

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE mTOR, PTEN
E AKT NA MUCOSA GÁSTRICA NORMAL E
CARCINOMAS GÁSTRICOS**

PAULA BLANDINA OLGA CHIAPPINI

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

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

**São Paulo
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Chiappini, Paula Blandina Olga

Estudo da expressão de mTOR, PTEN e AKT na mucosa gástrica normal e carcinomas gástricos / Paula Blandina Olga

Chiappini – São Paulo, 2011.

86p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Descritores: 1. NEOPLASIAS GÁSTRICAS. 2. MARCADORES BIOLÓGICOS 3. IMUNOISTOQUÍMICA. 4. PTEN FOSFOIDROLASE. 5. PROTEÍNAS PROTO-ONCOGÊNICAS C-AKT. 6. mTOR.

DEDICATÓRIA

A minha mãe Angela.

Ao meu pai Pierino (*in memorian*).

Ao meu irmão Roberto e minha cunhada Raquel.

Aos meus sobrinhos Izabella e Bruno.

Aos meus afilhados Eugenio, Iza e Gabi.

A minha madrinha de crisma Lene.

Ao meus avos maternos e padrinhos de batismo nonna Olga (*in memorian*) e

nonno Angelo (*in memorian*).

A minha amiga e comadre Eliana.

A meu amigo Claudio.

A minha orientadora Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação foi fruto de muito esforço e colaboração. Se não houvesse boa vontade e competência de todas as pessoas envolvidas eu não realizaria este trabalho. Agradeço pela amizade e força de todos aqueles que me ajudaram.

Agradeço a Deus por me dar sabedoria e capacidade para o trabalho.

Agradeço minha mãe, Angela, por ser a pessoa que sempre cuidou de mim e com quem posso contar incondicionalmente.

Agradeço a toda minha família pela torcida e carinho sempre.

Agradeço a minha madrinha Lene por toda a sua ajuda, principalmente espiritual.

Obrigada por sua amizade e por tomar conta de mim como uma segunda mãe.

Agradeço a minha orientadora Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami por ter me dado esta oportunidade e por ter confiança na minha capacidade profissional, principalmente nos momentos mais difíceis (que não foram poucos!). “Dra Dirlei o meu maior agradecimento está dentro do meu coração.”

Agradeço ao diretor da pós-graduação Prof. Dr Fernando Augusto Soares por toda a sua compreensão e apoio.

Agradeço a Dra. Ana Maria da Cunha Mercante, minha chefe, por sempre me valorizar profissionalmente e também por acreditar no meu

potencial. Sua ajuda foi muito importante nas horas em que a flexibilidade de horário se fez necessário.

Agradeço a boa vontade, paciência interesse e compreensão de todos os colegas e amigos do departamento de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis.

Agradeço a Dra Regina de Fátima B Costa do Hospital Heliópolis por ter lançado a semente, para que esta dissertação se realiza-se.

Agradeço ao Ivan, Suely, Fátima e Simone por terem realizado todas as reações Imunoistoquímicas. Eu não sabia que vocês são verdadeiros artistas.

Agradeço ao Seven pela amizade e boa vontade. Você sempre encontrou tempo para me ajudar!

Agradeço ao Carlinhos pela explicação e confecção dos TMAs.

Agradeço a todos os técnicos e auxiliares do departamento de Anatomia Patológica, que direta ou indiretamente me ajudaram, como Glauber, Emidia e Fabio com o levantamento de blocos, lâminas e laudos.

Agradeço a Dra Emy Fukuda Marques que coletou grande parte dos dados de nossa amostra.

Agradeço ao José Humberto pela estatística fantástica! Foi muito bom receber os resultados finais!

Agradeço a Ana Kuninari, coordenadora da pós-graduação da FAP, pela amizade e carinho.

Agradeço a equipe Luciana e Vanuza da pós-graduação da FAP pela qualidade e rapidez no atendimento.

Agradeço a querida Suely por todo o trabalho com a formatação, bibliografia e muitas outras coisas! Su, você é 10!

Agradeço a Francyne, Nicelia e Jefferson, equipe da biblioteca pela qualidade e rapidez no atendimento.

Agradeço a Liliane por fazer o possível e o impossível para agendar um horário no Acis e muito mais.

Agradeço às pós-docs Claudia e Marcilei por toda ajuda com o ACIS.

Agradeço a Luciano, Odirlei e Paulo da equipe do Same e à coordenadora Ana Paula Idalgo pela qualidade, paciência e rapidez no atendimento.

Agradeço ao meu amigo Claudio pelo interesse neste trabalho e incentivo pessoal.

Agradeço a Rosangela e a Rosana pelas orações, pelo interesse neste trabalho.

Agradeço a minha amiga - irmã Eliana pelo incentivo e palavras de força e determinação, nos momentos de cansaço.

Agradeço a todos os amigos da paróquia Nossa Senhora do Bom Conselho pelas orações, torcida, paciência e compreensão durante as minhas ausências, tanto no coral como em outros trabalhos sob minha responsabilidade.

Agradeço aos médicos do departamento de Anatomia Patológica por sempre me tratarem com gentileza e muita consideração.

Agradeço a amiga de caminhada, Carol Paterline, Carol Castro, Dani, Luciana, Debora, Michele e Tati pelas matérias que cursamos juntas e pela força nos momentos de dificuldade pelos quais passamos e todas superamos com amor paciência e compreensão.

Agradeço aos pacientes que são os nossos maiores parceiros!

Agradeço à Fundação Antonio Prudente/ Hospital AC Camargo pela oportunidade de aprimoramento intelectual e científico.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

RESUMO

Chiappini PBO. **Estudo da expressão de mTOR, PTEN e AKT na mucosa gástrica normal e carcinomas gástricos**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

OBJETIVOS: A via de sinalização do PI3K (fosfatidilinositol 3-cinase) / Akt (proteína B cinase, PKB) desempenha um papel fundamental na sobrevivência e crescimento celular. A desregulação desta via tem sido encontrada numa variedade de células tumorais. Recentemente, a ativação constitutiva da via de sinalização PI3K/Akt foi estabelecido como um fator determinante no crescimento celular e na sobrevivência das células cancerígenas. O bloqueio da via de ativação de PI3K/AKT fornece uma nova estratégia como terapia alvo contra o câncer. O objetivo do nosso presente estudo foi investigar a expressão de mTOR (p-mTOR), PTEN e pAKT no tecido gástrico não neoplásico e em pacientes com câncer gástrico e assim determinar seu padrão de expressão em tumores gástricos e seu significado prognóstico. **MÉTODOS:** A expressão de p-mTOR, pAKT e PTEN foi detectada por imunistoquímica em 239 carcinomas gástricos que foram submetidos à ressecção cirúrgica e 200 tecidos gástricos não neoplásicos. As lâminas foram digitalizadas e analisadas por um sistema de automatização de imagem (ACIS III, Dako). Foram determinadas as correlações das expressões de mTOR, pAKT e de PTEN com os resultados clinicopatológicos e de sobrevida nos carcinomas gástricos. **RESULTADOS:** A baixa expressão de mTOR no padrão citoplasmático, pAKT no padrão nuclear e PTEN no padrão nuclear apresentaram diferença significativa nos tecidos não neoplásicos quando comparados com os tecidos de tumor gástrico (todos, $p < 0,001$). A baixa expressão de mTOR, pAKT e PTEN nos tumores gástricos foi intimamente correlacionado com o estágio patológico pTNM ($p < 0,001$, $p = 0,008$, $p = 0,036$, respectivamente). Pacientes com p-AKT positivo mostraram um aumento significativo na sobrevida livre de

doença (SLD) e sobrevida global (SG), nas análises univariadas. Nas análises multivariadas, as altas taxas de expressão de mTOR e as perdas da expressão do PTEN foram associadas significativamente com a piora da sobrevida global. **CONCLUSÕES:** As proteínas AKT, pAKT, PTEN e mTOR estão frequentemente expressas na mucosa gástrica normal e nos carcinomas gástricos e são importantes fatores prognósticos. Co-expressão das proteínas é bastante frequente tanto na mucosa gástrica como no tumor. Estes dados revelam que novas estratégias terapêuticas combinadas a quimioterapia para câncer gástrico devem ser desenvolvidas para bloquear mais especificamente esta via em pacientes previamente selecionados.

SUMMARY

Chiappini PBO. [Study of the expression of mTOR, PTEN and AKT normal mucosa and gastric carcinomas]. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

BACKGROUND: The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt (protein kinase B, PKB) signaling pathway plays a critical role in cell growth and survival. Dysregulation of this pathway has been found in a variety of cancer cells. Recently, constitutively active PI3K/Akt signaling has been firmly established as a major determinant for cell growth and survival in an array of cancers. Blocking the constitutively active PI3K/AKT signaling pathway provides a new strategy for targeted cancer therapy. The purpose of our present study was to investigate the expression of activated mTOR (p-mTOR), PTEN and pAKT in non neoplastic gastric tissue and in gastric cancer patients to determine their pattern of expression in gastric tumors and their prognostic significance. **METHODS:** The expression of p-mTOR, pAKT and PTEN was detected in specimens of 239 gastric cancers who underwent radical resection (R0) and in 200 non neoplastic gastric tissues by immunohistochemistry. Slides were scanned and analyzed with an automated cellular imaging system (ACIS III, Dako). The correlation of p-mTOR, pAKT, and PTEN expression to clinicopathologic features and survival of gastric cancer was studied. **RESULTS:** Overexpression of pMTOR in the cytoplasmic pattern, nuclear pAKT and nuclear PTEN was observed in the non-neoplastic tissues when compared with gastric tumor tissues (all, $p < 0.001$). Overexpression of pmTOR, pAKT and PTEN in gastric tumors was closely correlated with pTNM stage ($p < 0.001$, $p = 0.008$, $p = 0,036$, respectively). Patients with p-AKT positive showed significantly longer disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) rates than those with pAKT-negative tumors in univariable analyses. In multivariable analyses, higher expression rates of pMTOR and losses of PTEN were significantly

associated with worse overall survival. **CONCLUSIONS:** The protein AKT, pAKT, PTEN and mTOR are often expressed in normal gastric mucosa and gastric carcinomas and are important prognostic factors. Co-protein expression is quite frequent in normal gastric mucosa and in the tumor tissue. These data reveal that new strategy for combined chemotherapy of gastric cancer should be designed to more specifically block PI3K/Akt pathway for selected patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação citoplasmática de AKT (tamanho original 40x).....	25
Figura 2A	Carcinoma gástrico do tipo difuso com marcação nuclear e AKT (tamanho original 20x).....	26
Figura 2B	Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação nuclear de AKT (tamanho original 40x).....	26
Figura 3	Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação nuclear de pAKT (tamanho original 40x).....	27
Figura 4A	Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação citoplasmática de pAKT (tamanho original 40x).....	28
Figura 4B	Carcinoma gástrico do tipo difuso com marcação citoplasmática de pAKT (tamanho original 40x).....	28
Figura 5	Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação nuclear de PTEN (tamanho original 40x).....	29
Figura 6A	Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação citoplasmática de PTEN (tamanho original 40x).....	30
Figura 6B	Carcinoma gástrico do tipo difuso com marcação citoplasmática de PTEN (tamanho original 40x).....	30
Figura 7	Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação citoplasmática de mTOR (tamanho original 40x).....	31

Figura 8A	Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação nuclear de mTOR (tamanho original 20x).....	32
Figura 8B	Carcinoma gástrico do tipo difuso com marcação nuclear de mTOR (tamanho original 40x).....	32
Figura 9A	Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação membrana de mTOR (tamanho original 40x).....	33
Figura 9B	Carcinoma gástrico do tipo difuso com marcação de membrana de mTOR (tamanho original 20x).....	33
Figura 10	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao gênero.....	52
Figura 11	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à localização do tumor.....	52
Figura 12	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação às margens cirúrgicas.....	53
Figura 13	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao Estádio clínico - 4 categorias.....	53
Figura 14	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao N (número de linfonodos positivos).....	54
Figura 15	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao M (metástase a distância).....	54

Figura 16	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao tamanho do tumor (3cm).....	55
Figura 17	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à invasão linfática.....	55
Figura 18	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à invasão sanguínea.....	56
Figura 19	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à invasão perineural.....	56
Figura 20	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à expressão do marcador PTEN padrão nuclear.....	57
Figura 21	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à expressão do marcador mTOR padrão citoplasmático.....	57
Figura 22	Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à expressão do marcador mTOR padrão de membrana.....	58
Figura 23	Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação às margens cirúrgicas.....	63
Figura 24	Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao estágio clínico (4 categorias).....	63

Figura 25	Curva de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação N (número de linfonodos comprometidos).....	64
Figura 26	Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à metástase linfonodal.....	64
Figura 27	Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à invasão linfática.....	65
Figura 28	Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à invasão sanguínea.....	65
Figura 29	Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à invasão perineural.....	66
Figura 30	Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação a infiltrado linfocitário.....	66
Figura 31	Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à expressão do marcador pAKT padrão nuclear.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos dados referentes a idade e tamanho do tumor, da amostra estudada.....	22
Tabela 2	Descrição dos dados clínicos e demográficos da amostra estudada.....	23
Tabela 3	Descrição dos dados histopatológicos dos 239 casos de carcinomas gástricos.....	23
Tabela 4	Resultados da expressão imunoistoquímica dos marcadores nos padrões citoplasmático, nuclear e de membrana.....	24
Tabela 5	Correlações do AKT citoplasmático com as variáveis Gênero e Classificação de Lauren.....	35
Tabela 6	Correlação de AKT nuclear com a variável Diferenciação histopatológica.....	36
Tabela 7	Correlações de pAKT citoplasmático com as variáveis Estádio clínico (2 categorias), M (metástase a distância) e Tamanho do tumor.....	37
Tabela 8	Correlações de pAKT nuclear com as variáveis e Estádio clínico (2 categorias) e Tamanho do tumor.....	38
Tabela 9	Correlação de PTEN citoplasmático com a variável Classificação de Lauren.....	39
Tabela 10	Correlações de mTOR citoplasmático com as variáveis Classificação de Lauren e Infiltrado inflamatório linfocitário....	40

Tabela 11	Correlações de mTOR nuclear com as variáveis classificação de Lauren, Infiltrado inflamatório linfocitário, Invasão perineural e Estádio clínico (2 categorias).....	41
Tabela 12	Correlações de mTOR membrana com as variáveis Estádio clínico (2 categorias) e Infiltrado inflamatório linfocitário.....	42
Tabela 13	Correlação entre a expressão de cada proteína estudada nos carcinomas gástricos.....	45
Tabela 14	Correlação da expressão do AKT citoplasmático e nuclear com a mucosa gástrica normal e carcinomas gástricos.....	46
Tabela 15	Correlação da expressão do pAKT citoplasmático e nuclear com a mucosa gástrica normal e carcinomas gástricos.....	47
Tabela 16	Correlação da expressão do PTEN citoplasmático e nuclear com a mucosa gástrica e carcinomas gástricos.....	47
Tabela 17	Correlação da expressão de mTOR citoplasmático, de membrana e nuclear com a mucosa gástrica e carcinomas gástricos.....	48
Tabela 18	Análise univariada dos parâmetros clinicopatológicos e biomoleculares.....	50
Tabela 19	Modelo multivariado para a análise dos fatores de risco relacionados com óbito.....	59
Tabela 20	Análise univariada de sobrevida livre de doença em relação aos parâmetros clinicopatológicos e biomoleculares.....	61

Tabela 21 Modelo multivariado para a análise dos fatores de risco relacionados com recorrência (excluíram-se os casos no estágio IV ou com intervalo livre de doença inferior a 3 meses)..... 68

LISTA DE ABREVIATURAS

ACIS	Automated Cellular Imaging System- ChromaVision
AKT	Proteína quinase serina treonina ou Proteína Quinase B
CG	Carcinoma Gástrico
core	Amostra
DAB	Cromógeno Diaminobenzidine
EC	Escore Combinado
EUA	Estados Unidos da America
HE	Hematoxilina-eosina
hot spots	Pontos quentes
HP	Helicobacter pylori
IHQ	Imunoistoquímica
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Mamíferos alvo da rapamicina (serine/treonine cinase)
mTORC1	Mamíferos alvo da rapamicina (serine/treonine cinase) complexo1
pAKT	Proteína Quinase serina treonina fosforilada ou Proteína Quinase B fosforilada
PBS	Phosphate Buffered Saline Tampão salino de fosfatase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PIP3	Defosforilação da fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RNA	Ácido Ribonucléico
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
Ta	Temperatura Ambiente
TMA	Tissue Microarray
TNM	Estadiamento
USA	United State of America

Σ

Somatória

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos gerais e epidemiológicos do carcinoma gástrico.....	1
1.2	Alterações genéticas nos carcinomas gástricos	5
1.3	O gene PTEN	6
1.4	Proteína mTOR	8
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	12
4	MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1	Casuística.....	13
4.2	Variáveis Clínico-Patológicas	14
4.3	Construção dos Tissue Microarray (TMA)	14
4.4	Imunoistoquímica	15
4.5	Leitura das lâminas	17
4.6	Análises Estatísticas.....	18
5	RESULTADOS	21
5.1	Casuística e dados da amostra	21
5.1.1	Dados demográficos e morfológicos	21
5.1.2	Resultados dos marcadores imunoistoquímicos	24
5.2	Correlações entre os marcadores de Imunoistoquímica e dados clinicopatológicos dos carcinomas gástricos	34
5.2.1	AKT	34
5.2.2	pAKT	36
5.2.3	PTEN	38
5.2.4	mTOR.....	39

5.3	Correlações entre os marcadores de Imunoistoquímica nos carcinomas gástricos	43
5.4	Correlações entre os marcadores de Imunoistoquímica nas mucosas gástricas normais e carcinomas gástricos	46
5.4.1	AKT	46
5.4.2	pAKT	46
5.4.3	PTEN	47
5.4.4	mTOR	48
5.5	Análises de sobrevida global dos pacientes com carcinomas gástricos	49
5.5.1	Análises univariada de sobrevida global dos pacientes com carcinomas gástricos em relação aos dados clinicopatológico e biomarcadores	51
5.5.2	Análises multivariada de sobrevida global dos pacientes com carcinomas gástricos	58
5.6	Análises de sobrevida livre de doenças dos pacientes com carcinomas gástricos	60
5.6.1	Análises univariadas de sobrevida livre de doença dos pacientes com carcinomas gástricos em relação aos dados clinicopatológicos e biomarcadores	62
5.6.2	Análises multivariadas de sobrevida livre de doença dos pacientes com carcinomas gástricos	67
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	75
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS DO CARCINOMA GÁSTRICO

O carcinoma gástrico (CG) é uma das neoplasias que embora sua incidência esteja em declínio no mundo nos últimos anos, ainda representa um grande problema de saúde mundial. Dados estatísticos revelam um declínio da incidência do câncer gástrico, especificamente na Inglaterra e em outros países mais desenvolvidos. A alta mortalidade é registrada atualmente na América Latina, principalmente nos países como a Costa Rica, Chile e Colômbia. Porém, o maior número de casos de câncer de estômago ocorre no Japão, onde encontramos 70 a 80 casos novos por 100.000 habitantes (Ministério da Saúde 2009).

O câncer gástrico (CG) é ainda muito comum no Brasil, sendo o tipo mais comum de câncer em algumas cidades, como Belém, Campinas e Fortaleza (Ministério da Saúde 2009). O número estimado de casos novos de câncer gástrico estimados para o Brasil em 2010 é de 13.820 entre os homens e 7.680 nas mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 14 casos novos a cada 100 mil homens e de 8 para cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2009).

No Estado de São Paulo é o terceiro tipo de câncer em frequência no sexo masculino e o quinto nas mulheres. Neste Estado, a taxa de mortalidade é de 14 a 30 por 100 mil habitantes; e, portanto menor que a do Japão e Chile

que é a 30 por 100 mil habitantes, mas maior que a dos EUA, Canadá e Austrália onde é de 5 a 9 por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde 2009).

Cerca de 65% dos pacientes diagnosticados com câncer gástrico têm mais de 50 anos. O pico de incidência se dá em sua maioria em homens, por volta dos 70 anos de idade (Ministério da Saúde 2009).

A ocorrência do câncer gástrico tem sido associada principalmente à exposição aos fatores relacionados à dieta. Estudos epidemiológicos sobre os padrões de ocorrência e óbito por câncer gástrico em populações de migrantes (HAENSZEL 1961; HAENSZEL et al. 1968, 1972; CORREA 1973; MCMICHAEL et al. 1980; KOLONEL et al. 1981; KOLONEL et al. 1983; MILLER 1982; ROSENWAIKE 1984; CORREA et al. 1985; JEDRYCHOWSKI et al. 1986; HU et al. 1988) vêm reforçando a idéia da associação entre essa neoplasia e alguns fatores encontrados em certos padrões de dieta, dentre eles o sal. Evidências experimentais foram obtidas com ratos que receberam dietas ricas em sal, comprovando que este leva à atrofia gástrica (CAPOFERRO e TORGENSEN 1974; KODAMA et al. 1984). O sal está fortemente associado à metaplasia intestinal e estimular a carcinogênese gástrica na presença de outros carcinógenos (TATEMATSU et al. 1975; OHGAKI e KATO 1984; TAKAHASHI et al. 1984; CORREA 1988). Talvez, boa parte do decréscimo da incidência do câncer gástrico nas últimas décadas esteja associada à abolição do uso do sal para conservação dos alimentos (OHGAKI e KATO 1984; TAKAHASHI et al. 1984; CORREA 1988). Alimentação pobre em vitamina A e C, carnes e peixes, ou ainda com um alto consumo de nitrato, alimentos defumados, enlatados, com corantes ou conservados no sal são fatores de risco para o aparecimento deste tipo de câncer. Em relação aos carboidratos,

parece que, se eles têm algum efeito na carcinogênese gástrica, esse é mais importante em etapas precoces do desenvolvimento das neoplasias (HOWSON et al. 1986). Sabe-se que há uma importante tendência de dietas ricas em carboidratos serem pobres em proteína e gorduras. Outros fatores ambientais como a má conservação dos alimentos e a ingestão de água, proveniente de poços que contenha uma alta concentração de nitrato contribuem para maiores taxas de incidências do câncer de estômago (KURTZ e SHERLOCK 1985; FENOGLIO-PREISER et al.1996).

Há também fatores de risco de origem patológica. A anemia perniciosa, as lesões pré-cancerosas como a gastrite atrofia e metaplasia intestinal e as infecções gástricas pela bactéria *Helicobacter pylori* têm importantes relações com o aparecimento desta neoplasia (AROMAA et al. 1996; SCHEIMANN e CUTLER 1999; ANDO et al. 2006). No entanto, uma lesão pré-cancerosa leva aproximadamente 20 anos para evoluir para a forma grave. Sendo assim, a medida mais eficaz para diminuir os riscos é iniciar uma dieta balanceada precocemente, ainda na infância (SIEWERT et al. 1998).

Quanto ao tabagismo, alguns estudos prospectivos mostram discreto risco aumentado entre os fumantes (NOMURA et al. 1990; KNELLER et al. 1991). Entre os estudos não prospectivos, alguns apontam aumento do risco (RISCH et al. 1985; HU et al. 1988) e outros não (JEDRYCHOWSKI et al. 1986; LA VECCHIA et al.1987). Considerando-se o consumo de álcool, alguns trabalhos demonstram risco aumentado para câncer gástrico (HOEY et al. 1981; JEDRYCHOWSKI et al. 1986). No entanto, os resultados ainda são conflitantes.

A partir de 1983, com a descrição das bactérias Gram-negativas flageladas e espiraladas por WARREN e MARSHALL (1983), denominadas *Helicobacter pylori* (HP), vários estudos começaram a ser desenvolvidos no sentido de determinar a patogenicidade desses microorganismos e suas relações com distúrbios gástricos, dentre eles o câncer gástrico.

