

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM
CARCINOMAS GÁSTRICOS DIAGNOSTICADOS EM
PACIENTES COM IDADE ABAIXO DE 50 ANOS:
MUTAÇÕES NO GENE *TP53*, EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS DO SISTEMA DE REPARO E ADESÃO
CELULAR**

EDAISE MARIA DA SILVA

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silva, Edaise Maria da

Estudo de alterações moleculares em carcinomas gástricos diagnosticados em pacientes com idade abaixo de 50 anos: mutações no gene *TP53*, expressão de proteínas do sistema de reparo e adesão celular / Edaise Maria da Silva – São Paulo, 2010.

106p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. NEOPLASIAS GÁSTRICAS. 2. MUTAÇÃO. 3. IDADE DE INÍCIO. 4. GENES p53. 5. DIAGNÓSTICO/métodos. 6. SÍNDROME DE LI-FRAUMENI. 7. MARCADORES BIOLÓGICOS. 8. CADERINAS. 9. BETA CATENINA. 10. PROGNÓSTICO.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Geraldo & Clara
e irmãos Edmilson e Edilaine*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Fernando Augusto Soares, pelo incentivo e orientação profissional, pela estrutura e recursos disponibilizados que possibilitaram a realização deste projeto; pela oportunidade e privilégio de trabalhar sob a sua orientação durante o mestrado e o doutorado.

Às queridas amigas Alexandra Longo, Yukie Sato-Kuwabara e Gilmara Silva pela amizade, pelo apoio, encorajamento, pelos momentos de descontração e conversas agradáveis – claro, que o prazer é todo de vocês ☺.

À Dra. Maria Isabel Achatz por acreditar e me incentivar sempre; pelo excelente aprendizado no Departamento de Oncogenética em relação ao trabalho com os pacientes.

À Amanda Nóbrega e Andréa do Departamento de Oncogenética pela amizade, pelo apoio e auxílio fundamentais na realização deste trabalho.

Ao Dr. Pierre Hainaut pela orientação no trabalho desenvolvido no Grupo de Carcinogênese Molecular (IARC), disponibilizando o laboratório e os recursos necessários para o desenvolvimento desse estudo.

À Ghyslaine Martel, Michelle Wrisez, Edenir Palmero, Stephanie Villar, Nathalia Meireles, Dominic Sighoko, Dominique Bourgeon e todos os alunos e funcionários que me receberam no IARC e me auxiliaram em todo o aprendizado.

Ao Dr. José Humberto Fregnani, pela amizade, disposição e muita paciência nas várias etapas deste trabalho; pelo empenho nas análises estatísticas - não apenas na tese, mas em todos os trabalhos desenvolvidos ao longo deste curso.

À Sueli Nonogaki, Carlos Ferreira e Severino Silva pela inestimável colaboração e excelente trabalho referente à preparação das lâminas e estudo imunoistoquímico.

As amigas de Pós Graduação Luciane Kagohara, Kátia Carvalho, Lígia Petrolini, Mila Martins, Alice Muglia, Mérin Barbara, Fernanda Ayala, pela amizade e convivência durante esses anos.

Aos colegas de laboratório Rodrigo Crespo, Marina Gomes, Cláudia Coutinho, Marcilei Buim, Adriana Bulgarelli, Gwen Freeman, Maria José Souza e também à Liliane Afonso pelo apoio.

Aos amigos André Abreu e Dr. Hugo Campos, pela amizade e toda a assistência no trabalho relacionado ao Banco de Material Biológico.

Ao Dr. Felipe Coimbra, Dr. Héber Salvador, Dr. Wilson Luiz da Costa e Dr. Thiago Pires do Departamento de Cirurgia Abdominal, pelo suporte no levantamento dos dados clínicos dos pacientes, pelo apoio e incentivo, imprescindíveis na realização deste trabalho.

À Dra. Patrícia Prolla, pelas sugestões, incentivo e críticas valiosas durante a realização deste trabalho.

À Eloísa Olivieri, Louise Mota e Vera Prescinoti, do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, pelo excelente trabalho, paciência e presteza.

Aos médicos titulares do Departamento de Anatomia Patológica, especialmente à Dra Maria Dirlei Begnami, Dra Renata Coudry e Dr. Hugo Campos pela colaboração e revisão das lâminas.

Ao Programa de Pós Graduação, principalmente, à Ana Kuninari, Luciana Pitombeira e Vanusa, pela assistência e paciência durante todo este período.

Ao Ivan Neves, Fátima e Simone do Laboratório de imunoistoquímica pelo apoio e amizade

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia Patológica que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho; em especial ao Glauber de Jesus, Marcelo Sibucks e Fábio, pelo auxílio na recuperação do material de arquivo;

À Dra. Erika Monteiro pela colaboração no levantamento do histórico de pacientes.

À Dra. Claudia Zitron e Dra. Adriane Pelosof, do Departamento de Endoscopia, pelo incentivo e colaboração neste projeto.

A equipe da Biblioteca, especialmente à Suely e Francyne pelo excelente trabalho na formatação da tese.

Aos membros da banca de qualificação Dr. Venâncio A. F. Alves, Dra. Ana Margarida M. F. Nogueira (*in memoriam*) e Dr. André Luiz Montagnini pela colaboração e todas as sugestões valiosas no decorrer deste trabalho.

A Sra. Hirde Cortesine e funcionários do Serviço de Arquivo Médico do Hospital do Câncer pela orientação e colaboração no levantamento dos prontuários.

Ao apoio financeiro do CNPQ, CEPID-FAPESP, ICRET e IARC, sem os quais não seria possível realizar este estudo.

Aos pacientes e familiares pela contribuição fundamental na realização deste trabalho.

Agradecimento especial à minha família.

Aos meus pais e irmãos,

*Pelo apoio e incentivo, sem questionamentos ou restrições.. pelo amor, paciência,
amizade e compreensão em todos os momentos.*

Pelo respeito ao meu trabalho e por acreditarem em mim.

Vocês são exemplos de vida e inspiração..

Amo vocês!

RESUMO

Silva EM. **Estudo de alterações moleculares em adenocarcinomas gástricos diagnosticados em pacientes com idade abaixo de 50 anos: mutações no gene *TP53*, expressão de proteínas do sistema de reparo e adesão celular.** São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Muitos estudos têm abordado as características do adenocarcinoma gástrico em pacientes jovens, sugerindo que as características clínico-patológicas e o perfil molecular dessa neoplasia em pacientes jovens diferem em muitos aspectos do carcinoma gástrico em pacientes em idade mais avançada. Um melhor entendimento dessas características particulares possibilitaria a identificação de biomarcadores que poderiam estar envolvidos no desenvolvimento precoce do câncer gástrico, e melhorar o diagnóstico precoce e o prognóstico para grupos específicos destes pacientes. Neste estudo analisamos uma série de 97 pacientes com câncer gástrico diagnosticado antes da idade de 50 anos para a presença de mutações no gene *TP53*. Características clínico-patológicas foram revistas e a análise imunoistoquímica foi realizada para avaliar o padrão de expressão dos marcadores considerados importantes na carcinogênese gástrica (E-caderina, β -catenina, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 e p53). Uma porcentagem significativa de tumores do tipo difuso e estadios avançados foram observados nesta série. A história familiar neoplásica foi positiva em 21,4% dos casos, sendo que em 10,8% foi relatada a ocorrência de câncer gástrico em outros familiares. Uma frequência significativa de alterações na expressão dos marcadores foi observada nos adenocarcinomas gástricos, mas estes não foram fatores prognósticos independentes. Houve uma associação significativa entre a expressão alterada de E-caderina e β -catenina, e entre a expressão da p53 e a invasão perineural. Em nossa casuística, as mutações no gene *TP53* foram detectadas em 11,3% dos casos avaliados, incluindo uma mutação germinativa no códon 337 (p.R337H), detectada em um paciente de 12 anos. A análise univariada para a sobrevida global mostrou diferenças significativas relacionadas às variáveis associadas ao tratamento, estadios do tumor e à histopatologia. Porém, a análise multivariada confirmou que apenas as variáveis associadas ao estadiamento (pT e

pN) foram fatores de risco independentes para o óbito. Nossos resultados sugerem investigações posteriores nesses pacientes jovens, a fim de identificar subgrupos que se beneficiariam no rastreamento e detecção precoce da doença. Outros estudos também devem avaliar a importância prognóstica dos marcadores para grupos específicos de pacientes de acordo com a histologia do tumor e história familiar.

SUMMARY

Silva EM. [Study of molecular alterations in gastric adenocarcinoma diagnosed in patients under 50 years old: *TP53* gene mutations, DNA mismatch repair and cell adhesion proteins expression]. São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Several studies have addressed the characteristics of the gastric adenocarcinoma in young patients, suggesting that the clinicopathological characteristics and molecular profile of this neoplasia in young patients differ in many ways from gastric carcinoma in older patients. A better understanding of these particular characteristics would allow us to identify molecular biomarkers that could be involved in early-onset gastric cancer, and it could improve early diagnosis and prognosis for specific groups of these patients. In this study, we have analyzed a series of 97 patients with gastric adenocarcinoma diagnosed before the age of 50 years for the presence of *TP53* mutations. Clinicopathological features were reviewed and immunohistochemistry was performed to evaluate the expression pattern of the markers considered to be important in gastric carcinogenesis (E-cadherin, β -catenin, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 and p53). A significant percentage of diffuse-type tumors and advanced stage disease were observed this series. The family history of cancer was positive in 21.4% of cases, while 10.8% reported the occurrence of gastric cancer in other relatives. A significant frequency of alterations in the markers expression was observed in gastric adenocarcinomas, but they were not found to be independent prognostic factors. There was a significant association between the altered expression of E-cadherin and β -catenin, and between p53 expression and perineural invasion. In our series, mutations in *TP53* were detected in 11.3% of evaluated cases, including a germline mutation at codon 337 (p.R337H) in one patient of 12 years old. The univariate analysis for overall survival showed significant differences related to the variables associated to the treatment, tumor stage and histopathology. However, multivariate analysis confirmed that only the variables associated with staging (pT and pN) were independent risk factors for

death. Our results suggest further investigations in these young patients, to identify subgroups that would benefit in screening and early detection of disease. Other studies should also evaluate the prognostic significance of markers for specific groups of patients according to tumor histology and family history.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de múltiplas etapas de progressão maligna no adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal e difuso.....	3
Figura 2	O gene <i>TP53</i> e a proteína p53.....	9
Figura 3	Distribuição da idade dos pacientes em anos.....	28
Figura 4	Perfil dos padrões de expressão da E-caderina nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.....	35
Figura 5	Perfil dos padrões de expressão da β -catenina nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.....	36
Figura 6	Representação dos padrões de expressão da E-caderina nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.....	37
Figura 7	Representação dos padrões de expressão da β -catenina nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.....	37
Figura 8	Representação da perda de expressão de MSH2 e MSH6 em adenocarcinoma gástrico em idade jovem.....	38
Figura 9	Representação da expressão da proteína p53 em adenocarcinoma gástrico de paciente diagnosticado em idade jovem.....	39
Figura 10	Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação ao tipo de cirurgia.....	53
Figura 11	Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação à linfadenectomia.....	53

Figura 12	Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação ao tratamento adjuvante.....	53
Figura 13	Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação ao pT.....	54
Figura 14	Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação ao pN.....	54
Figura 15	Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação à pM.....	54
Figura 16	Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação à invasão perineural.....	55
Figura 17	Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação à invasão linfática.....	55

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Seqüência de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR e seqüenciamento.....	22
Quadro 2	Especificações dos antígenos, clones dos anticorpos primários, suas diluições e fabricantes empregados no estudo imunoistoquímico.....	24
Tabela 1	Descrição das variáveis clínicas e demográfica dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico em idade jovem.....	32
Tabela 2	Descrição das variáveis referentes ao estadiamento clínico, tratamento e morbidade dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico em idade jovem.....	33
Tabela 3	Descrição dos dados anatomopatológicos, recidiva e sobrevida dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico em idade jovem.....	34
Tabela 4	Descrição das mutações no gene <i>TP53</i> detectadas nas amostras de adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.....	41
Tabela 5	Características clínico-patológicas dos casos apresentando mutações no gene <i>TP53</i>	42
Tabela 6	Associação entre a expressão imunoistoquímica da E-caderina e da β -catenina nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.....	45

Tabela 7	Associação entre a expressão imunoistoquímica da proteína p53 e a presença de invasão perineural nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.....	45
Tabela 8	Associação entre a expressão imunoistoquímica dos marcadores e análise molecular do gene <i>TP53</i> pelo seqüenciamento direto nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.....	47
Tabela 9	Sobrevida global dos pacientes em relação às variáveis clínicas e mutações no gene <i>TP53</i>	50
Tabela 10	Sobrevida global dos pacientes em relação às variáveis clínico-patológicas.....	51
Tabela 11	Sobrevida global dos pacientes em relação à expressão imunoistoquímica dos marcadores.....	52
Tabela 12	Fatores de risco para óbito em cinco anos de acordo com o modelo de riscos proporcionais de Cox.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

µl	Microlitros
BSA	Albumina bovina
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
DAB	Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDA	Endoscopia Digestiva alta
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FAP	Familial adenomatous polyposis
FFEP	Fixado em Formalina e Embebido em Parafina
HDGC	Hereditary Diffuse Gastric Cancer
HE	Hematoxilina e Eosina
HF	História Familiar
HNPCC	Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer
HPP	História pessoal patológica
HR	Risco relativo de óbito
IARC	Internacional Agency for Cancer Research
IPN	Invasão perineural
IVL	Invasão vascular linfática
IVS	Invasão vascular sanguínea
LFL	Li-Fraumeni- <i>like</i> syndrome
LFS	Li-Fraumeni Syndrome
MDM2	Murine double minute 2
mL	Militros
MLH1	MutL homolog1, colon cancer nonpolyposis type2
MMR	Mismatch Repair Genes
MPC	Morte pelo câncer
MSH2	MutS homolog2, colon cancer nonpolyposis type2
MSH6	MutS homolg 6
MSI	Instabilidade de microssatélite

NaN₃	Azida sódica
NO	Oxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PJS	Peutz-Jeghers Syndrome
pM	Metástases a distância
PMS2	Postmeiotic segregation increase 2
pN	Metástase linfonodal
pT	Infiltração da parede gástrica
QT neo	Quimioterapia neoadjuvante
QT	Quimioterapia
p.R337H	Mutação no códon 337 do gene <i>TP53</i>
RFLP	Restriction length fragment polymorphism
rpm	Rotações por minuto
SG	Sobrevida global
TNM	Sistema de estadiamento
VCD	Vivo com doença
VSD	Vivo sem doença
WHO	World Health Organization
Wnt	Wingless
WT	Wild-type

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivo específico	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Pacientes e Amostras	17
3.2	Metodologia	18
3.2.1	Extração de DNA	19
3.2.2	Identificação das mutações no gene <i>TP53</i>	21
3.2.3	Imunoistoquímica.....	23
3.3	Análises Estatísticas	27
4	RESULTADOS	28
4.1	Casuística e Dados da Amostra.....	28
4.1.1	Dados demográficos.....	28
4.1.2	História pessoal patológica	29
4.1.3	História familiar neoplásica	29
4.1.4	Manifestações clínicas	29
4.1.5	Estadiamento clínico e tratamento	29
4.1.6	Dados anátomo-patológicos e de sobrevida.....	30
4.2	Análise Imunoistoquímica	35
4.2.1	Marcadores do complexo de adesão celular	35
4.2.2	Marcadores do sistema de reparo do DNA	38
4.2.3	p53.....	38
4.3	Análise Molecular	40
4.3.1	Características clínico-patológicas dos casos apresentando mutações no gene TP53	41

4.3.2	Relato de caso	43
4.4	Associações entre as variáveis clínico-patológicas e expressão dos marcadores	44
4.4.1	Associação entre a análise imunoistoquímica dos marcadores e a análise molecular do gene <i>TP53</i> pelo seqüenciamento direto nos adenocarcinomas gástricos	46
4.5	Análises de Sobrevida dos pacientes	47
4.5.1	Sobrevida Global (SG).....	47
4.5.2	Sobrevida Global em relação às variáveis clínico-patológicas e expressão dos marcadores	48
4.5.3	Análise Multivariada.....	56
5	DISCUSSÃO.....	57
6	CONCLUSÃO.....	81
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

ANEXOS

- Anexo 1** Artigo publicado na *Gastric Cancer*
- Anexo 2** Ficha de coleta de dados clínico-patológicos
- Anexo 3** Protocolo de extração de DNA de material congelado
- Anexo 4** Protocolo de extração de DNA de sangue
- Anexo 5** Relato de caso submetido à publicação

1 INTRODUÇÃO

Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) /Organização Mundial de Saúde (OMS) (2009), o câncer de estômago foi a segunda causa de óbitos por câncer no mundo (780 mil óbitos) em 2008. Em homens, o tipo mais comum foi o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago e cólon e reto. Nas mulheres, o mais freqüente foi o câncer de mama, seguido de câncer do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (World Health Organization 2009).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer no Brasil, são estimados para o ano de 2010, cerca de 13.820 casos novos de câncer gástrico entre homens e 7.680 entre mulheres, correspondendo a um risco estimado de 14 casos novos a cada 100 mil homens e de 8 para cada 100 mil mulheres. No Brasil, o câncer gástrico é o terceiro mais incidente entre homens, e o quinto entre as mulheres. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer de estômago é o segundo tipo mais freqüente em homens nas regiões Norte (10/100.000) e Nordeste (10/100.000); o terceiro na Região Centro-Oeste (12/100.000), e o quarto nas regiões Sul (19/100.000) e Sudeste (17/100.000). Para as mulheres é o terceiro mais freqüente na Região Norte (6/100.000); o quarto na Região Nordeste (6/100.000), e o quinto nas demais regiões, Sul (10/100.000), Sudeste (9/100.000) e Centro-Oeste (6/100.000) (Ministério da Saúde 2010).

A ocorrência do câncer gástrico tem um pico de incidência em pacientes que apresentam idade em torno de 60 anos (MITSUDOMI et al. 1989; THEUER et al. 1996; SANCHEZ-BUENO et al. 1998). Cerca de 65% dos pacientes diagnosticados

com câncer de estômago têm mais de 50 anos, sendo incomum antes da idade de 40 anos (CARVALHO et al. 2004; MILNE et al. 2006; LLANOS et al. 2006; SANTORO et al. 2007).

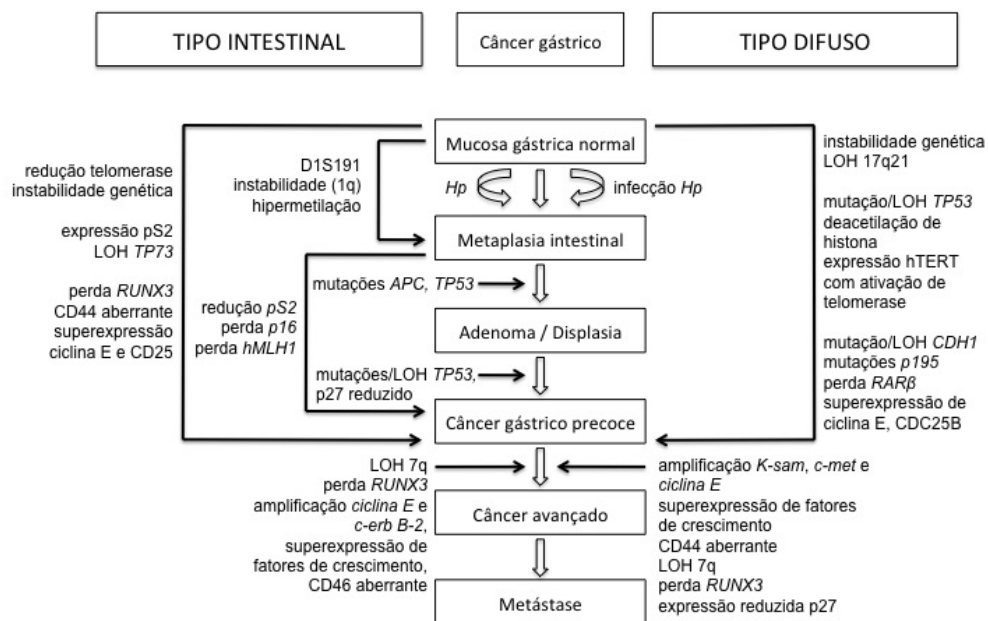
Muitos estudos abordam as características dessa neoplasia em pacientes jovens, sugerindo que as características biológicas e clínico-patológicas nesses pacientes diferem em muitos aspectos do carcinoma gástrico esporádico em pacientes com idade mais avançada (CARVALHO et al. 2004; MILNE et al. 2006; BUFFART et al. 2007; SILVA et al. 2008).

O carcinoma gástrico pode ser dividido em dois subtipos de acordo com a classificação histológica de Laurén: o difuso e o intestinal. De acordo com esta classificação, os carcinomas gástricos de tipo difuso são caracterizados pela ausência de coesão entre as células, o que facilita a infiltração de células isoladas na parede gástrica. Este tipo histológico ocorre mais frequentemente em pacientes jovens, especialmente na região de cárdia e está associado com prognóstico menos favorável (FUCHS et al. 1995). Os carcinomas gástricos de tipo intestinal são predominantes em população de idade mais avançada e de alto risco. São caracterizados por células neoplásicas coesas formando estruturas glandulares e lesões frequentemente ulceradas, ocorrem com maior frequência na região distal e geralmente são precedidas pela cadeia de eventos morfológicos como gastrite crônica, atrofia, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma (LAUREN 1965; CORREA 1988).

Alterações moleculares distintas têm sido detectadas nestes dois tipos histológicos. Mutação no gene *TP53*, acúmulo da proteína p53, instabilidade de microsatélite de DNA, perda de heterozigose (LOH) em 18q ou expressão de c-erbB-2 são preferencialmente associadas com o tipo intestinal, enquanto que a

mutação no gene da E-caderina (*CDH1*) ou perda da expressão da proteína na membrana celular está associada com o tipo difuso (UCHINO et al. 1993; BECKER et al. 1994; RANZANI et al. 1995; SOLCIA et al. 1996; OLIVEIRA et al. 1998; CANDUSSO et al. 2002).

Em relação ao desenvolvimento do câncer gástrico, em um modelo apresentado mais recentemente, os autores apontaram alterações genéticas e epigenéticas associadas com a progressão maligna dos adenocarcinomas de tipo intestinal e difuso. Em nível molecular, estes dois subtipos parecem ter origem genética e comportamento biológico distintos (VOGIATZI et al. 2007).



Fonte: Adaptado de VOGIATZI (2007)

Figura 1 - Modelo de múltiplas etapas de progressão maligna no adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal e difuso.

Os carcinomas gástricos são esporádicos em sua maioria e se desenvolvem em resposta ao efeito cumulativo de fatores de risco ambientais e susceptibilidade genética dos indivíduos, enquanto que a agregação familiar de câncer gástrico é observada em uma pequena porcentagem de casos (10%) (PALLI et al. 1994; EKSTROM et al. 2000; OLIVEIRA et al. 2006; CARNEIRO et al. 2008).

Recentemente, taxas elevadas de agregação familiar (33-36%) foram descritas em áreas com alta incidência de câncer gástrico, como no Japão e na Itália (KAWASAKI et al. 2007; ROVIELLO et al. 2007). Apenas 1-3% dos casos dos carcinomas gástricos estão relacionados às síndromes de predisposição hereditária ao câncer gástrico (STONE et al. 1999; BROOKS-WILSON et al. 2004; PEDRAZZANI et al. 2007).

Mutações germinativas no gene da E-caderina (*CDH1*, MIM#192090) têm sido relacionadas com a ocorrência de câncer gástrico difuso familiar (HDGC, MIM#137215). Em 1998, foi descrita pela primeira vez a ocorrência de mutações germinativas no gene *CDH1* responsáveis pelo desenvolvimento do câncer gástrico difuso em famílias de origem Maori, com alta agregação familiar. As famílias afetadas apresentavam indivíduos com câncer gástrico difuso em idade precoce, e a maioria dos óbitos ocorria em idade abaixo dos 40 anos, em contraste com a população geral onde 80% dos casos de câncer gástrico ocorriam em idade acima de 60 anos (GUILFORD et al. 1998). Desde então, mutações patogênicas têm sido descritas em pacientes com câncer gástrico difuso de várias origens étnicas (OLIVEIRA et al. 2003). Entretanto, apenas cerca de 30% de todas as famílias com câncer gástrico familiar são portadoras de mutações germinativas no gene *CDH1* (GAYTHER et al. 1998; GUILFORD et al. 1998; GUILFORD et al. 1999; CALDAS

et al. 1999; HUMAR et al. 2002; BACANI et al. 2006) e essas mutações não parecem estar associadas ao câncer gástrico esporádico ou de tipo intestinal (ASCANO et al. 2001; SURIANO et al. 2003; BROOKS-WILSON et al. 2004). Nessas famílias, as mutações no gene da E-caderina apresentam padrão autossômico dominante com penetrância alta e incompleta, sendo que os indivíduos afetados desenvolvem câncer gástrico do tipo difuso em idade jovem (GUILFORD et al. 1998).

Um estudo recente (HUNTSMAN 2001) avaliou microscopicamente amostras de mucosa gástrica de cinco indivíduos portadores de mutações germinativas em *CDH1* que foram submetidos à gastrectomia profilática (idade entre 22 e 40 anos). Em todas as amostras foram identificados infiltrados de células em anel de sinete. Em três dos cinco casos avaliados, as lesões eram multifocais, e em um dos casos, as células neoplásicas estavam presentes em 65 dos 140 blocos de tecido analisados. Considerando esse resultado, os autores recomendam aconselhamento genético e gastrectomia profilática em portadores assintomáticos de mutação em *CDH1* que pertençam a famílias com câncer gástrico difuso hereditário com alta penetrância (HUNTSMAN et al. 2001; CHUN et al. 2001; LEWIS et al. 2001; SURIANO et al. 2005; NORTON et al. 2007).

As mutações podem ser responsáveis por perda e ganho de função (perda das propriedades de adesão e da função supressora de proliferação, e aumento da motilidade celular), ambos os aspectos podem ser potencialmente relevantes para o tumor e formação de metástases (CHRISTOFORI et al. 1999; KREMER et al. 2003). Não apenas as alterações no gene *CDH1* mas também alterações estruturais e/ou disfunção das cateninas podem causar o rompimento do complexo de adesão celular

mediado pela E-caderina (BEHRENS et al. 1996).

A E-caderina é uma proteína transmembrana cálcio-dependente que desempenha papel importante na organização e manutenção da adesão célula-célula. A β -Catenina é uma proteína multifuncional que além do seu papel estrutural como componente do complexo de adesão célula-célula, também pode atuar na via de sinalização *Wingless (Wnt)* e transcrição gênica (POLAKIS 2000). Alterações da expressão de β -Catenina e das moléculas envolvidas na via de sinalização *Wnt* são amplamente estudadas no processo neoplásico. A modificação pós-traducional da β -catenina por fosforilação parece romper a interação entre a E-caderina e a α -catenina, causando perda da adesão celular dependente de caderina e potencializando o processo neoplásico (BEHRENS et al. 1996). A ativação dos genes alvo da via *Wnt* está associada à proliferação celular, crescimento e progressão do tumor, desdiferenciação, proteólise, angiogênese, migração e outros aspectos que conferem maior agressividade ao tumor (BRABLETZ et al. 2002).

Em artigo recente publicado pelo nosso grupo, 515 amostras de adenocarcinomas gástricos foram avaliadas por imunoistoquímica. A expressão alterada (ausente ou reduzida) de E-caderina foi observada em 73% destas amostras, e para a β -catenina, o mesmo padrão de expressão foi observado em 91% destes casos. Para avaliar a frequência dessas alterações no complexo de adesão celular em indivíduos mais jovens, o padrão de expressão da E-caderina e da β -catenina foi comparado entre dois grupos de pacientes de acordo com a idade (≤ 40 e > 40 anos de idade). Foi observado que o grupo de pacientes mais jovens apresentou taxa significativamente menor de alterações na expressão das proteínas avaliadas em relação ao outro grupo (SILVA et al. 2008) (Anexo 1). A expressão alterada desses

marcadores foi associada significativamente ao tipo histológico e perda da diferenciação histológica da neoplasia ($P < 0,001$) (SILVA 2005).

O câncer gástrico tem sido incluído como parte do espectro de tumores em outras síndromes de predisposição ao câncer hereditário, como a Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC), Síndrome de Li-Fraumeni (LFS), Polipose adenomatosa familiar (FAP) e Síndrome de Peutz-Jeghers (PJS) (CALDAS et al. 1999; FITZGERALD et al. 2002). O risco de câncer gástrico varia nestas síndromes, com um risco estimado de 10-15% na HNPCC, 30% em PJS e 12% em FAP (LEHTOLA 1978).

Os pacientes portadores da Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC, do inglês *Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer*), ou Síndrome de Lynch, não apresentam apenas predisposição ao câncer colorretal, mas também a outros tumores afetando o endométrio, pelve renal, intestino delgado e estômago. O câncer gástrico é um dos mais freqüentes no espectro de tumores extra-colônicos desta síndrome (PARK et al. 2000; GOECKE et al. 2006; BARROW et al. 2009), apesar disso, atualmente não está incluído nos critérios de Amsterdam. Esta síndrome é caracterizada pela presença de mutações germinativas nos genes do sistema de reparo do DNA (*MMR*, do inglês *Mismatch Repair Genes*), como por exemplo *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* e *MSH6*. Erros no mecanismo de reparo do DNA são a principal causa de instabilidade de microssatélite (MSI) e podem levar a mutações nos genes críticos cuja inativação resulta no desenvolvimento tumoral (KELLER et al. 1996; BECKER et al. 2000; SURAWEERA et al. 2001).

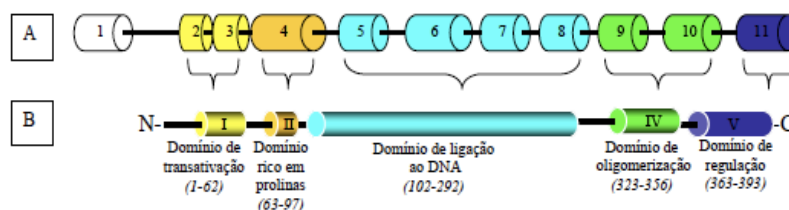
A ausência de expressão das proteínas *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* e *MSH6*, detectada através da imunoistoquímica, tem sido associada com o fenótipo MSI e é

considerada como marcador molecular para alterações nos genes de reparos do DNA (MMR). A identificação de pacientes HNPCC portadores de mutações germinativas em um dos genes MMR, pode ser significativamente aumentada pela análise da morfologia do tumor, MSI e imunoistoquímica (UMAR et al. 2004; HAMPEL et al. 2005). Foi relatada a ocorrência de MSI em 30% dos casos de câncer gástrico (RENAULT 1996), e a ocorrência de mutações nos genes MMR em casos de câncer gástrico esporádico (KELLER et al. 1996; PINTO et al. 2008). Duas novas mutações germinativas no gene *MLH1* foram detectadas em uma série de pacientes jovens diagnosticados com carcinomas gástricos (BACANI et al. 2005). Outro estudo mostrou que MSI estava significativamente associada com a ocorrência de tumores com localização distal (antro) e história familiar positiva de câncer gástrico (OTTINI 1997). Um estudo publicado recentemente pelo Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital AC Camargo, avaliou a frequência de tumores extra-colônicos em 2095 indivíduos pertencentes a 60 famílias portadoras da Síndrome de Lynch. Foi relatado um total de 200 tumores extra- colônicos, sendo o câncer gástrico o segundo tipo mais freqüente entre pacientes do sexo masculino, e o quarto tipo mais freqüente no o sexo feminino. Além disso, este trabalho relatou que a idade média destes pacientes com câncer gástrico ao diagnóstico (53 anos) foi menor do que a idade média dos pacientes acometidos por tumores gástricos esporádicos. Com base nestes resultados, os autores discutiram a inclusão do câncer gástrico no espectro de tumores extra-colônicos da Síndrome de Lynch (DA SILVA et al. 2010). Em relação à idade precoce ao diagnóstico, outro grupo relatou resultado semelhante em pacientes portadores da Síndrome de Lynch com câncer gástrico. Nestes pacientes, a idade

média ao diagnóstico foi menor (58 anos) quando comparada aos pacientes com câncer gástrico esporádico (76 anos) (GYLLING et al. 2007).

