

CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DOS CARCINOMAS GÁSTRICOS

MARIA DIRLEI BEGNAMI

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do Título de Doutorado em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

São Paulo

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Begnami, Maria Dirlei

Classificação molecular dos carcinomas gástricos / Maria Dirlei Begnami – São Paulo, 2007.

135p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CÂNCER GÁSTRICO/classificação. 2. CÂNCER GÁSTRICO/diagnóstico. 3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR. 4. IMUNOHISTOQUÍMICA. 5. BIOLOGIA MOLECULAR/métodos.

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

Begnami MD. **Classificação molecular dos carcinomas gástricos**. São Paulo; 2007.
[Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Embora tenhamos observado uma queda importante de sua incidência nos últimos anos, o carcinoma gástrico continua sendo uma das principais causas de morte por câncer no mundo. O prognóstico dos carcinomas gástricos não mudou muito nos últimos anos e é dependente principalmente do estadiamento e do grau histológico do tumor, porém estes indicadores não são preditivos de progressão tumoral. Variáveis ligadas ao paciente, ao tratamento e a biologia tumoral podem fornecer maiores informações em relação ao comportamento destas neoplasias. O tratamento dos carcinomas gástricos é eminentemente cirúrgico e há um consenso que o tipo de excisão cirúrgica é relevante à sobrevida. Análises moleculares recentes têm demonstrado que muitas alterações genéticas como nos genes p53, β -catenina, E-caderina e c-erbB-2 entre outros, estão associadas à carcinogênese gástrica. Estudos anteriores mostraram que há genes diferencialmente expressos na mucosa tumoral em comparação à normal e nos carcinomas gástricos do tipo intestinal, mas uma classificação dos tumores gástricos baseada nos padrões de expressão protéica de múltiplos genes ainda não foi proposta. Nosso estudo demonstrou por imunohistoquímica que os carcinomas gástricos frequentemente expressam proteínas associadas ao ciclo celular, fatores de crescimento, adesão, transcrição e diferenciação celulares, além das sintases do óxido nítrico e através das análises clusterizadas destes resultados caracterizamos 2 grupos de carcinomas gástricos. Estes resultados são importantes, pois fornecem novas bases moleculares para desvendar os mecanismos biológicos da carcinogênese gástrica, além de oferecer novos marcadores diagnósticos bem como alvos terapêuticos para o desenvolvimento de drogas específicas.

SUMMARY

Begnami MD. [**Molecular classification of gastric cancer**]. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Although its incidence is declining in the last years, gastric cancer remains one of the leading causes of cancer death in the world. The prognosis of gastric cancer did not change and depends mainly of staging and tumor histological grade, but these indicators are not predictive of tumoral progression. Features concerning to patient, treatment, and tumoral biology may provide more evidence regarding tumoral behavior. The surgical treatment is mainstay and there is a consensus about the excision type and better prognosis. Recently, molecular investigations have provided evidence that multiple genetic alterations such as p53, β -catenina, E-caderina e c-erbB-2 are involved in gastric carcinogenesis. Previous studies showed differentially expressed genes in gastric tumors in comparison to normal mucosae, and in intestinal type of gastric carcinoma, but a classification of gastric carcinomas based on patterns of protein expression of multiple genes have not ever been demonstrated. Using immunohistochemistry, our study showed frequently expression of proteins related with cell cycle, growth factors, cell adhesion, transcription, cell differentiation and oxide nitric synthases. Two groups of gastric cancer were identified by clustering analyses. These results are important not only providing new molecular basis for understanding biological properties of gastric carcinogenesis, but also useful resources for diagnostic markers and therapeutic targets for new drugs development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gráfico de seqüência e passos da carcinogênese gástrica e os principais mecanismos moleculares associados	6
Figura 2	Esquema representativo da montagem dos blocos de TMA	19
Figura 3	Design do TMA	33
Figura 4	Carcinomas gástricos com expressão imunoistoquímica das proteínas associadas a apoptose	34
Figura 5	Carcinomas gástricos com expressão imunoistoquímica de proteínas de genes associados ao ciclo celular	36
Figura 6	Carcinomas intestinais e difusos com expressão imunoistoquímica de proteínas de genes associados a fatores de crescimento	37
Figura 7	Carcinomas gástricos com expressão imunoistoquímica de proteínas dos genes associados à adesão, diferenciação e transcrição celular	38
Figura 8	Carcinomas gástricos com expressão imunoistoquímica para APC, clatrina, β -catenina e E-caderina	39
Figura 9	Carcinomas gástricos com expressão imunoistoquímica das proteínas das sintases do óxido nítrico	40
Figura 10	Curvas de sobrevividas de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas gástricos de até 60 anos e com mais de 60 anos	70

- Figura 11** Curvas de sobrevivência de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas gástricos positivos e negativos para TGF β II 70
- Figura 12** Curvas de sobrevivência de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas gástricos em relação ao estágio clínico 71
- Figura 13** Curvas de sobrevivência de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas intestinais em relação ao estágio clínico 73
- Figura 14** Curvas de sobrevivência de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas intestinais positivos e negativos para clatrina 73
- Figura 15** Curvas de sobrevivência de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas difusos em relação ao estágio clínico 75
- Figura 16** Curvas de sobrevivência de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas intestinais positivos e negativos para P53 76
- Figura 17** Curvas de sobrevivência de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas difusos de até 60 anos e com mais de 60 anos 76
- Figura 18** Curvas de sobrevivência de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas difusos positivos e negativos para TGF β II 77
- Figura 19** Classificação dos carcinomas gástricos usando a análise clusterizada dos marcadores imunoistoquímicos 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais alterações genéticas descritas nos carcinomas gástricos	7
Tabela 2	Anticorpos analisados por imunistoquímica, clones, origem, diluição e padrão de expressão considerada	25
Tabela 3	Principais características demográficas e histopatológicas dos carcinomas gástricos	30
Tabela 4	Resultados das expressões imunistoquímicas das proteínas dos genes associados ao ciclo celular, fatores de crescimento e apoptose	35
Tabela 5	Resultados das expressões imunistoquímicas das proteínas dos genes associados à transcrição de sinal, adesão e diferenciação celular	39
Tabela 6	Resultados das expressões imunistoquímicas das proteínas das sintases do óxido nítrico	40
Tabela 7	Comparações entre as principais características demográficas e histopatológicas e os tipos de carcinomas gástricos	43
Tabela 8	Associações entre as expressões imunistoquímicas das proteínas dos genes de transcrição de sinal, adesão e diferenciação celular e os tipos de carcinomas gástricos	49
Tabela 9	Associações entre as expressões imunistoquímicas das proteínas dos genes associados a apoptose e os tipos de carcinomas gástricos	50
Tabela 10	Associações entre as expressões imunistoquímicas das proteínas dos genes associados ao ciclo celular e os tipos de carcinomas gástricos	50

Tabela 11 Associações entre as expressões imunoistoquímicas das proteínas dos genes associados a fatores de crescimento e os tipos de carcinomas gástricos	51
Tabela 12 Associações entre as expressões imunoistoquímicas das proteínas das sintases do óxido nítrico e os tipos de carcinomas gástricos	51
Tabela 13 Análise univariada dos parâmetros clínicos e histológicos em relação à sobrevida global em 5 anos dos pacientes com carcinomas gástricos	54
Tabela 14 Análise univariada das proteínas estudadas por imunoistoquímica em relação à sobrevida global dos 482 pacientes em 5 anos	56
Tabela 15 Análise univariada dos parâmetros clínicos e histológicos em relação à sobrevida global dos pacientes com carcinomas gástricos do tipo intestinal	59
Tabela 16 Análise univariada das expressões imunoistoquímicas das proteínas em relação à sobrevida global em 5 anos dos pacientes com carcinomas gástricos intestinais	61
Tabela 17 Análise univariada dos parâmetros clínicos e histológicos em relação à sobrevida global dos pacientes com carcinomas gástricos do tipo difuso	64
Tabela 18 Análise univariada das expressões imunoistoquímicas das proteínas em relação à sobrevida global em 5 anos dos pacientes com carcinomas gástricos difusos	66
Tabela 19 Análise multivariada dos 482 carcinomas gástricos. Modelo de regressão de Cox com as variáveis: idade, estágio e expressão de TGFβII	68

Tabela 20 Análise multivariada dos 234 carcinomas intestinais. Modelo de regressão de Cox com as variáveis: expressão de clatrina e estágio clínico	72
Tabela 21 Análise multivariada dos 166 carcinomas difusos. Modelo de regressão de Cox com as variáveis: idade, estágio clínico, expressão de TGF β II e p53	74
Tabela 22 Associações entre as variáveis clínicas e histológicas e os grupos clusterizados pelo teste exato de Fisher ou qui-quadrado	81

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>H pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
LOH	perda de heterozigozidade
EGFR	receptor do fator de crescimento epitelial
EGF	fator de crescimento epitelial
TGF	fator de crescimento transformante
APC	polipose adenomatose cólica
Tcf	fator de reconhecimento linfóide de células T
GSK	glicogênio sintase quinase
Kb	kilobyte
Rb	retinoblastoma
Cdk	ciclina dependente de quinase
TMA	tissue microarray
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
MMP	metaloproteinase
MUC	mucina
NOS	sintase do óxido nítrico
H&E	hematoxilina e eosina
n	número de casos
NS	não significante
OMS	Organização Mundial de Saúde

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Mecanismos Moleculares da Carcinogênese Gástrica	
1.1.1	Genes Supressores de Tumor	
1.1.2	Moléculas de Adesão Celular (E-Caderina)	
1.1.3	Oncogenes	
1.1.4	Reguladores do Ciclo Celular	
1.1.5	Fatores de Crescimento e Citocinas	
1.1.6	Mucinas	
2	OBJETIVOS	
3	MATERIAL E MÉTODOS	
3.1	Casuística	
3.2	Construção dos TMAS	
3.3	Imunoistoquímica	
3.4	Avaliação das Expressões Imunoistoquímicas	
3.5	Análises Estatísticas	
3.6	Clusterização	
4	RESULTADOS	
4.1	Casuística e dados da Amostra	
4.1.1	Dados demográficos e morfológicos	
4.1.2	Resultados das expressões imunoistoquímicas	
4.2	Associações entre as Expressões Imunoistoquímicas e os Tipos Histológicos	
4.2.1	Associações entre as variáveis clínicas e morfológicas dos carcinomas gástricos e os tipos histológicos	
4.2.2	Associações entre as expressões imunoistoquímicas dos marcadores e os tipos histológicos	

- 4.3 Análises Univariadas
 - 4.3.1 Análises univariadas do grupo de carcinomas gástricos
 - 4.3.2 Análises univariadas dos carcinomas gástricos intestinais
 - 4.3.3 Análise univariada dos carcinomas difusos
- 4.4 Análise Multivariada
 - 4.4.1 Análise multivariada no grupo de carcinomas gástricos
 - 4.4.2 Análise multivariada dos carcinomas intestinais
 - 4.4.3 Análise multivariada dos carcinomas difusos
- 4.5 Clusterização Hierárquica

5 DISCUSSÃO

6 CONCLUSÃO

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Embora tenhamos observado uma significativa queda da incidência de câncer gástrico nos últimos 20 anos (PARKIN 2004), este tumor ainda é uma das neoplasias mais comuns, ocupando a quarta posição dentre as neoplasias malignas mais freqüentes, sendo responsável pela segunda causa de morte por câncer no mundo (PISANI et al. 1999). No Brasil, é o terceiro tipo de câncer mais comum, sendo estimados para 2006, 14.970 novos casos de câncer gástrico entre os homens e 8.230 entre as mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 16 casos novos a cada 100 mil homens e 9 para cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2005). Aproximadamente dois terços dos tumores gástricos ocorrem na população dos países em desenvolvimento (STEWART e KLEIHUES 2003). A infecção pelo *Helicobacter pylori* bem como fatores associados a hábitos alimentares são as principais causas associadas à etiologia do câncer gástrico (CREW e NEUGUT 2006). Países com altas taxas de incidência de câncer gástrico apresentam altos índices de infecção pelo *H pylori* e o declínio da incidência destas neoplasias observada nos países desenvolvidos estão diretamente associados à queda da incidência do *H pylori* (HOWSON et al. 1986; PARSONNET et al. 1995).

A infecção pelo *H pylori*, estimada atualmente em três a quatro bilhões de pessoas no mundo, é a causa mais comum de gastrite ativa crônica (MARSHALL e WARREN 1984). A associação entre a infecção crônica pelo *H pylori* e o desenvolvimento do câncer gástrico já está bem estabelecida (CORREA 1988). No modelo de carcinogênese gástrica proposto por CORREA (1996), a infecção pelo *H*

pylori dá início a uma seqüência progressiva de lesões gástricas que se inicia na mucosa normal, seguida de gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia, e finalmente carcinoma. A grande maioria dos indivíduos infectados pelo *H pylori* é assintomática. O desenvolvimento do câncer gástrico em pessoas infectadas pelo *H pylori* é dependente de fatores que incluem principalmente a virulência bacteriana e a resposta pró-inflamatória do hospedeiro (EL-OMAR et al. 2003). Maior virulência e conseqüentemente maior risco de câncer gástrico são atribuídos aos tipos de *H pylori* associados às citotoxinas do gene A (*cagA*) (TOMB et al. 1997; ALM et al. 1999). Vários estudos demonstraram que infecções por *H pylori cag A+* apresentam maior risco de desenvolver gastrite atrófica severa e câncer gástrico distal quando comparadas com as infecções por *H pylori cagA-* (KUIPERS et al. 1995; BLASER et al. 1995; HUANG et al. 2003).

Além da infecção pelo *H pylori*, associações com fatores ambientais e dietéticos como o consumo de alimentos ricos em sal, defumados ou crus, a exposição da mucosa gástrica a nitrosaminas, e o baixo consumo de frutas frescas e vegetais aumentam o risco de câncer gástrico (CORREA 1992; LEE SA et al. 2003).

Estudos prospectivos têm demonstrado uma significativa relação entre fumo e câncer gástrico (GONZALEZ et al. 2003; KOIZUMI et al. 2004). A obesidade também tem sido considerada como fator de risco para os carcinomas gástricos da região da cárdia (LAGERGREN et al. 1999). O refluxo gastro-esofágico causado pela obesidade predispõe ao desenvolvimento do esôfago de Barrett, lesão precursora dos adenocarcinomas de esôfago e da junção gastro-esofágica (ISHAQ e JANKOWSKI 2001). Outros fatores menos comuns relacionados à etiologia do câncer gástrico incluem radiação (THOMPSON et al. 1994), anemia perniciosa

(HSING et al. 1993), tipo sanguíneo A (AIRD et al. 1953), cirurgias gástricas prévias por condições benignas (STALNIKOWICZ e BENBASSAT 1990), fumo (NISHINO et al. 2006) e infecção pelo vírus de Epstein Barr (UEMURA et al. 1994; LEVINE et al. 1995). Além disso, história familiar positiva para câncer gástrico é um fator de risco importante, principalmente nas Síndromes genéticas como nos casos de Câncer de Cólon Hereditário Não-Polipose (HNPCC) e Síndrome de Li-Fraumeni (LA VECCHIA et al. 1992).

Aproximadamente 95% dos tumores gástricos são adenocarcinomas. Diversas classificações histológicas têm sido propostas, incluindo GOSEKI et al. (1992), CARNEIRO (1997) e MING et al. (1977), sendo as mais utilizadas as de LAUREN (1965) e da Organização Mundial da Saúde-OMS (HAMILTON e AALTONEN 2000). A classificação histológica dos carcinomas gástricos da OMS é baseada no padrão histológico predominante, sendo os principais tipos os carcinomas tubulares, papilares, mucinosos e em anel de sinete. Na classificação histológica de Lauren, os carcinomas gástricos são subdivididos em dois principais tipos: 1) bem diferenciados ou tipo intestinal, e 2) pouco diferenciados ou tipo difuso. O tipo intestinal está associado à gastrite atrófica e metaplasia intestinal, enquanto que o tipo difuso usualmente tem origem em pangastrites não atróficas.

Histologicamente, os carcinomas do tipo intestinal são constituídos por estruturas glandulares ou papilares bem formadas, são geralmente bem delimitados, e mais comuns em indivíduos mais velhos, com predomínio no gênero masculino e da raça negra. Os carcinomas do tipo difuso são constituídos por células menos coesas, infiltram difusamente a parede gástrica e são mais comuns em indivíduos mais jovens, com discreto predomínio no gênero feminino (MING et al. 1998). Nos

últimos anos, temos observado uma importante queda na incidência dos carcinomas do tipo intestinal, por outro lado, um aumento na incidência dos carcinomas difusos, principalmente os em anel de sinete, tem sido relatado mundialmente (HENSON et al. 2004).

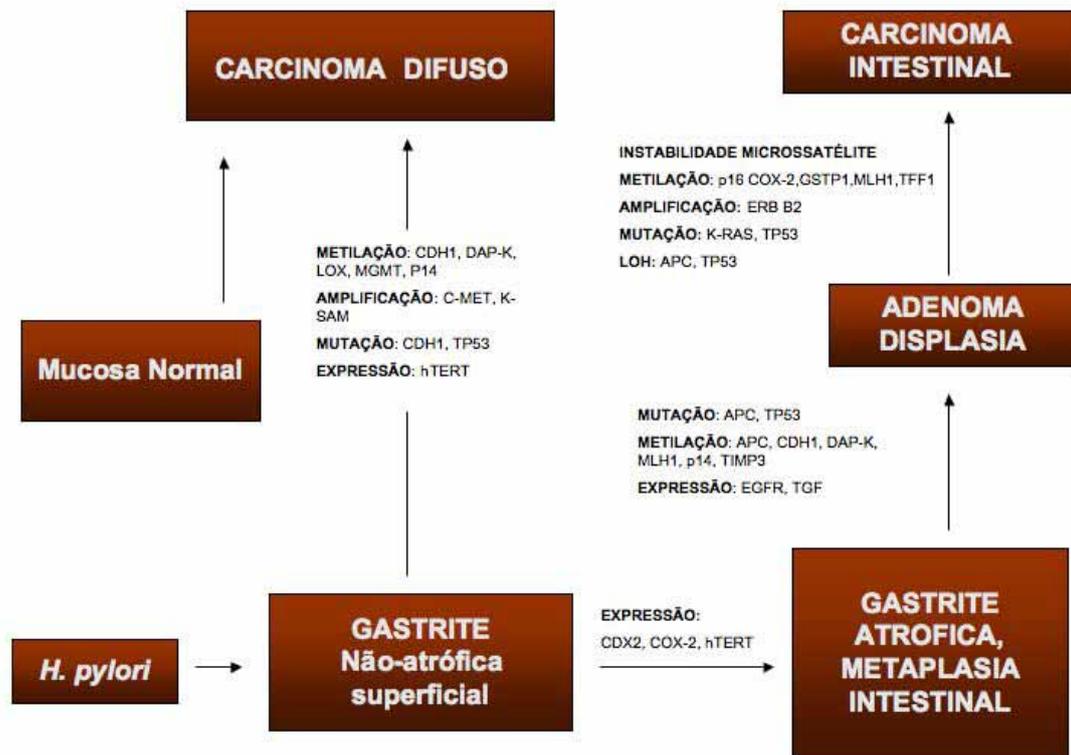
O prognóstico dos carcinomas gástricos não mudou muito nos últimos anos e é dependente principalmente do estadiamento e do grau histológico do tumor, porém estes indicadores não são preditivos de progressão tumoral. Variáveis ligadas ao paciente, ao tratamento e a biologia tumoral podem fornecer maiores informações em relação ao comportamento destas neoplasias (ALLGAYER et al. 1997; SAITO et al. 2006a e b; ALICI et al. 2006). O tratamento dos carcinomas gástricos é eminentemente cirúrgico e há um consenso que o tipo de excisão cirúrgica é relevante a sobrevida (DEN DULK et al. 2006; CHO et al. 2007; SAITO et al. 2007a). A ressecção cirúrgica completa do tumor ainda representa a maior chance de cura para os pacientes com carcinoma gástrico, mas aproximadamente 80% dos pacientes com margens cirúrgicas adequadas terão recorrência com morte decorrente da doença (MIDDLETON e CUNNINGHAM 1995). Embora com resultados ainda não satisfatórios, tem se observado nos últimos anos, um grande empenho no desenvolvimento e uso de novos esquemas quimio e radioterápicos mais eficientes que possam ser usados no tratamento adjuvante dos pacientes com carcinoma gástrico (MACDONALD et al. 2001; VAN DE VELDE e PEETERS 2003). Pacientes com câncer gástrico estágio IV ainda apresentam prognóstico sombrio com taxa de sobrevida em 5 anos em torno de 11% mesmo após tratamento cirúrgico e quimioterápico (HANSSON et al. 1999).

A carcinogênese gástrica é um processo multifatorial e de múltiplos passos, durante os quais múltiplas alterações genéticas e epigenéticas estão envolvidas (YASUI et al. 2006). Anormalidades nos fatores/ receptores de crescimento (TAHARA 2004), fatores associados à angiogênese (TZANAKIS et al. 2006), reguladores do ciclo celular (XIA et al. 2006), moléculas associadas à adesão celular (ZHENG et al. 2006), genes de reparo de DNA (HAYASHI et al. 2006), oncogenes e genes supressores de tumor (TAMURA 2006) têm sido associadas ao desenvolvimento e progressão dos carcinomas gástricos. A patologia molecular nos oferece informações que permitem a compreensão da patogênese tumoral, bem como a descoberta de marcadores moleculares que possam ser úteis no diagnóstico e prognóstico dos tumores, permitindo o diagnóstico mais preciso e o estabelecimento de terapia mais seletiva.

1.1 MECANISMOS MOLECULARES DA CARCINOGENESE GÁSTRICA

Inúmeras alterações genéticas têm sido associadas à desregulação da proliferação e diferenciação das células da mucosa gástrica normal que levam a formação do câncer (WRIGHT et al. 1992; TAHARA 1993; CORREA e SHIAO 1994; TAHARA 1995) (Figura 1). Embora diferentes mecanismos genéticos têm sido descritos como envolvidos na carcinogênese dos principais tipos de carcinomas gástricos, alguns mecanismos são comuns tanto para os carcinomas do tipo intestinal como para os difusos (YASUI et al. 2006; SMITH et al. 2006; VAUHKONEN et al.

2006) (Tabela 1). Descreveremos a seguir os principais mecanismos e vias associadas à carcinogênese gástrica.



Fonte: VAUHKONEN et al. (2006).

Figura 1 - Gráfico de seqüência e passos da carcinogênese gástrica e os principais mecanismos moleculares associados.

Tabela 1 - Principais alterações genéticas descritas nos carcinomas gástricos.

Alteração genética	Função	Difuso (%)	Intestinal (%)
Reparo de DNA	Instabilidade genética	16-39	-
Mutação K-ras	Transdução de sinal	0	10
Amplificação de c-met	Receptor de fator de crescimento	39	19
Amplificação de K-sam	Receptor de fator de crescimento	33	0
Amplificação de c-erbB-2	Receptor de fator de crescimento	0	20
Superexpressão de EGFR	Receptor de fator de crescimento	25	50
Superexpressão de EGF	Fator de crescimento	20	40
Superexpressão de TGF-alfa	Fator de crescimento	55	60
Superexpressão de VEGF	Fator de crescimento	12	46
Mutação/LOH de P53	Fator de transcrição	20-38	-
Mutação/LOH de APC	Transdução de sinal	30	40-60
LOH de DCC	Adesão celular	0	50
Perda de expressão de p16	Inibidor do ciclo celular	31	12
Mutação de e-caderina	Adesão celular	50	0
Mutação de B- catenina	Adesão celular/ transdução de sinal	0	27
Splices anormais de CD44	Adesão celular	100	100
LOH de Bcl-2	Inibidor de apoptose	0	43
Antígeno SC-1	Receptor de apoptose	50	24
Amplificação de Ciclina-E	Regulador do ciclo celular	10	20
Atividade de telomerase	Envelhecimento	90	100

Fonte: TAHARA (1997).

1.1.1 Genes Supressores de Tumor

Anormalidades genéticas no gene p53 estão entre as mais freqüentes na tumorigênese humana. A inativação deste gene leva a perda funcional da proteína que reconhece os danos do DNA e prolonga o ciclo celular até que seja feito o reparo.

O gene supressor de tumor p53 está frequentemente inativo nos carcinomas gástricos pela perda de heterozigozidade (LOH), mutações missense e deleções do tipo frame shift. Cerca de 60% dos carcinomas gástricos mostram alterações no gene

p53 independentemente do tipo histológico, sendo as alterações mais comuns em lesões precursoras como metaplasias intestinais, adenomas e displasias (YOKOZAKI et al. 1992; SAKURAI et al. 1995; TAMURA 2006).

Mutações no gene APC, primeiramente associadas à polipose coli familiar, são também observadas nos carcinomas gástricos. Mutações do tipo missense têm sido encontradas em cerca de 60% dos carcinomas gástricos do tipo intestinal (KINZLER et al. 1991). Estas alterações são raras nos carcinomas do tipo difuso, mas podem estar associadas aos carcinomas de células em anel de sinete (NAKATSURU et al. 1992). O produto do gene APC se liga a uma proteína multifuncional, β -catenina, que normalmente encontra-se livre e em baixas concentrações nas células. Quando na inativação do gene APC e/ ou mutações da β -catenina, a quantidade de β - catenina livre se eleva e acumula no citoplasma. A β -catenina então se transloca para o núcleo e interage com as proteínas da família dos fatores de reconhecimento linfóide de células T (Tcf/LEF) ativando a transcrição de genes alvos (PEIFER et al. 1999). É reconhecido que o complexo β - catenina/Tcf pode ativar vários genes alvos que estão diretamente associados a progressão e crescimento tumoral, como o *c-myc* e ciclina D1, bem como outros genes envolvidos nos mecanismos de proliferação celular, proteólise, diferenciação, angiogênese e migração celular (BRABLETZ et al. 2002). O gene APC e a β - catenina são constituintes do mecanismo de transdução de sinal chamado Wnt, que está alterado em 90% dos cânceres colorretais. Na ausência do sinal da via Wnt, ocorre a ativação do GSK-3 β que fosforila a β - catenina através de interações funcionais com a axina e APC (WILLERT e NUSSE 1998). Subsequentemente, a β - catenina é degradada pelo mecanismo de ubiquitina/proteossoma. Mutações da β - catenina tem sido

descritas principalmente nos carcinomas gástricos do tipo intestinal (UTSUNOMIYA et al. 2000; GULMANN et al. 2003b).

1.1.2 Moléculas de Adesão Celular (E-Caderina)

A E-caderina é um membro da família das glicoproteínas transmembrana envolvidas no mecanismo de adesão célula-célula cálcio dependentes, que aparentemente exercem um papel importante na organogênese e morfogênese (TAKEICHI et al. 1991). Mutações do gene da E-caderina afetam os exons 8 ou 9 e induzem a alteração morfológica, perda da adesão celular e aumento da mobilidade celular contribuindo para o processo de formação do câncer (HANDSCHUH et al. 1999). Mutações germinativas do gene da E-caderina tem sido relatadas em carcinomas gástricos do tipo difuso familiares (GUILFORD et al. 1998). Aproximadamente 50% dos carcinomas gástricos do tipo difuso mostram mutações do gene da E-caderina (BECKER et al. 1994). A adesão célula-célula mediada pela E-caderina aparentemente exerce um importante papel na proteção das células contra a apoptose (METCALFE e STREULI 1997). Recentemente foi demonstrado que a expressão de E-caderina reduz a expressão de bcl-2, um gene muito importante na regulação da apoptose (SASAKI et al. 2000).

