ROBERSON ANTEQUERA MORON

**Expressão de p53, p16^{ink4a}, p21^{Waf1/cip1}, p21^{Ras} e p27^{Kip1/cip1} em pacientes
com adenocarcinoma gástrico com invasão da submucosa submetidos
a gastrectomia com linfadenectomia D2**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Cirurgia do Aparelho Digestivo
Orientador: Prof. Dr. Cláudio José Caldas Bresciani

São Paulo

2009

ROBERSON ANTEQUERA MORON

Expressão de p53, p16^{ink4a}, p21^{Waf1/cip1}, p21^{Ras} e p27^{Kip1/cip1} em pacientes com adenocarcinoma gástrico com invasão da submucosa submetidos a gastrectomia com linfadenectomia D2

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Cirurgia do Aparelho Digestivo
Orientador: Prof. Dr. Cláudio José Caldas Bresciani

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moron, Roberson Antequera

**Expressão de p53, p16^{ink4a}, p21^{Waf1/cip1}, p21^{Ras} e p27^{Kip1/cip1}
em pacientes com adenocarcinoma gástrico com invasão da
submucosa submetidos a gastrectomia com linfadenectomia
D2** / Roberson Antequera Moron. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo. Departamento de Gastroenterologia.

Área de concentração: Cirurgia do Aparelho Digestivo.

Orientador: Cláudio José Caldas Bresciani.

Descritores: 1.Adenocarcinoma 2.Neoplasias gástricas
3.Gastrectomia 4.Excisão de linfonodo

USP/FM/SBD-459/09

Agradecimientos

Agradecimentos

Ao *Professor Ivan Cecconelo* pelos ensinamentos desde o início de minha formação acadêmica.

Ao *Professor Cláudio José Caldas Bresciani* pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

Ao *Dr. Carlos Eduardo Jacob* pela amizade e pelo exemplo que sempre me guiaram em toda minha carreira. Esse trabalho só foi possível pela sua ajuda inestimável. Sou eternamente grato.

Ao *Professor Bruno Zilberstein* por todo apoio e incentivo desde o início de minha formação acadêmica

Ao *Professor Joaquim Gama-Rodrigues* pelas inúmeras vezes que me acolheu e incentivou em minha carreira.

À *Professora Angelita Habr-Gama* por todos os ensinamentos e oportunidades.

Ao *Professor Henrique Walter Pinotti* que despertou em mim o interesse pela cirurgia digestiva e me deu os primeiros ensinamentos.

Ao *Dr. Marcelo de Oliveira* pelo exemplo e ensinamentos de caráter e humanidade. Sua amizade foi uma dádiva e sua partida deixa uma lacuna irreparável em minha vida.

Ao *Dr. Kleber Simões* pelo apoio, sugestões e atuação no exame histopatológico das lâminas.

Ao *Professor Venâncio Avancini Ferreira Alves*. Seu senso crítico e perguntas me estimularam a aprofundar o estudo e a compreensão da carcinogênese.

A equipe *Unigastro Bauru*. Por todo o apoio e compreensão que tiveram em todas as vezes que me ausentei para fazer esse trabalho.

A minha *família* que me faz desejar melhorar profissionalmente e como ser humano.

Muito obrigado!

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de ilustrações

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	2
2	OBJETIVOS	12
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	14
3.1	POPULAÇÃO ESTUDADA	14
3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	14
3.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	14
3.4	OBTENÇÃO E TABULAÇÃO DOS DADOS DO ESTUDO	15
3.5	PREPARO DAS LÂMINAS	16
3.6	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	18
3.7	POSITIVIDADE DOS MARCADORES	26
3.8	ESTUDO ESTATÍSTICO	27
4	RESULTADOS	29
4.1	IDADE	30
4.2	GÊNERO	31
4.3	RAÇA	32
4.4	MORTALIDADE	34
4.5	HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER GÁSTRICO	35
4.6	TIPO HISTOLÓGICO	37
4.7	PENETRAÇÃO NA SUBMUCOSA	39
4.8	INFILTRAÇÃO PERINEURAL	39
4.9	INVASÃO VASCULAR SANGUÍNEA	40
4.10	INVASÃO VASCULAR LINFÁTICA	41
4.11	LINFONODOS ACOMETIDOS	41
4.12	TESTE DE PROPORÇÃO	44

5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	66
7	ANEXOS	69
8	REFERÊNCIAS	75

*Lista de Abreviaturas,
Siglas e Símbolos*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS

H. pylori helicobacter pylori

SIGLAS

AGP	adenocarcinoma gástrico precoce
CDH1	Caderina 1 tipo 1, E-caderina (epitelial)
CDK	kinase dependente de ciclina
DP	desvio-padrão
GTP	guanosina trifosfato
HC/FM-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
JGCA	Japanese Gastric Cancer Association
TNA	<i>Tissue Microarrays</i> ou Micromatriz Tecidual
UICC	União Internacional Contra o Câncer

SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
±	mais ou menos, aproximadamente
µm	micrômetro
cm	centímetros
h	hora
kD	quiloDalton
kg	quilograma
min	minuto
mm	milímetros
s	segundos
Sm1	invasão da submucosa menor que 5 µm
Sm2	invasão da submucosa maior que 5 µm
X	versus

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1	Parte do conjunto de lâminas e blocos a partir dos quais os TMAs foram montados	16
Figura 2	Exemplo de pareamento entre lâminas e blocos marcados	17
Figura 3	<i>Tissue Microarrayer Manual</i> , modelo MTA1® (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA)	17
Figura 4	Exemplos de blocos dos TMA's obtidos	18
Figura 5	Posição de TMA do tumor primário completamente negativo para p16 ^{ink4a}	24
Figura 6	Posição de tumor primário com imunomarcagem para p16 ^{ink4a} no núcleo e citoplasma em mais de 90% das células	24
Figura 7	Amostra de tumor primário mostrando ausência de impregnação nuclear para p53	25
Figura 8	Adenocarcinoma gástrico bem diferenciado. Amostra de TMA mostrando intensa positividade para p53	25

GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição dos pacientes por faixa etária	30
Gráfico 2	Positividade de p21 ^{Waf1/cip1} na mucosa normal X gênero	31
Gráfico 3	Positividade de p27 ^{kip1} na mucosa normal X penetração na submucosa	39
Gráfico 4	Positividade de p16 ^{ink4a} na mucosa normal X infiltração perineural	40
Gráfico 5	Positividade de p16 ^{ink4a} na mucosa normal X invasão vascular	41
Gráfico 6	Positividade de p53 no tumor X acometimento linfonodal	42
Gráfico 7	Positividade de p21 ^{Waf1/cip1} no tumor X acometimento linfonodal	43
Gráfico 8	Positividade de p21 ^{ras} no tumor X acometimento linfonodal	43
Gráfico 9	Positividade proporcional de p53 na mucosa normal, mucosa metaplásica e tumor	44
Gráfico 10	Positividade proporcional de p21 ^{Waf1/cip1} na mucosa normal, mucosa metaplásica e tumor	45
Gráfico 11	Positividade proporcional de p27 ^{kip1} na mucosa normal, mucosa metaplásica e tumor.....	45
Gráfico 12	Positividade proporcional de p21 ^{ras} na mucosa normal, mucosa metaplásica e tumor	46
Gráfico 13	Positividade proporcional de p16 ^{ink4a} na mucosa normal, mucosa metaplásica e tumor	46

QUADROS

Quadro 1	Procedimento de recuperação de antígenos	20
Quadro 2	Procedimento de incubação dos anticorpos primários ..	21

TABELAS

Tabela 1	Semi-quantificação de imunopositividade	26
Tabela 2	Características clínicas gerais dos casos do estudo	29
Tabela 3	Positividade de p21 ^{ras} na mucosa metaplásica X raça ..	32
Tabela 4	Positividade de p21 ^{ras} no tumor X raça	33
Tabela 5	Positividade de p21 ^{waf1/Cip1} na mucosa normal X raça	33
Tabela 6	Positividade de p16 ^{ink4a} na mucosa normal X raça	34
Tabela 7	Positividade de p16 ^{ink4a} na mucosa normal X história familiar de câncer gástrico	35
Tabela 8	Positividade de p27 ^{kip1} na mucosa metaplásica X história familiar de câncer gástrico	36
Tabela 9	Positividade de p21 ^{ras} na mucosa metaplásica X história familiar de câncer gástrico	36
Tabela 10	Positividade de p21 ^{waf1/cip1} no tumor X tipo histológico de Laurén	36
Tabela 11	Positividade de p21 ^{ras} na mucosa normal X tipo histológico de Laurén	38
Tabela 12	Positividade de p27 ^{kip1} no tumor X tipo histológico de Laurén	38

Resumo

RESUMO

Moron RA. *Expressão de p53, p16^{ink4a}, p21^{Waf1/cip1}, p21^{Ras} e p27^{Kip1/cip1} no câncer gástrico precoce que invade a submucosa em pacientes submetidos a gastrectomia com linfadenectomia D2* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 96p.

INTRODUÇÃO: O câncer gástrico precoce que invade a submucosa pode apresentar acometimento linfonodal em torno de 20% dos casos. O tratamento cirúrgico clássico com gastrectomia e linfadenectomia D2 é um procedimento não isento de mortalidade e morbidade. Determinar quais pacientes têm maior risco de acometimento linfonodal permitiria tratamentos com menores complicações. Recentemente diversos autores relatam maior expressão imuno-histoquímica de p53 e p21^{ras} em tumores avançados e com pior prognóstico. Tem sido relatada também perda da expressão de p21^{waf1}, p27^{kip1} e p16^{ink4a} nos tumores avançados e algumas publicações relatam também relação entre a expressão dos marcadores e acometimento linfonodal. **MÉTODOS:** Foram estudados retrospectivamente 81 pacientes submetidos à gastrectomia com linfadenectomia D2 no período de 1971 a 2004 no Serviço de Cirurgia do Estômago e Intestino Delgado do Departamento de Gastroenterologia do HC-FM/USP. Os blocos de parafina contendo fragmentos dos tumores foram recuperados e novo exame histopatológico confirmou o diagnóstico. Selecionaram-se áreas representativas de mucosa normal, mucosa metaplásica e tumor para confecção de novos blocos de *tissue microarrays*. Foi avaliada a expressão imuno-histoquímica de p21^{ras}, p53, p21^{waf1/cip1}, p27^{kip1} e p16^{ink4a} nos tecidos. Foram investigadas as correlações entre a expressão dos marcadores e as características clínico-patológicas dos pacientes. A análise da associação entre os dados clínicos e a positividade dos marcadores foi realizada pelo teste Qui-quadrado. **RESULTADOS:** Na mucosa normal, metaplásica e tumoral p53 apresentou positividade em 53%, 87,3% e 87,1% dos casos respectivamente. Nos mesmos tecidos p21^{ras} apresentou positividade de 85,3%, 86% e 96,8%. Para p16^{ink4a} a positividade foi de 46,3%, 91,1% e 86%. Para p27^{kip1} a positividade foi de 60%, 94,7% e 95,3%. Para p21^{waf1/cip1} a positividade foi 32,4%, 72,7% e 71,4%. Todos os tumores tiveram alguma positividade para p53. Os tumores com acometimento linfonodal apresentaram hiper-expressão(+4) de p53 em 47% dos casos contra 17% nos pacientes que não tinham acometimento. Nenhum tumor com positividade para p53 baixa(0 e +1) teve linfonodos acometidos. Nenhum tumor com p21^{ras} negativo apresentou linfonodos acometidos. Nos pacientes com acometimento linfonodal p21^{ras} teve positividade intensa(+2 e +3) em 88% dos casos contra 50% dos casos sem acometimento linfonodal. Houve positividade intensa(+2,+3 e +4) de p21^{waf1/cip1} em 71% dos tumores com acometimento linfonodal contra 28% nos pacientes sem acometimento. Não observamos perda de expressão de p21^{waf1}, p27^{kip1} e p16^{ink4a} nos tumores com acometimento linfonodal. Na mucosa normal p16^{ink4a} foi hiper-expresso

(+4) em 20% dos casos com infiltração perineural contra 0% nos casos sem acometimento. O mesmo marcador foi hiperexpresso em 50% dos casos com infiltração vascular contra 0% dos casos sem infiltração. Os tumores com padrão de infiltração Sm2 tiveram pouca positividade (0 e +1) de p27^{kip1} na mucosa normal em 89% dos casos contra 55% dos casos Sm1. **CONCLUSÕES:** Maior expressão de p53, p21^{ras} e p21^{waf1/cip1} no tumor teve relação estatística significativa com acometimento linfonodal. Ocorre aumento da expressão imuno-histoquímica de todos os marcadores da mucosa normal para o tumor. A maior hiper-expressão de p16^{ink4a} na mucosa normal de pacientes tem relação com infiltração perineural e vascular nos tumores. A expressão dos marcadores é diferente nas raças estudadas. As pacientes do sexo feminino apresentam maior positividade de p21waf1 na mucosa normal. Pacientes com história familiar de câncer gástrico apresentam maior positividade de p16^{ink4a} na mucosa normal, menor positividade de p21waf1/cip1 e p21ras na mucosa metaplásica. Maior positividade na mucosa normal de p21^{waf1/cip1} relaciona-se a sexo feminino e infiltração tipo Sm1.

Descritores: Adenocarcinoma. Neoplasias gástricas. Gastrectomia. Excisão de linfonodo.

Summary

SUMMARY

Moron RA. *Expression of p53, p16^{ink4a}, p21^{Waf1/cip1}, p21^{Ras}, and p27^{Kip1/cip1} in patients exhibiting gastric adenocarcinoma with submucosa invasion submitted to gastrectomy with D2 lymphadenectomy* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 96p.