A associação do HP com gastrite crônica tipo B vem sendo confirmada por inúmeros estudos em diferentes regiões do mundo. Sabe-se também que a gastrite crônica tipo B relaciona-se com o câncer gástrico, sendo um precursor desse na escala de evolução dessa patologia (BRITTO 1997). O HP parece se adaptar facilmente ao ambiente hostil do estômago, e há evidências de que, dentre outros danos, ele provoca o bloqueio do mecanismo natural da mucosa gástrica de concentrar e secretar o ácido ascórbico para o lúmen do estômago (SOBALA et al. 1989; TAYLOR e BLASER 1991), além de aumentar a taxa de proliferação do epitélio gástrico e reduzir o nitrato a nitrito, o que é visto em algumas espécies de HP (MARSHALL 1994)

O tratamento do carcinoma gástrico é eminentemente cirúrgico e depende principalmente do tipo de cirurgia e das margens cirúrgicas (BRENNAN e KARPEH 1996; ALLGAYER et al. 1997; BOZZETTI et al. 1999).

Os carcinomas gástricos metastáticos apresentam baixas taxas de sobrevida e o tratamento quimioterápico nestes casos não tem demonstrado boa resposta (KITAMURA et al. 1997). Nos últimos anos, muitos estudos vêm sendo realizados na tentativa de compreender melhor a biologia tumoral dos carcinomas gástricos (WU et al. 2009).

O mecanismo de progressão tumoral proposto para o câncer gástrico está associado principalmente ao câncer gástrico do tipo intestinal (LAUREN

1965) e baseia-se nas evidências provenientes de estudos epidemiológicos e experimentais em animais e no modelo de carcinogênese proposto por CORREA (1988). Segundo esse autor, as fases que antecedem o câncer gástrico formam um *continuum*, do epitélio gástrico normal a gastrite, que se torna crônica e evolui para atrófica com perda de glândulas, seguida de metaplasia do tipo intestino delgado e depois colônica, displasia e câncer. Acompanhando essas alterações, há diminuição da secreção ácida, síntese anormal de mucinas ácidas e excessivos níveis de nitrato e nitrito na cavidade gástrica (HANSSON et al. 1996).

1.2 ALTERAÇÕES GENÉTICAS NOS CARCINOMAS GÁSTRICOS

Como já mencionado, a carcinogênese gástrica é um processo de múltiplos passos, constituído por várias etapas que se inicia na mucosa gástrica normal, seguida por gastrite superficial, gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal, displasia e finalmente, carcinoma (CORREA e SHIAO 1994).

Essas condições costumam ser sequenciais e ocorrem num período de muitos anos como resultado da exposição a uma variedade de fatores endógenos e exógenos, que causam alterações genéticas (TAHARA1995).

Os recentes avanços da genética molecular têm mostrado que o acúmulo dessas várias anormalidades, incluindo a ativação de oncogênes e inativação de genes supressores de tumores, resulta no desenvolvimento do câncer (WRIGHT et al. 1992).

Alterações genéticas já descritas nos carcinomas gástricos (CÉSAR et al. 2002) incluem principalmente amplificações e mutações dos genes c-erbB-2, K-RAS, c-MET e p53.

1.3 O GENE PTEN

O gene PTEN é um gene supressor de tumor e está localizado no cromossomo 10q23.3. Mutações germinativas do gene PTEN têm sido encontradas em algumas síndromes autossômicas dominantes como na Síndrome de Cowden, em que os pacientes apresentam múltiplos hamartomas e risco aumentado de desenvolver neoplasias malignas (VETTORATO et al. 2003). Mutações somáticas do PTEN têm sido descritas em diversos tumores malignos. Estas mutações levam a completa inativação da atividade enzimática do PTEN bem como na perda total ou parcial do mRNA e/ou sua proteína (GIMM et al. 2000; SATO et al. 2002; LIMA et al. 2005). Em geral, o PTEN é responsável pela desfosforilação da fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP3), um produto do PI3K, inibindo a ativação do mecanismo da via do AKT (SULIS e PARSONS 2003). O papel de PI3K, a ativação da via do Akt e a perda de PTEN estão associados à tumorigenesis de vários tipos de câncer (NICHOLSON e ANDERSON 2002). Uma vez que a atividade de PI3K leva a fosforilação e ativação de Akt formando o pAkt, alguns trabalhos têm demonstrado que o pAKT está aumentado no tecido benigno peritumoral em comparação com os casos de câncer de próstata (JENDROSSEK et al. 2008) e em 100% das amostras de tumores carcinóides gastrointestinal (PITT et al. 2009). Em tumores pouco diferenciados a perda da expressão PTEN está

associada à progressão tumoral e comportamento biologicamente mais agressivo (WANG et al. 2002; PITT et al. 2009).

Estudos in vitro têm demonstrado que em células em diferenciação ou em repouso, o PTEN é encontrado preferencialmente nos núcleos das células (GIMM et al. 2000). A localização nuclear do PTEN tem sido associada às alterações em mecanismos moleculares como crescimento celular, apoptose e diferenciação (LIU et al. 2005). Estudos utilizando a técnica de imunistoquímica mostraram que a distribuição celular do PTEN varia entre os tecidos. Na maioria das células epiteliais, como pele, cólon, mama e próstata a localização é predominantemente citoplasmática. Já em neurônios, fibroblastos, células da medular adrenal e tireóide, a localização do PTEN é nuclear (MCMENAMIN et al. 1999; GIMM et al. 2000; LACHYANKAR et al. 2000). Alterações na localização subcelular do PTEN tem sido demonstrada em várias neoplasias (SANO et al. 1999) O PTEN é localizado principalmente no citoplasma das células na maioria dos tumores pancreáticos neuroendócrinos. Semelhantemente, nos carcinomas de tireóide e melanomas a perda de expressão nuclear do PTEN tem sido observada nos tumores indiferenciados e nas metástases (GIMM et al. 2000; DEICHMANN et al. 2002). As razões destas alterações do PTEN nos núcleos das células ainda não estão definidas. Sabe-se pouco a respeito da participação do PTEN na carcinogênese gástrica. Alguns estudos anteriores têm demonstrado que mutações do gene PTEN são raras nos carcinomas gástricos (OKAMI et al. 1998). Porém, outros estudos utilizando imunistoquímica e PCR, demonstraram que a expressão de PTEN nos carcinomas gástricos está diminuída ou ausente em comparação à mucosa gástrica normal, sugerindo a

participação deste gene na carcinogênese gástrica por meio de outro mecanismo celular que não a mutação (FEI et al. 2002; ZHENG et al. 2007).

Portanto, a participação deste gene na carcinogênese gástrica necessita ainda ser esclarecida.

1.4 PROTEÍNA MTOR

mTOR é uma proteína cinase, serina/treonina específica que regula os mecanismos de crescimento, proliferação e metabolismo celular, por meio da interação entre os nutrientes e os fatores que estimulam o crescimento celular. O mTOR controla uma variedade de funções celulares como transcrição, turnover de RNA, estabilidade protéica e organização do citoesqueleto. Em células dos mamíferos, o mTOR atua em pelo menos 2 complexos de sinalização funcionalmente distintos, conhecidos como mTORC1 e mTORC2. O mTORC1 é responsável pela regulação do crescimento celular sendo sensível à rapamicina, contrariamente, o mTORC2 é resistente à rapamicina e é responsável pela regulação da organização do citoesqueleto (INOKI et al. 2005). Um crescimento anormal da via de ativação do mTORC1 pode gerar um aumento anormal no crescimento celular que é uma característica do metabolismo de transformação maligna (EVREN et al. 2010).

A ação do mTOR é controlada pelo mecanismo da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) / Akt. As funções do mTOR são dependentes da formação de complexos com outras proteínas. No citoplasma das células de mamíferos, a proteína mTOR é co-localizada com 3 peptídeos: proteína regulatória-associada ao mTOR (raptor), GbetaL e mLST8. Raptor é a proteína que

apresenta os substratos para a fosforilação e inibição de alvos moleculares. GbetaL se liga ao domínio catalítico do mTOR e estabiliza a interação Raptor-mTOR, aumentando a atividade de cinase do mTOR. A ação do mLST8 ainda não é conhecida (GUERTIN e SABATINI 2007; XIAO et al. 2009).

A proteína mTOR está envolvida na regulação do crescimento e proliferação celulares, como resultado, o mTOR é considerado um importante alvo terapêutico para o tratamento das neoplasias malignas (LANG et al. 2007). Atualmente, drogas inibidoras de mTOR têm sido utilizadas em vários estudos clínicos para tratamento de diversos tumores sólidos (CHIANG e ABRAHAM 2007; GEISLER et al. 2007).

Nos carcinomas gástricos, o aumento da expressão de mTOR tem sido demonstrado por alguns autores, sendo considerado um fator prognóstico independente (LANG et al. 2007; YU et al. 2009; LOPICCOLO et al. 2008). Recentemente, MURAYAMA et al. (2009) demonstraram que a positividade citoplasmática do mTOR fosforilado está relacionada com maior profundidade de invasão tumoral, presença de metástases linfonodais, estadiamento clínico avançado e pior sobrevida global e livre de doença, sugerindo que a localização do mTOR nas células neoplásicas pode ter um papel importante na progressão e sobrevida dos pacientes com câncer gástrico (LOPICCOLO et al. 2008; MURAYAMA et al. 2009)

Alguns trabalhos clínicos têm demonstrado que os tratamentos com inibidores de mTOR em combinação com ciclofosfamida representam uma boa alternativa terapêutica para os casos resistentes ao tratamento quimioterápico tradicional (DANCEY 2006; CEJKA et al. 2008; LOPICCOLO et al. 2008).

A ativação da via AKT/PI3K/mTOR de sinalização foi estabelecido, como um determinante no crescimento de células tumorais e de sobrevivência em vários tumores sólidos (CHEN et al. 2005). A ativação do mTOR tem sido associado, ao aumento da proliferação celular (ROBERTS e GORES 2005).

2 JUSTIFICATIVA

Os carcinomas gástricos apresentam de maneira geral pouca resposta ao tratamento quimioterápico. O desenvolvimento de terapias alvo, como por exemplo, anticorpos monoclonais contra receptores de fatores de crescimento e inibidores de tirosina cinase pode ser uma possibilidade terapêutica para o carcinoma gástrico avançado. Assim, a determinação da participação dos genes PTEN e mTOR na carcinogênese gástrica poderá estabelecer novos alvos terapêuticos para o tratamento desta neoplasia.

3 OBJETIVOS

- Estudar a expressão Imunoistoquímica das proteínas mTOR, AKT, AKT fosforilado e PTEN, na mucosa gástrica normal e carcinomas gástricos;
- Determinar a localização das expressões destas proteínas (nuclear e/ou citoplasmática) na mucosa gástrica normal e carcinomas gástricos;
- Correlacionar a expressão protéica de mTOR, AKT e AKT fosforilado e PTEN nos tumores analisados, com estadiamento clínico da doença e o comportamento da mesma, avaliado pela sobrevida livre de doença e sobrevida global.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Trata-se de estudo retrospectivo onde foram selecionados 239 pacientes com diagnóstico de carcinoma gástrico, operados no Hospital A. C. Camargo no período compreendido entre 1998 a 2006; a partir do Banco de Dados do Departamento de Anatomia Patológica deste serviço.

A revisão de prontuários junto ao Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) desta instituição foi realizada e os dados foram obtidos e organizados em um banco de dados, utilizando o programa Microsoft Excel 2007.

Os casos foram selecionados a partir dos critérios de inclusão: pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico neste hospital; diagnóstico de carcinoma gástrico confirmado por laudo anatomopatológico, material representativo do tumor suficiente e disponível para as análises.

Os critérios de exclusão foram pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante de quimio ou radioterapia, pacientes com outras neoplasias prévias ou concomitantes tratados com quimio ou radioterapia. De acordo com estes critérios foram excluídos 19 casos.

Os casos de mucosa gástrica normal foram obtidos dos pacientes submetidos ao exame de endoscopia digestiva por outras causas que não o diagnóstico de carcinoma gástrico anterior.

4.2 VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Foram obtidas a partir da revisão dos prontuários e correspondem a dados demográficos (idade e gênero); tratamento (tipo de cirurgia); seguimento (sobrevida livre de doença, tipo de recidiva: local ou sistêmica, sobrevida global); características histopatológicas do tumor a partir do laudo anatomopatológico (localização, tamanho, nível de infiltração, invasões vascular, linfática e perineural, comprometimento linfonodal e de margens cirúrgicas); estadiamento TNM.

4.3 CONSTRUÇÃO DOS TISSUE MICROARRAY (TMA)

Os blocos representativos dos tumores e mucosa gástrica normal dos casos selecionados para este estudo foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica. Novos cortes histológicos foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (HE). Por meio do exame de microscopia óptica, as áreas representativas do tumor e mucosa gástrica normal foram identificadas e marcadas. Realizou-se então a marcação do bloco de parafina (bloco doador) na área escolhida, com caneta permanente.

Utilizando o *tissue microarray* (Beecher Instrument, Silver Springe, MD, USA) foram extraídos os cilindros das áreas marcadas, e os mesmos transferidos para novos blocos de parafina (bloco receptor). Cada caso foi representado em duplicata, com a obtenção de dois cilindros de 1mm cada, de duas áreas distintas e representativas do tumor. A construção destes TMAs foi realizada pela Dra Emy Fukuda Marques , que realizou a coleta dos dados do

adenocarcinoma gástrico dos pacientes operados no Hospital AC Camargo no período de 1998 a 2006. Foram realizados cem cortes histológicos e a partir do bloco de TMA, foram preparados os cortes histológicos seriados em lâminas de vidro previamente tratadas com película aderente especial (Instrumedics USA) na espessura de 5 μ m. Duas destas lâminas com níveis de profundidades diferentes de 20 cortes, foram utilizadas para a realização dos estudos com Imunoistoquímica .

Sistema de coordenadas, a partir de tabelas em Excel, foi utilizado para a determinação e identificação exata dos casos no TMA, tendo como referência o cilindro de tecido hepático.

Foram construídos 5 blocos de TMA, sendo que um deles com tecido gástrico normal, os demais com tecido tumoral divididos da seguinte forma, dois blocos de TMA contendo 100 casos, um bloco com 40 casos e outro com 18 casos. Em todos os TMAs, os casos foram dispostos em duplicatas.

4.4 IMUNOISTOQUÍMICA

A reação de Imunoistoquímica foi realizada utilizando o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Anatomia Patológica, Hospital A.C. Camargo.

- 1- Desparafinização e hidratação dos cortes histológicos: 3 banhos em Xilol (5 minutos cada), 4 banhos de álcool, lavagem por 5 minutos em água corrente;

- 2- Recuperação antigênica na Pascal (Câmara de Pressão) em solução Citrato pH 6,0 à 125° C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi). Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 3- Bloqueio da peroxidase endógena: 3 banhos de 5 minutos cada com Peróxido de Hidrogênio 10 volumes;
- 4- Lavagem em PBS;
- 5- Bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO);
- 6- Incubação do anticorpo primário, anti-mTOR (diluição 1:50) (Cell Signaling - clone Ser 2448), anti-PTEN (diluição 1:100) (ABCAM - policlonal), anti- AKT(diluição 1:500) (Cell Signaling - clone 2H10) e Anti-p-AKT (diluição 1:200) (Cell Signaling - clone Ser 473) por 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida.
- 7- Lavagem em PBS;
- 8- Incubação com anticorpo secundário (Advance HRP Link - DAKO) por 30 minutos (Ta);
- 9- Lavagem em PBS;
- 10- Incubação com Polímero (Advance HRP enzyme - DAKO) por 30 minutos (Ta);
- 11- Lavagem em PBS;
- 12- Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidine (DAB) 5 minutos (Kit Liquid DAB+ Substrate Chromogen System; DakoCytomation, Carpinteria, California);
- 13- Lavagem em água corrente;
- 14- Contra coloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos;

15- Lavagem em água corrente por 5 minutos;

16- Desidratação em álcool, Xilol, montagem em meio permanente;

Em todas as reações foram utilizados controles negativos e positivos. Foram utilizados como controle positivos casos de carcinomas de mama, próstata e cólon sabidamente positivos para os anticorpos primários utilizados. O controle negativo de todos os anticorpos foi determinado pela ausência do anticorpo primário com a substituição por PBS.

4.5 LEITURA DAS LÂMINAS

As lâminas de TMA foram analisadas por meio da microscopia digital realizada com o programa ACIS III (Automated Cellular Imaging System-ChromaVision Medical Systems®, San Juan Capistrano Califórnia – Estados Unidos da América).

O ACIS é composto de duas principais estruturas, sendo a primeira o microscópio associado a hardware eletromecânico, e o segundo um computador com janela para captura de imagens e um sistema de processamento das imagens. Cada lâmina corada por imunistoquímica foi digitalizada e as imagens capturadas foram revisadas pelo patologista na tela do computador. Um mínimo de cinco campos de maior poder de aumento foi selecionado pelo patologista. O ACIS foi capaz de detectar, contar e classificar células baseadas na cor, tamanho e formato. Algumas de suas características são: sensibilidade e acurácia, avaliação em quantidade e com boa reprodutibilidade e as avaliações podem ser arquivadas permanentemente.

Para cada amostra (core) foram selecionadas cinco áreas com maior celularidade (*hot spots*), utilizando-se a circunferência de 20X (recurso disponível no programa ACIS III). Este sistema reconhece 256 níveis de intensidade da coloração Imunoistoquímica e converteu estes para um escore fracionado da área selecionada.

Para as análises da expressão de AKT, pAKT, PTEN e mTOR foram utilizados os programas computacionais *cytoplasm histo*, *nuclear histo* e *membrane histo*, residentes no sistema e que mediram a intensidade de reação no citoplasma, núcleo e membrana, isoladamente.

Para a avaliação da expressão do anticorpo em cada caso estudado por meio da microscopia digital (ACIS) foi utilizado um escore denominado de escore combinado (EC), devido à utilização os parâmetros de intensidade e quantidade de área marcada. A definição de EC é a multiplicação da intensidade pela área estudada, sendo a área definida como a área marrom dividida a soma da área marrom com azul (BAUER et al. 2000; Sun et al. 2002; BECKER et al. 2006; MESSERSMITH et al. 2006; Hes et al. 2007; KANEHIRA et al. 2008; SLODKOWSKA et al. 2010).

$$\% \text{ Área marcada} = \text{Área Marrom} / \text{Área Azul} + \text{Área Marrom}$$

$$\text{EC} = \text{Intensidade} \times \% \text{ Área marcada}$$

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As informações coletadas dos prontuários médicos e os dados das expressões imunoistoquímica foram armazenadas em um banco de dados informatizado (Excel®, versão 2003, Microsoft) e posteriormente analisados

com o programa de computador SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e MedCalc® versão 11.

A casuística foi caracterizada pela estatística descritiva. Realizou-se a comparação entre grupos das variáveis quantitativas por meio do teste de Mann-Whitney ou teste de Kruskal-Wallis. Efetuaram-se as análises post-hoc por meio de comparações múltiplas 2 a 2 pelo teste de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni para o nível de significância. O coeficiente de Spearman foi adotado para a análise de correlação entre as variáveis numéricas e/ou ordinais. Utilizou-se o método de Kaplan-Meier para os cálculos de probabilidade de sobrevida global e livre de doença aos 5 anos. A data da cirurgia foi considerada como o momento inicial do seguimento. Para o cálculo do intervalo livre de doença considerou-se como momento final a data da recorrência (até 60 meses). Excluíram-se desta análise os pacientes com intervalo livre de doença menor do que 3 meses, por considerar que esta situação corresponde, na maioria das vezes, à persistência de doença e não à recorrência. Também foram excluídos aqueles nos estádios IV. Para o cálculo da sobrevida global considerou-se como momento final a data do óbito (até 60 meses). Considerou-se como censura o caso em que não se registrou óbito ou recorrência e, nesta situação, o momento final da análise correspondeu a data da última informação clínica. Utilizou-se o teste de log-rank para se comparar as curvas de sobrevida entre grupos. As informações acerca dos marcadores biomoleculares foram coletadas originalmente como variáveis contínuas. Estas foram convertidas em variáveis dicotômicas (baixa e alta expressão) para que fosse possível a análise de sobrevida. Determinou-se o ponto de corte por meio da análise de curva ROC. Para tanto, adotou-se como padrão de referência a

ocorrência ou não de óbito por qualquer natureza em 60 meses de seguimento. Utilizou-se o modelo de riscos proporcionais de Cox para a identificação dos fatores de risco independentes para óbito e recorrência. Cada análise multivariada foi realizada em duas etapas. Na primeira, procurou-se identificar os fatores de risco sociodemográficos, clínicos, histopatológicos e terapêuticos para o desfecho em questão, adotando-se a técnica de modelagem do tipo stepwise forward selection.

Nesta etapa, consideraram-se o estadiamento, a idade (variável contínua) e as margens cirúrgicas como variáveis compulsórias de ajuste. Na segunda etapa, as variáveis biomoleculares foram testadas uma a uma no modelo multivariado da primeira etapa, seguindo-se a técnica de modelagem anteriormente descrita. Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi igual a 5%.

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA E DADOS DA AMOSTRA

5.1.1 Dados demográficos e morfológicos

Os principais dados demográficos dos carcinomas gástricos estudados podem ser vistos nas Tabelas 1, 2 e 3. A idade dos 239 pacientes estudados variou de 20 a 88 anos (média de 63 anos, mediana de 65 anos e desvio padrão de 13,36). 60% (144) dos pacientes eram do gênero masculino, enquanto 40% (95) do gênero feminino.

O tamanho macroscópico do maior diâmetro tumoral variou de 0.45 a 19.0 cm (média 5,76 cm; mediana 5,0 cm e desvio padrão de 3,55). Os tumores que infiltravam a camada muscular própria, subserosa, serosa ou além da serosa foram agrupados em tumores com nível de infiltração profunda e corresponderam a 82% (196) dos casos. Os carcinomas superficialmente invasivos, cujo nível de infiltração da parede era mucosa e submucosa, correspondem a apenas 18% (43) dos casos. Em relação aos tipos histológicos observou-se maior frequência dos tipos intestinal 128 (53,6%), difuso 83 (34,7%) e misto ou inclassificável 28 (11,7%) na classificação de Lauren. O grau histológico mais frequente foi o pouco diferenciado em 136 casos (56,9%). A invasão linfática esteve presente em 52,7% (126) dos casos enquanto que a invasão sanguínea ausente em 84,9% (203), e a invasão perineural ausente também em 54,8% (131). O infiltrado inflamatório linfocitário esteve presente de moderada a intensa quantidade em 39 casos

(16,3%), porém na maioria dos casos 174 (72,8%) esteve ausente. A localização mais freqüente do tumor foi a distal, observada em 173 (72,4%) casos. Em relação à classificação TNM (UICC-2009-7edição), 56,4% (135) dos pacientes pertenciam aos estádios avançados (IIIA, IIIB, IIIC e IV). Dos 239 casos, 67,4% (161) apresentavam metástases linfonodais. As margens cirúrgicas estavam comprometidas em 5,4% (13) dos casos estudados.

Dos 239 pacientes estudados apenas 46 (19,2%) foram submetidos ao tratamento adjuvante.

A recidiva tumoral foi observada em 81(33,9%) dos pacientes.