Um dos genes mais frequentemente envolvidos na carcinogênese em humanos é o gene supressor tumoral *TP53* (MIM#191170). Este gene está localizado na região 17p13.1 e é responsável pela codificação da proteína p53. O tamanho aproximado do gene *TP53* é de 20 Kb e é composto por onze éxons, sendo o primeiro deles não codificante. A sequência codificante contém cinco domínios caracterizados por funções específicas (MAY et al. 1999) (Figura 2).

O domínio inicial (aminoácidos 1 a 62), ou amino terminal, é o domínio de transativação, no qual se encontra o sítio de ligação à proteína mdm2 (do inglês, *murine double minute 2*) que regula a expressão da proteína p53. O segundo domínio é rico em resíduos de prolina (aminoácidos 63 a 97) e é seguido pela região central (aminoácidos 102 a 292), que contém o domínio de ligação ao DNA (terceiro domínio), conhecido como região de *hotspot*. O domínio de oligomerização (aminoácidos 323 a 356) é fundamental na configuração espacial da proteína p53, responsável pela multimerização da proteína, que se unirá em tetrâmeros. O domínio final é o de regulação (aminoácidos 363 a 393).



Legenda: A) Representação dos éxons 1 a 11 do gene *TP53*. B) Representação da proteína p53 e seus domínios.

Fonte: (ACHATZ 2008)

Figura 2 - O gene *TP53* e a proteína p53.

A proteína p53 atua como fator de transcrição de vários genes envolvidos na regulação do ciclo celular, apoptose, reparo de dano do DNA e também na diferenciação celular (LEVINE et al. 1991; LANE 1992; HAINAUT 1995; O'FARRELL et al. 2004).

Embora a localização nuclear da proteína p53 seja essencial para sua atividade (SHAULSKY et al. 1991), o acúmulo nuclear não é usualmente detectado devido a curta meia-vida da proteína selvagem (WT, do inglês *Wild-type*) que varia de 5 a 20 minutos (GIACCIA et al. 1998). Entretanto, mutações no gene *TP53* podem resultar na produção de uma proteína p53 com meia-vida prolongada que pode se acumular no núcleo da célula. Esta proteína é constitutivamente inibida e o principal mecanismo de inibição é a interação proteína-proteína com o produto do oncogene *MDM2*. Essa interação possibilita o redirecionamento da p53 do núcleo para o citoplasma, onde ocorrerá a degradação da proteína mediada por proteossomos (LJUNGMAN 2000).

Vários mecanismos podem alterar a função de *TP53*, dentre eles, a perda de heterozigose (LOH), metilação do DNA e mutações. As mutações são as principais alterações verificadas na carcinogênese, no entanto, outros mecanismos que levam à inativação da p53 podem ocorrer nas células neoplásicas. Estas alterações incluem a perda de um alelo ou mesmo de todo o cromossomo, o seqüestro e destruição da proteína ativa por proteínas celulares ou virais, repressão transcricional, degradação protéica acelerada, modificação da conformação da proteína, inativação protéica e alteração na distribuição celular da proteína (HAINAUT 2004). Sua inativação resulta na perda de função da proteína p53 e tem papel importante na tumorigênese e progressão de vários tumores, incluindo o câncer gástrico.

O gene *TP53* é alvo de mutações somáticas em aproximadamente 40% de todos os casos de câncer gástrico, e muitas dessas mutações podem levar à perda de função da proteína p53 (UCHINO et al. 1993; RUGGE et al. 2000)

Há controvérsias a respeito da prevalência de mutações no gene *TP53* e sua relação com o tipo histológico e estadiamento do tumor (PANANI 2008). Alguns estudos mostram que as mutações tendem a ocorrer em maior frequência nos tumores de tipo intestinal, enquanto outros relatam que a incidência de mutações é similar nos tumores de tipo intestinal e difuso (25-40% dos casos estudados). Além disso, as alterações no *TP53* parecem ocorrer precocemente em tumores de tipo intestinal (FENOGLIO-PREISER et al. 2003). Em relação à idade dos pacientes com câncer gástrico e a ocorrência de mutações no *TP53*, foi relatado que a frequência de mutações em *TP53* em pacientes mais jovens foi menor quando comparada aos pacientes em idade mais avançada (RUGGE et al. 2000).

Aproximadamente 35% das mutações são transições G:C – A:T ocorrendo nas ilhas CpG, e têm sido consideradas marcadores de mutagênese causada por espécies reativas de oxigênio, em particular óxido nítrico (NO), geradas durante processos como a inflamação ou infecção bacteriana (OHSHIMA et al. 1994; AMBS et al. 1997; RUGGE et al. 1997).

Esse padrão de mutação é consistente com o fato de que a mutagênese pode ocorrer em lesões inflamatórias precursoras, tais como a atrofia. Ainda não se sabe se tais mutações estão presentes em tumores gástricos diagnosticados em idade precoce, e se estão associadas com o processo inflamatório. Outros padrões de mutações no gene *TP53* têm sido associados à exposição a vários carcinógenos ambientais, como por exemplo a infecção por *Helicobacter pylori* (NOMURA et al. 1991;

PARSONNET et al. 1991; KOEA et al. 2000; RUGGE et al. 2000; PEEK et al. 2002). Este fator tem sido relacionado ao desenvolvimento de carcinomas gástricos em pacientes jovens (SAITO et al. 1999); (KOSHIDA et al. 2000; HARUMA et al. 2000), entretanto, é provável que envolva uma porcentagem menor de pacientes jovens em relação aos pacientes com idade mais avançada.

Mutações germinativas no gene *TP53* estão associadas à Síndrome de Li-Fraumeni (LFS, MIM # 151623) e sua variante, a Síndrome Li-Fraumeni-like (LFL) (BIRCH et al. 1994). Essas síndromes são doenças genéticas autossômicas dominantes caracterizadas pela predisposição ao desenvolvimento de vários tumores diagnosticados antes dos 45 anos, incluindo sarcomas, câncer de mama, tumores de sistema nervoso central e carcinoma adrenocortical (LI et al. 1969; LI et al. 1988). Outros tumores, como leucemia, câncer de pulmão, melanoma, câncer renal, colorretal e gástrico, também ocorrem com frequências variadas nas famílias afetadas (GARBER et al. 1990; HARTLEY et al. 1993; BIRCH et al. 1994; FREBOURG et al. 1995).

De acordo com o banco de dados da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), o câncer gástrico tem sido relatado em 2,8% das famílias LFS. As mutações germinativas no gene *TP53* têm sido identificadas em aproximadamente 70% das famílias com critérios clínicos para LFS e em 40% das famílias LFL. Aproximadamente 75% destas mutações, somáticas ou germinativas, são do tipo *missense*, ou seja, promovem alterações que levam a troca de aminoácidos, e tendem a ocorrer predominantemente na região do domínio de ligação ao DNA (CHOMPRET et al. 2001; OLIVIER et al. 2003; OLIVEIRA et al. 2004).

De acordo com os dados da literatura, uma mutação germinativa *missense* no gene *TP53* foi relatada em um paciente LFS apresentado como um caso de câncer gástrico não-familiar (SUGANO et al. 1999). Outro estudo demonstrou a presença de mutação germinativa *nonsense* em *TP53* em uma família onde os critérios clínicos de LFS e HDGC estavam associados (KIM et al. 2004). Em um estudo com 34 pacientes europeus com câncer gástrico familiar, apenas uma mutação germinativa *missense* no *TP53* foi identificada (KELLER et al. 2004). Em um estudo incluindo famílias com agregação familiar de câncer gástrico, apenas era portadora de mutação germinativa *missense* em região de *hotspot* do *TP53* (OLIVEIRA et al. 2004). Outro grupo avaliou sete famílias com câncer gástrico familiar e não encontrou nenhuma mutação nos genes da E-caderina e *TP53*, concluindo que mutações germinativas nestes genes não estavam freqüentemente envolvidas na carcinogênese do câncer gástrico familiar em pacientes japoneses (KUSANO et al. 2001). Amostras de 23 pacientes com Síndrome LFL, provenientes de uma área com elevada taxa de agregação familiar, foram avaliadas através do seqüenciamento da região dos éxons 5-8 do gene *TP53*, e nenhuma mutação germinativa foi encontrada (CORSO et al. 2010). Até o presente, poucos estudos relataram casos de câncer gástrico familiar com mutações germinativas no *TP53* (KELLER et al. 2004; OLIVEIRA et al. 2004; KIM et al. 2004; YAMADA et al. 2007).

Em estudo recente na genética do câncer familiar nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, foram determinados o padrão e prevalência de mutações germinativas no gene *TP53* e o perfil tumoral de 45 famílias brasileiras que preenchem os critérios diagnósticos da LFS/LFL (ACHATZ et al. 2007).

A apresentação clínica das famílias brasileiras LFS/LSL demonstrou

variações no espectro tumoral e na idade de acometimento dos tumores. A comparação entre o perfil de tumores apresentado pelas famílias brasileiras com mutações no gene *TP53* mostrou um aumento na presença de tumores gástricos em relação ao perfil de tumores em outras famílias com mutações no gene *TP53* relatados no banco de dados do IARC (PETITJEAN et al. 2007; ACHATZ et al. 2007). Neste estudo, casos de câncer de estômago foram diagnosticados em 46,2% (6/13) das famílias brasileiras com mutações germinativas no gene *TP53*, comparado a 31,3% (10/32) das famílias sem as mutações. Dentre os 56 tumores detectados nestas seis famílias, o câncer gástrico foi um dos mais frequentes (8.9%) (ACHATZ et al. 2007).

A presença de uma mutação germinativa específica no éxon 10 do gene *TP53*, p.R337H (CGC-CAC, uma troca de arginina para histidina) foi a principal alteração detectada. Um estudo com 36 crianças brasileiras com tumores adrenocorticais, sem história de LFS/LFL relatou a presença desta mutação (p.R337H) em trinta e cinco dessas crianças. Os autores concluíram que se tratava de uma mutação tumor-específica associada apenas ao desenvolvimento de tumores adrenocorticais (RIBEIRO 2001). Outro estudo identificou a mesma mutação em 77% das crianças e em 13,5% dos adultos com câncer adrenocortical avaliados. A mutação foi encontrada em heterozigose em outros familiares, indicando que a mutação Arg337His havia sido herdada em muitos casos. A presença da mutação em adultos mostrou que a ocorrência da mesma não era restrita a crianças com câncer adrenortical, além de estar associada a um prognóstico desfavorável nestes pacientes (LATRONICO 2001). O estudo realizado em 45 famílias com critérios clínicos para LFS/LFL, detectou mutações germinativas em 13 famílias, dentre as quais, seis

apresentaram a mutação p.R337H. Este estudo mostrou que a mutação p.R337H em linhagem germinativa predispõe os indivíduos afetados ao desenvolvimento de tumores em idade jovem, e não apenas ao tumor adrenocortical (ACHATZ 2007).

Estudos independentes nos Estados do Rio Grande do Sul e Paraná têm estimado que a mutação p.R337H está presente em aproximadamente 0,3% da população estudada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Além disso, esta mutação está associada à ocorrência do haplótipo caracterizado pelo alelo T do SNP28 (rs9894946), o qual é relativamente raro na população em geral, demonstrando um efeito fundador comum a estas famílias (PALMERO et al. 2008, GARRITANO et al. 2010).

Uma investigação detalhada da incidência de câncer em famílias portadoras da mutação p.R337H tem mostrado um risco aumentado quando comparado ao risco da população em geral (ACHATZ et al. 2007; PALMERO et al. 2008). Considerando que a detecção desta mutação é relativamente simples em testes genéticos, e a existência de protocolos específicos para portadores de mutações germinativas do *TP53*, a identificação dos portadores dessa mutação poderia auxiliar na detecção precoce de um número significativo de tumores, incluindo os carcinomas gástricos.

A proposta deste estudo retrospectivo foi avaliar as informações clínicas e patológicas em uma série de pacientes admitidos no Hospital AC Camargo, com diagnóstico de câncer gástrico em idade abaixo de 50 anos. E avaliar neste grupo, a associação do desenvolvimento do câncer gástrico em idade precoce e a presença de mutações no gene *TP53*, principalmente a mutação p.R337H. Desta forma, é possível obter através das análises moleculares, uma melhor compreensão do surgimento precoce do câncer gástrico nesses pacientes.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar alterações moleculares em amostras de pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade abaixo de 50 anos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a frequência de mutações no gene *TP53* em amostras de tecido neoplásico disponíveis nos arquivos do Hospital AC Camargo de pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade inferior a 50 anos.
2. Avaliar nestas amostras o padrão de expressão da proteína p53, de marcadores do complexo de adesão celular (E-caderina e β -catenina) e do sistema de reparo do DNA (MLH1, MSH2, PMS2, MSH6) pela técnica de imunoistoquímica.
3. Descrever nesta casuística, as características clínico-patológicas tais como a história pessoal patológica, história familiar neoplásica, estadiamento clínico e patológico, histopatologia do tumor e dados de sobrevida.
4. Correlacionar o padrão de expressão dos marcadores moleculares com as características clínico-patológicas nestas amostras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES E AMOSTRAS

O presente estudo incluiu uma série de amostras tumorais de pacientes admitidos no Hospital AC Camargo, São Paulo para tratamento de câncer gástrico, tendo como critério clínico para inclusão dos casos, pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico em idade inferior a 50 anos.

Com a aprovação deste estudo pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) desta instituição e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), os prontuários médicos e laudos anátomo-patológicos dos casos selecionados foram revistos para obtenção das informações clínico-patológicas incluindo: dados demográficos (idade e gênero), história pessoal patológica (presença de diabetes, obesidade, doença do refluxo e etilismo), história familiar neoplásica (ocorrência de câncer gástrico, colorretal, mama e outros tumores em parentes de primeiro, segundo e/ou terceiro grau), manifestações clínicas (relato de sintomas como: dor, anemia, vômitos, obstrução, sangramento e perda ponderal), tratamento inicial (quimioterapia neoadjuvante, cirurgia, quimioterapia paliativa ou laparotomia exploradora não terapêutica/cirurgia paliativa seguida de quimioterapia paliativa), intuito da cirurgia (se paliativa ou curativa), realização de linfadenectomia (se realizada: tipo D1, D2 ou D3), morbidade, estadiamento clínico e anátomo-patológico (pTNM), citologia, tipo histológico do tumor segundo a classificação de Laurén e da Organização Mundial de Saúde (OMS), grau histológico, presença de invasão perineural (IPN), invasão

vascular sanguínea (IVS), invasão vascular linfática (IVL), além dos dados de recidiva e sobrevida.

Neste estudo, foram considerados apenas casos de pacientes que possuíam material embebido em parafina (FFEP, Fixado em Formalina e Embebido em Parafina) ou congelado disponível, derivado de cirurgia ou biópsia endoscópica.

Foram excluídos casos de pacientes que foram submetidos à cirurgia em outros serviços e pacientes apresentando câncer gástrico de outro tipo histológico, como linfomas, tumores de origem neuroendócrina, entre outros. O seguimento clínico dos pacientes teve início a partir da data da cirurgia até a data do óbito ou da última consulta. Os prontuários foram revistos até o mês de junho de 2010, assim, o seguimento dos pacientes vivos foi considerado até essa data.

A revisão dos prontuários foi padronizada de acordo com a Ficha de Coleta de Dados utilizada pelo Departamento de Cirurgia Abdominal (Anexo 2). A casuística inicial foi composta de 181 casos. Após a revisão dos prontuários, foram separados 97 casos para inclusão no estudo, seguindo-se a etapa de recuperação do material disponível em arquivo do Departamento de Anatomia Patológica.

3.2 METODOLOGIA

Os blocos de material FFEP e lâminas dos respectivos casos selecionados foram recuperados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica para obtenção de amostras de tumor gástrico e mucosa gástrica não-tumoral. Selecionados os blocos representativos de cada caso, foram obtidos novos cortes e coloração em HE, para realização da análise imunoistoquímica e extração de DNA, conforme

protocolos já estabelecidos nos laboratórios onde foram desenvolvidas as metodologias.

Foi verificada também a disponibilidade de amostras de tecido congelado ou sangue dos respectivos casos, armazenadas no Banco de Material Biológico desta instituição. Todo o processo de recuperação, manipulação e extração do DNA genômico destas amostras foi realizado no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do Hospital AC Camargo, de acordo com protocolos utilizados no laboratório.

3.2.1 Extração de DNA

Todas as amostras utilizadas foram categorizadas e codificadas previamente, para preservação da identidade dos pacientes.

Material FFEP

Para a extração de DNA do material FFEP, foram obtidos cortes de 5µm de cada bloco e armazenados em tubos de 0,5mL previamente identificados.

Antes da extração do DNA, os cortes passaram pelo processo de desparafinização, utilizando-se o *QIAamp DNeasy Blood and Tissue Kit*[®] (Qiagen). Em cada tubo contendo os cortes de material FFEP, foram adicionados 1200 µl de xilol, agitando-se por 15 segundos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e 1200 µl de etanol foram adicionados ao sedimento (*pellet*). Os tubos foram agitados por 15 segundos e centrifugados a 14.000 rpm durante cinco minutos. Esse procedimento foi repetido e, ao final, os tubos com as tampas abertas foram

colocados em centrífuga a vácuo a 37°C durante 15 minutos, objetivando a evaporação do etanol remanescente.

Em seguida, as amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando-se o protocolo do *QIAamp DNA Micro kit*[®] (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

Em cada tubo foram adicionados 180 µl de Buffer ATL (*Tissue Lysis Buffer*), além de 20 µl de proteinase K. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C, *overnight*, em bloco aquecido com agitador (*termomixer*). Após esse período, foi adicionado a cada tubo, 200 µl de Buffer AL (fornecido pelo fabricante). Após homogeneização das amostras, foram adicionados 200 µl de etanol, agitando-se durante 15 segundos e centrifugando brevemente. As amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C).

Após breve centrifugação dos tubos, a solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna *QIAamp MinElute* e centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. O dispositivo com a coluna foi removido do tubo e recolocado em um tubo limpo. Foram adicionados 500 µl de Buffer AW1 (Wash Buffer 1) ao dispositivo com a coluna, que foram centrifugados a 8.000 rpm por um minuto. O procedimento de lavagem foi repetido com 500 µl de Buffer AW2 (Wash Buffer 2), seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante três minutos. O DNA extraído da coluna foi eluído pela adição de 100 µl de Buffer AE (fornecido pelo fabricante) em duas etapas: primeiramente foram adicionados 50 µl, e após um minuto ocorreu a centrifugação a 8.000 rpm durante um minuto. Em seguida, outros 50 µl de Buffer AE foram adicionados, e após cinco minutos, seguiu-se a centrifugação a 8.000 rpm por um minuto, após as amostras terem sido transferidas do dispositivo para tubo de

recuperação. As amostras foram armazenadas a -20°C.

Material congelado e sangue

As amostras de material congelado foram submetidas à extração de DNA de acordo com um protocolo de extração à base de fenol-clorofórmio (Anexo 3).

Para extração de DNA a partir de amostras de sangue foi utilizado o *Gentra Puregene Blood Kit* (Qiagen) (Anexo 4). O DNA obtido foi quantificado e estocado a -20°C.

3.2.2 Identificação das mutações no gene *TP53*

As análises subseqüentes, realizadas a partir de alíquotas do DNA genômico extraído, foram realizadas no laboratório do Grupo de Carcinogênese Molecular (*Molecular Carcinogenesis Group - Section of Mechanisms of Carcinogenesis*), na Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC - WHO), Lyon, França, sob a orientação do Dr. Pierre Hainaut, diretor do laboratório. O protocolo incluía o seqüenciamento direto do produto de PCR (*polymerase chain reaction*) nos éxons de 2-11 para identificação das mutações e comparação com a *TP53 mutation database* da instituição (<http://www-p53.iarc.fr/index.html>). Os éxons foram amplificados utilizando-se iniciadores (*primers*) específicos (Quadro 1), a partir de 50ng de DNA genômico, conforme protocolo estabelecido pelo laboratório. As condições da reação de PCR foram: 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs; 1,2 µM de cada oligonucleotídeo; 1,25 U de *TaqPlatinum DNA polymerase* (Invitrogen); 2,5 µL de tampão de reação para *TaqPlatinum* 10X (concentração final 1X) e água em quantidade suficiente para

25 µL. Para o éxon 7, foi utilizada a *HotStar Taq* (Qiagen). Para todos os éxons (exceto o éxon 7) a reação de amplificação foi realizada utilizando-se a estratégia de diminuição gradativa de temperatura, ou *touchdown*, iniciada a partir de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida por 20 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 63°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Nesta etapa, a temperatura de anelamento foi reduzida em 0,5°C a cada 3 ciclos. Após esses 20 ciclos, seguiram-se 30 ciclos adicionais de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos. Para o éxon 7, a reação de PCR foi realizada a partir da desnaturação a 95°C durante 15 minutos, seguida por 50 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Após os ciclos, seguiu-se a etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Quadro 1 - Sequência de *primers* utilizados nas reações de PCR e sequenciamento.

Região amplificada	Primers Direção Direta	Primers Direção Reversa	Fragmento (pb)
Éxons 2-3	tctcatgctggatccccact	agtcagaggaccaggtcctc	344
Éxons 4	tgctcttttaccatctac	atacgccaggcattgaagt	353
Éxons 5	ttcaactctgtctccttct	cagccctgtcgtctctccag	248
Éxon 6	gcctctgattcctcactgat	ttaacccctcctccagaga	181
Éxon 7	cttgccacaggtctcccaa	aggggtcagcggcaagcaga	237
Éxons 8-9	ttgggagtagatggagcct	agtgtagactggaaacttt	445
Éxon 10	caattgtaactgaaccatc	ggatgagaatggaatcctat	260
Éxon 11	agaccctctcactcatgtga	tgacgcacacctattgcaag	245

A reação de sequenciamento iniciou-se com etapa de purificação dos produtos de PCR. Nesta etapa, 5µL do produto de PCR foram purificados com a enzima ExoSap-IT (USA) por 15 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C. Na etapa de

seqüenciamento, foram utilizados o *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) de acordo com protocolo utilizado pelo serviço de seqüenciamento do IARC. Os produtos de PCR foram analisados pelo seqüenciador automático de 16 capilares (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Uma vez detectadas as mutações, estas foram avaliadas e comparadas com o banco de dados de mutações no *TP53*, disponibilizado pelo IARC. No caso de mutações descritas como germinativas, as análises foram repetidas utilizando DNA extraído de amostras de tecido não tumoral ou sangue periférico do mesmo paciente, quando disponível.

3.2.3 Imunoistoquímica

No estudo imunoistoquímico foram utilizados os protocolos estabelecidos na rotina do Departamento de Anatomia Patológica, para avaliação dos padrões de expressão das proteínas relacionadas ao complexo de adesão celular E-caderina/ β -catenina, ao sistema de reparo do DNA (MLH1, MSH2, PMS2, MSH6) e da proteína p53. As especificações dos antígenos, clones dos anticorpos primários, suas diluições e fabricantes empregados no estudo imunoistoquímico, estão descritas no Quadro 2.

Para este estudo, os cortes histológicos com espessura de 3 μ m dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas foram mantidos por 24 horas em estufa a 60°C. Em seguida a desparafinização foi realizada através de sucessivos banhos de xilol, etanol (100%, 95% e 70%) e lavagem com água corrente e destilada. A solução utilizada na etapa de recuperação antigênica variou de acordo com o antígeno em investigação: para todos os anticorpos, com exceção do PMS2, foi utilizada a solução

tampão de citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna[®], Nigro) destampada; para o anticorpo PMS2, foi utilizada a solução tampão Tris EDTA 1mM pH 9.0. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizada com H₂O₂ 3%, (água oxigenada 10 vol), seguido de lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10 mM pH 7.4. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em títulos pré-estabelecidos conforme descrito no Quadro 2, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Quadro 2 - Especificações dos antígenos, clones dos anticorpos primários, suas diluições e fabricantes empregados no estudo imunoistoquímico.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
p53	DO-7	1:100	DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca, cod # M7001
E-caderina	36	1:600	BD Transduction, cat# 610182, San Jose, CA
β-catenina	14	1:800	BD Transduction, EUA, cod # 610154
MLH1	G168-728	1:1000	BD Biosciences Pharmigen cat#51-1327GR, San Jose, CA, EUA
MSH2	G219-1129	1:1000	BD Pharmingen cat # 556349
MSH6	44/MSH6	1:100	BD Pharmingen cat # 610919
PMS2	A16-4	1:500	BD Pharmingen, cat # 556415

Na etapa seguinte, após lavagem com tampão PBS, ocorreu a incubação por 30 minutos, a 37°C, com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido), outra lavagem com tampão PBS, incubação com o NovoLink Polymer por 30 minutos a 37° C e lavagem com tampão PBS. Seguiu-se a incubação das lâminas em solução substrato: 100 mg% 3, 3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos

a 37°C, ao abrigo da luz. Em seguida, a lavagem em água corrente e destilada, contracoloração com hematoxilina de Harris, lavagem em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%) e água corrente e destilada. A desidratação dos cortes incluiu sucessivos banhos em etanol (80%, 95% e 100%), xilol e montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha).

As reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum e os resultados classificados de acordo com a categorização descrita para cada anticorpo.

E-caderina

Quanto à análise imunoistoquímica dos padrões de expressão da E-caderina, foram observados os seguintes aspectos: 1) a manutenção da expressão preservada na membrana (padrão similar ao observado em células não-neoplásicas), 2) perda parcial ou 3) perda total dessa expressão. Para fins estatísticos, tanto a perda parcial quanto total da expressão do marcador na membrana celular foram categorizadas como alterações na expressão fisiológica da proteína. A marcação citoplasmática da E-caderina não foi considerada.

β -catenina

Para a análise da β -catenina foram estabelecidos 4 grupos de acordo com os padrões de expressão: 1) perda total de expressão, 2) expressão exclusivamente na membrana, 3) expressão nuclear independente de outros sítios, e 4) expressão citoplasmática, sem expressão nuclear.

A intensidade da coloração não foi considerada neste sistema de gradação. Em relação à coloração citoplasmática/nuclear da β -catenina, os tumores foram considerados como positivos quando a imunorreatividade citoplasmática/nuclear para β -catenina pode ser detectada em qualquer das células tumorais. Para fins estatísticos, a expressão da β -catenina foi categorizada em apenas dois grupos: 1) expressão preservada na membrana celular (categorizada inicialmente como Grupo 2), e 2) expressão alterada (Grupos 1, 3 e 4).

MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2

Para a análise da expressão das proteínas do sistema de reparo do DNA (MMR), foi considerada apenas: 1) a presença ou 2) a ausência de imunorreatividade das proteínas nas células tumorais, mas não nas células não-neoplásicas ou estromais da mucosa normal adjacente. Os cortes histológicos que apresentaram ausência total de imunorreatividade não foram categorizados.

p53

Para este marcador, a imunorreatividade foi interpretada considerando a porcentagem das células neoplásicas apresentando imunocoloração acastanhada no núcleo celular. As categorias foram:

0) <1%

1) 1-10%

2) 11-50%

3) 51-90%

4) 91-100%

Para fins de análise estatística e melhor categorização, os resultados obtidos foram distribuídos em dois grupos, de acordo com os critérios previamente descritos na literatura: 1) casos onde a expressão nuclear ocorreu em quantidade superior a 10% das células imunocoradas e 2) quando a porcentagem de células com expressão nuclear foi inferior ou igual a 10%.

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As informações decorrentes da revisão dos prontuários médicos e os resultados obtidos da análise dos diversos marcadores foram registrados em planilha de dados Excel e a análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *Statistical Package for Social Sciences*, versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

As associações entre a expressão dos marcadores e as variáveis demográficas e clínico-patológicas foram verificadas através do teste de frequências do qui-quadrado e o teste exato de Fisher. As estimativas da probabilidade de sobrevida foram obtidas através da técnica de Kaplan-Meier. As curvas de probabilidade de sobrevida cumulativa foram comparadas pelo teste do log-rank. As estimativas do risco relativo para a morte (HR) ou os fatores prognósticos independentes foram obtidas através do modelo de regressão de Cox na técnica *stepwise (forward)*. O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes estatísticos ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA E DADOS DA AMOSTRA

4.1.1 Dados demográficos

No presente estudo, a idade dos pacientes variou entre 12-49 anos, sendo a média de $35,9 \pm 7,1$ anos e mediana de 36 anos. Dezenove (19,6%) pacientes tinham idade igual ou inferior a 30 anos ao diagnóstico. A Figura 3 representa a distribuição da idade dos pacientes em anos.

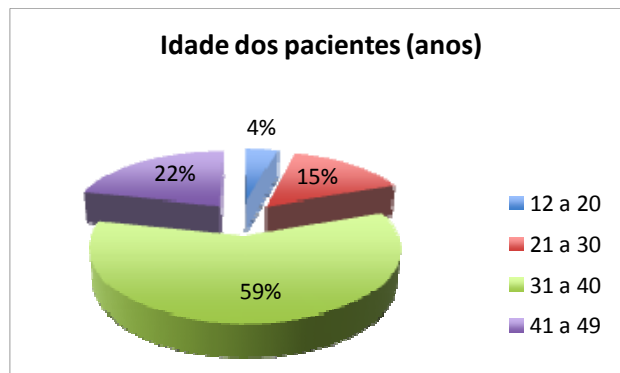


Figura 3 - Distribuição da idade dos pacientes em anos.

Dos 97 pacientes incluídos neste estudo, 56 (57,7%) eram do gênero masculino e 41 (42,3%) do gênero feminino (ver Tabela 1).

4.1.2 História pessoal patológica

As informações referentes aos antecedentes pessoais patológicos estavam relatadas nos prontuários médicos de 69 pacientes. Destes, 33 (47,8%) apresentaram antecedentes pessoais patológicos que incluíam histórico de diabetes (1,5%), obesidade (4,5%), doença do refluxo (10,6%) e etilismo (30,8%). (Tabela 1).

4.1.3 História familiar neoplásica

Em nossa casuística, 18/84 (21,4%) pacientes apresentaram história familiar neoplásica (Tabela 1), incluindo outros casos de tumores na família como o câncer gástrico (10,8%), colorretal (2,4%), mama (2,4%) e outros tumores (8,5%), como o câncer de próstata, renal, ósseo, no útero, ovário e bexiga.

4.1.4 Manifestações clínicas

As informações clínicas a respeito dos sinais/sintomas referidos pelos pacientes no momento do diagnóstico estavam disponíveis em 82/88 (93,2%) casos: 80,5% referiram dor epigástrica e/ou abdominal, anemia (15,1%), vômitos (22,8%), obstrução (10,6%), sangramento (11,8%) e perda ponderal (35,4%). (ver Tabela 1).

4.1.5 Estadiamento clínico e tratamento

Como descrito na Tabela 2, os dados referentes ao estadiamento clínico estavam disponíveis em aproximadamente 50% dos casos incluídos neste estudo. Destes casos, 50% apresentavam cT2, 78% eram cN0 e 91,8% eram cM0.

Noventa e dois pacientes (94,8%) foram submetidos ao exame de Endoscopia Digestiva alta (EDA). A média de diâmetro das lesões encontradas foi de 3,7cm. Dos

87 tumores avaliados por EDA, 43,7% estavam localizados na região do corpo gástrico e 34,5% no antro. Cerca de 11,5% dos tumores acometeram a região do cárdia. Ainda quanto à localização, 49% dos tumores estavam localizados na pequena curvatura e 6,4% ocuparam toda a circunferência do estômago (dados não incluídos nas Tabelas).

Em relação ao tratamento inicial (Tabela 2), o tratamento cirúrgico foi a alternativa terapêutica para 85,6% dos pacientes (83/97). A cirurgia com finalidade curativa foi realizada em 77,7% dos casos, e a gastrectomia total ocorreu em 52,1% dos casos com informações disponíveis. Em 74,2% dos casos foi realizada a linfadenectomia D2, e a morbidade ocorreu em 22/92 casos (23,9%).