INTRODUCTION: Early gastric cancer that invades the submucosa might have a lymphonodal involvement in about 20% of the cases. Gastrectomy and D2 lymphadenectomy is a procedure that has presented mortality and morbidity. Determining which patients would have a greater risk of lymphonodal involvement would allow treatments with fewer complications. Recently, several authors reported a greater immunohistochemical expression of p53 and p21^{ras} in advanced tumors with worst prognosis. It has also been reported the expression loss of p21^{waf1}, p27^{kip1}, and p16^{ink4a} in advanced tumors, and, some studies also observed the relationship between the markers expression and lymphonodal involvement. **METHODS:** Eighty-one patients who had undergone gastrectomy with D2 lymphadenectomy from 1971 to 2004 were retrospectively studied. A new histopathological exam confirmed the diagnosis. Representative areas of both normal and metaplastic mucosa and of the tumor were selected for obtaining new blocks of tissue microarrays. The immunohistochemical expression of p21^{ras}, p53, p21^{waf1/cip1}, p27^{kip1} and p16^{ink4a} in the tissues was evaluated. **RESULTS:** In normal, metaplastic and tumoral mucosa, p53 showed positivity in 53%, 87.3%, and 87.1% of the cases, respectively. In the same tissues, p21^{ras} showed positivity in 85.3%, 86%, and 96.8%, respectively. The positivity of p16^{ink4a} was 46.3%, 91.1%, and 86%, respectively. p27^{kip1} showed a positivity of 60%, 94.7%, and 95.3%, respectively. p21^{waf1/cip1} presented a positivity of 32.4%, 72.7%, and 71.4%, respectively. All tumors showed positivity for p53. Tumors with lymphonodal involvement presented hyper-expression (+4) of p53 in 47% of the cases versus 17% in patients who had not showed any involvement. No tumor with low positivity (0 and +1) of p53 showed lymphonodal involvement. In patients with lymphonodal involvement, p21^{ras} presented strong positivity (+2 and +3) in 88% of the cases versus 50% of the cases without lymphonodal involvement. There was a strong positivity (+2,+3, and +4) of p21^{waf1/cip1} in 71% of the tumors with lymphonodal involvement versus 28% in patients without involvement. It was not observed an expression loss of p21^{waf1}, p27^{kip1} e p16^{ink4a} in tumors with lymphonodal involvement. In normal mucosa, p16^{ink4a} showed a hyper-expression (+4) in 20% of the cases with perineural invasion versus 0% of the cases without invasion. This same marker showed a hyper-expression in 50% of the cases with vascular invasion versus 0% of the cases without invasion. Tumors with Sm2 invasion pattern showed low positivity (0 and +1) of p27^{kip1} in normal mucosa in 89% of the cases versus 55% of the cases of Sm1 tumors. **CONCLUSIONS:** Higher expression of p53, p21^{ras}, and p21^{waf1/cip1} in tumor

showed a significant statistical relationship with lymphonodal involvement. A higher hyper-expression of p16^{ink4a} in patient's normal mucosa was related to perineural and vascular invasion of tumors.

Descriptors: Adenocarcinoma. Stomach Neoplasms. Gastrectomy. Lymph Node Excision.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer de estômago é o quarto mais freqüente no mundo e o segundo em mortalidade. A estimativa no Brasil é de 14.080 casos novos entre homens e 7.720 entre mulheres no ano de 2008. O risco estimado é de 15 casos novos para cada cem mil homens e oito casos novos para cada cem mil mulheres (INCA, 2008).

Apesar de permanecer como importante problema de saúde pública no mundo, houve significativa redução dos casos novos de câncer gástrico nas últimas décadas. Ao lado de mudanças importantes na epidemiologia da doença, como o aumento dos tumores proximais e do tipo difuso de Laurén, o incremento entre mulheres e pacientes mais idosos, observa-se, sobretudo, nos países desenvolvidos do Oriente, o aumento significativo do diagnóstico nas fases precoces da doença. Entre as hipóteses para explicar esse fato figuram as mudanças nos hábitos alimentares com o consumo de alimentos refrigerados, a diminuição do consumo de alimentos salgados e defumados, o uso de antibióticos, a erradicação do *H. pylori* e maior utilização de exames preventivos (Howson et al., 1986; Drumm et al., 2003).

O adenocarcinoma gástrico precoce (AGP) foi definido pela Japanese Gastroenterological Endoscopy Society (JGES) como um tumor primário do estômago que não ultrapassa a camada submucosa, independente da presença ou não de metástases linfonodais ou à distância. O termo "precoce" foi utilizado no Japão para o diagnóstico de tuberculose pulmonar

em fase inicial, principal causa e morte no período pós 2ª Guerra Mundial. Como a campanha teve enorme sucesso, o governo japonês adotou a mesma nomenclatura para melhorar os resultados do tratamento do câncer gástrico em sua fase inicial (Inoe et al., 1991). Essa neoplasia incide com maior frequência nos pacientes na sétima década de vida. Em relação ao gênero há predominância do masculino (2:1) (Bringaza et al., 1986; Okabayashi et al., 2008, INCA, 2008).

Metástases linfonodais, principal fator prognóstico da doença, ocorrem entre 0 e 17 % em carcinomas intra-mucosos e 13 a 30 % nos tumores que invadem a submucosa (JRSGC, 1998; Abe et al., 2002; Okabayashi et al., 2008). No Ocidente, estudos mostram acometimento linfonodal entre 10 e 20% dos casos (Everett e Axon, 1997; Borie et al., 2000).

O AGP que invade a submucosa quando tratado tem prognóstico favorável e sobrevida em cinco anos superior a 90%. O fator prognóstico mais importante é a presença ou não de metástase linfonodal o que ocorre em aproximadamente 10 a 20% dos casos (Hioki et al., 1990; Abe et al., 2002). Isso significa que em 80% dos casos a linfadenectomia realizada classicamente poderia ser evitada, juntamente com as complicações decorrentes desse procedimento. O melhor conhecimento do comportamento biológico dos tumores e dos fatores genéticos envolvidos na carcinogênese gástrica pode auxiliar na escolha do tratamento para o AGP.

Os resultados do tratamento cirúrgico do AGP têm variado quanto aos índices de sobrevivência de cinco anos nos estudos multi-cêntricos. O tratamento padrão é a gastrectomia com linfadenectomia D2 (Inoue et al.,

1991; Folli et al., 1995; Gama-Rodrigues et al., 2001; Jacob, 2003). Em revisão da literatura Jacob (2003), relatou complicações de 2 a 37% e óbitos entre 3 e 8% dos casos submetidos a tratamento cirúrgico.

Novas técnicas diagnósticas e terapêuticas, envolvendo a endoscopia gástrica e a cirurgia laparoscópica, estão surgindo rapidamente permitindo a realização de ressecção endoscópica e em casos específicos, o tratamento do AGP. Têm sido preconizados procedimentos menores, como a mucosectomia endoscópica (Noda et al., 2001) e ressecção auxiliada por video-laparoscopia (Bresciani et al., 2001). A escolha depende de variáveis do tumor como tamanho, tipo histológico, aspecto macroscópico e presença de metástase linfonodal (Takeshita et al., 1998; Tsujitani et al., 1999; Gotoda et al., 2000).

A escolha do tratamento para o AGP pode ser orientada pelo melhor conhecimento do comportamento biológico dos tumores. O estudo da biologia molecular e da expressão de oncogenes e proteínas do ciclo celular pode ajudar na determinação dos pacientes com maior ou menor risco de metástase linfonodal (Gotoda et al., 2001; Liu et al., 2001; Pan et al., 2003). Diante desses achados, a realização de linfadenectomia limitada poderia contribuir para diminuir as complicações peri-operatórias e melhorar a qualidade de vida.

Torna-se necessário o entendimento da carcinogênese de estômago, que é processo de múltiplos passos; manifesta-se em várias etapas como gastrite superficial, gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, como carcinoma. Essas condições costumam ser seqüenciais e

ocorrer em período de muitos anos como resultado da exposição a uma variedade de fatores endógenos e exógenos, que causam alterações genéticas (Cotran, 1999; César, 2002). Com gastrite crônica de longa duração, o epitélio desenvolve alterações citológicas, incluindo as de tamanho, formato e orientação das células epiteliais com atipia dos núcleos. Essas alterações displásicas podem se tornar tão graves a ponto de constituírem um carcinoma *in situ* (Nakasturo et al., 1993; Cotran, 1999) principalmente do tipo intestinal proveniente de formas atróficas de gastrite (Kokkola et al., 1996). Já o adenocarcinoma do tipo difuso surge originalmente, sem evolução por meio de displasia (Tahara et al., 1993).

O câncer é doença genética causada pelo acúmulo progressivo de alterações dos genes que modulam diversos mecanismos relacionados a proliferação celular, apoptose, angiogênese e expressão de moléculas de adesão (Hall et al., 1997). Entre esses mecanismos foram definidos os proto-oncogenes que codificam proteínas importantes para a regulação do crescimento e proliferação celular. Os proto-oncogenes podem sofrer mutações ou deleções levando a aumento da proliferação celular. Quando isso ocorre passam a ser chamados de oncogenes. Dentre os proto-oncogenes, destaca-se a família Ras, composta por três genes; K-ras, H-ras e N-ras (Lowy et al., 1993) que codificam proteínas com atividade GTPase envolvidas na transdução de sinal ligada a via GTP.

O proto-oncogene K-ras codifica uma pequena proteína monomérica de 21 kDa (p21^{Ras}), localizada na membrana plasmática das células humanas com a função fisiológica de receber um sinal de um receptor de

tirosina-quinase. Este receptor estimulado por fatores de crescimento na face externa da célula desencadeia eventos que promovem a proliferação celular. Alterações nesse gene podem transformá-lo em um oncogene ativo, levando a proliferação celular descontrolada (Bos, 1989; Konishi et al., 1995). Esse mecanismo foi bastante estudado em câncer de cólon onde mutações no K-ras foram detectadas em até 50% dos casos (Bos et al., 1987; Morin et al., 1997; Perez et al., 2006). As alterações genéticas que levam a ativação do oncogene Ras são comumente associadas a indevida substituição de um único aminoácido na proteína p21 (Tabin et al., 1982; Shimizu et al., 1983). Estudos recentes tem sugerido que a expressão aumentada de p21^{ras} está presente em diversos tipos de tumores (Bos et al., 1989).

Os anti-oncogenes atuam de maneira diferente dos oncogenes. As proteínas codificadas pelos genes supressores de tumor estão envolvidas na inibição do crescimento e divisão celular. Portanto, perda ou mutação nos anti-oncogenes pode levar ao crescimento descontrolado devido a remoção dos mecanismos que regulariam a divisão de maneira inibitória (Craanen et al., 1999).

As células passam a maior parte de sua vida em interfase, que é um período de atividade biossintética intensa, durante o qual a célula dobra de tamanho e duplica o seu complemento cromossômico. A divisão celular é a fase final e microscopicamente visível de uma alteração básica que ocorreu ao nível molecular durante a interfase (Nurse et al., 2000).

O controle da divisão celular é um dispositivo bioquímico cíclico, controlado por várias proteínas que interagem entre si induzindo e coordenando os processos responsáveis pela duplicação e divisão (Hartwell e Weinert, 1989; Perdiggão e Tavares, 2001). Estes complexos de proteínas exercem controle através de ativação e desativação das quinases em pontos estratégicos do ciclo (Evans et al., 1983). Esse sistema é constituído basicamente por dois componentes: ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDK). Hunt descobriu a primeira ciclina no início da década de 80. As ciclinas são proteínas formadas e degradadas ciclicamente durante cada ciclo celular. As ciclinas ligam-se às CDK, regulando a sua atividade e selecionando as proteínas a serem fosforiladas. As CDK e as ciclinas conduzem a célula de uma fase do ciclo celular para a seguinte. Em mamíferos há pelo menos nove CDKs (Johnson e Walker, 1999) e já foram identificadas mais de 16 ciclinas.

Foram identificadas duas famílias de proteínas inibidoras da atividade das CDKs e por sua vez, do ciclo celular: a família INK4-“inhibitor of CDK4”, composta pela proteínas p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p17^{INK4c}, p18^{INK4d} e p19^{ink4a} com a função de inibir os complexos ciclina D/CDK4 ou CDK6 (Serrano et al., 1993; Guan et al., 1994; Hirai et al., 1995) e a família CIP1/KIP1-CDK2 *interacting protein 1/kinase inhibitory protein 1*, composta pelas proteínas p27^{Kip1}, p57^{Kip2} e p21^{waf1/cip1}, que inibem todas as CDKs de um modo geral (Harper et al., 1993; Toyoshima e Hunter, 1994; Sgambato et al., 2000; Nakanishi et al., 1995).

Mecanismos de controle do ciclo celular podem parar a divisão celular em uma determinada fase monitorando o estado de acontecimentos ao longo

do ciclo celular, como a replicação dos cromossomos ou a formação do fuso mitótico e determinam se o ciclo pode ou não continuar. Esses sistemas de controle são muito sensíveis e alteração em uma única molécula de DNA já é suficiente para bloquear o ciclo celular. A célula poderá então proceder reparações antes de prosseguir para as próximas fases ou induzir a morte celular, em caso de erros irreparáveis. Hartwell e Weinert em 1989 introduziram o conceito de pontos de controle (*checkpoints*) onde cada parte desse sistema agiria em determinado momento do ciclo.

Importante ponto de controle é o que bloqueia o ciclo celular na fase G1 impedindo que a célula entre na fase S após danos no DNA e é mediado pelo gene supressor de tumores p53. O p53 é gene supressor de tumores localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p). Deleções no 17p e mutações no p53 têm sido freqüentemente observadas em vários tumores, inclusive no câncer gastrointestinal (Fenoglio-Preiser et al., 2003).

O gene p53 codifica para a proteína p53, de 53 kilodaltons, que tem por função parar o ciclo celular na fase G1-S, permitindo o reparo do DNA ou induzindo apoptose. Na presença de mutações no DNA ocorre a ativação do p53 que induz a ativação de outros genes incluindo o gene inibidor do ciclo celular (p21^{Waf1}), o gene inibidor da angiogênese (bax) e o gene promotor de apoptose (bcl-2) (Maki et al., 1996; Chen et al., 2000). Outras funções do p53 são a manutenção da estabilidade do genoma e a inibição da angiogênese (Carr, 2000). O p53 é o gene mutado mais comum nos tumores humanos, pois esse é um dos primeiros passos na progressão de uma célula para a malignidade (Hollstein et al., 1991). Defeitos no p53 permitem a sobrevivência

e reprodução de células com mutações no DNA que as passam à sua descendência, criando oportunidade de se acumularem mutações adicionais necessárias para o surgimento de tumores (Levine et al., 1997). O aumento da expressão do p53 foi relatado como importante para o padrão de infiltração e a presença de metástases linfonodais no câncer gástrico (Ichiyoshi et al., 1997, Oiwa et al., 1995).

A proteína p21^{Waf1/Cip1} é codificada pelo gene WAF1 (*wild-type p53 activated fragment 1*), que é ativado pelo p53. O p21^{waf1}, localizado no cromossomo 6p, codifica proteínas que inibem a atividade de kinases dependentes de ciclinas, necessárias para a transição entre G1 e S. Numa ruptura de DNA a ativação do p53 induz a produção de p21^{waf1}, que ativa o complexo promotor da fase S. Com a ativação deste complexo não será possível a célula chegar a divisão do material genético (Harper et al., 1993; Noda et al., 2001). Mutações no p21^{waf1} são raras, mas, a perda da função do p21^{waf1} é freqüente no câncer em humanos (Akama et al., 1996).

Outra proteína bloqueadora da família CIP1/KIP1 é o p27^{kip1} que ligado ao complexo CDK4 ou CDK6 inibe a proliferação celular. O gene p27^{kip1}, localizado no cromossomo 12p (Ponce-Castaneda et al., 1995), pertence a família dos genes reguladores do ciclo celular chamados de inibidores das quinases dependentes de ciclinas e causa bloqueio do ciclo celular na fase G1 (Toyoshima e Hunter, 1994). O p27^{kip1} tem sido chamado de inibidor universal das quinases dependentes de ciclinas porque parece interagir com diferentes tipos de complexos CDK-ciclinas. Além disso, parece haver papel do p27^{kip1} na indução da apoptose e na diferenciação celular de alguns

tecidos. Em ratos a hiper-expressão de p27^{kip1} induzida por vírus modificado prolonga o ciclo celular na fase G1 e induz apoptose (Mitsunashi et al., 2001; Zheng et al., 2005). Foi descrita também a associação entre ativação anormal da proteína Ras e a queda na expressão de p27^{kip1}. A ativação da cascata Ras induz a degradação de p27^{kip1} em diversas linhagens celulares (Aktas et al., 1997; Takuwa e Takuwa, 1997).