1.1.3 Oncogenes

Muitos proto-oncogenes são ativados nos carcinomas gástricos, com algumas diferenças de acordo com os tipos histológicos. O gene c-met, codificador do fator de crescimento do hepatócito, está amplificado em 19% dos carcinomas gástricos do tipo intestinal e em 39% do tipo difuso (KUNIYASU et al. 1992). A maioria dos

carcinomas gástricos expressa 2 tipos de transcritos do gene c-met, de 7.0 kb e 6.0 kb. Expressão dos transcritos de 6.0 kb tem sido associada a fatores prognósticos como estágio, profundidade de invasão tumoral e metástases em linfonodos (KUNIYASU et al. 1993).

Outro proto-oncogene c-erbB-2, uma glicoproteína de 185 KDa com atividade tirosina quinase, tem sido encontrada amplificada em 20% dos carcinomas do tipo intestinal e raramente nos carcinomas do tipo difuso (YOKOTA et al. 1988). A super-expressão deste gene está também associada a prognóstico ruim e metástases hepáticas (YONEMURA et al. 1991).

1.1.4 Reguladores do Ciclo Celular

Há evidências de que o processo de carcinogênese gástrica freqüentemente envolve anormalidades na expressão de ciclinas e outras células reguladoras do ciclo celular, especialmente durante a regulação da fase G1 do ciclo (DOKI et al. 1997). Tem sido demonstrado que proteínas reguladoras do ciclo celular, especialmente no checkpoint G1, como Rb, cdk4, ciclina D1 e ciclina E bem como as perdas das expressões de p16 e p27 têm uma participação importante na carcinogênese gástrica (MYUNG et al. 2000; ZHAO et al. 2003).

O gene da ciclina E está amplificado em 15 a 20% dos carcinomas gástricos. Amplificação do gene da ciclina E e a super-expressão da sua proteína estão associados a maior agressividade e metástases em linfonodos (AKAMA et al. 1995). A superexpressão da proteína ciclina D1 e a perda de expressão da proteína p16 ocorrem em aproximadamente 1/2 e em 1/3 dos carcinomas gástricos

respectivamente, mas não são fatores que influenciam no prognóstico destes tumores (FEAKINS et al. 2003).

A redução da expressão da proteína p27 correlaciona com invasão tumoral e metástases em linfonodos, sendo mais comuns nos carcinomas gástricos avançados independentemente do tipo histológico (YASUI et al. 1997).

1.1.5 Fatores de Crescimento e Citocinas

As células do carcinoma gástrico expressam uma grande variedade de fatores de crescimento, hormônios e citocinas que agem nos mecanismos autócrinos e parácrinos que modulam interações complexas entre as células tumorais e células estromais. A família dos receptores do fator de crescimento epidérmico, que incluem EGF, $TGF\alpha$, IGF II e bFGF, são freqüentemente expressos nos carcinomas gástricos do tipo intestinal, enquanto $TGF\beta$, IGF II e bFGF são predominantemente expressos nos carcinomas do tipo difuso (TAHARA 2004). O fator de crescimento $TGF\beta$ é freqüentemente expresso nos carcinomas gástricos, particularmente nos carcinomas do tipo difuso com fibrose (YOSHIDA et al. 1989).

Fatores angiogênicos como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) promove a angiogênese e progressão dos carcinomas gástricos particularmente nos carcinomas do tipo intestinal, enquanto que os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) mostram uma forte associação com os carcinomas do tipo difuso (TANIMOTO et al. 1991; YAMAMOTO et al. 1998).

1.1.6 Mucinas

Uma consideração final a ser realizada é a participação das mucinas na gênese dos carcinomas gástricos. As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular e podem ser classificadas em secretoras (MUC2, MUC5AC e MUC6) e de membranas (MUC1 e MUC3). A expressão de MUC1 foi detectada na maioria dos epitélios, incluindo mama e pâncreas, bem como no trato gastrointestinal, respiratório e urinário (CAO et al. 1998). MUC2 é uma mucina secretora expressa no cólon, intestino delgado e vias aéreas. MUC1, MUC5AC e MUC6 são conhecidas como mucinas gástricas normais, enquanto a MUC2 não é usualmente expressa na mucosa gástrica normal (REIS et al. 1997). Nos carcinomas gástricos, tem se observado uma forte expressão de MUC1 e baixa expressão de MUC5AC e MUC6 (BALDUS et al. 1998). A expressão de MUC1 é aparentemente relacionada com pior prognóstico (AKYUREK et al. 2002). Por outro lado, a expressão de MUC2 é mais comum nos carcinomas do tipo mucinoso e não se correlaciona com o comportamento biológico (PINTO-DE-SOUSA et al. 2002). Recentemente, a expressão de mucinas tem sido utilizada para a determinação de fenótipos que possam correlacionar com a histogênese do carcinoma gástrico. O fenótipo gástrico é determinado pela expressão de MUC1 e ausência de expressão de MUC2 (MUC1+/MUC2-), o fenótipo intestinal é determinado pela expressão de MUC2 e ausência de MUC1 (MUC-/MUC2+) e finalmente o fenótipo gastrointestinal ou misto apresenta expressão de ambas as mucinas (MUC1+/MUC2+). Estudos têm demonstrado que os fenótipos gástricos e intestinais não correspondem aos tipos histológico difuso e intestinal, respectivamente, porém estão associados à

agressividade tumoral durante o estágio precoce de desenvolvimento tumoral (BARRESI et al. 2006).

Como podemos observar, os carcinomas gástricos dos tipos intestinal e difuso estão envolvidos em mecanismos moleculares distintos, mas algumas vias são comuns a ambos. Recentemente, a procura de uma ‘assinatura molecular’ baseada em expressão gênica que possa definir subgrupos de tumores com características clínicas e biológicas semelhantes tem sido demonstrada por diversos autores (GOLUB et al. 1999; ALIZADEH et al. 2000; BITTNER et al. 2000; SORLIE et al. 2001; DOLLED-FILHART et al. 2006; HOMMA et al. 2006). Em relação aos carcinomas gástricos, estudos têm sido realizados na tentativa de estabelecer novos parâmetros clínicos e biológicos que possam determinar o comportamento biológico destes carcinomas, mas os resultados são na maioria das vezes contraditórios e inconclusivos (SCARTOZZI et al. 2004). Além disso, a pesquisa de uma única proteína isolada ou o estudo de um pequeno grupo de marcadores moleculares não oferece parâmetros adequados e suficientes para a avaliação segura do prognóstico e do comportamento biológico dos tumores. A pesquisa de uma grande variedade ou grupos maiores de marcadores moleculares é mais eficaz na determinação de grupos de tumores com características clínicas e histológicas distintas (CALLAGY et al. 2003; GARCIA et al. 2003; SHI et al. 2005).

Embora tecnologias avançadas como cDNA arrays sejam capazes de analisar milhares de genes em um número pequeno de amostras, correlações entre os dados moleculares com as informações clínicas e histopatológicas só poderão ser fornecidas após a análise de um número maior de amostras (MEIRELES et al. 2004). O método de *tissue microarray* (TMA), descrito por KONONEN et al. (1998), é um

método eficiente e econômico que permite a análise de diversos genes ou proteínas em uma centena de amostras de um mesmo tecido ou de origens diferentes (KONONEN et al. 1998; ZHANG DH et al. 2003; HANS et al. 2004; ABD EL-REHIM et al. 2005). O TMA tem sido utilizado em técnicas como hibridação *in situ* (ISH), hibridação *in situ* por cromógeno (CISH), hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e imunistoquímica na pesquisa de marcadores diagnóstico e prognósticos de diversos tumores (KONONEN et al. 1998; MOCH et al. 2001; BUBENDORF et al. 2001; BHARGAVA et al. 2004; SAPINO et al. 2006). A crítica que cabe a este método é a representatividade da pequena amostra (core) do tumor em relação ao método tradicional das lâminas individuais, uma vez que os tumores de uma maneira geral são muito heterogêneos e podem exibir áreas distintas em uma mesma amostra. Estudos recentes mostram que duas ou mais amostras (cores) de tumores são suficientes para representar as lesões na pesquisa de fatores prognósticos pelo TMA (CAMP et al. 2000; GULMANN et al. 2003a; SAPINO et al. 2006). Mesmo em tumores muito heterogêneos, como nos carcinomas ovarianos, o resultado das análises pelo TMA de um único core coincidiu em 90% com os resultados do método tradicional e em 95% quando foram utilizados dois cores destes tumores (CAMP et al. 2000; ROSEN et al. 2004).

Portanto, decidimos neste estudo analisar as expressões imunistoquímicas de várias proteínas de genes envolvidos em diversos mecanismos moleculares, em uma grande amostra de carcinomas gástricos, utilizando-se a técnica do TMA. E, a partir destes achados, classificar através de análise clusterizada de dados, os carcinomas gástricos em subgrupos que apresentem padrão de expressão imunistoquímica semelhantes.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- Determinar as principais características demográficas e histopatológicas dos carcinomas gástricos da nossa amostra;
- Estudar as expressões imunoistoquímicas de proteínas associadas à adesão celular, apoptose, ciclo celular, reparo de DNA, diferenciação celular e oncogenes e genes supressores de tumor nos carcinomas gástricos dispostos em TMA;
- Determinar o padrão de expressão imunoistoquímica das proteínas associadas a diversos mecanismos moleculares nos carcinomas gástricos do tipo intestinal e difuso;
- Determinar grupos (clusters) de carcinomas gástricos de acordo com o padrão de expressão imunoistoquímica, através de análises clusterizadas dos marcadores;
- Determinar as correlações entre os grupos (clusters) de carcinomas gástricos com os principais achados clínicos e morfológicos; e sua importância no prognóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foi realizada a seleção de casos de carcinomas gástricos a partir do Banco de Dados do Departamento de Anatomia Patológica. Foram excluídos os casos de biópsia e os casos de revisão de lâminas. Foram então selecionados 482 carcinomas gástricos, produtos de gastrectomias realizadas no Centro de Pesquisa e Tratamento Hospital A C Camargo no período de 1988 a 1998 que continham materiais emblocados em parafina suficientes para o estudo. Foram resgatadas todas as lâminas e blocos de parafina dos arquivos da anatomia patológica. Blocos representativos do tumor foram separados e novos cortes histológicos foram realizados e corados pela técnica de hematoxilina-eosina. Foram realizadas as revisões das lâminas e a classificação histopatológica dos tumores de acordo com as classificações de LAUREN (1965), CARNEIRO (1997) e HAMILTON e AALTONEN (2000).

Os dados demográficos (idade e gênero) dos pacientes bem como as características histopatológicas dos casos selecionados como: localização e tamanho tumoral, profundidade de infiltração da parede gástrica e presença de metástases em linfonodos foram obtidos através da revisão dos prontuários e dos laudos anátomo-patológicos. A idade foi estratificada em dois grupos: pacientes de até 60 anos e acima de 60 anos. O tamanho tumoral foi determinado pela medida macroscópica do maior diâmetro da lesão e para as análises estatísticas, os casos foram agrupados em 2 grupos: tumores de até 5 cm de diâmetro ou maiores que 5 cm. O estadiamento

anátomo-patológico dos tumores foi categorizado de acordo com o sistema TNM da União Internacional contra o Câncer. O seguimento clínico dos pacientes teve início a partir da data da cirurgia até a data do óbito ou da última consulta em até 5 anos (60 meses).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A C Camargo em 3 de março de 2004; Projeto de Pesquisa nº 578/04.

3.2 CONSTRUÇÃO DOS TMAS

Os *tissue microarrays* (TMAs) foram construídos utilizando-se somente casos de carcinomas gástricos. Os casos foram resgatados do arquivo de anatomia patológica e blocos representativos do tumor foram separados. Novos cortes histológicos foram realizados e corados pela técnica de H&E. As áreas mais representativas do tumor foram identificadas através do exame microscópico das lâminas e as áreas de interesse foram marcadas com caneta permanente e identificadas nos blocos de parafina correspondentes (blocos doadores). Usando o *tissue microarrayer* (Beecher Instrument, Silver Spring, MD, USA) cilindros das áreas de interesse previamente identificada nos blocos doadores foram retiradas e transferidas em novos blocos de parafina (blocos receptores). Os cortes obtidos destes blocos de TMA foram dispostos em lâminas com adesivos Microsystems Inc[®] (Figura 2).

Para cada caso foram retirados dois cilindros de 0.6mm (cores) de duas áreas distintas do tumor, gerando um total de 964 cores. As cores foram distribuídos em

três blocos de parafina contendo 176, 105 e 201 casos de carcinomas gástricos, respectivamente. A partir de tabelas em Excel, um sistema de coordenadas foi usado para a determinação da posição exata dos casos nos blocos tendo como referência um fragmento de fígado. Os casos foram dispostos em ordem numérica crescente (de acordo com o registro anátomo-patológico).

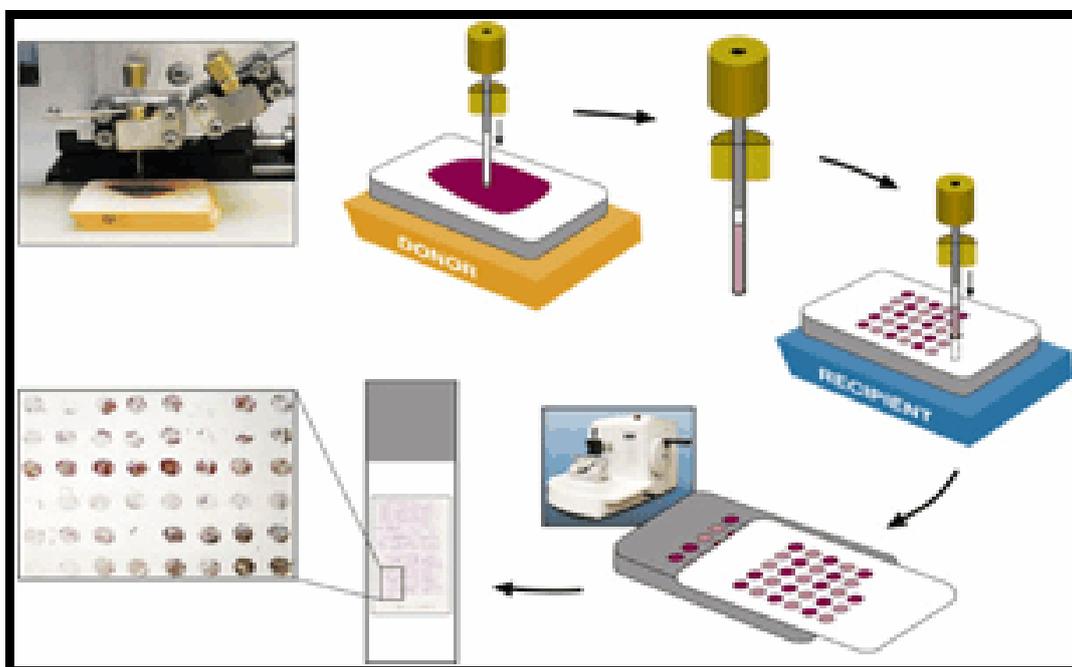


Figura 2 - Esquema representativo da montagem dos blocos de TMA, através da retirada de cilindros de 0.6mm de diâmetro dos blocos receptores e colocação dos mesmos nos blocos doadores.

3.3 IMUNOISTOQUÍMICA

As reações imunoistoquímicas foram realizadas em duas lâminas de cada bloco de TMA com níveis de profundidades diferentes de pelo menos 25 cortes de diferença. Esta estratégia garante a observação de áreas distintas da neoplasia. Como os casos foram inseridos em duplicada, as análises dos resultados para cada anticorpo foram realizadas em pelo menos quatro áreas (spots) representativas de cada caso.

Foi utilizado o método do complexo de streptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO[®]). Os passos técnicos realizados foram os já tradicionalmente descritos na literatura e podem ser vistos em livros texto (SANTOS et al. 1999).

O protocolo seguido está descrito passo a passo:

1. Desparafinização dos cortes histológicos com 3 μ m de espessura, do material incluído em parafina e colocados em lâminas silanizadas (3-aminopropyl-triethoxy-silane – SIGMA), e deixados estufa a 60°C por 24 horas.
2. Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos.
3. Três passagens em etanol (100%, 95%, 70%) a 30 segundos cada.
4. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
5. Recuperação antigênica por calor (panela de pressão) em tampão citrato por 5 minutos.
6. Bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 3% (água oxigenada 10 volumes).
7. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
8. Bloqueio das proteínas inespecíficas (Protein Block-serum free, DAKO[®]) por 20 minutos.

9. Incubação com anticorpo primário, diluído em título estabelecido em tampão PBS contendo albumina bovina BSA a 1% (SIGMA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, à 4°C em câmara úmida (16 a 18 horas).
10. Lavagem em tampão PBS.
11. Incubação com o anticorpo biotilado-reagente C, do kit StreptABComplex/HRP Duet (DAKO).
12. Lavagem em tampão PBS.
13. Incubação das lâminas em solução substrato cromógeno: 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 60mg (SIGMA); Dimetilsulfóxido (DMSO) 1ml; H_2O_2 a 6% (água oxigenada 20 volumes) 1 ml, PBS 100ml (5min, 37°C, ao abrigo da luz).
14. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
15. Contracorar com hematoxilina de Harris.
16. Imersão em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio a 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.
17. Desidratação das lâminas (6 passagens em etanol a 50%, 80%, 95% e 100%, sendo três delas em 100%).
18. Montagem das laminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Germany).

Os anticorpos pesquisados, clones, origens, diluições utilizadas e os respectivos padrões de marcação considerados podem ser vistos na Tabela 2.

As reações foram acompanhadas de controles positivos, em tecidos sabidamente positivos para os anticorpos testados, e dois controles negativos. O primeiro deles realizado pelo não uso do anticorpo primário e o segundo através da retirada do anticorpo secundário durante os passos da reação. A leitura das lâminas

foi realizada em microscópio óptico comum e o critério utilizado para positividade foi estabelecido de acordo com a categorização descrita para cada anticorpo pesquisado.

3.4 AVALIAÇÃO DAS EXPRESSÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

Para as proteínas de marcação nuclear, p53, p21, p27, p16, Rb, ciclina D1, ciclina A1 e MSH2 utilizamos critérios previamente descritos, que definem como positivos os casos com coloração marrom inequívoca nos núcleos das células tumorais observados em mais de 10% das células neoplásicas (LIU et al. 2001; CHETTY e SITTI 2003; FEAKINS et al. 2003).

Para as proteínas de marcação citoplasmática, a positividade foi avaliada de acordo com um escore considerando-se a intensidade da marcação e a quantidade de células marcadas.

A intensidade de marcação foi avaliada, utilizando-se a seguinte graduação:

- 0:** sem reação detectável
- 1:** marcação fraca ou discreta
- 2:** marcação de moderada intensidade
- 3:** marcação forte

A porcentagem das células marcadas foi dividida em cinco graus de acordo com o número de células, a saber:

- 0:** sem reação detectável
- 1:** positividade em menos de 25% das células

2: positividade em 25-50% das células

3: positividade em 50-75% das células

4: positividade em mais de 75% das células

O escore final foi obtido através da somatória das duas graduações. Casos com escore maior que 4 foram considerados positivos.

As proteínas que se expressam na membrana, foram avaliadas de acordo com critérios previamente publicados (ELLIS et al. 2004):

0: Marcação ausente ou presente em menos de 10% das células neoplásicas

1: Marcação de membrana fraca e parcial em mais de 10% das células

2: Marcação completa da membrana, fraca ou moderada em mais de 10% das células

3: Marcação completa e forte de membrana em mais de 10% das células

Os casos positivos foram considerados aqueles com escore 2 ou 3.

Quanto à análise imunoistoquímica dos padrões de marcação de expressão da E-caderina, foram utilizados critérios previamente descritos, sendo determinados dois aspectos (UTSUNOMIYA et al. 2000):

- Preservada: marcação na membrana celular presente em mais de 75% das células neoplásicas (padrão similar ao observado em células não-neoplásicas)
- Perda parcial ou total: ausência de expressão ou positividade observada em menos de 75% das células neoplásicas.

A marcação citoplasmática e intensidades de marcação não foram consideradas.

A expressão de β -catenina foi determinada de acordo com a localização da marcação, independente da intensidade da coloração (NABAIS et al. 2003), e foi categorizada como:

- Preservada: marcação de membrana em mais de 90% das células
- Alterada: ausência de marcação ou positividade citoplasmática e/ou nuclear em mais de 90% das células.

Como citado anteriormente, as reações imunoistoquímicas para cada anticorpo foram realizadas em duas lâminas de TMA, sendo analisados quatro *cores* de cada caso. O resultado final foi dado após o cálculo da média aritmética dos quatro eventos.

Tabela 2 – Anticorpos analisados por imunohistoquímica, clones, origem, diluição e padrão de expressão considerada.

CICLO CELULAR				
Anticorpos	Clones	Origem	Diluição	Padrão de expressão
p16	C-20	MTM Laboratories	1:25	Nuclear
p27	SX53G8	DAKO	1:200	Nuclear
p21	SX118	DAKO	1:30	Nuclear
Ciclina D1	RBT-14	BIO SB	Pré diluída	Nuclear
Ciclina A	Policlonal	Santa Cruz	1:40	Nuclear
Ciclina B1	V152	DAKO	1:50	Citoplasmático
Rb	Rb 1	DAKO	1:50	Nuclear
p53	DO7	DAKO	1:100	Nuclear
SINTASES DO ÓXIDO NÍTRICO				
Anticorpos	Clones	Origem	Diluição	Padrão de expressão
NOS 1	nNOS	Santa Cruz	1:200	Citoplasmático
NOS 2	iNOS	Santa Cruz	1:40	Citoplasmático
NOS 3	eNOS	Santa Cruz	1:100	Citoplasmático
FATORES DE CRESCIMENTO				
Anticorpos	Clones	Origem	Diluição	Padrão de expressão
c-met	Policlonal	Novocastra	1:50	Membrana
VEGF	Policlonal	Santa Cruz	1:500	Citoplasmático
c-erbB-2	Policlonal	Dako	1:500	Membrana
TGFβI	Policlonal	Santa Cruz	1:50	Citoplasmático
TGFβII	Policlonal	Santa Cruz	1:200	Citoplasmático
MSH2	Policlonal	Santa Cruz	1:25	Nuclear

Cont/ Tabela 2

APOPTOSE				
Anticorpos	Clones	Origem	Diluição	Padrão de expressão
Bcl-2	124	DAKO	1:40	Citoplasmático
Bax	Policlonal	DAKO	1:50	Citoplasmático
Bak	Policlonal	DAKO	1:400	Citoplasmático
Bcl-x	Policlonal	DAKO	1:50	Citoplasmático

ADESÃO CELULAR, TRANSCRIÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR				
Anticorpos	Clones	Origem	Diluição	Padrão de expressão
APC	Policlonal	Santa Cruz	1:800	Citoplasmático
Clatrina	23	Transduction	1:2000	Citoplasmático
E-caderina	36B5	Novocastra	1:50	Membrana
β - catenina	17C2	Novocastra	1:100	Membrana
MUC 1	Ma 695	Novocastra	1:500	Citoplasmático
MUC 2	CC p58	Novocastra	1:1000	Citoplasmático
MUC 5AC	CLH2	Novocastra	1:500	Citoplasmático
MUC 6	CLH5	Novocastra	1:600	Citoplasmático
MMP-2	75-7F7	Oncogene	1:40	Citoplasmático
MMP-9	56-2A4	Oncogene	1:80	Citoplasmático

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As informações coletadas dos prontuários médicos e os dados imunohistoquímicos dos marcadores biomoleculares foram armazenados em um banco de dados informatizado (Excel®, versão 2003, Microsoft) e posteriormente analisados com o programa de computador SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para a caracterização da população do estudo, utilizou-se a estatística

descritiva, empregando porcentagens, médias e medianas. A comparação das diversas variáveis entre os tipos histológicos intestinal e difuso (classificação de Laurén) foi realizada pelo teste de qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher, dependendo dos valores esperados nas tabelas de contingência. Realizou-se a análise dos fatores prognóstico separadamente para os grupos histológicos intestinal e difuso. Na análise univariada, calculou-se a taxa de sobrevivência global em 5 anos para as diversas variáveis, sendo as curvas comparadas pelo teste de log-rank. Para tanto, considerou-se o intervalo transcorrido entre a data da cirurgia e a data do óbito de qualquer natureza. Classificaram-se sob censura os casos que permaneceram vivos até o término do estudo. As variáveis cujo nível descritivo do teste foi de até 25% foram selecionadas para o modelo de riscos proporcionais de Cox, para o qual se empregou a técnica a modelagem do tipo *stepwise forward selection*. Estimou-se o risco relativo através do *hazard ratio* obtido a partir do modelo multivariado. Para todas as análises estatísticas estabeleceu-se o nível de significância em 5%.

3.6 CLUSTERIZAÇÃO

As análises clusterizadas dos resultados dos marcadores imunistoquímicos foram realizadas utilizando-se o programa TMEV. Foi utilizado um algoritmo para clusterização hierárquica não supervisionada dos marcadores. Usamos a distância Eclideana e *complete linkage*. Esta análise é realizada através da identificação de pares de proteínas que apresentam maior similaridade determinada pelas correlações entre todas as proteínas estudadas. Uma proteína é acrescentada ao cluster quando esta possui o máximo de similaridade com as proteínas do cluster em relação a todas

as demais. Cada ponto é representado por uma cor que quantitativamente refletem os resultados.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA E DADOS DA AMOSTRA

4.1.1 Dados demográficos e morfológicos

Os principais dados demográficos dos carcinomas gástricos estudados podem ser vistos na Tabela 3. A idade dos 482 pacientes estudados variou de 26 a 84 anos (média de 61.7; mediana de 64 anos). Em relação aos grupos de faixa etária, observamos um equilíbrio com discreto predomínio (56%) de pacientes com até 60 anos, 44% dos pacientes pertenciam ao grupo com mais de 60 anos. 64% dos pacientes eram do gênero masculino, enquanto 36% eram do gênero feminino. Os tumores localizavam-se preferencialmente na região distal do estômago (84%) em relação à região proximal (10%) e 27 casos (6%) ocupavam todo o estômago. 358 casos (75%) apresentavam metástases em linfonodos, 119 casos não tinham metástases linfonodais e em 4 casos os linfonodos não foram examinados. O tamanho macroscópico do maior diâmetro tumoral variou de 0.6 a 19.0 cm (média 6,4 e mediana 6,0 cm) sendo que 59% dos carcinomas eram maiores que 5.0 cm. Os tumores que infiltravam a camada muscular própria, subserosa, serosa ou além da serosa foram agrupados em tumores com nível de infiltração profunda e corresponderam a 455 casos (95%). Os carcinomas superficialmente invasivos, cujo nível de infiltração da parede era mucosa e submucosa, corresponderam a apenas 5% dos casos.

Em relação aos tipos histológicos observou-se maior frequência dos tipos intestinal (48.5%), glandular (46%) e tubular (40%) nas classificações de Lauren, Carneiro e da OMS, respectivamente.