4.1.6 Dados anátomo-patológicos e de sobrevida

Os dados referentes à histopatologia foram obtidos na revisão do laudo anátomo-patológico original e também das lâminas contendo os cortes histológicos, e estão descritos na Tabela 3. O estadiamento anátomo-patológico dos tumores foi categorizado de acordo com o sistema TNM da União Internacional para Controle do Câncer (SOBIN e WITTEKIND 2002) e foi avaliável em 94 casos. Quanto ao nível de infiltração da parede gástrica (pT), a maioria dos casos avaliáveis eram T3 (52,1%) e apenas 6 casos (6,4%) eram T4. O comprometimento linfonodal (pN) estava presente em 57,5% dos casos (54/93) e 21,3% apresentavam metástases a distância (pM). A citologia foi negativa em 39,3% dos casos.

Em relação ao tipo histológico, de acordo com a classificação de Laurén, 67 tumores foram classificados como tipo difuso (69,1%), 19 (19,6%) como tipo intestinal e 3 (3,1%) apresentavam tipo misto. Oito (8,2%) adenocarcinomas que não

preencheram os critérios para classificação em um ou outro tipo histológico, foram considerados não-classificados. De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, WHO), 42,3% dos casos foram classificados como carcinoma de células em anel de sinete e 41,2% dos casos não foram incluídos em nenhuma das categorias.

A invasão perineural estava presente em 49,5% (47/95) dos casos, 14% (13/93) dos casos apresentavam invasão vascular sanguínea e 45,3% (43/95) apresentavam invasão linfática. Cerca de 30% dos casos avaliáveis apresentaram recidiva.

Quanto ao seguimento clínico dos pacientes, 47,9% dos 97 pacientes avaliados encontravam-se vivos sem doença até a conclusão do presente estudo. O câncer gástrico foi a causa do óbito em 44,8% dos casos.

Tabela 1 - Descrição das variáveis clínicas e demográfica dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico em idade jovem.

VARIÁVEIS		N	CATEGORIAS	N(%)
	Gênero	97	M	56 (57,7)
			F	41 (42,3)
História Pessoal Patológica	História pessoal patológica	69	Não	36 (52,2)
			Sim	33 (47,8)
	HPP Diabetes	66	Não	65 (98,5)
			Sim	1 (1,5)
	HPP Obesidade	89	Não	85 (95,5)
			Sim	4 (4,5)
História Familiar Neoplásica	HPP Doença do Refluxo	66	Não	59 (89,4)
			Sim	7 (10,6)
	HPP Etilismo	65	Não	45 (69,2)
			Sim	20 (30,8)
	História Familiar Neoplásica	84	Não	66 (78,6)
			Sim	18 (21,4)
	HF Câncer Gástrico	83	Não	74 (89,2)
			Sim	9 (10,8)
Manifestações Clínicas	HF Câncer Colorretal	82	Não	80 (97,6)
			Sim	2 (2,4)
	HF Mama	82	Não	80 (97,6)
			Mama, subtipo não especificado	2 (2,4)
	HF Outros tumores	82	Não	75 (91,5)
			Sim	7 (8,5)
	Manifestações Clínicas	88	Não	6 (6,8)
			Sim	82 (93,2)
Manifestações Clínicas	Dor	87	Não	17 (19,5)
			Sim	70 (80,5)
	Anemia	86	Não	73 (84,9)
			Sim	13 (15,1)
	Vômitos	79	Não	61 (77,2)
			Sim	18 (22,8)
	Obstrução	85	Não	76 (89,4)
			Sim	9 (10,6)
Manifestações Clínicas	Sangramento	85	Não	75 (88,2)
			Sim	10 (11,8)
	Perda Ponderal	82	Não	53 (64,6)
			Sim <10%	13 (15,9)
			Sim >10%	16 (19,5)

Tabela 2 - Descrição das variáveis referentes ao estadiamento clínico, tratamento e morbidade dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico em idade jovem.

VARIÁVEIS	N	CATEGORIAS	N (%)
cT	40	1	7 (17,5)
		2	20 (50,0)
		3	13 (32,5)
cN	41	negativo	32 (78,0)
		positivo	9 (22,0)
cM	49	0	45 (91,8)
		1	4 (8,2)
Tratamento inicial	97	QT neoadjuvante	2 (2,0)
		Cirurgia	83 (85,6)
		QT paliativa	3 (3,1)
		LE não terapêutica ou Cirurgia paliativa seguida de QT paliativa	9 (9,3)
Intuito da Cirurgia	94	Curativo	73 (77,7)
		Paliativo	21 (22,3)
Tipo Cirurgia	94	Gastrectomia total	49 (52,1)
		Gastrectomia subtotal	41 (43,6)
		Degastrectomia	3 (3,2)
		Laparotomia não terapêutica	1 (1,1)
Linfadenectomia	93	Não realizada	2 (2,1)
		D1	9 (9,7)
		D2	69 (74,2)
		D3	13 (14,0)
Morbidade	92	Não	70 (76,1)
		Sim	22 (23,9)

Tabela 3 - Descrição dos dados anátomo-patológicos, recidiva e sobrevida dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico em idade jovem.

VARIÁVEIS	N	CATEGORIAS	N (%)
pT	94	1	19 (20,2)
		2	20 (21,3)
		3	49 (52,1)
		4	6 (6,4)
pN	94	0	40 (42,5)
		1	31 (33,0)
		2	18 (19,2)
		3	5 (5,3)
pM	94	0	74 (78,7)
		1	20 (21,3)
Citologia	89	Negativa	35 (39,3)
		Positiva	3 (3,4)
		Suspeita	2 (2,2)
		Ignorada	49 (55,1)
Tipo histológico Laurén	97	Difuso	67 (69,1)
		Intestinal	19 (19,6)
		Misto	3 (3,1)
		Não classificado	8 (8,2)
Tipo histológico OMS	97	Tubular	12 (12,4)
		Anel de sinete	41 (42,3)
		Indiferenciado	1 (1,0)
		Mucinoso	3 (3,1)
		Não classificado	40 (41,2)
Grau histológico	73	1	2 (2,7)
		2	12 (16,4)
		3	59 (80,9)
Invasão perineural	95	Não	48 (50,5)
		Sim	47 (49,5)
Invasão vascular sanguínea	93	Não	80 (86,0)
		Sim	13 (14,0)
Invasão linfática	95	Não	52 (54,7)
		Sim	43 (45,3)
Recidiva	91	Não	50 (54,9)
		Sim	27 (29,7)
		Ignorado	14 (15,4)
Status	97	Vivo sem doença	46 (47,9)
		Vivo com doença	4 (4,2)
		Morto pelo câncer	43 (44,8)
		Morto outra causa	3 (3,1)

4.2 ANÁLISE IMUNISTOQUÍMICA

4.2.1 Marcadores do complexo de adesão celular

A frequência dos casos em relação aos padrões de expressão da E-caderina pode ser observado na Figura 4. Dentre os 77 casos avaliáveis para a expressão deste marcador, 35 tumores (45,5%) apresentaram expressão preservada na membrana celular e 42 (54,5%) apresentaram expressão alterada do marcador, incluindo ausência de expressão (23,3%) e expressão reduzida (31,2%).

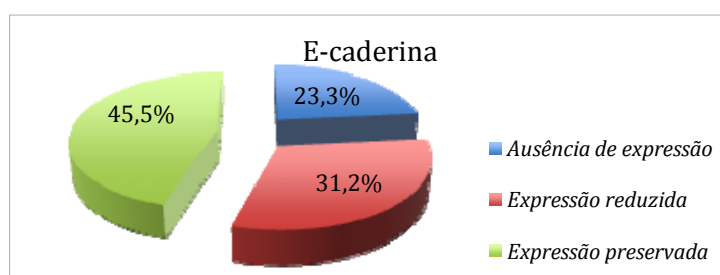


Figura 4 - Perfil dos padrões de expressão da E-caderina nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.

Em relação à expressão imunoistoquímica de β -catenina (Figura 5), 35 dos 78 casos avaliáveis (44,9%) apresentaram expressão preservada. Dentre os casos com expressão alterada (55,1%), foram incluídos casos com perda total da expressão do marcador (14,1%), casos apresentando marcação nuclear independente de outros compartimentos celulares (24,3%) e casos que apresentaram expressão citoplasmática sem expressão nuclear (16,7%).

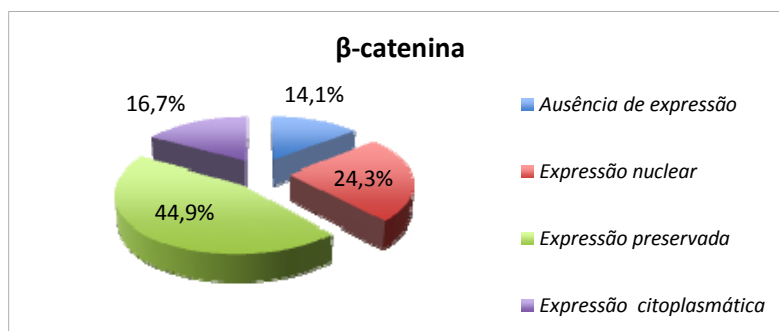


Figura 5 - Perfil dos padrões de expressão da β -catenina nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.

Casos representativos das expressões dos marcadores de adesão celular podem ser observados nas Figuras 6 e 7.

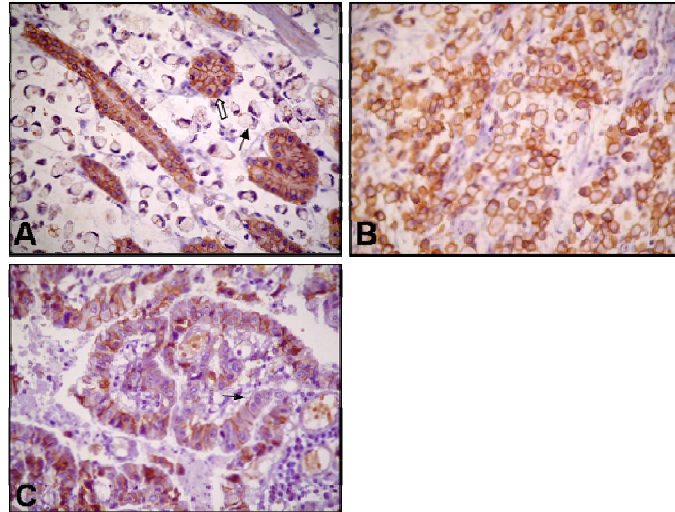


Figura 6 – Representação dos padrões de expressão da E-caderina nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem (x400). **A)** Adenocarcinoma gástrico de tipo difuso apresentando perda da expressão de E-caderina na membrana celular ($\rightarrow$), e a expressão preservada pode ser observada nas células das glândulas normais adjacentes ($\Rightarrow$). **B)** Adenocarcinoma gástrico de tipo difuso com expressão preservada na membrana celular. **C)** Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal com perda parcial na membrana celular.

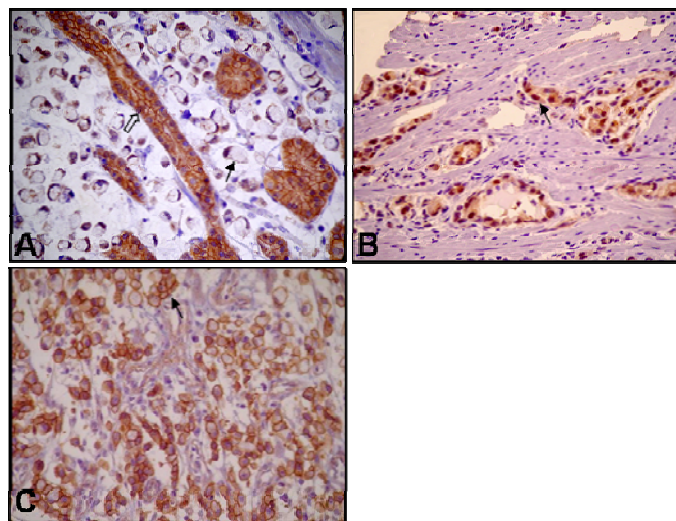


Figura 7 – Representação dos padrões de expressão da β -catenina nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem (x400). **A)** Perda da expressão de β -catenina em adenocarcinoma gástrico de tipo difuso ($\rightarrow$) comparada com a expressão preservada na membrana celular em glândulas normais ($\Rightarrow$). **B)** Marcação nuclear com distribuição citoplasmática da β -catenina em células neoplásicas. **C)** Adenocarcinoma gástrico de tipo difuso apresentando expressão preservada de β -catenina na membrana.

4.2.2 Marcadores do sistema de reparo do DNA

Para os marcadores MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6, 24 casos apresentaram ausência total de imunorreatividade em todo o corte histológico, incluindo as células não-neoplásicas, e conforme critério de exclusão deste estudo, estes casos não foram considerados avaliáveis. Dentre os 73 casos avaliáveis, dois casos (2,7%) apresentaram perda de MSH2 e MSH6 (Figura 8).

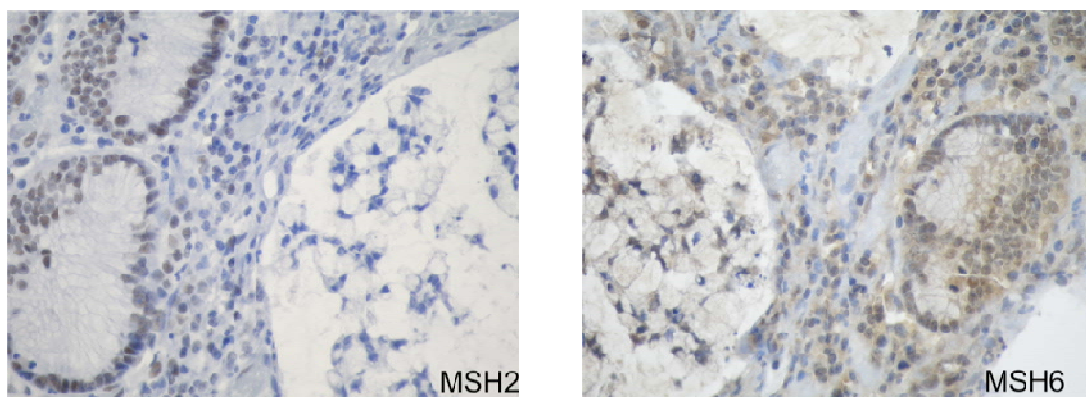


Figura 8 - Representação da perda de expressão de MSH2 e MSH6 em adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem.

4.2.3 p53

Para este marcador, 78/97 casos foram considerados avaliáveis. De acordo com o critério utilizado para a categorização dos resultados, 38 (48,7%) casos apresentaram marcação nuclear em $\leq 10\%$ das células neoplásicas e 40 casos (51,3%) apresentaram positividade em porcentagem superior a 10% das células neoplásicas.

A Figura 9 representa a expressão imunoistoquímica da proteína p53 nos adenocarcinomas gástricos.

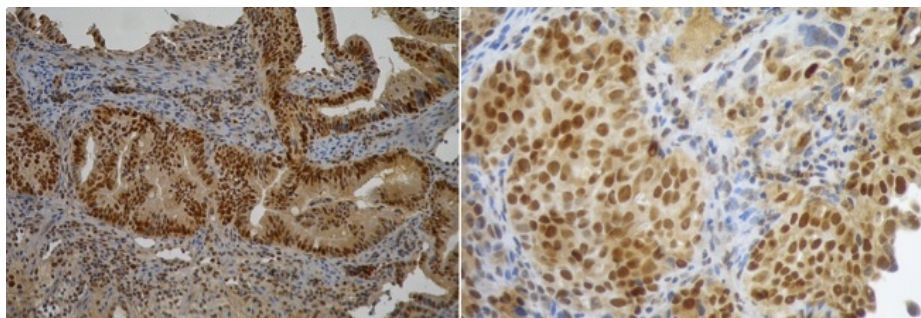


Figura 9 - Representação da expressão da proteína p53 em adenocarcinoma gástrico de paciente diagnosticado em idade jovem.

4.3 ANÁLISE MOLECULAR

Dos 97 casos de adenocarcinomas gástricos incluídos neste estudo, apenas 18 casos possuíam material congelado disponível no Banco de Material Biológico. Para os outros casos, o DNA genômico foi extraído de material embebido em parafina. Quinze casos foram excluídos da análise molecular por não apresentarem qualidade suficiente do DNA genômico proveniente de amostras de material embebido em parafina. Dos 82 casos que foram submetidos à análise molecular para detecção de mutações no gene *TP53*, 44 (53,7%) apresentaram DNA com excelente qualidade e foram submetidos ao seqüenciamento completo. Em 38 casos (46,3%) foi possível realizar apenas o seqüenciamento parcial do gene, ou seja, das regiões chamadas de “hotspots”; porém, todos os casos foram submetidos ao seqüenciamento do éxon 10 para detecção da mutação no códon 337 (p.R337H).

As mutações detectadas nestas amostras incluíram mutações descritas tanto como mutações somáticas quanto germinativas no Banco de dados de mutações no gene *TP53* do IARC (<http://www-p53.iarc.fr/index.html>). Treze mutações foram detectadas em onze casos. As mutações *silent* foram detectadas nos códons 216, 289 e 355. As mutações *missense*, incluíram mutações nos códons 175, 274, 301, 365, 380, 385 e 337, como descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Descrição das mutações no gene *TP53* detectadas nas amostras de adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.

Quantidade de mutações	Número do códon	Descrição genômica	Descrição proteína
3	175	g.12512G>A	p.R175H
1	216	g.12717G>A	p.V216V
1	274	g.13800G>A	p.V274I
1	289	g.13847C>T	p.L289L
1	301	g.14570C>T	p.P301S
1	337	g.16901G>A	p.R337H
1	355	g.16956T>A	p.A355A
1	365	g.16985A>G	p.H365R
1	380	g.17947C>T	p.H380Y
2	385	g.18651T>C	p.F385L

4.3.1 Características clínico-patológicas dos casos apresentando mutações no gene *TP53*.

As características clínico-patológicas dos casos apresentando mutações no gene *TP53* foram resumidas na Tabela 5.

Neste grupo, a idade dos pacientes variou de 12 a 40 anos de idade, sendo 07 do sexo masculino e 04 do sexo feminino. Os antecedentes pessoais patológicos foram etilismo (2 pacientes) e obesidade (1 paciente). De acordo com os prontuários médicos, dois pacientes apresentaram história familiar de câncer: 1) presença de câncer de próstata, útero e colorretal em parentes de primeiro e segundo grau, e 2) câncer gástrico em parentes de segundo e terceiro grau.

As manifestações clínicas descritas no prontuário que foram relatadas por estes pacientes incluíam dor, vômitos, obstrução, sangramento e perda de peso. A maioria das lesões estava localizada na região do antro. Nenhum paciente foi submetido à quimioterapia neoadjuvante. De acordo com o estadiamento TNM, predominaram os tumores com maior nível de infiltração (pT), comprometimento

linfonodal (pN) e metástases a distância (pM). A maioria dos tumores foi classificada como sendo de tipo difuso de Laurén (7/11), predominantemente pouco diferenciados ou indiferenciados, apresentando invasão perineural (IPN) e invasão vascular linfática (IVL). Em seis destes pacientes, o câncer gástrico foi a causa do óbito.

Tabela 5 - Características clínico-patológicas dos casos apresentando mutações no gene *TP53*.

GCM	TP53 MUT	Sexo	Idade	Antecedentes pessoais patológicos	História familiar neoplásica	Manifestações Clínicas	Local lesão	QT NEO	p T	p N	p M	pM1 Local	Classificação Laurén	pGrau	pIPN	pIVS	pIVL	Status
7	A355A	mas	35	etilismo	colorretal, próstata e útero	dor, perda de peso (<10%)	corpo	não	1	0	0		difuso	3	não	não	não	VSD
45	H365R	mas	34			dor, perda de peso (<10%)		não	2	1	0		não classificável	3	não	não	não	MPC
21	H380Y	mas	32	obesidade		dor	corpo	não	3	2	1	Peritônio	difuso	3	sim	não	sim	MPC
61	F385L	mas	31	etilismo		dor	antro	não	2	0	0		intestinal	1	sim	não	não	MPC
4	R175H	mas	19			vômitos, obstrução	cárdia	não	2	1	0		intestinal	3	sim	sim	sim	VSD
18	R175H	mas	36				linite	não	3	3	1	Peritônio	difuso	3	sim	sim	sim	MPC
89	R175H	fem	40		estômago		linite	não	3	3	0		difuso	3	sim	não	não	MPC
9	V216V, F385L	fem	33			dor	corpo	não	2	0	0		difuso	3	não	não	não	VSD
8	V274I	fem	36			dor, vômitos, perda de peso (<10%)	linite	não	3	1	1	Fígado	difuso	3	sim	não	sim	VCD
51	L289L	fem	37			dor, vômitos, perda de peso (>10%)	corpo	não	1	0	0		difuso	3	não	não	não	VSD
71	P301S, R337H	mas	12			dor, vômitos, obstrução, perda de peso (>10%)	cárdia	não	4	2	1		intestinal	2	sim	não	sim	MPC

MUT = mutação; QT neo= quimioterapia neoadjuvante; pT = nível de infiltração; pN = metástases em linfonodos; pM= metástases a distância; pIPN = invasão perineural; pIVS= invasão vascular sanguínea; pIVL= invasão vascular linfática; VSD = vivo sem doença; MPC = morte pelo câncer; VCD= vivo com doença

4.3.2 Relato de caso: Presença da mutação p.R337H no gene *TP53* em carcinoma gástrico de paciente de 12 anos.

Relatamos o caso de um dos pacientes, M.G.P, sexo masculino, 12 anos, com diagnóstico de câncer gástrico metastático. O estadió do tumor, de acordo com o prontuário médico era T4N2M1.

De acordo com o estudo imunoistoquímico, nenhuma alteração foi observada nas amostras tumorais para os marcadores relacionados à adesão celular (E-caderina e β -catenina) ou aos genes de reparo do DNA (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2). Porém, as amostras apresentaram marcação nuclear para p53. A partir deste resultado, o DNA genômico extraído das amostras foi submetido à análise molecular para detecção de mutações no gene *TP53*. Foi detectada a presença da mutação p.R337H no gene *TP53* (ACHATZ et al. 2007; PALMERO et al. 2008) e do haplótipo caracterizado pelo alelo T do SNP28 (rs9894946) (GARRITANO 2010). O perfil de tumores nas famílias que apresentam a mutação p.R337H é similar ao perfil apresentado pelas famílias Li-Fraumeni (LFS) ou Li-Fraumeni-like (LFL).

Assim, a história familiar mais detalhada foi obtida através de entrevista com mãe e um dos irmãos do probando, que compareceram ao Departamento de Oncogenética do Hospital AC Camargo após serem convocados para aconselhamento genético. O teste genético para detecção da p.R337H foi oferecido aos familiares de 1º grau para verificar a ocorrência da alteração em outros membros da família. Após assinatura do consentimento informado, amostra de sangue dos três familiares foi coletada. A mutação p.R337H e o SNP28 não foram detectados nas amostras da mãe e do irmão do probando. Porém, a amostra paterna apresentou tanto a mutação p.R337H quanto o haplótipo mutante, confirmando que o pai é portador

assintomático da Síndrome de Li-Fraumeni. A detecção da mutação p.R337H em um paciente de 12 anos de idade com câncer gástrico foi descrito e submetido à publicação (Anexo 5).

4.4 ASSOCIAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E EXPRESSÃO DOS MARCADORES

No presente estudo, não houve associação estatisticamente significativa entre as variáveis estudadas como: presença de mutações no gene *TP53*, história pessoal patológica, história familiar neoplásica, profundidade da invasão (pT), comprometimento linfonodal (pN), metástase à distância (pM), citologia, tipo histológico de acordo com a classificação de Laurén e da OMS e invasão vascular sanguínea (IVS) ($p > 0,05$ para todas associações. Estes dados não foram descritos em tabelas).

Quanto à expressão imunoistoquímica das proteínas nas amostras de adenocarcinomas gástricos, foi observada a associação estatisticamente significativa entre a expressão da E-caderina e da β -catenina ($p < 0,001$), e entre a expressão de p53 com a presença de invasão perineural ($p = 0,005$), como demonstrado nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Como descrito previamente em Material e Métodos, para fins estatísticos, a expressão imunoistoquímica da E-caderina e da β -catenina foi categorizada em (1) expressão preservada na membrana celular e (2) expressão alterada.

Tabela 6 - Associação entre a expressão imunoistoquímica da E-caderina e da β -catenina nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.

		E-caderina		<i>p</i> -valor
		Expressão alterada	Expressão preservada	
β -catenina	Expressão alterada	38 (90,5%)	5 (14,3%)	<0,001
	Expressão preservada	4 (9,5%)	30 (85,7%)	

Como observado na Tabela 6, a alteração na expressão da E-caderina ocorreu predominantemente em casos que também apresentaram alteração na expressão da β -catenina. Dentre os 42 casos que apresentaram alteração na expressão da E-caderina, 38 (90,5%) também apresentaram expressão alterada da β -catenina. Desses 38 casos com expressão alterada de β -catenina, 15 (39,5%) apresentaram marcação nuclear (dado não demonstrado nesta tabela).

A associação entre a expressão da proteína p53 e a presença de invasão perineural nos adenocarcinomas gástricos está descrita na Tabela 7. A presença de invasão perineural foi mais freqüente nos casos onde havia expressão nuclear de p53 em maior quantidade de células (>10%) ($p=0,005$).

Tabela 7 - Associação entre a expressão imunoistoquímica da proteína p53 e a presença de invasão perineural nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.

		p53		<i>p</i> -valor
		$\leq 10\%$	$> 10\%$	
Invasão perineural	Não	24 (64,9%)	12 (30,8%)	0,005
	Sim	13 (35,1%)	27 (69,2%)	

4.4.1 Associação entre a análise imunoistoquímica dos marcadores e a análise molecular do gene *TP53* pelo seqüenciamento direto nos adenocarcinomas gástricos

Os resultados das associações entre a expressão imunoistoquímica dos marcadores e análise molecular do gene *TP53* estão descritas na Tabela 8. Nenhuma das associações foi estatisticamente significativa ($p>0,05$), porém foi observado que dentre os casos que apresentaram mutações no gene *TP53*, 72,7% apresentavam expressão alterada de E-caderina e 54,7% apresentaram expressão alterada da β -catenina. Em relação à expressão alterada da β -catenina, 5/6 (83,4%) casos apresentaram marcação nuclear do marcador. A comparação dos dados referentes à expressão imunoistoquímica da proteína p53 e a análise molecular do gene *TP53* pelo método do seqüenciamento direto mostrou que 72,7% dos casos com mutações no gene *TP53*, também apresentaram marcação nuclear da proteína p53 em quantidade superior a 10% das células neoplásicas.

Tabela 8 - Associação entre a expressão imunoistoquímica dos marcadores e análise molecular do gene *TP53* pelo sequenciamento direto nos adenocarcinomas gástricos diagnosticados em idade jovem.

VARIÁVEIS	N	CATEGORIAS	SEQÜÊNCIA DO GENE <i>TP53</i>		<i>p</i> -valor
			WT	MUT	
			n (%)	n (%)	
E-caderina	70	Expressão alterada	29 (49,2)	8 (72,7)	0,19
		Expressão preservada	30 (50,8)	3 (27,3)	
β-catenina.	71	Expressão alterada	32 (53,3)	6 (54,5)	1,00
		Expressão preservada	28 (46,7)	5 (45,5)	
p53	71	≤10%	30 (50%)	3 (27,3)	0,20
		>10%	30 (50%)	8 (72,7)	

4.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA DOS PACIENTES

4.5.1 Sobrevida global (SG)

O seguimento clínico dos pacientes para a análise de sobrevida global (SG) foi considerado a partir da data do tratamento inicial até a data do óbito ou da última consulta, dentro do período do presente estudo. Neste período, 50 pacientes estavam vivos e 46 morreram, sendo que destas 46 mortes, 93,5% foram causadas por câncer e apenas 3 (6,5%) foram por outras causas. O período de seguimento clínico variou de 6 dias a 307 meses (média de 63 meses).

A análise da sobrevida global em cinco (60 meses) e dez anos (120 meses) dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem foi

calculada para as variáveis clínico-patológicas (Tabelas 9 e 10) e expressão dos marcadores (Tabelas 11).

4.5.2 Sobrevida global em relação às variáveis clínico-patológicas e expressão dos marcadores

Como descrito na Tabela 9, a SG dos pacientes não diferiu em relação à presença de mutações no gene *TP53* ($p=0,84$), gênero ($p=0,49$), história pessoal patológica ($p=0,50$), história familiar neoplásica ($p=0,95$) e a presença de manifestações clínicas ($p=0,38$). Pacientes submetidos à gastrectomia subtotal apresentaram melhores taxas de sobrevida em 10 anos (53,3%). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,003$). Pacientes submetidos à linfadenectomia D2 apresentaram melhores taxas de sobrevida tanto em dez anos ($p<0,001$). Os pacientes que tiveram tratamento adjuvante apresentaram menores taxas de sobrevida em dez anos ($p=0,01$).

A Tabela 10 descreve os dados de SG dos pacientes em relação aos dados patológicos. As variáveis pT, pN e pM foram significativas no cálculo da SG, diminuindo a probabilidade de sobrevida dos pacientes proporcionalmente: 1) ao aumento do nível de infiltração do adenocarcinoma gástrico, 2) ao número de linfonodos comprometidos e 3) à presença de metástases a distância ($p<0,001$).

As classificações histológicas de Laurén e da OMS não mostraram associações significativas na análise univariada em relação à sobrevida global dos pacientes. Observamos associações estatisticamente significativas das análises entre a SG dos pacientes e as variáveis invasão perineural ($p<0,001$) e invasão vascular linfática ($p=0,001$). As variáveis grau histológico ($p=0,60$) e invasão vascular

sanguínea ($p=0,54$) não mostraram associações significativas na análise univariada em relação à sobrevida global em dez anos dos pacientes.

As expressões dos marcadores E-caderina ($p=0,24$), β -catenina ($p=0,73$) e p53 ($p=0,79$) não mostraram associação significativa com a taxa de SG dos pacientes (Tabela 11).

Para as variáveis significativas nas análises de sobrevida global, as curvas de sobrevida estão representadas nas Figuras de 10 a 17.

Tabela 9 - Sobrevida global dos pacientes em relação às variáveis clínicas e mutações no gene *TP53*.

Variável	N	Categoria	Sobrevida Global (%)		p-valor
			5 anos (%)	10 anos (%)	
Mutações gene <i>TP53</i>	68	WT	56,6	48,3	0,84
	10	MUT	70,0	46,7	
Gênero	53	M	54,8	39,2	0,49
	40	F	57,3	53,9	
História pessoal patológica	33	Não	63,9	53,9	0,50
	32	Sim	71,9	60,4	
História familiar neoplásica	63	Não	59,2	52,9	0,95
	18	Sim	62,7	44,8	
Manifestações clínicas	6	Não	83,3	83,3	0,38
	79	Sim	58,1	47,3	
Tipo cirurgia	49	Gastrectomia total	48,7	41,8	0,003
	40	Gastrectomia subtotal	63,0	53,3	
	3	Degastrectomia	66,7	0,0	
	1	Laparotomia não terapêutica	0,0	0,0	
	2	Não realizada	0,0	0,0	
Linfadenectomia	9	D1	14,8	14,8	<0,001
	68	D2	66,9	53,3	
	13	D3	38,5	38,5	
Adjuvância	52	Não	75,5	66,9	0,01
	27	Sim	46,6	23,2	

Tabela 10 - Sobrevida global dos pacientes em relação às variáveis clínico-patológicas.