Tabela 1 - Dados referentes à idade, tamanho do tumor, da amostra estudada

VARIÁVEIS	INTERVALO	MÉDIA MEDIANA DESVIO PADRÃO
Idade (anos)	20 a 88	Média: 63 Mediana: 65 Desvio Padrão: 13,36
Tamanho do tumor (cm)	0,45 a 19 cm	Média: 5,76 Mediana: 5 Desvio Padrão: 3,55

Tabela 2 - Dados clínicos e demográficos da amostra estudada.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	NÚMERO DE CASOS (%)
Gênero	Feminino	95 (40%)
	Masculino	144 (60%)
Tratamento adjuvante	Sim	46 (19,2 %)
	Não	193 (80,8%)

Tabela 3 - Dados histopatológicos dos 239 casos de carcinomas gástricos.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	NÚMERO DE CASOS (%)
Invasão da parede	Mucosa / submucosa	43 (18 %)
	Muscular própria	34 (14,2 %)
	Subserosa	7 (2,9 %)
	Serosa /Tecido adiposo	125 (52,3 %)
	Órgãos adjacentes	30 (12,6%)
Classificação de Lauren (Tipo histológico)	Intestinal	128 (53,6 %)
	Difuso	83 (34,7 %)
	Misto / Inclassicável	28 (11,7 %)
Diferenciação	Bem	25 (10,5 %)
	Moderado	78 (32,6 %)
	Pouco	136 (56,9 %)
Invasão linfática	Sim	126 (52,7%)
	Não	113 (47,3%)
Invasão sanguínea	Sim	36 (15,1 %)
	Não	203 (84,9 %)
Invasão perineural	Sim	108 (45,2 %)
	Não	131 (54,8 %)
Infiltração linfocitária	Leve	26 (10,9 %)
	Moderado	27 (11,3 %)
	Intenso	12 (5,0 %)
	Ausente	174 (72,8%)
Estadiamento (4 categorias)	IA e B	53 (22,2%)
	IIA e IIB	51 (21,4%)
	IIIA , IIIB e IIIC	100 (41,8%)
	IV	35 (14,6%)
Metástase linfonodal	Sim	161 (67,4%)
	Não	78 (32,6%)
Margens cirúrgicas	Livre	126 (94,6%)
	Comprometida	13 (5,4%)
Recidiva	Sim	81 (33,9%)
	Não	158 (66,1%)
Localização do tumor	Proximal	38 (15,9%)
	Distal	173 (72,4%)
	Outros	28 (11,7%)

5.1.2 Resultados dos marcadores imunoistoquímicos

Os valores das médias e medianas das expressões protéicas nos padrões citoplasmático, nuclear e de membrana do AKT, pAKT, MTOR e PTEN em todas as amostras estudadas podem ser vistas na Tabela 4. As Figuras 1-9 ilustram alguns exemplos de carcinomas gástricos positivos para estes marcadores.

Tabela 4 - Resultados da expressão imunoistoquímica dos marcadores nos padrões citoplasmático, nuclear e de membrana

Anticorpo	(Σ tecido normal e carcinoma gástrico) Número de casos	Resultados	
		Média	Mediana
AKT citoplasmático	421	77,52	77,44
AKT nuclear	421	58,94	66,86
pAKT citoplasmático	426	129,73	20,78
pAKT nuclear	426	47,28	54,68
PTEN citoplasmático	434	60,36	72,05
PTEN nuclear	434	64,93	79,93
mTOR citoplasmático	432	76,32	75,20
mTOR nuclear	431	62,85	74,50
mTOR membrana	432	40,01	30,98

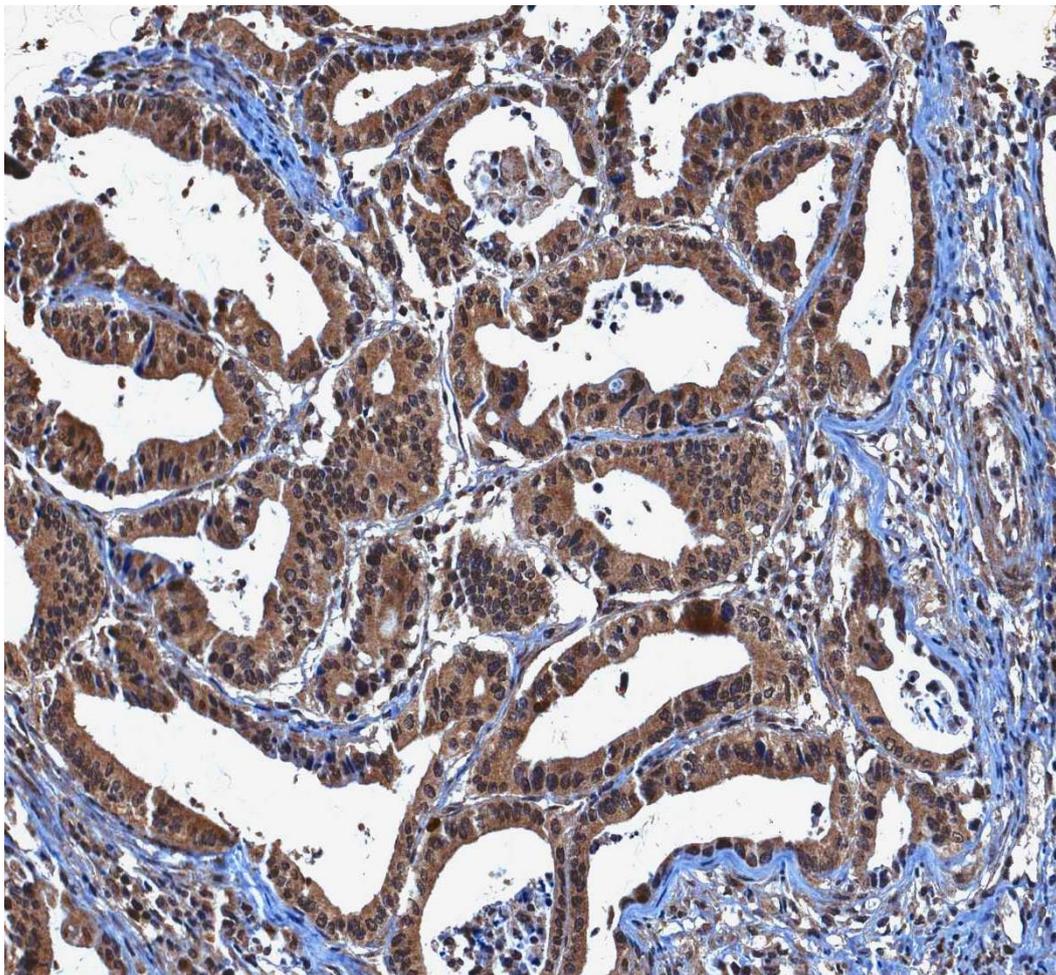


Figura 1 - Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação citoplasmática e nuclear de AKT (tamanho original 40x)

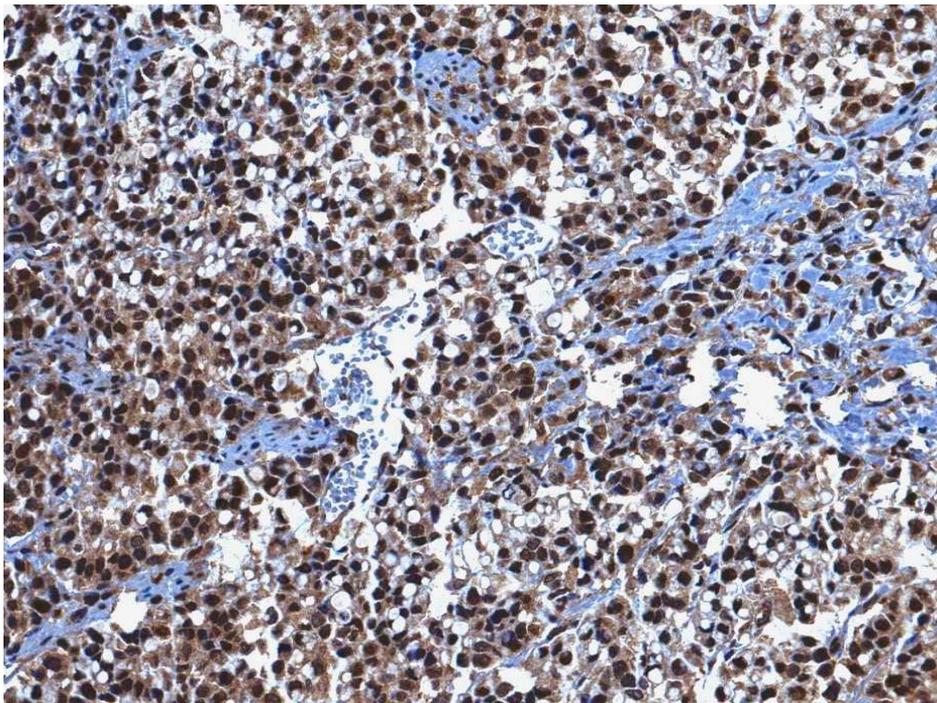


Figura 2A - Carcinoma gástrico do tipo difuso com marcação nuclear e citoplasmática de AKT (tamanho original 20x)

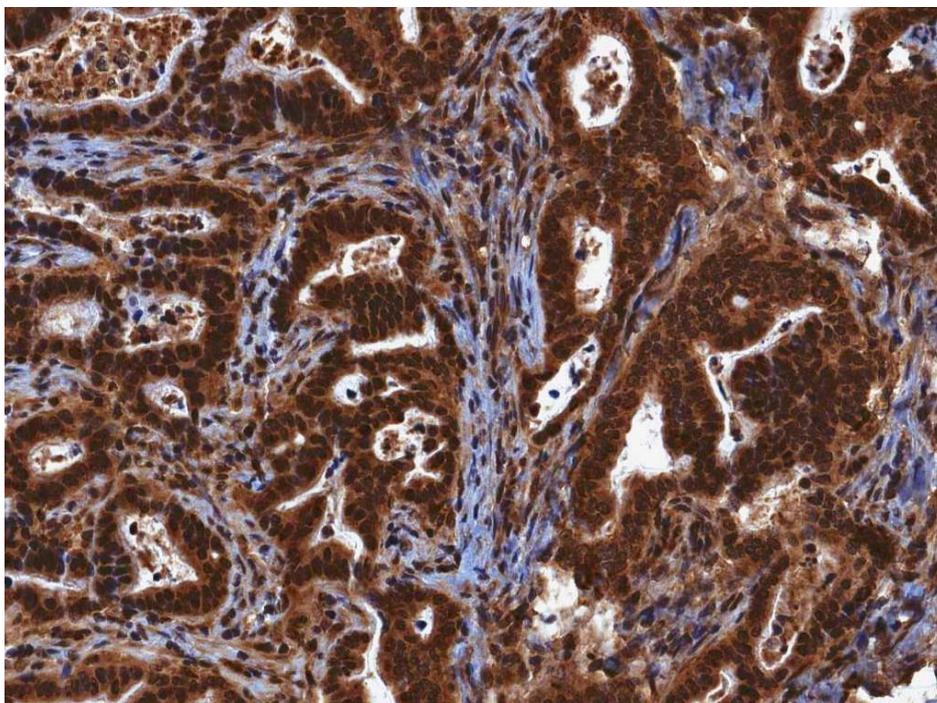


Figura 2B - Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação nuclear e citoplasmática de AKT (tamanho original 40x)

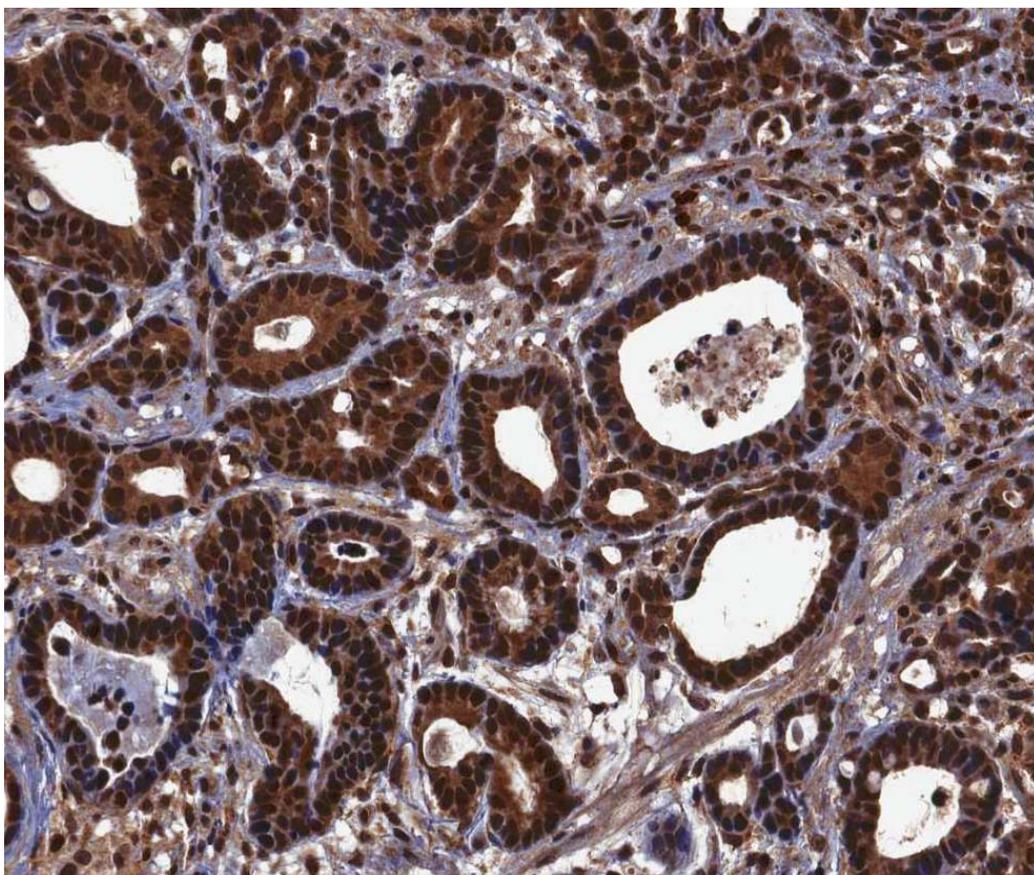


Figura 3 - Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação nuclear e citoplasmática de pAKT (tamanho original 40x)

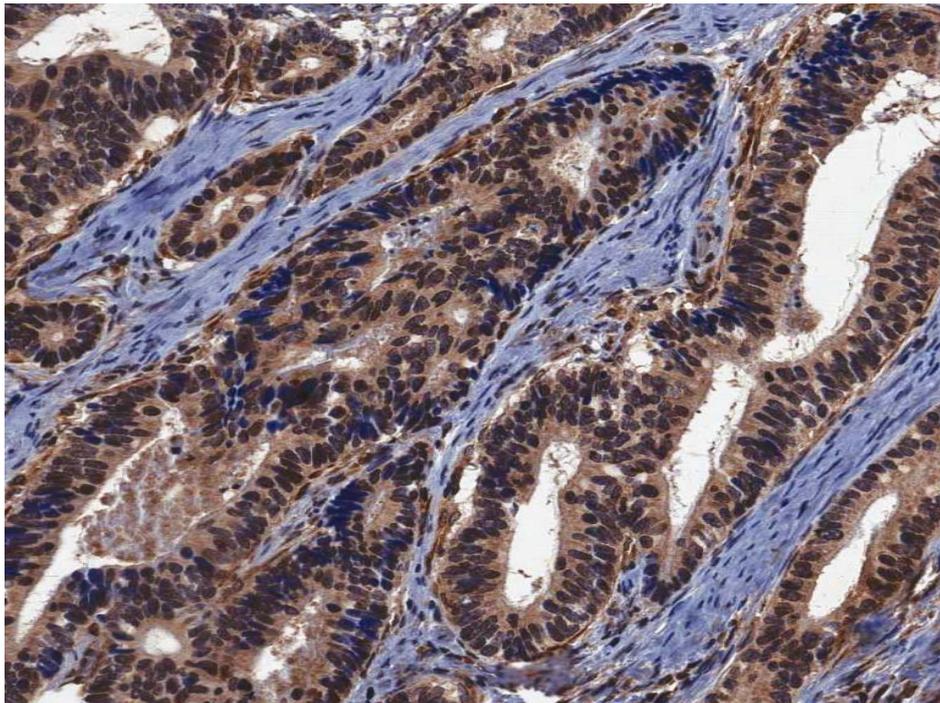


Figura 4A - Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação citoplasmática e nuclear de pAKT (tamanho original 40x)

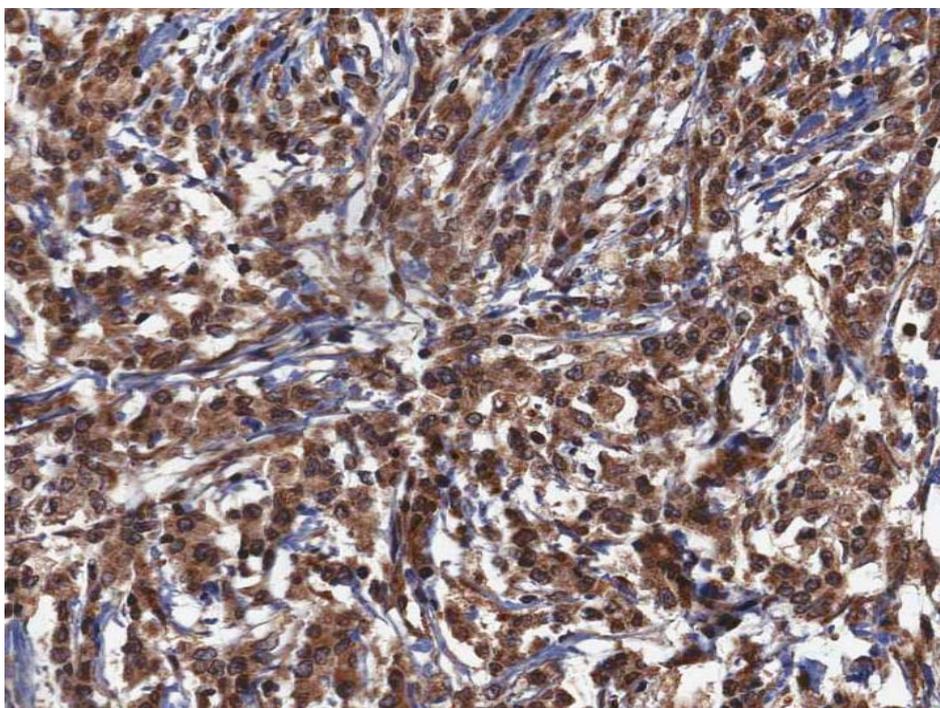


Figura 4B - Carcinoma gástrico do tipo difuso com marcação citoplasmática e nuclear de pAKT (tamanho original 40x)

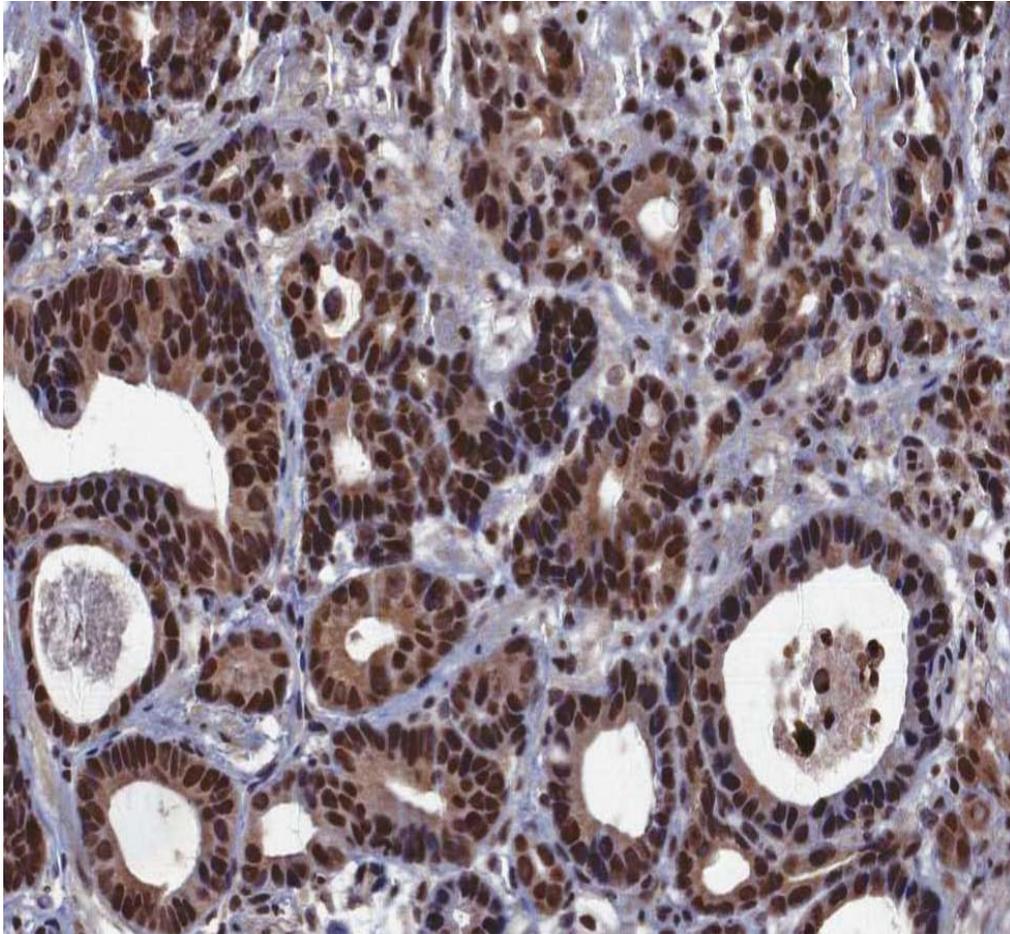


Figura 5 - Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação nuclear e citoplasmática de PTEN (tamanho original 40x)

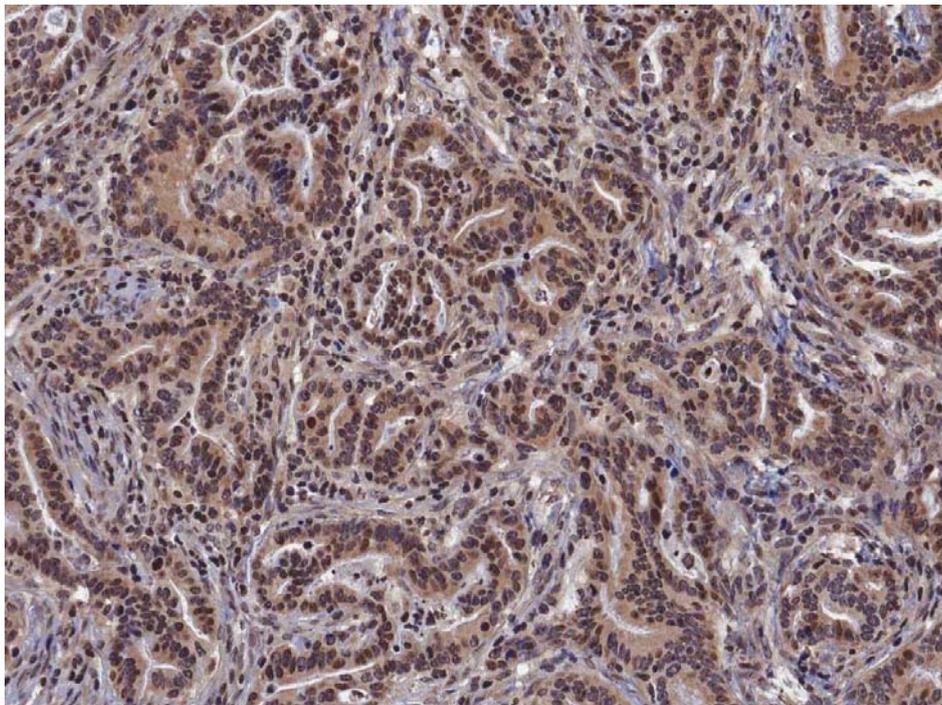


Figura 6A - Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação citoplasmática e nuclear de PTEN (tamanho original 40x)

