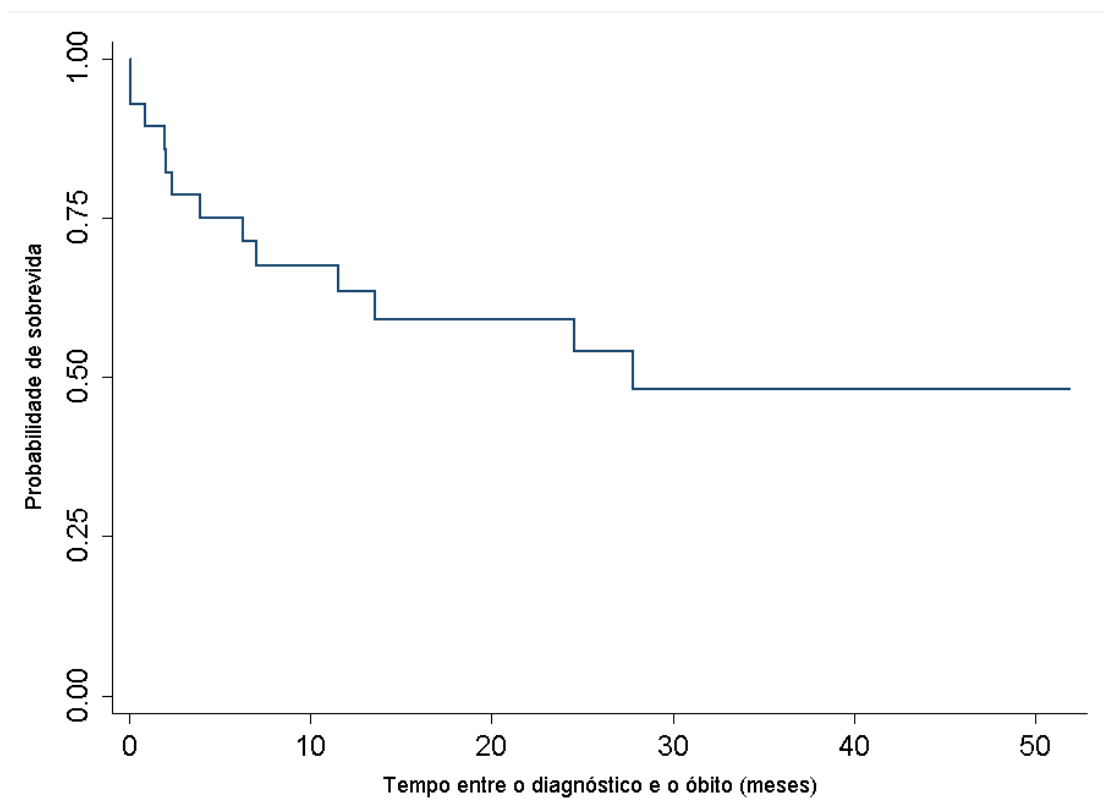


Figura 7 - Probabilidade de sobrevivência em pacientes com câncer gástrico (Cuiabá/MT: 2012-2015).

5 DISCUSSÃO

A classificação histológica de Lauren que divide os tumores gástricos em intestinal e difuso bem como a classificação da OMS são amplamente utilizadas no mundo, porém, não são suficientes para prever resultados bem como direcionar terapias alvo para melhor resposta clínica do paciente. Diante da dificuldade de correlacionar aspectos histológicos do tumor como preditores de resposta ao tratamento surgiu nos últimos anos técnicas moleculares que revolucionaram o cenário da oncologia (STRAND et al. 2017).

Dois dos maiores grupos de pesquisa em câncer do mundo o *The Cancer Genome Atlas Research Group* (TCGA) e *Asian Cancer Research Group* (ACRG) classificaram os carcinomas gástricos em 4 subtipos moleculares:

- ✓ **Classificação TCGA** - 1. CG com instabilidade de microssatélites (MSI), CG EBV – positivo (EBV), CG genomicamente estável (GS) e CG cromossomicamente instável (CIN)
- ✓ **Classificação ACRG** - CG com instabilidade de microssatélites (MSI), CG com características de transição epitélio-mesênquima (EMT), CG com TP53-ativo (TP53+) ou TP53 inativo (TP53-).