Variável	n	Categoria	Sobrevida Global (%)		p-valor
			5 anos (%)	10 anos (%)	
pT	19	1	100,0	100,0	<0,001
	20	2	84,1	58,9	
	48	3	33,8	25,8	
	5	4	0,0	0,0	
pN	40	0	86,2	77,5	<0,001
	30	1	55,1	35,7	
	17	2	7,1	0,0	
	5	3	0,0	0,0	
pM	73	0	69,9	57,0	<0,001
	19	1	6,1	6,1	
Classificação histológica Laurén	64	Difuso	51,7	46,1	0,75
	18	Intestinal	70,8	49,6	
	3	Misto	33,3	33,3	
	8	Não classificado	62,5	41,7	
Classificação histológica OMS	11	Tubular	60,6	45,5	0,07
	39	Células em anel de sinete	74,2	59,3	
	3	Mucinoso	66,7	66,7	
	2	Outros	50,0	50,0	
	37	Não-classificados	36,7	29,3	
Grau histológico	2	1	0,0	0,0	0,60
	11	2	72,7	62,3	
	58	3	50,5	44,6	
Invasão perineural	47	Não	77,3	67,7	<0,001
	46	Sim	36,5	26,7	
Invasão vascular sanguínea	78	Não	58,3	47,6	0,54
	13	Sim	46,2	38,5	
Invasão linfática	52	Não	72,8	61,3	0,001
	41	Sim	35,9	28,2	

Tabela 11 - Sobrevida global dos pacientes em relação à expressão imunoistoquímica dos marcadores.

Variável	n	Categoria	Sobrevida Global (%)		p-valor
			5 anos (%)	10 anos (%)	
E-caderina	42	Expressão alterada	60,9	50,7	0,24
	31	Expressão preservada	45,1	37,6	
β -catenina	42	Expressão alterada	55,8	42,5	0,73
	32	Expressão preservada	53,8	53,8	
p53	36	$\leq 10\%$	60,2	41,5	0,79
	38	$> 10\%$	44,9	40,9	

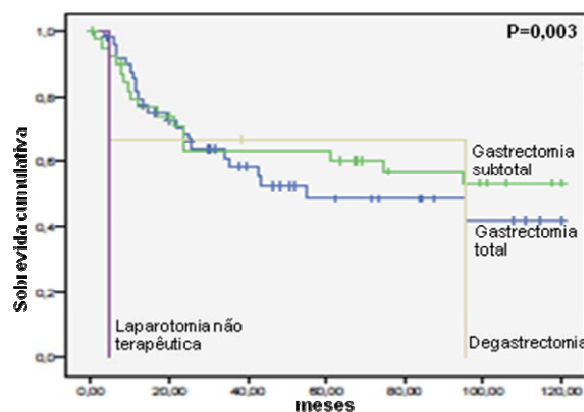


Figura 10 – Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação ao tipo de cirurgia.

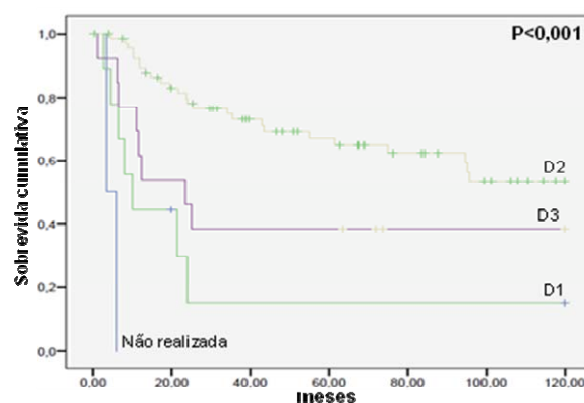


Figura 11 – Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação à linfadenectomia.

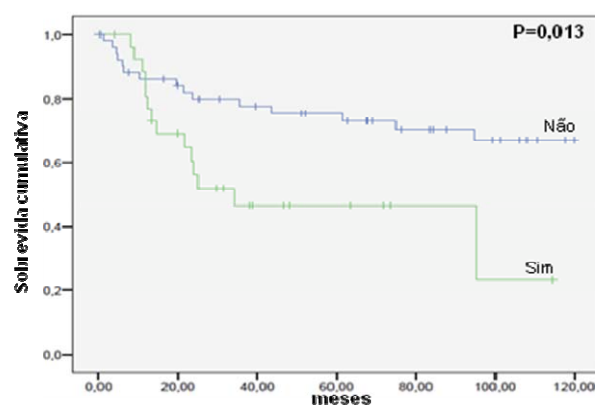


Figura 12 – Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em ao relação ao tratamento adjuvante.

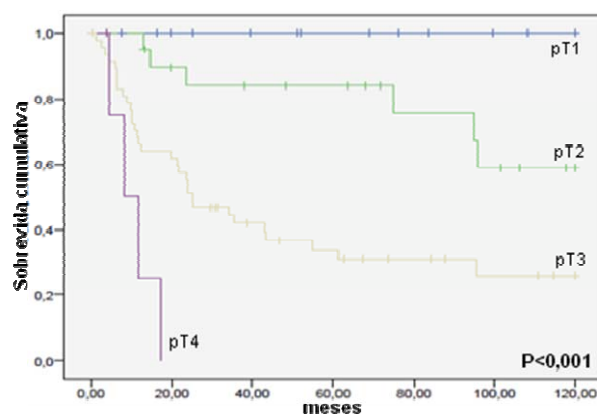


Figura 13 – Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação ao pT.

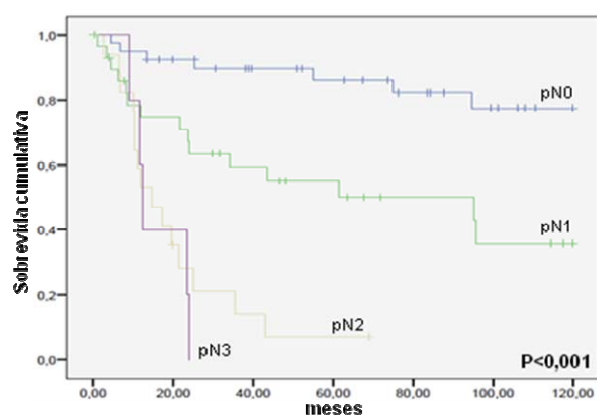


Figura 14 – Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação ao pN.

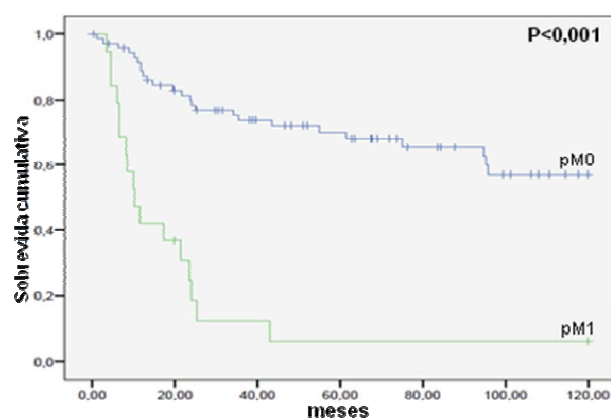


Figura 15 – Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação à pM.

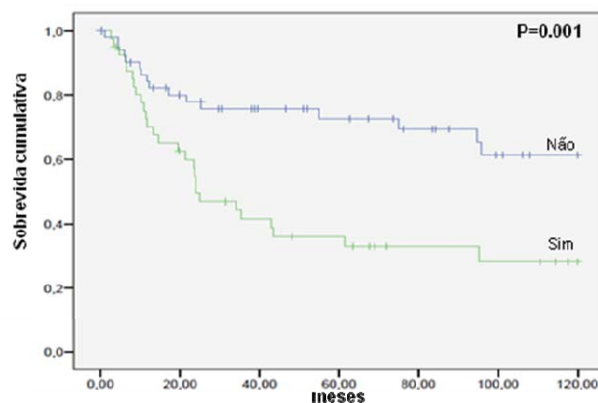


Figura 16 – Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação à invasão perineural.

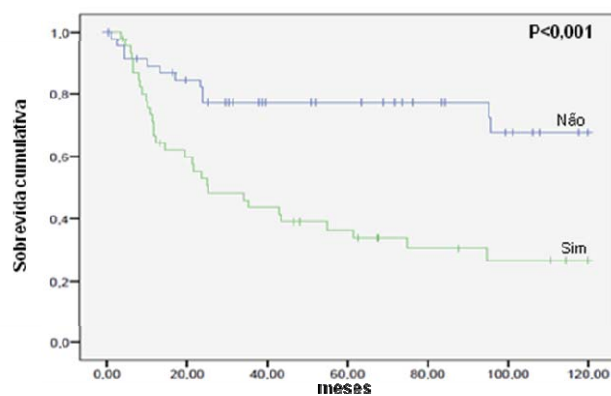


Figura 17 – Sobrevida global dos pacientes adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade jovem em relação à invasão linfática.

4.5.3 Análise Multivariada

Na análise multivariada, as variáveis identificadas como fatores de risco para óbito foram pT ($p=0,015$) e pN ($0,008$), pelo modelo de Cox ajustado pela idade. Estes dados foram apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Fatores de risco para óbito em 5 anos de acordo com o modelo de riscos proporcionais de Cox. Modelo ajustado compulsoriamente pela idade.

VARIÁVEL	CATEGORIAS	N	HR (*)	IC95% (HR)	p-valor
pT	pT1 + pT2	39	1,0	Referência	0,015
	pT3 + pT4	53	3,6	1,3 – 8,9	
pN	Negativo	40	1,0	Referência	0,008
	Positivo	52	3,3	1,4 – 8,0	
Idade	(variável contínua)	92	1,01	0,9 – 1,1	0,790

(*) Total de casos considerados na análise = 92. Número de eventos = 42.

Como observado na Tabela 12, no modelo de Cox ajustado pela idade, apenas as variáveis relacionadas ao estadiamento permaneceram como fator de risco para óbito. Os pacientes apresentando adenocarcinoma gástrico com maior nível de infiltração (pT3 e pT4) apresentaram risco de óbito aumentado (3,6x) comparado aos pacientes com tumores com menor pT (pT1 e pT2) ($p=0,015$). O comprometimento linfonodal (pN) também aumenta o risco de óbito (3,3x) ($p=0,008$).

5 DISCUSSÃO

O câncer gástrico é uma das principais causas de óbito por câncer no mundo e no Brasil é uma das neoplasias com maior incidência. Apesar dos avanços nos métodos diagnósticos, técnicas cirúrgicas e terapias adjuvantes, a sobrevida dos pacientes permanece abaixo da satisfatória.

O adenocarcinoma gástrico representa cerca de 90% das neoplasias gástricas e ocorre predominantemente em pacientes em idade mais avançada (FUJIMOTO et al. 1994). O desenvolvimento desta neoplasia parece resultar de uma combinação de fatores ambientais e o acúmulo de alterações genéticas específicas devido ao aumento da instabilidade genética (MILNE et al. 2006). Além disso, apresenta um prognóstico dependente de variáveis ligadas ao paciente, ao tratamento e a biologia do tumor (WERNER et al. 2001; ALLGAYER 2003; LEE et al. 2003).

Dois a quinze por cento dos pacientes diagnosticados com câncer gástrico têm idade inferior a 45 anos, sendo que esses casos são definidos como câncer gástrico em idade jovem (CARVALHO et al. 2004; MILNE et al. 2006; LLANOS et al. 2006; SANTORO et al. 2007). De acordo com estudos recentes, esses pacientes parecem desenvolver carcinomas gástricos com um perfil genético molecular diferente do perfil dos tumores esporádicos apresentados por pacientes em idade mais avançada (LAUREN 1965; CARVALHO et al. 2004; MILNE et al. 2006; BUFFART et al. 2007). Em pacientes jovens, o papel das alterações genéticas é maior que em pacientes com idade mais avançada, e com menor impacto dos carcinógenos ambientais (MILNE et al. 2009).

Muitos estudos têm avaliado as características epidemiológicas e clínico-patológicas, incluindo fatores de risco, em pacientes mais velhos. Entretanto, não há muitos estudos sobre o câncer gástrico em pacientes jovens e sobretudo, as casuísticas apresentadas são pequenas, dificultando as análises e conclusões mais consistentes. Os resultados apresentados por esses estudos são muito variáveis, o que poderia ser devido a um *bias* ou ao baixo poder estatístico (FUJIMOTO et al. 1994; THEUER et al. 1996; MEDINA-FRANCO et al. 2000; CARVALHO et al. 2004; MILNE et al. 2006; LLANOS et al. 2006; SANTORO et al. 2007; ALSTON et al. 2008).

Recentemente, um grupo avaliou dados epidemiológicos e fatores de risco em 3.242 pacientes com câncer gástrico com idade de 18 a 45 anos (CHUNG et al. 2010). De acordo com os resultados apresentados, os fatores hormonais (associados com fatores reprodutivos) apresentaram maior associação com a carcinogênese gástrica em mulheres, enquanto que nos pacientes homens houve maior associação com os fatores ambientais.

Ainda há controvérsias a respeito da carcinogênese gástrica em pacientes com idade jovem. Estudos comparativos têm demonstrado que pacientes jovens apresentam doença mais agressiva e um prognóstico mais pobre (LAUREN 1965; TSO et al. 1987), além da frequência elevada de tumores maiores, mais infiltrativos e lesões menos diferenciadas neste grupo de pacientes (TSO et al. 1987; MAEHARA et al. 1996; RUGGE et al. 2000). Muitos estudos têm relatado que as características clínico-patológicas e biológicas predominantes em pacientes jovens com câncer gástrico são: gênero feminino, tumores com localização proximal, infiltrativos, de crescimento difuso; frequências elevadas de tumores de tipo histológico

indiferenciado, diagnóstico tardio, rápida progressão, comprometimento linfonodal freqüente e um prognóstico pobre (NAKAMURA et al. 1999; EGUCHI et al. 1999; LIM et al. 2003; KIM et al. 2003)

Um estudo retrospectivo publicado pelo nosso grupo avaliou uma série de pacientes com adenocarcinoma gástrico, dividida em dois grupos (≤ 40 anos e > 40 anos) com o objetivo de comparar as características clínico-patológicas, a expressão de marcadores relacionados à adesão celular e diferenciação, e sobrevida global apresentadas pelos dois grupos. Os resultados mostraram diferenças significativas entre os grupos em relação aos parâmetros avaliados. Embora o grupo de pacientes jovens tenha apresentado maior freqüência de tumores gástricos de tipo difuso, foi observada uma menor freqüência de alterações na expressão dos marcadores biológicos relacionados à adesão celular e diferenciação gástrica. Além disso, estes pacientes apresentaram melhores taxas de sobrevida global. Esses resultados corroboram a hipótese de que os pacientes jovens desenvolvem carcinomas por vias genéticas distintas em comparação ao pacientes com tumores gástrico em idade mais avançada (SILVA et al. 2008) (Anexo1).

Com base nos resultados apresentados neste estudo, procuramos ampliar a casuística de 62 pacientes com idade ≤ 40 anos, incluindo pacientes admitidos no Hospital AC Camargo com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico em idade abaixo de 50 anos. Um levantamento na literatura incluindo vinte e três estudos que avaliaram o câncer gástrico em pacientes jovens, mostrou que 74% destes estudos consideraram a idade de corte abaixo ou igual a 40 anos, enquanto que os outros 26% consideraram a idade até 45-50 anos. Esses resultados mostram que a escolha da idade de corte nos diferentes estudos parece ser arbitrária, variando bastante nas

diferentes publicações (KOEI et al. 2000; KIM et al. 2003; CARVALHO et al. 2004; BACANI et al. 2005; MILNE et al. 2006; BUFFART et al. 2007; HIRAHASHI et al. 2007; SANTORO et al. 2007; CHUNG et al. 2010). No presente estudo, foi considerada a idade de 50 anos, também utilizada nos critérios para manejo dos pacientes com HDCG (PARK et al. 2000; BROOKS-WILSON et al. 2004).

Como previamente descrito na seção de Material e Métodos, a casuística inicial contou com 181 pacientes e, considerando os critérios de inclusão/exclusão, 97 pacientes foram incluídos no presente estudo. A idade média destes pacientes foi de $35,9 \pm 7,1$ e mediana de 36 anos.

As características clínico-patológicas apresentadas nesta casuística, incluíram um predomínio de pacientes do gênero masculino (57,7%) e maior frequência de lesões localizadas em região de corpo e antro, consistente com outros estudos (TSO et al. 1987; NAKAMURA et al. 1999; YOKOTA et al. 1999; RAMOS-DE LA MEDINA et al. 2004).

Os sintomas do câncer gástrico em sua fase precoce podem ser vagos e inespecíficos, semelhantes aos sintomas relacionados à gastrite e úlceras no estômago. Por este motivo, na maioria dos casos o diagnóstico do tumor é tardio, quando o tumor já apresenta estadiamento avançado. Dentre os principais sintomas relatados pelos pacientes, os mais frequentes foram dor epigástrica e/ou abdominal (80,5%), perda de peso (35,4%) e vômitos (22,8%). O papel dos sintomas no diagnóstico e prognóstico do câncer gástrico tem sido relatado em vários estudos, incluindo o papel como fator prognóstico (SANCHEZ-BUENO et al. 1998;

MACONI et al. 2003; STEPHENS et al. 2005; BOWREY et al. 2006; COSTA et al. 2006).

Segundo alguns autores, o prognóstico dos pacientes é pobre devido ao diagnóstico tardio, refletindo no estadiamento avançado do tumor ao diagnóstico; embora alguns autores mostrem que essa demora não interfere na sobrevida do paciente (WINDHAM et al. 2002). Trabalhos publicados recentemente mostraram similaridade no prognóstico entre pacientes jovens e idosos, desde que a doença seja diagnosticada na fase inicial (KATAI et al. 1996; THEUER et al. 1996; EGUCHI et al. 1999; KATH et al. 2000; SMITH et al. 2009).

Nossa série mostrou uma prevalência de tumores infiltrativos, indiferenciados e presença de metástases linfonodais, assim como o predomínio de tumores do tipo difuso (Laurén) e de células em anel de sinete (OMS), consistente com outros estudos (TSO et al. 1987; THEUER et al. 1996; KATH et al. 2000; RUGGE et al. 2000; KOKKOLA et al. 2001; LIM et al. 2003; KIM et al. 2005).

Quanto ao estadiamento, as variáveis pT e pN mostraram um impacto significativo no cálculo da sobrevida global ($p<0,0001$). Como esperado, essas variáveis permaneceram como fatores prognósticos independentes para os pacientes com câncer gástrico diagnosticado em idade jovem, pelo modelo de Cox ajustado pela idade, aumentando o risco de óbito proporcionalmente ao nível de invasão do tumor e comprometimento linfonodal ($p=0,0015$ e $p=0,008$, respectivamente).

Os estudos relacionados à determinação das vias de disseminação do adenocarcinoma gástrico demonstram que a via linfática é significativamente mais prevalente do que a hematogênica, de modo que, mesmo lesões definidas como precoces, apresentam índices de comprometimento linfonodal que variam de 0-25%

(SASAKO et al. 2000; SASAKO 2003). Consistente com esses dados, a presença de invasão vascular sanguínea foi observada em um pequeno número de casos (14%), em relação à discreta diferença observada para presença de invasão perineural e invasão vascular linfática (49,5 e 45,3%, respectivamente). A presença de invasão perineural e linfática apresentou associação significativa com a sobrevida global desses pacientes ($p<0,001$ e $p=0,001$, respectivamente), embora na análise multivariada, estes fatores não tenham permanecido como fatores prognósticos independentes.

Em relação à sobrevida global, estudos relatam que pacientes jovens apresentam sobrevida global significativamente mais pobre em comparação aos pacientes com idade mais avançada (TSO et al. 1987; THEUER et al. 1996; LIM et al. 2003). Este fato parece estar mais associado ao estadió avançado e indiferenciação histológica dos tumores ao diagnóstico, do que à idade jovem. De fato, a idade tem sido muito estudada como fator prognóstico (ISHIGAMI et al. 1999; NAKAMURA et al. 1999; EGUCHI et al. 1999; KATAI et al. 2004), porém os resultados não são consistentes.

Um estudo comparou o prognóstico do câncer gástrico em relação à idade e estadió, e relatou melhor prognóstico para o câncer precoce em pacientes jovens em relação aos pacientes mais velhos, embora o prognóstico de tumores avançados em pacientes jovens tenha sido pior em relação ao outro grupo. De acordo com os autores, os resultados indicavam que os pacientes jovens com câncer gástrico precoce toleravam melhor o tratamento radical, entretanto enfatizavam a agressividade das lesões em pacientes com tumores com estádios avançados (NAKAMURA et al. 1999).

Em relação ao tratamento, neste estudo predominaram o tratamento cirúrgico com finalidade curativa e a linfadenectomia do tipo D2. Dos pacientes avaliados, 85,6% dos pacientes foram submetidos ao tratamento cirúrgico, sendo que em 77,7% o intuito foi curativo. Melhores taxas de sobrevida global foram atribuídas aos pacientes submetidos à gastrectomia subtotal ($p=0,003$). A linfadenectomia D2 foi realizada em 74,2% dos casos, sendo que esses pacientes apresentaram melhores taxas de sobrevida global (66,9% em 5 anos e 53,3% em 10 anos) ($p<0,001$). De acordo com os dados da literatura, a ressecção cirúrgica associada à linfadenectomia D2 permanece como a opção de tratamento mais eficiente, proporcionando melhores taxas de sobrevida aos pacientes (SIEWERT et al. 1993; SIEWERT et al. 1996; RAMACCIATO et al. 2000; ROVIELLO et al. 2002). A alta incidência do câncer gástrico na população brasileira e a diferença nos resultados do tratamento desta neoplasia, além do estadió da doença ao diagnóstico, justificam os esforços para a detecção precoce e o rastreamento na população considerada de risco para a doença.

A frequência de câncer gástrico hereditário em pacientes jovens tem sido bem documentada na literatura. Aproximadamente 10-19% dos pacientes jovens com câncer gástrico apresentam história familiar de câncer gástrico (MEDINA-FRANCO et al. 2000; KOEA et al. 2000; KOKKOLA et al. 2001; RAMOS-DE LA MEDINA et al. 2004). Nesta casuística, 21,4% dos pacientes apresentaram história familiar positiva, sendo que 10,8% destes casos relataram a ocorrência de câncer gástrico em familiares. Tumores em outros sítios como cólon, mama, próstata, rins, osso, útero, ovário e bexiga, também foram mencionados.

Uma alta frequência de pacientes jovens com história familiar sugere a possibilidade de identificar uma população de alto risco, assim como portadores de

síndromes através do rastreamento de pacientes (KOEI et al. 2000), e tal história pode ter impacto na sobrevivência (MEDINA-FRANCO et al. 2000). Estudos sugerem que aproximadamente 5-10% dos casos de câncer gástrico apresentam história familiar, o que atribui grandes implicações para as famílias afetadas. A agregação familiar é mais comum no câncer gástrico de tipo difuso comparado ao tipo intestinal, atribuindo um risco aumentado de desenvolvimento do tumor de 7.0 vezes para familiares de pacientes com câncer gástrico difuso comparado a 1.4 vezes para familiares de pacientes com câncer tipo intestinal (LEHTOLA 1978). Um estudo recente relatou que 7.8% dos pacientes tinham história familiar de câncer gástrico, e essa história estava associada com o câncer gástrico em homens e com os casos de estadios mais avançados (CHUNG et al. 2010).

Em virtude de controvérsias em relação à relevância dos parâmetros clínicos e histopatológicos relacionados ao comportamento biológico e prognóstico do câncer gástrico, muitos estudos têm sido elaborados com intuito de identificar biomarcadores que possam fornecer informações importantes quanto a estes aspectos. A análise das alterações biológicas associadas à patogênese desta doença tem auxiliado na identificação desses biomarcadores (GABBERT et al. 1996; RAMESH et al. 1999; KOEI et al. 2000; TANAKA et al. 2002; EBERT et al. 2003; OLIVEIRA et al. 2004; LO et al. 2010)

O papel das proteínas E-caderina e β -catenina no complexo de adesão celular tem sido amplamente estudado na carcinogênese gástrica. As alterações neste complexo têm sido relacionadas ao fenótipo difuso no câncer gástrico, enquanto que o modelo de múltiplas etapas da carcinogênese gástrica, envolvendo fatores ambientais, pode ser o precursor no fenótipo intestinal.

Mutações germinativas no gene *CDH1* têm sido associadas à perda da função da E-caderina e à ocorrência do câncer gástrico difuso hereditário (HDGC) (SURIANO et al. 2003). Embora a mutação no gene *CDH1* esteja presente em uma pequena porcentagem de casos, a presença dessas mutações traz grande impacto nas famílias afetadas (GUILFORD et al. 1998). Segundo estimativas, mutações no gene *CDH1* são causais em pelo menos 30% dos casos de HDGC, e a penetrância dessas mutações varia de 75-85% (PHAROAH et al. 2001). As mutações no gene *CDH1* têm sido associadas com um prognóstico pobre e com uma taxa de sobrevida em 5 anos de 10% (CONCOLINO et al. 2004).

Estudos têm demonstrado que aproximadamente 90% dos casos de câncer gástrico apresentam alterações em pelo menos um dos componentes do complexo de adesão célula-célula (JAWHARI et al. 1997; RAMESH et al. 1999), o que reflete diretamente na correlação entre a perda da adesão celular característica da histologia dos tumores gástricos difusos. A correlação significativa da expressão da E-caderina com o tipo histológico, mais especificamente, a perda de expressão da E-caderina no câncer gástrico de tipo difuso, tem sido observada em diversos estudos (GABBERT et al. 1996; JAWHARI et al. 1997; JOO et al. 2002; SILVA et al. 2008).

Quanto à frequência destas alterações em relação à idade dos pacientes, os resultados têm sido controversos. Apesar da elevada frequência de tumores do tipo difuso em pacientes jovens, estas alterações no complexo de adesão celular não são significantes na carcinogênese do câncer gástrico em pacientes jovens. Ao invés disso, a comparação entre dois grupos de pacientes divididos de acordo com a idade, mostrou uma maior taxa de alterações no complexo caderina-catenina no grupo de pacientes mais velhos (74.9% vs 57.4% no grupo mais jovem) (SILVA et al. 2008).

Este resultado foi confirmado por uma análise estatística adicional (não demonstrada neste estudo) mostrando que a associação da expressão da E-caderina e a classificação histológica de Laurén foi significativa apenas para o grupo de pacientes mais velhos ($P < 0,001$).

Em nossa casuística, houve um discreto predomínio na frequência de casos apresentando expressão alterada de E-caderina (54,5%) em relação à frequência de casos com expressão preservada na membrana celular (45,5%). O mesmo padrão foi observado para a β -catenina (55,1% vs 44,9%, respectivamente). Além disso, houve uma associação significativa entre o padrão de expressão desses dois marcadores ($p < 0,001$). Este fato corrobora a importância da estabilidade das duas proteínas no complexo de adesão celular. Uma vez alterada a funcionalidade de um dos componentes do complexo, ocorre perda da adesão celular mediada pela caderina, o que pode potencializar o processo neoplásico (TAKEICHI 1991; BIRCHMEIER et al. 1994; BEHRENS et al. 1996).

Com base nos resultados obtidos na tese de mestrado (SILVA 2005) e nos resultados publicados posteriormente pelo nosso grupo (SILVA et al. 2008), concluímos que a carcinogênese gástrica em nossa casuística, não deve ser atribuída apenas às alterações na expressão dessas proteínas, como indicada pela imunoistoquímica. Como amplamente discutido, a carcinogênese gástrica em pacientes jovens pode ser desencadeada por outras alterações, em adição às alterações investigadas. Assim, a etapa seguinte ao estudo comparativo, envolveu a análise de um grupo específico de pacientes, para melhor compreensão da importância da expressão destas proteínas na carcinogênese gástrica em pacientes

jovens (idade <50 anos). Para tal, a casuística foi ampliada, assim como o painel de marcadores a ser avaliados pela imunoistoquímica.

Embora na análise inicial os marcadores de adesão não tenham apresentado associação com prognóstico e sobrevida no grupo de pacientes jovens diagnosticados com câncer gástrico em idade jovem, é importante ressaltar a relevância da identificação de alterações nestes marcadores como possível método de rastreamento em pacientes jovens com história familiar de câncer gástrico. Assim, estes marcadores foram mantidos e outros parâmetros importantes foram considerados nesta extensão do estudo.

Nas etapas iniciais do estudo, não foram considerados os dados a respeito da história pessoal e familiar neoplásica dos pacientes, nem tampouco um estudo detalhado dos dados clínicos e manejo deste grupo de pacientes admitidos para tratamento nesta instituição. A padronização do levantamento destes dados a partir dos prontuários médicos, foi realizada através do preenchimento de uma ficha de coleta de dados desenvolvida pelo Departamento de Cirurgia Abdominal. O objetivo principal, foi criar um banco contendo dados clínicos, histopatológicos e resultados de análises moleculares que possibilite a extensão das análises clínicas e moleculares neste grupo específico de pacientes, de uma forma consistente e padronizada. A criação deste banco foi bem sucedida graças à colaboração entre os Departamentos envolvidos no desenvolvimento deste estudo, e conta atualmente com aproximadamente 200 casos de pacientes diagnosticados com câncer gástrico em idade jovem.

Outros marcadores foram adicionados ao painel imunoistoquímico neste estudo, como a análise da expressão de marcadores do sistema de reparo do DNA (MMR) e a expressão da proteína p53.

A inclusão das proteínas MMR no painel de marcadores imunoistoquímicos foi baseada em estudos que avaliaram a associação entre alterações nesses marcadores e o câncer gástrico (KELLER et al. 1996; KANEMITSU et al. 2007; PINTO et al. 2008), além do estudo realizado nesta instituição que relatou o câncer gástrico como um dos tumores extra-colônicos mais freqüentes em pacientes portadores da Síndrome de Lynch (DA SILVA et al. 2010). Como descrito na literatura, o câncer gástrico é um dos tumores mais freqüentes no espectro de tumores extra-colônicos apresentados por pacientes portadores da Síndrome de Lynch (PARK et al. 2000; GOECKE et al. 2006; BARROW et al. 2009), caracterizada pela presença de mutações germinativas nos genes de reparo do DNA, como o *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* e *MSH6*.

Em relação aos marcadores MMR, dentre os 73 casos avaliáveis, dois casos (2,7%) apresentaram perda de *MSH2* e *MSH6*. Um dos casos se referia a um paciente do sexo masculino, 36 anos de idade, diagnosticado com câncer gástrico tipo difuso, estadiamento T3N1M0 e sem relato de história familiar descrito no prontuário médico. O outro caso, paciente do sexo masculino, 39 anos de idade, com diagnóstico de câncer gástrico do tipo difuso, T3N1M0, apresentando relato de história familiar. A partir destes resultados e do número de registro hospitalar (RGH) destes pacientes, foi realizado um levantamento no Registro de Câncer Colorretal Hereditário do Departamento de Cirurgia Pélvica deste hospital, com a colaboração da Dr.Erika Monteiro, em busca de outros dados clínicos pessoais ou de parentes

destes pacientes, já que estes dois casos não estavam incluídos em outros estudos na instituição.

Deste modo, foi possível encontrar informações referentes à história familiar do segundo paciente, caracterizada pela ocorrência de tumor colorretal e endometrial na irmã do paciente, que também havia sido diagnosticada com câncer gástrico. Amostra de DNA desta irmã havia sido submetida ao seqüenciamento e nenhuma mutação foi detectada sugerindo futuras análises, como por exemplo, pela técnica de MLPA para detecção de uma possível deleção nos genes do sistema MMR. Outro irmão do mesmo paciente, apresentou tumor colorretal e no intestino delgado, também com perda de MSH2 e MSH6 detectada na amostra tumoral por imunoistoquímica. Esta família preencheu o critério de Amsterdam II (8/10 irmãos apresentaram tumores, incluindo intestino delgado, colorretal e no endométrio).

A utilidade da imunoistoquímica como um método de rastreamento de pacientes HNPCC com mutações nos genes MMR tem sido controversa. Porém, alguns estudos têm mostrado que a imunoistoquímica tem sensibilidade e especificidade adequadas para avaliar MSI (CUNNINGHAM et al. 2001; RIGAU et al. 2003), e outros sugerem a imunoistoquímica como método de escolha para rastreamento pré-análise de mutações de MMR (MARCUS et al. 1999; DEBNAK et al. 2000; DIEUMEGARD et al. 2000; CUNNINGHAM et al. 2001; PARAF et al. 2001). No caso do câncer gástrico, não há consenso nos resultados apresentados. Apesar da baixa frequência de alterações encontradas nos marcadores MMR avaliados neste estudo, a análise imunoistoquímica demonstrou ser efetiva como método de rastreamento, considerando que o resultado em um dos casos foi corroborado pela história familiar detalhada, incluindo a detecção das mesmas

alterações em outros familiares. A imunoistoquímica deve ser considerada como método de rastreamento dessas alterações no caso de amplas casuísticas, devido ao custo e disponibilidade do método nas instituições. Entretanto, com base apenas nestes resultados, não é possível sugerir a substituição dos métodos moleculares amplamente descritos como de escolha no rastreamento efetivo das mutações.