Pertencente a família INK4 de proteínas inibidoras da atividade das CDKs, o gene p16 codifica a proteína p16^{ink4a} que atua nos complexos CDK4/ciclina D e CDK/ciclina D, impedindo a progressão do ciclo celular além da fase G₁-S. Alterações do p16^{ink4a} foram descritas em vários tipos de tumores humanos incluindo astrocitoma, melanoma, leucemias, câncer de pulmão, câncer de mama, mesoteliomas e tumores gástricos (Guan et al., 1994).

Há poucas publicações na literatura mundial sobre a expressão dos marcadores descritos na introdução e em nenhum foram estudados todos em conjunto. Torna-se oportuno estudar, através de revisão clínica retrospectiva a imunoexpressão das proteínas p53, p21^{ras}, p27^{kip1}, p21^{waf1/cip1} e p16^{ink4a} e sua correlação com metástase linfonodal e parâmetros clínico-patológicos dos pacientes com AGP, que invade a submucosa, submetidos a tratamento cirúrgico clássico com linfadenectomia D2.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

A análise de pacientes com AGP que invadem a submucosa submetidos a gastrectomia com linfadenectomia D2 objetivou:

1. Avaliar a expressão das proteínas p53, p16^{ink4a}, p21^{Waf1/cip1}, p21^{Ras} e p27^{Kip1/cip1} na mucosa normal, na mucosa metaplásica e no tumor.
2. Estudar a relação entre metástases linfonodais e a expressão dos antígenos.
3. Relacionar a expressão dos marcadores com os parâmetros clínicos e histo-patológicos
4. Avaliar a relação entre a expressão dos marcadores e a evolução dos pacientes submetidos à gastrectomia.

3 Casuística e Métodos

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram recuperados retrospectivamente, nos arquivos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FM-USP), 1989 prontuários de pacientes admitidos para tratamento de adenocarcinoma gástrico, no Serviço de Cirurgia do Estômago e Intestino Delgado da Divisão de Clínica Cirúrgica II do HC/FM-USP, no período compreendido entre 1971 e 2004. Destes, 210 pacientes tinham AGP e foram separados para o estudo 120 casos que apresentavam invasão da submucosa.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Adenocarcinoma gástrico primário que invadia até a submucosa.
- Pacientes submetidos a gastrectomia com linfadenectomia D2.
- Quinze ou mais linfonodos dissecados na peça cirúrgica.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes que foram submetidos à ressecção gástrica prévia.
- Indisponibilidade de todas as lâminas e blocos da peça ressecada do paciente.

Em 81 pacientes que preencheram os critérios do estudo foi possível recuperar os dados clínicos, prontuários, blocos e lâminas para análise histopatológica e imuno-histoquímica.

3.4 OBTENÇÃO E TABULAÇÃO DOS DADOS DO ESTUDO

Através de revisão retrospectiva dos prontuários dos pacientes foram obtidos os seguintes dados para análise:

- Nome
- Registro geral no HC/FM-USP
- Idade
- Gênero
- Raça
- Data do procedimento cirúrgico
- Mortalidade
- Tipo histológico de Laurén (Laurén, 1965)
- Número de linfonodos acometidos pela doença
- Ocorrência de metástases à distância
- Data último seguimento
- Situação clínica do paciente no último seguimento
- Tempo livre de doença
- Data e causa do óbito

Foi criado um banco de dados contendo os dados clínicos, anátomo-patológicos e do seguimento ambulatorial. Os dados colhidos foram armazenados utilizando-se o programa de computador Microsoft Access®.

3.5 PREPARO DAS LÂMINAS

As lâminas originais foram avaliadas por médico patologista para confirmação do diagnóstico, após o que novas secções foram obtidas e coradas pela hematoxilina-eosina com a finalidade de selecionar áreas representativas do tumor e mucosas normal e metaplásica, para confecção dos blocos de micro-matrizes teciduais. Foi utilizado o equipamento *Tissue Microarrayer Manual*, modelo MTA1 (Beecher®), para retirada de amostras das áreas previamente selecionadas dos blocos doadores e reagrupamento das mesmas em novos blocos de parafina (receptores) contendo tecidos de diferentes pacientes devidamente registrados através de sua posição na matriz.

Figura 1 - Parte do conjunto de lâminas e blocos a partir dos quais os TMA's foram montados

Figura 2 - Exemplo de pareamento entre lâmina e bloco (ambos marcados e com os blocos já amostrados)

Figura 3 - *Tissue Microarrayer Manual*, modelo MTA1® (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA)

Figura 4 - Exemplo dos blocos de TMA's obtidos

Após obtenção das lâminas de TMA foi realizado estudo imuno-histoquímico no Departamento de Patologia da FMUSP segundo protocolo a seguir descrito.

3.6 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Secções histológicas obtidas a partir dos blocos de parafina foram dispostas sobre lâminas silanizadas e submetidas a reação imuno-histoquímica para cada marcador: p21^{ras} (clone NCC-RAS-001DakoCytomation M0637, Carpinteria, CA, EUA), p21^{waf1/cip1} (clone SX118, DakoCytomation M7202, Glostrup, Dinamarca), p27^{kip1} (clone SX53G8 DakoCytomation M7203, Glostrup, Dinamarca), p16^{ink4a} (clone E6H4

DakoCytomation K5334, Glostrup, Dinamarca) e p53 (clone DO-7 DakoCytomation, M7001, Glostrup, Dinamarca).

Previamente a realização dos ensaios nas amostras pertinentes, as condições ótimas das reações (pH e método de recuperação antigênica, título do anticorpo primário e sistema de revelação) foram determinadas para cada anticorpo contra os antígenos pesquisados (p21^{ras}, p53, p21^{waf1/cip1}, p27^{kip1} e p16^{ink4a}), empregando-se tecidos que sabidamente expressam tais antígenos (controles positivos).

Após a determinação das condições ideais de reação, o mesmo protocolo foi aplicado para as amostras provenientes da série de casos, sendo utilizado para cada bateria reação controle positivo e negativo para os anticorpos estudados. Para os anticorpos anti-p21^{ras}, anti-p21^{waf1/cip1} e anti-p27^{kip1} o tecido usado como controle foi amígdala normal proveniente da rotina diagnóstica da Divisão de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para o anticorpo anti-p53 empregou-se como controle positivo amostra de adenocarcinoma pulmonar de mesma procedência e para o p16^{ink4a} neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau histológico híbrida (glandular e escamosa) de trato genital inferior feminino.

PROTOCOLO DE REAÇÕES

Desparafinização das lâminas de TMA:

- Xilol a 60⁰ C por 20 min;
- Xilol à temperatura ambiente por 20 min;

- Etanol 100% 3 vezes 30 s cada passagem;
- Etanol 95% 30 s;
- Etanol 80% 30 s;
- Etanol 70% 30 s;
- Lavar as lâminas em água corrente e destilada.

Recuperação de antígenos:

Quadro 1 - Procedimento de recuperação de antígenos

Princípios dos métodos	Recursos utilizados	Soluções utilizadas	Observações
Calor úmido	Panela de pressão	Ácido Cítrico (Merck 1.00244.1000) 10mM pH 6.0 ou Solução de Tris - EDTA 1 mM pH 8.0	Esfriar sob água corrente até a despressurização total

- Lavar as lâminas em água corrente e destilada.

Bloqueio da peroxidase endógena:

- Mergulhar as lâminas em H₂O₂ 6%, com três trocas de 10 min cada;
- Lavar em água corrente e destilada;
- Lavar com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7.4 por 5 min.

Anticorpos primários:

- Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, no título previamente estabelecido conforme tabela abaixo, durante 30 min a 37°C e por 16 a 18 h a 4°C em câmara úmida;
- Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.

Quadro 2 - Procedimento de incubação dos anticorpos primários

Anticorpos	Clones	Diluições	Métodos de Recuperação	Fabricantes
p21 ^{ras}	NCC-RAS-001	1:100	Panela de pressão em ácido cítrico 10 mM pH 6.0, 3 min e 30 seg a partir da pressurização total	DakoCytomation M0637, Carpinteria, CA, EUA
p21 ^{waf1/cip1}	SX118	1:100	Panela de pressão em tampão Tris-EDTA 1 mM, pH 8.0, 2 min e 30 seg a partir da pressurização total	DakoCytomation M7202, Glostrup, Dinamarca
p27 ^{kip1}	SX53G8	1:400	Panela de pressão em tampão Tris-EDTA 1 mM, pH 8.0, 2 min e 30 seg a partir da pressurização total	DakoCytomation M7203, Glostrup, Dinamarca
p16 ^{INK4a}	E6H4	1:400	Panela de pressão em ácido cítrico 10 mM pH 6.0, 3 min e 30 seg a partir da pressurização total	DakoCytomation K5334, Glostrup, Dinamarca
p53	DO-7	1:200	Panela de pressão em ácido cítrico 10 mM pH 6.0, 3 min e 30 seg a partir da pressurização total	DakoCytomation, M7001, Glostrup, Dinamarca

Anticorpos secundários / Sistemas de detecção:

- Incubar com o Post Primary Block (NovoLink Max Polymer Detection System, Cat# RE7280-k, Newcastle, Reino Unido), por 30 min a 37⁰ C;
- Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada;
- Incubar com o Polymer do mesmo kit , por 30 min a 37⁰ C;
- Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.

Revelação com cromógeno:

- Incubar as lâminas em solução substrato cromógeno: 60 mg% de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, USA); 1 ml Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 ml de H₂O₂ 6%; 100 ml de PBS; por 5 min a 37⁰ C, ao abrigo da luz;
- Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.

Contra-coloração:

- Mergulhar as lâminas em solução de Hematoxilina de Harris por 1 min;
- Lavar em água corrente e destilada;
- Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada;
- Desidratar as lâminas em:
 - Etanol 50%, 30 s

- Etanol 80%, 30 s;
 - Etanol 95%, 30 s;
 - Etanol 100% 3 vezes, 30 s cada;
 - Xilol 4 vezes, 30 s cada;
- Montagem das lâminas com lamínula e Entellan (Merck, 1.07961, Alemanha).

A reação imuno-histoquímica, quando positiva, resultou em cor marrom localizada no núcleo ou citoplasma da célula, a depender do antígeno cuja expressão se determinara. Para p53, p21^{Waf1/cip1} e p27^{kip1} a coloração endereça somente o núcleo das células. Para p21^{ras} a coloração ocorre no citoplasma e para p16^{ink4a}, coram-se o núcleo e o citoplasma das células.

O controle negativo foi obtido através da subtração da etapa de incubação do anticorpo primário do protocolo das reações imuno-histoquímicas.

A imunopositividade foi qualitativamente interpretada como a presença de coloração marrom sobre o núcleo das células que sabidamente expressam os antígenos estudados nos tecidos controles, sendo a bateria de reações considerada válida e interpretável somente quando os controles positivos evidenciaram as positivities esperadas, bem como os controles negativos não exibiram marcação de fundo inespecífica. Células do estroma, linfócitos e células da camada muscular do estômago apresentaram positividade infreqüente e não foram incluídos na análise dos resultados.

As Figuras 5, 6, 7 e 8 exemplificam o resultado final de cada posição dos blocos de TMA.

Figura 5 - Posição de TMA do tumor primário completamente negativo para p16^{ink4a}

Figura 6 - Posição de tumor primário com imunomarcção para p16^{ink4a} no núcleo e citoplasma em mais de 90% das células (semi-quantificada como 4+)

Figura 7 - Amostra de tumor primário mostrando ausência de impregnação nuclear para p53

Figura 8 - Adenocarcinoma gástrico bem diferenciado. Amostra de TMA mostrando intensa positividade para p53

3.7 POSITIVIDADE DOS MARCADORES

Após a realização dos ensaios imuno-histoquímicos nas secções obtidas dos blocos de TMA, as lâminas obtidas foram avaliadas por médico patologista quanto aos mencionados critérios qualitativos de positividade. O patologista não teve acesso aos registros e dados clínicos dos pacientes.

Cada amostra foi ainda semi-quantificada para os marcadores estudados, sendo definidas cinco categorias de imunoreatividade conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Semi-quantificação de imunopositividade

(0) nenhuma célula corada;
(1+) até 10% das células positivas;
(2+) 11%-25% das células positivas;
(3+) 26%-50% das células positivas;
(4+) > 51% das células positivas.

Foi avaliado o significado de cada categoria de imunopositividade, correlacionando-as com as variáveis clínicas e patológicas, sem o estabelecimento, o qual seria arbitrário, de um ponto de corte. Optamos, portanto, por realizar o estudo estatístico sem mesclar diferentes níveis de positividade.

3.8 ESTUDO ESTATÍSTICO

A análise da associação entre os dados clínicos e a positividade dos marcadores foi realizada pelo teste Qui-quadrado.

Em todos os testes de hipóteses utilizou-se um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), sendo estatisticamente significantes aqueles com p menor que 5% ou 0,05.

O programa estatístico empregado para a análise das tabulações e frequências foi o SPSS® versão 8.0 (SPSS Brasil).

4 Resultados

4 RESULTADOS

Em 81 casos obtivemos material em condições de análise (tumor, mucosa normal e mucosa metaplásica). Houve acometimento linfonodal em 11 pacientes (13,6%), sendo impossível recuperar material linfonodal acometido dos blocos de parafina em oito casos.

As características epidemiológicas e clínicas dos pacientes estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Características clínicas gerais

Características clínicas		Número de pacientes	%
Sexo	Feminino	31	38,3
	Masculino	50	61,7
Raça	Branca	59	72,2
	Amarela	7	8,6
	Negra	14	17,3
	Parda	1	1,2
Média de idade	61,5 ± 12,5 anos		
História familiar presente		12	14,8
Sintoma principal	Dispepsia	58	71,6
	Assintomáticos	18	22,2
	Hemorragia Digestiva Alta	5	6,2
Mortalidade hospitalar (<30 dias)		5	6,2
	AVC	1	1,2
	Sépsis	2	2,5
	Complicações respiratórias	2	2,5
Mortalidade no seguimento (>30 dias)		2	2,5
	Metástase pleural	1	1,25
	Metástase pulmonar	1	1,25
Tipo histológico (Laurén)	Intestinal	45	55,5
	Difuso	25	30,8
	Misto	11	13,5
Linfonodos acometidos		19	23,4
Tempo médio de seguimento	88 meses		

n=81; n=total de pacientes

4.1 IDADE

A média de idade dos pacientes foi de 61,5 anos (DP=12,5), sendo o paciente mais jovem com 26 anos e o mais idoso com 86 anos. A mediana da idade foi 63 anos. A maioria dos pacientes se distribuiu entre a 6ª e 8ª décadas de vida. Não houve correlação estatística entre idade e expressão imuno-histoquímica dos marcadores nos casos estudados (Anexos A, B, C, D e E). O Gráfico 1 exibe a distribuição dos pacientes nas diversas faixas etárias.