Esses subtipos moleculares surgiram após as análises de sequenciamentos dos éxons do DNA, análises do número de cópias

somáticas, perfis de metilação do DNA, sequenciamentos do RNA mensageiro e microRNA e análises de expressão de proteínas.

Em nosso estudo, tínhamos a preocupação de que os resultados obtidos pelas análises imuno-histoquímicas seriam equivalentes aos resultados das análises moleculares, porém, alguns trabalhos que avaliaram essa correlação fenótipo x genótipo mostraram uma alta concordância (SHIA et al. 2009; YUAN et al. 2015; SMYTH et al. 2017).

Em consonância com os objetivos primários de analisar a perda de expressão de proteínas de reparo MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6 em pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico submetidos a gastrectomia no Hospital de Câncer de Mato Grosso bem como, secundariamente, estudar o comportamento clínico dos pacientes com CG EBV+, p53+ e presença de inflamação neste mesmo grupo de pacientes percebemos que apenas 13,8% (n=4) dos pacientes apresentaram perda de expressão para as proteínas MLH1 e PMS2 e nenhum paciente apresentou a perda de expressão de MSH2 e MSH6, caracterizando a presença de MSI nestes 4 pacientes.

A semelhança do observado no estudo da ACRG, nossos pacientes com MSI eram do tipo intestinal em três casos e um inclassificável de acordo com a classificação de Lauren. Nenhum caso do tipo difuso apresentou MSI. Além disso, em nossa casuística, de acordo com a classificação da OMS os pacientes com subtipo tubular teriam maior probabilidade de apresentar MSI. Nos dados do TCGA, a presença de EBV positivo foi de 9%, instabilidade microssatélite de 22%, genômicamente estável de 20% e instabilidade

cromossômica por mutação do TP 53 com 50% de prevalência. Comparando com nossos resultados percebemos uma proporção relativamente semelhante, porém tendendo a uma maior concentração de indivíduos com instabilidade cromossômica.

Com relação à presença do EBV, 13,2% (n=4) foram positivos para a presença do vírus e em relação a expressão do p53, 69% (n=20) apresentaram positividade. A inflamação estava presente em todos os casos sendo o grau leve o mais prevalente.

No que tange o fator inflamação que é avaliado pela presença de células inflamatórias no microambiente tumoral em nossa amostra se mostrou robusta em todos os casos. Segundo HANAHAN e WEINBERG em 2011 a resposta inflamatória ao câncer tem o efeito paradoxal de estimular o crescimento das células cancerígenas através de moléculas bioativas que estimulam a proliferação celular e inibição da morte celular programada favorecendo a progressão da doença e formação de metástases. Tais aspectos são relevantes tendo em vista a possibilidade do uso de imunoterapias no combate desta neoplasia.

Em nossa casuística chama a atenção a quantidades de pacientes em estadios avançados. Dos 29 pacientes 72,4% (n=21) estavam entre T3 e T4, 58,6% apresentaram linfonodos comprometidos (n=17) e 10,3% (n=3) metástases a distância.

Segundo o *Global Burden of Disease Cancer Collaboration* (2017) o câncer de estômago continua sendo uma doença agressiva, mortal e de diagnóstico em estadios avançados. No Brasil analisando dados de uma

instituição de referencia COSTA JUNIOR (2009) também notou a escassez de diagnostico precoces sendo os estadios II e III os mais encontrados.

Em relação a diferenciação tumoral, tumores graus dois e três prevaleceram em 89,7% (n=26) dos casos sugerindo tumores mais agressivos.

Em relação à localização da lesão a maioria 65,7% (n=19) encontrava-se no terço proximal, 3,4% (n=1) no terço distal e 30,9% (n=9) no terço médio do estômago. Não foi encontrada nenhuma lesão em transição esôfago-gástrica em nossa amostra.

Em nosso trabalho os tumores com MSI estavam localizados no antro em três dos quatro os casos. Os tumores EBV positivos estavam presentes no terço médio e distal do estômago enquanto os tumores p53 positivos estavam distribuídos por todas as áreas do estômago.