Tabela 3 - Principais características demográficas e histopatológicas dos carcinomas gástricos.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	NÚMERO DE CASOS (%)
Gênero	Masculino	308 (64%)
	Feminino	174 (36%)
Idade	Até 60 anos	273 (56%)
	> 60 anos	209 (44%)
Tamanho do tumor	Até 5 cm	198 (41%)
	> 5 cm	284 (59%)
Localização	Proximal	48 (10%)
	Distal	407 (84%)
	Prox+Distal	27 (6%)
Nível de Infiltração	Superficial	27 (6%)
	Profunda	455(94%)
Metástases em Linfonodos	Presente	358 (75%)
	Ausente	119 (25%)
Tipo histológico Laurèn	Intestinal	234 (48.5%)
	Difuso	166 (34%)
	Misto	60 (12%)
	Inclassificável	22 (4.5%)
Tipo histológico Carneiro	Glandular	221 (46%)
	Células isoladas	157 (32%)
	Misto	55 (11%)
	Inclassificável	49 (10%)
Tipo histológico OMS	Tubular	191(40%)
	Papilífero	37 (8%)
	Células em anel de sinete	102 (21%)
	Mucinoso	43 (9%)
	Carcinoma indiferenciado	74 (15%)
	Adenocarcinoma SOE	35 (7%)

4.1.2 Resultados das expressões imunoistoquímicas

Os resultados das expressões das proteínas pesquisadas pela imunoistoquímica podem ser vistos na Tabela 4. Todas as lâminas de TMA utilizadas para os diversos marcadores continham pelo menos 90% dos casos, com uma representação mínima de 10% da área tumoral (Figura 3).

A imunopositividade para as proteínas da família do Bcl-2, representadas por Bax, Bak, Bcl-2 e Bcl-x foi observada em 303 (67%) de 453 casos, em 350 (77%) dos 456 casos, em 82 (18%) de 451 casos e em 398 (89%) de 448 casos examinados, respectivamente. A Figura 4 mostra casos positivos para as proteínas Bcl-2, Bak, Bax e Bcl-x.

As expressões das proteínas dos genes envolvidos no ciclo celular p53, p27, p16, p21 e Rb foram observadas em 137 (30%) de 458 casos, 231 (50%) de 457 casos, 50 (10.8%) de 463, em 64 (14%) de 458 casos, e em 313 (68%) de 458 casos, respectivamente.

Observamos positividade imunoistoquímica para a ciclina D1 em 220 (49%) de 449 casos. 316 (69%) de 458 casos foram positivos para ciclina A e positividade para ciclina B1 foi observada em 229 (49%) de 460 casos estudados de carcinomas gástricos. Casos representativos das expressões das proteínas do ciclo celular podem ser vistos na Figura 5.

Somente 56 (12%) de 462 casos mostraram positividade na membrana das células para a proteína do oncogene c-erbB-2. O mesmo padrão de expressão foi observada em 409 (89%) de 458 casos analisados para a proteína do gene c-Met, enquanto que expressões para MSH2, VEGF, TGF β I e TGF β II foram observadas em 427 (92%) de 463 casos, em 399 (91%) de 438 casos, em 382 (82%) de 464 casos

e em 446 (97%) de 459 casos, respectivamente. Na Figura 6 podemos encontrar carcinomas gástricos com expressões destas proteínas.

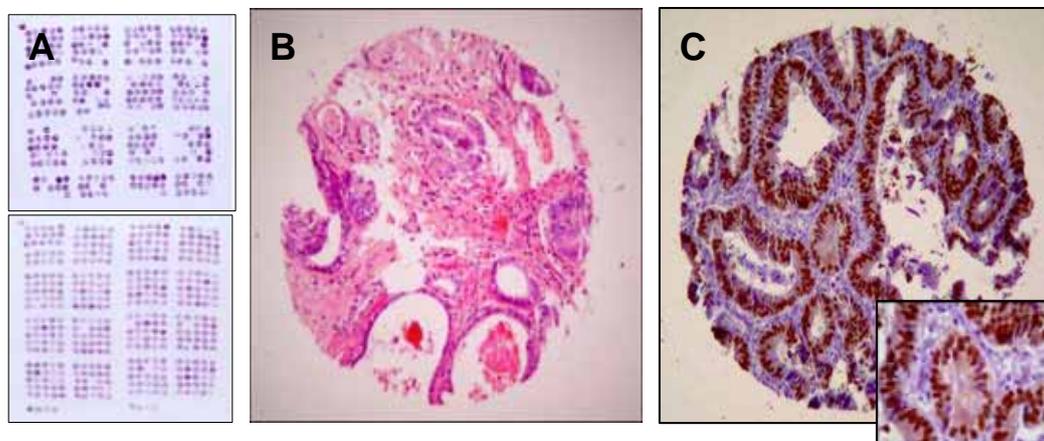
A Tabela 5 mostra os resultados das expressões imunoistoquímicas das proteínas dos genes envolvidos nos mecanismos de transcrição de sinal, adesão e sinalização celular.

Em relação às expressões das metaloproteases, MMP2 e MMP9, observamos que 181 (40%) de 458 casos foram positivos para MMP2 e 205 (45.5%) de 451 casos para MMP9. Positividade para MUC1 foi observada em 77 (17%) de 448 casos. A expressão de MUC2 foi encontrada em 50 (11%) de 462 casos. Observamos que 92 (20%) de 463 casos expressaram MUC5AC e somente 9 (2%) de 458 casos foram positivos para MUC6 (Figura 7).

Expressão para a proteína do gene da E-caderina, na membrana celular, presente em mais de 75% das células tumorais foi observada em 112 (25%) de 457 carcinomas gástricos. Por outro lado, observamos que a maioria dos casos estudados, 345/ 457 (75%), mostrou este padrão de expressão em menos de 75% das células tumorais. A expressão na membrana celular para β -catenina foi observada em somente 27 (6%) de 457 casos analisados. A expressão desta proteína no citoplasma e/ou núcleo das células tumorais foi detectada em 94% (430/457) dos casos. 293 (63%) de 464 carcinomas gástricos e 301 (63%) de 454 casos mostraram expressão de clatrina e APC, respectivamente. Ilustrações de carcinomas gástricos com expressão de APC, clatrina, E-caderina e β -catenina podem ser vistas na Figura 8.

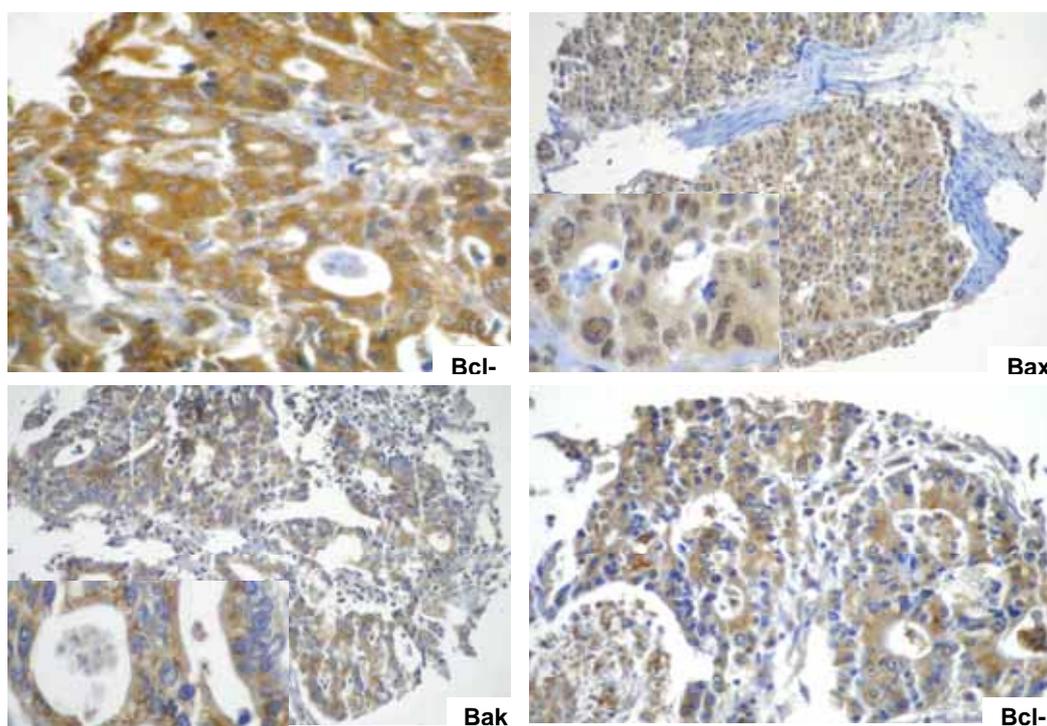
Em relação aos resultados das expressões das sintases de óxido nítrico, observamos que 461 (99%) de 465 casos foram positivos para NOS1; 166 (36%) de

465 casos foram positivos para NOS2 e 423 (97%) de 437 casos de carcinomas gástricos foram positivos para NOS3 (Figura 8 e Tabela 6).



Legenda: (A) Distribuição dos cilindros dos cores do TMA. Preservação da morfologia em um dos cilindros de carcinoma do tipo intestinal, corado pela técnica do H&E (B). Preservação dos antígenos corados pelo p53 (C), tamanho original x40, detalhe, x60

Figura 3 - Design do TMA



Legenda: Casos positivos para Bcl-2 (x60), Bak (x20, detalhe x60), Bax (20x, detalhe x60), Bcl-x (40x)

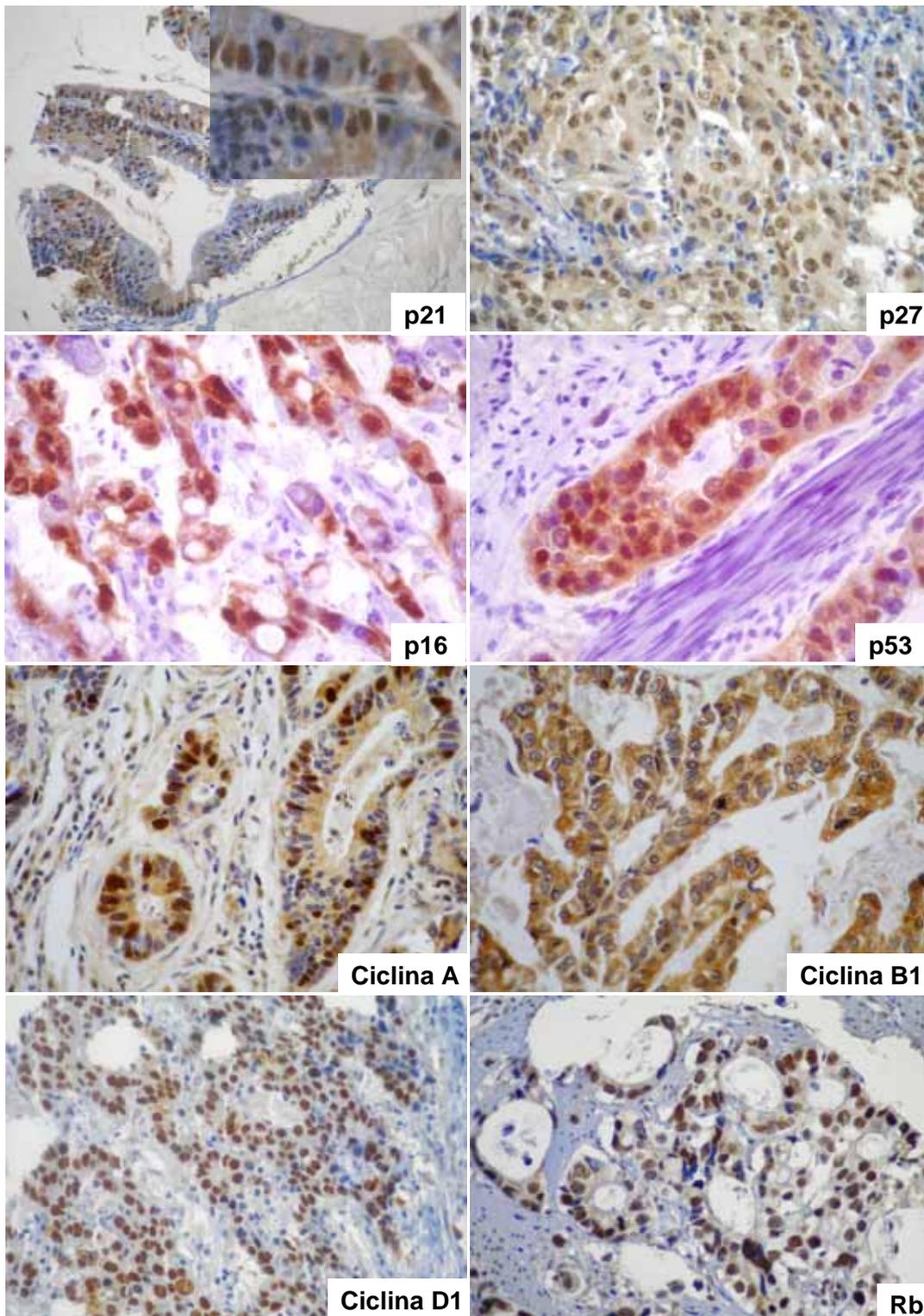
Figura 4 - Carcinomas gástricos com expressão imunohistoquímica das proteínas associadas a apoptose

Tabela 4 - Resultados das expressões imunoistoquímicas das proteínas dos genes associados ao ciclo celular, fatores de crescimento e apoptose

CICLO CELULAR		
ANTICORPOS	NÚMERO DE CASOS	CASOS POSITIVOS
p16	463	50 (11%)
p27	457	231 (50.5%)
p21	458	64 (14%)
Ciclina D1	449	220 (49%)
Ciclina A	458	316 (69%)
Ciclina B1	460	229 (49%)
Rb	458	313 (68%)
p53	458	137 (30%)

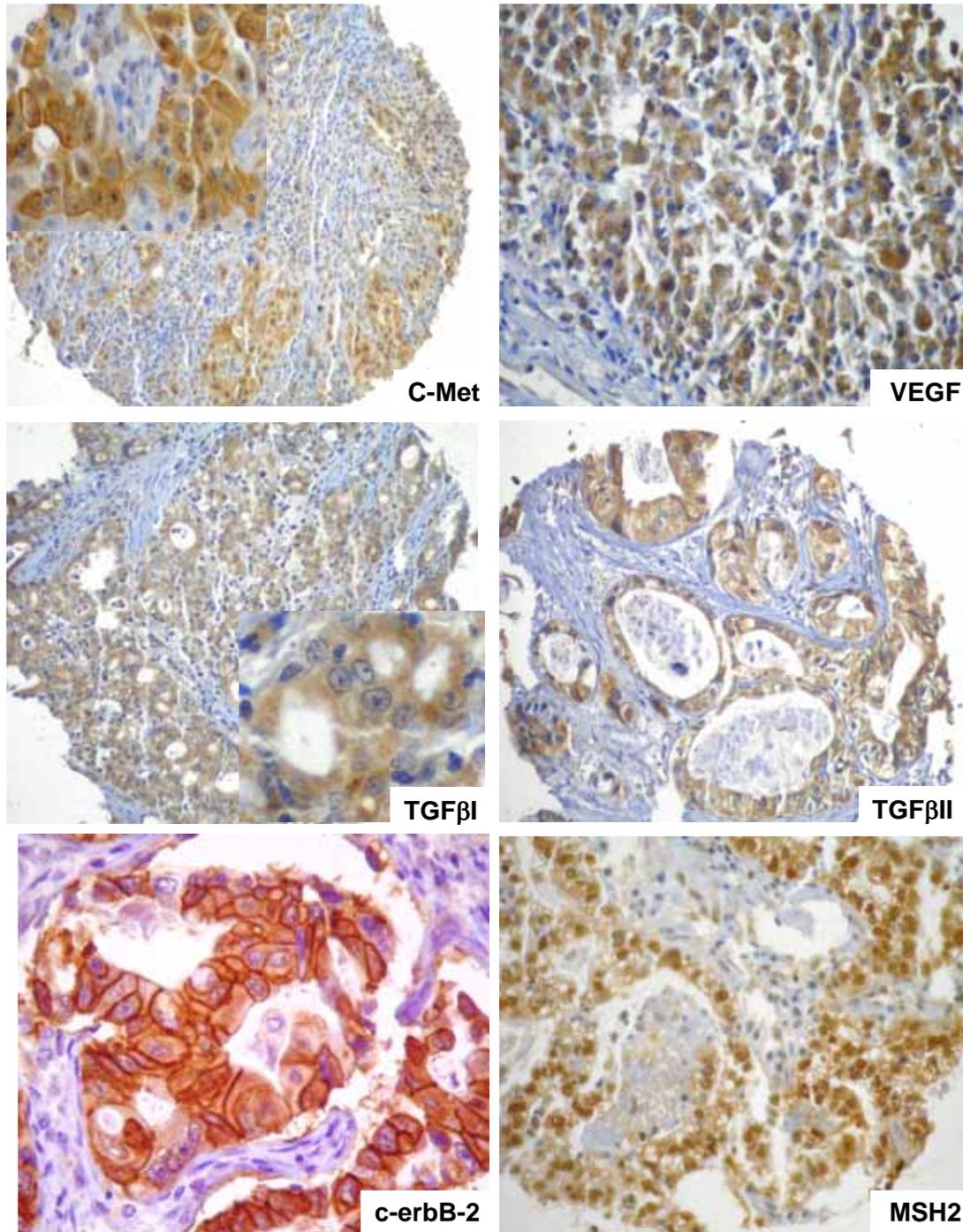
FATORES DE CRESCIMENTO		
ANTICORPOS	NÚMERO DE CASOS	CASOS POSITIVOS
c-met	459	409 (89%)
VEGF	438	399 (91%)
c-erbB-2	462	56 (12%)
TGF β I	464	382 (82%)
TGF β II	459	446 (97%)
MSH2	463	427 (92%)

APOPTOSE		
ANTICORPOS	NÚMERO DE CASOS	CASOS POSITIVOS
Bcl-2	451	82 (18%)
Bax	453	303 (67%)
Bak	456	350 (77%)
Bcl-x	448	398 (89%)



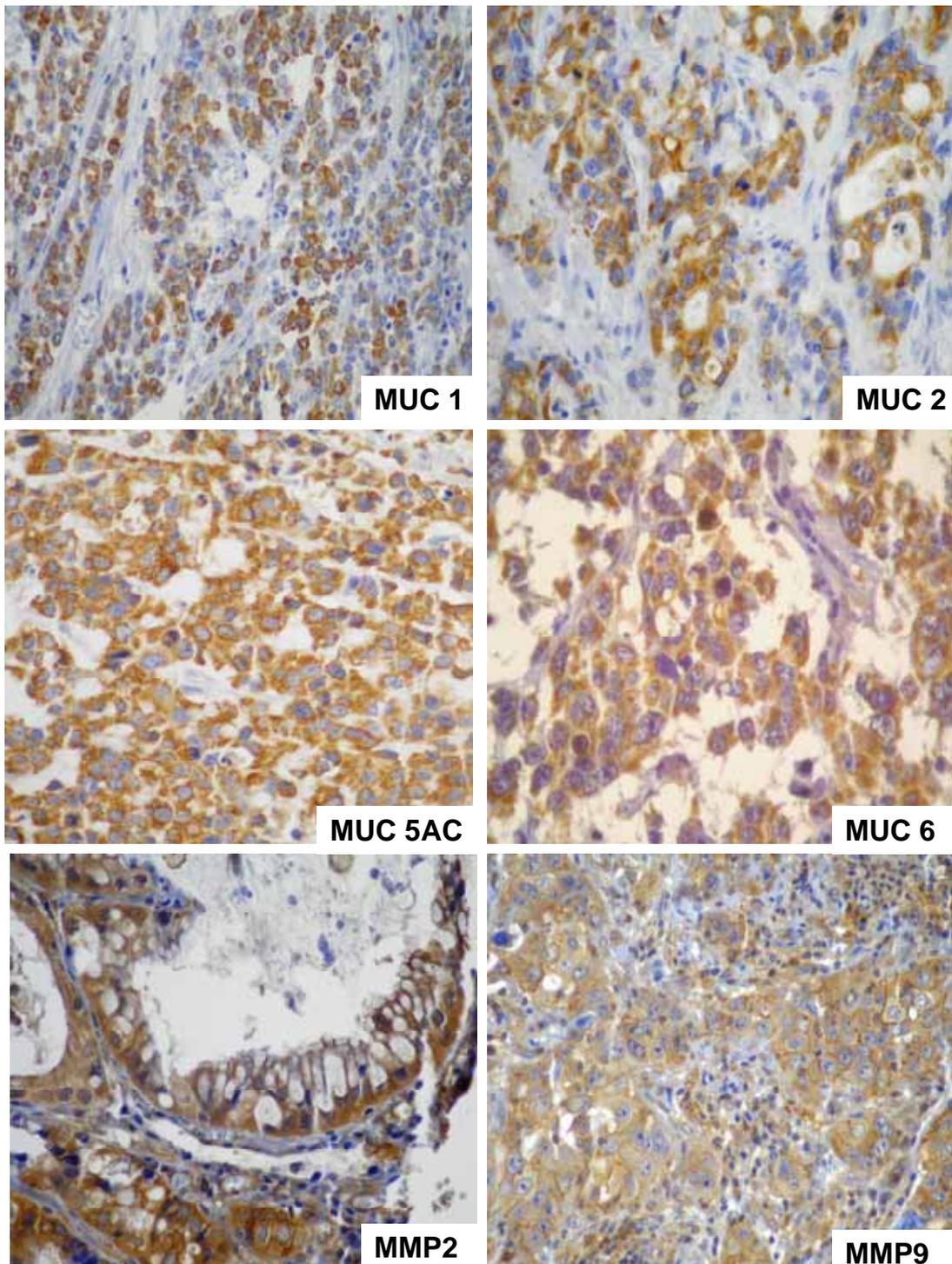
Legenda: Casos positivos para p21 (x20, detalhe x60), p27 (x40), p16 (x60), ciclina A (x60), ciclina B1 (x60), ciclina D1 (x40), Rb (x40).

Figura 5 - Carcinomas gástricos com expressão imunoistoquímica de proteínas de genes associados ao ciclo celular.



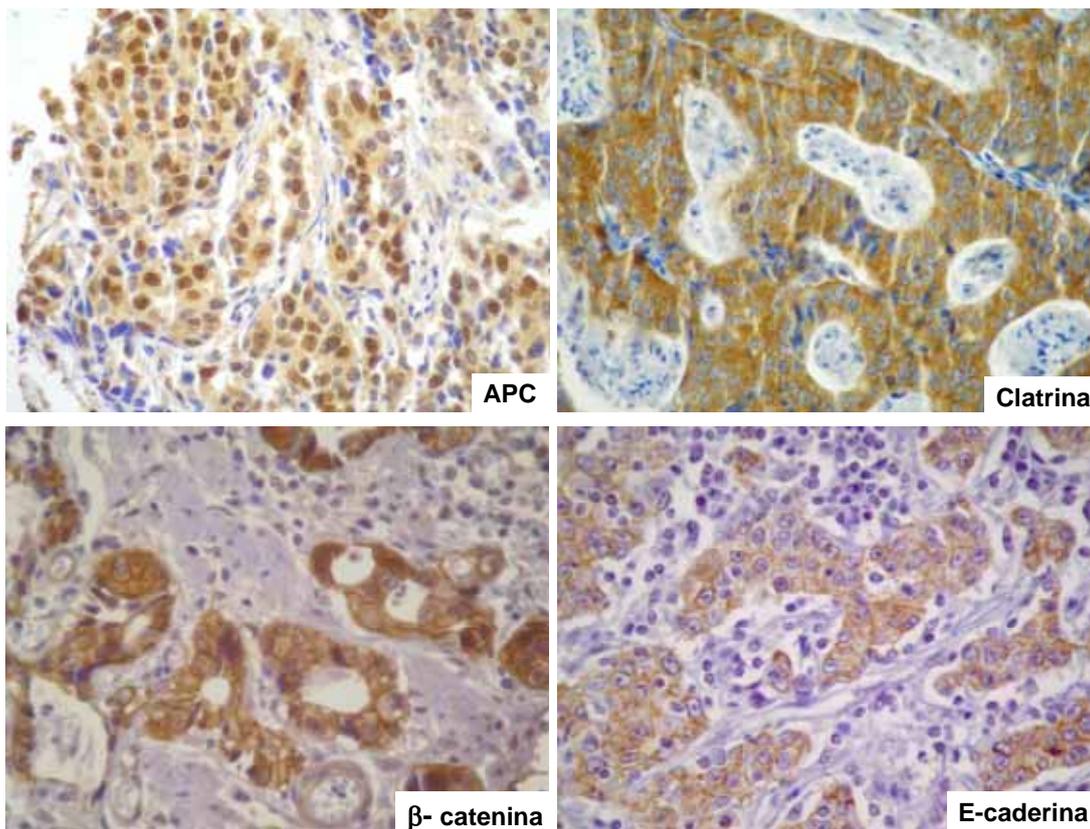
Legenda: carcinomas gástricos positivos para c-Met (x20, detalhe x60), VEGF (x40), TGFβI (x20, detalhe x60), TGFβII (x20, detalhe x60), c-erbB-2 (x60) e MSH2 (x40)

Figura 6 - Carcinomas intestinais e difusos com expressão imunoistoquímica de proteínas de genes associados a fatores de crescimento.



Legenda: Carcinomas gástricos positivos para mucinas e MMPs, aumento original x40 (MUC1) e x60 (MUC2, MUC5AC, MUC6, MMP2 e MMP9)

Figura 7 - Carcinomas gástricos com expressão imunoistoquímica de proteínas dos genes associados à adesão, diferenciação e transcrição celular

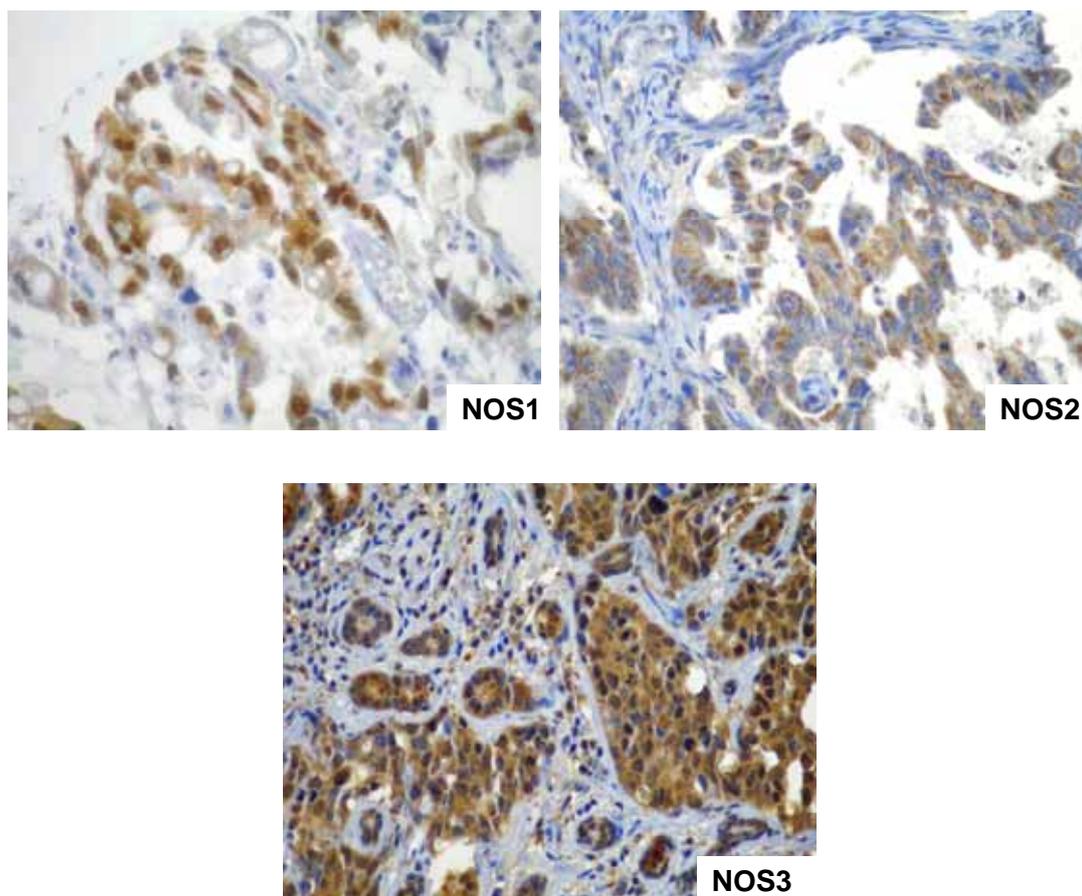


Legenda: Carcinomas gástricos positivos para APC (x40), clatrina (x60), β -catenina (x60), e E-caderina (x60)

Figura 8 - Carcinomas gástricos com expressão imunoistoquímica para APC, clatrina, β -catenina e E-caderina

Tabela 5 - Resultados das expressões imunoistoquímicas das proteínas dos genes associados à transcrição de sinal, adesão e diferenciação celular.