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes por faixa etária

4.2 GÊNERO

Houve predomínio do gênero masculino (50 casos), responsável por 61,7% dos casos. O sexo feminino apresentou 31 casos, equivalente a 38,3% dos pacientes. A relação homem/mulher foi de 1,6. A análise estatística evidenciou menor expressão de p21^{Waf1} na mucosa normal de pacientes do sexo masculino conforme demonstrado no Gráfico 2. Não houve relação significativa entre os outros marcadores e o gênero (Anexos A, B, C, D e E).

Gráfico 2 - Positividade de p21^{Waf1/cip1} na mucosa normal X gênero

4.3 RAÇA

Houve predomínio da raça branca com 59 (72,2%) pacientes, seguida da raça amarela com sete (8,6%), negra com 14 (17,3%) e raça parda com um (1,2%).

Na mucosa metaplásica quase todos os pacientes tiveram menos que 25% das células positivas para p21^{ras}. Houve mais casos com hiperexpressão (mais que 25% de positividade) entre os amarelos e pardos, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Positividade de p21^{ras} na mucosa metaplásica X raça

	Branca	Negra	Amarela	Parda
0	6 (15%)	1 (11,1%)	1 (14,3%)	0
1+	33 (82,5%)	8 (88,9%)	5 (71,4%)	0
2+	1 (2,5%)	0	1 (14,3%)	1 (100%)
3+	0	0	0	0
4+	0	0	0	0

n=57; n=total de pacientes

p<0,002; p=nível de significância estatística

Nos mesmos pacientes a positividade de p21^{ras} no tumor foi muito maior. Entre os brancos, 54,4% dos pacientes tiveram 25% ou mais das células positivas. Entre os amarelos 66,7% e entre os negros, 90% dos pacientes tiveram 25% ou mais de células positivas para o marcador. O único paciente de raça parda presente no estudo apresentou mais que 25% de positividade na mucosa metaplásica, porém, no tumor desse paciente houve perda da positividade para p21^{ras}, conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Positividade de p21^{ras} no tumor X raça

	Branca	Negra	Amarela	Parda
0	1 (2,2%)	0	0	1 (100%)
1+	20 (43,5%)	1 (10%)	2 (33,3%)	0
2+	21 (45,7%)	8 (80%)	3 (50%)	0
3+	4 (8,7%)	1 (10%)	1 (16,7%)	0
4+	0	0	0	0

n=63; n=total de pacientes

p<0,001; p=nível de significância estatística

Houve maior positividade de p16^{ink4a} e p21^{waf1/cip1} na mucosa normal dos pacientes amarelos, negros e pardos. Entre os brancos 74% e 57% se apresentaram sem expressão respectivamente para p21^{waf1} e p16^{ink4a} na mucosa normal, conforme demonstrado nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Positividade de p21^{waf1/Cip1} na mucosa normal X raça

	Branca	Negra	Amarela	Parda
0	37 (74%)	6 (60%)	3 (43%)	0
1+	9 (18%)	4 (40%)	3 (43%)	0
2+	4 (8%)	0	1 (14%)	1 (100%)
3+	0	0	0	0
4+	0	0	0	0

n=68; n=total de pacientes

p=0,017; p=nível de significância estatística

Tabela 6 - Positividade de p16^{ink4a} na mucosa normal X raça

	Branca	Negra	Amarela	Parda
0	28 (57%)	5 (50%)	3 (43%)	0
1+	14 (28,%)	4 (40%)	2 (29%)	0
2+	5 (10%)	1 (10%)	2 (29%)	0
3+	1 (2%)	0	0	1 (100%)
4+	1 (2%)	0	0	0

n=67; n=total de pacientes

p<0,001; p=nível de significância estatística

Os dados de relação dos marcadores com raça que não atingiram significância estatística encontram-se nos Anexos A, B, C, D e E.

4.4 MORTALIDADE

Durante a internação hospitalar foram constatados cinco (6,2%) óbitos. Dois (2,5%) pacientes apresentaram complicações respiratórias. Dois (2,5%) pacientes evoluíram para sépsis por coleção intra-abdominal e um (1,2%) paciente foi a óbito por acidente vascular cerebral. Houve duas recidivas do tumor tardiamente. Um paciente teve metástase pleural falecendo oito anos após a operação. O outro paciente teve metástase pulmonar e faleceu após quatro anos da operação. Não encontramos relação significativa entre complicações, mortalidade tardia, recidivas e imunoexpressão dos marcadores estudados.

4.5 HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER GÁSTRICO

Observou-se história familiar de câncer gástrico em 12 pacientes (14,8%). Houve grande positividade de p16^{ink4a} na mucosa normal dos pacientes com história familiar positiva de câncer gástrico. Em 33% dos pacientes com história familiar positiva e em 56% dos pacientes sem história familiar, o p16^{ink4a} não apresentou expressão imuno-histoquímica na mucosa normal, conforme demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Positividade de p16^{ink4a} na mucosa normal X história familiar de câncer gástrico

	Ausente	Presente
0	33 (56,9%)	3 (33,3%)
1+	18 (31%)	2 (22,2%)
2+	6 (9%)	2 (22,2%)
3+	1 (1,7%)	1 (11,1%)
4+	0	1 (11,1%)

n=67; n=total de pacientes

p<0,031; p=nível de significância estatística

Observamos positividade de p27^{kip1} na mucosa metaplásica em mais de 90% dos casos em ambos os grupos, entretanto, houve menor positividade nos pacientes com história familiar de câncer gástrico conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Positividade de p27^{kip1} na mucosa metaplásica X história familiar de câncer gástrico

	Ausente	Presente
0	2 (4,3%)	1 (10%)
1+	6 (12,8%)	5 (50%)
2+	23 (48,9%)	4 (40%)
3+	13 (27,7%)	0
4+	3 (6,4%)	0

n=57; n=total de pacientes

p=0,04; p=nível de significância estatística

Houve menor expressão de p21^{ras} na mucosa metaplásica dos pacientes com história familiar de câncer gástrico, conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Positividade de p21^{ras} na mucosa metaplásica X história familiar de câncer gástrico

	Ausente	Presente
0	4 (8,5%)	4 (40%)
1+	40 (85,1%)	6 (60%)
2+	3 (6,4%)	0
3+	0	0
4+	0	0

n=57; n=total de pacientes

p=0,029; p=nível de significância estatística

4.6 TIPO HISTOLÓGICO

Considerando-se a classificação de Laurén, o tipo intestinal foi o mais encontrado em 45 (55,5%) pacientes. O tipo difuso foi encontrado em 25 (30,9%) dos pacientes e o tipo misto foi encontrado em 11 (13,5%) pacientes. Os tumores do tipo intestinal não expressaram p21^{waf1} em 29,4% dos casos. Houve 67,6% dos casos com positividade intermediária, com menos de 25% de células marcadas e apenas 2,9% dos casos apresentaram hiper-expressão com mais de 25% de células positivas. Entre os tumores difusos houve perda de expressão de p21^{waf1/cip1} em 40% dos casos, 45% tiveram positividade intermediária e 15% apresentaram hiper-expressão. Os tumores mistos foram todos positivos para p21^{waf1/cip1}, porém, 77,8% tiveram positividade intermediária e 22,2% tiveram hiper-expressão, conforme demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10 - Positividade de p21^{waf1/cip1} no tumor X tipo histológico de Láuren

	Intestinal	Difuso	Misto
0	10 (29,4%)	8 (40%)	0
1+	8 (23,5%)	7 (35%)	5 (55,6%)
2+	15 (44,1%)	2 (10%)	2 (22,2%)
3+	1 (2,9%)	2 (10%)	2 (22,2%)
4+	0	1 (5%)	0

n=63; n=total de pacientes

p=0,034; p=nível de significância estatística

Houve positividade de p21^{ras} na mucosa normal de 81,1% dos pacientes com tumores do tipo intestinal de Laurén, seguido por 86,4% dos

pacientes com tipo difuso e 100% dos pacientes com tipo misto, conforme demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Positividade de p21^{ras} na mucosa normal X tipo histológico de Láuren

	Intestinal	Difuso	Misto
0	7 (18,9%)	3 (13,6%)	0
1+	23 (62,2%)	19 (86,4%)	9 (100%)
2+	7 (18,9%)	0	0
3+	0	0	0
4+	0	0	0

n=68; n=total de pacientes

p=0,048; p=nível de significância estatística

P27^{kip1} foi positivo em todos os casos de tumores do tipo difuso e misto de Láuren. No tipo intestinal ocorreram 8,8% de casos sem expressão ao marcador. Houve maior expressão imuno-histoquímica de p27^{kip1} no tumor em 66,6% dos casos do tipo difuso, 50% do tipo intestinal e 33,3% do tipo misto, conforme demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Positividade de p27^{kip1} no tumor X tipo histológico de Láuren

	Intestinal	Difuso	Misto
0	3 (8,8%)	0	0
1+	3 (8,8%)	4 (19%)	0
2+	11 (32,4%)	3 (14,3%)	6 (66,7%)
3+	15 (44,1%)	8 (38,1%)	2 (22,2%)
4+	2 (5,9%)	6 (28,6%)	1 (11,1%)

n=64; n=total de pacientes

p=0,038; p=nível de significância estatística

4.7 PENETRAÇÃO NA SUBMUCOSA

Quanto a penetração na submucosa 34 (42%) pacientes apresentaram invasão limitada à parte superficial da camada submucosa (Sm1) e 47 (58%) apresentavam invasão maior que 0,5 mm (Sm2). Dentre os marcadores estudados houve maior positividade na expressão de p27^{Kip1} na mucosa normal adjacente dos tumores Sm1 conforme demonstrado no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Positividade de p27^{Kip1} na mucosa normal X penetração na submucosa

4.8 INFILTRAÇÃO PERINEURAL

A invasão perineural ocorreu em cinco (6,17%) casos. Houve maior hiper-expressão do p16^{ink4a} na mucosa normal nos casos em que o tumor apresentou infiltração perineural conforme demonstrado no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Positividade de p16^{ink4a} na mucosa normal X infiltração perineural

4.9 INVASÃO VASCULAR SANGUÍNEA

Observou-se invasão vascular sanguínea em 4 (4,9%) casos. Houve correlação estatística entre a positividade de p16^{ink4a} na mucosa normal e invasão vascular sanguínea no tumor conforme demonstrado no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Positividade de p16^{ink4a} na mucosa normal X invasão vascular

4.10 INVASÃO VASCULAR LINFÁTICA

Invasão vascular linfática foi observada em 16 casos (19,7%). Não houve correlação estatística entre a invasão vascular linfática e a positividade imuno-histoquímica dos marcadores estudados e os dados obtidos encontram-se nos Anexos A, B, C, D e E.

4.11 LINFONODOS ACOMETIDOS

Dezenove (23,4%) pacientes apresentaram linfonodos com metástases do adenocarcinoma. Destes, quatro (21%) pacientes apresentavam invasão

submucosa Sm2 e 15 (78,9%) pacientes apresentavam invasão tipo Sm1. Quanto a classificação de Laurén de 10 (52,6%) eram do tipo intestinal, sete (36,8%) eram do tipo difuso e dois (10,5%) apresentaram o tipo misto.

Houve correlação entre a maior expressão de p53 no tumor e a presença de acometimento linfonodal, conforme demonstrado no Gráfico 6.

Gráfico 6 - Positividade de p53 no Tumor X acometimento linfonodal

Houve correlação entre a maior expressão de p21^{Waf1/cip1} no tumor e a presença de acometimento linfonodal. Os pacientes que tiveram acometimento linfonodal tiveram maior expressão de p21^{Waf1/cip1}, conforme demonstrado no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Positividade de p21^{Waf1/cip1} no Tumor X acometimento linfonodal

Houve correlação entre a maior expressão de p21^{ras} no tumor e a presença de acometimento linfonodal. Os pacientes com linfonodos acometidos tiveram maior positividade imuno-histoquímica, conforme demonstrado no Gráfico 8.

Gráfico 8 - Positividade de p21^{ras} no Tumor X acometimento linfonodal

Não houve correlação entre a maior expressão de $p16^{\text{Ink4a}}$ e $p27^{\text{Kip1}}$ no tumor com a presença de acometimento linfonodal (Anexos C e E).

4.12 TESTE DE PROPORÇÃO

Houve aumento na expressão de todos os marcadores quando comparamos a mucosa normal com o tumor. Quando comparamos a mucosa normal com a mucosa metaplásica houve aumento da expressão de $p53$, $p21^{\text{Waf1/cip1}}$ e $p27^{\text{kip1}}$ (Gráficos 9, 10 e 11). Não houve diferença estatística na expressão para $p16^{\text{Ink4a}}$ e $p21^{\text{Ras}}$ quando comparada a mucosa normal com a metaplásica, conforme demonstrado nos Gráficos 12 e 13.

Gráfico 9 - Positividade proporcional de $p53$ na mucosa normal, mucosa metaplásica e tumor

Gráfico 10 - Positividade proporcional de p21^{waf1/cip1} na mucosa normal, mucosa metaplásica e tumor

Gráfico 11 - Positividade proporcional de p27^{kip1} na mucosa normal, mucosa metaplásica e tumor

Quando comparamos a mucosa metaplásica com o tumor houve aumento da expressão de p21^{ras}, conforme demonstrado no Gráfico 12.

Gráfico 12 - Positividade proporcional de p21^{ras} na mucosa normal, mucosa metaplásica e tumor

Gráfico 13 - Positividade proporcional de p16^{ink4a} na mucosa normal, mucosa metaplásica e tumor

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

No período de 1971-2004 foram admitidos 1989 pacientes com câncer gástrico no HC/FM-USP, destes 210 (10,5%) tinham AGP. Essa porcentagem é compatível com os achados de vários autores ocidentais porém, muito menor que os dados japoneses que chegam a relatar 48,3% de câncer gástrico precoce (Inoue, 2005).

O método de *Tissue Microarray* (TMA) ou Micromatriz Tecidual é uma coleção organizada de amostras dispostas sob a forma de uma matriz, onde cada amostra é grande suficientemente para ser representativa, e convenientemente pequena para permitir o uso não predatório do material doador. Isso permite aumentar a vida útil dos blocos de biópsia e também diminuir os custos da execução das lâminas, pois permite a utilização racional dos reagentes a serem aplicados na amostra em condições experimentais homogêneas (Moch, 1999).

Foram encontrados na literatura diversos métodos para quantificação da positividade dos marcadores estudados (Liu et al., 2001; Al-Moundhri et al., 2005; Ogino et al., 2006). Em ampla revisão dos estudos com p53 em câncer gástrico Fenoglio-Preiser et al. (2003) enumeraram mais de 40 estudos com as mais variadas técnicas, tipos de anticorpos e critérios de positividade. Alguns autores optam por designar de hiper-expressão valores acima de determinada porcentagem de células positivas e de expressão normal ou ausente quando esse valor não seja ultrapassado, o que constitui, na prática, definir pontos de corte. Outros utilizam análise de intensidade de coloração ou mesmo

estabelecem escore final a partir da positividade e intensidade de imunomarcação (Fenoglio-Preiser et al., 2003). Optamos, por realizar o estudo estatístico sem mesclar diferentes níveis de positividade. As correlações encontradas correspondem exatamente aos graus de positividade dos tecidos quando comparados com os controles (Tabela 1).