Apesar da maioria de nossa amostragem tratar de tumores localmente avançados nota-se uma baixa indicação de terapia neoadjuvante. Apenas dois pacientes adotaram essa estratégia. Talvez a justificativa para isso seja a predominância de pacientes do SUS (Sistema Único de Saúde), baixo nível sócio-econômico e falta de logística para atender esse protocolo.

Numa recente atualização publicada na revista JAMA, SMYTH et al. (2017) fizeram uma atualização do estudo MAGIC onde eram incluídos pacientes portadores de adenocarcinoma gastro-esofágico submetidos a cirurgia apenas ou quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia. Neste estudo, o objetivo primário era associar a perda de expressão de genes de

reparo e instabilidade microssatélite com a sobrevida e resposta a quimioterapia. O que se pôde extrair deste trabalho foi que pacientes tratados apenas com cirurgia que apresentaram MSI tiveram uma sobrevida melhor em comparação com quem não tinha MSI, em contra partida quem apresentava MSI e foi submetido à neoadjuvância obteve um resultado pior em comparação com quem não apresentava MSI.

Em nosso estudo numa análise univariada comparando as variáveis explicativas com desfecho óbito não foi identificada associação no que se refere ao sexo, idade, diferenciação, MSI, p53, inflamação, tamanho do tumor, linfonodos comprometidos, metástases a distância, estadiamento, localização, grau nuclear e quimioterapia. Talvez isso seja em decorrência da principal crítica ao nosso trabalho que foi o número de casos muito reduzido o que pode ter interferido na análise estatística.

Apesar desta problemática o estadiamento IV se mostrou preditor de mortalidade aumentando o risco em 150%.

Com relação às análises múltiplas comparando a idade, diferenciação e linfonodo positivos ou não, a idade se mostrou um fator de risco independente com aumento de 161% da mortalidade.

Em nosso estudo analisamos a probabilidade de sobrevida em pacientes com câncer gástrico de acordo com a classificação de Lauren. Em nossa casuística o tipo inclassificável obteve o pior cenário com mediana de tempo de sobrevida de 1 mês após o diagnóstico seguida de 13 meses para o tipo intestinal, 24 meses para o tipo misto e 27 meses para o tipo difuso.

Semelhante aos nossos resultados, o estudo de KIM et al. (2017) analisou a sobrevida global do câncer gástrico precoce em relação a classificação de Lauren e identificou pior prognóstico no tipo misto quando diagnosticado em fases mais avançadas.

Também analisamos a probabilidade de sobrevida dos pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico de acordo com a classificação da OMS. Em nossa casuística a probabilidade mediana de sobrevida para o tipo anel de sinete foi de 2 meses após o diagnóstico, 27 dias para o tipo células isoladas, 24 dias para o tipo misto, 11 meses para o tipo tubular e menos que 1 mês para o tipo medular. Com relação ao subtipo tubular papilífero não houve óbito até a data estipulada.

Muitos trabalhos tentam associar as classificações histológicas como preditores de metástases linfonodais para melhor estadiamento do paciente, principalmente para tornar mais eficiente o manejo no câncer gástrico precoce. Neste cenário, PYO et al. (2017) publicaram um trabalho comparando o efeito da classificação histológica da OMS para câncer gástrico para prever metástases linfonodais em câncer gástrico precoce. Nele foram analisadas diversas variáveis sendo a classificação da OMS útil e necessária como parâmetro para metástases linfonodais. Apesar desse esforço de melhor selecionar o paciente, a taxa de recidiva local e metástases ainda são muito grandes.

Estes achados reforçam a necessidade de aprofundar a investigação na busca da individualização do tratamento do câncer.

Apesar do número reduzido da nossa amostra foi possível elaborar uma análise univariada entre as variáveis explicativas e os marcadores biológicos MLH1, PMS2, EBV e p53.

Encontramos que o sexo masculino foi relacionado com maior positividade para o p53. A classificação de Lauren não se relacionou com os possíveis perfis moleculares porém na classificação da OMS o subtipo tubular tende a ser mais propício a MSI em relação aos outros subtipos.

As instabilidades de microssatélites foram encontradas em CG estágio II o que pode levar a crer que a progressão da doença nesses casos é mais lenta em comparação com os outros tipos de mutação.