A ocorrência de alterações no gene *TP53* tem sido amplamente discutida na literatura, incluindo a associação destas alterações com variáveis clínico-patológicas, prognóstico e resposta ao tratamento (KIM et al. 1995; LEE et al. 1998; NAKATA et al. 1998; ROVIELLO et al. 1999; HOSAKA et al. 2001).

No câncer gástrico, a frequência de alterações em *TP53* em pacientes jovens ainda é controversa (MAEHARA et al. 1996; RUGGE et al. 2000; HARUMA et al. 2000; LIM et al. 2003; MILNE et al. 2006). No presente estudo, 51,3% dos casos avaliados apresentaram marcação nuclear em porcentagem superior a 10% das células neoplásicas. Este resultado é compatível com as frequências relatadas por outros grupos (23-60%), que também utilizaram a mesma metodologia empregada neste estudo (VICTORZON et al. 1996; LIM et al. 1996; MONIG et al. 1997; LIU et al. 2001; TAKENO et al. 2001)

A variabilidade observada nos diversos estudos em relação à frequência de positividade de p53 no câncer gástrico (17-90%) pode ser explicada pela utilização de diferentes metodologias e critérios para a detecção destas alterações (FENOGLIO-PREISER et al. 2003). Os estudos têm sido realizados na tentativa de demonstrar a relevância clínica das alterações do p53 nos pacientes com carcinomas gástricos, porém os resultados são conflitantes.

Neste estudo, houve associação significativa entre a expressão da proteína p53 e a invasão perineural ($p=0,005$). Alguns estudos mostram a associação entre a expressão de p53 e o tipo histológico, o comportamento biológico do tumor e prognóstico dos pacientes com câncer gástrico (UCHINO et al. 1993; JOYPAUL et al. 1994; RANZANI et al. 1995; GOMYO et al. 1996; SHUN et al. 1997; IWAMATSU et al. 2001; LIU et al. 2001). Entretanto, o impacto prognóstico destas alterações no câncer gástrico permanece controverso (MCCULLOCH et al. 1997; PINTO-DE-SOUSA et al. 2004). A associação entre a expressão aumentada de p53 e o padrão de infiltração tumoral, o comprometimento linfonodal ou diminuição da sobrevida em alguns estudos, não é confirmada em outros relatos (KAKEJI et al. 1993; YONEMURA et al. 1993; JOYPAUL et al. 1994; OIWA et al. 1995; ICHIYOSHI et al. 1997; IOACHIM et al. 1997).

Alguns autores afirmam que a expressão da proteína p53 tem valor preditivo na sobrevida dos pacientes (MARTIN et al. 1992; ROVIELLO et al. 1999; DIEZ et al. 2000). Nesta casuística, a expressão de p53 não foi fator prognóstico de sobrevida, como demonstrado também em outro estudo (GABBERT et al. 1995).

Para entender melhor os diferentes resultados quanto à relevância prognóstica da expressão imunoistoquímica de p53, deve-se considerar a variabilidade entre as frequências de mutação do gene e o acúmulo da proteína. Nos estudos imunoistoquímicos, a expressão aumentada de p53 pode ser atribuída tanto à síntese aumentada da proteína selvagem quanto ao acúmulo da proteína mutada na célula. A positividade imunoistoquímica de p53, não relacionada à mutação, pode resultar de falhas nas vias normais de degradação da proteína levando então ao acúmulo da proteína selvagem; ou ainda, o acúmulo pode ocorrer quando há uma regulação

crescente do gene em resposta a um estresse ambiental. Considerando que muitos anticorpos utilizados podem reconhecer os dois tipos da proteína, o acúmulo de p53 pode não necessariamente indicar a presença de mutação no gene e nem toda mutação no gene produz acúmulo da proteína p53 (BOSARI et al. 1995; CESAR et al. 2004). O anticorpo utilizado neste estudo (DO-7) tem apresentado um alto grau de correlação entre a imunorreatividade de p53 e as mutações em *TP53* (BAAS et al. 1994).

As mutações em *TP53* têm sido amplamente estudadas em vários tipos de câncer com o objetivo de estabelecer características diagnósticas, prognósticas e terapêuticas dos tumores aos quais elas estão associadas.

Muitos estudos têm avaliado a frequência de mutações no gene *TP53* em carcinomas gástricos. Entretanto, assim como ocorre com a detecção de alterações pela imunoistoquímica, as frequências de mutações do *TP53* descritas nos diferentes estudos apresentam grande variabilidade (3,2% a 65%). Além disso, há variabilidade entre as casuísticas, as técnicas utilizadas para a detecção das mutações, e os éxons examinados (FENOGLIO-PREISER et al. 2003). Tal variabilidade interfere no consenso quanto ao impacto destas mutações no prognóstico e sobrevida dos pacientes. Muitas mutações somáticas levam à perda de função de p53 e foram detectadas no câncer gástrico (UCHINO et al. 1993; RUGGE et al. 2000). Neste estudo, a frequência de mutações foi de 11,3% dos casos avaliados. Quando comparados os resultados da análise molecular através do seqüenciamento do *TP53* e da expressão imunoistoquímica de p53, foi encontrada uma concordância em 72,7% dos casos positivos para p53, consistente com resultados apresentados em outros

estudos (POREMBA et al. 1995; RANZANI et al. 1995; LIM et al. 1996; GOMYO et al. 1996).

O fenótipo de predisposição a tumores tem sido caracterizado em portadores de mutações germinativas de *TP53*. Mutações germinativas de *TP53* têm sido identificadas em pacientes com câncer gástrico familiar, sugerindo uma associação entre a presença destas mutações e o risco aumentado de desenvolvimento de câncer gástrico (HORIO et al. 1994; KELLER et al. 2004; OLIVEIRA et al. 2004; KIM et al. 2004; YAMADA et al. 2007).

A associação das mutações germinativas no gene *TP53* com a predisposição à múltiplos tumores na síndrome Li-Fraumeni (MALKIN et al. 1990; SRIVASTAVA et al. 1990; BIRCH et al. 1994; MALKIN 1994; FREBOURG et al. 1995; VARLEY 2003), foi confirmada no estudo do perfil de mutações germinativas em *TP53* em famílias LFS/LFL das regiões Sul e Sudeste do Brasil (ACHATZ et al. 2007).

Quanto ao espectro de tumores associados à LFS/LFL, estudos têm relatado um aumento na incidência de outros tipos tumorais diagnosticados em idade jovem, incluindo o câncer gástrico (HARTLEY et al. 1989; VARLEY et al. 1997; BIRCH et al. 2001). Nas famílias LFS/LFL brasileiras, o câncer gástrico foi diagnosticado em 46,2% das famílias com mutações, comparado com 31,3% nas famílias sem mutações (ACHATZ et al. 2007). Entretanto, a idade dos pacientes ao diagnóstico foi similar nos dois grupos, sugerindo que a presença da mutação não parece acelerar o aparecimento do câncer gástrico (artigo em preparação).

Estudos na genética dessas famílias envolveram a análise de alterações e mutações de *TP53* e demonstraram uma associação entre estas alterações moleculares e o desenvolvimento de tumores em idade jovem. A principal alteração

detectada no gene *TP53* foi a mutação germinativa no códon 337 (p.R337H). A presença da mutação p.R337H foi detectada em aproximadamente 0,3% da população estudada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Além disso, esta mutação está associada à ocorrência do haplótipo caracterizado pelo alelo T do SNP28 (rs9894946), o qual é relativamente raro na população em geral, demonstrando um efeito fundador (PALMERO et al. 2008; GARRITANO et al. 2010). O perfil dos tumores apresentado pelas famílias com p.R337H é semelhante ao perfil apresentado pelas famílias LFS/LFL. Entretanto, devido à penetrância incompleta, muitas famílias apresentam histórias que não preenchem os critérios de LFS, e casos de câncer em crianças têm sido relatados em portadores de p.R337H que não apresentam história familiar significativa.

Neste contexto, nossa casuística incluiu um paciente com idade de 12 anos, com diagnóstico de câncer gástrico metastático, estadio T4N2M1 (Anexo 5). A peculiaridade deste caso, além da idade precoce ao diagnóstico do câncer gástrico, se deve ao tipo histológico do tumor (adenocarcinoma gástrico bem diferenciado) e aos resultados obtidos nos estudos imunoistoquímico e molecular. De acordo com o estudo imunoistoquímico, nenhuma alteração foi observada nas amostras tumorais para os marcadores relacionados à adesão celular (E-caderina e β -catenina) ou aos genes de reparo do DNA (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2). Porém, as amostras apresentaram marcação nuclear para p53.

Apesar do diagnóstico do tumor em idade precoce, neste caso, a histologia do tumor, a história familiar neoplásica e os resultados imunoistoquímicos não preenchem os critérios de uma provável associação do câncer gástrico diagnosticado em idade precoce com as síndromes HDGCC ou Lynch. A partir deste resultado, o

DNA genômico extraído das amostras foi submetido à análise molecular para detecção de mutações no gene *TP53*.

A mutação p.R337H está associada à ocorrência do haplótipo caracterizado pelo alelo T do SNP28 (rs9894946) (GARRITANO et al. 2010). Este alelo foi detectado nas amostras contendo a mutação p.R337H mas não na amostra com sequência selvagem. A presença da p.R337H nas amostras foi confirmada por RFLP (*restriction length fragment polymorphism*). Este método confirmou a presença da mutação apenas em amostra tumoral, consistente com a ocorrência de mutação somática. Assim, tanto a mutação p.R337H, quanto a presença do alelo T do SNP28 (rs9894946), característico do haplótipo fundador, foram detectadas apenas em amostras de carcinoma gástrico deste paciente. Entretanto, a mutação p.R337H tem sido descrita como uma mutação germinativa comum devido a um efeito fundador no Brasil (PINTO et al. 2004; GARRITANO 2010).

O paciente M.G.P foi a óbito pelo agravamento do quadro pouco tempo após a tentativa de remoção cirúrgica da doença. Na época não foi armazenada amostra de sangue periférico ou tecido normal do paciente. Sendo assim, não há amostra de DNA obtido a partir de células do sangue periférico do probando na instituição.

Como mencionado anteriormente, o perfil de tumores nas famílias portadores de p.R337H é similar ao perfil apresentado pelas famílias Li-Fraumeni (LFS) ou Li-Fraumeni-like (LFL). Sendo assim, após a detecção da mutação na amostra deste paciente, a história familiar mais detalhada foi obtida através de entrevista com mãe e um dos irmãos do probando, que compareceram ao Departamento de Oncogenética do Hospital AC Camargo após serem convocados para aconselhamento genético. O teste genético para detecção do p.R337H foi oferecido para os familiares de 1º grau

para verificar a ocorrência da alteração em outros membros da família, o que confirmaria a ocorrência de hereditariedade na Síndrome de Li-Fraumeni,

Após assinatura do consentimento informado, amostra de sangue de dois familiares foi coletada. Tanto a mutação p.R337H quanto o SNP28 não foram detectados nas amostras da mãe e do irmão do probando. Posteriormente, a amostra de sangue do pai foi coletada sob o mesmo procedimento de consentimento informado. Tanto a mutação p.R337H quanto o haplótipo mutante foram detectados na amostra paterna, confirmando que o pai é portador assintomático da Síndrome de Li-Fraumeni.

De acordo com o Banco de dados do IARC (<http://www-p53.iarc.fr>), a mutação p.R337H está bem documentada como uma mutação germinativa que predispõe portadores a múltiplos tumores na população das regiões Sul e Sudeste do Brasil, onde ocorre frequentemente devido a um efeito fundador. Consistente com essa origem germinativa, o haplótipo mutante foi detectado no DNA do pai do probando. A partir dos resultados obtidos pelo sequenciamento e alelotipagem destas amostras, a hipótese sugerida foi a de ocorrência de microquimerismo genético. O microquimerismo é o nome dado ao fenômeno biológico referente a uma pequena população de células ou DNA presente em um indivíduo mas derivada de outro indivíduo geneticamente distinto. Este fenômeno ocorre geralmente devido ao tráfego materno-fetal ou fetal-fetal durante a gravidez (NELSON 2003; YAN et al. 2005; GAMMILL 2010). A hipótese de microquimerismo consideraria o tráfego fetal-fetal entre dois fetos gêmeos dizigóticos, um dos quais tinha o haplótipo mutante do pai e não sobreviveu. Análises posteriores podem levar a uma melhor compreensão do desenvolvimento precoce de câncer gástrico em uma paciente de 12

anos de idade e sua associação com a mutação no gene *TP53*. Entretanto, devido à quantidade de material arquivado disponível para estudo na instituição, as análises ficaram restritas às que foram relatadas neste estudo.

Devido à penetrância incompleta, histórias de pacientes que não preenchem os critérios de LFS/LFL e a ocorrência de câncer único na infância têm sido relatadas em famílias p.R337H. Esse resultado sugere que o DNA tumoral em adição ao DNA genômico sejam considerados para análises em pacientes apresentando tumor em idade jovem em populações com os alelos fundadores.

Embora seja muito freqüente na população adulta, a ocorrência de câncer gástrico primário em crianças é extremamente rara, sendo aproximadamente 0,005% dos tumores gastrointestinais (MCGILL et al. 1993; NOTTINGHAM 1994; DEUTSCH et al. 2004). Um estudo em 1999 citou 21 publicações relatando casos de pacientes com idade inferior a 21 anos que tiveram adenocarcinoma gástrico (SASAKI et al. 1999).

De acordo com dados da literatura, o adenocarcinoma gástrico na população pediátrica pode se desenvolver de três maneiras distintas: *de novo*, como parte de uma síndrome poliposa ou após o tratamento por um linfoma gástrico (GOLDTHORN et al. 1986). Desde o trabalho publicado por McNeer em 1941, tem sido relatada a ocorrência em torno de 1% de câncer gástrico em pacientes abaixo de 30 anos de idade (MCNEER 1941; BLOCK et al. 1948; DUPONT et al. 1978; BEDIKIAN et al. 1979). Em nossa casuística, 19 pacientes (19,6%) apresentaram idade igual ou inferior a 30 anos, dentre os quais, 04 pacientes com idade de 12 a 20 anos.

O prognóstico para crianças com adenocarcinoma gástrico é pobre. Em pacientes adultos, a taxa de sobrevida livre de doenças em 5 anos, é de aproximadamente 15%. Entre os casos pediátricos relatados na literatura, a mediana de sobrevida após o diagnóstico é de aproximadamente 5 meses, e não há relato de sobrevida dessas crianças em 5 anos. Considerando o caso específico relatado neste estudo, de um paciente pediátrico com câncer gástrico apresentando características biológicas e clínico-patológicas muito particulares, sugerimos a relevância da análise molecular para melhor compreensão da carcinogênese gástrica nestes pacientes. O estudo da genética e da história familiar criteriosa destes pacientes jovens, associado ao diagnóstico precoce, pode levar ao melhor tratamento em busca do aumento da taxa de sobrevida e qualidade de vida destes pacientes.

Considerações finais

A descrição das características clínico-patológicas em pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico em idade jovem (<50 anos) mostrou uma correspondência entre o perfil apresentado por estes pacientes com os dados relatados em outros estudos. As categorizações e a metodologia utilizadas estão de acordo com os dados da literatura, e são válidas para análises deste grupo de pacientes. A variabilidade observada entre os resultados apresentados na literatura pode corresponder aos critérios e metodologias empregados nos diferentes estudos.

A prevalência de história familiar positiva nos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico em idade jovem é significativa em relação aos dados da literatura. A análise criteriosa da história familiar nos estudos da genética e de

associações das variáveis clínico-patológicas é fundamental para melhor compreensão e delineamento dos estudos que buscam a identificação de marcadores biológicos associados à carcinogênese gástrica nos pacientes jovens. A análise da frequência de pacientes jovens com história familiar sugere a possibilidade de identificar uma população de alto risco, assim como portadores de síndromes através do rastreamento de alterações em genes específicos associados a estas síndromes.

Neste estudo, os fatores prognósticos independentes foram o nível de invasão do tumor (pT) e o comprometimento linfonodal (pN). Esse resultado reafirma a relevância do sistema TNM como indicador de prognóstico no câncer gástrico.

O estudo comparativo entre dois grupos de pacientes diagnosticados com câncer gástrico mostrou que embora tenha sido detectada uma alta frequência de alterações na expressão dos marcadores do complexo de adesão celular (E-caderina/ β -catenina) nos dois grupos, essa associação foi significativa para o grupo de pacientes com idade >40 anos. No grupo de pacientes com idade <50 anos, os marcadores de adesão celular e do sistema de reparo do DNA não foram significativos como fator prognóstico, mas sugerem estudos posteriores em grupos mais específicos. O estudo desses marcadores associado aos dados histopatológicos e à história familiar positiva pode auxiliar na identificação de pacientes com maior probabilidade de ter uma mutação em genes de predisposição às síndromes hereditárias.

Embora os resultados apresentados neste estudo tenham confirmado a utilidade da imunoistoquímica na detecção de alterações nos marcadores avaliados, esses achados poderiam ser complementados através da utilização de metodologias mais específicas.

Com base nos dados da literatura, é possível afirmar que a falta de consistência nas análises da expressão da proteína p53 como fator prognóstico no

adenocarcinoma gástrico interfere na sua utilização na prática clínica. Muitas questões sobre a função de *TP53*, as proteínas e sinais envolvidos nesta via, necessitam ser elucidadas para que possam resultar na identificação de pacientes que se beneficiem, por exemplo, de formas adicionais de tratamento.

A baixa frequência de mutações apresentada neste estudo sugere que as mutações no *TP53* podem não ser o evento crucial na carcinogênese gástrica deste grupo de pacientes em particular, indicando a possibilidade que outros tipos de mecanismos e alterações genéticas possam ter maior destaque no desenvolvimento e progressão tumoral na carcinogênese gástrica destes pacientes. Ainda em relação à análise de mutações nos pacientes com câncer gástrico em idade jovem, há a perspectiva de ampliação do número de casos seqüenciados, incluindo outros casos que foram admitidos no Hospital AC Camargo no período de conclusão deste estudo e não foram incluídos nesta casuística. Outras análises podem complementar os resultados apresentados, como a influência dos polimorfismos no risco de câncer e o estudo de outros genes relacionados ao *TP53* como *MDM2*. Esta etapa complementar poderia esclarecer realmente o impacto das mutações detectadas em *TP53* no desenvolvimento do câncer gástrico em pacientes com idade jovem avaliados, e trazer novas perspectivas para o estudo da carcinogênese gástrica nestes pacientes.

A detecção da mutação p.R337H em paciente de 12 anos, com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico e sem história familiar relatada, confirma a importância da associação entre a análise molecular e a obtenção da história familiar detalhada nestes pacientes. Este resultado também sugere que a análise desta mutação específica seja considerada em pacientes apresentando tumor em idade jovem em populações com alta frequência de alelos fundadores.

6 CONCLUSÃO

1. Na análise da frequência de mutações no gene *TP53* em amostras de tumor de pacientes com adenocarcinoma gástrico diagnosticado em idade inferior a 50 anos, foram detectadas mutações em 11,3% casos. Dentre as quais, a presença da mutação germinativa p.R337H em um paciente de 12 anos com adenocarcinoma gástrico.

2. Uma frequência significativa de alterações na expressão dos marcadores avaliados foi detectada pela técnica da imunoistoquímica. Nesta casuística, o padrão de expressão de p53, dos marcadores de adesão celular (E-caderina/ β -catenina) e do sistema de reparo do DNA (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) não foi significativo como fator prognóstico, mas os resultados sugerem estudos posteriores em grupos mais específicos.

3. A descrição das características clínico-patológicas deste grupo de pacientes apresentou particularidades em relação à frequência do estadiamento avançado dos tumores ao diagnóstico e predomínio de adenocarcinomas gástricos de tipo histológico difuso (Laurén). A frequência de história familiar positiva foi significativa em relação aos dados da literatura (21,4%), incluindo a ocorrência de câncer gástrico em outros familiares em 10,8% dos casos. O nível de invasão do tumor (pT) e o comprometimento linfonodal (pN) persistiram como fatores prognósticos independentes na análise multivariada, reafirmando a relevância do sistema TNM como indicador de prognóstico no câncer gástrico.

4. Neste estudo, foi observada uma correlação significativa entre o padrão de expressão imunoistoquímica dos marcadores E-caderina e β -catenina, e da expressão de p53 com a invasão perineural sugerindo estudos posteriores.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achatz MI. **Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene TP53 em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni like: impacto dos polimorfismos intragênicos do TP53 e de genes que regulam a atividade da p53.** Sao Paulo; 2008. [Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo].

Achatz MI, Olivier M, Le CF, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett** 2007; 245:96-102.

Allgayer H. Molecular staging of cancer: concepts of today, therapies of tomorrow. **J Surg Oncol** 2003; 82:217-23.

Alston RD, Geraci M, Eden TO, Moran A, Rowan S, Birch JM. Changes in cancer incidence in teenagers and young adults (ages 13 to 24 years) in England 1979-2003. **Cancer** 2008; 113:2807-15.

Ambs S, Hussain SP, Harris CC. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. **FASEB J** 1997; 11:443-8.
Ascano JJ, Frierson H Jr., Moskaluk CA, et al. Inactivation of the E-cadherin gene in sporadic diffuse-type gastric cancer. **Mod Pathol** 2001; 14:942-9.

Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. **J Pathol** 1994; 172:5-12.

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

Bacani JT, Soares M, Zwingerman R, di Nicola N, Senz J, Riddell R et al. *CDH1*/E-cadherin germline mutations in early-onset gastric cancer. **J Med Genet** 2006; 43:867-72.

Barrow E, Robinson L, Alduaij W, et al. Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. **Clin Genet** 2009; 75:141-9.

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.

Becker KF, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. **Surg Oncol** 2000; 9:5-11.

Bedikian AY, Khankhanian N, Heilbrun LK, Bodey GP, Strohlein JR, Valdivieso M. Gastric carcinoma in young adults. **South Med J** 1979; 72:654-6.

Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. **Nature** 1996; 382:638-42.

Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline *TP53* mutations. **Oncogene** 2001; 20:4621-8.

Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer Res** 1994; 54:1298-304.

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.

Block M, Griep AH, Pollard HM. The occurrence of gastric neoplasms in youth. **Am J Med Sci** 1948; 215:398-404.

Bosari S, Viale G. The clinical significance of p53 aberrations in human tumours. **Virchows Arch** 1995; 427:229-41.

Bowrey DJ, Griffin SM, Wayman J, Karat D, Hayes N, Raimes SA. Use of alarm symptoms to select dyspeptics for endoscopy causes patients with curable esophagogastric cancer to be overlooked. **Surg Endosc** 2006; 20:1725-8.

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

Brooks-Wilson AR, Kaurah P, et al. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. **J Med Genet** 2004; 41:508-17.

Buffart TE, Carvalho B, Hopmans E, et al. Gastric cancers in young and elderly patients show different genomic profiles. **J Pathol** 2007; 211:45-51.

Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. **J Med Genet** 1999; 36:873-80.

Candusso ME, Luinetti O, Villani L, et al. Loss of heterozygosity at 18q21 region in gastric cancer involves a number of cancer-related genes and correlates with stage and histology, but lacks independent prognostic value. **J Pathol** 2002; 197:44-50.

Carneiro F, Oliveira C, Suriano G, Seruca R. Molecular pathology of familial gastric cancer, with an emphasis on hereditary diffuse gastric cancer. **J Clin Pathol** 2008; 61:25-30.

Carvalho R, Milne AN, van Rees BP, et al. Early-onset gastric carcinomas display molecular characteristics distinct from gastric carcinomas occurring at a later age. **J Pathol** 2004; 204:75-83.

Cesar AC, Borim AA, Caetano A, Cury PM, Silva AE. Aneuploidies, deletion, and overexpression of *TP53* gene in intestinal metaplasia of patients without gastric cancer. **Cancer Genet Cytogenet** 2004; 153:127-32.

Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. **J Med Genet** 2001; 38:43-7.

Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. **Trends Biochem Sci** 1999; 24:73-6.

Chun YS, Lindor NM, Smyrk TC, et al. Germline E-cadherin gene mutations: is prophylactic total gastrectomy indicated? **Cancer** 2001; 92:181-7.

Chung HW, Noh SH, Lim JB. Analysis of demographic characteristics in 3242 young age gastric cancer patients in Korea. **World J Gastroenterol** 2010; 16:256-63.

Concolino P, Papa V, Mozzetti S, et al. The unsolved enigma of *CDH1* down-regulation in hereditary diffuse gastric cancer. **J Surg Res** 2004; 121:50-5.

Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. **Cancer Res** 1988; 48:3554-60.
Corso G, Pedrazzani C, Marrelli D, Pinto E, Roviello F. Familial gastric cancer and Li-Fraumeni syndrome. **Eur J Cancer Care (Engl)** 2010; 19:377-81.

Costa ML, de Cassia Braga RK, Machado MA, Costa AC, Montagnini AL. Prognostic score in gastric cancer: the importance of a conjoint analysis of clinical, pathologic, and therapeutic factors. **Ann Surg Oncol** 2006; 13:843-50.

Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, et al. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. **Am J Hum Genet** 2001; 69:780-90.

da Silva FC, de Oliveira LP, Santos EM, et al. Frequency of extracolonic tumors in Brazilian families with Lynch syndrome: analysis of a hereditary colorectal cancer institutional registry. **Fam Cancer** 2010; 9:563-70.

Debniak T, Kurzawski G, Gorski B, Kladny J, Domagala W, Lubinski J. Value of pedigree/clinical data, immunohistochemistry and microsatellite instability analyses in reducing the cost of determining hMLH1 and hMSH2 gene mutations in patients with colorectal cancer. **Eur J Cancer** 2000; 36:49-54.

Deutsch F, Zilberstein B, Yagi OK, Crescentini F, Deutsch CR e Gama-Rodrigues JJ. Gastric carcinoma in a 13-year-old girl. **Gastric Cancer** 2004; 7:178-82.

Dieumegard B, Grandjouan S, Sabourin JC, et al. Extensive molecular screening for hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Br J Cancer** 2000; 82:871-80.

Diez M, Medrano MJ, Gutierrez A, et al. P53 protein expression in gastric adenocarcinoma. Negative predictor of survival after postoperative adjuvant chemotherapy. **Anticancer Res** 2000; 20:3929-33.

Dupont JB, Jr., Lee JR, Burton GR, Cohn I, Jr. Adenocarcinoma of the stomach: review of 1,497 cases. **Cancer** 1978; 41:941-7.

Ebert MP, Yu J, Hoffmann J, et al. Loss of beta-catenin expression in metastatic gastric cancer. **J Clin Oncol** 2003; 21:1708-14.

Eguchi T, Takahashi Y, Yamagata M, Kasahara M, Fujii M. Gastric cancer in young patients. **J Am Coll Surg** 1999; 188:22; 2-26

Ekstrom AM, Serafini M, Nyren O, Hansson LE, Ye W, Wolk A. Dietary antioxidant intake and the risk of cardia cancer and noncardia cancer of the intestinal and diffuse types: a population-based case-control study in Sweden. **Int J Cancer** 2000; 87:133-40.

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

Fitzgerald RC, Caldas C. E-cadherin mutations and hereditary gastric cancer: prevention by resection? **Dig Dis** 2002; 20:23-31.

Frebourg T, Barbier N, Yan YX, et al. Germ-line *p53* mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome. **Am J Hum Genet** 1995; 56:608-15.

Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. **N Engl J Med** 1995; 333:32-41.

Fujimoto S, Takahashi M, Ohkubo H, et al. Comparative clinicopathologic features of early gastric cancer in young and older patients. **Surgery** 1994; 115:516-20.

Gabbert HE, Muller W, Schneiders A, Meier S e Hommel G. The relationship of *p53* expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. **Cancer** 1995; 76:720-6.

Gabbert HE, Mueller W, Schneiders A, et al. Prognostic value of E-cadherin expression in 413 gastric carcinomas. **Int J Cancer** 1996; 69:184-9.

Garber JE, Burke EM, Lavally BL, et al. Choroid plexus tumors in the breast cancer-sarcoma syndrome. **Cancer** 1990; 66:2658-60.

Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, et al. Detailed haplotype analysis at the *TP53* locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Hum Mutat** 2010; 31:143-50.

Gammill HS, Nelson JL. Naturally acquired microchimerism. **Int J Dev Biol** 2010; 54:531-43.

Gayther SA, Goringe KL, Ramus SJ, et al. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. **Cancer Res** 1998; 58:4086-9.

Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. **Genes Dev** 1998; 12:2973-83.

Goecke T, Schulmann K, Engel C, et al. Genotype-phenotype comparison of German MLH1 and MSH2 mutation carriers clinically affected with Lynch syndrome: a report by the German HNPCC Consortium. **J Clin Oncol** 2006; 24:4285-92.

Goldthorn JF, Canizaro PC. Gastrointestinal malignancies in infancy, childhood, and adolescence. **Surg Clin North Am** 1986; 66:845-61.

Gomyo Y, Osaki M, Kaibara N, Ito H. Numerical aberration and point mutation of p53 gene in human gastric intestinal metaplasia and well-differentiated adenocarcinoma: analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) and PCR-SSCP. **Int J Cancer** 1996; 66:594-9.

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

Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, et al. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. **Hum Mutat** 1999; 14:249-55.

Gylling A, Abdel-Rahman WM, et al. Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. **Gut** 2007; 56:926-33.

Hainaut P. The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. **Curr Opin Oncol** 1995; 7:76-82.

Hainaut PWK. **25 Years of TP53 Research**. Dordrecht-Netherlands: Springer; 2004.

Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). **N Engl J Med** 2005; 352:1851-60.

Hartley AL, Birch JM, Kelsey AM, Marsden HB, Harris M, Teare MD. Are germ cell tumors part of the Li-Fraumeni cancer family syndrome?. **Cancer Genet Cytogenet** 1989; 42:221-6.

Hartley AL, Birch JM, Tricker K, et al. Wilms' tumor in the Li-Fraumeni cancer family syndrome. **Cancer Genet Cytogenet** 1993; 67:133-5.

Haruma K, Komoto K, Kamada T, et al. Helicobacter pylori infection is a major risk factor for gastric carcinoma in young patients. **Scand J Gastroenterol** 2000; 35:255-9.

Hirahashi M, Yao T, Matsumoto T, et al. Intramucosal gastric adenocarcinoma of poorly differentiated type in the young is characterized by Helicobacter pylori infection and antral lymphoid hyperplasia. **Mod Pathol** 2007; 20:29-34.

Horio Y, Suzuki H, Ueda R, et al. Predominantly tumor-limited expression of a mutant allele in a Japanese family carrying a germline p53 mutation. **Oncogene** 1994; 9:1231-5.

Hosaka N, Ichikawa Y, Ishikawa T, et al. Correlation of immunohistochemical p53 labeling index with inhibition rate in chemosensitivity test in gastric and colon cancer. **Anticancer Res** 2001; 21:229-35.

Humar B, Graziano F, Cascinu S, et al. Association of *CDH1* haplotypes with susceptibility to sporadic diffuse gastric cancer. **Oncogene** 2002; 21:8192-95.

Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, et al. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. **N Engl J Med** 2001; 344:1904-9.

Ichiyoshi Y, Oiwa H, Tomisaki S, et al. Overexpression of p53 is associated with growth pattern and prognosis in advanced gastric cancer. **Hepatogastroenterology** 1997; 44:546-53.

Ioachim E, Goussia A, Stefanou D, Agnantis NJ. Expression of p53 protein in gastric cancer: an immunohistochemical study with correlation to proliferative activity. **Anticancer Res** 1997; 17:513-7.