A expressão imuno-histoquímica das proteínas reguladoras do ciclo celular $p21^{waf1}$, $p27^{kip1}$, tem sido proposta como instrumento de avaliação prognóstica (Wang et al., 1997; Liu et al., 2001). Liu et al. (2001), sugeriram que a análise combinada da expressão de $p27^{kip1}$, $p21^{waf1}$, e p53 permite avaliar prognóstico em pacientes com câncer gástrico avançado.

Segundo Fearon e Vogelstein (1990), a carcinogênese gastro-intestinal é um processo de múltiplos passos, no qual anormalidades morfológicas são acompanhadas por acúmulo progressivo de alterações genéticas. No caso especial do câncer gástrico, é observada elevada heterogeneidade nos padrões histológicos e nos genótipos celulares (Buonsanti et al., 1997).

Mutações cumulativas na linhagem tumoral permitiriam o surgimento de células capazes de invadir a submucosa. O melhor conhecimento das alterações genéticas envolvidas nesse mecanismo seria útil para determinação do prognóstico do tratamento.

O acúmulo de p53 foi relatado em 60% dos carcinomas do estômago (Fenoglio-Preiser et al., 2003). Todos os pacientes que estudamos tiveram expressão positiva para p53 no tumor, diferentemente do observado por Begnami et al. (2005) que encontrou apenas 30% de positividade em tumores gástricos. Outros autores relatam positividade de p53 em câncer gástrico variando entre 17 e 90% dos tumores. Isso pode ser explicado pelo

critério de positividade diferente adotado, onde tumores com menos de 10% de núcleos marcados são considerados negativos por alguns autores. A maioria entretanto só considera negativos os casos sem expressão do anticorpo. Fenoglio-Preiser et al. (2003), numa revisão ampla da literatura sobre o p53 no câncer gástrico observaram resultados conflitantes por conta de diferenças nos anticorpos utilizados, diferenças nos métodos de preparação dos tecidos e técnicas imuno-histoquímicas, diferenças no estágio evolutivo dos tumores e por fim diferenças nos critérios de positividade adotados.

O p27^{Kip1}, é um inibidor das CDKs da família Cip/Kip e foi o primeiro regulador inibitório do ciclo celular a ser identificado. O aumento da expressão da proteína p27^{Kip1} em células de mamíferos induz a parada do ciclo celular e a apoptose (Wang et al., 1997). A expressão diminuída de p27^{Kip1} foi recentemente relacionada a progresso tumoral e a pior prognóstico em pacientes com diversos tumores, incluindo o câncer gástrico avançado. Kim et al. (2000), encontraram correlação significativa entre redução na expressão de p27^{Kip1} e acometimento linfonodal em tumores avançados. Os mesmos autores observaram expressão de p27^{Kip1} em 87% dos pacientes com câncer gástrico precoce, reduzindo-se para 67% nos adenocarcinomas avançados. Relataram ainda, expressão positiva de p27^{Kip1} de 96% em controles normais, de 86% em gastrite atrófica, de 86% em metaplasia intestinal e de 80% em mucosa transicional. Estudo mostraram que a redução na expressão de p27^{KIP1} e P21^{Waf1} é comum no câncer e estaria associada a pior prognóstico (Esposito et al., 1997; Catzavelos et al., 1997). Parece que a diminuição da expressão de p21^{Waf1}

no câncer gástrico é fator de pior prognóstico e teria correlação significativa com a sobrevida, o tipo histológico, a profundidade de invasão da parede gástrica, a invasão vascular, a invasão vascular linfática e com as metástases linfonodais (Jang et al., 1998). Entretanto, a maioria desses trabalhos refere-se a câncer gástrico avançado. Estudamos pacientes com câncer gástrico precoce, sabidamente com bom prognóstico. Talvez por isso não tenhamos observado a esperada perda na expressão de p27^{kip1}, p21^{waf1} e p16^{ink}. Ao contrário, observamos aumento na expressão dos marcadores relativos a mecanismos de bloqueio do ciclo celular. Noda et al. (2002) relataram que os casos fortemente positivos para p21^{waf1} estão associados a invasão da submucosa e os carcinomas restritos a mucosa não expressaram a proteína fortemente.

Sabe-se que a expressão de p21^{waf1} é estimulada pelo p53 não mutado, mas não pelo p53 alterado (Harper et al., 1993). Quando ocorre perda da função de p53 seria de se esperar redução na expressão de p21^{waf1}, entretanto, outros mecanismos de bloqueio celular não dependentes de p53 podem ativar o p21^{waf1} por vias alternativas ainda desconhecidas o que explicaria a expressão aumentada em alguns tumores precoces.

Foi descrito aumento paradoxal na expressão de p27^{kip1} em vários tumores. Esse aumento pode ser uma manifestação de mecanismos homeostáticos que tentam limitar a proliferação descontrolada das células tumorais (Sgambato et al., 2000). Tumores com elevada expressão de p27^{kip1} teriam ainda mecanismos parcialmente funcionantes de controle da divisão e diferenciação celular.

A relação homem/mulher foi de 1,6 com predomínio do gênero masculino (50 casos), responsável por 61,7% dos casos. Esse predomínio do sexo masculino foi encontrado em estudos semelhantes (Ranaldi et al., 1995; Folli et al., 1995; Jacob et al., 1999; Cesar et al., 2002). Especula-se sobre a influência dos hormônios femininos sobre a carcinogênese gástrica. Foi demonstrada a existência de receptores para estrógenos em câncer gástrico e parece haver influência dos estrógenos na atividade dos oncogenes da família Ras (Wu et al., 1992).

Em nosso estudo houve maior expressão de p21^{Waf1} na mucosa normal de pacientes do sexo feminino ($p=0,04$). Alguns trabalhos (Al-Moundhri et al., 2005; Noda et al., 2002) encontraram maior positividade para p21^{Waf1} em tecido tumoral em pacientes do sexo feminino porém, sem atingir significância estatística. Outros autores que estudaram o câncer gástrico avançado não encontraram relação entre gênero e a positividade dos marcadores (Jang et al., 1998; Xie et al., 2004). É possível que essa diferença esteja relacionada com a menor incidência de câncer gástrico em mulheres porém ainda não são conhecidos os mecanismos envolvidos neste processo.

A maioria dos pacientes do estudo tinha entre 50 e 80 anos semelhante a publicações anteriores (Folli et al., 1995). Foi relatada maior agressividade dos tumores em pacientes jovens com menos de 50 anos (Bedikian et al., 1984). Não observamos nessa casuística diferenças significantes entre os dados clínicos e imuno-histoquímicos nas diferentes faixa etárias, assim como também não encontraram diferença outros autores (Kitamura et al., 1996; Kishimoto et al., 2008).

O AGP tem prognóstico favorável e sobrevida em 5 anos superior a 90%. Como os pacientes tinham doença em fase inicial e foram submetidos a cirurgia radical, somente dois pacientes apresentaram recidiva e vieram a falecer. Houve recidiva pulmonar em um paciente e recidiva pleural em outro. Em ambos os casos não havia acometimento linfonodal, invasão vascular, linfática e peri-tumoral, apesar da evolução desfavorável. Não houve significância estatística entre a imunoexpressão dos marcadores com a recidiva ou mortalidade como observado por outros autores (Ohtani et al., 1999; Liu et al., 2001), talvez pelo reduzido número de pacientes e por se tratarem de tumores precoces.

A maioria dos pacientes era branca (72,2%), seguido dos negros (17,3%), amarelos (8,6%) e pardos com 1,2% dos casos. Um estudo epidemiológico amplo, com mais de 80 mil pacientes americanos do “National Cancer Data Base” dos Estados Unidos, realizado por Al-Refaie et al. (2008) encontrou diferenças importantes entre as características clínicas e evolutivas dos tumores gástricos nas diversas etnias estudadas como, hábitos alimentares, localização tumoral, idade, tipo histológico e estadiamento. Nesse estudo os asiáticos tiveram prognóstico melhor do que os pacientes de outras raças. Os hispânicos tiveram tumores geralmente mais avançados e em idade mais jovem e os brancos tiveram tumores mais proximais e em idade mais avançada. Em análise multi-variada os autores sugerem a presença de diferenças genéticas dentre os diversos fatores envolvidos na origem dos tumores gástricos.

Observamos positividade maior de p21^{ras} na mucosa metaplásica em pacientes de raça amarela, negra e parda. No tumor observamos maior

positividade de p21^{ras} em negros e amarelos porém no paciente de raça parda o tumor perdeu a expressão para p21^{ras}. Encontramos também maior positividade de p16^{ink4a} e p21^{waf1} na mucosa normal dos pacientes amarelos, negros e pardos. Craanem et al. (1995), também encontraram diferenças no espectro de mutações dos oncogenes Ras entre os tumores de pacientes de raça asiática e caucasianos especulando que os resultados conflitantes encontrados na expressão de p21^{ras} ocorram devido a diferenças genéticas entre as populações estudadas.

No presente estudo, não houve relação estatística entre raça, acometimento linfonodal e sobrevida. Os resultados sugerem diferenças genéticas dos tumores entre as raças mas não é possível avaliar o real peso da origem étnica quando comparada a hábitos e costumes regionais que poderiam interferir na carcinogênese gástrica.

Encontramos história familiar de câncer gástrico presente em 12 pacientes (14,8%). O Câncer Gástrico Difuso Hereditário é uma doença de herança autossômica dominante causada por mutações na E-caderina tipo 1 (CDH1). A perda da expressão de CDH1 está relacionada ao desenvolvimento dos tumores difusos do estômago (Guilford, Harraway et al., 1998). A E-caderina normal é uma proteína de adesão celular que age bloqueando a divisão celular quando ocorre contato entre as células. Mutações com perda da função da proteína podem estimular a divisão celular desordenada e foram encontradas em 50% das famílias afetadas (Suriano et al., 2003). A penetrância é alta e 70% dos pacientes desenvolvem câncer gástrico ainda jovens, com idade média de 38 anos, associado ainda a elevado risco de câncer de mama (Caldas et al., 1999).

Há grande dificuldade de seguimento desses pacientes porque os tumores difusos podem avançar pela submucosa o que dificulta o diagnóstico endoscópico precoce. Por conta disso alguns autores preconizaram a gastrectomia total profilática (Suriano et al., 2003; Bacani et al., 2006). Em estudo realizado nos estômagos ressecados em gastrectomias profiláticas de 17 pacientes com mutação de CDH1 confirmada, Lynch et al. (2008) encontraram adenocarcinoma em 76% dos casos.

O presente estudo não objetivou avaliar a expressão de CDH1 mas identificamos 12 casos com história familiar que poderiam ser objeto de estudos futuros. Entre esses pacientes foi encontrada maior hiper-expressão de p16^{ink4a} na mucosa normal dos pacientes com história familiar e mais casos com perda da expressão para p16^{ink4a} na mucosa normal dos pacientes sem história familiar. É possível que esse aumento das proteínas de bloqueio do ciclo celular poderia decorrer de um mecanismo compensatório na tentativa de impedir a divisão celular. Diferentemente dos nossos achados He et al. (2001), encontraram p16^{ink4a} positivo na mucosa normal em 96% dos pacientes com câncer gástrico, embora tenham estudado câncer avançado e independentemente de história familiar.

Observamos mais de 90% de expressão de p27^{kip1} na mucosa metaplásica de ambos os grupos porém, com menor positividade entre os pacientes com história familiar. Encontramos também menor expressão de p21^{ras} na mucosa metaplásica dos pacientes com história familiar de câncer gástrico. Teh e Lee (1993) estudaram a expressão de p21^{ras} em diferentes tecidos do trato gastro-intestinal, incluindo tumores gástricos, sugerindo que a hiper-expressão observada na mucosa metaplásica ocorreria como reflexo

final da diferenciação epitelial.

Estudos sugerem que fatores ambientais são a principal causa de tumores gástricos. O câncer gástrico familiar seria menos comum do que se imagina devido a fatores de interferência como a infecção por *H. pylori* e hábitos alimentares que influenciariam na maior incidência dos tumores em membros de uma mesma família (Hemminki e Jiang, 2002). Estima-se que a real incidência de tumores gástricos relacionados a hereditariedade esteja em torno de 5% (Jemal et al., 2004). Incluem-se nesses 5% os tumores gástricos relacionados a Polipose Adenomatosa Familiar, a Síndrome de Lynch, a Síndrome de Peutz-Jeghers, Síndrome de Cowden, Síndrome de Li-Fraumeni e o Câncer Gástrico Difuso Hereditário (Grady, 2001; Lynch et al., 2005).

Observamos 62,9% tumores do tipo intestinal, 30,9% do tipo difuso e 6,2% do tipo misto. Estudos semelhantes também demonstraram predomínio do tipo intestinal de Laurén no câncer gástrico precoce. Há indícios de que as alterações genéticas e os fatores de risco seriam distintos nos diferentes tipos histológicos (Noda et al., 2001; Mattioli et al., 2007).

Na mucosa normal p21^{ras} foi positivo em 81,1% dos pacientes com tumores do tipo intestinal, seguido por 86,4% do tipo difuso e 100% do tipo misto. Foi relatada expressão aumentada de p21^{ras} na mucosa gástrica metaplásica de pacientes com AGP e observou-se maior expressão de p21^{ras} na mucosa normal de pacientes com AGP do tipo difuso (Czerniak et al., 1989). Outros autores (Ohuchi et al., 1987; Teh e Lee, 1993) encontraram maior expressão de p21^{ras} nos tumores gástricos indiferenciados. O estudo de Teh e Lee (1993) demonstra a presença de

vários tecidos normais com positividade ao p21^{ras} entretanto, o que encontramos foi expressão progressivamente elevada em 3 grupos distintos de pacientes quando comparados ao controle normal. Os resultados sugerem a presença de alterações que estimulariam a expressão de p21^{ras} na mucosa aparentemente normal de pacientes que tiveram tumores mais indiferenciados.

Observamos hiper-expressão de p21^{waf1/cip1} nos tumores do tipo difuso e misto, porém, houve mais casos de perda de expressão de p21^{waf1} no tipo difuso. Os resultados foram diferentes de outros autores que estudaram a expressão de p21^{waf1/cip1} em tumores gástricos precoces e que não encontraram diferença na expressão de p21^{waf1/cip1} nos diferentes tipos histológicos (Yasui et al., 1996; Craanen et al., 1999). É possível que isso tenha ocorrido por diferenças no critério de positividade adotados.

Houve forte positividade de p27^{kip1} em todos os tumores avaliados e maior positividade no casos do tipo difuso. Kim et al. (2006) encontraram maior expressão de p27^{kip1} nos tumores precoces do tipo difuso de Laurén. Contrariamente, estudando tumores gástricos avançados Bu et al. (2001) encontraram perda de expressão de p27^{kip1} em tumores do tipo difuso. So et al. (1999) relatam p27^{kip1} negativo em 44% dos tumores precoces e em 89% dos tumores avançados porém não houve diferença entre os tipos histológicos.