A positividade para EBV foi mais encontrada em tumores localizados no terço médio do estômago em relação às outras localizações.

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- Analise retrospectiva
- Número reduzido de pacientes
- Baixo poder analítico

7 CONCLUSÃO

- ✓ Avaliando a expressão das proteínas de reparo do DNA, a instabilidade de microssatélites é uma alteração que se encontrou presente em 13,8% dos pacientes portadores de câncer gástrico;
- ✓ A expressão de p53 foi mais frequente em homens porém não se correlacionou com as outras variáveis estudadas;
- ✓ O EBV esteve mais associado aos tumores localizados no terço médio do estômago porém sem significância estatística e o infiltrado inflamatório esteve presente, apesar de graus variados, em todos os casos da amostra;
- ✓ O subtipo tubular do câncer gástrico pela OMS parece estar mais associado a MSI;
- ✓ Não foi possível associar a MSI, p53, EBV e inflamação com as taxas de sobrevida.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

[ACS] American Cancer Society. **Stomach cancer**. Available from: <URL:<https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer.html>> [2017 mai. 25].

[Anonymous] Epidemiology of, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. The EUROGAST Study Group. **Gut** 1993; 34:1672-6.

Ahn JR, Jung M, Kim C, et al. Prognosis of pN3 stage gastric cancer. **Cancer Res Treat** 2009; 41:73-9.

Bacani J, Zwingerman R, Di Nicola N, et al. Tumor microsatellite instability in early onset gastric cancer. **J Mol Diagn** 2005; 7:465-77.

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. **Lancet Oncol** 2012; 13:790-801.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature** 2014; 513:2019-9.

Correa P. The biological model of gastric carcinogenesis. **IARC Sci Publ** 2004; (157):301-10.

Costa Junior WL. **Fatores clinicopatológicos na avaliação de adjuvância e sobrevivência de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico por câncer gástrico**. São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2006; 12:354-62.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7^a ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Stomach; p.99-106.

Fenoglio-Preiser C, Carneiro F, Correa P. Gastric carcinoma. In: Hamilton SR, Aaltonen LA. **Pathology & genetics tumours of the digestive system**. Lyon: IARC Press; 2000. p.37-66.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer** 2015; 136:E359-86.

Fleisher AS, Esteller M, Wang S, et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. **Cancer Res** 1999; 59:1090-5.

Fujimura T, Nakamura K, Oyama K, et al. Selective lymphadenectomy of para-aortic lymph nodes for advanced gastric cancer. **Oncol Rep** 2009; 22:509-14.

Giganti F, Orsenigo E, Arcidiacono PG, et al. Preoperative locoregional staging of gastric cancer: is there a place for magnetic resonance imaging? Prospective comparison with EUS and multidetector computed tomography. **Gastric Cancer** 2016; 19:216-25.

Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 Cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA Oncol** 2017; 3:524-48.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-75.

Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. **J Gastrointest Oncol** 2012; 3:251-61.

Kim YH, Kim JH, Kim H, et al. Is the recent WHO histological classification for gastric cancer helpful for application to endoscopic resection? **Gastric Cancer** 2016; 19:869-75.

Kodera Y. The current state of stomach cancer surgery in the world. **Jpn J Clin Oncol** 2016 Aug 30. [Epub ahead of print]

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.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature** 1998; 396:643-9.

Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. **N Engl J Med** 2001; 345:725-30.

Marshall BJ, McGeachie DB, Rogers PA, Glancy RJ Pyloric Campylobacter infection and gastroduodenal disease. **Med J Aust** 1985; 142:439-44.

McCulloch P, Nita ME, Kazi H, Gama-Rodrigues J. Extended versus limited lymph nodes dissection technique for adenocarcinoma of the stomach. **Cochrane Database Syst Rev** 2004; (4):CD001964.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2016 incidência de câncer no brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>. [2017 mai. 25]

Parkin DM, Stjernswärd J, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. **Bull World Health Organ** 1984; 62:163-82.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin** 2005; 55:74-108.