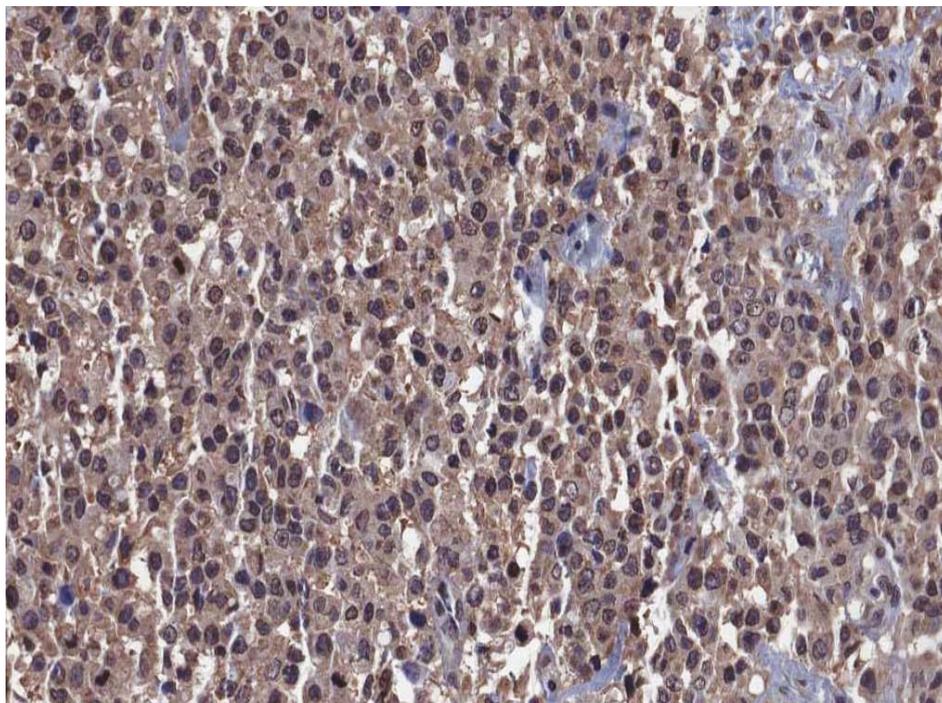


Figura 6B - Carcinoma gástrico do tipo difuso com marcação citoplasmática e nuclear de PTEN (tamanho original 40x)

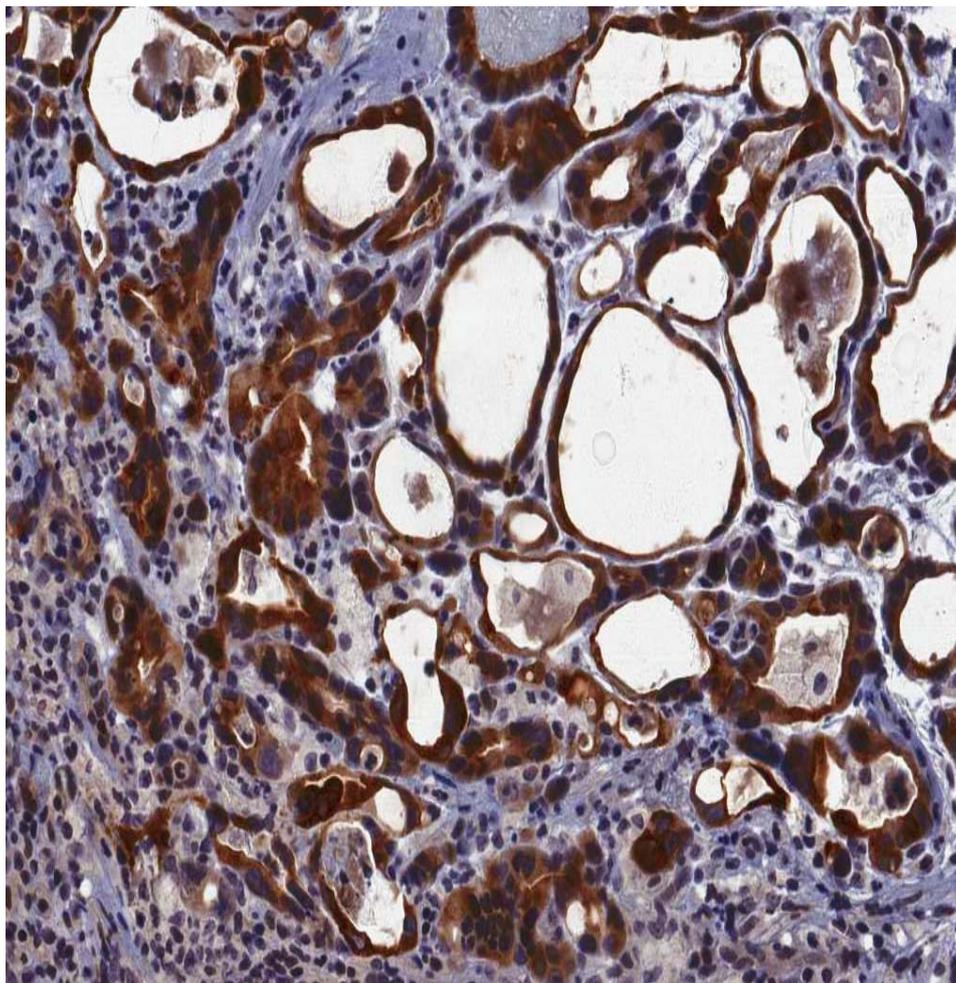


Figura 7 - Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação citoplasmática, nuclear e de membrana de mTOR (tamanho original 40x)

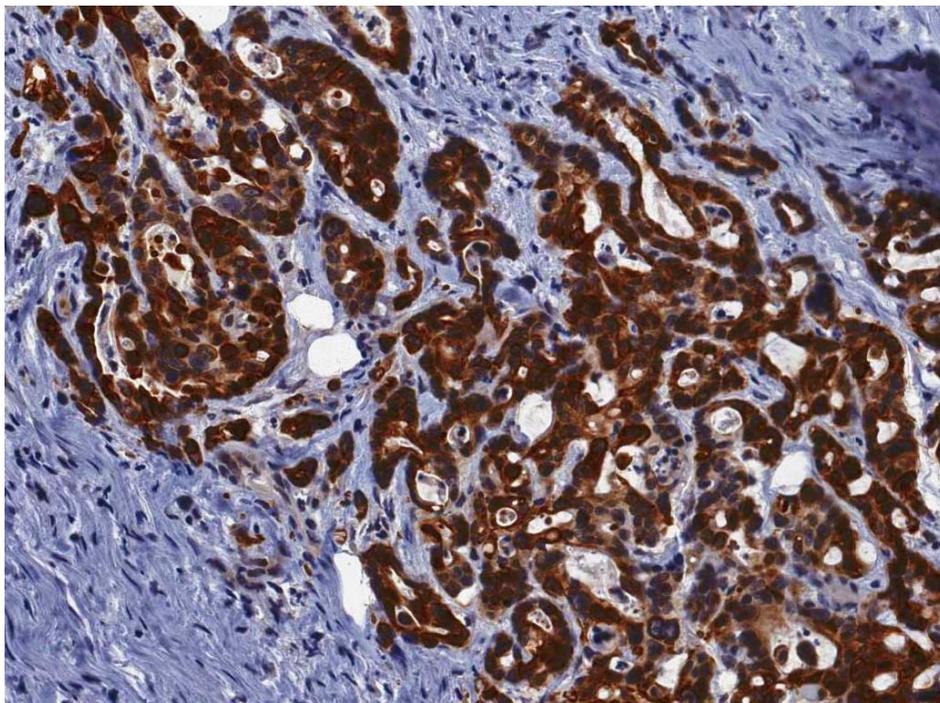


Figura 8A - Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação nuclear, citoplasmática e de membrana de mTOR (tamanho original 20x)

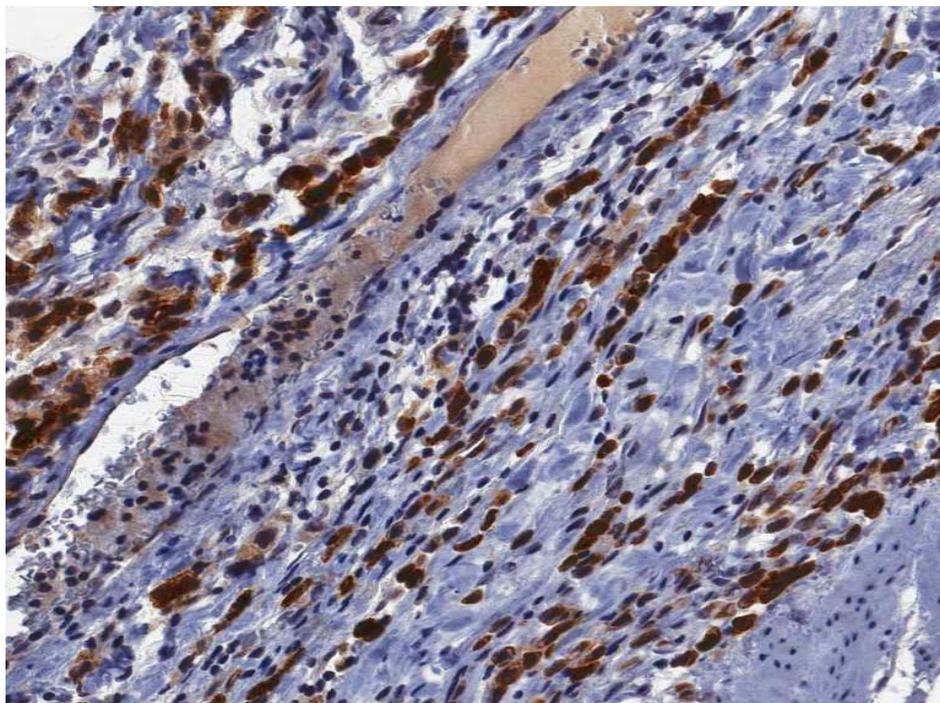


Figura 8B - Carcinoma gástrico do tipo difuso com marcação nuclear, citoplasmática e de membrana de mTOR (tamanho original 40x)

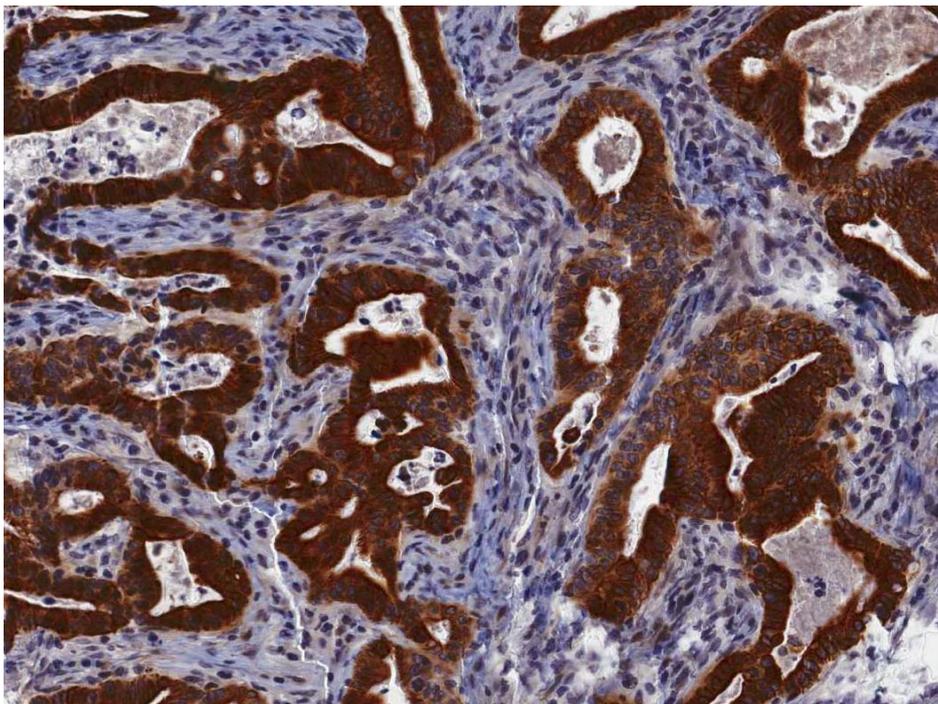


Figura 9A - Carcinoma gástrico do tipo intestinal com marcação de membrana, citoplasmática e nuclear de mTOR (tamanho original 40x)

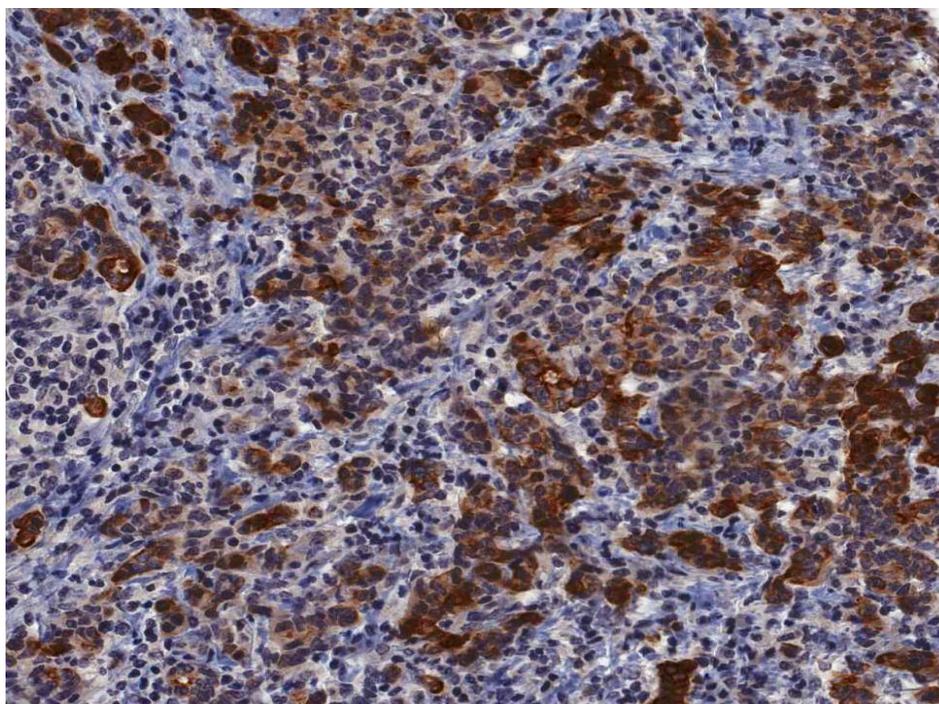


Figura 9B - Carcinoma gástrico do tipo difuso com marcação de membrana, nuclear e citoplasmática de mTOR (tamanho original 20x)

5.2 CORRELAÇÕES ENTRE OS MARCADORES DE IMUNOISTOQUÍMICA E DADOS CLINICOPATOLÓGICOS DOS CARCINOMAS GÁSTRICOS

5.2.1 AKT

A correlação entre os resultados da expressão imunoistoquímica no padrão citoplasmático, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação às seguintes variáveis estudadas: idade, localização tumoral, estágio clínico, N (número de linfonodos acometidos), M (presença de metástase a distância), tamanho tumoral, invasão linfática, invasão sanguínea, invasão perineural, infiltrado inflamatório intratumoral e grau de diferenciação histológica. Associações estatisticamente significantes foram observadas entre a expressão de AKT citoplasmática e gênero e classificação histológica de Lauren. Observamos que a média de expressão deste marcador foi maior no gênero feminino em comparação ao masculino. O carcinoma do tipo misto/indiferenciado também apresentou a média de expressão maior quando comparados aos demais subtipos. Estes dados estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5 - Correlações de AKT citoplasmático com as variáveis gênero e classificação de Lauren.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	AKT CITOPLASMA	
		Média de expressão	VALOR DE <i>p</i>
Gênero	Feminino	122,86	0,028
	Masculino	103,44	
Classificação de Lauren	Intestinal	62,82	0,024
	Difuso	69,89	
	Misto/Indiferenciado	81,60	

A correlação entre os resultados da expressão imunoistoquímica de AKT no padrão nuclear, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes para as seguintes variáveis estudadas: idade, gênero, localização tumoral, estágio clínico, N (número de linfonodos acometidos), M (presença de metástase a distância), tamanho tumoral, invasão linfática, invasão sanguínea, invasão perineural, infiltrado inflamatório intratumoral e classificação histológica de Lauren. Associação estatisticamente significativa foi observada somente entre a expressão de AKT nuclear e diferenciação histológica (Tabela 6). Observamos que a média de expressão deste marcador foi maior nos carcinomas bem diferenciados em comparação com os moderadamente ou pouco diferenciados ($p=0.001$).

Tabela 6 - Correlação de AKT nuclear com a variável diferenciação histológica

VARIÁVEL	CATEGORIA	AKT NUCLEAR	
		Média de expressão	VALOR DE p
Diferenciação histológica	Bem diferenciado	40,70	0,001
	Moderadamente	33,94	
	Pouco diferenciado	22,21	

5.2.2 pAKT

A associação entre os resultados da expressão imunoistoquímica no padrão citoplasmático, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes para as seguintes variáveis estudadas: idade, gênero, localização tumoral, N (número de linfonodos acometidos), invasão linfática, invasão sanguínea, invasão perineural, infiltrado inflamatório intratumoral e grau de diferenciação histológica e a classificação histológica de Lauren. Correlações estatisticamente significantes foram observadas entre a expressão de pAKT citoplasmática e o estágio clínico, o M (presença de metástase a distância) e o tamanho do tumor. Observamos que a média de expressão deste marcador foi maior nos estádios mais avançados T3 e T4. A ausência de metástase a distância (M) teve uma maior expressão. Já os tumores que apresentaram um tamanho maior tiveram uma maior expressão quando comparados aos de menor tamanho. Estes dados estão expostos na Tabela 7

Tabela 7 - Correlações de pAKT citoplasmático com as variáveis estágio clínico (2 categorias), M (metástase a distância) e Tamanho do tumor.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	pAKT CITOPLASMA	
		Média de expressão	VALOR DE p
Estádio clínico	T1 + T2	6,17	< 0,001
	T3 + T4	284,79	
M(metástase a distância)	Ausente	222,59	0,020
	Presente	13,234	
Tamanho do tumor	Contínuo (0,45 a 19,0cm)	5,76	< 0,001

As correlações entre os resultados da expressão imunoistoquímica do pAKT no padrão nuclear, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes para as seguintes variáveis estudadas: idade, gênero, localização tumoral, N (número de linfonodos acometidos), invasão linfática, invasão sanguínea, invasão perineural, infiltrado inflamatório intratumoral, M (presença de metástase a distância), grau de diferenciação histológica e a classificação histológica de Lauren. Correlações estatisticamente significantes foram observadas entre a expressão de pAKT nuclear, estágio clínico e o tamanho do tumor. Observamos que a média de expressão deste marcador foi maior nos estádios mais avançados T3 e T4. Assim como os tumores que apresentaram um tamanho maior tiveram uma maior expressão quando comparados aos de menor tamanho. Estes dados estão expostos na Tabela 8

Tabela 8 - Correlações de pAKT nuclear com as variáveis estágio clínico (2 categorias), e Tamanho do tumor.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	pAKT NUCLEAR	
		Média de expressão	VALOR DE p
Estádio clínico	T1 + T2	1,27	< 0,001
	T3 + T4	17,03	
Tamanho do tumor	Contínuo (0,45 a 19,0cm)	5,76	< 0,001

5.2.3 PTEN

As correlações entre os resultados da expressão imunoistoquímica do PTEN no padrão citoplasmático, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes para as seguintes variáveis estudadas: idade, gênero, localização tumoral, N (número de linfonodos acometidos), invasão linfática, invasão sanguínea, invasão perineural, infiltrado inflamatório intratumoral e grau de diferenciação histológica, estágio clínico, M (presença de metástase a distância) e tamanho do tumor. Pudemos notar que houve correlação estatisticamente significantes entre a expressão de PTEN citoplasmática e a classificação histológica de Lauren. Observamos que a média de expressão deste marcador foi maior nos carcinomas do tipo difuso quando comparada com a expressão dos carcinomas do tipo intestinal, com um valor de $p = 0,007$. Estes dados estão expostos na Tabela 9

Tabela 9 - Correlação de PTEN citoplasmático com a variável Classificação de Lauren

VARIÁVEIS	CATEGORIA	PTEN CITOPLASMA	
		Média de expressão	VALOR DE <i>p</i>
Classificação de Lauren	Intestinal**	63,97	0,026 (POS HC)= 0,007
	Difuso**	77,58	
	Misto/Indiferenciado	70,178	

** Teste de Mann-Whitney (POS HC)

As correlações entre os resultados da expressão imunoistoquímica do PTEN no padrão nuclear não demonstraram diferenças estatisticamente significantes para todas as variáveis estudadas: idade, gênero, localização tumoral, N (número de linfonodos acometidos), invasão linfática, invasão sanguínea, invasão perineural, infiltrado inflamatório intratumoral, grau de diferenciação histológica, estágio clínico, M (presença de metástase a distância) além do tamanho do tumor e da classificação histológica de Lauren.

5.2.4 mTOR

A associação entre os resultados da expressão imunoistoquímica do mTOR citoplasmático, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes para as seguintes variáveis estudadas: idade, gênero, localização tumoral, estágio clínico, M (presença de metástase a distância), tamanho do tumor, N (número de linfonodos acometidos), grau de diferenciação histológica, invasão linfática, invasão sanguínea e invasão perineural. Correlações estatisticamente significantes foram observadas entre a expressão de mTOR citoplasmática com o infiltrado inflamatório intratumoral e a classificação

histológica de Lauren (Tabela10). Observamos que a média de expressão deste marcador foi maior quando o infiltrado inflamatório era ausente ou leve. Esta expressão mostrou-se elevada nos carcinomas do tipo intestinal quando comparado aos carcinomas do tipo difuso.

Tabela 10 - Correlações de mTOR citoplasmático com as variáveis classificação de Lauren e Infiltrado inflamatório linfocitário.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	mTOR CITOPLASMA	
		Média de expressão	VALOR DE p
Classificação de Lauren	Intestinal**	57,68	0,017 (POS-HC)- 0,005
	Difuso**	40,89	
	Misto/Indiferenciado	56,48	
Infiltrado Inflamatório linfocitário	Ausente/leve	55,22	0,008
	Moderado / intenso	34,15	

**Teste de Mann-Whitney (POS HC)

As correlações entre os resultados da expressão imunoistoquímica do mTOR no padrão nuclear, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes para as seguintes variáveis estudadas: idade, gênero, localização tumoral, N (número de linfonodos acometidos), invasão linfática, invasão sangüínea, o tamanho do tumor, M (presença de metástase a distância) e grau de diferenciação histológica. Correlações estatisticamente significantes foram observadas entre a expressão de mTOR nuclear e o estágio clínico, a invasão perineural assim como também em relação ao infiltrado inflamatório linfocitário e a classificação histológica de Lauren (Tabela 11). Observamos que a média de expressão deste marcador foi maior nos estádios mais avançados T3 e T4. Assim como na ausência ou presença de leve infiltrado inflamatório linfocitário.

Nos carcinomas com ausência de invasão perineural a marcação de mTOR foi maior em comparação com aqueles com invasão perineural presente. O carcinoma do tipo intestinal também apresentou a média de expressão maior quando comparados ao subtipo difuso.