Encontramos 42% pacientes com invasão da camada submucosa tipo Sm1 e 58% com invasão Sm2. Dentre os marcadores estudados a análise estatística mostrou maior positividade na expressão de p27^{Kip1} na mucosa normal adjacente dos tumores Sm1. Embora nos casos Sm2 a mucosa normal tenha expressado p27^{Kip1}, houve menor número de células positivas.

Quando analisamos a mucosa normal, metaplásica e o tumor encontramos aumento progressivo na expressão de p27^{Kip1}. Ichinoe et al. (2003), comparando tumores gástricos precoces intra-mucosos e tumores que invadem a submucosa encontraram aumento progressivo da expressão de p21^{Waf1} conforme os tumores se aprofundam na submucosa.

Houve invasão perineural em 6,17% e invasão vascular sanguínea em 4,9% dos casos. A análise estatística demonstrou relação entre a hiper-expressão de p16^{Ink4a} na mucosa normal e a invasão perineural no tumor. Observamos também correlação entre a expressão de p16^{Ink4a} na mucosa normal com a invasão vascular sanguínea. Não encontramos relato de achados semelhante na literatura.

Houve invasão vascular linfática em 19,7% dos casos mas não encontramos relação estatisticamente significativa entre esse achado e a expressão imuno-histoquímica dos marcadores (Anexos A, B, C, D e E).

Dos 81 casos avaliados, 19 pacientes (23,4%) apresentaram linfonodos acometidos pelo adenocarcinoma. Destes, 4 (21%) apresentavam invasão submucosa Sm2 e 15 (78,9%) apresentavam invasão tipo Sm1. Talvez esse número maior de metástases linfonodais tenha ocorrido porque a maioria de nossos casos apresentaram invasão do tipo Sm2 em concordância com os achados de outros autores (Kurihara et al., 1998; Gotoda et al., 2001).

Observamos correlação estatística significante entre acometimento linfonodal e maior positividade de p53, p21^{ras} e p21^{Waf1} nas lâminas dos tumores. Não houve correlação entre a maior expressão de p16^{Ink4a} e p27^{Kip1} no tumor e a presença de acometimento linfonodal.

Quando p21^{ras} apresentou maior positividade o acometimento

linfonodal foi mais freqüente ($p=0,023$). Os pacientes com $p21^{ras}$ negativo no tumor não apresentaram metástases linfonodais. Kim et al. (2000), encontraram tendência de maior positividade de $p21^{ras}$ em pacientes com metástases linfonodais em câncer gástrico avançado mas, em seu estudo não foi atingida significância estatística. Há pouca literatura sobre a expressão de $p21^{ras}$ no câncer gástrico precoce (Czerniak et al., 1989). A maioria dos autores estudou o câncer avançado. A correlação entre acometimento linfonodal e hiper-expressão de $p21^{ras}$ pode ser útil na escolha das alternativas terapêuticas minimamente invasivas para os pacientes $p21^{ras}$ negativos no tumor. A positividade do $p21^{ras}$ não é exclusiva dos tecidos tumorais, foi descrita positividade em tecidos não neoplásicos e normais (Chesa et al., 1987). A expressão de $p21^{ras}$ está geralmente aumentada nos adenocarcinomas de estômago e teria relação com pior prognóstico (Fujita et al., 1987; Kim et al., 1993). Foi proposto que o aumento da expressão de $p21^{ras}$ é evento precoce na carcinogênese gástrica ocorrendo já nos tumores precoces do estômago (Czerniak et al. 1989).

Houve aumento significativo do acometimento linfonodal nos casos com maior positividade para p53 no tumor ($p=0,042$). Nenhum paciente com menos de 10% de núcleos marcados para p53 no tumor apresentou metástase linfonodal. Foi relatado valor prognóstico na expressão de p53 em câncer gástrico (Liu et al., 2001). A hiper-expressão de p53 tem sido relacionada a profundidade de invasão tumoral na parede gástrica, invasão vascular e acometimento linfonodal (Ichiyoshi et al., 1997; Al-Moundhri et al., 2005).

Acometimento linfonodal também relacionou-se estatisticamente com a

positividade das células tumorais ao p21^{waf1}. Nenhum dos pacientes com p21^{waf1} negativo no tumor apresentou metástase linfonodal e houve maior frequência de acometimento linfonodal nos pacientes com maior positividade de p21^{waf1}. Yasui et al. (1996), relataram maior incidência de acometimento linfonodal em pacientes com forte expressão de p21^{waf1} do que nos pacientes de pouca ou nenhuma expressão do marcador. Nessa publicação a imunoexpressão de p21^{waf1} foi positiva em 70% dos tumores e os autores relacionaram a maior expressão de p21^{waf1} no tumor com maior grau de invasão da submucosa. Noda et al. (2002) estudaram pacientes com câncer gástrico precoce que invade a submucosa e encontraram 65,4% de positividade para p21^{waf1}. No mesmo estudo encontrou-se maior incidência de acometimento linfonodal nos pacientes com elevada atividade proliferativa e perda de expressão do p21^{waf1} nos tumores. Parece existir correlação entre a perda de expressão do p21^{waf1} com a taxa de recidivas e mortalidade no câncer gástrico, sugerindo-se que a expressão do p21^{waf1} tem valor prognóstico (Jang et al. 1998). A perda da atividade do p21^{waf1} está relacionada a progressão do câncer para formas mais avançadas e existe relação entre a profundidade da invasão tumoral e a presença de metástases linfonodais com a perda da expressão do gene (Park et al., 1998)

Não encontramos correlação entre a expressão de p27^{Kip1} no tumor e a presença de acometimento linfonodal. Outros autores relataram que a perda de expressão de p27^{Kip1} está relacionada a presença de metástases linfonodais porém, foram todos estudos com câncer avançado (Kim et al., 2000; Nitti et al., 2002). A diminuição da expressão do p27^{Kip1} estaria

associada a um pior prognóstico e a maior chance de metástases linfonodais. (Bu e Han 2001; Nitti et al., 2002). Além de atuar no bloqueio da divisão celular o p27^{kip1} está envolvido em diversos mecanismos celulares como apoptose e diferenciação celular. A expressão aumentada de p27^{kip1} em células normais induz a diferenciação celular. A perda de expressão nos tumores levaria a perda da capacidade de diferenciação celular e predisporia a tumores com fenótipo indiferenciado (Sgambato et al., 2000; Han et al., 1999).

Não houve correlação estatística entre a presença de acometimento linfonodal e expressão imuno-histoquímica de p16^{ink4a} assim como relatado por alguns autores (Kishimoto e Mitomi, 2008; Matioli et al., 2007) e diferentemente do relatado por outros autores que descrevem relação entre a perda de expressão com linfonodos acometidos (He et al., 2001). Embora a expressão de p16^{ink4a} esteja alterada nos tumores gástricos isto parece ser secundário a mutações de p53. Raramente a mutação primária ocorre na proteína codificadora do p16^{ink4a} (Iigaki et al., 1995). Na mucosa normal a expressão de p16^{ink4a} foi relatada como baixa. Nos tumores gástricos a expressão aumentaria tanto no tipo intestinal como no tipo difuso, porém nos tumores muito indiferenciados pode ocorrer perda da expressão o que pode refletir um fenótipo mais agressivo (Rocco 2002, Tsujie et al., 2000). Os mesmos autores correlacionaram a expressão do p16^{ink4a} com os dados clínicos e não encontraram diferença significativa na sobrevida dos pacientes. He et al. (2001) encontrou diminuição na expressão de p16^{ink4a} da mucosa metaplásica para o tumor sugerindo que a perda da expressão de p16^{ink4a} é um passo necessário na carcinogênese gástrica. O mesmo autor

notou aumento da expressão de p16^{ink4a} da mucosa normal para mucosa displásica e tumoral. Yu et al. (2006), observaram positividade de p16^{ink4a} na mucosa normal de 15% e de p53 de 19%. No tumor a positividade foi de 50% e 53% respectivamente, demonstrando um aumento na expressão de p16^{ink4a} e p53 nos tumores quando comparados a mucosa normal.

Ao estudar os marcadores na mucosa normal, mucosa metaplásica e tumor, imaginávamos que haveria queda na positividade de p21^{waf1}, p27^{kip1} e p16^{ink4a} porém houve aumento de todos os marcadores. Especulamos que nessa fase precoce da evolução do tumor, esses mecanismos de bloqueio do ciclo celular ainda estejam funcionantes e, eventualmente, hiper-expressos na tentativa de impedir a proliferação celular. O aumento progressivo da positividade dos marcadores das proteínas de bloqueio do ciclo celular na mucosa normal, na metaplásica e no tumor no teste de proporção ocorreu simultaneamente ao aumento da expressão da proteína p21^{ras}, que atua estimulando a divisão celular e o p53 que reflete a perda da principal via de bloqueio da divisão.

A interpretação dos achados deve levar em conta também a heterogeneidade das mutações genéticas no câncer. Dos marcadores que estudamos o p53 é o mais freqüentemente atingido por mutações (Hollstein et al., 1993). A proteína p53 normal é pouco estável e tem meia vida muito curta. Aproximadamente 5 a 20 min. Genes mutantes codificam para proteínas mutadas que são mais estáveis e se acumulam no núcleo celular permitindo sua detecção por imuno-histoquímica. Portanto, a presença de acúmulo de p53 detectada por imuno-histoquímica é freqüentemente indicativa de mutação no gene p53 (Giaccia e Kastan, 1998). Desse modo, quando olhamos para

um tumor com alta expressão de p53 estamos observando quase diretamente o efeito da mutação.

O p21^{ras} sofre mutações diretamente em torno de 15% dos tumores e especificamente no câncer gástrico a mutação direta do p21^{ras} é pouco freqüente (Bos, 1989). Apesar disso níveis elevados de p21^{ras} são encontrados em até 50% dos tumores gástricos sugerindo que em muitos casos a expressão aumentada é consequência indireta de mutações em outros genes que estimulam a atividade Ras (Kim et al., 2000).

O gene p16 também sofre mutação direta que leva a inativação da produção de proteína p16^{ink4a} mas, no câncer gástrico parece ser rara a mutação do gene p16 e a queda na expressão da proteína observada nos tumores gástricos seria secundária a outros mecanismos ainda desconhecidos (He et al., 2001).

Mutações diretas nos genes p27^{kip1} e p21^{waf1} são muito raras (Xie et al. 2004). O aumento de expressão observado nos tumores precoces é possivelmente, a consequência indireta de mutações ainda desconhecidas no mecanismo de controle da divisão celular. Dependendo da fase da carcinogênese em que se encontra o tumor é possível observar momentos de hiper-expressão ou perda de expressão pois essas proteínas na verdade refletem a ação dos mecanismos homeostáticos compensatórios que tentam corrigir falhas em outros genes.

Observamos um aumento progressivo da expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular desde a mucosa normal até o tumor. Esse aumento se correlacionou com eventos que sugerem a progressão do tumor como, penetração na submucosa, invasão vascular sanguínea, invasão

perineural e acometimento linfonodal. Como estudamos tumores precoces devidamente submetidos a cirurgia radical não houve significância entre os achados imuno-histoquímicos e a sobrevida. Estudos prospectivos e com controles em pessoas sem câncer ou história familiar de neoplasias, incluindo tecidos normais em pacientes sem gastrite ou infecção por *H. pylori*, são necessários para confirmar e entender melhor o significado dos achados.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

A análise das características clínicas e a imunoexpressão de p53, p21^{ras}, p27^{kip1}, p21^{waf1} e p16^{ink4a} nos pacientes com adenocarcinoma gástrico precoce que invade a submucosa permite as seguintes conclusões:

- ocorre aumento da expressão imuno-histoquímica de p53, p21^{ras}, p27^{kip1}, p21^{waf1/cip1} e p16^{ink4a} quando comparadas a mucosa normal com os tumores;
- há relação entre maior expressão das proteínas p21^{ras}, p53 e p21^{waf1/cip1} nos tumores e a presença de metástases linfodais;
- não há relação entre a expressão no tumor de p27^{kip1} e p16^{ink4a} com a presença de metástases linfonodais;
- pacientes com história familiar de câncer gástrico apresentam maior positividade de p16^{ink4a} na mucosa normal, menor positividade de p21^{waf1/cip1} e p21^{ras} na mucosa metaplásica;
- pacientes do sexo feminino com adenocarcinoma gástrico apresentam maior expressão na mucosa normal de p21^{waf1};
- pacientes com tumores com padrão de infiltração tipo Sm1 apresentam maior positividade de p21^{waf1/cip1};
- hiper-expressão na mucosa normal de pacientes com adenocarcinoma gástrico de p16^{ink4a} relacionou-se a infiltração perineural e vascular nos tumores;
- há diferenças na expressão imuno-histoquímica dos marcadores entre as raças estudadas;

- há diferenças na expressão imuno-histoquímica entre os tipos histológicos de Laurén;
- a expressão dos marcadores não se revelou útil para avaliação do prognóstico dos pacientes operados.