TRANSCRIÇÃO DE SINAL, ADESÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR		
ANTICORPOS	NÚMERO DE CASOS	CASOS POSITIVOS (%)
APC	454	301 (66%)
Clatrina	464	293 (63%)
E-caderina	457	112 (25%)
β -catenina	457	27 (6%)
MUC1	448	77 (18%)
MUC2	462	50 (11%)
MUC5AC	463	92 (20%)
MUC6	458	9 (2%)
MMP2	458	181 (40%)
MMP9	451	205 (45.5%)



Legenda: Carcinomas gástricos positivos para NOS1 (x60), NOS2 (x60), NOS3 (x40)

Figura 9 - Carcinomas gástricos com expressão imunoistoquímica das proteínas das sintases do óxido nítrico.

Tabela 6 - Resultados das expressões imunoistoquímicas das proteínas das sintases do óxido nítrico

SINTASES DO OXIDO NÍTRICO		
ANTICORPOS	NÚMERO DE CASOS	CASOS POSITIVOS (%)
NOS1	465	461 (99%)
NOS2	465	166 (36%)
NOS3	437	423 (97%)

4.2 ASSOCIAÇÕES ENTRE AS EXPRESSÕES IMUNOISTOQUÍMICAS E OS TIPOS HISTOLÓGICOS

4.2.1 Associações entre as variáveis clínicas e morfológicas dos carcinomas gástricos e os tipos histológicos

As análises das associações das variáveis clínicas, histológicas e de expressão imunoistoquímica foram realizadas em 400 casos, constituídos por 166 carcinomas difusos e 234 carcinomas intestinais. Os principais resultados podem ser vistos na Tabela 7.

Em relação as variáveis demográficas idade e gênero, observamos associações estatisticamente significantes entre estas variáveis e os tipos de carcinomas ($p=0.03$ e $p=0.003$, respectivamente). Embora haja um predomínio do gênero masculino em ambos os tipos de carcinomas, observamos que nos carcinomas do tipo intestinal há uma maior frequência de carcinomas em homens em comparação com o tipo difuso. Em relação à idade, vimos que os carcinomas do tipo difuso são mais comuns no grupo de pacientes com até 60 anos. Por outro lado, os carcinomas do tipo intestinal apresentaram a mesma frequência nos grupos de faixa etária.

Os carcinomas gástricos intestinais e difusos eram tumores macroscopicamente grandes e a grande maioria deles pertencia ao grupo de tumores com diâmetro máximo maior de 5 cm, não mostrando associação estatística entre tipo histológico e tamanho macroscópico máximo do diâmetro tumoral.

Os carcinomas do tipo intestinal e difuso localizavam-se preferencialmente na região distal do estômago, porém os carcinomas da região proximal eram freqüentemente do tipo intestinal com associação estatística significativa ($p=0.015$).

O grupo de carcinomas gástricos estudados era constituído principalmente por tumores avançados, vimos que mais de 90% dos carcinomas intestinais e difusos apresentavam nível profundo de infiltração da parede gástrica. Estes achados não mostraram associação estatística. Outro dado muito semelhante foi em relação à presença de metástase linfonodal. A presença de metástase foi detectada em 71% e em 77% dos carcinomas intestinais e difusos, respectivamente, sem associação estatística entre estas variáveis.

Associação estatística foi observada entre os tipos histológicos e estadiamento clínico. A maioria dos casos estágio I e II eram do tipo intestinal, enquanto que os casos estágio III e IV eram predominantemente do tipo difuso ($p<0.001$).

Tabela 7 – Comparações entre as principais características demográficas e histopatológicas e os tipos de carcinomas gástricos.

VARIÁVEL	CATEGORIA	TIPO HISTOLÓGICO			VALOR DE P
		INTESTINAL	DIFUSO	TOTAL	
Gênero	Masculino	155 (66%)	92 (55%)	247 (100%)	0.037
	Feminino	79 (34%)	74 (45%)	153 (100%)	
Idade	Até 60 anos	120 (52%)	110 (68%)	230 (100%)	0.003
	>60 anos	114 (48%)	56 (32%)	170 (100%)	
Tamanho do tumor	Até 5 cm	98 (42%)	72 (43%)	170 (100%)	NS
	> 5 cm	136 (58%)	94 (57%)	230 (100%)	
Localização	Distal	190 (82%)	146 (88%)	336 (100%)	NS
	Proximal	34 (15%)	10 (6%)	44 (100%)	
	Proximal+Distal	9 (3%)	10 (6%)	19 (100%)	
Nível de infiltração	Profunda	218 (93%)	157 (95%)	375 (100%)	NS
	Superficial	16 (7%)	9 (5%)	25 (100%)	
Metástases em linfonodos	Presente	168 (72%)	128 (77%)	296 (100%)	NS
	Ausente	63 (28%)	38 (33%)	101 (100%)	
Estádio Clínico	I e II	147 (71%)	75 (51%)	222 (100%)	< 0.001
	III e IV	59 (29%)	74 (49%)	133 (100%)	

4.2.2 Associações entre as expressões imunoistoquímicas dos marcadores e os tipos histológicos

Como já previamente descrito, as associações foram feitas somente entre as expressões imunoistoquímicas das proteínas e os carcinomas gástricos do tipo intestinal e difuso (n=400).

Os resultados das associações entre as expressões imunoistoquímicas das proteínas dos genes associados aos mecanismos de transcrição de sinal, adesão e diferenciação celular e os carcinomas intestinais e difusos podem ser vistos na Tabela 8.

A maioria dos carcinomas gástricos estudados apresentou perda total ou parcial da proteína E-caderina, sendo este padrão observado em 61% (137/224) dos

carcinomas intestinais e em 83% (144/155) dos difusos. Os carcinomas com expressão preservada de E-caderina eram principalmente do tipo intestinal 89% (87/98). Somente 11/98 (11%) casos de carcinomas difusos mostraram expressão de E-caderina em mais de 75% das células. Esta diferença de expressão foi estatisticamente significativa ($p < 0.001$).

A expressão de β -catenina na membrana das células tumorais (preservada) foi observada somente em 8% (18/215) dos carcinomas intestinais e em 3% (5/154) dos carcinomas difusos. A grande maioria dos casos apresentou expressão citoplasmática e/ ou nuclear deste marcador, correspondendo a 92% e 97% dos carcinomas intestinais e difusos respectivamente. Estes dados não foram estatisticamente significantes.

Os carcinomas gástricos de ambos os tipos foram em sua grande maioria negativos para as mucinas. Negatividade para MUC 1 foi observada em 75% (168/222) dos carcinomas intestinais e em 87% (139/158) dos difusos. MUC 2 negativa foi encontrada em 93% (212/226) dos carcinomas intestinais e em 81% (128/157) dos difusos. Os carcinomas intestinais foram negativos para MUC5AC em 178/226 (78%) dos casos e os difusos em 132/157 (84%). Positividade para MUC 6 foi observada somente em 4/225 (2%) dos carcinomas do tipo intestinal e 100% dos difusos foram negativos para MUC 6. Associação estatística entre estas variáveis foi encontrada somente entre a positividade para MUC2 e os carcinomas difusos. Dentre os casos positivos para MUC2, 67% (29/43) deles eram do tipo difuso, este resultado mostrou-se estatisticamente significativo ($p < 0.001$).

Uma molécula que revelou associação estatística entre a expressão da proteína e o tipo histológico foi a clatrina. Observamos que 75 % (172/228) dos

carcinomas do tipo intestinal foram positivos para esta proteína. Por outro lado, somente 45% (73/159) dos difusos mostraram esta expressão. Esta diferença mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0.001$).

Os resultados da expressão imunoistoquímica da proteína do gene APC nos carcinomas intestinais e difusos não mostraram associações estatísticas. Positividade para esta proteína foi observada em 64% (144/224) dos carcinomas intestinais e em 66% (103/154) dos difusos.

A expressão imunoistoquímica para MMP2 foi mais frequentemente observada nos carcinomas intestinais do que nos difusos. Dentre os casos positivos para MMP2, 68% (107/172) deles eram do tipo intestinal e 32% (51/155) do tipo difuso. Estes dados foram estatisticamente significantes ($p = 0.019$). Por outro lado, a expressão imunoistoquímica de MMP9 não mostrou diferenças importantes em relação aos tipos histológicos. Imunopositividade para MMP9 foi detectada em 47% (107/225) dos carcinomas intestinais e em 42% (65/153) dos difusos.

Para os marcadores de apoptose, observamos que os carcinomas intestinais e difusos foram positivos para Bax em 69% (153/223) e 65% (100/154) dos casos respectivamente. Positividade para Bak foi observada em 78% dos carcinomas intestinais e em 72% dos difusos. Os carcinomas intestinais foram positivos para Bcl-2 em 91% (202/221) dos casos e os difusos em 84% (129/152). A maioria dos casos foram frequentemente negativos para Bcl-2. 79% dos carcinomas intestinais e 82% dos difusos não mostraram expressão imunoistoquímica para esta proteína. Estes resultados não mostraram diferenças estatísticas significantes (Tabela 9).

Na Tabela 10 podemos observar as associações estatísticas entre os carcinomas gástricos e as expressões imunoistoquímicas das proteínas dos genes

associados ao ciclo celular. Os carcinomas gástricos dos tipos intestinal e difuso não mostraram associações estatísticas com a expressão de ciclina D1. Positividade para esta proteína foi vista em 112/223 (50%) carcinomas intestinais e em 84/149 (56%) carcinomas difusos. A frequência observada de carcinomas gástricos positivos para ciclina A foi muito semelhante entre os tipos intestinal e difuso (70% e 65%, respectivamente), não mostrando associações estatísticas significantes. A imunexpressão de ciclina B1 foi observada em 107/226 (47%) dos carcinomas intestinais e em 92/156 (58%) dos carcinomas difusos, esta diferença de expressão foi estatisticamente significativa ($p=0.029$). Em relação a expressão da proteína Rb, detectamos que os carcinomas gástricos expressam esta proteína em mais de 60% (138/224) dos carcinomas intestinais e em mais de 70% (121/157) dos carcinomas difusos. Porém, associação estatística foi observada entre a perda de expressão de pRb e o tipo histológico ($p=0.002$). Vimos que dentre os casos negativos para esta proteína, a maioria deles (70%) era do tipo intestinal.

Perdas das expressões protéicas detectadas por imunistoquímica para p27, p21 e p16 foram encontradas em 51% (114/224), 83% (189/226) e em 87% (200/228) dos carcinomas intestinais e em 45% (71/156), 92% (144/155) e em 91% (144/158) dos carcinomas difusos. Associação estatística entre as expressões destas proteínas e o tipo histológico foi observada somente entre a expressão de p21 e o tipo intestinal, pois vimos que no grupo de carcinomas gástricos positivos para p21, a maioria deles 77% (37/48) era constituída por carcinomas do tipo intestinal ($p=0.007$). A maioria dos carcinomas gástricos estudados foram negativos para a proteína p53. Detectamos que 146/226 (65%) dos carcinomas intestinais foram negativos para p53 e 118/154 (76%) dos carcinomas difusos também foram

negativos para esta proteína. Mas, semelhante ao observado com a proteína p21, notamos que dentre os casos positivos para p53, 70% (80/116) era do tipo intestinal e estes achados foram estatisticamente significativos ($p=0.001$).

As associações entre as expressões imunoistoquímicas das proteínas associadas aos fatores de crescimento e os tipos histológicos de carcinomas gástricos estão na Tabela 11. Observamos associações estatísticas entre as expressões imunoistoquímicas de TGF β I, TGF β II, c-erbB-2 e c-Met e o tipo histológico de carcinoma gástrico. As expressões de TGF β I e TGF β II foram observadas em 86% (197/228) e 98% (223/226) dos carcinomas intestinais e em 74% (117/157) e 94% (147/156) dos difusos. Embora, tenhamos observado que a maioria dos casos de ambos os tipos histológicos são positivos para estas proteínas, considerando somente os carcinomas positivos, notamos que 197/314 (63%) dos carcinomas positivos para TGF β I e 223/370 (60%) dos positivos para TGF β II são do tipo intestinal. Estes achados foram estatisticamente significantes ($p= 0.005$ e $p= 0.018$). 92 % (208/226), 95% (207/217) e 97% (220/226) dos carcinomas intestinais foram positivos para c-Met, VEGF e MSH2 respectivamente. Os carcinomas difusos mostraram 83% (129/154), 84% (126/149) e 85% (136/160) casos positivos para c-Met, VEGF e MSH2. Porém, se analisarmos os grupos de carcinomas positivos para c-Met, VEGF e MSH2 vimos que 62% (208/333), 62% (207/333) e 62% (220/356) deles são do tipo intestinal, mostrando uma associação estatística entre a expressão imunoistoquímica destes marcadores e os tipos histológicos ($p= 0.0012$, $p= <0.001$ e $p=<0.001$). Em relação a expressão imunoistoquímica de c-erbB-2, notamos que 78% (177/226) e 97% (154/159) dos carcinomas intestinais e difusos não mostraram expressão desta proteína. Seguindo os critérios de interpretação já descritos, a

expressão imunohistoquímica de c-erbB-2 foi observada em 54 casos do grupo total de 385 carcinomas gástricos estudados. Destes, 90% (49/54) eram carcinomas intestinais, mostrando uma forte associação deste tipo de carcinoma gástrico com a expressão de c-erbB-2 ($p < 0.001$).

As análises das expressões imunohistoquímicas de NOS1, NOS2 e NOS3 nos carcinomas gástricos mostraram que mais de 90% dos carcinomas gástricos do tipo intestinal e difuso foram positivos para NOS1 e NOS3. Somente 2/ 229 (1%) dos carcinomas intestinais e 2/158 (2%) dos carcinomas difusos foram negativos para NOS1. Negatividade para NOS3 foi observada em 2/217 (1%) dos carcinomas intestinais e em 11/148 (8%) dos carcinomas difusos. Os resultados das análises estatísticas mostraram associação entre a expressão de NOS3 e o tipo histológico de carcinoma, uma vez que a frequência (60%) de carcinomas intestinais positivos para NOS3 foi maior em comparação com os carcinomas difusos (40%) considerando-se o total de casos positivos para NOS3 ($p = 0.002$). Imunopositividade para NOS 2 foi observada em 92/229 (40%) dos carcinomas intestinais e em 50/157 (32%) dos carcinomas difusos, sem diferenças estatisticamente significantes. Estes dados podem ser vistos na Tabela 12.

Tabela 8 - Associações entre as expressões imunohistoquímicas das proteínas dos genes de transcrição de sinal, adesão celular e diferenciação celular e os tipos de carcinomas gástricos.

ANTICORPO	CATEGORIA	TIPO HISTOLÓGICO			VALOR DE P
		INTESTINAL	DIFUSO	TOTAL	
E-caderina	Preservada	87 (39%)	11 (7%)	98 (100%)	0.001
	Perda total ou parcial	137 (61%)	144 (93%)	281 (100%)	
B-catenina	Preservada	18 (8%)	5 (4%)	23 (100%)	NS
	Alterada	207 (92%)	149 (96%)	356 (100%)	
MUC1	Negativo	168 (75%)	139 (93%)	307 (100%)	NS
	Positivo	54 (25%)	9 (7%)	63 (100%)	
MUC2	Negativo	212 (93%)	128 (82%)	340 (100%)	0.001
	Positivo	14 (7%)	29 (18%)	43 (100%)	
MUC5AC	Negativo	178 (78%)	132 (84%)	310 (100%)	NS
	Positivo	48 (22%)	25 (16%)	73 (100%)	
MUC6	Negativo	221 (98%)	152 (100%)	373 (100%)	NS
	Positivo	4 (2%)	0	4 (100%)	
Clatrina	Negativo	56 (25%)	86 (54%)	142 (100%)	< 0.001
	Positivo	172 (75%)	73 (46%)	245(100%)	
APC	Negativo	80 (36%)	51 (33%)	131 (100%)	NS
	Positivo	144 (64%)	103 (67%)	247 (100%)	
MMP2	Negativo	123 (54%)	101 (66%)	224 (100%)	0.019
	Positivo	104 (46%)	51 (34%)	155 (100%)	
MMP9	Negativo	118 (52%)	88 (57%)	206 (100%)	NS
	Positivo	107 (48%)	65 (43%)	172 (100%)	

Tabela 9 - Associações entre as expressões imunoistoquímicas das proteínas dos genes associados a apoptose e os tipos de carcinomas gástricos.

ANTICORPO	MARCAÇÃO	TIPO HISTOLÓGICO		TOTAL	VALOR DE P
		INTESTINAL	DIFUSO		
Bax	Negativo	70 (32%)	54 (35%)	124 (100%)	NS
	Positivo	153 (68%)	100 (65%)	253 (100%)	
Bak	Negativo	48 (22%)	43 (28%)	91 (100%)	NS
	Positivo	177 (78%)	112 (72%)	289 (100%)	
Bcl-2	Negativo	179 (80%)	125 (82%)	304 (100%)	NS
	Positivo	45 (20%)	27 (18%)	72 (100%)	
Bcl-x	Negativo	19 (9%)	23 (16%)	42 (100%)	NS
	Positivo	202 (91%)	129 (84%)	331 (100%)	

Tabela 10 – Associações entre as expressões imunoistoquímicas das proteínas dos genes associados ao ciclo celular e os tipos de carcinomas gástricos.

ANTICORPO	MARCAÇÃO	TIPO HISTOLÓGICO		TOTAL	VALOR DE P
		INTESTINAL	DIFUSO		
Ciclina D1	Negativo	112 (51%)	84 (56%)	196 (100%)	NS
	Positivo	111 (49%)	65 (44%)	176 (100%)	
Ciclina A	Negativo	66 (30%)	51 (33%)	117 (100%)	NS
	Positivo	160 (70%)	102 (67%)	262 (100%)	
Ciclina B1	Negativo	119 (52%)	64 (41%)	183 (100%)	0.029
	Positivo	107 (48%)	92 (59%)	199 (100%)	
Rb	Negativo	86 (39%)	36 (23%)	122 (100%)	0.002
	Positivo	138 (61%)	121 (77%)	259 (100%)	
p27	Negativo	114 (51%)	71 (45%)	185 (100%)	NS
	Positivo	110 (49%)	85 (55%)	195 (100%)	
p21	Negativo	189 (84%)	144 (93%)	333 (100%)	0.007
	Positivo	37 (16%)	11 (7%)	48 (100%)	
p16	Negativo	200 (88%)	144 (92%)	344 (100%)	NS
	Positivo	28 (12%)	14 (8%)	42 (100%)	
p53	Negativo	146 (65%)	118 (76%)	264 (100%)	0.001
	Positivo	80 (35%)	36 (24%)	116 (100%)	

Tabela 11 – Associações entre as expressões imunohistoquímicas das proteínas dos genes associados a fatores de crescimento e os tipos de carcinomas gástricos.

ANTICORPO	MARCAÇÃO	TIPO HISTOLÓGICO			VALOR DE P
		INTESTINAL	DIFUSO	TOTAL	
TGFβI	Negativo	31 (14%)	40 (25%)	71 (100%)	0.005
	Positivo	197 (86%)	117 (75%)	314 (100%)	
TGFβII	Negativo	3 (2%)	9 (6%)	12 (100%)	0.018
	Positivo	223 (98%)	147 (94%)	370 (100%)	
c-erbB-2	Negativo	177 (78%)	154 (97%)	331 (100%)	< 0.001
	Positivo	49 (22%)	5 (3%)	54 (100%)	
c-Met	Negativo	17 (8%)	25 (16%)	42 (100%)	0.012
	Positivo	208 (92%)	129 (84%)	333 (100%)	
VEGF	Negativo	10 (8%)	23 (15%)	33 (100%)	< 0.001
	Positivo	207 (92%)	126 (85%)	333 (100%)	
MSH2	Negativo	6 (3%)	24 (15%)	30 (100%)	< 0.001
	Positivo	220 (97%)	136 (85%)	356 (100%)	

Tabela 12 – Associações entre as expressões imunohistoquímicas das proteínas das sintases de óxido e os tipos de carcinomas gástricos.

ANTICORPO	MARCAÇÃO	TIPO HISTOLÓGICO			VALOR DE P
		INTESTINAL	DIFUSO	TOTAL	
NOS1	Negativo	2 (1%)	2 (2%)	4 (100%)	NS
	Positivo	227 (99%)	156 (98%)	383 (100%)	
NOS2	Negativo	137 (60%)	107 (68%)	244 (100%)	NS
	Positivo	92 (40%)	50 (32%)	142 (100%)	
NOS3	Negativo	2 (1%)	11 (8%)	13 (100%)	0.002
	Positivo	215 (99%)	137 (92%)	352 (100%)	

4.3 ANÁLISES UNIVARIADAS

4.3.1 Análises univariadas do grupo de carcinomas gástricos

A Variáveis clínicas e histológicas

As análises univariadas foram calculadas em relação à sobrevida global em cinco anos (60 meses) dos 482 pacientes com carcinomas gástricos. Neste período, 164 pacientes estavam vivos e 318 mortos, destes 292 casos morreram especificamente por câncer e 26 morreram por outras causas. As análises univariadas de sobrevida dos pacientes em relação aos parâmetros clínicos podem ser vistas na Tabela 13. Observamos associações estatísticas das análises entre as variáveis: nível de infiltração da parede gástrica, presença de metástase em linfonodos, localização da lesão, estágio clínico e a sobrevida global em cinco anos dos pacientes com carcinomas gástricos. As demais variáveis, gênero, idade, tamanho do tumor, tipo histológico de Lauren, Carneiro e OMS não mostraram associações estatísticas nas análises univariadas em relação à sobrevida global em cinco anos dos pacientes. Pacientes com tumores localizados na região proximal mostraram uma melhor taxa de sobrevida em cinco anos (34.4%) em comparação a aqueles localizados nas regiões distal (19.2%) ou proximal+distal do estômago (19.2%). Esta diferença nas análises univariadas foram estatisticamente significantes ($p=0.024$). Os pacientes com carcinomas gástricos e nível de infiltração profunda da parede do estômago, apresentaram taxa de sobrevida diferente daqueles com infiltração superficial. A chance de sobrevida em cinco anos no grupo de pacientes com carcinomas com nível de infiltração profunda foi de 29.5%, por outro lado, aqueles com infiltração superficial mostraram taxa de 79.5% de sobrevida neste mesmo período de tempo (p

<0.001). Os pacientes com carcinomas com metástases em linfonodos, apresentaram taxa de sobrevida em cinco anos nas análises univariadas de 22.4%. Esta taxa foi de 62.1% para os pacientes com carcinomas sem metástases em linfonodos. Esta diferença mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0.001$). Pacientes com estágio clínico avançado (III ou IV) tiveram pior taxa de sobrevida em cinco anos (14.8 % e 5.3%, respectivamente) em comparação aos pacientes com estádios clínicos iniciais I ou II (70.3% e 34.6%, respectivamente), sendo estas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.001$).

Tabela 13 - Análise univariada dos parâmetros clínicos e histológicos em relação à sobrevida global em 5 anos dos pacientes com carcinomas gástricos.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	NÚMERO DE CASOS	SOBREVIDA GLOBAL EM 5 ANOS (%)	VALOR DE P
Gênero	Masculino	308	33.1	0.191
	Feminino	174	35.2	
Idade	até 60 anos	273	33.9	0.113
	> 60 anos	209	29.4	
Tamanho	até 5 cm	198	32.4	0.94
	> 5 cm	284	31.7	
Localização	Proximal	407	34.4	0.024
	Distal	48	19.2	
	Prox + Distal	26	19.2	
Nível de infiltração	Profunda	455	29.5	<0.001
	Superficial	27	76.5	
Metástases em linfonodos	Presente	358	22.4	<0.001
	Ausente	119	62.1	
Estadio Clínico	I	107	70.3	<0.001
	II	161	34.6	
	III	133	14.8	
	IV	19	5.3	
	Intestinal	234	33.8	
Tipo Histológico de Lauren	Difuso	166	31.3	0.301
	Misto	60	21.8	
Tipo Histológico Carneiro	Inclassificável	22	43.8	0.072
	Glandular	221	34.5	
	Células isoladas	157	27.2	
	Misto	55	20	
	Inclassificável	49	48	
Tipo Histológico OMS	Tubular	191	34.9	0.875
	Papilífero	102	33.3	
	Células em anel de sinete	37	27	
	Mucinoso	43	23.6	
	Carcinoma indiferenciado	74	34.3	
	Adenocarcinoma	35	22.3	

B Expressão imunoistoquímica de proteínas

As análises univariadas de sobrevida global em cinco anos dos pacientes com carcinomas gástricos em relação aos resultados das expressões imunoistoquímicas das proteínas pesquisadas mostraram associação somente entre a expressão imunoistoquímica de ciclina B1 e a taxa de sobrevida em cinco anos. Pacientes com carcinomas gástricos negativos para ciclina B1 mostraram taxa de sobrevida em

cinco anos de 40%, enquanto que esta taxa cai para 22,6% nos pacientes com carcinomas gástricos positivos para esta proteína. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0.001$). As análises univariadas das demais proteínas estudadas não mostraram associações estatísticas entre a expressão imunoistoquímica e a taxa de sobrevida global em cinco anos dos pacientes com carcinomas gástricos. A Tabela 14 mostra os resultados das análises univariadas das expressões imunoistoquímicas de cada proteína estudada em relação à sobrevida global em cinco anos dos 482 pacientes com carcinomas gástricos.

Tabela 14 - Análise univariada das proteínas estudadas por imunohistoquímica em relação à sobrevida global dos 482 pacientes em 5 anos.