Tabela 11 - Correlações de mTOR nuclear com as variáveis classificação de Lauren, infiltrado inflamatório linfocitário, invasão perineural e estágio clínico (2 categorias).

VARIÁVEIS	CATEGORIA	mTOR NUCLEAR	
		Média de expressão	VALOR DE p
Classificação de Lauren	Intestinal**	45,79	0,008 (POS-HC)- 0,002
	Difuso**	32,92	
	Misto/Indiferenciado	43,83	
Infiltrado Inflamatório linfocitário	Ausente/leve	43,21	0,008
	Moderado / intenso	30,51	
Invasão perineural	Sim	36,18	0,026
	Não	45,13	
Estádio clínico	T1 + T2	35,38	0,036
	T3 + T4	43,85	

** teste de Mann-Whitney (POS HC)

As correlações entre os resultados da expressão imunohistoquímica do mTOR no padrão de membrana, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes para as seguintes variáveis estudadas: idade, gênero, localização tumoral, N (número de linfonodos acometidos), invasão linfática, invasão sangüínea, invasão perineural, tamanho do tumor, M (presença de metástase a distância), grau de diferenciação histológica e a classificação histológica de Lauren. Correlações estatisticamente significantes foram observadas entre a expressão de mTOR membrana e o estágio clínico e infiltrado inflamatório intratumoral (Tabela 12). Observamos que a média de expressão deste marcador foi maior nos estádios mais avançados T3 e T4 e nos carcinomas com infiltrado inflamatório linfocitário ausente ou leve.

Tabela 12 - Correlações de mTOR membrana com as variáveis estágio clínico (2 categorias), e infiltrado inflamatório linfocitário.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	mTOR MEMBRANA	
		Média de expressão	VALOR DE p
Estádio clínico	T1 + T2	47,80	0,05
	T3 + T4	56,48	
Infiltrado Inflamatório linfocitário	Ausente/leve	55,73	0,023
	Moderado / intenso	43,31	

5.3 CORRELAÇÕES ENTRE OS MARCADORES DE IMUNOISTOQUÍMICA NOS CARCINOMAS GÁSTRICOS

Os marcadores estudados apresentaram uma correlação significativa entre eles, com exceção da expressão do mTOR citoplasmático com a expressão do mTOR de membrana (-0,029 e $p=0,547$) e do AKT citoplasmático (0,025 e $p=0,604$).

Observamos que existe correlação inversamente fraca e significativa entre PTEN citoplasmático e estes três biomarcadores, mTOR citoplasmático (-0,222 e $p<0,001$), AKT citoplasmático (-0,129 e $p<0,001$) e pAKT citoplasmático (-0,212 e $p<0,001$). Enquanto que a correlação entre PTEN citoplasmático e outros quatro biomarcadores, PTEN nuclear (-0,328 e $p<0,001$), mTOR nuclear (-0,372 e $p<0,001$), AKT nuclear (-0,273 e $p<0,001$) e pAKT nuclear (-0,329 e $p<0,001$) e com cada um deles inversamente regular e significativa. Já a correlação entre PTEN citoplasmático e mTOR de membrana (0,146 e $p<0,001$) e diretamente fraca e significativa.

A correlação existente entre PTEN nuclear e estes três marcadores, mTOR citoplasmático (0,501 e $p<0,001$), mTOR nuclear (0,686 e $p<0,001$) e pAKT nuclear (0,732 e $p<0,001$) é diretamente moderada e significativa. Enquanto que a correlação entre PTEN nuclear e AKT nuclear (0,827 e $p<0,001$) é diretamente forte e significativa. Entre PTEN nuclear e pAKT citoplasmático (0,732 e $p<0,001$) é diretamente regular e significativa. Já a correlação entre PTEN nuclear e AKT citoplasmático (0,425 e $p<0,001$) é diretamente fraca e significativa. Todavia entre PTEN nuclear e mTOR de membrana (-0,365 e $p<0,001$) é inversamente regular e significativa.

Neste biomarcador mTOR citoplasmático existe uma correlação diretamente moderada e significativa com mTOR nuclear (0,660 e $p < 0,001$) e com AKT nuclear (0,532 e $p < 0,001$), entretanto existe uma correlação diretamente regular e significativa entre mTOR citoplasmático e pAKT nuclear (0,422 e $p < 0,001$). Já a correlação existente entre mTOR citoplasmático e pAKT citoplasmático (0,247 e $p < 0,001$) é diretamente fraca e significativa.

Observamos que existe correlação diretamente moderada e significativa entre mTOR nuclear e estes dois biomarcadores, AKT nuclear (0,676 e $p < 0,001$) e pAKT nuclear (0,662 e $p < 0,001$). Enquanto que a correlação entre mTOR nuclear e AKT citoplasmático (0,160 e $p < 0,001$) é diretamente fraca e significativa. Já a correlação entre mTOR nuclear é inversamente fraca e significativa com estes dois biomarcadores, mTOR de membrana (-0,136 e $p = 0,005$) e pAKT citoplasmático (0,120 e $p < 0,001$).

Existe uma correlação inversamente regular e significativa entre mTOR de membrana e estes dois biomarcadores, AKT nuclear (-0,352 e $p < 0,001$) e pAKT nuclear (-0,337 e $p < 0,001$). A correlação entre mTOR de membrana e outros dois biomarcadores, AKT citoplasmático (-0,125 e $p = 0,010$) e pAKT citoplasmático (-0,120 e $p < 0,013$) é com cada um deles inversamente fraca e significativa.

Com este biomarcador AKT citoplasmático existe uma correlação diretamente fraca e significativa entre estes três biomarcadores, AKT nuclear (0,135 e $p = 0,005$), pAKT citoplasmático (0,135 e $p = 0,005$) e pAKT nuclear (0,103 e $p = 0,034$).

Neste biomarcador AKT nuclear existe uma correlação diretamente regular e significativa com pAKT citoplasmático (0,481 e $p < 0,001$), entretanto a

correlação é diretamente forte e significativa entre AKT nuclear e pAKT nuclear (0,776 e $p < 0,001$).

Já a correlação entre pAKT citoplasmático e pAKT nuclear (0,596 e $p < 0,001$) é diretamente moderada e significativa.

Todos dados destas correlações podem ser vistos na Tabela 13.

Tabela 13 - Correlação entre a expressão de cada proteína estudada nos carcinomas gástricos

	PTEN cit								
PTEN cit		PTEN nucl							
PTEN nucl	<u><0.001</u>		mTOR cit						
mTOR cit	<u><0.001</u>	<0.001		mTOR nucl					
mTOR nucl	<u><0.001</u>	<0.001	<0.001		mTOR memb				
mTOR memb	0.002	<u><0.001</u>	NS	<u>0.005</u>		AKT cit			
AKT cit	<u>0.008</u>	0.004	NS	0.001	<u><0.010</u>		AKT nucl		
AKT nucl	<u><0.001</u>	<0.001	<0.001	<0.001	<u><0.001</u>	0.005		pAkt cit	
pAkt cit	<u><0.001</u>	<0.001	<0.001	<u><0.001</u>	<u><0.013</u>	0.005	<0.001		pAKTnuc
pAKTnuc	<u><0.001</u>	<0.001	<0.001	<0.001	<u><0.001</u>	0.034	<0.001	<0.001	

Direta=0 a 0,25/ Fraca 0,26 a 0,50/ Regular 0,51 a 0,75/ Moderada 0,76 a 1,00/Forte
 Inversa=0 a 0,25/ Fraca 0,26 a 0,50/ Regular 0,51 a 0,75/Moderada 0,76 a 1,00/ Forte

5.4 CORRELAÇÕES ENTRE OS MARCADORES DE IMUNOISTOQUÍMICA NAS MUCOSAS GÁSTRICAS NORMAIS E CARCINOMAS GÁSTRICOS

5.4.1 AKT

As correlações entre os resultados da expressão imunoistoquímica de AKT na mucosa normal e carcinomas gástricos, demonstraram que as médias de expressão tanto citoplasmática quanto nuclear são significativamente maiores na mucosa gástrica normal em relação ao tecido neoplásico. Estes dados estão expostos na Tabela 14.

Tabela 14 - Correlação da expressão de AKT citoplasmático e nuclear com a mucosa gástrica normal e carcinomas gástricos

VARIÁVEIS	N (número de casos)	AKT CITOPLASMA		AKT NUCLEAR	
		Média de expressão	VALOR DE p	Média de expressão	VALOR DE p
Tecido normal	200	88,64	<0.001	93,13	<0.001
Carcinomas Gástricos	221	67,46		27,99	

5.4.2 pAKT

A correlação entre o resultado da expressão imunoistoquímica de pAKT citoplasmática no carcinoma gástrico demonstra que a média de expressão é significativamente maior que na mucosa normal. Já a associação do resultado da expressão imunoistoquímica de pAKT nuclear na mucosa gástrica normal,

mostra que a média desta expressão é significativamente maior do que no carcinoma gástrico. Dados vistos na Tabela 15.

Tabela 15 - Correlação da expressão de pAKT citoplasmático e nuclear com a mucosa gástrica normal e carcinomas gástricos.

VARIÁVEIS	N (número de casos)	pAKT CITOPLASMA		pAKT NUCLEAR	
		Média de expressão	VALOR DE p	Média de expressão	VALOR DE p
Tecido normal	200	60,39	<0.001	97,44	<0.001
Carcinomas Gástricos	226	191,09		11,73	

5.4.3 PTEN

A associação entre o resultado da expressão imunoistoquímica de PTEN citoplasmático no carcinoma gástrico, demonstra que a média de expressão é significativamente maior do que na mucosa normal. Já a mucosa gástrica normal mostra que a média do PTEN nuclear é significativamente maior do que no tecido neoplásico. Dados expostos na Tabela 16.

Tabela 16 - Correlação da expressão de PTEN citoplasmático e nuclear com a mucosa gástrica normal e carcinomas gástricos.

VARIÁVEIS	N (número de casos)	PTEN CITOPLASMA		PTEN NUCLEAR	
		Média de expressão	VALOR DE p	Média de expressão	VALOR DE p
Tecido normal	200	49,85	<0.001	95,71	<0.001
Carcinomas Gástricos	234	69,33		38,63	

5.4.4 mTOR

As correlações entre os resultados da expressão imunoistoquímica de mTOR na mucosa normal e carcinomas gástricos, demonstraram que as médias de expressão tanto citoplasmática quanto nuclear são significativamente maiores na mucosa gástrica normal em relação ao tecido neoplásico. Já a média de expressão imunoistoquímica de mTOR na membrana é significativamente maior no carcinoma gástrico que na mucosa normal (Tabela 17).

Tabela 17 - Correlação da expressão de mTOR citoplasmático, de membrana e nuclear com a mucosa gástrica normal e carcinomas gástricos.

VARIÁVEIS	N (número de casos)	mTOR CITOPLASMA		mTOR MEMBRANA		N (número de casos)	mTOR NUCLEAR	
		Média de expressão	VALOR DE p	Média de expressão	VALOR DE p		Média de expressão	VALOR DE p
Tecido normal	200	104,89	<0.001	24,20	<0.001	199	88,24	<0.001
Carcinomas Gástricos	232	51,68		53,64		232	41,08	

5.5 ANÁLISES DE SOBREVIDA GLOBAL DOS PACIENTES COM CARCINOMAS GÁSTRICOS

Dos 239 pacientes estudados, 154 (64,4%) foram a óbito e 85 (35,6%) se encontram vivos. Deste grupo, o tempo médio de segmento foi de 49 meses e o tempo máximo de 154 meses.

Podemos observar que existe uma diferença significativa na sobrevida global quanto ao gênero feminino. Tumores localizados na região proximal também apresentam melhor taxa de sobrevida. O estatus das margens cirúrgicas é outro fator importante na sobrevida global. Pacientes com estágio clínico mais precoce apresentam melhor taxa de sobrevida global em relação aos pacientes com estádios avançados. Linfonodos livres de comprometimento faz em parte dos fatores com melhores taxas de sobrevida global. Assim como a ausência de metástase a distância e o tamanho tumoral menor de 3cm. Outros fatores como ausência de invasão sanguínea, linfática e perineural também influenciam as taxas de sobrevida. Quanto aos marcadores biomoleculares temos como fator protetor, o aumento da expressão do marcador PTEN padrão nuclear, e a baixa expressão dos marcadores mTOR padrão citoplasmático e de membrana. Os dados podem ser visto na tabela 18.

Tabela 18 - Análise univariada dos parâmetros clinicopatológicos e biomoleculares.

Variáveis	Categorias	Taxa de Sobrevida	Valor de p
		Global em 5 anos (%)	
Gênero	Sexo feminino	50,5	0,026
	Sexo masculino	36,1	
Localização do tumor	Proximal	55,3	0,001
	Distal	42,8	
	Outras	17,9	
Margens cirúrgicas	Livres	43,4	< 0,001
	Comprometidas	15,4	
Estádio Clínico - 4 categorias	Estádio 1	77,4	< 0,001
	Estádio 2	52,9	
	Estádio 3	29	
	Estádio 4	8,6	
N (número de linfonodos comprometidos)	0	66,7	< 0,001
	1	43,6	
	2	26,1	
	3	5,4	
M (metástase a distância)	Não	47,5	< 0,001
	Sim	8,6	
Tamanho do tumor	Até 3 cm	54,1	0,03
	> 3 cm	37,6	
Invasão linfática	Sim	33,3	< 0,001
	Não	51,3	
Invasão sanguínea	Sim	25	0,005
	Não	44,8	
Invasão perineural	Sim	30,6	< 0,001
	Não	51,1	
PTEN_nuc (ROC: cut-off =30)	Baixa expressão (cut-off<30)	30,3	0,008
	Alta expressão (cut-off≥ 30)	47,6	
mTOR_cit (ROC: cut-off = 83)	Baixa expressão (cut-off<83)	46,9	0,002
	Alta expressão (cut-off≥ 83)	27,8	
mTOR_memb (ROC:cut-off = 54)	Baixa expressão (cut-off<54)	51	0,012
	Alta expressão (cut-off≥ 54)	32,8	

5.5.1 Análises univariadas de sobrevida global dos pacientes com carcinomas gástricos em relação aos dados clinicopatológicos e biomarcadores

Na análise da curva de sobrevida, podemos observar alguns fatores que aumentam significativamente a sobrevida global, sendo eles: gênero feminino (Figura 10), localização do tumor na região proximal (Figura 11), margem cirúrgica livre (Figura 12), estágio clínico precoce (Figura 13), N (número de linfonodos positivos) (Figura 14), M (metástase a distância) (Figura 15), tamanho do tumor inferior a 3 cm (Figura 16) e ausência de invasões linfáticas (Figura 17), sanguíneas (Figura 18) e perineurais (Figura 19). A alta expressão do marcador Pten padrão nuclear (Figura 20), e a baixa expressão dos marcadores mTOR padrão citoplasmático (Figura 21) e de membrana (Figura 22) influenciaram significativamente na sobrevida global.

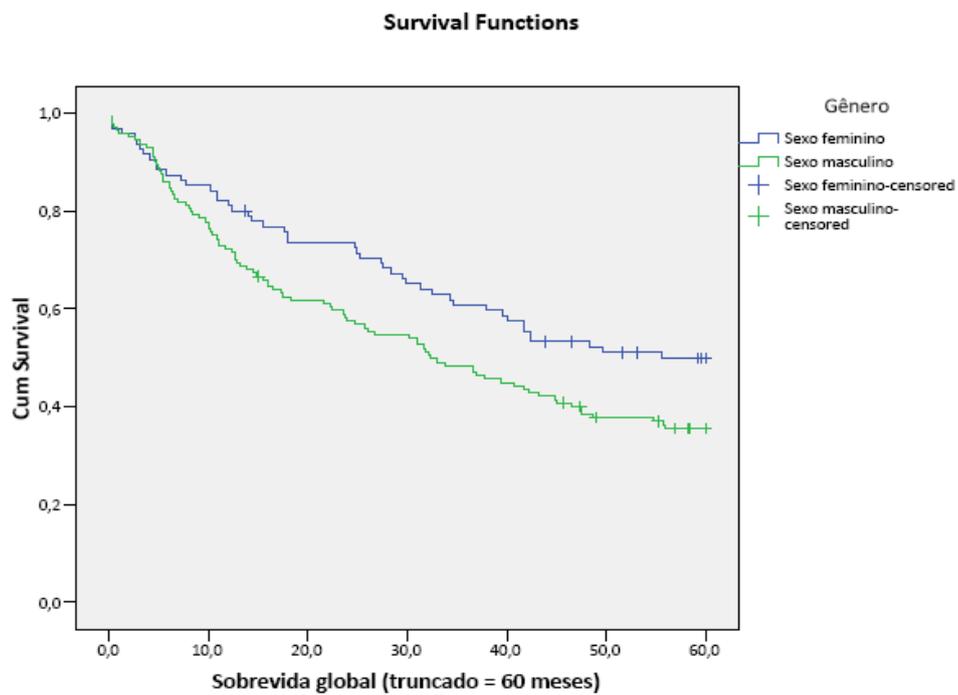


Figura 10 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao gênero.

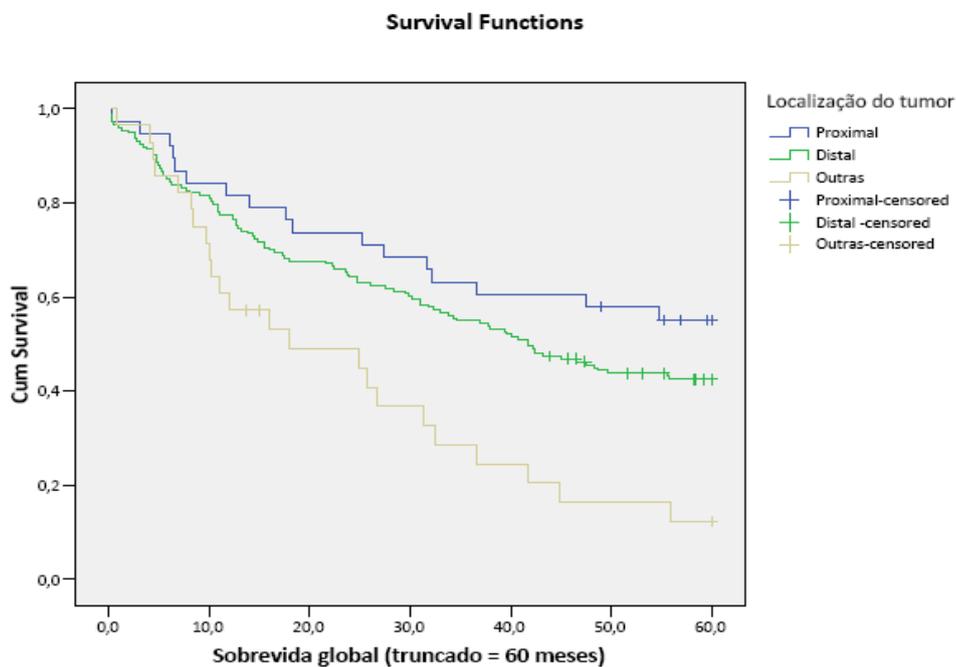


Figura 11 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à localização do tumor.

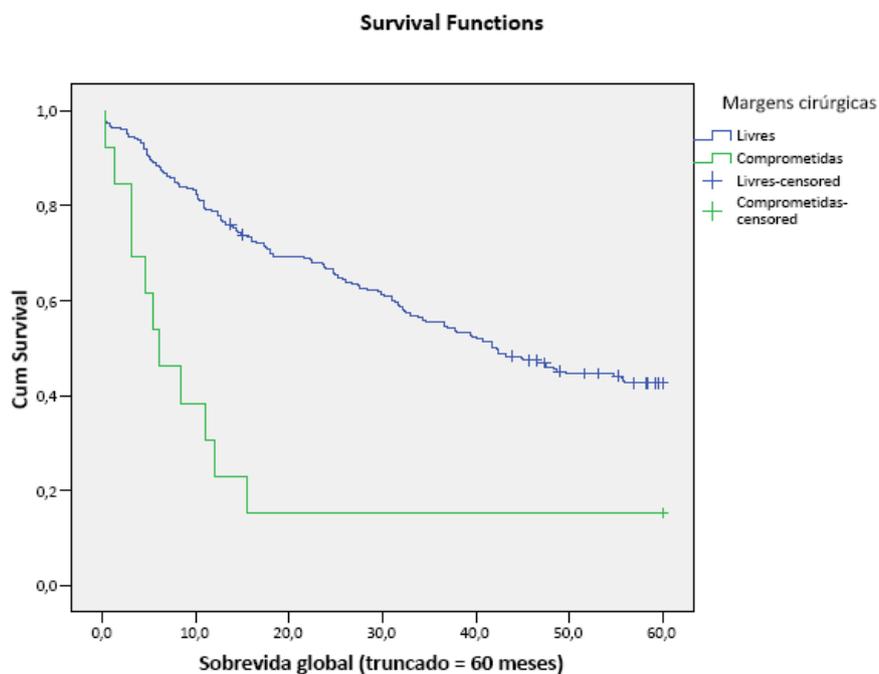


Figura 12 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação às margens cirúrgicas.

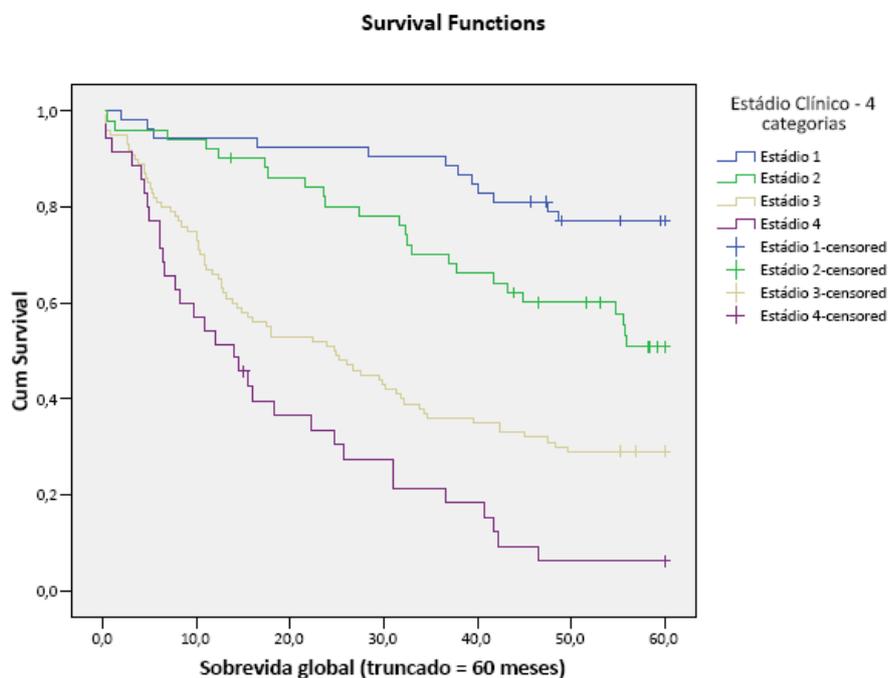


Figura 13 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao Estádio clínico - 4 categorias.