Ishigami S, Natsugoe S, Hokita S, et al. Strategy of gastric cancer in patients 85 years old and older. **Hepatogastroenterology** 1999; 46:2091-5.

Iwamatsu H, Nishikura K, Watanabe H, et al. Heterogeneity of p53 mutational status in the superficial spreading type of early gastric carcinoma. **Gastric Cancer** 2001; 4:20-6.

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.

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.

Joypaul BV, Hopwood D, Newman EL, et al. The prognostic significance of the accumulation of p53 tumour-suppressor gene protein in gastric adenocarcinoma. **Br J Cancer** 1994; 69:943-6.

Takeji Y, Korenaga D, Tsujitani S, et al. Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasising to lymph nodes. **Br J Cancer** 1993; 67:589-93.

Kanemitsu K, Kawasaki K, Nakamura M, et al. MSI is frequently recognized among gastric cancer patients with a family history of cancer. **Hepatogastroenterology** 2007; 54:2410-4.

Katai H, Sasako M, Sano T, Fukagawa T. Gastric cancer surgery in the elderly without operative mortality. **Surg Oncol** 2004; 13:235-8.

Katai H, Sasako M, Sano T, Maruyama K. Gastric carcinoma in young adults. **Jpn J Clin Oncol** 1996; 26:139-43.

Kath R, Fiehler J, Schneider CP, Hoffken K. Gastric cancer in very young adults: apropos four patients and a review of the literature. **J Cancer Res Clin Oncol** 2000; 126:233-7.

Kawasaki K, Kanemitsu K, Yasuda T, Kamigaki T, Kuroda D, Kuroda Y. Family history of cancer in Japanese gastric cancer patients. **Gastric Cancer** 2007; 10:173-5.

Keller G, Grimm V, Vogelsang H, et al. Analysis for microsatellite instability and mutations of the DNA mismatch repair gene hMLH1 in familial gastric cancer. **Int J Cancer** 1996; 68:571-6.

Keller G, Vogelsang H, Becker I, et al. Germline mutations of the E-cadherin(*CDH1*) and *TP53* genes, rather than of *RUNX3* and *HPP1*, contribute to genetic predisposition in German gastric cancer patients. **J Med Genet** 2004; 41:89.

Kim DY, Joo JK, Ryu SY, Park YK, Kim YJ, Kim SK. Clinicopathologic characteristics of gastric carcinoma in elderly patients: a comparison with young patients. **World J Gastroenterol** 2005; 11:22-6.

Kim DY, Ryu SY, Kim YJ, Kim SK. Clinicopathological characteristics of gastric carcinoma in young patients. **Langenbecks Arch Surg** 2003; 388:245-9.

Kim IJ, Kang HC, Shin Y, et al. A *TP53*-truncating germline mutation (E287X) in a family with characteristics of both hereditary diffuse gastric cancer and Li-Fraumeni syndrome. **J Hum Genet** 2004; 49:591-5.

Kim KM, Lee A, Chae HS, Shim SI. Expression of p53 and NDP-K/nm23 in gastric carcinomas--association with metastasis and clinicopathologic parameters. **J Korean Med Sci** 1995; 10:406-13.

Koea JB, Karpeh MS, Brennan MF. Gastric cancer in young patients: demographic, clinicopathological, and prognostic factors in 92 patients. **Ann Surg Oncol** 2000; 7:346, 45-51.

Kokkola A, Sipponen P. Gastric carcinoma in young adults. **Hepatogastroenterology** 2001; 48:1552-5.

Koshida Y, Koizumi W, Sasabe M, Katoh Y, Okayasu I. Association of *Helicobacter pylori*-dependent gastritis with gastric carcinomas in young Japanese patients: histopathological comparison of diffuse and intestinal type cancer cases. **Histopathology** 2000; 37:124-30.

Kremer M, Quintanilla-Martinez L, Fuchs M, et al. Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on tumorigenicity and metastasis. **Carcinogenesis** 2003; 24:1879-86.

Kusano M, Kakiuchi H, Mihara M, et al. Absence of microsatellite instability and germline mutations of E-cadherin, APC and p53 genes in Japanese familial gastric cancer. **Tumour Biol** 2001; 22:262-8.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature** 1992; 358:

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; 64:46-9.

Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:4970-3.

Lee HS, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kim WH. Tumour suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis. **J Pathol** 2003; 200:39-46.

Lee WJ, Shun CT, Hong RL, Wu MS, Chang KJ, Chen KM. Overexpression of p53 predicts shorter survival in diffuse type gastric cancer. **Br J Surg** 1998; 85:1138-42.

Lehtola J. Family study of gastric carcinoma; With special reference to histological types. **Scand J Gastroenterol Suppl** 1978; 50-4.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. **Nature** 1991; 351:453-6.

Lewis FR, Mellinger JD, Hayashi A, et al. Prophylactic total gastrectomy for familial gastric cancer. **Surgery** 2001; 130:612-7.

Li FP, Fraumeni JF, Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. **J Natl Cancer Inst** 1969; 43:1365-73.

Li FP, Fraumeni JF, Jr., Mulvihill JJ, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Res** 1988; 48:5358-62.

Lim BH, Soong R, Grieu F, Robbins PD, House AK, Iacopetta BJ. p53 accumulation and mutation are prognostic indicators of poor survival in human gastric carcinoma. **Int J Cancer** 1996; 69:200-4.

Lim S, Lee HS, Kim HS, Kim YI, Kim WH. Alteration of E-cadherin-mediated adhesion protein is common, but microsatellite instability is uncommon in young age gastric cancers. **Histopathology** 2003; 42:128-36.

Liu XP, Tsushimi K, Tsushimi M, et al. Expression of p21(WAF1/CIP1) and p53 proteins in gastric carcinoma: its relationships with cell proliferation activity and prognosis. **Cancer Lett** 2001; 170:183-9.

Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. **Neoplasia** 2000; 2:208-25.

Llanos O, Butte JM, Crovari F, Duarte I, Guzman S. Survival of young patients after gastrectomy for gastric cancer. **World J Surg** 2006; 30:17-20.

Lo NC, Monteverde M, Riba M, et al. Expression profiling and long lasting responses to chemotherapy in metastatic gastric cancer. **Int J Oncol** 2010; 37:1219-28.

Maconi G, Kurihara H, Panizzo V, et al. Gastric cancer in young patients with no alarm symptoms: focus on delay in diagnosis, stage of neoplasm and survival. **Scand J Gastroenterol** 2003; 38:1249-55.

Maehara Y, Emi Y, Tomisaki S, et al. Age-related characteristics of gastric carcinoma in young and elderly patients. **Cancer** 1996; 77:1774-80.

Malkin D. p53 and the Li-Fraumeni syndrome. **Biochim Biophys Acta** 1994; 1198:197-213.

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 1990; 250:1233-8.

Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. **Am J Surg Pathol** 1999; 23:1248-55.

Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. **Int J Cancer** 1992; 50:859-62.

May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene** 1999; 18:7621-36.

MC Neer G. Cancer of the stomach in the young. **Am J Roentgenol** 1941; 45:537-50.

McCulloch P, Taggart T, Ochiai A, O'Dowd G, Nash J, Sasako M. c-erbB2 and p53 expression are not associated with stage progression of gastric cancer in Britain or Japan. **Eur J Surg Oncol** 1997; 23:304-9.

McGill TW, Downey EC, Westbrook J, Wade D, de la Garza J. Gastric carcinoma in children. **J Pediatr Surg** 1993; 28:1620-1.

Medina-Franco H, Heslin MJ, Cortes-Gonzalez R. Clinicopathological characteristics of gastric carcinoma in young and elderly patients: a comparative study. **Ann Surg Oncol** 2000; 7:515-9.

Milne AN, Carneiro F, O'Morain C, Offerhaus GJ. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. **Hum Genet** 2009; 126:615-28.

Milne AN, Carvalho R, Morsink FM, et al. Early-onset gastric cancers have a different molecular expression profile than conventional gastric cancers. **Mod Pathol** 2006; 19:564-72.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2010.

Mitsudomi T, Matsusaka T, Wakasugi K, et al. A clinicopathological study of gastric cancer with special reference to age of the patients: an analysis of 1,630 cases. **World J Surg** 1989; 13:225-30.

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.

Nakamura T, Yao T, Niho Y, Tsuneyoshi M. A clinicopathological study in young patients with gastric carcinoma. **J Surg Oncol** 1999; 71:214-9.

Nakata B, Chung KH, Ogawa M, et al. p53 protein overexpression as a predictor of the response to chemotherapy in gastric cancer. **Surg Today** 1998; 28:595-8.

Nelson JL. Microchimerism in human health and disease. **Autoimmunity** 2003; 36:5-9.

Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. **N Engl J Med** 1991; 325:1132-6.

Norton JA, Ham CM, Van Dam J, Jeffrey RB, Longacre TA, Huntsman DG et al. CDH1 truncating mutations in the E-cadherin gene: an indication for total gastrectomy to treat hereditary diffuse gastric cancer. **Ann Surg** 2007; 245:873-79.

Nottingham J. Signet-ring carcinoma of stomach in a child. **Histopathology** 1994; 24:490-1.

O'Farrell TJ, Ghosh P, Dobashi N, Sasaki CY, Longo DL. Comparison of the effect of mutant and wild-type p53 on global gene expression. **Cancer Res** 2004; 64:8199-207.

Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. **Mutat Res** 1994; 305:253-64.

Oiwa H, Maehara Y, Ohno S, Sakaguchi Y, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Growth pattern and p53 overexpression in patients with early gastric cancer. **Cancer** 1995; 75:1454-9.

Oliveira C, Ferreira P, Nabais S, et al. E-Cadherin (*CDH1*) and p53 rather than SMAD4 and Caspase-10 germline mutations contribute to genetic predisposition in Portuguese gastric cancer patients. **Eur J Cancer** 2004; 40:1897-903.

Oliveira C, Seruca R, Caldas C. Genetic screening for hereditary diffuse gastric cancer. **Expert Rev Mol Diagn** 2003; 3:201-15.

Oliveira C, Seruca R, Carneiro F. Genetics, pathology, and clinics of familial gastric cancer. **Int J Surg Pathol** 2006; 14:21-33.

Oliveira C, Seruca R, Seixas M, Sobrinho-Simoes M. The clinicopathological features of gastric carcinomas with microsatellite instability may be mediated by mutations of different "target genes": a study of the TGFbeta RII, IGFII R, and BAX genes. **Am J Pathol** 1998; 153:1211-9.

Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and *TP53* genotype. **Cancer Res** 2003; 63:6643-50.

Ottini L, Palli D, Falchetti M, et al. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with tumor location and family history in a high-risk population from Tuscany. **Cancer Res** 1997; 57:4523-9.

Palli D, Galli M, Caporaso NE, et al. Family history and risk of stomach cancer in Italy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1994; 3:15-8.

Palmero EI, Schuler-Faccini L, et al. Detection of R337H, a germline *TP53* mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Lett** 2008; 261:21-5.

Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. **Cancer Lett** 2008; 266:99-115.

Paraf F, Gilquin M, Longy M, et al. MLH1 and MSH2 protein immunohistochemistry is useful for detection of hereditary non-polyposis colorectal cancer in young patients. **Histopathology** 2001; 39:250-8.

Park JG, Yang HK, Kim WH, Caldas C, Yokota J, Guilford PJ. Report on the first meeting of the International Collaborative Group on Hereditary Gastric Cancer. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:1781-2.

Park YJ, Shin KH, Park JG. Risk of gastric cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Korea. **Clin Cancer Res** 2000; 6:2994-8.

Parsonnet J, Vandersteen D, Goates J, Sibley RK, Pritikin J, Chang Y. Helicobacter pylori infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. **J Natl Cancer Inst** 1991; 83:640-43.

Pedrazzani C, Corso G, Marrelli D, Roviello F. E-cadherin and hereditary diffuse gastric cancer. **Surgery** 2007; 142:645-57.

Peek RM, Jr., Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:28-37.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Hum Mutat** 2007; 28:622-9.

Pharoah PD, Guilford P, Caldas C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. **Gastroenterology** 2001; 121:1348-53.

Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, Domenice S, Mendonca BB, Latronico AC. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 2004; 48:647-50.

Pinto M, Wu Y, Mensink RG, Cirnes L, Seruca R, Hofstra RM. Somatic mutations in mismatch repair genes in sporadic gastric carcinomas are not a cause but a consequence of the mutator phenotype. **Cancer Genet Cytogenet** 2008; 180:110-4.

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.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. **Genes Dev** 2000; 14:1837-51.

Poremba C, Yandell DW, Huang Q, et al. Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer--a molecular genetic and immunohistochemical study. **Virchows Arch** 1995; 426:447-55.

Ramacciato G, Aurello P, D'Angelo F, Cicchini C, Sternberg CN. Does extended lymphadenectomy influence prognosis of gastric carcinoma after curative resection?. **Hepatogastroenterology** 2000; 47:1470-4.

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.

Ramos-De la Medina A, Salgado-Nesme N, Torres-Villalobos G, Medina-Franco H. Clinicopathologic characteristics of gastric cancer in a young patient population. **J Gastrointest Surg** 2004; 8:240-4.

Ranzani GN, Luinetti O, Padovan LS, et al. p53 gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1995; 4:223-31.

Renault B, Calistri D, Buonsanti G, Nanni O, Amadori D, Ranzani GN. Microsatellite instability and mutations of p53 and TGF-beta RII genes in gastric cancer. **Hum Genet** 1996; 98:601-7.

Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:9330-5.

Rigau V, Sebbagh N, Olschwang S, et al. Microsatellite instability in colorectal carcinoma. The comparison of immunohistochemistry and molecular biology suggests a role for hMSH6 [correction of hMLH6] immunostaining. **Arch Pathol Lab Med** 2003; 127:694-700.

Roviello F, Corso G, Pedrazzani C, et al. High incidence of familial gastric cancer in Tuscany, a region in Italy. **Oncology** 2007; 72:243-47.

Roviello F, Marrelli D, Morgagni P, et al. Survival benefit of extended D2 lymphadenectomy in gastric cancer with involvement of second level lymph nodes: a longitudinal multicenter study. **Ann Surg Oncol** 2002; 9:894-900.

Roviello F, Marrelli D, Vindigni C, De SA, 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.

Rugge M, Bovo D, Busatto G, et al. p53 alterations but no human papillomavirus infection in preinvasive and advanced squamous esophageal cancer in Italy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1997; 6:171-6.

Rugge M, Shiao YH, Busatto G, et al. The p53 gene in patients under the age of 40 with gastric cancer: mutation rates are low but are associated with a cardiac location. **Mol Pathol** 2000; 53:207-10.

Saito A, Kanai Y, Maesawa C, Ochiai A, Torii A, Hirohashi S. Disruption of E-cadherin-mediated cell adhesion systems in gastric cancers in young patients. **Jpn J Cancer Res** 1999; 90:993-99.

Sanchez-Bueno F, Garcia-Marcilla JA, Perez-Flores D, et al. Prognostic factors in a series of 297 patients with gastric adenocarcinoma undergoing surgical resection. **Br J Surg** 1998; 85:255-60.

Santoro R, Carboni F, Lepiane P, Ettorre GM, Santoro E. Clinicopathological features and prognosis of gastric cancer in young European adults. **Br J Surg** 2007; 94:737-42.

Sasaki H, Sasano H, Ohi R, et al. Adenocarcinoma at the esophageal gastric junction arising in an 11-year-old girl. **Pathol Int** 1999; 49:1109-13.

Sasako M. Principles of surgical treatment for curable gastric cancer. **J Clin Oncol** 2003; 21:274s-5s.

Sasako M, Katai H, Sano T, Maruyama K. Management of complications after gastrectomy with extended lymphadenectomy. **Surg Oncol** 2000; 9:31-4.

Shaulsky G, Goldfinger N, Tosky MS, Levine AJ, Rotter V. Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. **Oncogene** 1991; 6:2055-65.

Shun CT, Wu MS, Lin JT, et al. Relationship of p53 and c-erbB-2 expression to histopathological features, Helicobacter pylori infection and prognosis in gastric cancer. **Hepatogastroenterology** 1997; 44:604-9.

Siewert JR, Bottcher K, Roder JD, Busch R, Hermanek P, Meyer HJ. Prognostic relevance of systematic lymph node dissection in gastric carcinoma. German Gastric Carcinoma Study Group. **Br J Surg** 1993; 80:1015-8.

Siewert JR, Kestlmeier R, Busch R, et al. Benefits of D2 lymph node dissection for patients with gastric cancer and pN0 and pN1 lymph node metastases. **Br J Surg** 1996; 83:1144-7.

Silva EM. **Morfogênese dos adenocarcinomas gástricos e expressão de E-caderina, â-catenina, clatrina e mucinas.** Sao Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundacao Antonio Prudente].

Silva EM, Begnami MD, Fregnani JH, et al. Cadherin-catenin adhesion system and mucin expression: a comparison between young and older patients with gastric carcinoma. **Gastric Cancer** 2008; 11:149-59.

Smith BR, Stabile BE. Extreme aggressiveness and lethality of gastric adenocarcinoma in the very young. **Arch Surg** 2009; 144:506-10.

Sobin LH, Wittekind CH. **TNM classificação dos tumores malignos**. 6 ed. Trad. de INCA. Rio de Janeiro: INCA; 2002.

Solcia E, Fiocca R, Luinetti O, et al. Intestinal and diffuse gastric cancers arise in a different background of *Helicobacter pylori* gastritis through different gene involvement. **Am J Surg Pathol** 1996; 20 Suppl 1:S8-22.

Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. **Nature** 1990; 348:747-9.

Stephens MR, Lewis WG, White S, et al. Prognostic significance of alarm symptoms in patients with gastric cancer. **Br J Surg** 2005; 92:840-6.

Stone J, Bevan S, Cunningham D, et al. Low frequency of germline E-cadherin mutations in familial and nonfamilial gastric cancer. **Br J Cancer** 1999; 79:1935-37.

Sugano K, Taniguchi T, Saeki M, Tsunematsu Y, Tomaru U, Shimoda T. Germline p53 mutation in a case of Li-Fraumeni syndrome presenting gastric cancer. **Jpn J Clin Oncol** 1999; 29:513-6.

Suraweera N, Iacopetta B, Duval A, Compoint A, Tubacher E, Hamelin R. Conservation of mononucleotide repeats within 3' and 5' untranslated regions and their instability in MSI-H colorectal cancer. **Oncogene** 2001; 20:7442-77.

Suriano G, Oliveira C, Ferreira P, et al. Identification of *CDH1* germline missense mutations associated with functional inactivation of the E-cadherin protein in young gastric cancer probands. **Hum Mol Genet** 2003; 12:575-82.

Suriano G, Yew S, Ferreira P, et al. Characterization of a recurrent germ line mutation of the E-cadherin gene: implications for genetic testing and clinical management. **Clin Cancer Res** 2005; 11:5401-9.

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

Takeno S, Noguchi T, Kikuchi R, Sato T, Uchida Y, Yokoyama S. Analysis of the survival period in resectable stage IV gastric cancer. **Ann Surg Oncol** 2001; 8:215-21.

Tanaka M, Kitajima Y, Edakuni G, Sato S, Miyazaki K. Abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin may be a molecular marker of submucosal invasion and lymph node metastasis in early gastric cancer. **Br J Surg** 2002; 89:236-44.

Theuer CP, de Virgilio C, Keese G, et al. Gastric adenocarcinoma in patients 40 years of age or younger. **Am J Surg** 1996; 172:473-6.

Tso PL, Bringaze WL, III, Dauterive AH, Correa P, Cohn I, Jr. Gastric carcinoma in the young. **Cancer** 1987; 59:1362-5.

Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. **Int J Cancer** 1993; 54:759-64.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:261-8.

Varley JM. Germline *TP53* mutations and Li-Fraumeni syndrome. **Hum Mutat** 2003; 21:313-20.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. Germ-line mutations of *TP53* in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. **Cancer Res** 1997; 57:3245-52.

Victorzon M, Nordling S, Haglund C, Lundin J, Roberts PJ. Expression of p53 protein as a prognostic factor in patients with gastric cancer. **Eur J Cancer** 1996; 32A:215-20.

Vogiatzi P, Vindigni C, Roviello F, Renieri A, Giordano A. Deciphering the underlying genetic and epigenetic events leading to gastric carcinogenesis. **J Cell Physiol** 2007; 211:287-95.

Werner M, Becker KF, Keller G, Hofler H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. **J Cancer Res Clin Oncol** 2001; 127:207-16.

Windham TC, Termuhlen PM, Ajani JA, Mansfield PF. Adenocarcinoma of the stomach in patients age 35 years and younger: no impact of early diagnosis on survival outcome. **J Surg Oncol** 2002; 81:118-24.

World Health Organization. **World Cancer Report 2008**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2009.

Yamada H, Shinmura K, Okudela K, et al. Identification and characterization of a novel germ line p53 mutation in familial gastric cancer in the Japanese population. **Carcinogenesis** 2007; 28:2013-8.

Yan Z, Lambert NC, Guthrie KA, et al. Male microchimerism in women without sons: quantitative assessment and correlation with pregnancy history. **Am J Med** 2005; 118:899-906.

Yokota T, Takahashi N, Teshima S, et al. Early gastric cancer in the young: clinicopathological study. **Aust N Z J Surg** 1999; 69:443-6.

Yonemura Y, Fushida S, Tsugawa K, et al. Correlation of p53 expression and proliferative activity in gastric cancer. **Anal Cell Pathol** 1993; 5:277-88.



Original article

Cadherin-catenin adhesion system and mucin expression: a comparison between young and older patients with gastric carcinoma

EDAISE M. SILVA¹, MARIA D. BEGNAMI¹, JOSÉ HUMBERTO T.G. FREGNANI², ADRIANE G. PELOSOF³, CLAUDIA ZITRON³, ANDRÉ L. MONTAGNINI⁴, and FERNANDO AUGUSTO SOARES¹

¹Department of Anatomic Pathology, Hospital AC Camargo, Rua Antonio Prudente, 109 – 1° Andar, São Paulo 01509-010, Brazil

²Department of Morphology, Medical School of Santa Casa of São Paulo, São Paulo, Brazil

³Endoscopy Service, Hospital AC Camargo, São Paulo, Brazil

⁴Department of Abdominal Surgery, Hospital AC Camargo, São Paulo, Brazil

Abstract

Background. Young patients are thought to develop gastric carcinomas with a molecular genetic profile that is distinct from that of gastric carcinomas occurring at a later age. The aim of this study was to compare the clinicopathological features and expression patterns of the markers E-cadherin and β -catenin, and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) in young and older patients.

Methods. The clinicopathological features and overall survival data of 62 young patients (age ≤ 40 years) with gastric cancer were retrospectively reviewed from hospital records and compared with the data for 453 older patients (age > 40 years). A tissue microarray method and immunohistochemistry were used in order to analyze marker expression in paraffin-embedded tissue blocks obtained from both groups.

Results. The young group presented a higher percentage of diffuse-type tumors in comparison to the older group ($P < 0.01$). The rates of positivity for E-cadherin and β -catenin membranous expression patterns and mucin (MUC2, MUC5AC and MUC6) positivity were higher in the young group ($P < 0.01$). Although young patients showed a lower frequency of alterations in marker expression and had significantly better survival rates than the older patients, neither age nor the marker expression pattern were found to be independent prognostic factors of survival. Only stage, tumor size, and tumor location persisted as prognostic factors for patients with gastric cancer.

Conclusion. Biological markers of cellular adhesion and gastric differentiation were differently expressed in young and older patients. Our findings support the hypothesis that young patients develop carcinomas with a different genetic pathway compared to the pathway of tumors occurring at a later age, and we suggest further investigations to assess the prognostic relevance of the markers to specific subgroups.

Key words Gastric cancer · Young · E-cadherin · β -Catenin · Mucins · Tissue microarray

Introduction

Gastric cancer is thought to involve a combination of environmental factors and an accumulation of specific genetic alterations, which lead to the progressive disturbance of cell growth and differentiation control. The disease occurs predominantly in older patients, with a peak of incidence in patients who are more than 60 years old [1–3].

Several studies have addressed the characteristics of this neoplasia in young patients, suggesting the clinicopathological and biological characteristics in young patients differ in many ways from gastric carcinoma in older patients. For young patients, the male:female ratio is approximately equal [3] or shows female predominance [4, 5], and the tumors are usually poorly differentiated, diffuse-type or infiltrative carcinomas [6–8]. Some authors have suggested that young patients have a worse prognosis, mainly due to the delay in diagnosis and more aggressive tumor behavior [6, 7, 9, 10], whereas others have shown no difference in survival between young and older patients [11, 12]. Also, young patients are thought to develop carcinomas with a molecular genetic profile that is distinct from that of sporadic carcinomas occurring at a later age [13–15].

A better understanding of the molecular differences between gastric carcinomas affecting young and old patients would allow us to investigate specific molecular biomarkers that could be involved in early gastric carcinogenesis, and the identification of such markers could then improve early diagnosis for specific groups.

Several studies have shown considerable interest in the influence of cell adhesion molecules such as E-cadherin and β -catenin, and also the mucins, in the development and progression of gastric tumors. Previous results from our group showed, through gene expression analyses using cDNA microarrays, that a large series of genes, including E-cadherin and MUC6

gene expression, were differently expressed in gastric carcinomas [16].

E-cadherin is a transmembrane calcium-dependent cell adhesion molecule which plays an important role in the maintenance of intercellular adhesion, cell polarity, and mucosal architecture [17, 18]. Functional cadherin-dependent cell adhesion requires the formation of complexes between E-cadherin and cytoplasmic proteins known as the catenins (e.g., β -catenin). β -Catenin is a multifunctional protein which plays an important role in Wingless/Wnt signaling transduction, in addition to its function as a cell-adhesion molecule [19]. Nuclear β -catenin expression was correlated with poor prognosis in several malignances [20]. Impairment of one or more components of this complex is associated with poor differentiation, dysfunction of intercellular adhesion, increased invasiveness of carcinomas [18, 21], and tumor progression and metastasis [22]. E-cadherin (*CDH1*) gene mutations have been associated with familial gastric cancer [23–27]. Not only E-cadherin gene alterations but also structural abnormalities and/or catenin dysfunction cause disruption of the E-cadherin-mediated cell adhesion system [19].

Mucins are the major component of the mucous gel that covers the surface of epithelial tissue, and at least 13 mucins have been found [28]. It has been suggested that alterations in mucin expression may contribute to cancer invasion and metastatic capabilities through changes in cancer-cell growth regulation, immune recognition, and cellular adhesion [29–31]. The process of neoplastic transformation in the stomach has been reported to be associated with the decreased expression of mucins that are normally expressed in gastric mucosa (including MUC1, MUC5AC, and MUC6) and with the de novo expression of mucins (e.g., MUC2) that are normally expressed in other organs [32, 33].

The present study represents a retrospective analysis of patients with gastric carcinoma, carried out in order to compare the clinicopathological features and overall survival between two groups of patients divided by age (≤ 40 and > 40 years of age) and analyze whether differences exist between young and older patients in the expression of markers considered to be important in conventional gastric carcinogenesis, such as E-cadherin, β -catenin, and the mucins MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6.

Patients, materials, and methods

Patients

This was a retrospective study of the tumor registry of patients who were admitted to the Hospital AC Camargo (São Paulo, Brazil) for the management of adenocarci-

noma of the stomach between 1988 and 2005. A total of 515 patients were identified during the study period, and the clinicopathological features of these patients, including information on each patient's age, sex, tumor size, tumor location, histological tumor type, nodal involvement, and stage were reviewed. Tumor size was categorized according the mean size of all tumors (≤ 5 cm and > 5 cm) and tumor location was categorized as being in proximal or distal regions. Histologically, tumors were classified into three main groups: intestinal-type, diffuse-type, and mixed/unclassified-type gastric adenocarcinomas, according to the Laurén histological classification [34]. Pathological stage was classified according to the International Union Against Cancer (UICC) tumor-node-metastasis system (TNM) and it was categorized as early (stages I and II) and advanced (stages III and IV) for statistical analyses. The follow-up data were obtained from the hospital records. Overall survival was defined as the time elapsed between primary treatment and death from gastric cancer or from other causes.

Tissue microarray method and immunohistochemistry

Formalin-fixed, paraffin wax-embedded tissues from 515 gastric carcinomas were retrieved from the archival tissue bank of the Department of Anatomic Pathology. A section from each specimen was stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological evaluation and the selection of morphologically representative sites in the tumors to construct tissue microarray (TMA) blocks. Our series included 470 cases from TMA blocks (including 17 cases from young patients) and another 45 cases analyzed in conventional sections (including 6 tumor-derived biopsies from young patients). For TMA block construction, tissue core biopsies (diameter, 0.6 mm) were punched from selected regions of donor paraffin-embedded tumor blocks and precisely arrayed into a new recipient paraffin block, using a precision instrument (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA). Published studies on TMAs have reported the comparability of immunohistochemical results from TMAs versus corresponding large sections [35, 36]. These studies found that the analysis of two cores provided representative information, as compared with the corresponding whole-tissue section. In the present study, all the cases were spotted twice in each TMA block and immunohistochemistry was carried out in two slides at different depth levels, to increase the accuracy and the strength of the array-based data. Immunohistochemical analysis was performed in 3- μ m-thick sections from each sample of TMA block and conventional blocks by the standard streptavidin-biotin peroxidase technique. Briefly, tissue sections were deparaffinized and rehydrated, and antigen retrieval was performed by placing

the tissue sections in citrate buffer (0.01 M, pH 6.0) in a pressure cooker. Endogenous peroxidase was blocked using 3% hydrogen peroxide and then the sections were washed with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The sections were incubated with a primary mouse monoclonal antibody overnight at 4°C: E-cadherin (1: 750; BD Transduction, San Jose, CA, USA); β -catenin (1: 1000; BD Transduction); all mucins, by Novocastra (New Castle, UK); MUC1 [1: 500], MUC2 [1: 1000], MUC5AC [1: 500], and MUC6 [1: 600]. Then, the sections were incubated for 30 min at room temperature with biotinylated secondary antibodies (K492; DAKO, Copenhagen, Denmark), followed by three washes in PBS and incubation with 3, 3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride solution for 5 min. The sections were counterstained with hematoxylin. For negative control preparations, the primary antibodies were omitted from the reaction sequence.

The expression of E-cadherin and β -catenin in malignant cells was compared with that in nonmalignant cells. Only a membranous pattern, which was stained as strongly as normal epithelial cells, was considered to be normal. In contrast, an absent pattern (loss of staining), a cytoplasmic pattern (cytoplasmic staining with loss of membranous expression), and a heterogeneous pattern (cytoplasmic staining with preservation of membranous expression) were categorized as altered patterns [21]. Nuclear staining of β -catenin was also categorized as an altered pattern. In the case of mixed patterns in some sections, the classification was based on the dominant pattern. The expression of the mucins MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 was considered positive if at least 10% of the neoplastic cells were stained [37].

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the SPSS 13.0 statistical software program (SPSS, Chicago, IL, USA). The χ^2 test and Fisher's exact test were used to

analyze the association between age and clinicopathological parameters and molecular biomarker expression. Five-year survival rates were estimated using the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was used to compare the curves. The Cox proportional hazards model was performed to find the independent risk factors for death. For all tests, the alpha error was set at 5%.

Results

A total of 515 patients with gastric adenocarcinomas were divided into two groups according to their age: young (age ≤ 40 years; $n = 62$) and older patients (age > 40 years; $n = 453$). Of the 62 young patients (mean age, 35 years), 38 (61.3%) were 35 years old or younger, and 20 (32.2%) were less than 30 years old.

Table 1 summarizes the clinicopathological findings of gastric carcinoma in the 515 patients divided by age (≤ 40 years vs > 40 years old). The young and older patients had similar distributions with respect to sex, tumor location, and stage ($P > 0.05$). There were some differences in distributions related to tumor size and lymph node metastasis, but the differences did not reach statistical significance. According to Laurén's histological classification [34], the young group had a significantly higher percentage of diffuse-type tumor than the older group ($P < 0.01$).