APOPTOSE				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
Bcl-2	Negativo	369	32,6	0,31
	Positivo	82	24,8	
Bak	Negativo	106	35,5	0,33
	Positivo	350	29,4	
Bax	Negativo	150	36,2	0,78
	Positivo	303	28,1	
Bcl-x	Negativo	50	27,2	0,47
	Positivo	398	31,4	
CICLO CELULAR				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
p16	Negativo	413	31,6	0,74
	Positivo	50	31,3	
p27	Negativo	226	28,7	0,21
	Positivo	231	31,9	
p21	Negativo	394	31,3	0,99
	Positivo	64	27,5	
Ciclina D1	Negativo	229	30,4	0,60
	Positivo	316	29,5	
Ciclina A	Negativo	142	32,7	0,40
	Positivo	316	29,5	
Ciclina B1	Negativo	231	40	<0,001
	Positivo	229	22,6	
Rb	Negativo	145	36,2	0,06
	Positivo	313	27,9	
p53	Negativo	321	31,2	0,41
	Positivo	137	31	
FATORES DE CRESCIMENTO				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
c-Met	Negativo	49	36,7	0,29
	Positivo	409	29,9	
VEGF	Negativo	39	34,6	0,59
	Positivo	399	30	
c-erbB-2	Negativo	406	30,4	0,30
	Positivo	56	38,3	
TFGβI	Negativo	82	28,2	0,38
	Positivo	382	31,9	
TGFβII	Negativo	13	60,6	0,06
	Positivo	446	30,5	
MSH2	Negativo	36	41,3	0,19
	Positivo	427	29,9	

Cont. Tabela 14

ADESÃO, TRANSCRIÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
APC	Negativo	153	29.8	0.54
	Positivo	301	30.9	
Clatrina	Negativo	171	36.3	0.17
	Positivo	293	29.4	
E-caderina	Negativo	345	30.5	0.75
	Positivo	112	30.6	
β -catenina	Negativo	430	31.4	0.31
	Positivo	27	27.4	
MUC1	Negativo	371	30.7	0.69
	Positivo	77	29.7	
MUC2	Negativo	412	32.1	0.42
	Positivo	50	27.2	
MUC5AC	Negativo	371	31.3	0.85
	Positivo	92	28.4	
MUC6	Negativo	449	30.8	0.39
	Positivo	9	51.8	
MMP2	Negativo	277	30.4	0.97
	Positivo	181	31.6	
MMP9	Negativo	246	30.7	0.96
	Positivo	209	31.3	
SINTASES DO ÓXIDO NITRICO				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
NOS1	Negativo	4	50	0,49
	Positivo	461	31,4	
NOS2	Negativo	299	31,9	0,32
	Positivo	166	31,6	
NOS3	Negativo	14	30,9	0,90
	Positivo	423	30	

4.3.2 Análises univariadas dos carcinomas gástricos intestinais

A Variáveis clínicas e histológicas

As análises univariadas foram calculadas em relação à sobrevida global em cinco anos (60 meses) dos 234 pacientes com carcinomas gástricos do tipo intestinal. As análises univariadas de sobrevida dos pacientes em relação aos parâmetros clínicos podem ser vistas na Tabela 15. Observamos associações estatísticas das análises entre as variáveis: nível de infiltração da parede gástrica, presença de

metástase em linfonodos, estágio clínico e a sobrevida global em cinco anos dos pacientes com carcinomas intestinais. As demais variáveis: gênero, idade e tamanho do tumor não mostraram associações estatísticas nas análises univariadas em relação à sobrevida global em cinco anos dos pacientes. Os pacientes com carcinomas intestinais e nível de infiltração profunda da parede do estômago, apresentaram taxa de sobrevida em 5 anos de 31.6%, sendo esta taxa de 65.4% para os pacientes com carcinomas intestinais e infiltração superficial da parede gástrica. Sendo estes dados estatisticamente significativos ($p=0.01$). Os pacientes com carcinomas intestinais com metástases em linfonodos, apresentaram taxa de sobrevida em cinco anos nas análises univariadas de 24%. Esta taxa foi de 62.1% para os pacientes com carcinomas intestinais sem metástases em linfonodos. Esta diferença mostrou-se estatisticamente significante ($p<0.001$). Assim como o observado no grupo total de carcinomas gástricos, os pacientes com carcinomas intestinais e estágio clínico avançado (III ou IV) tiveram pior taxa de sobrevida em cinco anos (0% e 12.5%, respectivamente) em comparação aos pacientes com estádios clínicos iniciais I ou II (72.8% e 35%, respectivamente), sendo estas diferenças estatisticamente significantes ($p<0.001$).

Tabela 15 - Análise univariada dos parâmetros clínicos e histológicos em relação a sobrevida global dos pacientes com carcinomas gástricos do tipo intestinal.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	NÚMERO DE CASOS	SOBREVIDA GLOBAL EM 5 ANOS (%)	Valor de P
Gênero	Masculino	155	32.1	0.36
	Feminino	79	37.0	
Idade	até 60 anos	120	32.1	0.70
	> 60 anos	114	35.6	
Tamanho	até 5 cm	98	35.8	0.62
	> 5 cm	136	32.3	
Localização	Proximal	34	20.5	0.10
	Distal	190	37.0	
	Prox + Distal	9	22.2	
Nível de infiltração	Profunda	218	31.6	0.01
	Superficial	16	65.4	
Metástases em linfonodos	Presente	168	24.0	<0.001
	Ausente	63	62.1	
Estádio Clínico	I	54	72.8	<0.001
	II	93	35.0	
	III	54	12.5	
	IV	5	0	

B Análises das expressões das proteínas

As análises univariadas de sobrevida global em cinco anos dos pacientes com carcinomas intestinais em relação aos resultados das análises das proteínas pesquisadas por imunohistoquímica mostraram a mesma associação anteriormente descrita no grupo de carcinomas gástricos entre a expressão imunohistoquímica de ciclina B1 e índice de sobrevida em cinco anos. Pacientes com carcinomas intestinais negativos para ciclina B1 mostraram taxa de sobrevida em cinco anos de 41.2%, enquanto que esta taxa cai para 24.9% nos pacientes com carcinomas intestinais

positivos para esta proteína. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0.002$). As análises univariadas das demais proteínas estudadas não mostraram associações estatísticas entre a expressão imunoistoquímica e a taxa de sobrevida global em cinco anos dos pacientes com carcinomas intestinais. A Tabela 16 mostra os resultados das análises univariadas das expressões imunoistoquímicas de cada proteína estudada em relação à sobrevida global em cinco anos dos 234 pacientes com carcinomas gástricos do tipo intestinal.

Tabela 16 - Análise univariada das expressões imunoistoquímicas das proteínas em relação à sobrevida global em 5 anos dos pacientes com carcinomas gástricos intestinais.

APOPTOSE				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
Bcl-2	Negativo	179	35.3	0.16
	Positivo	45	24.0	
Bak	Negativo	48	39.5	0.22
	Positivo	177	31.1	
Bax	Negativo	70	38.4	0.12
	Positivo	153	30.2	
Bcl-x	Negativo	19	26.3	0.63
	Positivo	202	33.7	
CICLO CELULAR				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
p16	Negativo	200	32.7	0.35
	Positivo	28	38.3	
p27	Negativo	114	31.2	0.64
	Positivo	110	34.0	
p21	Negativo	189	33.9	0.56
	Positivo	37	26.6	
Ciclina D1	Negativo	112	31.9	0.75
	Positivo	111	33.6	
Ciclina A	Negativo	66	36.4	0.22
	Positivo	160	31.1	
Ciclina B1	Negativo	119	41.2	0.002
	Positivo	107	24.9	
Rb	Negativo	86	33.1	0.50
	Positivo	138	31.4	
p53	Negativo	146	31.2	0.81
	Positivo	80	36.7	

Cont. Tabela 16

FATORES DE CRESCIMENTO				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
c-Met	Negativo	17	35.2	0.52
	Positivo	208	32.7	
VEGF	Negativo	10	36.0	0.55
	Positivo	207	32.6	
c-erbB-2	Negativo	177	33.2	0.88
	Positivo	49	33.4	
TFGβI	Negativo	31	34.1	0.77
	Positivo	197	33.2	
TGFβII	Negativo	3	33.3	0.90
	Positivo	223	33.7	
MSH2	Negativo	6	66.6	0.11
	Positivo	220	32.3	
ADESÃO, TRANSCRIÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
APC	Negativo	80	32.6	0.95
	Positivo	144	32.6	
Clatrina	Negativo	56	45.5	0.07
	Positivo	172	30.0	
E-caderina	Alterada	137	35.8	0.25
	Preservada	87	27.3	
β-catenina	Alterada	207	33.7	0.25
	Preservada	18	25.0	
MUC1	Negativo	168	32.8	0.60
	Positivo	54	31.3	
MUC2	Negativo	212	33.2	0.76
	Positivo	14	41.6	
MUC5AC	Negativo	178	34.4	0.20
	Positivo	48	26.2	
MUC6	Negativo	221	33.1	0.48
	Positivo	4	50.0	
MMP2	Negativo	123	33.4	0.74
	Positivo	104	32.5	
MMP9	Negativo	118	31.7	0.80
	Positivo	107	34.3	
SINTASES DO ÓXIDO NITRICO				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
NOS1	Negativo	2	50.0	0.65
	Positivo	227	33.5	
NOS2	Negativo	137	34.3	0.82
	Positivo	92	33.8	
NOS3	Negativo	2	50.0	0.71
	Positivo	215	31.5	

4.3.3 Análise univariada dos carcinomas difusos

A Variáveis clínicas e histológicas

As análises univariadas foram calculadas em relação à sobrevida global em cinco anos (60 meses) dos 166 pacientes com carcinomas gástricos do tipo difuso. Observamos associações estatísticas das análises entre as variáveis: idade, nível de infiltração da parede gástrica, presença de metástase em linfonodos, estágio clínico e a sobrevida global em cinco anos dos pacientes com carcinomas intestinais. As variáveis gênero e tamanho do tumor não mostraram associações estatísticas nas análises univariadas em relação à sobrevida global em cinco anos dos pacientes. Os pacientes com carcinomas difusos de até 60 anos de idade mostraram taxa de sobrevida em 5 anos de 35.7%, um pouco maior em relação aos pacientes com mais de 60 anos, cuja taxa de sobrevida foi de 22.3%. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0.01$). Os pacientes com carcinomas difusos exibindo nível de infiltração profunda da parede do estômago, apresentaram taxa de sobrevida em 5 anos de 28%, sendo esta taxa de 88.8% para os pacientes com carcinomas difusos e infiltração superficial da parede gástrica. Estes dados foram estatisticamente significativos ($p=0.006$). Os pacientes com carcinomas difusos com metástases em linfonodos, apresentaram taxa de sobrevida em cinco anos nas análises univariadas de 21.1%. Esta taxa foi de 66.3% para os pacientes com carcinomas difusos sem metástases em linfonodos. Esta diferença mostrou-se estatisticamente significativa ($p<0.001$). Assim como o observado nos outros grupos carcinomas gástricos, os pacientes com carcinomas difusos e estágio clínico avançado (III ou IV) tiveram pior taxa de sobrevida em cinco anos (8.3% e 18.7%, respectivamente) em comparação aos pacientes com estádios clínicos iniciais I ou II (70.2% e 33.3%,

respectivamente), sendo estas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.001$).

Estes resultados podem ser vistos na Tabela 17.

Tabela 17 - Análise univariada dos parâmetros clínicos e histológicos em relação à sobrevida global dos pacientes com carcinomas gástricos do tipo difuso.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	NÚMERO DE CASOS	SOBREVIDA GLOBAL EM 5 ANOS (%)	Valor de P
Gênero	Masculino	92	27.0	0.25
	Feminino	74	36.8	
Idade	até 60 anos	110	35.7	0.01
	> 60 anos	56	22.3	
Tamanho	até 5 cm	72	31.3	0.77
	> 5 cm	94	31.1	
Localização	Proximal	10	22.5	0.49
	Distal	146	32.6	
	Prox + Distal	10	20.0	
Nível de infiltração	Profunda	157	28.0	0.006
	Superficial	9	88.8	
Metástases em linfonodos	Presente	128	21.1	<0.001
	Ausente	38	66.3	
Estádio Clínico	I	36	70.2	<0.001
	II	39	33.3	
	III	62	18.7	
	IV	12	8.3	

B Análises das expressões das proteínas

As análises univariadas de sobrevida global em cinco anos dos pacientes com carcinomas difusos em relação aos resultados das análises das proteínas pesquisadas por imunohistoquímica mostraram associações entre as expressões imunohistoquímicas de p16, ciclina B1, Rb, p53 e índice de sobrevida. A taxa de sobrevida dos pacientes com carcinomas difusos negativos para a proteína p16 foi de 32.6%. Esta taxa foi de apenas 7.1% para aqueles com carcinomas gástricos positivos para este marcador. Diferença estatisticamente significativa foi encontrada nestes casos ($p=0.01$). Pacientes com carcinomas difusos negativos para ciclina B1 mostraram taxa de sobrevida em cinco anos de 45.3%, esta taxa cai para 20% nos pacientes com

carcinomas difusos positivos para esta proteína. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0.001$). Pacientes com carcinomas gástricos difusos negativos para Rb mostraram taxa de sobrevida em 5 anos de 52.3 %, e aqueles com imunopositividade para esta proteína exibiram taxa de sobrevida de 24.1%, com resultados estatisticamente significativos ($p = 0.006$). A perda de expressão imunohistoquímica para a proteína p53 nos carcinomas difusos mostrou nas análises univariadas taxa de sobrevida em 5 anos de 35.0% dos pacientes. Por outro lado esta taxa foi de 14.1% para os pacientes com carcinomas difusos positivos para este marcador, mostrando associação entre a expressão de p53 e a sobrevida em 5 anos dos pacientes com carcinomas difusos ($p = 0.005$). As análises univariadas das demais proteínas estudadas por imunohistoquímica não mostraram associações estatísticas entre as expressões imunohistoquímicas e a taxa de sobrevida global em cinco anos destes pacientes. A Tabela 18 mostra os resultados das análises univariadas das expressões imunohistoquímicas de cada proteína estudada em relação à sobrevida global em cinco anos dos 166 pacientes com carcinomas gástricos do tipo difuso.

Tabela 18 - Análise univariada das expressões imunoistoquímicas das proteínas em relação à sobrevida global em 5 anos dos pacientes com carcinomas gástricos difusos.

APOPTOSE				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
Bcl-2	Negativo	125	31.7	0.86
	Positivo	27	27.0	
Bak	Negativo	43	38.8	0.33
	Positivo	112	26.8	
Bax	Negativo	54	39.7	0.08
	Positivo	100	25.3	
Bcl-x	Negativo	23	33.6	0.91
	Positivo	129	29.4	
CICLO CELULAR				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
p16	Negativo	144	32.6	0.01
	Positivo	14	7.1	
p27	Negativo	71	26.0	0.09
	Positivo	85	31.8	
p21	Negativo	144	30.5	0.80
	Positivo	11	23.5	
Ciclina D1	Negativo	84	32.3	0.33
	Positivo	65	22.6	
Ciclina A	Negativo	51	38.0	0.15
	Positivo	102	24.8	
Ciclina B1	Negativo	64	45.3	<0.001
	Positivo	92	20.0	
Rb	Negativo	36	52.3	0.006
	Positivo	121	24.1	
p53	Negativo	118	35.0	0.005
	Positivo	36	14.1	
FATORES DE CRESCIMENTO				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
c-Met	Negativo	25	44.8	0.12
	Positivo	129	26.6	
VEGF	Negativo	23	43.4	0.27
	Positivo	126	26.2	
c-erbB-2	Negativo	154	29.7	0.15
	Positivo	5	60.0	
TFGβI	Negativo	40	28.7	0.47
	Positivo	117	31.0	
TGFβII	Negativo	9	64.8	0.05
	Positivo	147	27.7	
MSH2	Negativo	24	41.2	0.24
	Positivo	136	27.7	

Cont. Tabela 18

ADESÃO, TRANSCRIÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
APC	Negativo	51	34.5	0.78
	Positivo	103	27.2	
Clatrina	Negativo	86	37.3	0.26
	Positivo	73	25.9	
	Alterada	144	29.4	
E-caderina	Preservada	11	40.0	0.33
	Alterada	149	30.2	
β -catenina	Preservada	5	40.0	0.84
	Negativo	139	29.2	
MUC1	Positivo	9	22.2	0.81
	Negativo	128	32.8	
MUC2	Positivo	29	24.1	0.36
	Negativo	132	30.4	
MUC5AC	Positivo	25	26.1	0.99
	Negativo	152	30.1	
MUC6	Positivo	0	NA	NA
	Negativo	101	28.4	
MMP2	Positivo	51	30.2	0.61
	Negativo	88	35.2	
MMP9	Positivo	65	24.2	0.16
SINTASES DO ÓXIDO NITRICO				
Anticorpo	Categoria	Número de casos	Sobrevida global Em 5 anos (%)	Valor de P
NOS1	Negativo	2	50.0	0.61
	Positivo	156	29.9	
NOS2	Negativo	107	32.1	0.81
	Positivo	50	26.7	
NOS3	Negativo	11	30.3	0.87
	Positivo	137	29.5	

4.4 ANÁLISE MULTIVARIADA

As análises multivariadas semelhante às análises univariadas, foram realizadas em 3 grupos. O primeiro grupo compreendia toda a casuística de nosso estudo e era constituído por 482 carcinomas gástricos (234 intestinais, 166 difusos, 60 mistos e 22 inclassificáveis de acordo com a classificação de Lauren). O segundo

grupo era constituído por 234 carcinomas intestinais e o terceiro grupo por 166 carcinomas difusos.

Todas as variáveis clínicas ou moleculares com nível de significância na análise univariada menor que 0.25 participaram da análise multivariada através do modelo de regressão de Cox.

4.4.1 Análise multivariada no grupo de carcinomas gástricos

Os fatores de risco independentes para morte identificados pelo modelo de Cox nos 482 carcinomas gástricos estudados foram: idade, estágio clínico e expressão imunohistoquímica de TGF β II. Estes dados estão expostos na Tabela 19.

Tabela 19 - Análise multivariada dos 482 carcinomas gástricos. Modelo de regressão de Cox com as variáveis: idade, estágio e expressão de TGF β II.

Variável	Categoria	Hazard ratio	Intervalo de Confiança 95% do Hazard ratio
Idade	Até 60 anos	1.0	Ref
	>60 anos	1.3	1.1-1.7
TGF β II	Negativo	1.0	Ref
	Positivo	3.0	1.0-8.2
Estádio clínico	I	1.0	Ref
	II	3.2	2.1-4.9
	III	6.0	3.9-9.2
	IV	9.3	5.0-17.2

De acordo com estes dados observamos que pacientes com carcinomas gástricos com mais de 60 anos apresentam um discreto aumento no risco de morte (1.3x) comparado aos pacientes com idade até 60 anos. Em relação à expressão de TGF β II, notamos que os pacientes com carcinomas gástricos positivos para esta proteína têm um risco maior de até 3x de morrer em relação aos pacientes com carcinomas gástricos negativos para TGF β II. Como já estabelecido na literatura

nossos casos também mostraram que à medida que aumenta o estágio clínico (I, II, III e IV), há também o aumento do risco de óbito de 3.2 para o estágio II, 6.0 para o estágio III e 9.3 para o estágio IV. As curvas de sobrevida estão ilustradas nas Figuras 10,11 e 12.

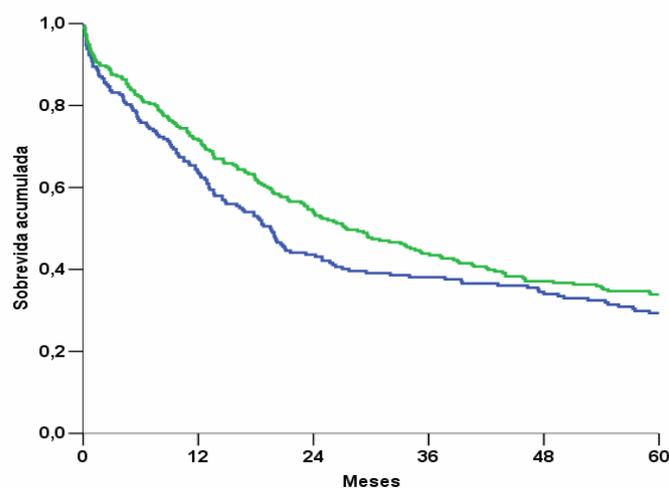


Figura 9 - Curvas de sobrevidas de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas gástricos de até 60 anos (verde) e com mais de 60 anos (azul). Os pacientes com até 60 anos mostraram uma discreta melhora da sobrevida em relação aos pacientes com mais de 60 anos.

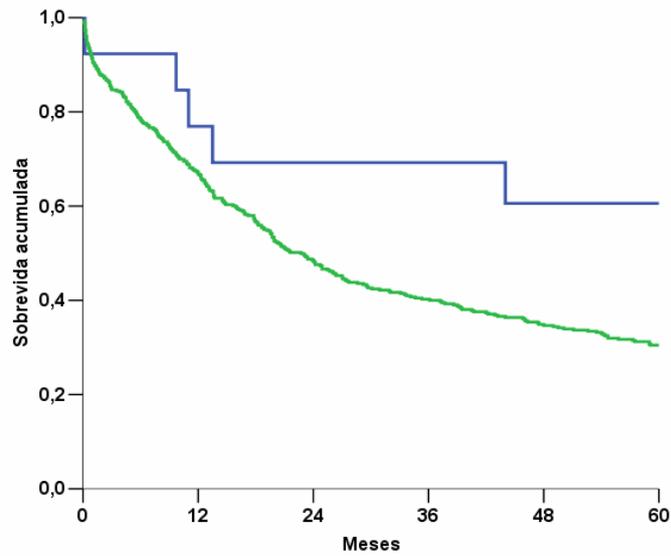


Figura 10 - Curvas de sobrevidas de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas gástricos positivos para TGF β II (verde) e negativos para TGF β II (azul). Os casos TGF β II positivos mostraram curva de sobrevida pior em relação aos casos TGF β II negativos.

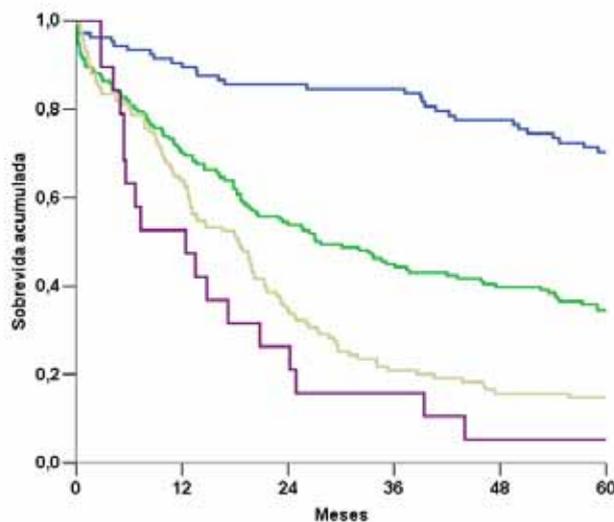


Figura 11 - Curvas de sobrevidas de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas gástricos em relação ao estágio clínico. Estádios clínicos avançados (III e IV) apresentam baixa curva de sobrevida em relação aos estádios iniciais (I e II).

4.4.2 Análise multivariada dos carcinomas intestinais

No grupo constituído por 234 carcinomas intestinais, os fatores de risco identificados pelo modelo de Cox foram o estadiamento clínico e a expressão imunohistoquímica de clatrina. A Tabela 20 mostra estes resultados.

Tabela 20 - Análise multivariada dos 234 carcinomas intestinais. Modelo de regressão de Cox com as variáveis: expressão de clatrina e estágio clínico.

Variável	Categoria	Hazard ratio	Intervalo de Confiança 95% do Hazard ratio
Clatrina	Negativo	1.0	Ref
	Positivo	1.6	1.0-2.5
Estádio clínico	I	1.0	Ref
	II	3.6	1.9-6.6
	III	7.2	3.8-13.6
	IV	10.6	3.7-30.1

Observamos que os pacientes com carcinomas gástricos do tipo intestinal positivos para clatrina apresentam risco de morte de 1.6x maior do que aqueles com carcinomas intestinais negativos para esta proteína. Vimos que o risco de morte dos pacientes com carcinomas intestinais também aumentou à medida que aumenta o estágio clínico. Tendo como referência o estágio clínico I, as chances de óbito é 3.6x maior para os pacientes com carcinomas intestinais e estágio clínico II, 7.2 x maior para aqueles com estágio clínico III e finalmente 10.6x maior para aqueles com estágio clínico IV. As curvas de sobrevida das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas intestinais estão ilustradas nas Figuras 12 e 13.

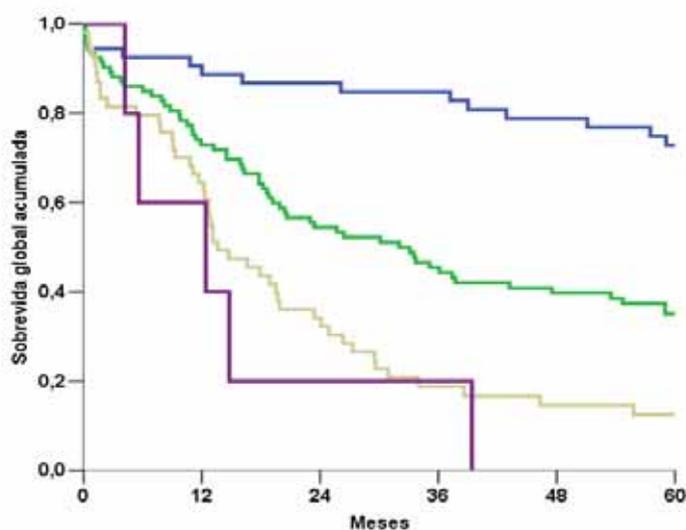


Figura 12 - Curvas de sobrevidas de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas intestinais em relação ao estágio clínico. Estádios clínicos avançados (III e IV) apresentam baixa curva de sobrevida em relação aos estádios iniciais (I e II).

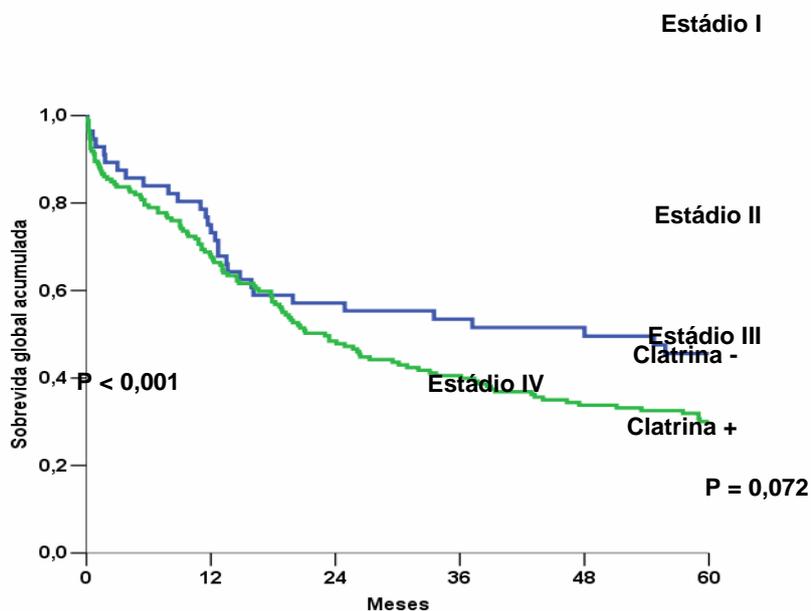


Figura 13 - Curvas de sobrevidas de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas intestinais positivos para clatrina (verde) e negativos para clatrina (azul). Os casos clatrina positivos mostraram curva de sobrevida pior em relação aos casos clatrina negativos.