Pyo JH, Lee H, Min BH, et al. Early gastric cancer with a mixed-type Lauren classification is more aggressive and exhibits greater lymph node metastasis. **J Gastroenterol** 2017; 52:594-601.

Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. **N Engl J Med** 2007; 357:1810-20.

Sano T, Okuyama Y, Kobori O, Shimizu T, Morioka Y. Early gastric cancer. Endoscopic diagnosis of depth of invasion. **Dig Dis Sci** 1990; 35:1340-4.

Shia J, Tang LH, Vakiani E, et al. Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:1639-45.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin** 2016; 66:7-30.

Smyth EC, Wotherspoon A, Peckitt C. Mismatch repair deficiency, microsatellite instability, and survival. **JAMA Oncol** 2017; 3:1197-1203.

Soma N. Diagnosis of Helicobacter pylori-related chronic gastritis, gastric adenoma and early gastric cancer by magnifying endoscopy. **J Dig Dis** 2016; 17:641-51.

Songun I, Putter H, Kranenbarg EM, Sasako M, van de Velde CJ. Surgical treatment of gastric cancer: 15-year follow-up results of the randomised nationwide Dutch D1D2 trial. **Lancet Oncol** 2010; 11:439-49.

Strand MS, Lockhart AC, Fields RC. Genetics of gastric cancer. **Surg Clin North Am** 2017; 97:345-70.

Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet** 1993; 1:1273-5.

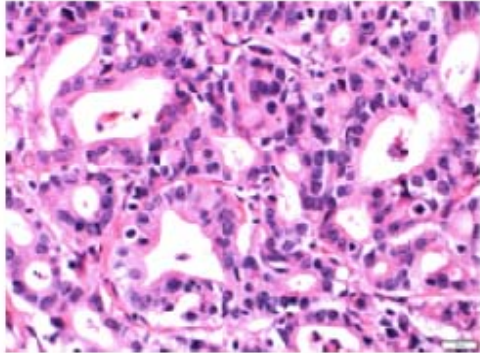
Yuan L, Chi Y, Chen W, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. **Int J Clin Exp Med** 2015; 8:20988-1000.

Anexo 1 – Classificação TNM

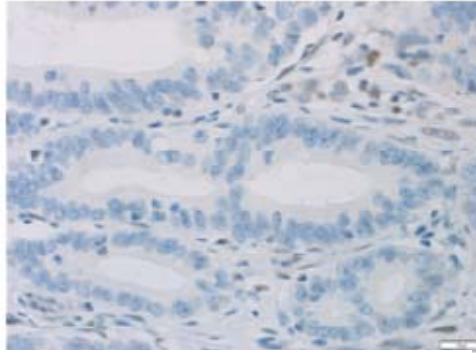
<i>Estádio T</i>	<i>Comprometimento</i>
T1	Mucosa e submucosa
T2	Muscular própria e subserosa
T2a	Muscular própria
T2b	Subserosa
T3	Invasão de serosa
T4	Estruturas adjacentes
Estádio N	
N0	Ausência de linfonodos comprometidos
N1	1 a 6 linfonodos comprometidos
N2	7 a 15 linfonodos comprometidos
N3	Mais de 15 linfonodos comprometidos
Estádio M	
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância

<i>Estádio clínico</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
II	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
IIIB	T3	N2	M0
IV	T4	N1, N2	M0
	qqT	N3	M0
	qqT	qqN	M1

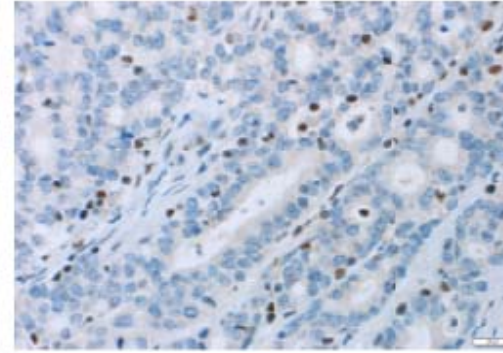
Anexo 2 – Reações imunohistoquímicas dos marcadores analisados