Representative immunohistochemistry staining for marker expression pattern in the gastric cancer can be seen in Figs. 1–3. As shown in Table 2, alterations in the E-cadherin/ β -catenin adhesion complex patterns occurred in a high percentage of gastric carcinomas in both groups of patients: 73% of all evaluated samples presented are altered E-cadherin (absent/reduced) expression pattern, and 91% of all samples showed an altered β -catenin expression pattern. The rate of E-cadherin preserved membranous expression was higher

Table 1. Comparison of clinicopathological characteristics between young and older patients with gastric carcinoma

Variable	Category	≤ 40 Years $n = 62$ (%)	> 40 Years $n = 453$ (%)	<i>P</i> value
Sex	M	38 (61.3)	288 (63.6)	0.73
	F	24 (38.7)	165 (36.4)	
Tumor location	Proximal	9 (15.3)	68 (15.0)	0.96
	Distal	50 (84.7)	385 (85.0)	
Tumor size	≤ 5 cm	31 (53.4)	179 (40.9)	0.07
	> 5 cm	27 (46.6)	259 (59.1)	
Histological type	Intestinal	15 (24.2)	230 (50.8)	< 0.01
	Diffuse	36 (58.1)	146 (32.2)	
	Mixed/unclassified	11 (17.7)	77 (17.0)	
Lymph node metastasis	Negative	21 (35.6)	106 (23.7)	0.05
	Positive	38 (64.4)	342 (76.3)	
Stage	Early	21 (37.5)	127 (31.2)	0.35
	Advanced	35 (62.5)	280 (68.8)	

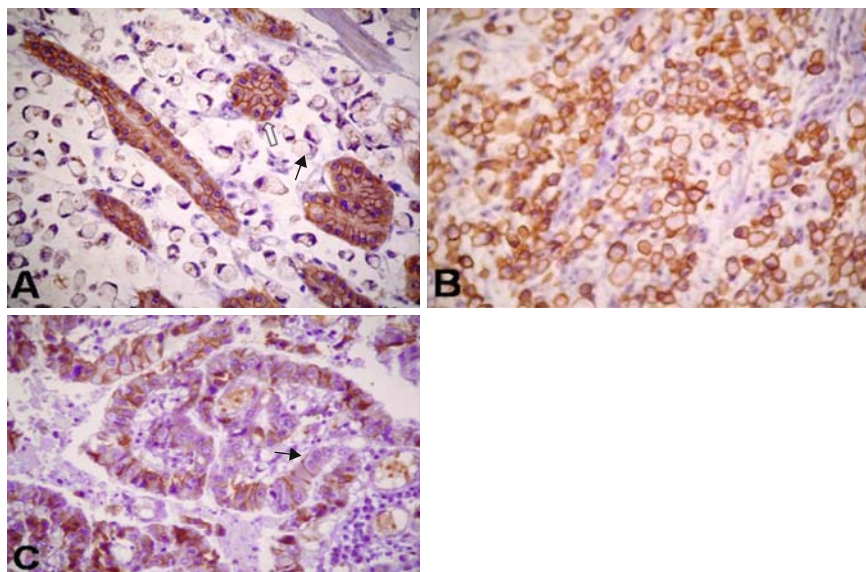


Fig. 1A–C. Representative immunohistochemical staining for E-cadherin in gastric cancer. **A** Diffuse-type gastric tumor displaying loss of membranous E-cadherin pattern expression (*black arrow*). Preserved membranous staining can be seen in adjacent normal glands (*white arrow*). **B** Diffuse-type gastric cancer with preserved membranous expression. **C** Intestinal-type gastric tumor with partial loss of membranous expression (*black arrow*). $\times 400$

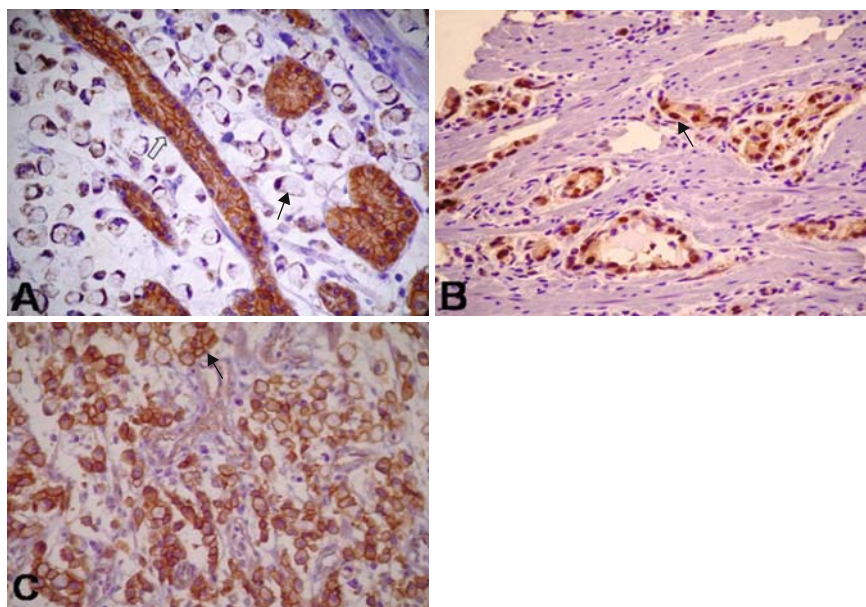


Fig. 2A–C. Representative immunohistochemical staining for β -catenin in gastric cancer. **A** Loss of β -catenin in diffuse-type gastric cancer (*black arrow*) compared with preserved membranous expression in normal glands (*white arrow*). **B** Nuclear staining with cytoplasmic distribution of β -catenin (*black arrow*) in neoplastic cells. **C** Diffuse-type tumor showing preserved membranous expression of β -catenin (*black arrow*). $\times 400$

in the young group than in the older group ($P < 0.01$). Concerning β -catenin pattern expression, a similar situation occurred — the young group showed a higher preservation of membranous β -catenin expression ($P < 0.01$). Comparison of the expression rates of each mucin in the carcinomas of the young and older patients showed that positivity for MUC2, MUC5AC, and MUC6 was higher in young patients with gastric carcinoma when compared with the older group ($P < 0.01$). No significant difference was seen between the positivity rates for MUC1 in the two groups (see Fig. 3A–H for the mucin expression patterns).

Follow-up ranged from 1 day to 177.5 months, with a mean follow-up of 20 months. When the survival analysis was restricted to the young patient group, only the

stage persisted as a prognostic factor. However, univariate analysis of survival for all patients (Table 3) showed that patients with proximal tumor location, larger tumor size (>5 cm), lymph node metastasis, advanced-stage disease (all $P < 0.01$), and MUC6 negativity ($P = 0.01$) had a worse survival rate, as seen in Fig. 4. Sex, histological tumor type, and the expression patterns of E-cadherin, β -catenin, MUC1, MUC2, and MUC5AC were not significant prognostic factors for patients with gastric carcinomas ($P > 0.05$). Of interest, the young patients with gastric carcinoma had a better 5-year survival rate than the older patients ($P = 0.02$) according to the univariate analysis, as seen in Fig. 4 (the age graphic). But multivariate analysis (Table 4) confirmed that only the stage of disease, tumor location, and tumor

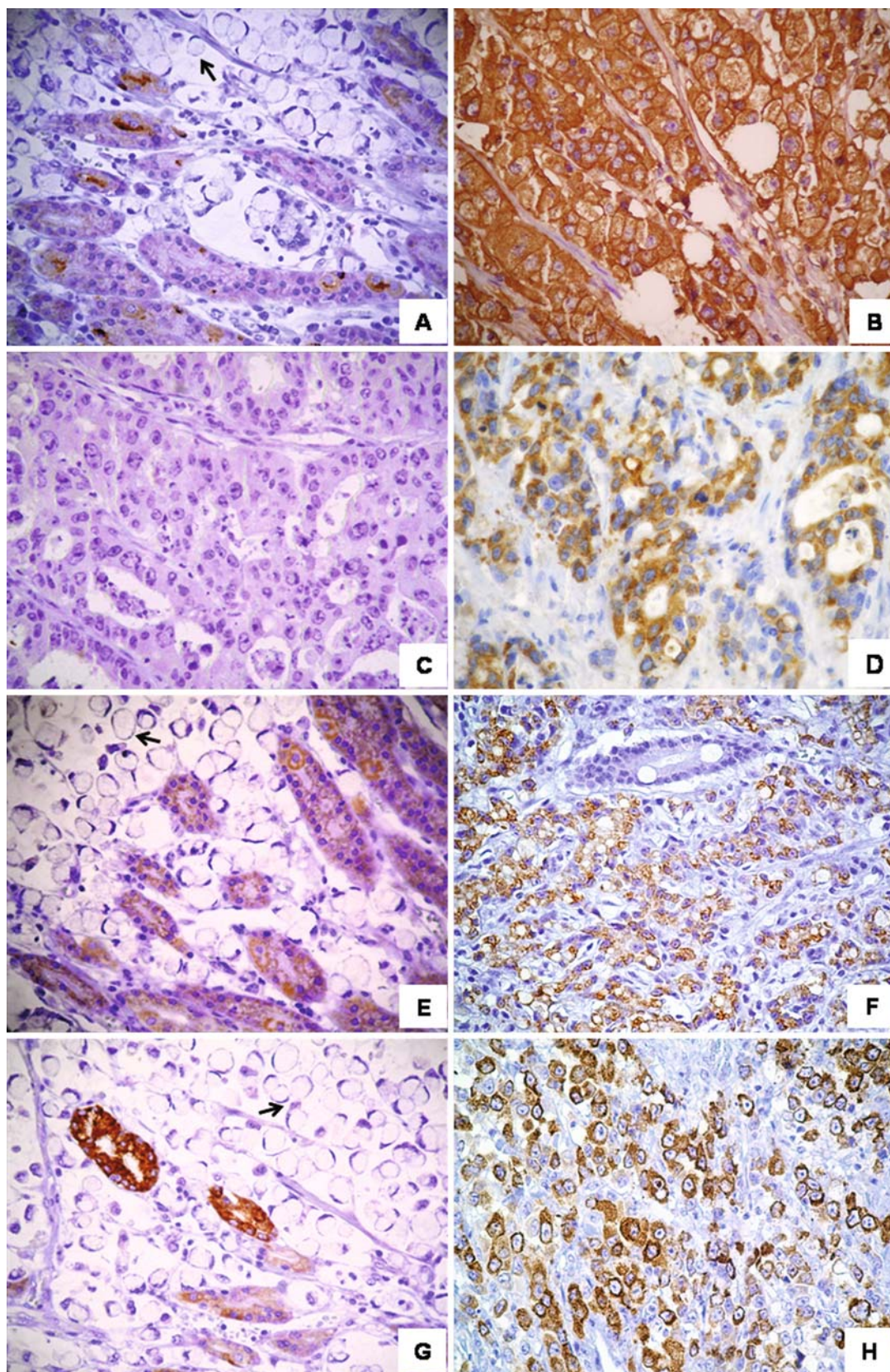


Fig. 3A–H. Representative immunohistochemical staining for mucins in gastric cancer: **A/B**, MUC1; **C/D**, MUC2; **E/F**, MUC5AC; **G/H**, MUC6. *Panels on the left (A, C, E, G) represent negative staining (arrows, neoplastic cells showing negativity), and panels on the right (B, D, F, H) represent positivity.* ×400

Table 2. Comparison of molecular biomarker expression patterns between young and older patients with gastric carcinoma

Variable	Category	≤40 Years <i>n</i> = 62 (%)	>40 Years <i>n</i> = 453 (%)	<i>P</i> value
E-cadherin	Altered	35 (57.4)	322 (74.9)	<0.01
	Membranous	26 (42.6)	108 (25.1)	
β-Catenin	Altered	41 (67.2)	404 (94.0)	<0.01
	Membranous	20 (32.8)	26 (6.0)	
MUC1	Negative	45 (75.0)	346 (82.2)	0.18
	Positive	15 (25.0)	75 (17.8)	
MUC2	Negative	32 (52.5)	389 (89.6)	<0.01
	Positive	29 (47.5)	45 (10.4)	
MUC5AC	Negative	19 (31.7)	349 (80.4)	<0.01
	Positive	41 (68.3)	85 (19.6)	
MUC6	Negative	35 (61.4)	425 (98.6)	<0.01
	Positive	22 (38.6)	6 (1.4)	

Table 3. Five-year overall survival rates according to clinicopathological and molecular biomarker expression in young and older patients with gastric carcinoma

Variables	Category	5-Year survival		<i>P</i> value
		<i>n</i>	rate (%)	
Age	≤40 Years	62	45.5	0.02
	>40 Years	453	30.9	
Sex	M	326	30.8	0.49
	F	188	35.3	
Tumor location	Proximal	76	21.6	<0.01
	Distal	435	34.5	
Tumor size	≤5 cm	209	45.5	<0.01
	>5 cm	286	24.8	
Histological type	Intestinal	244	33.3	0.94
	Diffuse	182	34.3	
	Mixed/unclassified	88	26.4	
Lymph node metastasis	Negative	127	65.1	<0.01
	Positive	379	22.4	
Stage	Early	148	65.9	<0.01
	Advanced	314	19.6	
E-cadherin	Altered	357	32.2	0.88
	Membranous	133	29.5	
β-Catenin	Altered	445	31.8	0.98
	Membranous	45	30.7	
MUC1	Negative	391	32.3	0.10
	Positive	89	25.2	
MUC2	Negative	421	32.2	0.87
	Positive	73	29.8	
MUC5AC	Negative	368	30.3	0.20
	Positive	125	34.6	
MUC6	Negative	460	30.5	0.01
	Positive	27	57.4	

size were independent risk factors for death. This analysis also showed that age itself was not an independent prognostic survival factor for patients with gastric cancer.

Discussion

There are controversies about whether gastric cancer in young patients differs in any way from gastric cancer in

older patients. Young patients with gastric cancer are believed to have more aggressive disease and a poorer prognosis than older patients [7]. A comparative study from Japan demonstrated different features of gastric cancer in patients younger than 40 years compared with those in patients older than 70 years. In patients older than 70 years, tumors were smaller and less infiltrative, and differentiated lesions were more common in comparison to findings in the patients younger than 40 years [38].

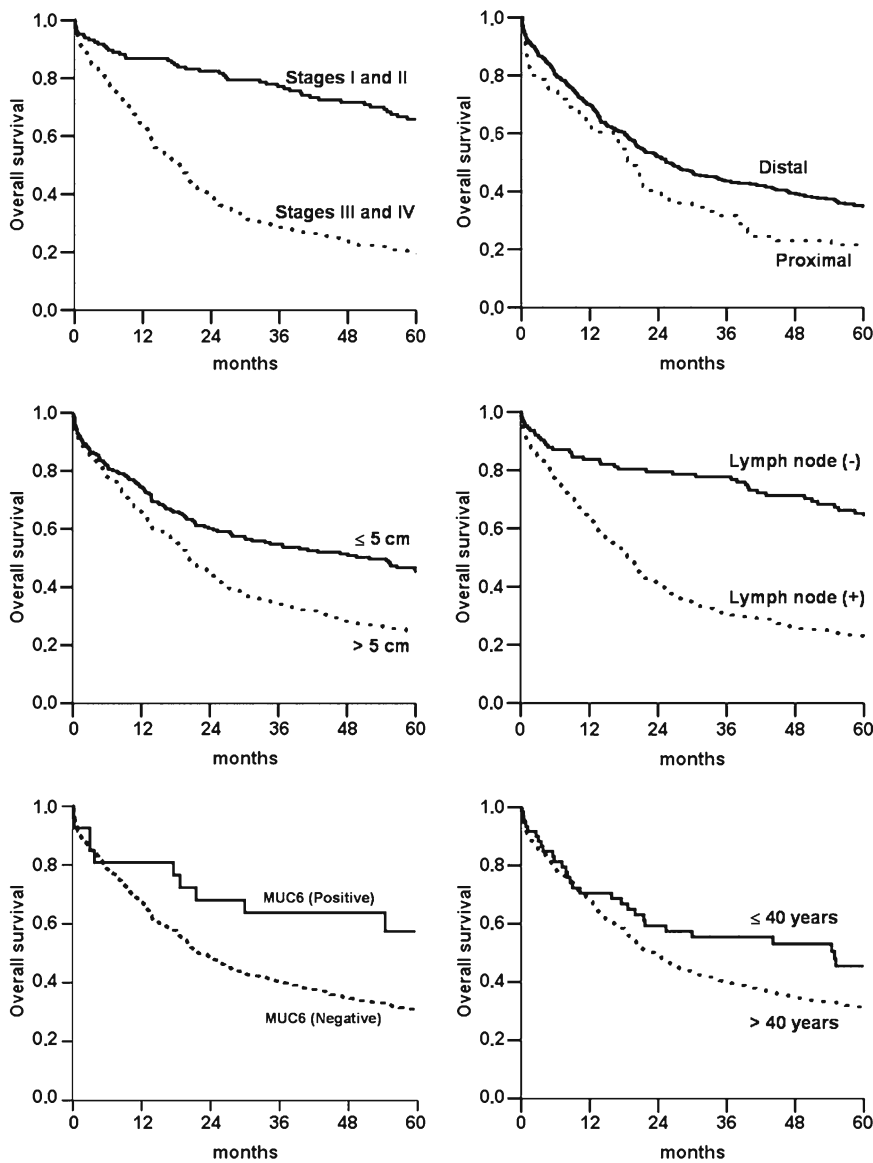


Fig. 4. Five-year overall survival according to the stage ($P < 0.01$), location of the disease ($P < 0.01$), tumor size ($P < 0.01$), lymph node status ($P < 0.01$), MUC6 expression ($P = 0.01$), and age ($P = 0.02$)

Table 4. Independent risk factors for death in patients with gastric carcinoma identified in the Cox proportional hazards model (adjusted for age)

Variables	Category	HR	95% CI	<i>P</i> value
Stage	Early	1	Ref.	<0.01
	Advanced	3.5	2.6–4.7	
Tumor location	Distal	1	Ref.	0.03
	Proximal	1.5	1.1–2.0	
Tumor size	≤5 cm	1	Ref.	0.01
	>5 cm	1.4	1.1–1.7	
Age	≤40 Years	1	Ref.	0.39
	>40 Years	1.2	0.8–1.8	

CI, confidence interval; HR, hazard ratio

In our series, there was a male predominance in both age groups, and there was no significant difference in male-female distribution between the young and older patients, as reported previously [12]. In regard

to the tumor location, the frequency of tumors located in proximal and distal regions in our study was similar in the young and older patients ($P = 0.96$), although some authors have found that the upper third of

the stomach was more frequently involved in young patients [11]. We found that young patients were more likely to present with smaller tumors (≤ 5 cm) than older patients, but the difference did not reach statistical significance.

Diffuse histology has consistently been shown to be associated with a young age at diagnosis [3, 11]. In accordance with previous reports, we found that significantly more young patients had diffuse histology than intestinal or mixed histology, while gastric carcinoma in the older group was usually the intestinal type ($P < 0.01$). This correlation between age and intestinal type, which has been associated with precursor changes described by the multistep carcinogenesis model as a sequential chain of events characterized as chronic gastritis, atrophy, intestinal metaplasia, dysplasia, and carcinoma [39], involves environmental factors. However, the predominance of diffuse-type tumors in young patients suggests an association with genotypic events involving E-cadherin gene mutation in the gastric neoplastic process.

In our series, 75% of all patients presented with node-positive disease. It was expected that as the young group presented with a higher frequency of diffuse-type tumor, this also could represent an increased rate of isolated cells infiltrating the gastric wall and a higher frequency of lymph node metastasis; however, there were no significant differences in lymph node metastasis between the two groups ($P = 0.05$) [11]. In our casuistic, approximately 68% of all patients presented with advanced tumor stage at diagnosis, and no significant differences were found between the two groups in the frequency of early and advanced stage.

Regarding the tested markers, we observed that alterations in E-cadherin/ β -catenin adhesion complex expression occurred in a considerable proportion of gastric carcinomas in both groups of patients (≤ 40 years vs >40 years). The E-cadherin expression pattern has been associated with histological tumor type [40, 41] and it has been suggested that loss of E-cadherin is a crucial defect in diffuse-type tumors, and this could explain the observed phenotype of noncohesive cells [42]. According to this correlation between histological type and cadherin-catenin adhesion system expression, it was expected that, as the young group presented with a higher proportion of diffuse-type tumors, this group could also present with a higher frequency of alterations in the cadherin/catenin complex compared to the older group. However, in our patients, the young group presented with a significantly higher percentage of the membranous expression pattern of the adhesion system complex when compared to findings in the older group (42.6% vs 25.1% for E-cadherin, and 32.8% vs 6.0% for β -catenin; both $P < 0.01$).

We observed some cases of diffuse-type gastric carcinomas displaying E-cadherin and β -catenin membranous expression (Figs. 1B and 2C), and some intestinal-type tumors lacking the expression of these markers (Fig. 1C). These findings strongly suggest that, in some cases, the presence of E-cadherin, as revealed by immunohistochemistry, might not indicate that E-cadherin is necessarily functional. We might consider that E-cadherin interacts with other proteins, such as APC, c-erbB-2, and p120 (not included in this study), and that alterations in these proteins interacting with the cadherin-catenin system may affect its adhesive function, despite the expression of E-cadherin and β -catenin being normal [40, 43–45]. Another possibility might be a functional defect of E-cadherin with normal immunohistochemical expression, as has been shown to occur in diffuse-type gastric cancer due to exon skipping in the E-cadherin gene [46]. Nuclear expression of β -catenin was observed in both groups, but the molecular mechanisms leading to the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway still have to be elucidated in our series. Some authors have reported correlations between the E-cadherin expression pattern and prognosis [47–49], in contrast to the reports of others [40, 50]. According to our data, no correlations were found between E-cadherin and β -catenin expression and prognosis.

Several groups have studied the correlation between *MUC1* gene expression, clinicopathological features, and the prognoses of patients with breast, pancreatic, and colon cancers [51–53]. However, there were conflicting results regarding the prognostic value of MUC1, in part because of the use of different antibodies recognizing different glycoforms or different core peptides of MUC1 mucin, both of characteristics which can be modified during carcinogenesis [54]. In the present study, we did not find that MUC1 had a prognostic role in gastric cancer patients, a finding which is consistent with the results reported by Reis et al. [55], but different from those reported by Utsunomiya et al. [56] and other authors [57], who found that positive MUC1 expression was a marker of malignancy in gastric cancer.

It has been suggested that positivity for the gastric mucins (MUC5AC and MUC6) normally expressed in normal gastric epithelium, and/or positivity for intestinal mucin MUC2 is associated with a better prognosis in gastric adenocarcinoma [56, 58, 59]. Although we did not find any significant correlation between mucin expression and prognosis in our series, we observed that the positive expression of gastric mucins (MUC5AC and MUC6) and the intestinal mucin MUC2 was significantly more frequent in the young than in the older patients.

Some authors have suggested that MUC2 expression in tumors was correlated with lower levels of invasion and lymph node metastasis in gastric carcinomas [56].

Therefore, MUC2 expression may be inversely correlated with tumor aggressiveness in gastric carcinomas. Moreover, MUC2 expression has been related more specifically to the mucinous subtype of the WHO classification, which was included in the diffuse-subtype group of Lauren's classification in our series. In our series, we observed a higher percentage of MUC2 positivity in the young patient group, and we can associate this result as being due to the higher rate of diffuse-type tumor in this group.

In our casuistic, only 5.7% of all patients presented with MUC6 positivity. Other studies reported similar results [33, 60, 61]; in contrast, however, other studies reported higher percentages for positivity [33]. The different results regarding the prognostic value of mucins may reflect the use of different antibodies and also the score chosen for the mucin antigens (at least 10% of neoplastic cells stained). Our univariate analysis indicated that MUC6 positive expression was associated with a significantly better survival rate, but the prognostic value of this marker was not confirmed in the multivariate analysis.

We observed that alterations in E-cadherin/ β -catenin adhesion complex expression and in the mucin (MUC2, MUC5AC and MUC6) expression occurred in a high percentage of gastric carcinomas in both groups of patients (≤ 40 years vs > 40 years), but the older group displayed significantly higher percentages of altered expression patterns. Considering our findings, gastric carcinomas in young patients appear to have characteristics that are different from those of gastric carcinomas occurring at a later age [13, 15]; the markers addressed in this study do not appear to play a predominant role in gastric carcinomas in young patients, considering that these patients displayed higher preservation of marker expression, and in addition, a better survival rate. Despite the significant differences between the groups, the markers we tested were not significant prognostic factors for patients with gastric carcinomas.

In our casuistic, when the overall survival analysis was restricted to the young patient group, none of the other factors except for the tumor stage, were found to have a prognostic significance. The survival analysis for all patients was influenced by age, tumor stage, tumor location, tumor size, and lymph node involvement, as shown by the univariate analysis. However, the multivariate analysis indicated that age was not an independent factor for survival, in agreement with other studies [12, 62]. The pathological stage of gastric cancer remains the most important determinant of the prognosis.

The present study showed that the prognosis of gastric carcinoma is nearly always poor for both young and older groups of patients. Although only tumor stage persisted as an independent prognostic factor independent of the age of the patients, and age itself

was not a prognostic factor, in our series there were significant differences regarding clinicopathological parameters and marker expression patterns between the young and older patients. The young patients had a better survival rate and a higher percentage of marker expression preservation. Our findings support the hypothesis that young patients develop carcinomas that have a different genetic pathway compared with that of tumors occurring at a later age. We suggest further investigations of these young patients to provide clues as to why they are different and to identify subgroups that would benefit from screening and the detection of early disease. Further studies should also assess the prognostic relevance of the markers to specific patient groups.

Acknowledgments Financial support was provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/CEPID) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors thank Dr. Jeremy A. Squire for his critical reading of the manuscript and Sueli Nonogaki, Carlos F. Nascimento, and Severino S. Ferreira for their expert technical assistance.

References

1. Mitsudomi T, Matsusaka T, Wakasugi K, Takenaka M, Kume K, Fujinaga Y, et al. A clinicopathological study of gastric cancer with special reference to age of the patients: an analysis of 1630 cases. *World J Surg* 1989;13:225–30.
2. Sanchez-Bueno F, Garcia-Marcilla JA, Perez-Flores D, Perez-Abad JM, Vicente R, Aranda F, et al. Prognostic factors in a series of 297 patients with gastric adenocarcinoma undergoing surgical resection. *Br J Surg* 1998;85:255–60.
3. Theuer CP, de Virgilio C, Keese G, French S, Arnell T, Tolmos J, et al. Gastric adenocarcinoma in patients 40 years of age or younger. *Am J Surg* 1996;172:473–6.
4. Eguchi T, Takahashi Y, Yamagata M, Kasahara M, Fujii M. Gastric Cancer in Young Patients. *J Am Coll Surg* 1999;188: 22–6.
5. Nakamura T, Yao T, Niho Y, Tsuneyoshi M. A Clinicopathological Study in Young Patients With Gastric Carcinoma. *J Surg Oncol* 1999;71:214–9.
6. Matley PJ, Dent DM, Madden MV, Price SK. Gastric Carcinoma in Young Adults. *Ann Surg* 1988;208:593–6.
7. Tso PL, Bringaze WL, III, Dauterive AH, Correa P, Cohn I, Jr. Gastric Carcinoma in the Young. *Cancer* 1987;59:1362–5.
8. Rugge M, Busatto G, Cassaro M, Shiao YH, Russo V, Leandro G, et al. Patients Younger Than 40 Years With Gastric Carcinoma: *Helicobacter pylori* Genotype and Associated Gastritis Phenotype. *Cancer* 1999;85:2506–11.
9. Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric Carcinoma. *N Engl J Med* 1995; 333:32–41.
10. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele G, Jr, Winchester D, Osteen R. Cancer of the Stomach. A Patient Care Study by the American College of Surgeons. *Ann Surg* 1993;218:583–92.
11. Kim DY, Joo JK, Ryu SY, Park YK, Kim YJ, Kim SK. Clinicopathologic Characteristics of Gastric Carcinoma in Elderly Patients: a Comparison With Young Patients. *World J Gastroenterol* 2005;11:22–6.