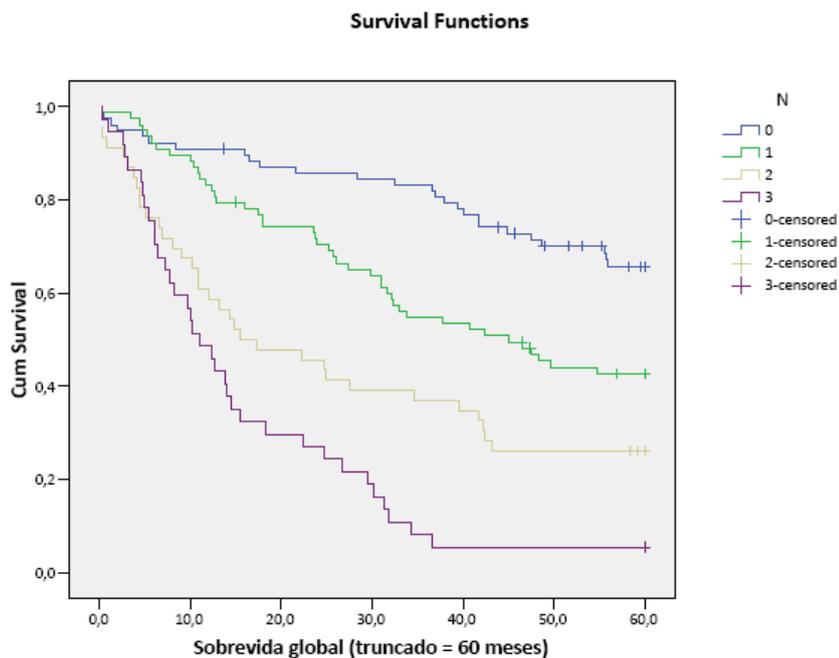


Figura 14 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao N (número de linfonodos positivos).

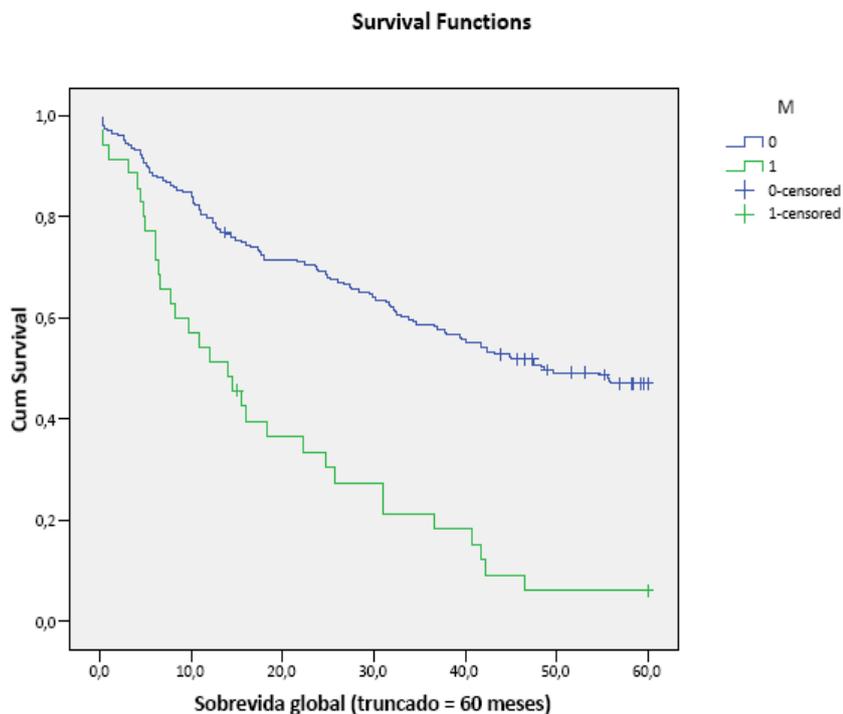


Figura 15 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao M (metástase a distância).

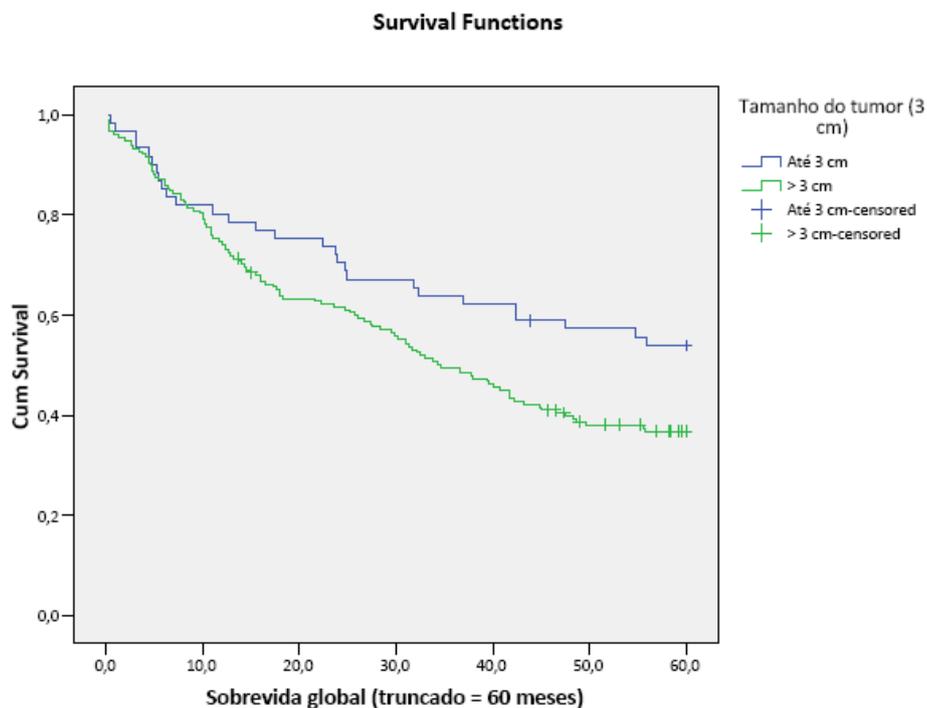


Figura 16 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao tamanho do tumor (3cm).

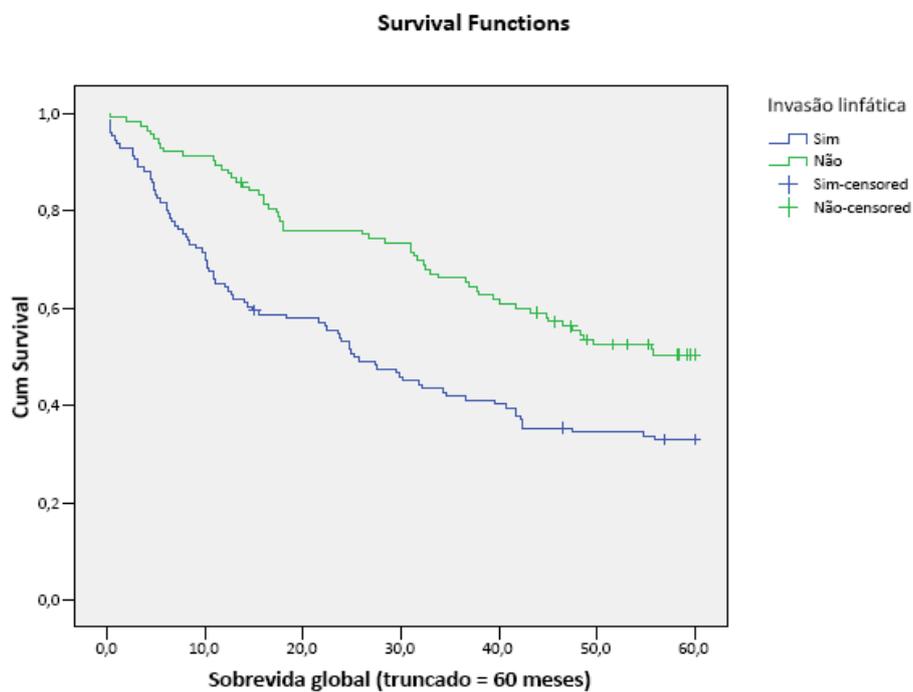


Figura 17 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à invasão linfática.

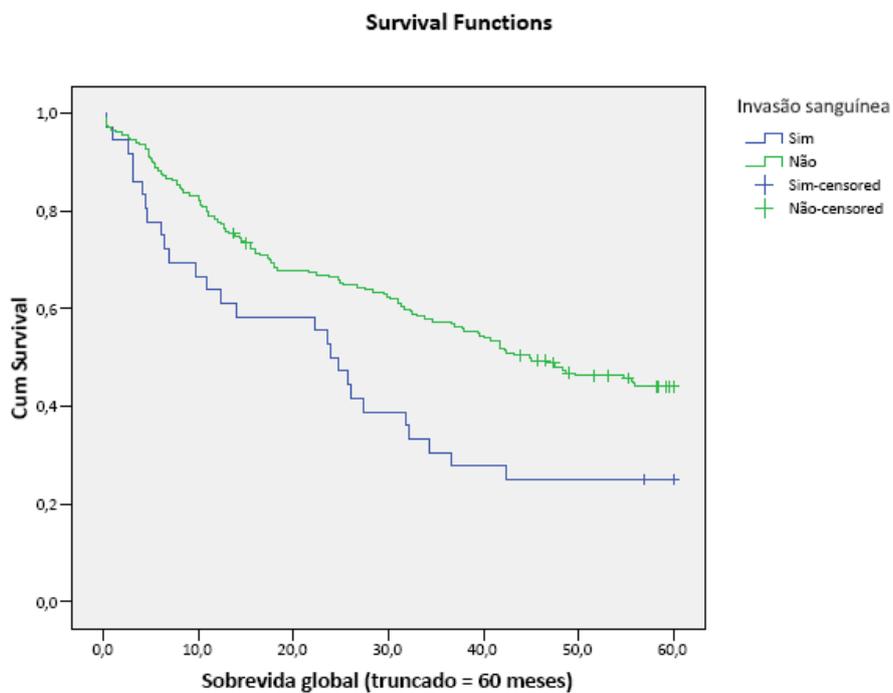


Figura 18 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à invasão sanguínea.

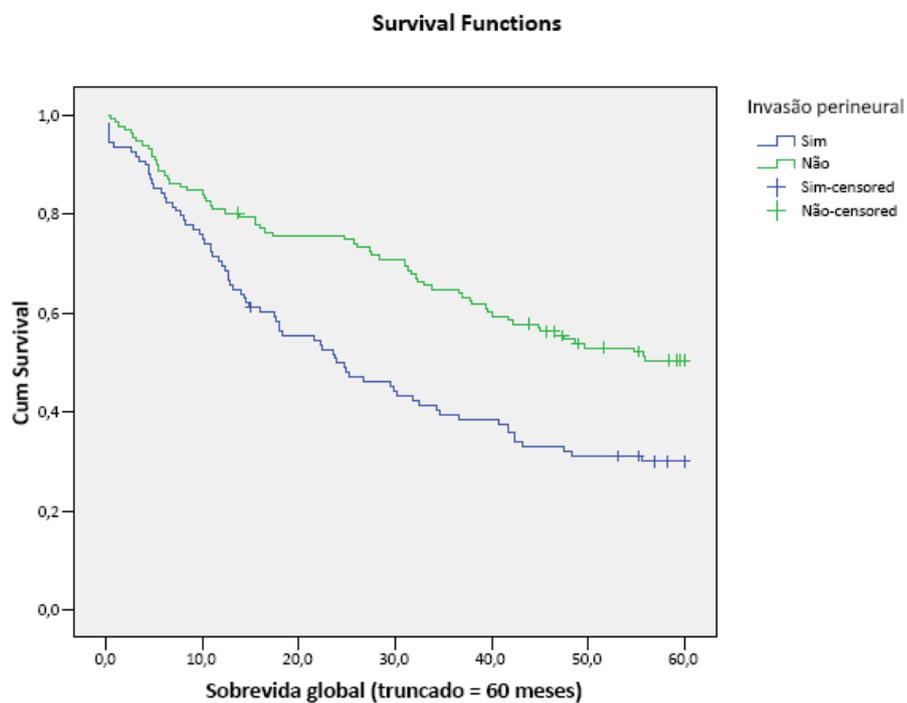


Figura 19 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à invasão perineural.

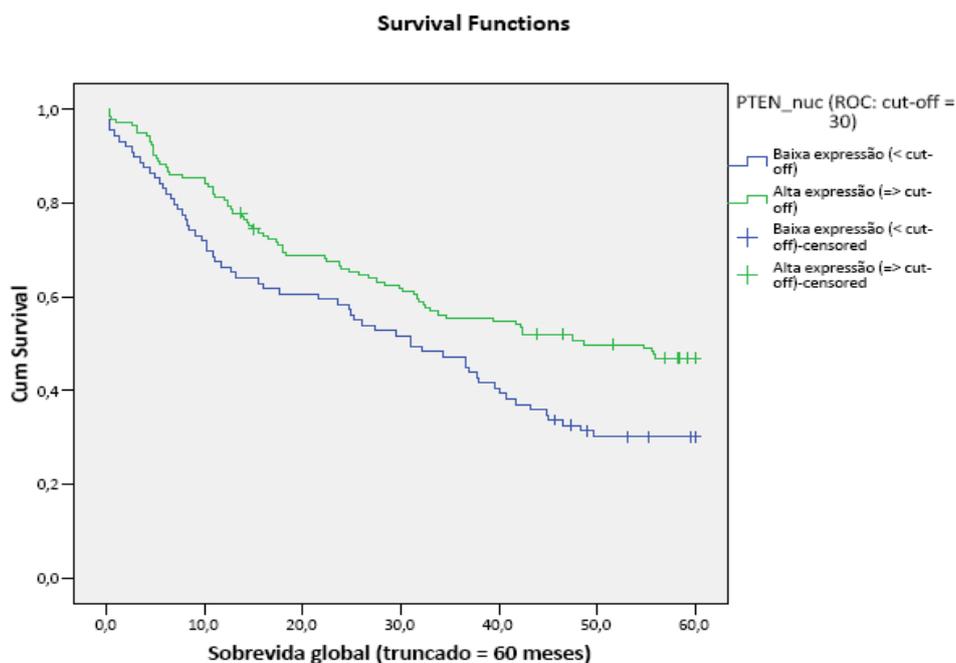


Figura 20 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à expressão do marcador PTEN padrão nuclear.

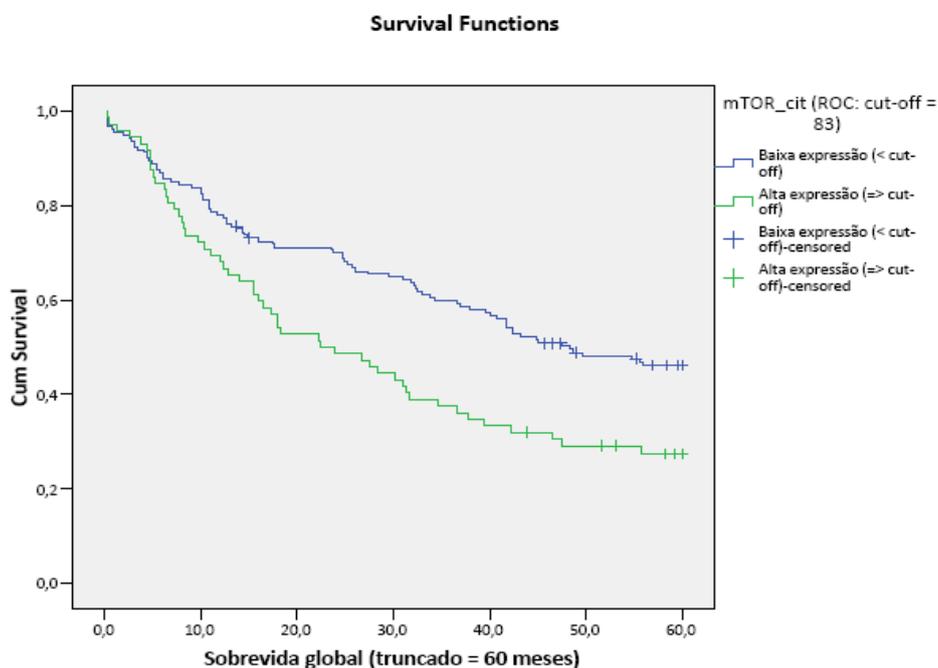


Figura 21 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à expressão do marcador mTOR padrão citoplasmático.

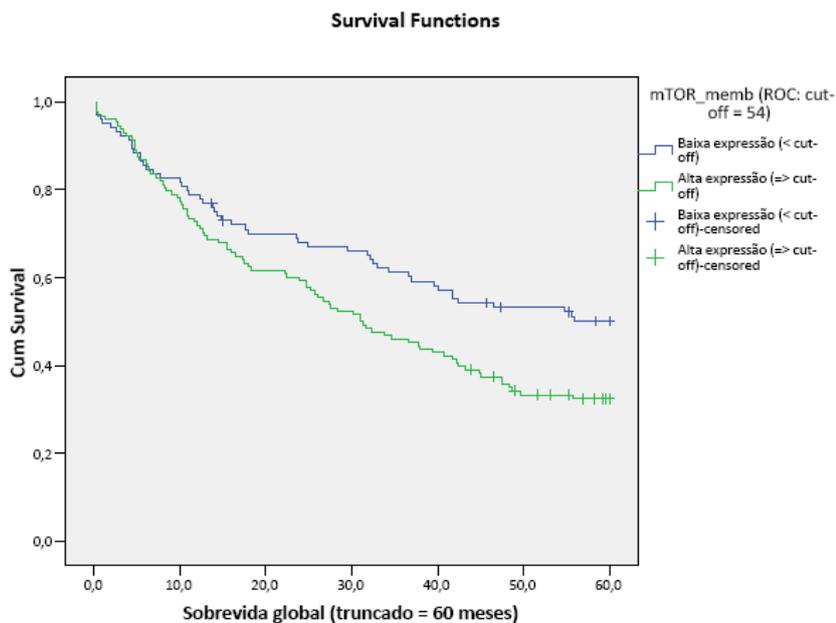


Figura 22 - Curvas de sobrevidas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação a expressão do marcador mTOR padrão de membrana.

5.5.2 Análises multivariadas de sobrevida global dos pacientes com carcinomas gástricos

Os fatores de risco independentes para morte identificados pelo modelo de regressão de Cox nos casos estudados foram: estágio clínico, tamanho do tumor, localização tumoral, margens cirúrgicas, idade, expressão de PTEN nuclear e mTOR citoplasmático.

O estágio clínico avançado III e IV aumenta significativamente de 2,8 a 14,6 vezes a probabilidade de morte. Já em relação ao tamanho do tumor, esse aumento significativo se dá de 1,01 a 1,11 vezes. O comprometimento das margens aumenta significativamente de 0,8 a 3,0 vezes a ocorrência do óbito. Outro fator de risco com aumento significativo do óbito é a idade com 0,99 a 1,02 vezes de ocorrência do óbito. Já a localização tumoral difusa ou outra (com exceção da localização proximal/distal) é outro fator significativo de aumento do óbito de 1,3 a 3,7 vezes. Podemos perceber que a baixa

expressão do Pten nuclear está associada a um aumento significativo de 1,1 a 2,2 vezes maior de ocorrência de óbito, já a alta expressão do mTOR citoplasmático leva a aumentar de 1,1 a 2,3 vezes a ocorrência do óbito.

Tabela 19 - Modelo multivariado para a análise dos fatores de risco relacionados com óbito.

VARIÁVEL	CATEGORIA	n	HR	IC95% (HR)	p
PTEN (nuclear)	Baixa expressão (cut-off<30)	86	1,6	1,1 – 2,2	0,012
	Alta expressão (cut-off≥ 30)	144	1,0	Referência	
mTOR (citoplasmático)	Baixa expressão (cut-off< 83)	158	1,0	Referência	
	Alta expressão (cut-off≥ 83)	72	1,6	1,1 – 2,3	0,011
Estádio clínico	I	48	1,0	Referência	
	II	49	2,1	1,02 – 4,3	0,043
	III	98	5,4	2,8 – 10,4	< 0,001
	IV	35	7,1	3,5 – 14,6	< 0,001
Localização do tumor	Proximal / Distal	202	1,0	Referência	
	Outro	28	2,3	1,4 – 3,7	0,001
Tamanho do tumor	(variável contínua)	230	1,06	1,01 – 1,11	0,030
Margens cirúrgicas	Livres	217	1,0	Referência	
	Comprometidas	13	1,5	0,8 – 3,0	0,217
Idade	(variável contínua)	230	1,00	0,99 – 1,02	0,612

HR - Hazard ratio

IC95% - Intervalo de confiança de 95%

Número de eventos (óbitos) considerados na análise: 136

5.6 ANÁLISES DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA DOS PACIENTES COM CARCINOMAS GÁSTRICOS

Na avaliação da sobrevida livre de doença podemos observar que existe diferença significativa, como o estatus das margens cirúrgicas. Pacientes com estágio clínico precoce apresentam melhor taxa de sobrevida livre de doença em relação aos pacientes em estágio III. Linfonodos livres de comprometimento fazem parte dos fatores com melhores taxas de sobrevida livre de doença. A ausência de metástase linfonodal, invasão sanguínea, linfática, perineural e do infiltrado linfocitário também influenciam as taxas de sobrevida livre de doença. Quanto ao marcador biomolecular temos como fator protetor, o aumento da expressão do marcador pAKT padrão nuclear. Os dados podem ser visto na Tabela 19.

Tabela 20 - Análise univariada de sobrevida livre de doença em relação aos parâmetros clinicopatológicos e biomoleculares.

Variáveis	Categorias	Taxa de Sobrevida	Valor de p
		livre de doença (%)	
Margens cirúrgicas	Livres	75,7	<0,001
	Comprometidas	40	
Estádio Clínico - 4 categorias	Estádio 1	96,1	< 0,001
	Estádio 2	80,4	
	Estádio 3	58,8	
N (número de linfonodos comprometidos)	0	88,7	< 0,001
	1	69,1	
	2	70,4	
	3	43,8	
Metástase linfonodal	Não	88,7	< 0,001
	Sim	65,8	
Invasão linfática	Sim	64,6	0,002
	Não	83	
Invasão sanguínea	Sim	52,6	0,026
	Não	77,3	
Invasão perineural	Sim	59,2	< 0,001
	Não	84,7	
Infiltrado linfocitário linfocitário	Ausente	78,6	0,038
	Discreto	70	
	Moderado	72	
	Intenso	45,5	
pAKT_nuc (ROC: cut-off=0,01)	Baixa expressão (cut-off <0,01)	63,3	0,006
	Alta expressão (cut-off ≥ 0,01)	81,8	

5.6.1 Análises univariadas de sobrevida livre de doença dos pacientes com carcinomas gástricos em relação aos dados clinicopatológicos e biomarcadores

Na avaliação da sobrevida livre de doença temos variáveis significativamente importantes como margens cirúrgicas livres (Figura 23), estágio clínico precoce (Figura 24), (N) ausência de linfonodos comprometidos (Figura 25), ausência de metástases linfonodais (Figura 26), invasão linfática (Figura 27), sanguínea (Figura 28) e perineural (Figura 29) e também infiltrado inflamatório linfocitário ausente ou leve (Figura 30). A alta expressão de pAKT nuclear (Figura 31) também interferindo nas taxas de sobrevida livres de doença.