4.4.3 Análise multivariada dos carcinomas difusos

No grupo constituído por 166 carcinomas difusos, observamos que através do modelo de Cox foram identificados 4 fatores de risco independentes para morte: idade, estágio clínico, expressão imunoistoquímica de p53 e TGF β II. Estes dados podem ser vistos na Tabela 21.

Tabela 21 - Análise multivariada dos 166 carcinomas difusos. Modelo de regressão de Cox com as variáveis: idade, estágio clínico, expressão de TGF β II e p53.

Variável	Categoria	Hazard ratio	Intervalo de Confiança 95% do Hazard ratio
Idade	Até 60 anos	1.0	Ref
	>60 anos	2.9	1.8-4.7
TGF β II	Negativo	1.0	Ref
	Positivo	3.7	1.1-12.5
P53	Negativo	1.0	Ref
	Positivo	1.8	1.1-2.9
Estádio clínico	I	1.0	Ref
	II	5.3	2.3-11.9
	III	7.5	3.5-15.9
	IV	14.7	5.5-39.4

Os carcinomas gástricos do tipo difuso apresentaram nas análises multivariadas diversos fatores independentes para o risco de morte dos pacientes. Observamos que pacientes com carcinomas gástricos do tipo difuso pertencentes ao grupo de faixa etária maior que 60 anos apresentaram aumento do risco de morte em 60 meses de 2.9x em relação aos pacientes de até 60 anos. Os pacientes com carcinomas difusos que expressam TGF β II e p53 por imunoistoquímica apresentaram 3.7x e 1.8x maior chance de óbito em 60 meses em comparação aos carcinomas difusos que não expressaram estas proteínas. Em comparação aos pacientes com carcinomas difusos e estágio clínico I, aqueles com carcinomas difusos e estádios clínicos II, III e IV apresentaram respectivamente, aumento de 5.3x, 7.5x e 14.7x do

risco de óbito dos pacientes em 60 anos. As Figuras 14, 15, 16 e 17 mostram as curvas de sobrevida das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas difusos.

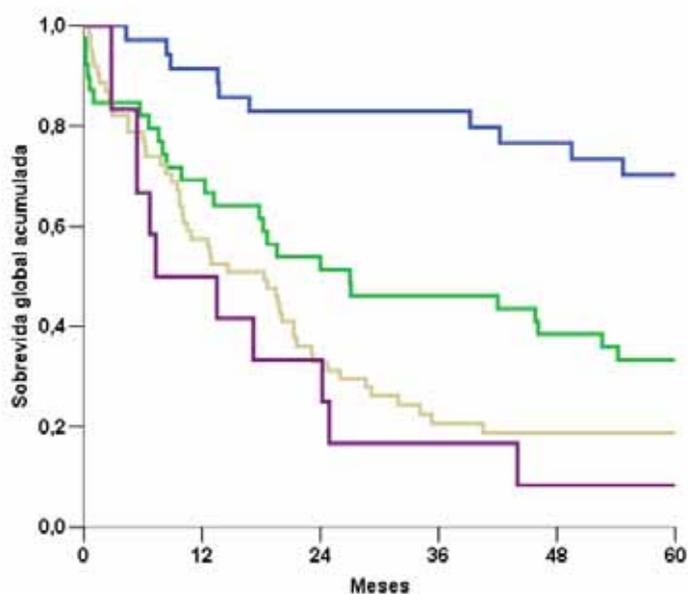


Figura 14 - Curvas de sobrevidas de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas difusos em relação ao estágio clínico. Pacientes com estádios clínicos avançados (III e IV) apresentam baixa curva de sobrevida em relação aos pacientes com estádios iniciais (I e II).

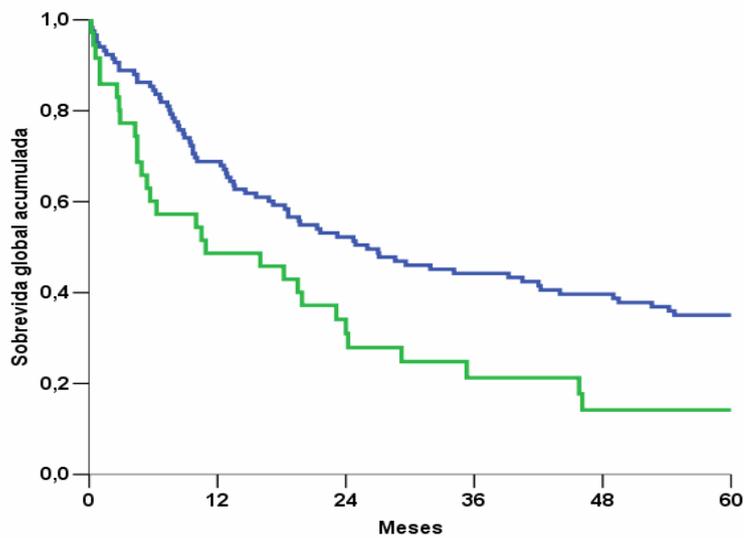


Figura 15 - Curvas de sobrevidas de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas difusos positivos para p53 (verde) e negativos para p53 (azul). Os casos p53 positivos mostraram curva de sobrevida pior em relação aos casos p53 negativos.

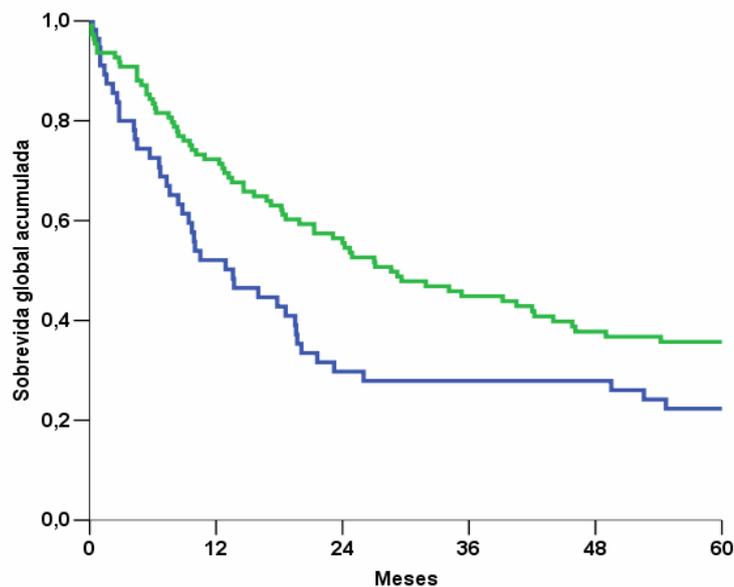


Figura 16 - Curvas de sobrevidas de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas gástricos de até 60 anos (verde) e com mais de 60 anos (azul). Os pacientes com até 60 anos mostraram uma discreta melhora da sobrevida em relação aos pacientes com mais de 60 anos.

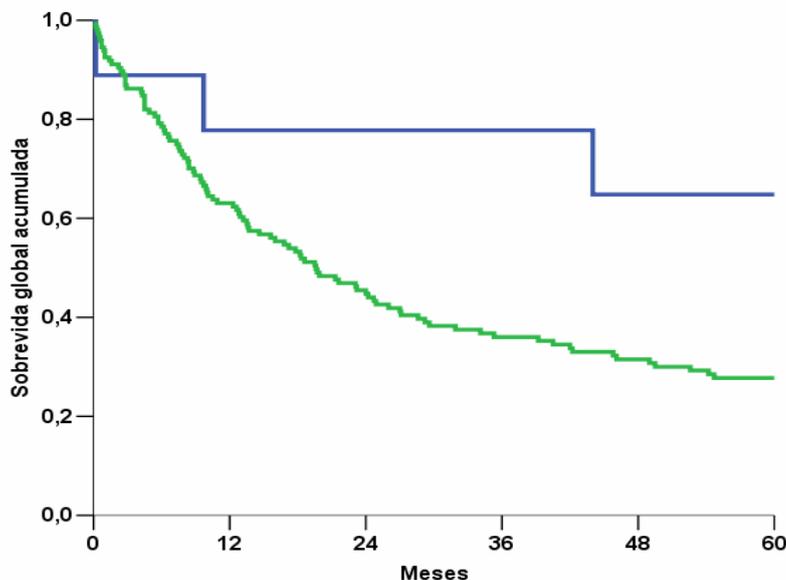


Figura 17 - Curvas de sobrevidas de Kaplan Méier das análises multivariadas dos pacientes com carcinomas difusos positivos para TGF β II (verde) e negativos para TGF β II (azul). Os casos TGF β II positivos mostraram curva de sobrevida pior em relação aos casos TGF β II negativos.

4.5 CLUSTERIZAÇÃO HIERÁRQUICA

Aplicando o algoritmo de clusterização hierárquica não supervisionada nos resultados das expressões protéicas e aos tumores (clusterização bi-dimensional), podemos agrupar: 1. Marcadores protéicos de acordo com o seu padrão de expressão nos tumores, e 2. Grupos de tumores de acordo com a similaridade de expressão dos marcadores (Figura 12).

Os marcadores protéicos de acordo com o seu padrão de expressão nos tumores separaram-se em dois grupos. O primeiro grupo foi formado pelos marcadores: p53, E-caderina, MUC5AC, MUC1, MUC2, MUC6, p21, p16, p27, ciclina D1, Bcl-2, c-erbB-2, β -catenina, MMP2 e NOS2 e o segundo grupo foi

constituído pelos marcadores: clatrina, MMP9, ciclina B1, ciclina A, Bax, Bak, Bcl-x, Rb, APC, VEGF, c-met, TGF β I, TGF β II, NOS1, NOS3 e MSH2.

De acordo com a expressão dos marcadores biológicos estudados, as análises clusterizadas definiram dois grandes grupos de carcinomas gástricos. O grupo 1 é formado por carcinomas gástricos que frequentemente mostram perda de expressão de: VEGF, TGF β I, TGF β II, Bcl-x, Bak, Bax, clatrina, Rb, ciclina B1, ciclina A, APC, c-Met, NOS1, NOS3 e MSH2. Por outro lado, o grupo 2 é formado por carcinomas gástricos que frequentemente são positivos para p21, p27, p16, ciclina D1, Bcl-2, p53, c-erbB-2, MUC5Ac, MUC6, E-caderina, MMP2, MMP9 e NOS2. As expressões imunoistoquímicas para MUC1, MUC2 e β -catenina não mostraram diferenças de expressões entre os dois grupos, estando os casos uniformemente distribuídos entre os 2 grupos. As correlações entre os 2 grupos definidos pelas análises clusterizadas e as demais variáveis clínicas e histológicas podem ser vistos na Tabela 22.

Após a identificação dos grupos pela clusterização, fizemos as análises estatísticas de associação entre os grupos clusterizados e variáveis clínicas e histológicas através do teste do qui-quadrado ou exato de Fisher, sendo considerados significantes os resultados com valor de $p < 0.005$. Os resultados podem ser vistos na Tabela 22.

Nossos resultados mostraram que os grupos não se correlacionam com as variáveis clínicas e histológicas estudadas. Em relação ao gênero, 48% do gênero masculino estavam no grupo 1 e 52% no grupo 2. 54% dos casos do grupo 1 eram do gênero feminino enquanto que no grupo 2 observamos 46% deles. Pacientes com até 60 anos estavam igualmente distribuídos nos grupos 1 e 2 (50% cada), e o mesmo se

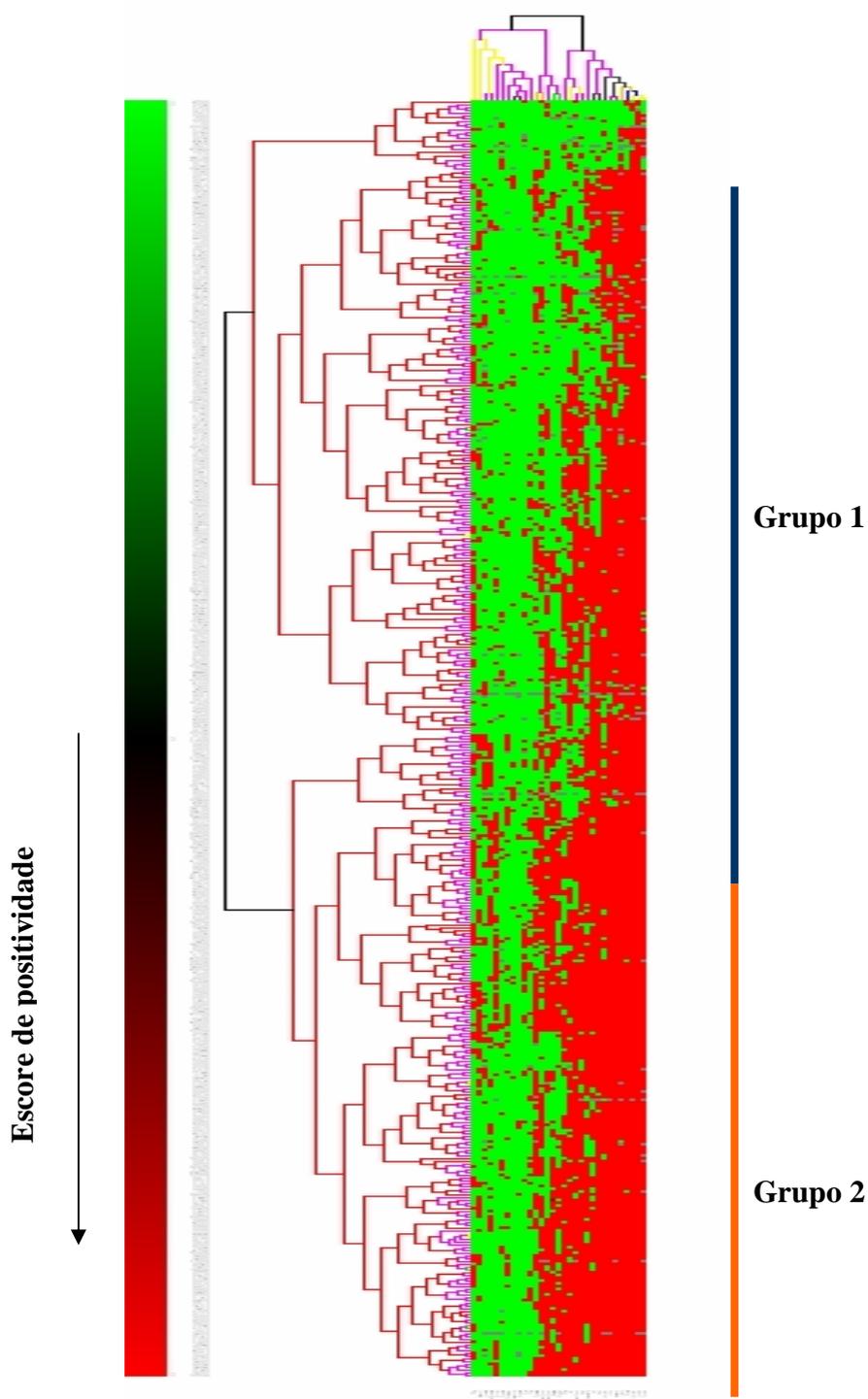
observou nos pacientes com mais de 60 anos de idade, 49% eram do grupo 1 e 51% do grupo 2. 54% dos tumores com até 5 cm de maior diâmetro macroscópico eram do grupo 1 e 46% do grupo 2. Os tumores maiores de 5 cm estavam assim distribuídos: 46% no grupo 1 e 54% no grupo 2. Tumores localizados na região distal estavam igualmente distribuídos nos grupos 1 e 2 (50% cada). 48% dos carcinomas de região distal pertenciam ao grupo 1 e os 52% restantes eram do grupo 2. O inverso foi observado nos tumores que ocupavam as regiões proximais e distais, 52% eram do grupo 1 e 48% do grupo 2. Os tumores de nível de infiltração profunda da parede gástrica estavam 50% presentes no grupo 1 e 50% no grupo 2, porém aqueles com infiltração superficial correspondiam a 33% no grupo 1 e 67% no grupo 2. Esta diferença não foi estatisticamente significativa. Em relação a presença de metástases em linfonodos, 51% dos casos com metástases em linfonodos eram do grupo 1 e 49% do grupo 2. A frequência de carcinomas gástricos sem metástases linfonodais correspondiam a 46% do grupo 1 e 54% dos casos do grupo 2. Em relação as classificações histológicas dos carcinomas gástricos, observamos que pela classificação da OMS os carcinomas do tipo tubular (55%), células em anel de sinete (64%) e adenocarcinoma SOE (59%) predominaram no grupo 2, enquanto que os carcinomas dos tipos papilífero (51%), mucinoso (79%) e carcinoma indiferenciado (54%) predominaram no grupo 1. Utilizando a classificação de Lauren observamos que os carcinomas do tipo intestinal (56%) e misto (52%) predominaram no grupo 2 e os carcinomas do tipo difuso (56%) e inclassificável (60%) foram frequentes no grupo 1. Na classificação de Carneiro, os carcinomas do tipo glandular predominaram no grupo 2, os de células isoladas e inclassificável foram frequentes no grupo 1 e os carcinomas mistos estavam uniformemente distribuídos nos dois

grupos. Apesar destas diferenças, as análises estatísticas não mostraram associações entre os grupos de clusterização e o tipo histológico de acordo com as classificações da OMS, Lauren e Carneiro. A única variável que mostrou correlação estatística foi o estágio clínico. Os carcinomas gástricos com estágio clínico I e II predominaram no grupo 1 e os carcinomas com estágio clínico II e IV foram mais frequentes no grupo 2. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0.046$) e mostra que os carcinomas gástricos do grupo 2 tem um comportamento mais agressivo que os carcinomas do grupo 1.

As análises de sobrevida em 5 anos dos carcinomas gástricos estudados pelo teste de Kaplan Méier não mostraram alterações estatisticamente significativas nas curvas de sobrevida dos dois grupos determinados pela clusterização.

Tabela 22 - Associações entre as variáveis clínicas e histológicas e os grupos clusterizados pelo teste exato de Fisher ou qui-quadrado.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL	VALOR DE P
Gênero	Masculino	138 (48%)	154 (52%)	292 (100%)	NS
	Feminino	90 (54%)	78 (46%)	168 (100%)	
Idade	Até 60 anos	129 (50%)	130 (50%)	259 (100%)	NS
	> 60 anos	99 (49%)	102 (51%)	201 (100%)	
Tamanho do tumor	Até 5 cm	102 (54%)	86 (46%)	188 (100%)	NS
	> 5 cm	126 (46%)	146 (54%)	272 (100%)	
Nível de infiltração	Profundo	221(50%)	218 (50%)	340 (100%)	NS
	Superficial	7 (33%)	14 (67%)	21 (100%)	
Metástase em linfonodos	Presente	175 (51%)	167 (49%)	342 (100%)	NS
	Ausente	52 (46%)	61 (54%)	113 (100%)	
Localização	Distal	192 (50%)	194 (50%)	386 (100%)	NS
	Proximal	23 (48%)	25 (52%)	48 (100%)	
	Prox+Distal	13 (52%)	12 (48%)	25 (100%)	
Tipo histológico OMS	Tubular				NS
	Papilífero				
	Células em anel de sinete	82 (45%)	102 (55%)	184 (100%)	
	Mucinoso	48 (51%)	46 (49%)	94 (100%)	
	Carcinoma	13 (36%)	23 (64%)	36 (100%)	
Tipo histológico Lauren	Indiferenciado	33 (79%)	9 (21%)	42 (100%)	NS
	Adenocarcinoma	38 (54%)	32 (46%)	70 (100%)	
	SOE	14 (41%)	20 (59%)	34 (100%)	
	Inclassificável	12 (60%)	8 (40%)	20 (100%)	
Tipo histológico Carneiro	Intestinal	100 (44%)	126 (56%)	226 (100%)	NS
	Difuso	88 (56%)	68 (44%)	156 (100%)	
	Misto	28 (48%)	30 (52%)	58 (100%)	
	Inclassificável	24 (52%)	22 (48%)	46 (100%)	
Estádio clínico	Glandular	92 (43%)	122 (57%)	214 (100%)	NS
	Células isoladas	85 (58%)	62 (42%)	147 (100%)	
	Misto	27 (50%)	26 (50%)	53 (100%)	
	Inclassificável	24 (52%)	22 (48%)	46 (100%)	
	I e II	135 (53%)	121 (47%)	256 (100%)	0.046
	III e IV	61 (42%)	83 (58%)	144 (100%)	



Legenda: as linhas representam os casos de carcinomas gástricos e cada coluna representa um marcador. Para cada tumor a expressão protéica é representada por uma cor. O vermelho representa positivo e o verde negativo. O comprimento e padrão dos dendogramas verticais e horizontais correspondem aos padrões de expressão dos marcadores e dos tumores. As cores dos ramos dos dendogramas representam o suporte da clusterização sendo preto 100% (Bootstrop com 1000 interações). As colunas coloridas à direita da figura representam os grupos de tumores definidos pela clusterização.

Figura 18 - Classificação dos carcinomas gástricos usando a análise clusterizada dos marcadores imunoistoquímicos.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Embora dados a respeito da patologia molecular do câncer gástrico tenha aumentado consideravelmente nos últimos anos, estes ainda são confusos e controversos. Ainda não foram demonstradas diferenças consistentes na patologia molecular entre os diferentes tipos histológicos de carcinomas gástricos de acordo com a classificação de Lauren, apesar disto, a utilização de técnicas de patologia molecular disponíveis pode ajudar na identificação de subtipos de carcinomas com grande potencial de agressividade e de comportamento sombrio, que não são identificados utilizando-se somente os critérios morfológicos.

Utilizando-se a técnica de *tissue microarray*, estudamos a expressão imunohistoquímica de 31 proteínas envolvidas em mecanismos moleculares distintos como ciclo celular, adesão, proliferação, diferenciação e reparo de DNA em 422 carcinomas gástricos.

A técnica de *tissue microarray* tem sido utilizada com grande eficiência em diversos estudos para a pesquisa da expressão de proteínas e validação de marcadores tumorais em um grande número de tumores. Em nosso estudo, construímos TMAs com cores de 0.6 mm de diâmetro em duplicata. Estudos em carcinomas de mama (CAMP et al. 2000), estômago (GULMANN et al. 2003b) e linfomas (HEDVAT et al. 2002) entre outros têm demonstrado que este design de TMA é bastante representativo da área tumoral. Em estudo prévio, realizado pelo nosso grupo, demonstramos que existe uma excelente correlação entre a expressão de p53 analisadas no TMA e em cortes tradicionais contendo todo o fragmento

(BEGNAMI et al. 2005). As perdas nas análises das expressões imunoistoquímicas dos anticorpos, devido à escassez ou não representatividade tumoral foram de 10 a 15% para cada anticorpo, dependendo do nível do corte examinado. Esta frequência está de acordo com o descrito em literatura que considera aceitável a não representação tumoral em até 20% dos casos (HOOS et al. 2001; TORHORST et al. 2001).

Embora nosso objetivo principal fosse a análise clusterizada dos resultados imunoistoquímicos de diversas proteínas e a determinação de grupos de carcinomas gástricos baseados no padrão destas expressões, discutiremos a seguir os resultados das análises dos marcadores imunoistoquímicos estudados neste estudo, bem como as associações encontradas entre estas expressões e os carcinomas do tipo intestinal e difuso.

Dentre os vários grupos de proteínas que estudamos, as expressões imunoistoquímicas das proteínas associadas ao mecanismo de adesão celular mostraram importantes associações entre os tipos histológicos de carcinomas gástricos. Um grande problema no tratamento dos carcinomas gástricos é a disseminação metastática. Para isto, as células neoplásicas adquirem a capacidade de modificar suas propriedades relacionadas à adesão e aos componentes da matriz extracelular. Nos carcinomas gástricos, um dos mecanismos mais descritos e estudados é a perda de expressão da E-caderina. Esta molécula é indispensável para o início e manutenção das junções aderentes epiteliais (GUMBINER et al. 1988) e da adesão célula-célula (SURIANO et al. 2003). A inativação da E-caderina tem sido associada ao desenvolvimento da maioria dos tumores de origem epitelial (BIRCHMEIER e BEHRENS 1994). Perdas totais ou parciais da expressão desta

proteína em carcinomas gástricos têm sido demonstradas numa freqüência de 17 a 92%, dependendo do método utilizado para pesquisa (SHIMOYAMA e HIROHASHI 1991; MAYER et al. 1993). Na nossa casuística, observamos perda total ou parcial da expressão de E-caderina em cerca de 75% dos casos, com uma evidente associação com os carcinomas do tipo difuso. Esses achados apóiam a hipótese de que a adesão celular mediada pela E-caderina atua como um sistema supressor de invasão. A perda da expressão desta proteína causa a redução da adesão célula-célula, desorganização da morfologia glandular normal e redução da diferenciação (TAKEICHI et al. 1991; BIRCHMEIER e BEHRENS 1994), correspondendo aos achados histológicos dos carcinomas difusos que se caracterizam pela presença de células isoladas, com caráter infiltrativo e grande potencial disseminativo.

Para a manutenção da adesão celular, a E-caderina mantém a β -catenina na membrana celular, formando um complexo de adesão intercelular. Alterações no gene da E-caderina leva a ruptura deste complexo permitindo que a β -catenina adquira forma livre no citoplasma. Após a ativação pela via Wnt, a porção citoplasmática livre da β -catenina é translocada para o núcleo e atua como fator de transcrição (WILLERT e NUSSE 1998). Na ausência de sinalização da via Wnt, a β -catenina é degradada. No nosso estudo, os carcinomas gástricos do tipo intestinal e difuso mostraram na grande maioria dos casos alteração da expressão de β -catenina. Muitos destes casos também exibiam perda de expressão de E-caderina, demonstrando que alterações no complexo E-caderina/ β -catenina são freqüentes nos carcinomas gástricos. Estes achados são similares aos já previamente demonstrados

por outros autores através do estudo imunohistoquímico destas proteínas (JAWHARI et al. 1997; RAMESH et al. 1999; JOO et al. 2002; NABAIS et al. 2003).

Fisiologicamente, o nível da β - catenina no citoplasma é baixo, devido a sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteossomo através da ativação do gene APC. Mutações no gene APC podem levar ao aumento do nível citoplasmático e nuclear da β - catenina livre (INOMATA et al. 1996). Embora sem valor estatístico observamos que a grande maioria dos carcinomas gástricos expressaram a proteína APC no citoplasma das células neoplásicas, sugerindo uma possível associação entre acúmulo citoplasmático desta proteína e mutação genética, que poderia causar o acúmulo citoplasmático ou nuclear da β - catenina que também foi observada na maioria dos carcinomas gástricos.