12. Medina-Franco H, Heslin MJ, Cortes-Gonzalez R. Clinicopathological Characteristics of Gastric Carcinoma in Young and Elderly Patients: a Comparative Study. *Ann Surg Oncol* 2000;7:515–9.
13. Carvalho R, Milne AN, van Rees BP, Caspers E, Cirnes L, Figueiredo C, et al. Early-Onset Gastric Carcinomas Display Molecular Characteristics Distinct From Gastric Carcinomas Occurring at a Later Age. *J Pathol* 2004;204:75–83.
14. Buffart TE, Carvalho B, Hopmans E, Brehm V, Kranenbarg EK, Schaaij-Visser TB, et al. Gastric Cancers in Young and Elderly Patients Show Different Genomic Profiles. *J Pathol* 2007;211: 45–51.
15. Milne AN, Carvalho R, Morsink FM, Musler AR, de Leng WW, Ristimaki A, Offerhaus GJ. Early-Onset Gastric Cancers Have a Different Molecular Expression Profile Than Conventional Gastric Cancers. *Mod Pathol* 2006;19:564–72.
16. Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, Hirata R, Jr, Pelosof A, Gomes LI, et al. Molecular Classifiers for Gastric Cancer and Nonmalignant Diseases of the Gastric Mucosa. *Cancer Res* 2004;64:1255–65.
17. Suriano G, Mulholland D, de Wever O, Ferreira P, Mateus AR, Bruyneel E, 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.
18. Takeichi M. Cadherin Cell Adhesion Receptors As a Morphogenetic Regulator. *Science* 1991;251:1451–5.
19. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional Interaction of Beta-Catenin With the Transcription Factor LEF-1. *Nature* 1996;382:638–42.
20. 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.
21. Tanaka M, Kitajima Y, Edakuni G, Sato S, Miyazaki K. Abnormal Expression of E-Cadherin and Beta-Catenin May Be a Molecular Marker of Submucosal Invasion and Lymph Node Metastasis in Early Gastric Cancer. *Br J Surg* 2002;89:236–44.
22. Pierceall WE, Woodard AS, Morrow JS, Rimm D, Fearon ER. Frequent Alterations in E-Cadherin and Alpha- and Beta-Catenin Expression in Human Breast Cancer Cell Lines. *Oncogene* 1995;11:1319–26.
23. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, MacLeod PM, Hayashi A, Monaghan KG, et al. Early Gastric Cancer in Young, Asymptomatic Carriers of Germ-Line E-Cadherin Mutations. *N Engl J Med* 2001;344:1904–9.
24. Gayther SA, Gorringe KL, Ramus SJ, Huntsman D, Roviello F, Grehan N, et al. Identification of Germ-Line E-Cadherin Mutations in Gastric Cancer Families of European Origin. *Cancer Res* 1998;58:4086–9.
25. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, et al. E-Cadherin Germline Mutations in Familial Gastric Cancer. *Nature* 1998;392:402–5.
26. Richards FM, McKee SA, Rajpar MH, Cole TR, Evans DG, Jankowski JA, et al. Germline E-Cadherin Gene (CDH1) Mutations Predispose to Familial Gastric Cancer and Colorectal Cancer. *Hum Mol Genet* 1999;8:607–10.
27. Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, Markowitz SD, Willis J, Lynch H, et al. E-Cadherin Germline Mutations Define an Inherited Cancer Syndrome Dominated by Diffuse Gastric Cancer. *Hum Mutat* 1999;14:249–55.
28. Williams SJ, Wreschner DH, Tran M, Eyre HJ, Sutherland GR, McGuckin MA. Muc13, a Novel Human Cell Surface Mucin Expressed by Epithelial and Hemopoietic Cells. *J Biol Chem* 2001;276:18327–36.
29. Bresalier RS, Niv Y, Byrd JC, Duh QY, Toribara NW, Rockwell RW, et al. Mucin Production by Human Colonic Carcinoma Cells Correlates With Their Metastatic Potential in Animal Models of Colon Cancer Metastasis. *J Clin Invest* 1991;87:1037–45.
30. Majuri ML, Mattila P, Renkonen R. Recombinant E-Selectin-Protein Mediates Tumor Cell Adhesion Via Sialyl-Le(a) and Sialyl-Le(x). *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182: 1376–82.
31. Kuan SF, Byrd JC, Basbaum CB, Kim YS. Characterization of Quantitative Mucin Variants From a Human Colon Cancer Cell Line. *Cancer Res* 1987;47:5715–24.
32. Carrato C, Balague C, de Bolos C, Gonzalez E, Gambus G, Planas J, et al. Differential Apomucin Expression in Normal and Neoplastic Human Gastrointestinal Tissues. *Gastroenterology* 1994;107:160–72.
33. Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, Kim YS, Lyftogt C, Cherwitz DL, et al. Mucin Gene Expression in Normal, Preneoplastic, and Neoplastic Human Gastric Epithelium. *Cancer Res* 1995;55: 2681–90.
34. 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.
35. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of Tissue Microarray Technology in Breast Carcinoma. *Lab Invest* 2000;80: 1943–9.
36. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH, 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.
37. Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, et al. Heterogeneity of Mucin Gene Expression in Normal and Neoplastic Tissues. *Cancer Res* 1993;53:641–51.
38. Maehara Y, Emi Y, Tomisaki S, Oshiro T, Kakeji Y, Ichiyoshi Y, et al. Age-Related Characteristics of Gastric Carcinoma in Young and Elderly Patients. *Cancer* 1996;77:1774–80.
39. Correa P, Chen VW. Gastric Cancer. *Cancer Surv* 1994;19–20: 55–76.
40. 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.
41. 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.
42. Machado JC, Soares P, Carneiro F, Rocha A, Beck S, Blin N, et al. E-Cadherin Gene Mutations Provide a Genetic Basis for the Phenotypic Divergence of Mixed Gastric Carcinomas. *Lab Invest* 1999;79:459–65.
43. Shimoyama Y, Hirohashi S. Expression of E- and P-Cadherin in Gastric Carcinomas. *Cancer Res* 1991;51:2185–92.
44. Jawhari AU, Noda M, Pignatelli M, Farthing M. Up-Regulated Cytoplasmic Expression, With Reduced Membranous Distribution, of the Src substrate P120 (Ctn) in Gastric Carcinoma. *J Pathol* 1999;189:180–5.
45. Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, et al. Expression of E-Cadherin and Beta-Catenin in Gastric Carcinoma and Its Correlation With the Clinicopathological Features and Patient Survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987–93.
46. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Huang HH, Nekarda H, Siewert JR, et al. Exon Skipping in the E-Cadherin Gene Transcript in Metastatic Human Gastric Carcinomas. *Hum Mol Genet* 1993;2:803–4.
47. Gabbert HE, Mueller W, Schneiders A, Meier S, Moll R, Birchmeier W, et al. Prognostic Value of E-Cadherin Expression in 413 Gastric Carcinomas. *Int J Cancer* 1996;69:184–9.
48. Grabsch H, Takeno S, Noguchi T, Hommel G, Gabbert HE, Mueller W. Different Patterns of Beta-Catenin Expression in Gastric Carcinomas: Relationship With Clinicopathological Parameters and Prognostic Outcome. *Histopathology* 2001;39: 141–9.
49. Chen HC, Chu RY, Hsu PN, Hsu PI, Lu JY, Lai KH, et al. Loss of E-Cadherin Expression Correlates With Poor Differentiation

- and Invasion into Adjacent Organs in Gastric Adenocarcinomas. *Cancer Lett* 2003;201:97–106.
50. 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.
51. Rahn JJ, Dabbagh L, Pasdar M, Hugh JC. The Importance of MUC1 Cellular Localization in Patients With Breast Carcinoma: an Immunohistologic Study of 71 Patients and Review of the Literature. *Cancer* 2001;91:1973–82.
52. Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, Shirotani K, Irimura T. MUC1 Mucin Expression As a Marker of Progression and Metastasis of Human Colorectal Carcinoma. *Gastroenterology* 1994;106:353–61.
53. Terada T, Ohta T, Sasaki M, Nakanuma Y, Kim YS. Expression of MUC Apomucins in Normal Pancreas and Pancreatic Tumours. *J Pathol* 1996;180:160–5.
54. Kim YS, Gum J, Jr, Brockhausen I. Mucin Glycoproteins in Neoplasia. *Glycoconj J* 1996;13:693–707.
55. 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.
56. Utsunomiya T, Yonezawa S, Sakamoto H, Kitamura H, Hokita S, Aiko T, et al. Expression of MUC1 and MUC2 Mucins in Gastric Carcinomas: Its Relationship With the Prognosis of the Patients. *Clin Cancer Res* 1998;4:2605–14.
57. 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.
58. Baldus SE, Zirbes TK, Engel S, Hanisch FG, Monig SP, Lorenzen J, 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.
59. Baldus SE, Monig SP, Arkenau V, Hanisch FG, Schneider PM, Thiele J, et al. Correlation of MUC5AC Immunoreactivity With Histopathological Subtypes and Prognosis of Gastric Carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2002;9:887–93.
60. Reis CA, David L, Carvalho F, Mandel U, de Bolos C, Mirgorodskaya E, et al. Immunohistochemical Study of the Expression of MUC6 Mucin and Co-Expression of Other Secreted Mucins (MUC5AC and MUC2) in Human Gastric Carcinomas. *J Histochem Cytochem* 2000;48:377–88.
61. 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.
62. Kokkola A, Sipponen P. Gastric Carcinoma in Young Adults. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1552–5.

Anexo 2 - Ficha de Levantamento Câncer Gástrico em Jovens

FICHA Nº: _____

PARA TODAS AS VARIÁVEIS: 88 – NÃO SE APLICA / 99 – IGNORADO

IDENTIFICAÇÃO:	RESUMO
1. RGH:	
2. Nome:	
3. Sexo: 1 – masculino / 2 – feminino	
4. Data Nascimento: dd/mm/aaaa	
5. Idade ao Diagnóstico do câncer gástrico (anos)	
6. Data do diagnóstico:	
7. AP biópsia:	
8. AP peça:	
9. H. PESSOAL PATOLOGICA 0 – Não / 1 - Sim	
10. Diabetes: 0 – Não / 1 – Sim	
11. Obesidade: 0 – Não / 1 – Sim	
12. Doença do Refluxo: 0 – Não / 1 - Sim	
13. Etilismo: 0 – Não / 1 - Sim	
14. Tabagismo: 0 – Não / 1 - Sim	
15. H. FAMILIAR NEOPLÁSICA 0 – Não / 1 - Sim	
16. Estômago: 0 – Não / 1 - Sim	
17. Colorectal: 0 – Não / 1 - Sim	
18. Mama: 0 - Não / 1 – CDI / 2 – CLI / 3 – Outros / 4- Subtipo não especificado	
19. Outras Neoplasias: 0 – Não / 1 - Sim	
20. Outras Neoplasias – Qual: _____	
21. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS 0 – Não / 1 - Sim	
22. Dor: 0 – Não / 1 - Sim	
23. Anemia: 0 – Não / 1 - Sim	
24. Vômitos: 0 – Não / 1 - Sim	
25. Obstrução: 0 – Não / 1 - Sim	
26. Sangramento: 0 – Não / 1 - Sim	
27. Ascite: 0 – Não / 1 - Sim	
28. Perda de Peso: 0 – Não / 1 - < 10% / 2 - > 10%	
ESTADIAMENTO PRÉ-OPERATÓRIO	
29. EDA : 0 – Não / 1 – Sim	
30. Diâmetro da Lesão na EDA (cm)	
31. Localização I: 1 – Cárdia / 2 – Corpo / 3 – Antro / 4 - Linite	
32. Localização II: 1 - Pequena curvatura / 2 - Grande curvatura / 3 - Parede anterior / 4 - Parede posterior / 5 - Circunferencial	
33. Bormann: 1 – I / 2 – II / 3 – III / 4 – IV	

34. TC de Abdômen: 0 – Não / 1 – Sim	
35. Espessamento da parede gástrica TC: 0 – Não / 1 - Sim	
36. Linfadenomegalia locoregional TC: 0 – Não / 1 - Sim	
37. Metástase à distância TC: 0 – Não / 1 – Sim	
38. Local da Metástase TC: 1 – fígado / 2 – linfonodos não regionais / 3 – peritônio / 4 – outros	
39. M1TC Outro _____	
40. RNM Abdômen: 0 – Não / 1 – Sim	
41. Espessamento da parede gástrica RNM: 0 – Não / 1 - Sim	
42. Linfadenomegalia locoregional RNM: 0 – Não / 1 - Sim	
43. Metástase na RM: 0 – Não / 1 – Sim	
44. Local da Metástase RM 1 – fígado / 2 – linfonodos não regionais / 3 – peritônio / 4 – outros	
45. M1RM Outro _____	
46. PET – CT: 0 – Não / 1 – Sim	
47. Captação em parede gástrica PET: 0 – Não / 1 - Sim	
48. Linfadenomegalia locoregional PET:0 – Não / 1 - Sim	
49. Metástase PET: 0 – Não / 1 – fígado / 2 – linfonodos não regionais / 3 – peritônio / 4 – outros	
50. ECO – EDA: 0 – Não / 1 – Sim	
51. Profundidade de Invasão ECO – EDA: 1 – Mucosa / 2 – Submucosa / 3 – Muscular / 4 – Sub – serosa / 5 – serosa / 6 – gordura adjacente / 7 - órgãos adjacentes	
52. Doença linfonodal ECO – EDA: 0 – Não / 1 - Sim	
53. Punção Linfonodal ECO – EDA: 0 – Negativa / 1 – Positiva / 2 – Não Realizada	
54. Laparoscopia: 0 – Não / 1 - Sim	
55. Invasão de serosa Laparoscopia: 0 – Não / 1 - Sim	
56. Doença Linfonodal Laparoscopia: 0 – Não / 1 - Sim	
57. Lavado peritoneal laparoscopia: 0 – Não Realizado / 1 – positivo / 2 – negativo	
58. Doença metastática laparoscopia: 0 – não / 1 – peritônio / 2 – fígado / 3 – outros	

ESTADIAMENTO CLÍNICO	
59. T: 1/2/3/4	
60. N: 0/1	
61. M: 0/1	
TRATAMENTO	
62. Tratamento Inicial: 1 – QT neoadjuvante / 2 – cirurgia / 3 – QT paliativa / 4 – Rtx neoadjuvante / 5 – QT + Rtx Neoadjuvantes 6- LE não terapêutica ou Cirurgia Paliativa seguida de QT paliativa	
63. Data de Início do tratamento	
64. ESQUEMA QT NEO: 0 – Não realizou QT Neo / 1 – DCF / 2 – ECF / 3 – ECX / 4 – EOX / 5 – OUTRO: (QUAL: _____)	
65. ESQUEMA QT PALIATIVA: 0 – Não iniciou o tratamento por QT Paliativa / 1 – ELF / 2 – Outro esquema / esquema ignorado (QUAL: _____)	
CIRURGIA	
66. Data da Cirurgia (DD/MM/AAAA):	
67. Intuito da Cirurgia: 1 – curativo / 2 – paliativo	
68. Tipo: 1 – GT / 2 – GST / 3 – Degastrectomia / 4 – Gastroenteronastomose / 5 – jejunostomia 6- Lapatotomia não terapêutica	
69. Linfadenectomia: 1 – D1 / 2 – D2 / 3 – D3 / 0 – Não realizada	
70. Gastrectomia ampliada: 0 – Não / 1 – baço / 2 – cauda pâncreas / 3 – baço e cauda de pâncreas / 4 – colon / 5 - cabeça do pâncreas / 6 – outro	
71. Gastrectomia ampliada Outro _____	
72. HIPEC: 1 – SIM / 2 – Não (Anotar Qual Droga)	Ainda não colhida
73. Tempo cirúrgico (min):	
74. Morbidade: 0 – Não / 1 - Sim	
75. Complicações clínicas pós op: 0 – Nenhuma / 1 – PNM / 2 – atelectasia / 3 – ICO/IAM / 4 – AVC / 5 – ITU / 6 – IRA / 7 – Infecção de cateter central / 8 – Outras	
76. Complicações cirúrgicas pós op: 0 – Nenhuma / 1 – Fístula pancreática / 2 – fístula duodenal / 3 – Fístula de anastomose esôfago-jejunal / 4 – Fístula de gastro-entero-anastomose / 5 – Eventração ou evisceração / 6 – Infecção FO / 7 – Abscesso intra-cavitário / 8- Estenose de anastomose esôfago-jejunal / 9 – Outras	
77. Outras Morbidades _____	
78. Óbito Pós op: 0 – Não / 1 - Sim	
79. UTI: 0 – Não / 1 - Sim	
80. Dias UTI:	
81. Dias de internação:	
82. Transfusão Sanguínea: 0 – Não / 1 - Sim	

ANATOMOPATOLÓGICO	
83. T: 1/2/3/4	
84. Profundidade da Invasão: 1- Mucosa / 2- Submucosa / 3- Muscular Própria / 4- Subserosa / 5- Serosa / 6- Gordura Adjacente / 7 – Órgãos Adjacentes	
85. Órgãos Adjacentes Qual _____	
86. N: 0/1/2/3	
87. Numero de Linfonodos Ressecados:	
88. Numero de Linfonodos Acometidos:	
89. M: 0/1	
90. M1 – Local _____	
91. Citologia: 0 - Negativa / 1 – positiva / 3- Suspeita / 4 - Ignorada	
92. Ressecção: 0 – R0 / 1 – R1 / 2 – R2	
93. Tipo Histológico Laurén: 1. Difuso / 2. Intestinal / 3. Misto / 4. Não classificado	
94. TIPO HISTOLÓGICO – WHO: 1 – Tubular / 2 – Anel de Sinete / 3 – Indiferenciado / 4 – mucinoso / 5 – Outros (Qual: _____) 6- Não Classificado	
95. Tipo Histológico Carneiro: 1 – Glandular / 2 – Células Isoladas / 3 – Misto / 4 – Sólido / 5- Não Classificado	
96. Grau Histológico: 1 – Bem diferenciado ou Baixo Grau / 2 – Moderamente diferenciado / 3 – Pouco diferenciado ou Indiferenciado ou Alto Grau	
97. Invasão Perineural: 0 – Não / 1 - Sim	
98. IVS: 0 – Não / 1 - Sim	
99. IVL: 0 – Não / 1 - Sim	
100. Tratamento Adjuvante: 0 – Não / 1 - Sim	
101. Tipo de Tratamento Adjuvante: 1 – Rtx / 2 – QT / Rtx + QT	
RESULTADOS ONCOLÓGICOS	
102. Recidiva: 0 – Não / 1 - Sim	
103. Local de Recidiva (primeiro sítio): 1 – Local / 2 – Linfonodos / 3 – fígado / 4 – pulmão / 5 – ossos / 6 – SNC / 7 – Outro (QUAL: _____) / 8 – Recidiva em local desconhecido / 9 – Paciente não operado ou metastático ao diagnóstico / 10 – Peritônio / 11 - Pleura	
104. Data recidiva: DD/MM/AAAA	
105. Óbito: 0 – Não / 1 – Sim	
106. Data do Óbito: DD/MM/AAAA	
107. Status: 1 – Vivo sem doença / 2 – Vivo com doença / 3 – Morto pelo câncer / 4 – Morto outra causa (QUAL: _____)	
108. Data do Status: DD/MM/AAAA	
109. Outra causa de Óbito: _____	

Observações: _____

Anexo 3 - Protocolo de Extração de DNA – tecido congelado (Fenol/clorofórmio)

De acordo com protocolo utilizado para extração de DNA de tecido congelado, foram adicionados 600 µl de Tampão de Digestão (30µl de 0,5M EDTA, 15µl sodium dodecylsulphate 20%, 15 µl NaCl 4M, 6 µl Tris-HCl 1M pH 8,0, 519 µl de água MilliQ, 15 µl Proteinase K 20 µg/µl) ou 600 µl do tampão *Cell Lysis Solution* (Gentra Puregene Blood Kit - Qiagen) ao tubo de 1,5 ml contendo o tecido (<100 mg de tecido). A Proteinase K também foi adicionada quando utilizado o tampão da Qiagen. Em seguida, as amostras foram incubadas a 55°C em agitação (700rpm) por 18 horas.

Na etapa seguinte, ocorreu a centrifugação do tubo *Phase Lock Gel* (PLG) por 1 min a 13.200 rpm e transferência da amostra para o tubo PLG. Foram adicionados 600 µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico às amostras e homogeneizadas por inversão por 1 min. Após centrifugação por 10 min a 13.200 rpm, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo PLG. Após adição de 600 µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), as amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas por 10 min a 13.200 rpm.

Foram adicionados 600 µl de clorofórmio direto no tubo PLG, e as amostras foram homogeneizadas por 1 min e centrifugadas por 10 min a 13.200 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo (2,0 ml) e foram adicionados 0,5 µl de glicogênio (20 mg/ml) e 800 µl de EtOH 100 % gelado. Após a homogeneização por inversão, e incubação por 1 hora a -20°C, os tubos foram centrifugados por 30 min a 14.000 rpm a 4°C.

Removido o sobrenadante, o pellet foi lavado com 1ml de EtOH 70% gelado, ressuspendido na primeira lavagem e centrifugado por 2 min a 14.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi removido e as amostras foram deixadas expostas à temperatura ambiente para secagem do *pellet*. Ao pellet foi adicionado 50 µl de H₂O, e seguiu-se a incubação a 55°C por 10 minutos, e incubação *overnight* a 4°C.

As amostras de DNA extraído foram quantificadas e armazenadas em freezer -20°C.

Anexo 4 - Protocolo de Extração de DNA – sangue (Gentra Puregene Blood Kit, (Qiagen)

Amostras de 20 mL de sangue periférico foram coletadas de maneira convencional em tubos contendo EDTA e estocadas a 4°C. A separação dos linfócitos foi realizada por TE 1X pH 8,0 (*buffy coat*), conforme protocolo estabelecido pelo laboratório. A partir de um tubo de 1,5mL contendo o *buffy coat*, foi realizada a extração de DNA através do *Gentra Puregene Blood Kit* (Qiagen).

Ao tubo contendo o *buffy coat*, foram adicionados 600µL de solução de lise celular (Cell Lysis Solution), seguindo-se uma incubação da mistura a 37°C, *overnight*, com agitação a 1.000rpm. Foram adicionados 140µL de solução de precipitação protéica (Protein Precipitation Solution) ao lisado de células. A mistura foi então homogeneizada vigorosamente em um vortex por 20 segundos e incubada no gelo por período de 5-15 minutos. Após a incubação, a solução foi então centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um tubo limpo de 1,5 mL .

Após adição de 600µL de Isopropanol 100% , a mistura foi homogeneizada por inversão e em seguida, centrifugada a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e foi adicionado sobre o mesmo, 1ml de etanol 70%. O tubo foi invertido várias vezes para lavar o precipitado de DNA e em seguida, foi centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado novamente. A lavagem foi repetida por duas vezes. As amostras foram deixadas expostas à temperatura ambiente para total evaporação do etanol.

Ao DNA precipitado, foi pipetado 100µL de H₂O *Sigma* ou Milli-Q. Seguiu-se a incubação por 20 minutos a 55°C, e em seguida, incubação *overnight* a 4°C. O DNA foi quantificado utilizando-se o Nanodrop e a integridade avaliada em gel de agarose 0,8%. As amostras de DNA genômico extraído foram armazenadas a -20°C até o momento de análise.

Anexo 5 - Relato de caso submetido à publicação

TP53 mutation R337H in gastric cancer tissues of a 12-year-old boy: evidence of chimerism involving a common mutant founder haplotype

Edaise M. da Silva, Maria Isabel Waddington Achatz, Ghislaine Martel-Planche, Magali Olivier, Pierre Hainaut, Fernando A. Soares

(1) Hospital AC Camargo, Fundacao Antonio Prudente, Sao Paolo, Brazil;

(2) International Agency for Research on Cancer, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon France

Correspondence:

Pierre Hainaut and Fernando Soares:

hainaut@iarc.fr

fsoares@hcancer.org.br

Running title: TP53 R337H germline mutation chimerism in childhood gastric cancer

Abstract

We report a case of invasive, non-diffuse gastric cancer in a Brazilian 12-year-old boy diagnosed with metastatic disease and deceased seven months after surgery. DNA from intra-surgical biopsies revealed *TP53* mutation at codon 337 (p.R337H) in samples containing transformed cells (dysplasia, tumor and metastasis) but not non-transformed cells (incomplete intestinal metaplasia). This haplotype corresponds to a common founder mutation in South Brazil and was present in the genome of the patient's father. Presence of this haplotype in tumor, but not non-tumor tissues suggests a rare case of microchimerism in this patient, who may have harbored a small number of mutants originating from another individual, perhaps a vanished dizygotic twin. This observation calls for caution in assessing the genetic status of patients with early or multiple cancers in populations with common founder mutations.

Keywords: TP53, Li-Fraumeni syndrome, Founder effect, gastric cancer

Case report

A 12-year-old boy with no documented familial history of cancer presented with weakness, malaise, abdominal pain, dysphagia and loss of 14kg before referral. Upper digestive endoscopy detected a 3.5cm-ulcerated lesion in the cardia. Surgery revealed a gastric tumor with lymph-node involvement, histopathologically proven liver metastasis and probable diaphragm, esophagus and celiac axis infiltration. Gastrostomy was performed and the patient received chemotherapy with CUFE scheme without significant response. He deceased with disseminated disease after seven months.

Genetic and Molecular Pathology findings

Endoscopic biopsies included intestinal metaplasia in cardia (**S1**) and high-grade dysplasia/in situ carcinoma in stomach (**S2**). Surgical biopsies included liver metastasis (**S3M**) and well-differentiated gastric adenocarcinoma (**S3G**). TNM classification was T4N2M2. Despite early-onset, tumor histology did not support a case of Hereditary Diffuse Gastric Cancer (HDGC). Immunohistochemistry showed membrane E-cadherin in tumor cells. No alterations were found in MLH1, MSH2, PMS2 and MSH6 expression, ruling against extra-colonic manifestation of Lynch Syndrome. Nuclear accumulation of p53 was detected in S2, S3M and S3G (Figure 1). Sequencing of *TP53* exons 2 to 11 identified wild-type sequence in S1 while S2, S3G and S3M showed mutation at codon 337 (1010G→A, p.R337H) (Figure 2). This mutation occurs in the germline of about 1:300 individuals (0.3%) in Southeast Brazil as the consequence of a founder effect predisposing to early cancer. Tumor patterns in p.R337H families are consistent with Li-Fraumeni (LFS) or Li-Fraumeni-like Syndrome (LFL) (1,2).

The founder haplotype is characterized by the T allele of SNP 28 (rs9894946) (3). This allele was detected in the patient's samples containing p.R337H but not in those with wild-type sequences (Figure 2). Allele-specific PCR demonstrated that p.R337H was located on this haplotype, identical to the founder haplotype (not shown). Presence of p.R337H was confirmed by Restriction Length Fragment Polymorphism (RFLP) using HhaI, which cut within codon 337, in S2, S3G and S3M but not in S1. Genomic DNA was obtained from father, mother and one

brother. The mutant haplotype was constitutive in the father's genome, whereas mother and brother were wild-type for *TP53*. DNA from peripheral blood cells of the patient was not available.

Discussion

The *TP53* mutation p.R337H borne by a haplotype carrying the T allele of rs9894946 was detected in tumor and metastasis but not in non-cancer tissues of a 12-year-old patient. According to the IARC *TP53* database, this mutation has never been reported as a somatic mutation in human cancer (<http://www-p53.iarc.fr>). In contrast, it is a well-documented germline mutation predisposing to multiple cancers in the population of Southeast Brazil, where it frequently occurs due to a founder effect (3). Consistent with a germline origin, the mutant haplotype was found in the father's DNA. These observations suggest that the patient may have harbored two populations of cells, one containing the paternal *TP53* wild-type allele, and another one containing the paternal *TP53* mutant allele, the later present at very low levels, undetectable by sequencing in most tissues. This observation would be consistent with genetic microchimerism. Microchimerism refers to harboring a small number of cells or DNA from a genetically different individual, often due to maternal-fetal or feto-fetal trafficking during pregnancy (4,5). In this patient, we suggest microchimerism due to feto-fetal cell trafficking between dizygotic twin fetuses, one of whom had the paternal mutant haplotype and underwent early developmental failure. This is, to our knowledge, the first report of microchimerism for a cancer-causing germline mutation. Due to incomplete penetrance, histories not matching LFS/LFL criteria and solitary childhood cancers have been reported in p.R337H families. Testing tumor DNA in addition to genomic DNA should be considered in patients presenting early cancer in populations with common founder alleles.

Figure Legends

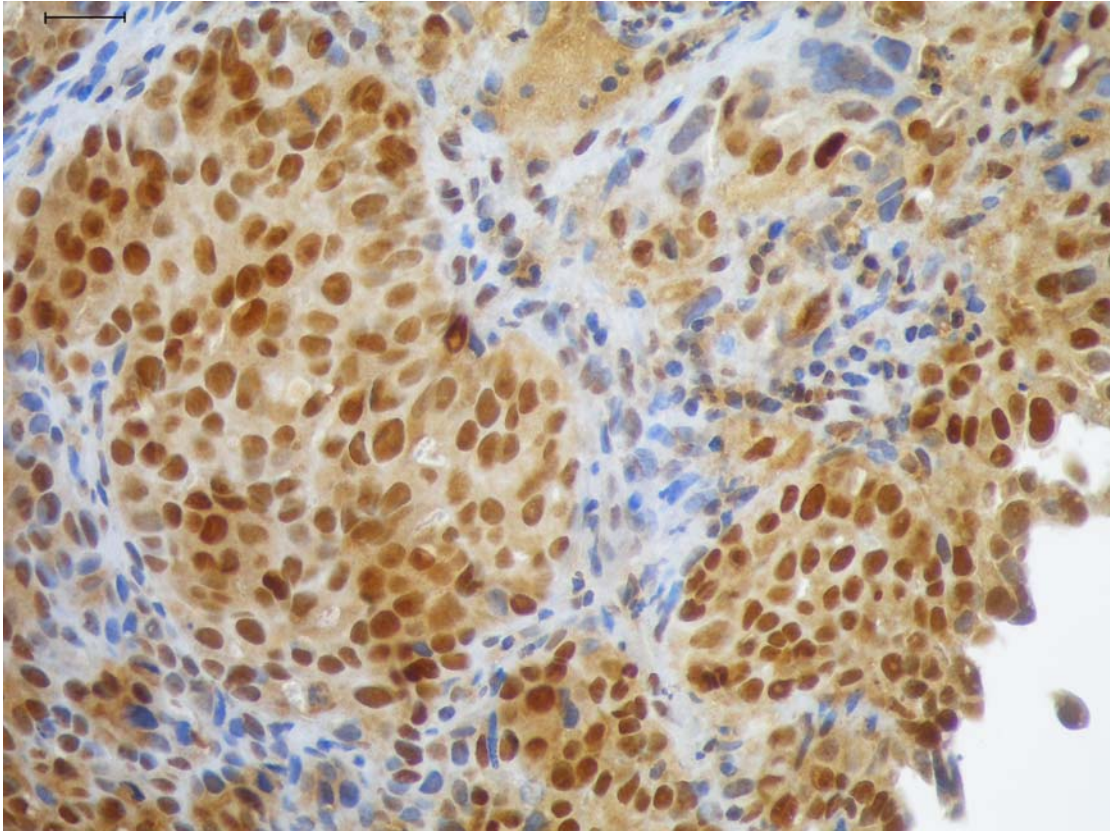


Figure 1:

Immunodetection of p53 in a gastric cancer biopsy. Section was immunostained with anti-p53 DO7 (Dako) using standard protocols.. Bar: 10 μm ;

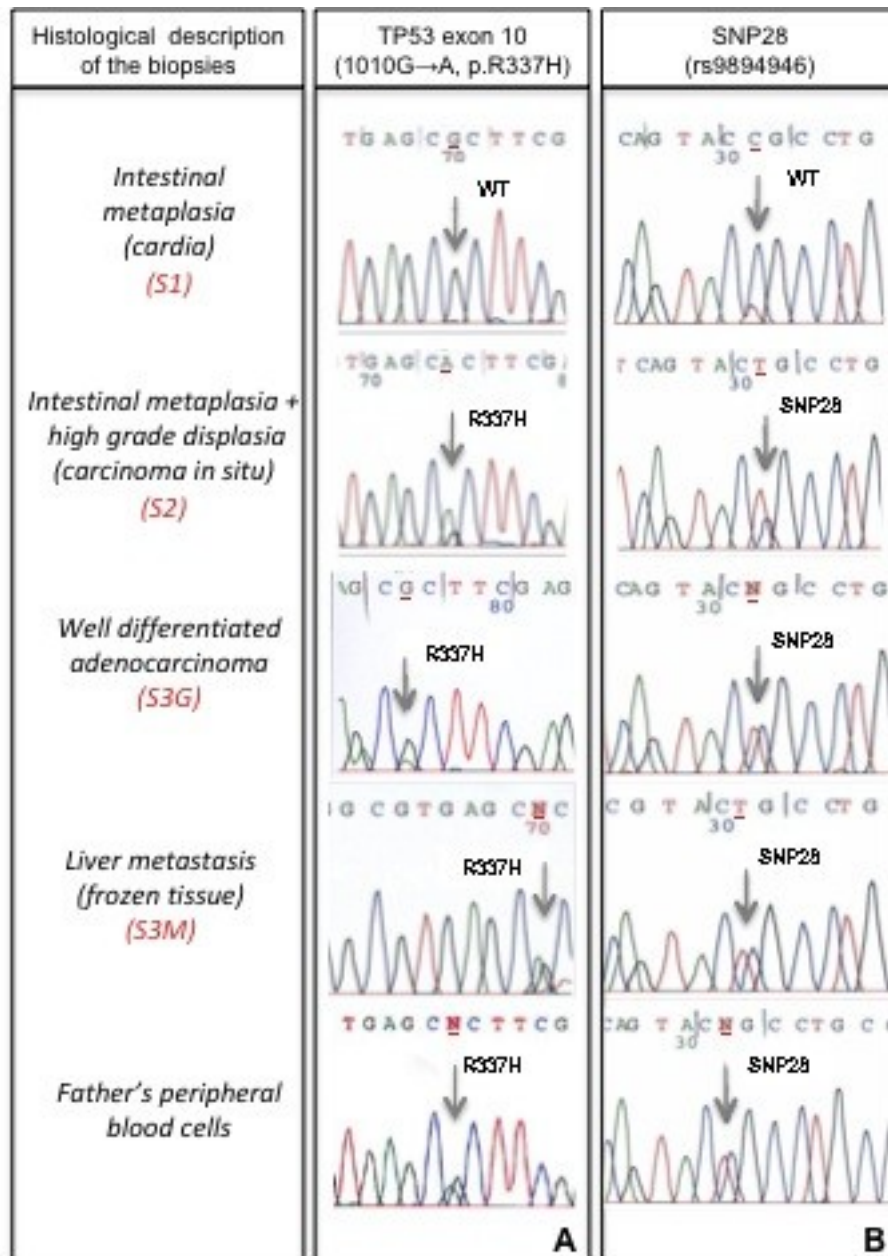


Figure 2:

Sequence at codon 337 of TP53 and at SNP rs9894946 in DNA extracted from biopsies in the patient (a, b, c) and from the father's peripheral blood cells (d). Sequencing was performed as described in (http://www-p53.iarc.fr/Download/TP53_DirectSequencing_IARC.pdf)

References

1. Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Palmero EI, Vargas FR, Da Rocha JC, Vettore AL, Hainaut P. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett.* 2007 Jan 8;245(1-2):96-102.
2. Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP, Giugliani R, Hainaut P, Ashton-Prolla P. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett.* 2008 Mar 8;261(1):21-5.
3. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Le Calvez-Kelm F, Brugières L, Vargas FR, Brentani RR, Ashton-Prolla P, Landi S, Tavtigian SV, Hainaut P, Achatz MI. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat.* 2010 Feb;31(2):143-50.
4. Yan Z, Lambert NC, Guthrie KA, Porter AJ, Loubiere LS, Madeleine MM, Stevens AM, Hermes HM, Nelson JL. Male microchimerism in women without sons: quantitative assessment and correlation with pregnancy history. *Am J Med.* 2005 Aug;118(8):899-906.
5. Nelson JL. Microchimerism in human health and disease. *Autoimmunity.* 2003 Feb;36(1):5-9.