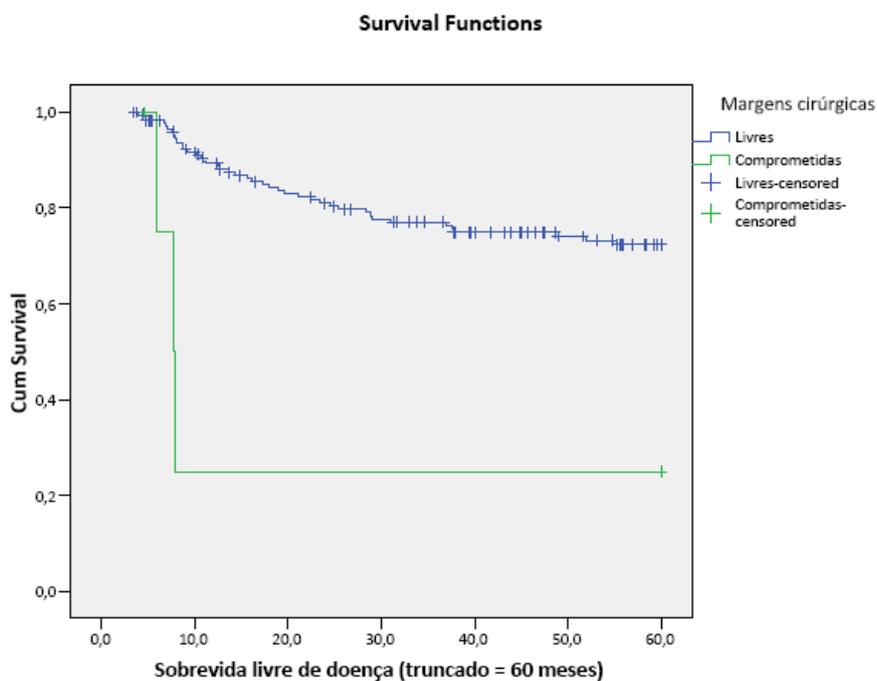


Figura 23 - Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação às margens cirúrgicas.

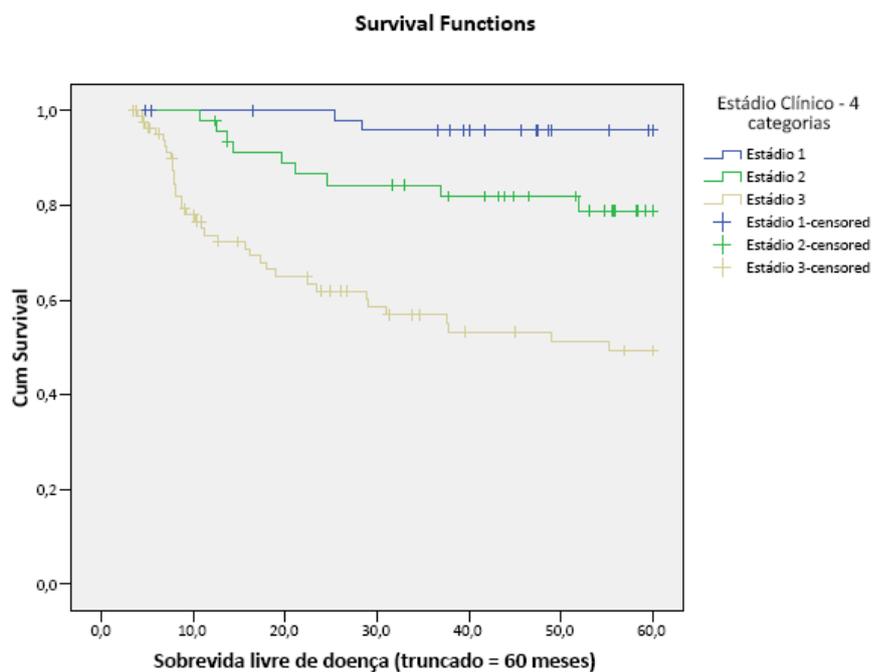


Figura 24 - Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao estágio clínico – 4 categorias.

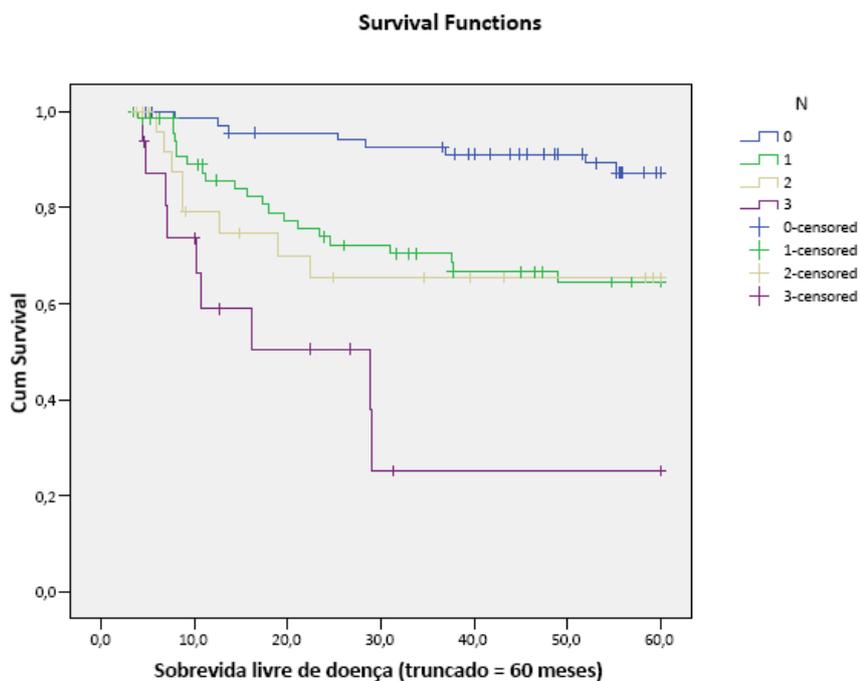


Figura 25 - Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao N (número de linfonodos comprometidos).

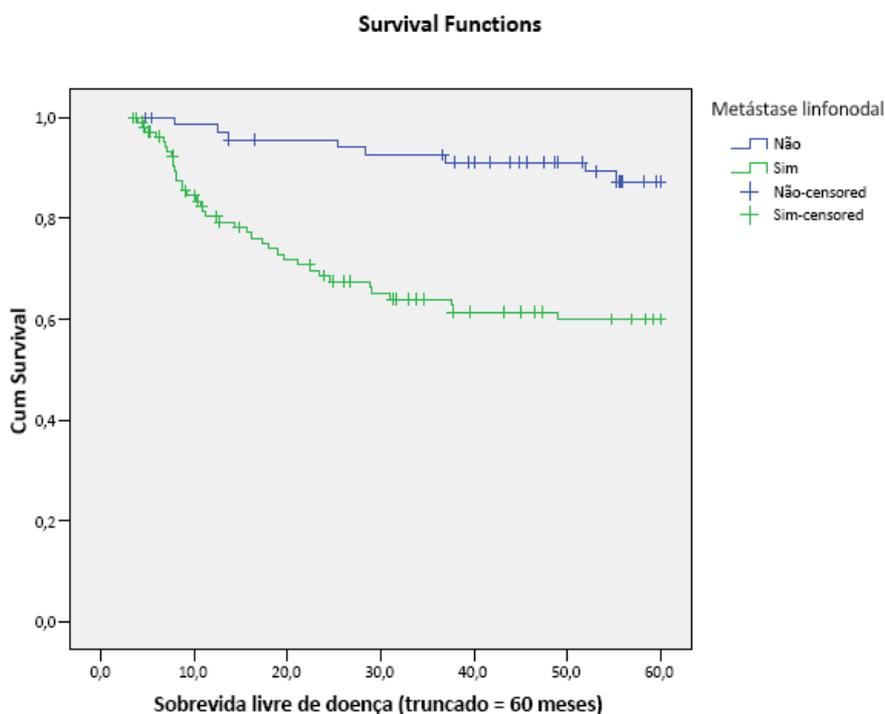


Figura 26 - Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à metástase linfonodal.

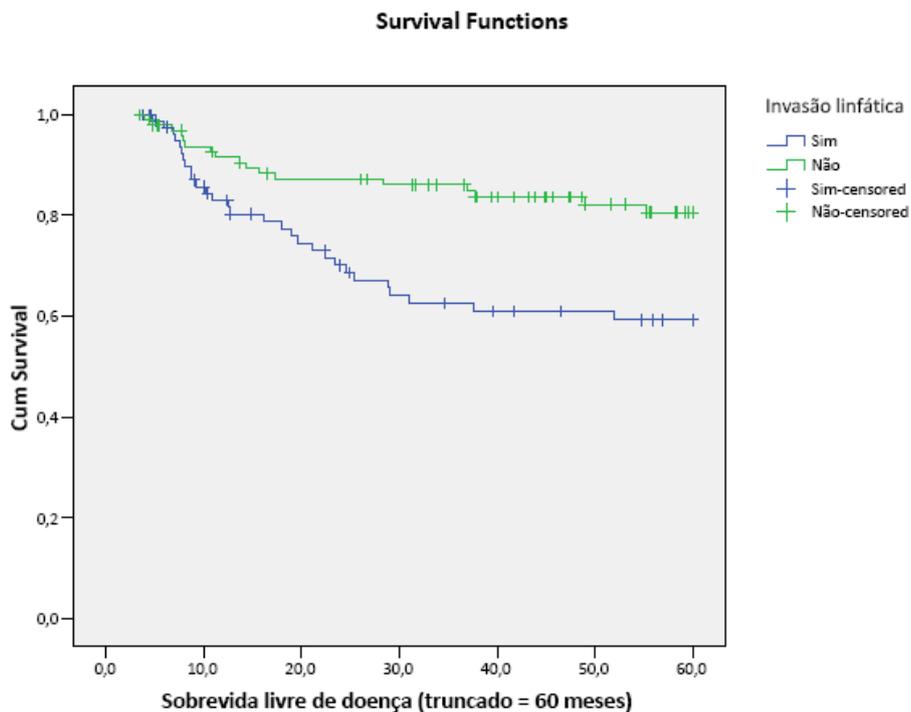


Figura 27 - Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à invasão linfática.

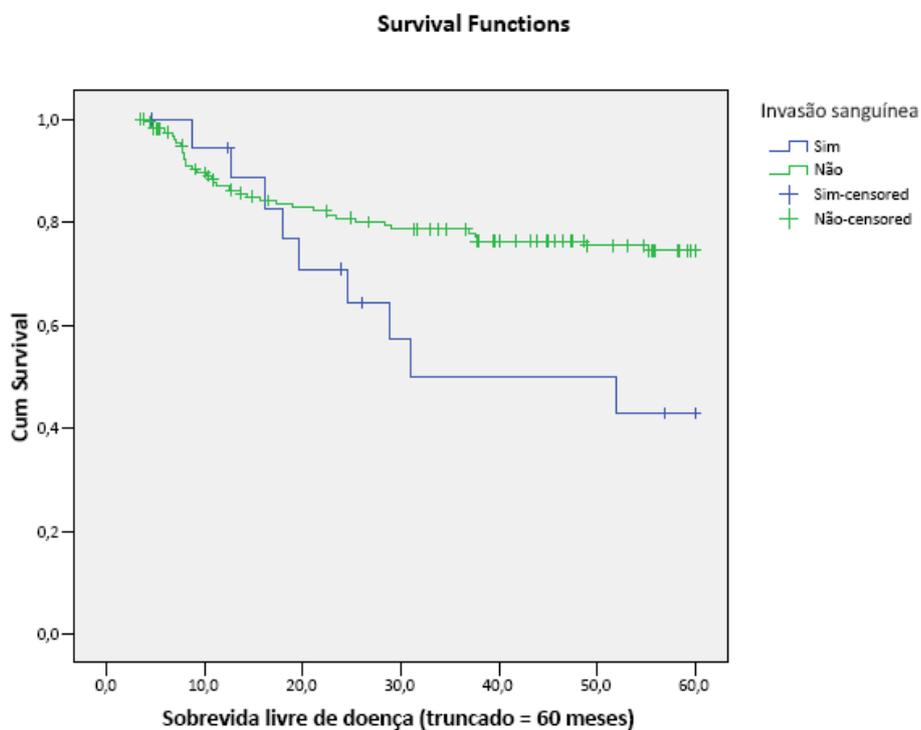


Figura 28 - Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à invasão sanguínea.

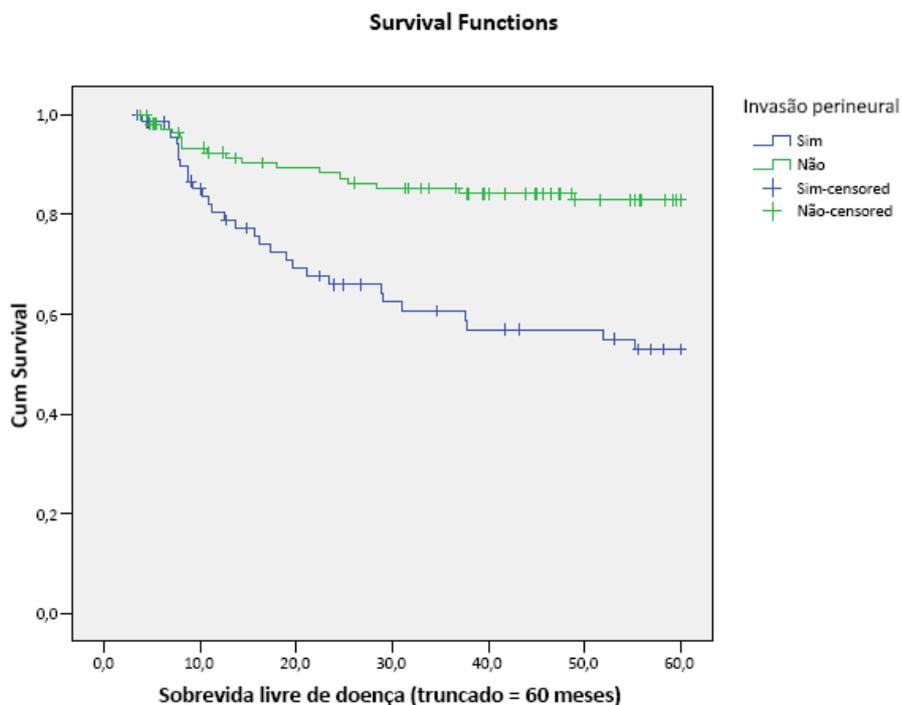


Figura 29 - Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à invasão perineural.

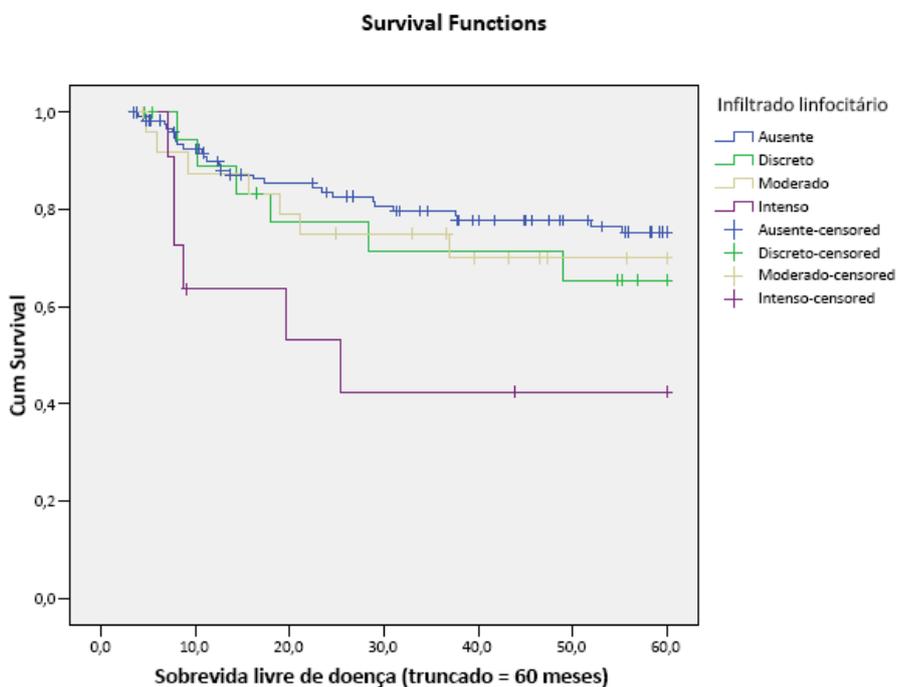


Figura 30 - Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação ao infiltrado inflamatório linfocitário.

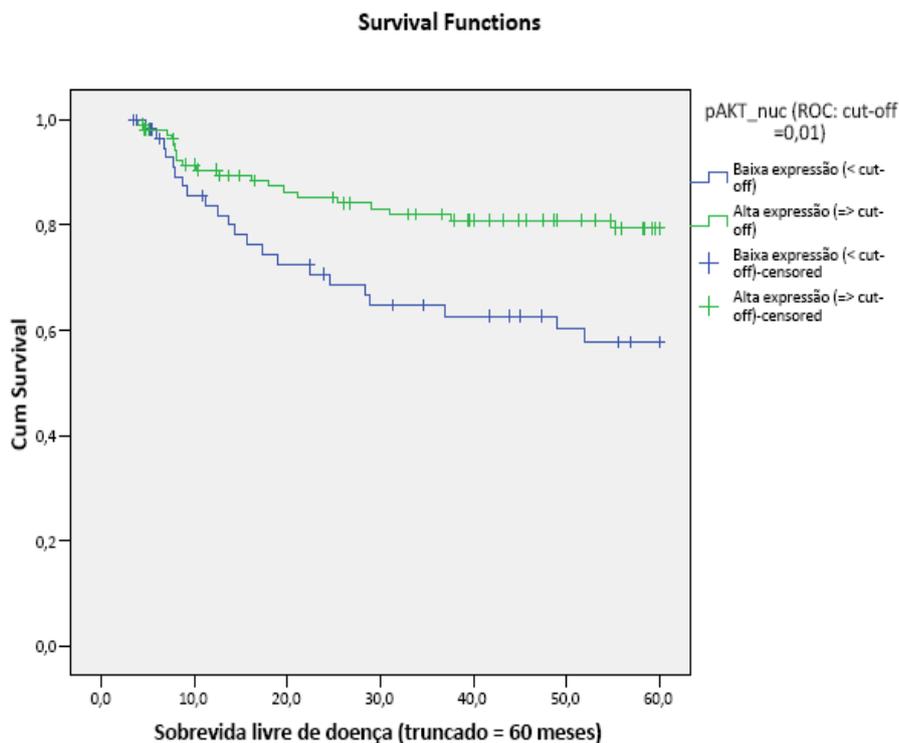


Figura 31 - Curvas de sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma gástrico em relação à expressão do marcador pAKT padrão nuclear.

5.6.2 Análises multivariadas de sobrevida livre de doença dos pacientes com carcinomas gástricos

Nesta análise, os fatores de risco independentes para a recorrência na sobrevida livre de doença identificados pelo modelo de regressão de Cox foram estágio clínico, o estatus da margem cirúrgica, idade e expressão de pAKT. Vimos que os pacientes com estágio clínico III têm um risco de 2,6 a 11,3 vezes de recorrência tumoral em comparação com os pacientes com estágios clínicos I e II. O comprometimento das margens cirúrgicas eleva de 1,2 a 14,4 vezes o risco de recorrência. Percebemos também que o aumento da idade do paciente é outro fator significativo do aumento do risco de recorrência de 0,99 a 1,04. Quanto a expressão do marcador pAKT no padrão nuclear, observamos que o risco torna-se elevado de 1,1 a 3,6 vezes para os pacientes com

carcinomas gástricos com baixa expressão deste marcador. Estes dados podem ser vistos na Tabela 21.

Tabela 21- Modelo multivariado para a análise dos fatores de risco relacionados com recorrência (excluíram-se os casos no estágio IV ou com intervalo livre de doença inferior a 3 meses).

VARIÁVEL	CATEGORIA	n	HR	IC95% (HR)	p
pAKT (nuclear)	Baixa expressão (cut-off<0,01)	60	1,9	1,1 – 3,6	0,035
	Alta expressão (cut-off≥ 0,01)	110	1,0	Referência	
Estádio	I + II	90	1,0	Referência	
	III	80	5,4	2,6 – 11,3	< 0,001
Margens cirúrgicas	Livres	165	1,0	Referência	
	Comprometidas	5	4,2	1,2 – 14,4	0,022
Idade	(variável contínua)	168	1,02	0,99 – 1,04	0,193

HR - Hazard ratio

IC95% - Intervalo de confiança de 95%

Número de eventos (recorrências) considerados na análise: 42

6 DISCUSSÃO

Apesar de ao longo dos últimos anos, ter se observado uma queda na incidência do adenocarcinoma gástrico, este ainda é o sexto câncer mais comum em todo o mundo (TERRY et al. 2002; FENOGLIO-PREISER et al. 2010). O principal tratamento desta neoplasia baseia-se principalmente na intervenção cirúrgica. Nos últimos anos, observamos uma constante busca de novos quimioterápicos que possam melhorar o intervalo livre de doença e sobrevida global dos pacientes com esta neoplasia (ANDERSON et al. 2006). Embora dados a respeito da patologia molecular do câncer gástrico tenha aumentado consideravelmente nos últimos anos, estes ainda são confusos e controversos. Estudos anteriores têm buscado identificar e compreender melhor as diferenças entre os principais tipos histológicos de carcinoma gástricos (SHIBATA et al. 2001; MEIRELES et al. 2004; ZHENG et al. 2007). A utilização de técnicas de patologia molecular como a imunohistoquímica tem nos ajudado nesta busca (BEGNAMI et al. 2004).

Um dos caminhos mais explorados na área da terapia alvo é a via do PI3K /AKT /mTOR, que desempenha um papel central na sobrevivência e na proliferação celular (PITT et al. 2009). Desregulação desta via implica no crescimento e sobrevivência do câncer (TOKUNAGA et al. 2008; PITT et al. 2009). No nosso estudo, utilizamos a imunohistoquímica para pesquisa de proteínas associadas a esta via. Encontramos uma alta frequência de expressão de pAKT, mTOR e PTEN nos carcinomas gástricos tanto do tipo difuso como no tipo intestinal, quando comparados ao tecido gástrico normal.

Observamos, porém uma diferença estatisticamente significativa entre a expressão destes marcadores e o subtipo histológico. A expressão de mTOR tanto no citoplasma como no núcleo das células neoplásicas mostrou-se associada ao tipo intestinal entretanto a expressão de PTEN citoplasmática se correlacionou significativamente com o tipo difuso. A expressão de AKT citoplasmática foi mais comum no tipo misto/indiferenciado e a presença de marcação nuclear para este anticorpo esteve associada aos carcinomas bem diferenciados. Neste estudo observamos uma correlação significativa entre os marcadores mTOR, PTEN e pAKT com a classificação de Lauren. Estes dados foram observados por BAI et al. (2007), que encontraram no câncer gástrico uma correlação significativa entre a alta expressão de PTEN e o tipo histológico difuso. Já nos trabalhos de ZHENG et al. (2003 e 2007) e YANG et al. (2003) foram encontradas correlações entre a forte expressão de PTEN e o tipo histológico intestinal. LOPICCOLO et al. (2008) e MURAYAMA et al. (2009) recentemente demonstraram que a positividade citoplasmática do mTOR está relacionada com maior profundidade de invasão tumoral, presença de metástases linfonodais, estadiamento clínico avançado e pior sobrevida global e livre de doença.

Outros achados histopatológicos mostraram associação significativa com a expressão dos marcadores pesquisados. Correlações estatísticas foram encontradas entre a expressão de pAKT no citoplasma e no núcleo, mTOR nuclear e de membrana e carcinomas gástricos estádios T3 e T4. Estes tumores são agressivos com alta taxa de mortalidade, sendo assim, esta associação sugere que a expressão destes marcadores nesta localização celular está relacionada a agressividade tumoral. Por outro lado, a expressão

de mTOR nas diversas localizações celulares (citoplasma, núcleo e membrana) está associada a ausência de infiltrado inflamatório e invasão perineural, podendo corresponder a fatores de bom prognóstico. A expressão de pAKT citoplasmático correlacionou-se com ausência de metástases à distância e a presença de pAKT no núcleo e citoplasma estava associada ao tamanho tumoral, ou seja, o tamanho tumoral está diretamente associado à expressão de pAKT. Estes dados são concordantes com MURAKAMI et al. (2007) que demonstraram que a expressão pAkt se correlacionou com pacientes portadores de carcinomas gástricos estágio T3/T4 e com outras variáveis como tamanho do tumor, profundidade de invasão, metástase em linfonodo, invasão linfática e venosa. Contrariamente, o estudo de NAM et al. (2003) demonstraram que a alta expressão de pAkt é freqüente nos carcinomas gástricos com estadiamento pTNM inicial.