Outra molécula associada ao complexo caderina-catenina é a clatrina. A clatrina é um peptídeo associado à endocitose da E-caderina. Estudos anteriores demonstraram que redução nos níveis de clatrina leva à redução da reciclagem de E-caderina, diminuindo sua concentração na superfície celular e conseqüentemente o recrutamento da β - catenina no complexo caderina-catenina. Assim, a β - catenina ficaria disponível no citoplasma para seguir a via de sinalização nuclear (LE et al. 1999). O acúmulo de β - catenina no citoplasma com subseqüente translocação para o núcleo observada nos carcinomas gástricos pode estar também associada a perda de expressão de clatrina. Nossos resultados mostraram que a perda de expressão de clatrina foi mais freqüente nos carcinomas difusos onde o complexo caderina-catenina mostrava-se alterado. Na literatura, há poucos trabalhos direcionados a esta via e os resultados quanto ao papel da clatrina na reciclagem da E-caderina são contraditórios (AKHTAR et al. 2001; IVANOV et al. 2004). Nas análises

multivariadas de sobrevida em 5 anos, observamos uma pequena diferença entre as curvas de sobrevida dos pacientes com carcinomas gástricos do tipo intestinal positivos para clatrina em comparação com carcinomas intestinais negativos para esta proteína. Ainda não temos uma explicação para este achado e novos estudos são necessários para confirmar estes dados.

Como citado anteriormente, para facilitar a invasão tumoral e disseminação, os carcinomas sólidos freqüentemente alteram os elementos de sua matriz extracelular. Nos carcinomas gástricos, alterações na expressão de metaloproteinases de matriz (MMP), responsáveis por modulações na matriz extracelular, são freqüentemente descritas (HASEGAWA et al. 2002; HIPPO et al. 2002). O nosso estudo demonstrou expressão de MMP2 e MMP9 em 40 e 45.5% dos casos, respectivamente. Esta freqüência é baixa em comparação com dados de literatura que mostram positividade para MMP2 em torno de 83.3% a 90% dos carcinomas gástricos (ALLGAYER et al. 1998a; KO et al. 1998; MURRAY et al. 1998). Observamos também que a positividade de MMP2 foi mais freqüentemente observada nos carcinomas do tipo intestinal em comparação aos carcinomas do tipo difuso. Esta associação não está totalmente estabelecida e resultados contraditórios têm sido descritos por outros autores. A associação entre a expressão de MMPs e tumores pouco diferenciados já foi demonstrada (ALLGAYER et al. 1998b; KABASHIMA et al. 2000), porém há outros trabalhos que não mostraram associações entre os tipos histológicos de carcinomas gástricos e as expressões de MMPs (KO et al. 1998; MONIG et al. 2001). O aumento da expressão de MMPs e enzimas remodeladoras de matriz extracelular tem sido demonstrada em carcinomas pulmonares, mamários e colônicos, tendo importância prognostica nestes tumores

(PYKE et al. 1993; TRYGGVASON et al. 1993; PASSLICK et al. 2000). No nosso estudo, as análises das expressões imunoistoquímicas destas proteínas não mostraram associações com a sobrevida dos pacientes, mas estas proteínas têm sido consideradas alvos terapêuticos e o tratamento com inibidores de MMPs podem representar uma alternativa para os pacientes com carcinomas gástricos positivos para MMPs (COLASANTI et al. 1998).

Os carcinomas gástricos frequentemente mostram alterações na camada de gel mucoso que revestem os epitélios. As mucinas, proteínas de alto peso molecular e oligossacarídeos, são as maiores constituintes deste gel mucoso (CORFIELD et al. 2000). Sob condições fisiológicas, MUC1 e MUC2 não são expressas no epitélio gástrico, mas MUC1 é expressa nas glândulas mamárias em lactação e MUC2 está presente nos epitélios colônicos (GENDLER et al. 1990; HO et al. 1995). Expressões imunoistoquímicas de MUC1 e MUC2 têm sido relatadas em alguns carcinomas gástricos (TANAKA et al. 2003; SCARTOZZI et al. 2004). Em nossos casos, estudamos as expressões imunoistoquímicas de MUC1, MUC2, MUC5A e MUC6 e observamos baixa frequência de expressão destes marcadores. Semelhante aos nossos achados, a baixa frequência de expressão de MUC5AC nos carcinomas gástricos já foi demonstrada previamente (ZHANG et al. 2004). Em relação à associação com o tipo histológico, mostramos que a expressão de MUC2 está aumentada nos carcinomas do tipo difuso, com associação estatisticamente significativa. A correlação entre o aumento da expresssão de MUC2 e tipos histológicos de carcinomas gástricos foi previamente descrita em carcinomas gástricos do tipo mucinosos (PINTO-DE-SOUSA et al. 2002), papilares (AKYUREK et al. 2002) e em intestinais (LEE et al. 2001). A correlação com os

tipos difusos e em anel de sinete foi descrita por SAKAMOTO et al. (1997). Embora MUC2 tenha sido descrita como um marcador de fenótipo intestinal, a sua expressão em carcinomas de células em anel de sinete ou difusos sugerem que ocorra um processo de ‘intestinalização’ como mecanismo patogénico alternativo para o desenvolvimento destes tumores. Além disso, alguns carcinomas de células em anel de sinete podem mostrar vários padrões de diferenciação como para superfície mucosa, glândula pilórica, epitélio do tipo microcístico ou secretor, que são detectados somente por exames ultraestruturais (YAMACHIKA et al. 1997). ZHANG et al. (2004) propuseram que as expressões de MUC1 e MUC2 interferem nas funções da E-caderina, facilitando a progressão tumoral, sendo estas alterações comumente observadas nos carcinomas do tipo difuso. Nossos resultados não mostraram associação com o prognóstico, mas a importância da expressão destas proteínas no prognóstico dos pacientes com carcinomas gástricos ainda é controversa (REIS et al. 1998; ZHANG et al. 2004).

Outro importante mecanismo de sinalização celular cujas expressões das proteínas mostraram-se frequentemente alteradas no nosso estudo é o mecanismo do TGF- β . Nos tumores, o TGF- β exerce uma ação bifásica. Nos estágios iniciais da carcinogênese, TGF- β atua como supressor de tumor através da supressão da proliferação (WAKEFIELD e ROBERTS 2002). Em estágios mais avançados da carcinogênese, o TGF- β aparentemente age na progressão tumoral, pela produção de matriz extracelular, supressão do sistema imune ou promoção da angiogênese (HAN et al. 2004). Nós demonstramos as expressões imunoistoquímicas de TGF- β I e TGF- β II em 82 e 97% dos carcinomas gástricos. Quando comparamos a expressão de TGF- β e os tipos histológicos de carcinomas gástricos, vimos associação entre a

expressão de TGF- β II e os carcinomas do tipo intestinal. Em concordância com nossos dados, SAITO et al. (2007b) demonstraram a expressão de TGF- β I em carcinomas bem diferenciados e associação com tumores avançados. Contrariamente, a perda de expressão de TGF- β I associada à hipermetilação de CpG na região 5' deste gene foi demonstrada em carcinomas avançados do tipo intestinal (TAHARA 2004). Outros estudos não encontraram associação entre a expressão de TGF- β com o tipo histológico de carcinoma gástrico, mas observaram associação entre esta expressão e tumores gástricos avançados (TATEISHI et al. 2000). A correlação entre o prognóstico dos carcinomas gástricos e a expressão de TGF- β ainda não está esclarecida, embora tenha sido demonstrada em tumores do pulmão (TAKANAMI et al. 1997) e da próstata (KIM et al. 1998). Nós demonstramos que os pacientes do grupo de carcinomas gástricos, bem como os pacientes com carcinomas gástricos difusos negativos para TGF β II apresentaram melhor curva de sobrevida em cinco anos em comparação com aqueles carcinomas gástricos ou difusos positivos para TGF β II. Este dado foi demonstrado previamente por TATEISHI et al. (2000) que associaram a expressão deste marcador a maior capacidade de invasão, progressão e pior resposta ao tratamento dos carcinomas gástricos. Adicionalmente, alterações no mecanismo de sinalização do TGF- β têm sido associadas a fenômenos epigenéticos e estão associados a mutações de p53 e ampliações da ciclina D1 (GERWIN et al. 1992; OKAMOTO et al. 1994).

Alterações nos fatores de crescimento e seus receptores têm sido demonstradas nos carcinomas gástricos. A expressão da proteína, bem como a amplificação gênica do receptor do fator de crescimento c-erbB-2, um receptor de tirosina quinase, tem sido observada em 10 a 15% dos carcinomas gástricos

(USHIJIMA e SASAKO 2004). No nosso estudo, 12% dos carcinomas gástricos foram positivos para c-erbB-2, principalmente os carcinomas do tipo intestinal. Esta associação tem sido observada mais comumente nos carcinomas bem diferenciados, intestinais ou tubulares, avançados e tem sido associado à pior prognóstico (YONEMURA et al. 1991; NAKAJIMA et al. 1999; KIMURA et al. 2004). Quanto ao valor prognóstico da expressão de c-erbB-2 nos carcinomas gástricos, os dados de literatura não são conclusivos, mas a amplificação deste gene tem sido um importante alvo terapêutico sobretudo nos carcinomas de mama (YONEMURA et al. 1991; UCHINO et al. 1993).

Outro mecanismo frequentemente alterado nos carcinomas gástricos é o mecanismo que envolve HGF/c-Met. O c-Met é um receptor de fator de crescimento do hepatócito (HGF), composto por uma subunidade α e uma subunidade β com atividade de tirosina fosfatase (PARK et al. 1987; BOTTARO et al. 1991). A sinalização do complexo GHF/c-Met está associada à proliferação, migração e morfogênese (BIRCHMEIER e BIRCHMEIER 2003). A positividade para c-Met foi observada em 88% dos carcinomas gástricos estudados, indicando que a expressão desta proteína é um evento comum nestes tumores. Dados na literatura confirmam a amplificação gênica e a super-expressão da proteína c-Met em câncer gástrico e em linhagem celular de carcinomas gástricos (PONZETTO et al. 1991; HASEGAWA et al. 2002). HUANG et al. (2001) mostraram a amplificação gênica e a expressão da proteína c-Met em 71% dos carcinomas gástricos em comparação com a mucosa gástrica normal. Nós encontramos diferença estatisticamente significativa entre a expressão imunistoquímica de c-Met e o tipo histológico de carcinoma gástrico. A expressão de c-Met foi mais frequentemente encontrada nos carcinomas intestinais.

Em concordância com estes achados, alguns autores mostraram associação entre a expressão de c-Met e carcinomas gástricos do tipo intestinal (WU et al. 1998), por outro lado, associações entre a expressão de c-Met e carcinomas do tipo difuso também tem sido demonstradas (TAHARA 1995; NAKAJIMA et al. 1999).

Neovascularização através da indução da angiogênese é um pré-requisito para a expansão dos tumores sólidos (BOUCK et al. 1996; HANAHAN et al. 1996). O VEGF é um fator de indução de angiogênese cuja expressão é frequentemente demonstrada nos carcinomas gástricos (ICHINOE et al. 2004). A expressão de VEGF nos carcinomas gástricos tem sido associada a metástases em linfonodos (KABASHIMA et al. 2001) e parece correlacionar-se com mutações do gene p53, uma vez que em condições normais, o gene p53 regula a expressão de VEGF, impedindo a angiogênese (SCARTOZZI et al. 2004). Demonstramos a expressão imunohistoquímica de VEGF em cerca de 90% dos carcinomas gástricos de nosso estudo. Nossos resultados mostraram que a expressão de VEGF está associada ao carcinoma gástrico do tipo intestinal, similar ao encontrado em relação à expressão da proteína p53, demonstrando uma possível relação entre VEGF e p53 nos carcinomas intestinais.

Instabilidade de microsatélite (MSI) tem origem no processo de reparação de DNA defeitoso que leva a instabilidade genética. A maior causa para a instabilidade de microsatélite em carcinomas gástricos é o ‘silenciamento’ do gene de reparo humano MuL homolog 1 (hMLH1) através de sua metilação (FANG et al. 2003). Porém perdas de expressão do hMSH2 têm sido observadas (HALLING et al. 1999). Em nossos casos, estudamos a expressão de somente um dos genes de reparo (hMSH2) e observamos que mais de 90% dos carcinomas gástricos mostraram a

expressão desta proteína, estando à perda desta expressão associada aos carcinomas do tipo difuso. Tem sido demonstrado que mutações nos genes hMSH2 e hMLH1 são raras nos carcinomas gástricos, justificando a freqüente expressão de hMSH2 encontrada no nosso estudo (TAMURA et al. 1995; AKIYAMA et al. 1996). A correlação entre a perda de expressão de hMSH2 e carcinomas do tipo difuso já foi previamente demonstrada em carcinomas pouco diferenciados do estômago (ZHANG QX et al. 2003) e de bexiga (JIN et al. 1999), mostrando que quanto menor a diferenciação tumoral maior será a instabilidade genética (ZHANG QX et al. 2003).

Nos carcinomas gástricos, o controle do ciclo celular é afetado diretamente e indiretamente. A modulação direta é feita pela ativação ou inibição da expressão de moduladores como as ciclinas, ciclinas dependentes de quinase (CDKs) ou seus inibidores. Nossos dados mostraram que os carcinomas gástricos frequentemente expressam ciclina A, ciclina B1 e pRb. A perda de expressão imunistoquímica de ciclina D1 e pRb foi associada aos carcinomas do tipo intestinal, quando comparadas aos carcinomas difusos. Perdas das expressões de inibidores de CDK, como p15, p21 e p27 têm sido observadas nos carcinomas gástricos (KANG et al. 1999; TAHARA 2004; HAN et al. 2004). Nossos resultados estão de acordo com estes dados e perdas de expressões das proteínas p27 e p21 por imunistoquímica foram observadas em 50 e 86% dos casos, respectivamente. Demonstramos ainda que a perda de expressão de p21 está associada com os carcinomas do tipo difuso. Em relação à expressão da proteína p16, observamos perda de expressão imunistoquímica em cerca de 90% dos casos. Dados de literatura mostram que cerca de 52 a 90% dos casos de carcinomas gástricos apresentam perdas de expressão desta proteína. Estas perdas

têm sido associadas à hipermetilação e mais raramente a mutação deste gene (OUE et al. 2002; ZHAO et al. 2003; DING et al. 2003). Em relação à expressão da proteína Rb, proteína relacionada ao ciclo celular, dados na literatura mostra que os carcinomas gástricos expressam esta proteína em torno de 60% dos casos (FEAKINS et al. 2003; SONG et al. 2005; HE et al. 2005). Nosso estudo demonstrou a expressão da proteína Rb em 68% dos casos dos carcinomas gástricos e a perda desta expressão mostrou-se associada aos carcinomas do tipo intestinal. MATTAR et al. (2004) e FEAKINS et al. (2003) também encontraram associação entre a perda de expressão de Rb e os carcinomas do tipo intestinal através do uso de PCR. Estes autores sugeriram que a perda de expressão do Rb pode estar associada à infecção pelo *H pylori*, uma vez que esta infecção é muito comum neste tipo de carcinoma. No nosso trabalho não estudamos a infecção pelo *H pylori* e não pudemos confirmar esta associação.

Alterações da proteína p53, regulador central do ciclo celular e apoptose, têm sido comumente descritas nos carcinomas gástricos. Estas alterações incluem mutações, perda de heterozigozidade (LOH) e acúmulo de proteína (FENOGLIO-PREISER et al. 2003; SARBIA et al. 2004). De acordo os dados previamente descritos, demonstramos a expressão da proteína p53 em 30% dos casos, sendo esta expressão associada ao tipo intestinal. Outros estudos têm mostrado frequência de expressão de p53 em carcinomas gástricos entre 13 a 54% (RENAULT et al. 1993; MONIG et al. 1997; ROVIELLO et al. 1999). Em concordância com nossos resultados, a associação com o tipo intestinal também foi demonstrada por outros autores (OCHIAI et al. 1996; ROVIELLO et al. 1999; LEE KE et al. 2003), porém resultados discordantes têm sido descritos (MONIG et al. 1997; PINTO-DE-SOUSA

et al. 2004). As análises multivariadas das curvas de sobrevida mostraram que os pacientes com carcinomas difusos positivos p53 apresentaram pior curva de sobrevida em comparação com aqueles com carcinomas difusos negativos para p53, confirmando a participação do gene p53 como fator prognóstico independente nos carcinomas gástricos do tipo difuso.

As características clínicas e histológicas encontradas nos carcinomas gástricos de nosso estudo foram semelhantes às descritas previamente por outros autores (CREW e NEUGUT 2006). Em concordância com dados de literatura, na nossa casuística, os carcinomas intestinais foram mais frequentes em pacientes do gênero masculino e com mais de 60 anos. Os carcinomas difusos apresentaram uma distribuição semelhante entre os gêneros masculino e feminino, sendo mais comuns em pacientes com menos de 60 anos (LAUREN 1965; CORREA et al. 1973). Os tipos mais comuns de carcinomas gástricos de nosso estudo foram os intestinais, glandulares e tubulares, segundo as classificações de Lauren, Carneiro e OMS, e estão de acordo com dados de literatura (SMITH et al. 2006). Como já observado por outros autores, a maioria dos carcinomas gástricos são diagnosticados em estágio clínico avançado. Nossos casos eram constituídos principalmente por tumores grandes (maiores de 5 cm), infiltrativos, com metástases em linfonodos e estágio clínico III ou IV. Estes dados podem ter obscurecido a importância de algumas variáveis nas análises das curvas de sobrevida, uma vez que estes casos apresentam pior prognóstico, independente de qualquer outro fator associado. Demonstramos que as variáveis clínicas idade e estágio clínico foram associadas a pior sobrevida em 5 anos dos pacientes com carcinomas gástricos. A importância do estágio clínico no prognóstico já está bem estabelecida e demonstrada na literatura e vários estudos

mostraram que as curvas de sobrevida são piores quanto mais avançado for o estadiamento clínico dos pacientes com carcinomas gástricos. A associação com a idade deve ser vista com cautela, uma vez que quanto maior a idade maior o risco de morte mesmo não associada ao câncer.

Em resumo, o número de estudos visando à pesquisa da expressão gênica nos carcinomas gástricos está cada vez maior. Estes estudos têm revelado que embora os carcinomas gástricos tenham diversas etiologias, certos padrões de expressão gênica permanecem estáveis. De acordo com nossos resultados observamos que os carcinomas difusos e intestinais mostraram expressões ou perdas de expressão de diversas proteínas envolvidas em diferentes mecanismos moleculares. Os carcinomas do tipo intestinal têm sido caracterizados pela superexpressão de genes associados à divisão e proliferação (HASEGAWA et al. 2002). De fato, observamos que dentre os casos positivos para ciclinas D1, ciclina A, ciclina B1, Bcl-2, Bax e Bak a maioria era constituída por carcinomas intestinais, que mostraram também perdas das expressões de p27 e Rb. Estes carcinomas também mostraram aumento de expressão de oncogenes e genes supressores de tumor tais como p53, c-erbB-2, c-Met e p16. O aumento de expressão de proteínas associadas à matriz extracelular tem sido associado aos carcinomas difusos, nossos resultados foram divergentes em relação a estes dados. Dentre os casos positivos para TGF β , MMP2 e MMP9 a maioria era constituída por carcinomas do tipo intestinal. No nosso estudo, os carcinomas do tipo difuso se caracterizaram somente pela perda de expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de adesão celular (E-caderina, β -catenina e clatrina), reparo de DNA (hMSH2) e mucinas. Embora a correlação entre expressão destas proteínas com o prognóstico não tenha sido estabelecida para a maioria dos marcadores, vimos que a

expressão de p53 e TGF β II está associada a pior curva de sobrevida nos pacientes com carcinomas gástricos do tipo difuso, enquanto que os carcinomas gástricos do tipo intestinal positivos para clatrina mostraram pior curva de sobrevida dos pacientes em comparação aos carcinomas intestinais negativos para este marcador.

Os carcinomas gástricos apresentam uma variedade de padrões histológicos e comportamentos biológicos. A classificação de Lauren, proposta em 1965 e até hoje utilizada, divide os carcinomas gástricos em 2 principais tipos: intestinal e difuso. Esta classificação tem sido utilizada também para prever o comportamento biológico dos carcinomas gástricos. Baseados somente em critérios histológicos, embora não confirmado pelos nossos resultados, têm sido demonstrado que os carcinomas difusos apresentam pior prognóstico em relação aos carcinomas intestinais no mesmo estágio clínico (LEE et al. 2001). Estudos prévios em biologia molecular, incluindo os resultados deste estudo, têm demonstrado que múltiplas alterações genéticas nos genes como *K-ras*, *c-erbB-2*, *K-sam*, *ciclinas*, *p53*, *Rb*, *APC*, dentre outros, estão frequentemente alterados nos carcinomas gástricos, mas a classificação dos carcinomas gástricos baseada no perfil de expressão protéica de múltiplos genes ainda não foi estabelecida. A definição de marcadores moleculares em subgrupos de carcinomas gástricos pode definir grupos de tumores com padrões histopatológicos e biológicos distintos e estabelecer terapêuticas específicas para estes tumores. Recentemente, HASEGAWA et al. (2002) demonstrou o padrão de expressão gênica nos carcinomas intestinais através de microdissecção e amplificação genética, porém estas técnicas exigem equipamentos sofisticados e de alto custo que dificultam sua utilidade na prática diária.

A clusterização hierárquica dos resultados é um método de análise que utiliza grupos de dados e é capaz de definir grupos de tumores baseados em imunofenótipos complexos. Este tipo de técnica tem sido utilizada na análise de dados de expressão gênica, e é eficaz na determinação de grupos de tumores de acordo com o padrão de expressão destes genes.

No nosso estudo, a clusterização hierárquica baseada nos padrões de expressão protéica por imunistoquímica definiu 2 grupos de carcinomas gástricos. O grupo 1 foi constituído principalmente por carcinomas freqüentemente negativos para marcadores associados a fatores de crescimento TGF β I e II, VEGF, marcadores de apoptose (Bcl-x, Bak, Bax), marcadores do ciclo celular (Rb, ciclina A, APC), c-Met, MSH2 e sintases do óxido nítrico (NOS1 e NOS3). Por outro lado, os carcinomas do grupo 2 foi constituído por carcinomas gástricos com freqüente positividade para os marcadores do ciclo celular (p21, p27, p16, ciclina B1, ciclina D1), Bcl-2, p53, c-erbB-2, MUC5AC, MUC6, E-caderina, MMP2, MMP9 e NOS2. Em relação aos tipos histológicos, observamos um predomínio dos tipos histológicos difusos no grupo 1 e intestinais no grupo 2, porém sem associação estatística significativa. Associações estatísticas significantes foram observadas entre o grupo 2 de carcinomas gástricos e estádios clínicos mais avançados (III e IV), sugerindo que estes carcinomas são mais agressivos, porém as análises estatísticas univariadas e multivariadas não mostraram diferenças nas curvas de sobrevida global em 5 anos dos pacientes de ambos os grupos (1 e 2). Embora a clusterização hierárquica de marcadores imunistoquímicos tenha sido útil na classificação de carcinomas da mama (CALLAGY et al. 2003), endométrio (ALKUSHI et al. 2003) e de linfomas (ALIZADEH et al. 2000), não há dados na literatura em relação a este tipo de

classificação nos carcinomas gástricos. Nossos achados são inéditos e representam uma primeira tentativa de estabelecer grupos de carcinomas gástricos através do padrão de expressão proteica. A definição de 2 grupos de carcinomas gástricos e a associação entre estádios clínicos avançados e o grupo 2 mostra que alterações genéticas envolvendo as proteínas do ciclo celular e de adesão e diferenciação celulares são frequentemente envolvidas no processo de carcinogênese gástrica. De fato, alterações nos genes envolvidos no ciclo celular mostram um aumento da atividade proliferativa das células cancerosas, por outro lado, alterações dos genes de adesão e diferenciação celulares refletem reações das células estromais tumorais que estão associadas ao aumento do potencial de invasão e metástases. De acordo com nossos resultados, novas classificações dos carcinomas gástricos baseadas em expressões protéicas de múltiplos genes podem ser propostas. Estas novas classificações podem ser importantes não somente na determinação de novos tipos de tumores gástricos, mas também podem ter impacto no prognóstico dos pacientes pela identificação de novos alvos terapêuticos específicos.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os carcinomas gástricos de nosso estudo se caracterizaram pelo acometimento mais freqüente em homens de até 60 anos. Localizaram-se preferencialmente na região distal do estômago, sendo na sua maioria maiores que 5 cm, infiltrando profundamente a parede gástrica e com metástases em linfonodos. Os tipos histológicos mais comuns foram os Intestinais, Glandulares e Tubulares de acordo com as classificações de Lauren, Carneiro e OMS, respectivamente.

Na nossa casuística de 422 casos de carcinomas gástricos, observamos as seguintes marcações imunoistoquímicas:

- **Marcadores do ciclo celular:** os carcinomas gástricos foram freqüentemente positivos para p27, ciclina D1, ciclina A, ciclina B1, Rb e p53 e freqüentemente negativos para p16 e p21.
- **Fatores de crescimento:** os carcinomas gástricos foram freqüentemente positivos para c-met, VEGF, TGF β I, TGF β II e MSH2; e negativos para c-erbB-2.
- **Apoptose:** os carcinomas gástricos expressam freqüentemente Bax, Bak e Bcl-x e são na maioria dos casos negativos para Bcl-2.
- **Transcrição de sinal, adesão e diferenciação celular:** os carcinomas gástricos expressam freqüentemente APC, clatrina, MMP2 e MMP9; sendo freqüentemente negativos para E-caderina, β -catenina, MUC1, MUC2, MUC5AC e MUC6.

- **Sintases do óxido nítrico:** os carcinomas gástricos freqüentemente são positivos para NOS1 e NOS3 e negativos para NOS2.

As proteínas diferencialmente expressas, através de imunoistoquímica, entre os carcinomas gástricos do tipo intestinal e difuso foram: E-caderina, MUC2, clatrina, MMP2, ciclina B1, pRb, p21, p53, TGF β II, c-erbB-2, c-Met, VEGF, MSH2 e NOS3.

Idade, estadiamento clínico e expressão imunoistoquímica de TFG β II são fatores associados ao prognóstico dos carcinomas gástricos.

Estadiamento clínico e expressão imunoistoquímica de TFG β II são fatores associados ao prognóstico dos carcinomas gástricos do tipo intestinal.

Idade, estadiamento clínico e expressão imunoistoquímica de TFG β II E p53 são fatores associados ao prognóstico dos carcinomas gástricos do tipo difuso.

A clusterização hierárquica dos marcadores determinou 2 grupos de carcinomas gástricos de acordo com o padrão de expressão imunoistoquímica.

O grupo 1 de tumores determinado pela clusterização é constituído predominantemente por carcinomas do tipo difuso e inclassificável (segundo a classificação de Lauren) e caracteriza-se pela negatividade imunoistoquímica da maioria dos marcadores associados ao ciclo celular, apoptose, diferenciação e adesão celular. O grupo 2 é formado principalmente por carcinomas do tipo intestinal e são freqüentemente positivos para os marcadores imunoistoquímicos estudados.

Os grupos de carcinomas gástricos determinados pela clusterização não demonstrou associação ou impacto na sobrevida dos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. **Int J Cancer** 2005; 116:340-50.

Aird I, Bentall HH, Roberts JA. A relationship between cancer of stomach and the ABO blood groups. **Br Med J** 1953; 1:799-101.

Akama Y, Yasui W, Yokozaki H, et al. Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. **Jpn J Cancer Res** 1995; 86:617-21.

Akhtar N, Hotchin NA. RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin. **Mol Biol Cell** 2001; 12:847-62.

Akiyama Y, Nakasaki H, Nihei Z, et al. Frequent microsatellite instabilities and analyses of the related genes in familial gastric cancers. **Jpn J Cancer Res** 1996; 87:595-1.