7 Anexos

Anexo A - Positividade de p53 e dados clínico-patológicos

p53		Mucosa Normal						Mucosa Metaplásica						Tumor					
positividade		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)	
Idade: < 50a		2 (18,2%)	6 (54,5%)	2 (18,2%)	1 (9,1%)	0	n=66	2 (25%)	1 (12,5%)	3 (27,2%)	2 (25%)	0	n=58	0	2 (22,2%)	1 (11,1%)	2 (22,2%)	4 (44,4%)	n=62
>50a		20 (36,4%)	25 (45,5%)	8 (14,5%)	2 (3,6%)	0	p=0,62	5 (10,6%)	26 (55,3%)	13 (27,7%)	2 (4,3%)	1 (2,1%)	p=0,08	0	6 (11,3%)	15 (28,3%)	20 (37,7%)	12 (22,6%)	p=0,317
Sexo: Masculino		14 (34,1%)	19 (46,3%)	6 (14,6%)	2 (4,8%)	0	n=66	4 (12,1%)	17 (51,5%)	10 (30,3%)	1 (3%)	1 (3%)	n=55	0	6 (16,2%)	9 (24,3%)	14 (37,8%)	8 (21,6%)	n=62
Feminino		8 (32%)	12 (48%)	4 (16%)	1 (4%)	0	p=0,9	3 (13,6%)	10 (45,4%)	6 (27,2%)	3 (13,6%)	0	p=0,57	0	2 (8%)	7 (28%)	8 (32%)	8 (32%)	p=0,6
Raça: Branca		19 (39,6%)	21 (43,8%)	6 (12,5%)	2 (4,2%)	0		6 (15,4%)	17 (43,6%)	12 (30,8%)	3 (7,7%)	1 (2,6%)		0	8 (17,4%)	13 (28,3%)	15 (32,6%)	10 (21,7%)	
Negra		3 (30%)	2 (20,%)	4 (40%)	1 (10%)	0	n=66	1 (11,1%)	5 (55,6%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	0	n=55	0	0	1 (11,1%)	4 (44,4%)	4 (44,4%)	n=62
Amarela		0	7 (100,0%)	0	0	0	p=0,06	0	5 (83,3%)	1 (16,7%)	0	0	p=0,8	0	0	2 (33,3%)	3 (50%)	1 (16,7%)	p=0,4
Parda		0	1 (100,0%)	0	0	0		0	0	1 (100%)	0	0		0	0	0	0	1 (100%)	
História familiar Sim		2 (25%)	5 (62,5%)	1 (12,5%)	0	0	n=66	2 (20%)	6 (60%)	2 (20%)	0	0	n=55	0	3 (27,3%)	3 (27,3%)	1 (9,1%)	4 (36,4%)	n=62
câncer gástrico Não		20 (34,5%)	26 (44,8%)	9 (15,5%)	3 (5,2%)	0	p=0,77	5 (11,1%)	21 (46,7%)	14 (31,1%)	4 (8,9%)	1 (2,2%)	p=0,6	0	5 (9,8%)	13 (25,5%)	21 (41,2%)	12 (23,5%)	p=0,14
Tipo Histológico(Lauren):																			
Intestinal		15 (40,5%)	16 (43,2%)	5 (13,5%)	1 (2,7%)	0	n=66	3 (9,7%)	13 (41,9%)	12 (38,7%)	3 (9,7%)	0	n=55	0	3 (9,1%)	12 (36,4%)	10 (30,3%)	8 (24,2%)	n=62
Difuso		5 (23,8%)	11 (52,4%)	4 (19%)	1 (4,8%)	0	p=0,77	3 (20%)	9 (60%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)	p=0,35	0	3 (15,8%)	2 (10,5%)	9 (47,4%)	5 (26,3%)	p=0,5
Misto		2 (25%)	4 (50%)	1 (12,5%)	1 (12,5%)	0		1 (11,1%)	5 (55,6%)	3 (33,3%)	0	0		0	2 (20%)	2 (20%)	3 (30%)	3 (30%)	
Subtipo Sm1		9 (42,9%)	10 (47,6%)	2 (9,5%)	0	0	n=58	3 (18,8%)	8 (50%)	4 (25%)	1 (6,3%)	0	n=48	0	2 (15,4%)	5 (38,5%)	4 (32,1%)	2 (15,4%)	n=53
de Invasão Sm2		11 (29,7%)	20 (54,1%)	4 (10,8%)	2 (5,4%)	0	p=0,58	3 (9,4%)	18 (56,3%)	8 (25%)	3 (9,4%)	0	p=0,8	0	6 (15%)	10 (25%)	13 (32,5%)	11 (27,5%)	p=0,7
Acometimento Sim		5 (33,3%)	6 (40%)	3 (20%)	1(6,7%)	0	n=66	2 (16,7%)	6 (50%)	3 (25%)	1 (8,3%)	0	n=55	0	0	5 (29,4%)	4 (23,5%)	8 (47,1%)	n=62
Linfonodal Não		17 (33,3%)	27 (49,0%)	7 (13,7%)	2 (3,9%)	0	p=0,8	5 (11,6%)	21 (48,8%)	13 (30,2%)	3 (7%)	1 (2,3%)	p=0,9	0	8 (17,8%)	11 (24,4%)	18 (40,0%)	8 (17,8%)	p=0,042
Invasão Sim		0	2 (100%)	0	0	0	n=66	0	4 (100%)	0	0	0	n=55	0	8 (12,9%)	16 (25,8%)	22 (35,5%)	16 (25,8%)	n=62
Vascular Não		22 (34,4%)	29 (45,3%)	10 (15,6%)	3 (4,7%)	0	p=0,5	7 (13,7%)	23 (45,1%)	16 (31,4%)	4 (7,8%)	1 (2%)	p=0,3	0	8 (13,6%)	16 (27,1%)	19 (32,2%)	16 (27,1%)	p=0,1
Invasão Sim		1 (20%)	3 (60%)	0	1 (20%)	0	n=66	0	4 (80%)	1 (20%)	0	0	n=55	0	0	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)	n=62
Perineural Não		21 (34,4%)	28 (45,9%)	9 (14,8%)	3 (4,9%)	0	p=0,8	7 (14%)	23 (46%)	15 (30%)	4 (8%)	1 (2%)	p=0,6	0	8 (14%)	15 (26,3%)	19 (33,3%)	15 (26,3%)	p=0,6
Invasão Sim		4 (44,4%)	4 (44,4%)	0	1 (11,1%)	0	n=66	1 (8,3%)	6 (50%)	4 (33,3%)	1 (8,3%)	0	n=55	0	2 (15,4%)	4 (30,8%)	5 (38,5%)	2 (15,4%)	n=62
Linfática Não		18 (31,6%)	27 (47,4%)	10 (17,5%)	2 (3,5%)	0	p=0,39	6 (14,0%)	21 (48,8%)	12 (27,9%)	3 (7,0%)	1 (2,3%)	p=0,9	0	6 (12,2%)	12 (24,5%)	17 (34,7%)	14 (28,6%)	p=0,8

Anexo B - Positividade de p27^{ras} e dados clínico-patológicos

P21 ^{ras}		Mucosa Normal						Mucosa Metaplásica						Tumor					
positividade		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)	
Idade: < 50a		0	11 (100%)	0	0	0	n=62	2 (22,2%)	6 (66,7%)	1 (11,1%)	0	0	n=57	1 (11,1%)	3 (33,3%)	3 (33,3%)	2 (22,2%)	0	n=63
>50a		10 (17,5%)	40 (70,2%)	7 (12,3%)	0	0	p=0,11	6 (12,5%)	40 (83,3%)	2 (4,2%)	0	0	p=0,48	1 (1,9%)	20 (37%)	29 (53,7%)	4 (7,4%)	0	p=21
Sexo: Masculino		33 (78,6%)	6 (14,3%)	3 (7,1%)	0	0	n=68	3 (8,6%)	30 (85,7%)	2 (5,7%)	0	0	n=57	2 (5,1%)	12 (30,8%)	20 (51,3%)	5 (12,8%)	0	n=63
Feminino		6 (23,1%)	19 (73,1%)	1 (3,8%)	0	0	p=0,15	5 (22,7%)	16 (72,7%)	1 (4,5%)	0	0	p=0,3	0	11 (45,8%)	12 (50%)	1 (4,2%)	0	p=0,3
Raça: Branca		6 (12%)	38 (76%)	6 (12%)	0	0		6 (15%)	33 (82,5%)	1 (2,5%)	0	0		1 (2,2%)	20 (43,5%)	21 (45,7%)	4 (8,7%)	0	
Negra		4 (40%)	5 (50%)	1 (10%)	0	0	n=68	1 (11,1%)	8 (88,9%)	0	0	0	n=57	0	1 (10%)	8 (80%)	1 (10%)	0	n=63
Amarela		0	7 (100%)	0	0	0	p=0,22	1 (14,3%)	5 (71,4%)	1 (14,3%)	0	0	p=0,002	0	2 (33,3%)	3 (50%)	1 (16,7%)	0	p<0,001
Parda		0	1 (100%)	0	0	0		0	0	0	1 (100%)	0		1 (100%)	0	0	0	0	
História familiar Sim		1 (11,1%)	7 (77,8%)	1 (11,1%)	0	0	n=68	4 (40%)	6 (60%)	0	0	0	n=57	0	7 (58,3%)	4 (33,3%)	1 (8,3%)	0	n=63
câncer gástrico Não		9 (15,3%)	44 (74,6%)	6 (10,2%)	0	0	p=0,9	4 (8,5%)	40 (85,1%)	3 (6,4%)	0	0	p=0,029	2 (3,9%)	16 (31,4%)	28 (54,9%)	5 (9,8%)	0	p=0,3
Tipo Histológico(Laurén):																			
Intestinal		7 (18,9%)	23 (62,2%)	7 (18,9%)	0	0	n=68	3 (9,5%)	27 (84,4%)	2 (6,3%)	0	0	n=57	1 (3,1%)	10 (15,9%)	19 (59,4%)	2 (6,3%)	0	n=63
Difuso		3 (13,6%)	19 (86,4%)	0	0	0	p=0,048	2 (12,5%)	14 (87,5%)	0	0	0	p=0,26	1 (4,8%)	8 (38,1%)	8 (31,2%)	4 (19%)	0	p=0,4
Misto		0	9 (100%)	0	0	0		3 (33,3%)	5 (55,6%)	1 (11,1%)	0	0		0	5 (50%)	5 (50%)	0	0	
Subtipo Sm1		4 (19%)	15 (71,4%)	2 (9,5%)	0	0	n=59	4 (25%)	11 (68,8%)	1 (6,3%)	0	0	n=50	0	4 (28,6%)	7 (50%)	3 (21,4%)	0	n=55
de Invasão Sm2		4 (10,5%)	30 (78,9%)	4 (10,5%)	0	0	p=0,65	4 (11,8%)	29 (85,3%)	1 (2,9%)	0	0	p=0,39	1 (2,4%)	15 (36,6%)	22 (53,7%)	3 (7,3%)	0	p=0,4
Acometimento Sim		3 (18,8%)	12 (75%)	1 (6,3%)	0	0	n=68	1 (9,1%)	10 (90,9%)	0	0	0	n=57	0	2 (11,8)	14 (82,4%)	1 (5,9%)	0	n=63
Linfonodal Não		7 (13,5%)	39 (85,7%)	6 (11,5%)	0	0	p=0,7	7 (15,2%)	36 (78,3%)	3 (5,6%)	0	0	p=0,5	2 (4,3)	21 (45,7%)	18 (39,1%)	5 (10,9%)	0	p=0,023
Invasão Sim		1 (50%)	1 (50%)	0	0	0	n=68	1 (25%)	3 (75%)	0	0	0	n=57	0	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)	0	n=63
Vascular Não		9 (13,6%)	50 (75,8%)	7 (10,6%)	0	0	p=0,3	7 (13,2%)	43 (81,1%)	3 (5,7%)	0	0	p=0,7	2 (3,4%)	21 (35,6%)	31 (52,5%)	5 (8,5%)	0	p=0,5
Invasão Sim		1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)	0	0	n=68	2 (40%)	3 (60%)	0	0	0	n=57	0	3 (60%)	2 (40%)	0	0	n=63
Perineural Não		9 (14,3%)	48 (76,2%)	6 (9,5%)	0	0	p=0,68	6 (11,5%)	43 (82,7%)	3 (5,8%)	0	0	p=0,2	2 (3,4%)	20 (34,5%)	30 (51,7%)	6 (10,3%)	0	p=0,6
Invasão Sim		3 (30%)	7 (70%)	0	0	0	n=68	3 (27,3%)	8 (72,7%)	0	0	0	n=57	0	6 (50%)	5 (41,7%)	1 (8,3%)	0	n=63
Linfática Não		7 (12,1%)	44 (75,9%)	7 (12,1%)	0	0	p=0,28	5 (10,9%)	38 (82,6%)	3 (6,5%)	0	0	p=0,2	2 (3,9%)	17 (33,3%)	27 (52,9%)	5 (9,8%)	0	p=0,6

Anexo C - Positividade de p27^{kip1} e dados clínico-patológicos

p27 ^{kip1}		Mucosa Normal						Mucosa Metaplásica						Tumor					
Positividade		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)	
Idade: < 50a		8 (72,7%)	1 (9,1%)	2 (18,1%)	0	0	n=66	0	2 (22,2%)	5 (55,6%)	2 (22,2%)	0	n=57	0	2 (20%)	3 (30%)	3 (30%)	2 (20%)	n=64
>50a		18 (32,7%)	24 (43,6%)	10 (18,2%)	2(3,6%)	1(1,8%)	p=0,12	3 (6,3%)	9 (18,8%)	22 (45,8%)	11 (22,9%)	3 (6,3%)	p=0,85	3 (5,6%)	5 (9,3%)	17 (31,5%)	22 (40,7%)	7 (13%)	p=0,736
Sexo: Masculino		15 (36,6%)	19 (46,3%)	6 (14,6%)	1(2,4%)	0	n=66	2 (5,7%)	5 (14,3%)	19 (54,3%)	6 (17,1%)	3 (8,6%)	n=57	3 (7,5%)	5 (12,5%)	9 (51,3%)	17 (42,5%)	6 (15%)	n=64
Feminino		11 (44%)	6 (24%)	6 (24%)	1(4%)	1 (4%)	p=0,31	1 (4,5%)	6 (27,3%)	8 (36,4%)	7 (31,8%)	0	p=0,25	0	2 (8,3%)	11 (45,8%)	8 (33,3)	3 (12,5)	p=0,2
Raça: Branca		18 (38,1%)	19 (40,4%)	8 (17%)	1 (2,1%)	1(2,1%)		3 (7,5%)	8 (20%)	20 (50%)	6 (15%)	3 (7,5%)		2 (4,3%)	3 (6,5%)	18 (39,1%)	19 (41,3%)	4 (8,7%)	
Negra		4 (50%)	5 (33,3%)	1 (16,7%)	0	0	n=68	0	1 (11,1%)	3 (33,3%)	5 (55,6%)	0	n=57	1 (9,1%)	2 (18,2%)	0	3 (27,3%)	5 (45,5%)	n=64
Amarela		2 (28,6%)	2 (28,6%)	2 (28,6%)	1 (14,3)	0	p=0,7	0	2 (28,6%)	3 (42,9%)	2 (28,6%)	0	p=0,6	0	2 (33,3%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)	0	p=0,054
Parda		perda	-	-	-	-		0	0	1 (100%)	0	0		0	0	0	1 (100%)	0	
História familiar Sim		3 (33,3%)	2 (22,2%)	4 (44,4%)	0	0	n=66	1 (10%)	5 (50%)	4 (40%)	0	0	n=57	1 (10%)	1 (10%)	5 (50%)	3 (30%)	0	n=64
câncer gástrico Não		23 (40,4%)	23 (40,4%)	8 (14%)	2 (3,5%)	1 (1,8)	p=0,26	2 (4,3%)	6 (12,8%)	23 (48,9%)	13 (27,7)	3 (6,4%)	p=0,04	2 (3,7%)	6 (11,1%)	15 (27,8%)	22 (34,4%)	9 (16,7%)	p=0,41
Tipo Histológico(Laurén):																			
Intestinal		13 (37,1%)	14 (40%)	7 (20%)	1 (2,9%)	0	n=68	1 (3,1%)	6 (18,8%)	14 (43,8%)	9 (28,1%)	2 (6,3%)	n=57	3 (8,8%)	3 (8,8%)	11 (32,4%)	15 (44,1%)	2 (5,9%)	n=64
Difuso		10 (45,5%)	8 (36,4%)	4 (18,2%)	0	0	p=0,28	0	4 (25%)	9 (56,3%)	2 (12,5%)	1 (6,3%)	p=0,3	0	4 (19%)	3 (14,3%)	8 (38,1%)	6 (28,6%)	p=0,038
Misto		3 (33,3%)	3 (33,%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)		2 (22,2%)	1 (11,1%)	4 (44,4%)	2 (22,2%)	0		0	0	6 (66,7%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	
Subtipo Sm1		8 (40%)	3 (15%)	6 (30%)	2 (10%)	1 (5%)	n=58	1 (5,9%)	0	8 (64,7%)	5 (29,4%)	0	n=51	0	3 (21,4)	5 (35,7%)	6 (42,9%)	0	n=55
de Invasão Sm2		15 (39,5%)	19 (50%)	4 (10,5%)	0	0	p=0,012	2 (5,9%)	10 (29,4%)	14 (41,2%)	7 (20,6%)	1 (2,9%)	p=0,12	3 (7,3%)	4 (9,8%)	15 (36,6%)	13 (31,7%)	6 (14,6)	p=0,33
Acometimento Sim		6 (37,5%)	5 (31,3%)	6 (33,1%)	0	0	n=66	0	3 (27,3%)	4 (36,4%)	4 (36,4%)	0	n=57	1 (5,9%)	1 (5,9%)	4 (23,5%)	7 (41,2%)	4 (23,5%)	n=64
Linfonodal Não		20 (40%)	20 (40%)	7 (14%)	2 (4%)	1 (2%)	p=0,5	3 (6,5%)	8 (17,4%)	23 (50%)	9 (19,6%)	3 (6,5%)	p=0,5	2 (4,3%)	6 (12,8%)	16 (34%)	18 (38,3%)	5 (10,6%)	p=0,63
Invasão Sim		1 (50%)	0	1 (50%)	0	0	n=66	0	1 (25%)	3 (75%)	0	0	n=57	1 (25%)	0	0	3 (75%)	0	n=64
Vascular Não		25 (39,1%)	25 (39,1%)	11 (17,2%)	2 (3,1%)	1 (1,6%)	p=0,72	3 (5,7%)	10 (18,9%)	24 (45,3%)	13 (24,5%)	3 (5,7%)	p=0,6	2 (3,3%)	7 (11,7%)	20 (33,3%)	22 (36,7%)	9 (15%)	p=0,1
Invasão Sim		2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)	0	0	n=66	0	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)	0	n=57	0	1 (20%)	0	3 (60%)	1 (20%)	n=64
Perineural Não		24 (39,3%)	23 (37,7%)	11 (18%)	2 (3,3%)	1 (1,6%)	p=0,9	3 (5,8%)	9 (17,3%)	26 (50%)	11 (21,1%)	3 (5,8%)	p=0,4	3 (5,1%)	6 (10,2%)	20 (33,9%)	22 (37,3%)	8 (13,6%)	p=0,5
Invasão Sim		3 (30%)	5 (50%)	2 (20%)	0	0	n=66	1 (10%)	4 (40%)	2 (20%)	2 (20%)	1 (10%)	n=57	0	1 (7,7%)	5 (38,5%)	6 (46,2%)	1 (7,7%)	n=64
Linfática Não		23 (41,1%)	20 (35,7%)	10 (17,9%)	2 (3,6%)	1 (1,8%)	p=0,86	2 (4,3%)	7 (14,9%)	25 (53,2%)	11 (23,4%)	2 (4,3%)	p=0,22	3 (5,9%)	6 (11,8%)	15 (29,4%)	19 (37,3%)	8 (15,7%)	p=0,7