Buscando entender melhor a participação destes marcadores, pesquisamos suas expressões na mucosa gástrica normal e no tecido tumoral. Desta forma, observamos que a marcação de mTOR na membrana, pAKT e PTEN no citoplasma das células neoplásicas foi mais intenso que na mucosa gástrica normal. Estes dados são concordantes com os achados de FEI et al. (2002), porém são divergentes de outros autores que utilizando imunohistoquímica e PCR, demonstraram que a expressão de PTEN nos carcinomas gástricos está diminuída ou ausente em comparação à mucosa gástrica normal. Esta discordância pode ser justificada principalmente pela diferença de metodologia utilizada (PCR vs IHQ) e também pelo pequeno número de casos estudados pelos outros autores. Em concordância com os nossos dados, o aumento da expressão de mTOR na membrana em

carcinomas gástricos tem sido demonstrado por alguns autores, sendo considerado um fator prognóstico independente (LANG et al. 2007; LOPICCOLO et al. 2008; YU et al. 2009). Estes mesmos autores encontraram que no tecido gástrico normal a marcação de PTEN, AKT, pAKT e mTOR no núcleo, AKT e mTOR no citoplasma foi mais intensa que no tecido tumoral, sugerindo que tanto a expressão como a localização celular das proteínas estão associadas ao desenvolvimento do tumor. Neste estudo, não foi possível estabelecer a etapa da carcinogênese nas quais estes mecanismos ocorrem, porque utilizamos somente amostras de tecido normal e tumoral, que representam a etapa inicial e final da carcinogênese.

Vários genes participam da via do PI3K /Akt /mTOR fazendo com que a via fosse estimulada ou inibida de acordo com sinais intrínsecos celulares. A co-expressão e a correlação entre os principais genes é frequentemente encontrada. No nosso estudo as correlações entre as expressões de pAKT, mTOR e PTEN em suas diversas localizações celulares foram freqüentes. Estes dados foram demonstrados por CHUNG et al. (2009) que por meio da imunohistoquímica estudaram os mesmos marcadores de nosso estudo em colangiocarcinomas tendo um resultado significativo com aumento da expressão de PTEN e a diminuição da expressão de mTOR e pAKT no tecido tumoral em relação ao normal.

De acordo com os dados clínicos e histopatológicos dos carcinomas gástricos já descritos na literatura, o presente trabalho constatou que a localização mais frequente do tumor foi a distal. Estes tumores ocorrem com maior frequência nos países em desenvolvimento, acometendo a população de menor renda, tem a relação de dois homens acometidos para cada mulher

(MCCOLL 2006). Em relação à idade e gênero dos pacientes diagnosticados com câncer gástrico em nosso meio, nossos achados foram muito semelhantes com os dados de literatura (Ministério da Saúde 2009). A idade variou de 20 a 88 anos, com a média de 63 anos, mediana de 65 anos; quanto ao gênero este apresentou uma maior incidência no gênero masculino. Em relação as características histopatológicas do tumor, a maioria foi constituída por tumores do tipo intestinal e pouco diferenciados, semelhante aos dados de estudos anteriores (CREW e NEUGUT 2006; LOCHHEAD e EL-OMAR 2008).

Nossa casuística era formada por tumores gástricos localmente avançados ou metastáticos, com quase 57 % dos casos correspondendo aos estádios avançados IIIA, IIIB, IIIC ou IV. Estes dados também refletem uma casuística de país em desenvolvimento, onde o diagnóstico precoce é raro e as medidas de prevenção e controle das doenças são falhas.

De maneira geral os fatores clínicos que aumentam a taxa de sobrevida global nos carcinomas gástricos já estão bem estabelecidos e podem ser representados por: localização dos tumores na região proximal; margens cirúrgicas livres; estádio clínico precoce; linfonodos livres de comprometimento; ausência de metástase à distância e ausência de invasão sanguínea; linfática; perineural e tumor de tamanho menor de 3cm (LAZAR et al. 2009). Já os marcadores biomoleculares que aumentam a taxa de sobrevida global ainda não estão estabelecidos, porém alguns dados de literatura podem ser encontrados como: aumento da expressão de PTEN nuclear; baixa expressão de mTOR citoplasmático e de membrana (PITT et al. 2009; EVREN et al. 2010).

No nosso estudo demonstramos que os fatores clínicos e histopatológicos de risco independentes para maior incidência de morte foram: estágio clínico avançado (T3 e T4), tamanho e localização tumoral (tumores grandes e de localização difusa), presença de margens cirúrgicas comprometidas e idade avançada. Já os fatores moleculares associados à maior incidência de morte foram: baixa expressão de PTEN nuclear e a alta expressão do mTOR citoplasmático e de membrana nas células neoplásicas. A baixa expressão de pAKT nos núcleos das células mostrou ser um fator de risco para recidivas tumorais. Estes dados estão de acordo com o descrito em literatura onde a perda da expressão PTEN está associada à progressão tumoral, ao comportamento biológico mais agressivo nos carcinomas da mama, à próstata e ao endométrio, bem como em gliomas (WANG et al. 2002). A expressão de mTOR também tem sido associada a um impacto negativo na sobrevida global dos pacientes com carcinomas gástricos, semelhante aos estudos prévios dos marcadores biomoleculares PTEN e mTOR em câncer de mama (PITT et al. 2009; BAKARAKOS et al. 2010).

Em conclusão, demonstramos que as proteínas associadas à via do PI3K /Akt /mTOR estão expressos nos carcinomas gástricos. A alta expressão de mTOR, PTEN e pAKT nos carcinomas gástricos demonstrados neste estudo corroboram com o fato que o uso de inibidores destes marcadores possa representar um tratamento eficaz para o câncer gástrico.

8 CONCLUSÕES

1. As proteínas AKT, pAKT, PTEN e mTOR estão frequentemente expressas na mucosa gástrica normal e nos carcinomas gástricos. Co-expressão das proteínas é bastante frequente tanto na mucosa gástrica como no tumor.

2. No tecido gástrico normal observamos maior expressão da proteína AKT (citoplasma e núcleo); pAKT (núcleo); PTEN (núcleo) e mTOR (citoplasma e núcleo). Por outro, observamos no carcinoma gástrico maior expressão de pAKT (citoplasma), PTEN (citoplasma) e mTOR (membrana).

3. Em relação às características histopatológicas observamos que os carcinomas do tipo intestinal se correlacionam com aumento da expressão de mTOR (citoplasma e núcleo); carcinomas do tipo difuso expressam mais frequentemente a proteína PTEN (citoplasma) e os carcinomas misto/indiferenciados expressam AKT (citoplasma). Os carcinomas em estágio avançado (T3-T4) mostraram maior expressão de pAKT (citoplasma e núcleo) e mTOR (núcleo e membrana).

As expressões de PTEN (nuclear) e mTOR (citoplasma e membrana) foram fatores prognósticos em relação as taxas de sobrevida global nas análises uni e multivariadas. A expressão de pAKT (nuclear) foi um importante fator prognóstico em relação as taxas de sobrevida livre de doença.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Anderson C, Nijagal A, Kim J. Molecular markers for gastric adenocarcinoma: an update. **Mol Diagn Ther** 2006; 10:345-52.

Ando T, Goto Y, Maeda O, et al. Causal role of Helicobacter pylori infection in gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2006; 12:181-6.

Aromaa A, Kosunen TU, Knekt P, et al. Circulating anti-Helicobacter pylori immunoglobulin a antibodies and low serum pepsinogen I level are associated with increased risk of gastric cancer. **Am J Epidemiol** 1996; 144:142-9.

Bakarakos P, Theohari I, Nomikos A, et al. Immunohistochemical study of PTEN and phosphorylated mTOR proteins in familial and sporadic invasive breast carcinomas. **Histopathology** 2010; 56:876-82.

Bauer P, Brannath W, Posch M. Multiple testing for identifying effective and safe treatments. **Biometrical J** 2001; 43, 605-16.

Bai Z, Ye Y, Chen D, et al. Homeoprotein Cdx2 and nuclear PTEN expression profiles are related to gastric cancer prognosis. **APMIS** 2007; 115:1383-90.

Becker A, Albrecht C, Knaapen ADM, et al. Induction of CYP1A1 in rat lung cells following in vivo and in vitro exposure to quartz. **Arch Toxicol** 2006; 80:258-68.

Begnami MDFS, Cunha IW, Montagnini A, Nonogaki S, Soares F. Immunohistochemical expression of nitric oxide synthases in gastric adenocarcinomas. **J Bras Patol Med Lab** 2004; 40:351-7.

Bozzetti F, Marubini E, Bonfanti G, et al. Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five-year survival rates in a multicenter randomized Italian trial. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group. **Ann Surg** 1999; 230:170-8.

Brennan MF, Karpeh MS Jr. Surgery for gastric cancer: the American view. **Semin Oncol** 1996; 23:352-9.

Britto AV. Stomach cancer: risk factors. **Cad Saúde Públ** 1997; 13:7-13.

Capoferro R, Torgensen O. The effect of hypertonic saline on the uptake of tritiated 7,12 dimethylben(a)anthracene by the gastric mucosa. **Scand J Gastroenterol** 1974; 9:343-9.

Cejka D, Preussler M, Fuereder T, Sieghart W, et al. mTOR Inhibition sensitizes gastric cancer to alkylating chemotherapy in Vivo. **Anticancer Res** 2008; 28:3801-8.

César ACG, Silva AE, Tajara EH. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. **Arq Gastroenterol** 2002; 39:253-9.

Chen YL, Law PY, Loh HH. Inhibition of PI3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy. **Curr Med Chem Anticancer Agents** 2005; 5:575-89.

Chiang GG, Abraham RT. Targeting the mTOR signaling network in cancer. **Trends Mol Med** 2007; 13:433-42.

Chung JY, Hong SM, Choi BY, Cho HJ, Yu E, Hewitt SM. The Expression of Phospho-AKT, Phospho-mTOR, and PTEN in extrahepatic cholangiocarcinoma. **Clin Cancer Res** 2009; 15:660-7.

Correa P, Fontham E, Pickle LW, Chen V, Lin Y, Haenszel W. Dietary determinants of gastric cancer in south Louisiana inhabitants. **J Natl Cancer Inst** 1985; 75:645-53.

Correa P, Sasano N, Stermmernann N. Pathology of gastric carcinoma in Japanese populations: comparison between Myiagi prefecture, Japan, Hawaii. **J Natl Cancer Inst** 1973; 51:1449-59.

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

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

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

Dancey JE. Therapeutic Targets mTOR and related pathways; **Cancer Biol Ther** 2006; 5:1065-73.

Deichmann M, Thome M, Benner A, Egner U, Hartschuh W, Naher H. PTEN/MMAC1 expression in melanoma resection specimens. **Br J Cancer** 2002; 87:1431-6.

Evren S, Dermen A, Lockwood G, Fleshner N, Sweet J. Immunohistochemical examination of the mTORC1 pathway in High Grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinomas (PCa): a tissue microarray study (TMA). **Prostate** 2010; 70:1429-36.

Fei G, Ebert MP, Mawrin C, et al. Reduced PTEN expression in gastric cancer and in the gastric mucosa of gastric cancer relatives. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2002; 14:297-303.

Feng W, Brown RE, Trung CD, et al. Morphoproteomic Profile of mTOR, Ras/Raf Kinase/ERK, and NF- κ B pathways in human gastric adenocarcinoma **Ann Clin Lab Sci** 2008 2009; 38:195-209.

Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Belli J, et al. Pathologic and phenotypic features of gastric cancer. **Semin Oncol** 1996; 23:292-306.

Fenoglio-Preiser C, Carneiro F, Correa P, et al. Gastric carcinoma. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. **Pathology & genetics tumours of the digestive system**. Lyon: IARC Press; 2010. (IARC WHO Classification of Tumours, n° 2).

Geissler EK, Schlitt HJ, Thomas G. mTOR, cancer and transplantation. **Am J Transplant** 2008; 8:2212-8.

Gimm O, Attie-Bitach T, Lees JA, Vekemans M, Eng C. Expression of the PTEN tumour suppressor protein during human development. **Hum Mol Genet** 2000; 9:1633-9.

Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. **Cancer Cell** 2007; 12:9-22.

Haenszel W, Kurihara M, Segi M. Stomach cancer among Japanese in Hawaii. **J Natl Cancer Inst** 1972; 49:969-88.

Haenszel W, Kurihara M. Studies of Japanese migrants: mortality from cancer and others diseases among Japanese in the U.S. **J Natl Cancer Inst** 1968; 40:43-68.

Haenszel W. Cancer mortality among the foreign born in the US. **J Natl Cancer Inst** 1961; 17:837-47.

Hansson LE, Nyrén O, Hsing AW, et al. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. **N Engl J Med** 1996; 335:242-9.

Hes O, Michal M, Kuroda N, et al. Vimentin reactivity in renal oncocytoma: immunohistochemical study of 234 cases. **Arch Pathol Lab Med** 2007; 131:1782-8.

Hochwald SN, Kim S, Klimstra DS, Brennan MF, Karpeh MS. Analysis of 154 actual five-year survivors of gastric cancer. **J Gastrointest Surg** 2000; 4:520-5.

Hoey J, Montvernay C, Lambert R, Wine and tobacco: risk factors for gastric cancer in France. **AmJ Epidemiol** 1981; 113:668-74.

Howson PC, Hyiama T, Wynder LE. The decline in gastric cancer: epidemiology of na unplanned triumph. **Epidemiol Rev** 1986; 8:1-27.

Hu J, Zhang S, Jia E, et al. Diet and cancer of the stomach: a case-control study in China. **Int J Cancer** 1988; 41:331-5.

Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. **Nat Genet** 2005; 37:19-24.

Jedrychowski W, Wahrendorf J, Popiela T, Rachtan J. A case-control study of dietary factors and stomach cancer risk in Poland. **Int J Cancer** 1986; 37:837-42.

Jendrossek V, Henkel M, Hennenlotter J, et al. Analysis of complex protein kinase B signaling pathways in human prostate cancer samples. **BJU Int** 2008; 102:371-82.

Kanehira K, Hu J, Pier T, Sebree L, Huang W. High endogenous avidin binding activity: an inexpensive and readily available marker for the differential diagnosis of kidney neoplasms. **Int J Clin Exp Pathol** 2008; 1:435-9.

Kitamura K, Yamaguchi T, Sawai K, et al. Chronologic changes in the clinicopathologic findings and survival of gastric cancer patients. **J Clin Oncol** 1997; 15:3471-80.

Kneller RW, McLaughlin JK, Bjelke E, A cohort study of stomach cancer in a high risk American population. **Cancer** 1991; 68:672-8.

Kodama M, Kodama T, Susuki H, Kondo K. Effect of rice and salty rice diet on the structure of mouse stomach. **Nutrition Cancer** 1984; 6:135-47.

Kolonel LN, Nomura AMY, Hinds MW, Hankin JH, Hirihata T, Lee J. Role of diet in cancer incidence in Hawaii. **Cancer Res** 1983; 43:2397s-402.

Kolonel LN, Nomura AMY, Hirohata T, Hankin JH, Hinds MW. Association of diet and place of birth with stomach cancer incidence in Hawaii Japanese and Caucasians. **Am J Clin Nutr** 1981; 34:2478-85.

Kurtz RC, Sherlock P. The diagnosis of gastric cancer. **Semin Oncol** 1985; 12:11-8.

La Vecchia C, Negri E, Decarli A, D'Ávanzo B, Franceschi S. A case-control study of diet and gastric cancer in northern Italy. **Int J Cancer** 1987; 40:484-9.

Lachyankar MB, Sultana N, Schonhoff CM, et al. A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. **J Neurosci** 2000; 20:1404-13.

Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, et al. Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. **Int J Cancer** 2007; 120:1803-10.

Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at a histoclinical classification. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1965; 64:31-49.

Lazar D, Taban S, Dema A, et al. Gastric cancer: the correlation between the clinicopathological factors and patients' survival (I) **Rom J Morphol Embryol** 2009; 50:41-50.

Lee S, Kim YC, Lee HM, et al. Prognostic value of phosphorylated Akt and survivin expression in gastric adenocarcinoma. **Korean J Pathol** 2010; 44:252-8.

Lima EM, Araújo JJ, Harada ML, Assumpção PP, Burbano RR, Casartelli C. Molecular study of the tumour suppressor gene PTEN in gastric adenocarcinoma in Brazil. **Clin Exp Med** 2005; 5:129-32.

Liu JL, Sheng X, Hortobagyi ZK, Mao Z, Gallick GE, Yung WK. Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of Akt down-regulation. **Mol Cell Biol** 2005; 25:6211-24.

Lochhead P, El-Omar EM. Gastric cancer. **Br Med Bull** 2008; 85:87-100.

LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations, **Drug Resist Updat** 2008; 11:32-50.

Marshall BJ. Helicobacter pylori. **Am J Gastroenterol** 1994; 89:116s-28s.

McCull KE. Cancer of the gastric cardia. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2006; 20:687-96.

Mcmenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. **Cancer Res** 1999; 59:4291-6.

McMichael AJ, McCall MG, Harstshorne JM. Patterns of gastro-intestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change. **Int J Cancer** 1980; 25:431-7.

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

Messersmith DJ, Benson DA, Geer RC. A Web-based assessment of bioinformatics end-user support services at US universities. **J Med Libr Assoc** 2006; 94:299-305.

Miller AB. Risk factors from geographic epidemiology for gastrointestinal cancer. **Cancer** 1982; 50:2533-40.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2010 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Murakami D, Tsujitani S, Osaki T, Saito H, Katano K, Tatebe S, Ikeguchi M. Expression of phosphorylated Akt (pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy. **Gastric Cancer** 2007; 10:45-51.

Murayama T, Inokuchi M, Takagi Y, et al. Relation between outcomes and localisation of p-mTOR expression in gastric cancer. **Br J Cancer** 2009; 100:782-8.

Nam SY, Lee HS, Jung GA, et al. Akt/PKB activation in gastric carcinomas correlates with clinicopathologic variables and prognosis. **APMIS** 2003; 111:1105-13.

Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. **Cell Signal** 2002; 14:381-95.

Nomura A, Grove JS, Stemmermann GN, Severson RK. A prospective study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes and alcohol consumption. **Cancer Res** 1990; 50:627-31.

Ohgaki H, Kato T. Study of promoting effect of sodium chloride on gastric carcinogenesis by N-methyl-N-nitro-N-nitroso guanidine in inbred wistar rats. **Gann** 1984; 75:1053-7.

Okami K, Wu L, Riggins G, et al. Analysis of PTEN/MMAC1 alterations in aerodigestive tract tumors. **Cancer Res** 1998; 58:509-11.

Paez J, Sellers WR. PI3K/PTEN/AKT pathway: a critical mediator oncogenic signaling. **Cancer Treat Res** 2003; 115:145-67.

Pitt SC, Davis R, Kunnimalaiyaan M, Chen H. AKT and PTEN expression in human gastrointestinal carcinoid tumors. **Am J Transl Res** 2009; 1:291-9.

Risch AH, Jain M, Choi NW, et al. Dietary factors and the incidence of cancer of the stomach. **Am J Epidemiol** 1985; 122:947-57.

Roberts LR, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. **Semin Liver Dis** 2005; 25:212-25.

Rosenwaike I. Cancer mortality among Puerto-Rican born residents in New York city. **Am J Epidemiol** 1984; 119:177-85.

Sano T, Lin H, Chen X, et al. Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. **Cancer Res** 1999; 59:1820-4.

Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, et al. Análise das alterações genéticas e epigenéticas do gene PTEN no cancro gástrico. **Virchows Arch** 2002; 440:160-5.

Scheiman JM, Cutler AF: Helicobacter pylori and gastric cancer. **Am J Med** 1999; 106:222-6.

Shibata A, Longacre TA, Puligandla B, Parsonnet J, Habel LA .Histological Classification of Gastric Adenocarcinoma for Epidemiological Research: Concordance between Pathologists. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10:75-8.

Siewert JR, Böttcher K, Stein HJ, et al. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. **Ann Surg** 1998; 228:449-61.

Slodkowska J, Filas V, Buszkiewicz E, et al. Study on breast carcinoma Her2/neu and hormonal receptors status assessed by automated images analysis systems: ACIS III (Dako) and ScanScope (Aperio), **Folia Histochem Cytobiol** 2010; 48:19-25.

Sobala GM, Schorah CJ, Sanderson M, et al. Ascorbic acid in the human stomach. **Gastroenterology** 1989; 97:357-63.

Sulis ML, Parsons R. PTEN: from pathology to biology. **Trends Cell Biol** 2003; 13:478-83.

Sun W, Zhang PL, Herrera GA. p53 protein and Ki-67 overexpression in urothelial dysplasia of bladder. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2002; 10:327-31.

Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. **Cancer** 1995; 75:1410-7.

Takahashi M, Kokubo T, Furukawa F. Effects of sodium chloride, saccharin, Phenobarbital and aspirin on gastric carcinogenesis rats after inhibition with N-methyl-N-nitro-N-nitroso guanidine. **Gann** 1984; 75:494-501.

Tatematsu M, Takahashi M, Fukushima S. Effects in rats of sodium chloride on experimental gastric cancer induced by N-methyl N-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline 1-oxide. **J Natl Cancer Inst** 1975; 55:101-6.

Taylor DN, Blaser MJ. The epidemiology of Helicobacter pylori infection. **Epidemiol Rev** 1991; 13:42-59.

Terry MB, Gaudet MM, Gammon MD. The epidemiology of gastric cancer, **Semin Radiat Oncol** 2002; 12:111-27.

Tokunaga E, Oki E, Egashira A, et al. Deregulation of the Akt pathway in human cancer. **Curr Cancer Drug Targets** 2008; 8:27-36.

Vettorato G, Souza PRMS, Bozko MP, Lamb FM. Cowden's disease or multiple hamartoma syndrome. **An Bras Dermatol** 2003; 78:209-13.

Wang L, Ignat A, Axiotis CA. Differential expression of the PTEN tumor suppressor protein in fetal and adult neuroendocrine tissues and tumors: progressive loss of PTEN expression in poorly differentiated neuroendocrine neoplasms. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2002; 10:139-46.

Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet** 1983; 2:1273-5.

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

Wu K, Nie Y, Guo C, Chen Y, Ding J, Fan D. Molecular basis of therapeutic approaches to gastric cancer. **J Gastroenterol Hepatol** 2009; 24:37-41.

Xiao L, Wangn YC, Li WS, Du Y. The role of mTOR and phospho-p70S6K in pathogenesis and progression of gastric carcinomas: an immunohistochemical study on tissue microarray. **J Exp Clin Cancer Res** 2009; 28:152.

Yang L, Kuang L-G, Zheng H-C, et al. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma. **World J Gastroenterol** 2003; 9:35-9.

Yu G, Wang J, Chen Y, et al. Overexpression of phosphorylated mammalian target of rapamycin predicts lymph node metastasis and prognosis of chinese patients with gastric cancer. **Clin Cancer Res** 2009; 15:1821-9.

Zheng HC, Sun J-M, Li X-H, Yang X-F, Zhang Y-C, and Xin Y. Role of PTEN and MMP-7 expression in growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. **Pathol Int** 2003; 53:659-66

Zheng H, Takahashi H, Murai Y, et al. Low expression of FHIT and PTEN correlates with malignancy of gastric carcinomas: tissue-array findings. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2007; 15:432-40.