Akyurek N, Akyol G, Dursun A, Yamac D, Gunel N. Expression of MUC1 and MUC2 mucins in gastric carcinomas: their relationship with clinicopathologic parameters and prognosis. **Pathol Res Pract** 2002; 198:665-74.

Alici S, Kaya S, Izmirli M, et al. Analysis of survival factors in patients with advanced-stage gastric adenocarcinoma. **Med Sci Monit** 2006; 12:CR221-9.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature** 2000; 403:503-11.

Alkushi A, Irving J, Hsu F, et al. Immunoprofile of cervical and endometrial adenocarcinomas using a tissue microarray. **Virchows Arch** 2003; 442:271-7.

Allgayer H, Heiss MM, Schildberg FW. Prognostic factors in gastric cancer. **Br J Surg** 1997; 84:1651-64.

Allgayer H, Babic R, Beyer BC, et al. Prognostic relevance of MMP-2 (72-kD collagenase IV) in gastric cancer. **Oncology** 1998a; 55:152-60.

Allgayer H, Babic R, Grutzner KU, et al. Tumor-associated proteases and inhibitors in gastric cancer: analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns. **Clin Exp Metastasis** 1998b; 16:62-73.

Alm RA, Ling LS, Moir DT, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature** 1999; 397:176-80.

Baldus SE, Zirbes TK, Engel S, et al. Correlation of the immunohistochemical reactivity of mucin peptide cores MUC1 and MUC2 with the histopathological subtype and prognosis of gastric carcinomas. **Int J Cancer** 1998; 79:133-8.

Barresi V, Vitarelli E, Grosso M, Tuccari G, Barresi G. Relationship between immunoexpression of mucin peptide cores MUC1 and MUC2 and Lauren's histologic subtypes of gastric carcinomas. **Eur J Histochem** 2006; 50:301-10.

Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. **Cancer Res** 1994; 54:3845-52.

Begnami MD, Campos AHJFM, Silva EG, et al. Expressão imuno-histoquímica de c-erbB-2 e p53 em carcinomas gástricos. **J Bras Patol Med Lab** 2005; 41:279-86.

Bhargava R, Lal P, Chen B. Feasibility of using tissue microarrays for the assessment of HER-2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization in breast carcinoma. **Diagn Mol Pathol** 2004; 13:213-6.

Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. **Biochim Biophys Acta** 1994; 1198:11-26.

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2003; 4:915-25.

Bittner M, Meltzer P, Chen Y, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. **Nature** 2000; 406:536-40.

Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Res** 1995; 55:2111-5.

Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. **Science** 1991; 251:802-4.

Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. **Adv Cancer Res** 1996; 69:135-74.

Brabletz T, Jung A, Kirchner T. Beta-catenin and the morphogenesis of colorectal cancer. **Virchows Arch** 2002; 441:1-11.

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **J Pathol** 2001; 195:72-9.

Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, et al. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. **Diagn Mol Pathol** 2003; 12:27-34.

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. **Lab Invest** 2000; 80:1943-9.

Cao Y, Karsten U, Hilgers J. Immunohistochemical characterization of a panel of 56 antibodies with normal human small intestine, colon, and breast tissues. **Tumour Biol** 1998; 19 Suppl 1:88-99.

Carneiro F. The distinction between dysplasia and truly invasive cancer: classification of gastric carcinomas. **Curr Diag Pathol** 1997; 4:51-9.

Chetty R, Sitti CW. Cyclin E immunoexpression in gastric cancer does not correlate with clinicopathological parameters. **Histopathology** 2003; 42:66-9.

Cho BC, Jeung HC, Choi HJ, et al. Prognostic impact of resection margin involvement after extended (D2/D3) gastrectomy for advanced gastric cancer: a 15-year experience at a single institute. **J Surg Oncol** 2007; 95:461-8.

Colasanti M, Persichini T, Venturini G, Menegatti E, Lauro GM, Ascenzi P. Effect of gabexate mesylate (FOY), a drug for serine proteinase-mediated diseases, on the nitric oxide pathway. **Biochem Biophys Res Commun** 1998; 246:453-6.

Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S, Pignatelli M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. **Gut** 2000; 47:589-94.

Correa P, Sasano N, Stemmermann GN, Haenszel W. Pathology of gastric carcinoma in Japanese populations: comparisons between Miyagi prefecture, Japan, and Hawaii. **J Natl Cancer Inst** 1973; 51:1449-59.

Correa P, Shiao YH. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. **Cancer Res** 1994; 54:1941s-3.

Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. **Cancer Res** 1988; 48:3554-60.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Res** 1992; 52:6735-40.

Correa P. Helicobacter pylori and gastric cancer: state of the art. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1996; 5:477-81.

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

den Dulk M, Verheij M, Cats A, Jansen EP, Hartgrink HH, Van de Velde CJ. The essentials of locoregional control in the treatment of gastric cancer. **Scand J Surg** 2006; 95:236-42.

Ding Y, Le XP, Zhang QX, Du P. Methylation and mutation analysis of p16 gene in gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2003; 9:423-6.

Doki Y, Imoto M, Han EK, Sgambato A, Weinstein IB. Increased expression of the P27KIP1 protein in human esophageal cancer cell lines that over-express cyclin D1. **Carcinogenesis** 1997; 18:1139-48.

Dolled-Filhart M, Ryden L, Cregger M, et al. Classification of breast cancer using genetic algorithms and tissue microarrays. **Clin Cancer Res** 2006; 12:6459-68.

Ellis IO, Bartlett J, Dowsett M, et al. Best Practice No 176: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. **J Clin Pathol** 2004; 57:233-7.

El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. **Gastroenterology** 2003; 124:1193-201.

Fang DC, Wang RQ, Yang SM, et al. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. **World J Gastroenterol** 2003; 9:655-9.

Feakins RM, Nickols CD, Bidd H, Walton SJ. Abnormal expression of pRb, p16, and cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and its lymph node metastases: relationship with pathological features and survival. **Hum Pathol** 2003; 34:1276-82.

Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Stemmermann GN, Noffsinger A. TP53 and gastric carcinoma: a review. **Hum Mutat** 2003; 21:258-70.

Garcia JF, Camacho FI, Morente M, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. **Blood** 2003; 101:681-9.

Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, et al. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. **J Biol Chem** 1990; 265:15286-93.

Gerwin BI, Spillare E, Forrester K, et al. Mutant p53 can induce tumorigenic conversion of human bronchial epithelial cells and reduce their responsiveness to a negative growth factor, transforming growth factor beta 1. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; 89:2759-63.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. **Science** 1999; 286:531-7.

Gonzalez CA, Pera G, Agudo A, et al. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). **Int J Cancer** 2003; 107:629-34.

Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. **Gut** 1992; 33:606-12.

Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. **Nature** 1998; 392:402-5.

Gulmann C, Butler D, Kay E, Grace A, Leader M. Biopsy of a biopsy: validation of immunoprofiling in gastric cancer biopsy tissue microarrays. **Histopathology** 2003a; 42:70-6.

Gulmann C, Grace A, Leader M, Butler D, Patchett S, Kay E. Adenomatous polyposis coli gene, beta-catenin, and E-cadherin expression in proximal and distal gastric cancers and precursor lesions: an immunohistochemical study using tissue microarrays. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2003b;11:230-7.

Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. **J Cell Biol** 1988; 107:1575-87.

Halling KC, Harper J, Moskaluk CA, et al. Origin of microsatellite instability in gastric cancer. **Am J Pathol** 1999; 155:205-11.

Hamilton SR, Aaltonen LA. **Pathology and genetics of tumours of the digestive system**. Lyon: IARC Press; 2000. livro todo???????

Han SU, Kim HT, Seong DH, et al. Loss of the Smad3 expression increases susceptibility to tumorigenicity in human gastric cancer. **Oncogene** 2004; 23:1333-41.

Hanahan D, Christofori G, Naik P, Arbeit J. Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. **Eur J Cancer** 1996; 32A:2386-93.

Handschuh G, Candidus S, Luber B, et al. Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. **Oncogene** 1999; 18:4301-12.

Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. **Blood** 2004; 103:275-82.

Hansson LE, Sparen P, Nyren O. Survival in stomach cancer is improving: results of a nationwide population-based Swedish study. **Ann Surg** 1999; 230:162-9.

Hasegawa S, Furukawa Y, Li M, et al. Genome-wide analysis of gene expression in intestinal-type gastric cancers using a complementary DNA microarray representing 23,040 genes. **Cancer Res** 2002; 62:7012-7.

Hayashi T, Arai M, Ueno M, et al. Frequency of immunohistochemical loss of mismatch repair protein in double primary cancers of the colorectum and stomach in Japan. **Dis Colon Rectum** 2006; 49:S23-9.

He XS, Rong YH, Su Q, et al. Expression of p16 gene and Rb protein in gastric carcinoma and their clinicopathological significance. **World J Gastroenterol** 2005; 11:2218-23.

Hedvat CV, Hegde A, Chaganti RS, et al. Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. **Hum Pathol** 2002; 33:968-74.

Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. **Arch Pathol Lab Med** 2004; 128:765-70.

Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, et al. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. **Cancer Res** 2002; 62:233-40.

Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, et al. Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. **Cancer Res** 1995; 55:2681-90.

Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, et al. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. **J Neuropathol Exp Neurol** 2006; 65:846-54.

Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. **Am J Pathol** 2001; 158:1245-51.

Howson CP, Hiyama T, Wynder EL. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. **Epidemiol Rev** 1986; 8:1-27.

Hsing AW, Hansson LE, McLaughlin JK, et al. Pernicious anemia and subsequent cancer: a population-based cohort study. **Cancer** 1993; 71:745-50.

Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. **Gastroenterology** 2003; 125:1636-44.

Huang TJ, Wang JY, Lin SR, Lian ST, Hsieh JS. Overexpression of the c-met protooncogene in human gastric carcinoma--correlation to clinical features. **Acta Oncol** 2001; 40:638-43.

Ichinoe M, Mikami T, Shiraishi H, Okayasu I. High microvascular density is correlated with high VEGF, iNOS and COX-2 expression in penetrating growth-type early gastric carcinomas. **Histopathology** 2004; 45:612-8.

Inomata M, Ochiai A, Akimoto S, Kitano S, Hirohashi S. Alteration of beta-catenin expression in colonic epithelial cells of familial adenomatous polyposis patients. **Cancer Res** 1996; 56:2213-7.

Ishaq S, Jankowski JA. Barrett's metaplasia: clinical implications. **World J Gastroenterol** 2001; 7:563-5.

Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. **Mol Biol Cell** 2004; 15:176-88.

Jawhari A, Jordan S, Poole S, Browne P, Pignatelli M, Farthing MJ. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. **Gastroenterology** 1997; 112:46-54.

Jin TX, Furihata M, Yamasaki I, et al. Human mismatch repair gene (hMSH2) product expression in relation to recurrence of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Cancer** 1999; 85:478-84.

Joo YE, Rew JS, Choi SK, Bom HS, Park CS, Kim SJ. Expression of e-cadherin and catenins in early gastric cancer. **J Clin Gastroenterol** 2002; 35:35-42.

Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Baba H, Koga T, Sugimachi K. Clinicopathological features and overexpression of matrix metalloproteinases in

intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis. **Clin Cancer Res** 2000; 6:3581-4.

Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Sugimachi K. Overexpression of vascular endothelial growth factor C is related to lymphogenous metastasis in early gastric carcinoma. **Oncology** 2001; 60:146-50.

Kang SH, Bang YJ, Jong HS, Seo JY, Kim NK, Kim SJ. Rapid induction of p21WAF1 but delayed down-regulation of Cdc25A in the TGF-beta-induced cell cycle arrest of gastric carcinoma cells. **Br J Cancer** 1999; 80:1144-9.

Kim IY, Ahn HJ, Lang S, et al. Loss of expression of transforming growth factor-beta receptors is associated with poor prognosis in prostate cancer patients. **Clin Cancer Res** 1998; 4:1625-30.

Kimura M, Tsuda H, Morita D, et al. A proposal for diagnostically meaningful criteria to classify increased epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 gene copy numbers in gastric carcinoma, based on correlation of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical measurements. **Virchows Arch** 2004; 445:255-62.

Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. **Science** 1991; 253:661-5.

Ko BK, Cho HR, Choi DW, et al. Reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase in nodal metastasis of stomach cancer. **J Korean Med Sci** 1998; 13:286-90.

Koizumi Y, Tsubono Y, Nakaya N, et al. Cigarette smoking and the risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan. **Int J Cancer** 2004; 112:1049-55.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. Helicobacter pylori and atrophic gastritis: importance of the cagA status. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:1777-80.

Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 1992; 189:227-32.

Kuniyasu H, Yasui W, Yokozaki H, Kitadai Y, Tahara E. Aberrant expression of c-met mRNA in human gastric carcinomas. **Int J Cancer** 1993; 55:72-5.

La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Gentile A. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. **Cancer** 1992; 70:50-5.

Lagergren J, Bergstrom R, Nyren O. Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. **Ann Intern Med** 1999; 130:883-90.

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.

Le TL, Yap AS, Stow JL. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. **J Cell Biol** 1999; 146:219-32.

Lee HS, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kim YI, Kim WH. MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 expressions in gastric carcinomas: their roles as prognostic indicators. **Cancer** 2001; 92:1427-34.

Lee KE, Lee HJ, Kim YH, et al. Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer. **Jpn J Clin Oncol** 2003; 33:173-9.

Lee SA, Kang D, Shim KN, Choe JW, Hong WS, Choi H. Effect of diet and Helicobacter pylori infection to the risk of early gastric cancer. **J Epidemiol** 2003; 13:162-8.

Levine PH, Stemmermann G, Lennette ET, Hildesheim A, Shibata D, Nomura A. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus prior to the diagnosis of Epstein-Barr-virus-associated gastric adenocarcinoma. **Int J Cancer** 1995; 60:642-4.

Liu XP, Kawauchi S, Oga A, et al. Combined examination of p27 (Kip1), p21 (Waf1/Cip1) and p53 expression allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma. **Histopathology** 2001; 39:603-10.

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, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet** 1984; 1:1311-5.

Mattar R, Nonogaki S, Silva C, Alves V, Gama-Rodrigues JJ. P53 and Rb tumor suppressor gene alterations in gastric cancer. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo** 2004; 59:172-80.

Mayer B, Johnson JP, Leitzl F, et al. E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. **Cancer Res** 1993; 53:1690-5.

Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, et al. Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa. **Cancer Res** 2004; 64:1255-65.

Metcalf A, Streuli C. Epithelial apoptosis. **Bioessays** 1997; 19:711-20.

Middleton G, Cunningham D. Current options in the management of gastrointestinal cancer. **Ann Oncol** 1995; 6 Suppl 1:17-25; discussion 25-16.

Ming SC. Gastric carcinoma: a pathobiological classification. **Cancer** 1977; 39:2475-85.

Ming SC. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: A critical review. **Gastric Cancer** 1998; 1:31-50.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. **Estimativa/2006: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? **Adv Anat Pathol** 2001; 8:14-20.

Monig SP, Eidt S, Zirbes TK, Stippel D, Baldus SE, Pichlmaier H. p53 expression in gastric cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance. **Dig Dis Sci** 1997; 42:2463-7.

Monig SP, Baldus SE, Hennecken JK, et al. Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. **Histopathology** 2001; 39:597-602.

Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. **Gut** 1998; 43:791-7.

Myung N, Kim MR, Chung IP, Kim H, Jang JJ. Loss of p16 and p27 is associated with progression of human gastric cancer. **Cancer Lett** 2000; 153:129-36.

Nabais S, Machado JC, Lopes C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. Patterns of beta-catenin expression in gastric carcinoma: clinicopathological relevance and mutation analysis. **Int J Surg Pathol** 2003; 11:1-9.

Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, et al. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. **Cancer** 1999; 85:1894-902.

Nakatsuru S, Yanagisawa A, Ichii S, et al. Somatic mutation of the APC gene in gastric cancer: frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. **Hum Mol Genet** 1992; 1:559-63.

Nishino Y, Inoue M, Tsuji I, et al. Tobacco Smoking and Gastric Cancer Risk: An Evaluation Based on a Systematic Review of Epidemiologic Evidence among the Japanese Population. **Jpn J Clin Oncol** 2006; 36:800-7.

Ochiai A, Yamauchi Y, Hirohashi S. p53 mutations in the non-neoplastic mucosa of the human stomach showing intestinal metaplasia. **Int J Cancer** 1996; 69:28-33.

Okamoto A, Jiang W, Kim SJ, et al. Overexpression of human cyclin D1 reduces the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor and growth inhibition by TGF-beta 1 in an immortalized human esophageal epithelial cell line. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:11576-80.

Oue N, Motoshita J, Yokozaki H, et al. Distinct promoter hypermethylation of p16INK4a, CDH1, and RAR-beta in intestinal, diffuse-adherent, and diffuse-scattered type gastric carcinomas. **J Pathol** 2002; 198:55-9.

Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G. Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1987; 84:6379-83.

Parkin DM. International variation. **Oncogene** 2004; 23:6329-40.

Parsonnet J. The incidence of Helicobacter pylori infection. **Aliment Pharmacol Ther** 1995; 9:45-51.

Passlick B, Siemel W, Seen-Hibler R, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res** 2000; 6:3944-8.

Peifer M. Signal transduction. Neither straight nor narrow. **Nature** 1999; 400:213-5.

Pinto-de-Sousa J, David L, Reis CA, Gomes R, Silva L, Pimenta A. Mucins MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 expression in the evaluation of differentiation and clinico-biological behaviour of gastric carcinoma. **Virchows Arch** 2002; 440:304-10.

Pinto-de-Sousa J, Silva F, David L, et al. Clinicopathological significance and survival influence of p53 protein expression in gastric carcinoma. **Histopathology** 2004; 44:323-31.

Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. **Int J Cancer** 1999; 83:18-29.

Ponzetto C, Giordano S, Peverali F, et al. C-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. **Oncogene** 1991; 6:553-9.

Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K, Dano K. Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. **Am J Pathol** 1993; 142:359-65.

Ramesh S, Nash J, McCulloch PG. Reduction in membranous expression of beta-catenin and increased cytoplasmic E-cadherin expression predict poor survival in gastric cancer. **Br J Cancer** 1999; 81:1392-7.

Reis CA, David L, Nielsen PA, et al. Immunohistochemical study of MUC5AC expression in human gastric carcinomas using a novel monoclonal antibody. **Int J Cancer** 1997; 74:112-21.

Reis CA, David L, Seixas M, Burchell J, Sobrinho-Simoes M. Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC1 mucin in gastric carcinoma. **Int J Cancer** 1998; 79:402-10.

Renault B, van den Broek M, Fodde R, et al. Base transitions are the most frequent genetic changes at P53 in gastric cancer. **Cancer Res** 1993; 53:2614-7.

Rosen DG, Huang X, Deavers MT, Malpica A, Silva EG, Liu J. Validation of tissue microarray technology in ovarian carcinoma. **Mod Pathol** 2004; 17:790-7.

Roviello F, Marrelli D, Vindigni C, De Stefano A, Spina D, Pinto E. P53 accumulation is a prognostic factor in intestinal-type gastric carcinoma but not in the diffuse type. **Ann Surg Oncol** 1999; 6:739-45.

Saito H, Osaki T, Murakami D, et al. Effect of age on prognosis in patients with gastric cancer. **ANZ J Surg** 2006a; 76:458-61.

Saito H, Osaki T, Murakami D, et al. Macroscopic tumor size as a simple prognostic indicator in patients with gastric cancer. **Am J Surg** 2006b; 192:296-300.

Saito H, Fukumoto Y, Osaki T, et al. Prognostic Significance of Level and Number of Lymph Node Metastases in Patients with Gastric Cancer. **Ann Surg Oncol** 2007a; 14:1688-93.

Saito H, Osaki T, Murakami D, et al. Prediction of sites of recurrence in gastric carcinoma using immunohistochemical parameters. **J Surg Oncol** 2007b; 95:123-8.

Sakamoto H, Yonezawa S, Utsunomiya T, Tanaka S, Kim YS, Sato E. Mucin antigen expression in gastric carcinomas of young and old adults. **Hum Pathol** 1997; 28:1056-65.

Sakurai S, Sano T, Nakajima T. Clinicopathological and molecular biological studies of gastric adenomas with special reference to p53 abnormality. **Pathol Int** 1995; 45:51-7.

Santos RTM, Watamatsu A, Kanamura CI, Nonogaki S, Pinto GA. Procedimentos laboratoriais em imunohistoquímica e hibridização in situ. In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J, editores. **Manual de imunoistoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p.237-59.

Sapino A, Marchio C, Senetta R, et al. Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. **Virchows Arch** 2006; 449:288-96.

Sarbia M, Becker KF, Hofler H. Pathology of upper gastrointestinal malignancies. **Semin Oncol** 2004; 31:465-75.

Sasaki CY, Lin H, Passaniti A. Expression of E-cadherin reduces bcl-2 expression and increases sensitivity to etoposide-induced apoptosis. **Int J Cancer** 2000; 86:660-6.

Scartozzi M, Galizia E, Freddari F, Berardi R, Cellerino R, Cascinu S. Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches. **Cancer Treat Rev** 2004; 30:451-9.

Shi T, Seligson D, Beldegrun AS, Palotie A, Horvath S. Tumor classification by tissue microarray profiling: random forest clustering applied to renal cell carcinoma. **Mod Pathol** 2005; 18:547-57.

Shimoyama Y, Hirohashi S. Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. **Cancer Res** 1991; 51:2185-92.

Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2006; 12:2979-90.

Song HS, Kim IH, Sohn SS, Kwon KY, Lee WS. Prognostic significance of immunohistochemical expression of p53 and retinoblastoma gene protein (pRB) in curatively resected gastric cancer. **Korean J Intern Med** 2005; 20:1-7.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10869-74.

Stalnikowicz R, Benbassat J. Risk of gastric cancer after gastric surgery for benign disorders. **Arch Intern Med** 1990; 150:2022-6.

Stewart BW, Kleihues P. **World Cancer Report**. Lyon: IARC Press; 2003. Livro todo?

Suriano G, Mulholland D, de Wever O, et al. The intracellular E-cadherin germline mutation V832 M lacks the ability to mediate cell-cell adhesion and to suppress invasion. **Oncogene** 2003; 22:5716-9.

Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. **J Cancer Res Clin Oncol** 1993; 119:265-72.

Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. **World J Surg** 1995; 19:484-8; discussion 489-90.

Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. **IARC Sci Publ** 2004; 327-49.

Takanami I, Tanaka F, Hashizume T, et al. Transforming growth factor-beta isoforms expressions in pulmonary adenocarcinomas as prognostic markers: an immunohistological study of one hundred and twenty patients. **Oncology** 1997; 54:122-8.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science** 1991; 251:1451-5.

Tamura G, Sakata K, Maesawa C, et al. Microsatellite alterations in adenoma and differentiated adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Res** 1995; 55:1933-6.

Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2006; 12:192-8.

Tanaka M, Kitajima Y, Sato S, Miyazaki K. Combined evaluation of mucin antigen and E-cadherin expression may help select patients with gastric cancer suitable for minimally invasive therapy. **Br J Surg** 2003; 90:95-101.

Tanimoto H, Yoshida K, Yokozaki H, et al. Expression of basic fibroblast growth factor in human gastric carcinomas. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol** 1991; 61:263-7.

Tateishi M, Kusaba I, Masuda H, Tanaka T, Matsumata T, Sugimachi K. The progression of invasiveness regarding the role of transforming growth factor beta receptor type II in gastric cancer. **Eur J Surg Oncol** 2000; 26:377-80.

Thompson DE, Mabuchi K, Ron E, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987. **Radiat Res** 1994; 137(2 Suppl):S17-67.

Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature** 1997; 388:539-47.

Torhorst J, Bucher C, Kononen J, et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. **Am J Pathol** 2001; 159:2249-56.

Tryggvason K, Hoyhtya M, Pyke C. Type IV collagenases in invasive tumors. **Breast Cancer Res Treat** 1993; 24:209-18.

Tzanakis N, Gazouli M, Rallis G, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in gastric cancer development, prognosis, and survival. **J Surg Oncol** 2006; 94:624-30.

Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, et al. Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Its correlation with long-term survival of patients. **Cancer** 1993; 72:3179-84.

Uemura Y, Tokunaga M, Arikawa J, et al. A unique morphology of Epstein-Barr virus-related early gastric carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1994; 3:607-11.

Ushijima T, Sasako M. Focus on gastric cancer. **Cancer Cell** 2004; 5:121-5.

Utsunomiya T, Doki Y, Takemoto H, et al. Clinical significance of disordered beta-catenin expression pattern in human gastric cancers. **Gastric Cancer** 2000; 3:193-201.

van de Velde CJ, Peeters KC. The gastric cancer treatment controversy. **J Clin Oncol** 2003; 21:2234-6.

Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2006; 20:651-74.

Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. **Curr Opin Genet Dev** 2002; 12:22-9.

Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. **Curr Opin Genet Dev** 1998; 8:95-102.

Wright PA, Quirke P, Attanoos R, Williams GT. Molecular pathology of gastric carcinoma: progress and prospects. **Hum Pathol** 1992; 23:848-59.

Wu CW, Li AF, Chi CW, et al. Hepatocyte growth factor and Met/HGF receptors in patients with gastric adenocarcinoma. **Oncol Rep** 1998; 5:817-22.

Xia HH, He H, De Wang J, et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a specific c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) inhibitor, SP-600125, in gastrointestinal cancers. **Cancer Lett** 2006; 241:268-74.

Yamachika T, Inada K, Fujimitsu Y, et al. Intestinalization of gastric signet ring cell carcinomas with progression. **Virchows Arch** 1997; 431:103-10.

Yamamoto S, Yasui W, Kitadai Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human gastric carcinomas. **Pathol Int** 1998; 48:499-506.

Yasui W, Kudo Y, Semba S, Yokozaki H, Tahara E. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. **Jpn J Cancer Res** 1997; 88:625-9.

Yasui W, Sentani K, Motoshita J, Nakayama H. Molecular pathobiology of gastric cancer. **Scand J Surg** 2006; 95:225-31.

Yokota J, Yamamoto T, Miyajima N, et al. Genetic alterations of the c-erbB-2 oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of the stomach and are often accompanied by amplification of the v-erbA homologue. **Oncogene** 1988; 2:283-7.

Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitadai Y, et al. p53 point mutations in primary human gastric carcinomas. **J Cancer Res Clin Oncol** 1992; 119:67-70.

Yonemura Y, Ninomiya I, Ohoyama S, et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma. Immunoreactivity for c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short-term prognosis in patients with gastric carcinoma. **Cancer** 1991; 67:2914-8.

Yoshida K, Yokozaki H, Niimoto M, Ito H, Ito M, Tahara E. Expression of TGF-beta and procollagen type I and type III in human gastric carcinomas. **Int J Cancer** 1989; 44:394-8.

Zhang DH, Salto-Tellez M, Chiu LL, Shen L, Koay ES. Tissue microarray study for classification of breast tumours. **Ann Acad Med Singapore** 2003; 32:S75-6.

Zhang QX, Ding Y, Le XP, Du P. Studies on microsatellite instability in p16 gene and expression of hMSH2 mRNA in human gastric cancer tissues. **World J Gastroenterol** 2003; 9:437-41.

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 Gastroenterol** 2004; 10:3044-7.

Zhao GH, Li TC, Shi LH, et al. Relationship between inactivation of p16 gene and gastric carcinoma. **World J Gastroenterol** 2003; 9:905-9.

Zheng H, Takahashi H, Murai Y, et al. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. **Anticancer Res** 2006; 26:3579-83.