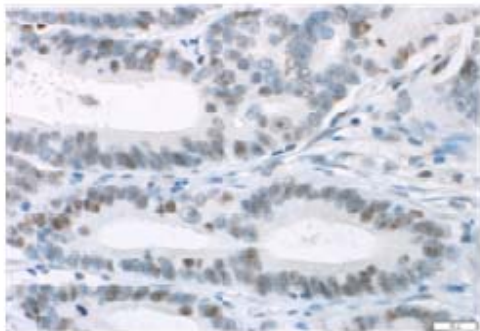
Carcinoma gástrico do tipo intestinal CCM moderado infiltrado linfócito intratumoral. HE, 400x



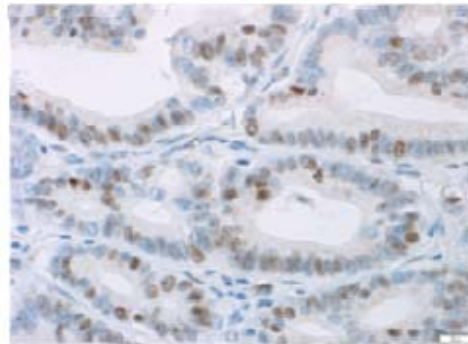
Carcinoma gástrico do tipo intestinal negativo para MLH1. Presença de linfócitos intratumorais positivos. IMH, 400x



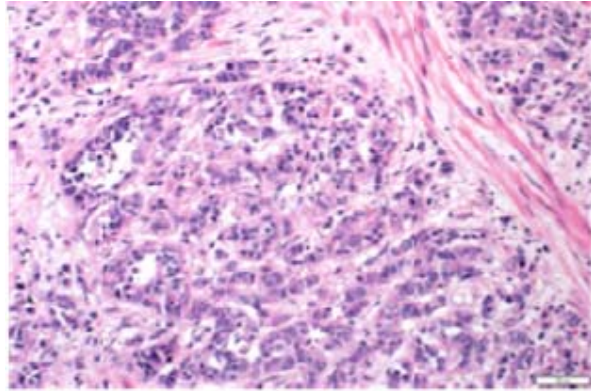
Carcinoma gástrico do tipo intestinal negativo para PMS2. Presença de linfócitos intratumorais positivos. IMH, 400x



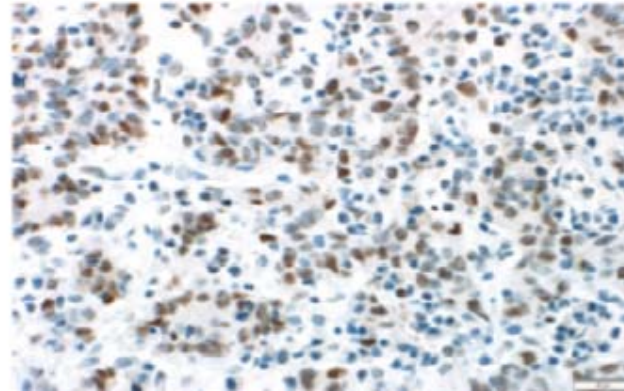
Carcinoma gástrico do tipo Intestinal, positivo para MSH2 por IMH. 400x



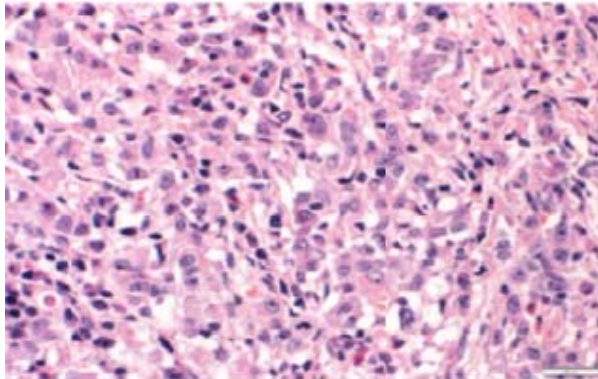
Carcinoma gástrico do tipo Intestinal, negativo para MSH6 por IMH. 400x



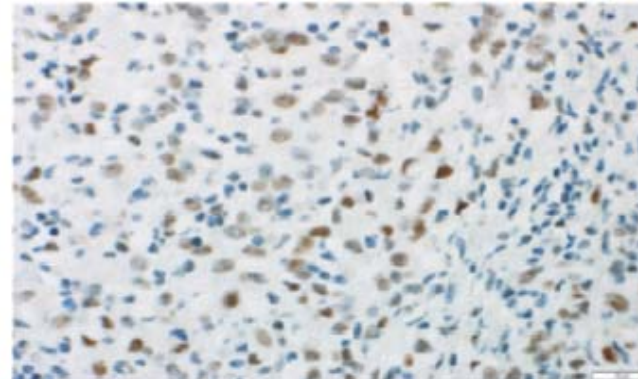
Carcinoma gástrico do tipo intestinal. HE, 200x



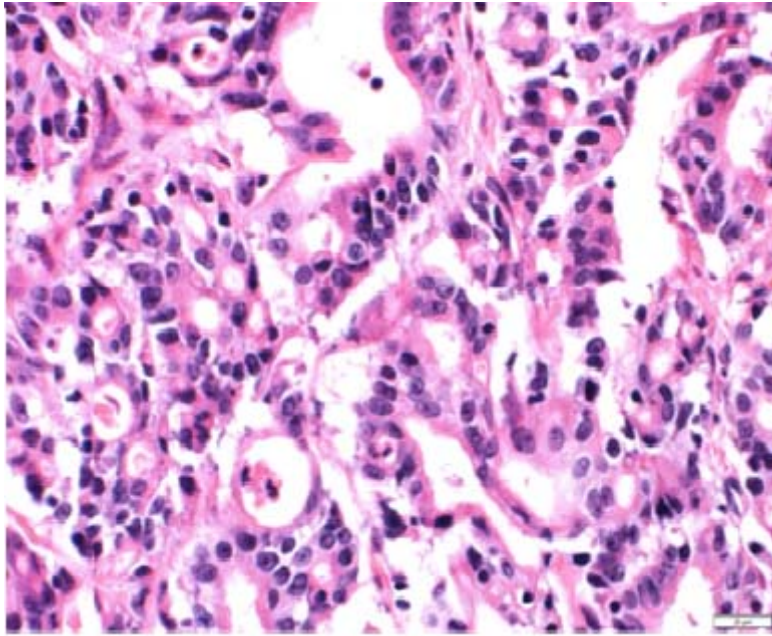
Carcinoma gástrico do tipo difuso. p53, 200x



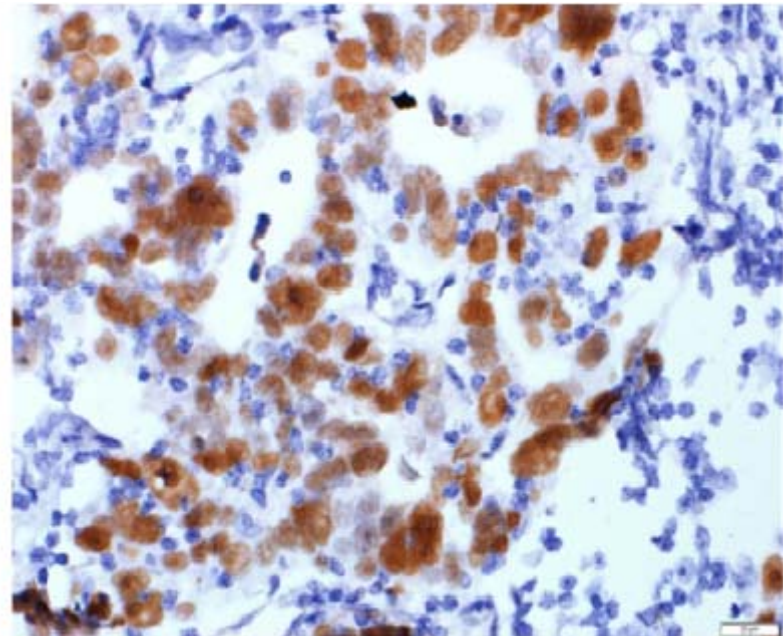
Carcinoma gástrico do tipo difuso. HE, 200x



Carcinoma gástrico do tipo difuso. p53, 200x



Carcinoma gástrico do tipo intestinal. HE, 400x



Carcinoma gástrico do tipo intestinal. EBV, 400x