Anexo D - Positividade de p27^{kip1} e dados clínico-patológicos

P21 ^{wait/cip1}		Mucosa Normal						Mucosa Metaplásica						Tumor					
positividade		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)	n/p	0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)	n/p	0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)	n/p
Idade: < 50a		5 (45,5%)	4 (36,4%)	2 (18,2%)	0	0	n=68	2 (25%)	0	4 (50,2%)	1 (12,5%)	1 (12,5%)	n=55	1 (11,1%)	2 (22,2%)	4 (44,4%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	n=63
>50a		41 (71,9%)	12 (21,1%)	4 (7%)	0	0	p=0,2	13 (27,7%)	10 (21,3%)	10 (21,3%)	9 (19,1%)	5 (10,6%)	p=0,39	17 (31,5%)	18 (33,3%)	15 (27,8%)	4 (7,4%)	0	p=0,82
Sexo: Masculino		33 (78,6%)	6 (14,3%)	3 (7,1%)	0	0	n=68	8 (24%)	6 (18%)	6 (18%)	8 (24%)	5 (15%)	n=55	13 (33%)	13 (33%)	11 (28%)	1 (3%)	1 (3%)	n=63
Feminino		13 (50%)	10 (38,5%)	3 (11,5%)	0	0	p=0,043	7 (32%)	4 (18%)	8 (36%)	2 (9%)	1 (4,5%)	p=0,28	5 (21%)	7 (29%)	8 (33%)	4 (17%)	0	p=0,2
Raça: Branca		37 (74%)	9 (18%)	4 (8%)	0	0		11 (29%)	8 (21%)	9 (24%)	6 (16%)	4 (10%)		14 (31%)	17 (38%)	12 (27%)	2 (4%)	0	
Negra		6 (60%)	4 (40%)	0	0	0	n=68	1 (11%)	1 (11%)	2 (14%)	3 (33%)	2 (22%)	n=55	2 (18%)	2 (18%)	4 (36%)	2 (18%)	1 (9%)	n=63
Amarela		3 (42,9%)	3 (42,9%)	1 (14,3%)	0	0	p=0,017	3 (43%)	1 (14%)	2 (29%)	1 (14%)	0	p=0,7	2 (33%)	1 (17%)	2 (33,3%)	1 (17%)	0	p=0,4
Parda		0	0	1 (100%)	0	0		0	0	1 (100%)	0	0		0	0	1 (100%)	0	0	
História familiar Sim		5 (56%)	3 (33%)	1 (11%)	0	0	n=68	5 (56%)	2 (22%)	1 (11%)	0	1 (11%)	n=55	4 (36%)	5 (46%)	2 (18%)	0	0	n=63
câncer gástrico Não		41 (69%)	13 (22%)	5 (9%)	0	0	p=0,7	10 (22%)	8 (17%)	13 (28%)	10 (22%)	5 (11%)	p=0,19	14 (27%)	15 (29%)	17 (32%)	5 (9%)	1 (2%)	p=0,5
Tipo Histológico(Laurén):																			
Intestinal		28 (76%)	6 (16%)	3 (8%)	0	0	n=68	9 (28%)	6 (19%)	7 (22%)	6 (19%)	4 (12%)	n=55	10 (29,4%)	8 (23,5%)	15 (44,1%)	1 (2,9%)	0	n=63
Difuso		13 (59%)	07 (32%)	2 (9%)	0	0	p=0,6	2 (13%)	4 (27%)	4 (27%)	3 (20%)	2 (13%)	p=0,5	8 (40%)	7 (35%)	2 (10%)	2 (10%)	1 (5%)	p=0,034
Misto		5 (56%)	3 (33%)	1 (11%)	0	0		4 (50%)	0	3 (37%)	1 (12%)	0		0	5(55,6%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	0	
Subtipo Sm1		16 (76%)	03 (14%)	2 (10%)	0	0	n=59	2 (12%)	2 (12%)	6 (38%)	4 (25%)	2 (12%)	n=49	6 (43%)	4 (28%)	4 (28%)	0	0	n=54
de Invasão Sm2		26 (68%)	10 (26%)	2 (5,%)	0	0	p=0,5	11 (33%)	7 (21%)	6 (18%)	5 (15)	4 (12%)	p=0,35	10 (25%)	15 (37%)	12 (30%)	3 (8%)	0	p=0,4
Acometimento Sim		9 (56%)	5 (31%)	2 (13%)	0	0	n=68	3 (27%)	2 (18%)	3 (27%)	1 (9%)	2 (18%)	n=55	0	5 (29,4)	10 (58,8%)	1 (5,9%)	1 (5,9%)	n=63
Linfonodal Não		37 (71%)	11 (21%)	4 (8%)	0	0	p=0,5	12 (27%)	8 (18%)	11 (25%)	9 (20%)	4 (9%)	p=0,8	18 (39,1)	15 (32,6%)	9 (19,6%)	4 (8,7%)	0	p=0,003
Invasão Sim		1 (50%)	1 (50%)	0	0	0	n=68	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	0	1 (25%)	n=55	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)	0	0	n=63
Vascular Não		45 (68%)	15 (23%)	6 (9%)	0	0	p=0,6	14 (27%)	9 (18%)	13 (25%)	10 (19%)	5 (10%)	p=0,7	16 (27,1%)	19 (32,2%)	18 (8,5%)	5 (1,7%)	1 (1,7%)	p=0,8
Invasão Sim		2 (40%)	3 (60%)	0	0	0	n=68	4 (80%)	1 (20%)	0	0	0	n=55	2	2	1 (20%)	0	0	n=63
Perineural Não		44 (70%)	13 (21%)	6 (9%)	0	0	p=0,12	11 (22%)	9 (18%)	14 (28%)	10 (20%)	6 (12%)	p=0,7	16 (27,6%)	18 (31%)	18 (31%)	5 (8,6%)	1 (1,7%)	p=0,8
Invasão Sim		5 (50%)	5 (50%)	0	0	0	n=68	6 (60%)	2 (20%)	1 (10%)	0	1 (10%)	n=55	3 (23%)	4 (31%)	5 (38%)	1 (8%)	0	n=63
Linfática Não		41 (71%)	11 (19%)	6 (10%)	0	0	p=0,07	9 (20%)	8 (18%)	13 (29%)	10 (22%)	5 (11%)	p=0,08	15 (30%)	16 (32%)	14 (28%)	4 (8%)	1 (2%)	p=0,9

Anexo E - Positividade de p16^{ink4a} e dados clínico-patológicos

p16 ^{ink}		Mucosa Normal						Mucosa Metaplásica						Tumor					
positividade		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)		0	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)	
Idade: < 50a		5 (45,5%)	4 (36,4%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	0	n=67	1 (12,5%)	3 (37,5%)	1 (12,5%)	2 (25%)	1 (12,5)	n=56	1 (12,5%)	1 (12,5%)	0	1 (12,5%)	5 (62,5%)	n=57
>50a		31 (55,4%)	16 (28,6%)	7 (12,5%)	1 (1,8%)	1 (1,8%)	p=0,68	4 (8,3%)	15 (31,3%)	8 (16,7%)	9 (18,8%)	12 (25%)	p=0,92	7 (14,3%)	9 (18,4%)	10 (20,4%)	8 (16,3%)	15 (30,6)	p=0,42
Sexo: Masculino		24 (57,1%)	11 (26,2%)	5 (11,9%)	2 (4,8%)	0	n=67	3 (5,4%)	12 (35,3%)	5 (14,7%)	7 (20,6%)	7 (20,6%)	n=56	5 (14,3%)	7 (20%)	8 (22,9%)	4 (11,4%)	11 (31,4%)	n=57
Feminino		12 (48%)	9 (36%)	3 (12%)	0	1 (4%)	p=0,46	2 (9,1%)	6 (27,3%)	4 (18,2%)	4 (18,2%)	6 (27,3%)	p=0,9	3 (13,6%)	3 (13,6%)	2 (9,1%)	5 (22,7%)	9 (40,9%)	p=0,5
Raça: Branca		28 (57,1%)	14 (28,6%)	5 (10,2%)	1 (2%)	1 (2%)		3 (7,7%)	14 (35,9%)	6 (15,4%)	7 (17,9%)	9 (23,1%)		5 (12,5%)	6 (15%)	8 (20%)	8 (20%)	13 (32,5%)	
Negra		5 (50%)	4 (40%)	1 (10%)	0	0	n=67	1 (11,1%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	3 (33,3%)	n=56	2 (20%)	1 (10%)	2 (20%)	1 (10%)	4 (40%)	n=57
Amarela		3 (42,9%)	2 (28,6%)	2 (28,6%)	0	0	p<0,001	1 (14,3%)	2 (28,6%)	1 (14,3%)	2 (28,6%)	1 (14,3%)	p=0,89	1 (16,7%)	3 (50%)	0	0	2 (33,3)	p=0,6
Parda		0	0	0	1 (100%)	0		0	0	0	1 (100%)	0		0	0	0	0	1 (100%)	
História familiar Sim		3 (33,3%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	n=67	1 (11,1%)	5 (55,6%)	0	2 (22,2%)	1 (11,1%)	n=56	1 (10%)	2 (20%)	1 (10%)	3 (30%)	3 (30%)	n=57
câncer gástrico Não		33 (56,9%)	18 (31%)	6 (9%)	1 (1,7%)	0	p=0,031	4 (8,5%)	13 (27,7%)	9 (19,1%)	9 (19,1%)	12 (25%)	p=0,39	7 (3,9%)	8 (17%)	9 (19,1%)	6 (12,8%)	17 (36,2%)	p=0,69
Tipo Histológico(Laurén):																			
Intestinal		19 (51,4%)	13 (35,1%)	4 (10,8%)	1 (2,7%)	0	n=67	2 (6,1%)	13 (39,4%)	2 (6,1%)	7 (21,2%)	9 (27,3%)	n=56	6 (20%)	4 (13,3%)	4 (13,3%)	5 (16,7%)	11 (33,7%)	n=57
Difuso		12 (57,1%)	5 (23,8%)	3 (14,3%)	0	1 (4,8%)	p=0,66	1 (6,7%)	5 (33,3%)	4 (26,7%)	3 (20%)	2 (13,3%)	p=0,13	1 (5,6%)	4 (22,2%)	4 (22,2%)	3 (16,7%)	6 (33,3%)	p=0,9
Misto		5 (55,6%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	0		2 (25%)	0	3 (37,5%)	1 (12,5%)	2 (25%)		1 (11,1%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	3 (33,3%)	
Subtipo Sm1		10(50%)	7 (35%)	3 (15%)	0	0	n=58	1 (6,3%)	4 (25%)	3 (18,8%)	4 (25%)	4 (25%)	n=49	2 (16,7%)	3 (25%)	1 (8,3%)	2 (16,7%)	4 (33,3%)	n=48
de Invasão Sm2		22 (57,9%)	11 (28,9%)	3 (7,9%)	1 (2,6%)	1 (2,6%)	p=0,7	3 (9,1%)	14 (42,4%)	5 (15,2%)	4 (12,1%)	7 (21,2%)	p=0,69	6 (16,7%)	6 (16,7%)	4 (11,1%)	5 (13,9%)	15 (41,7%)	p=0,9
Acometimento Sim		10 (62,5%)	2 (12,5%)	4 (25%)	0	0	n=67	1 (9,1%)	4 (36,4%)	3 (27,3%)	0	3 (27,3%)	n=56	2 (13,3%)	2 (13,3%)	4 (26,7%)	2 (13,3%)	5 (33,3%)	n=57
Linfonodal Não		26 (51%)	18 (35,3%)	4 (7,8%)	2 (3,9%)	1 (2%)	p=0,17	4 (8,9%)	14 (31,1%)	6 (13,3%)	11 (24,4%)	10 (22,2%)	p=0,4	6 (14,3%)	8 (19%)	6 (14,3%)	7 (16,7%)	15 (35,7%)	p=0,8
Invasão Sim		1 (50%)	0	0	0	1 (50%)	n=67	0	1 (25%)	0	3 (75%)	0	n=56	0	2 (66,7%)	0	1 (33,3%)	0	n=57
Vascular Não		35 (53,8%)	20 (30,8%)	8 (12,3%)	2 (3,1%)	0	p<0,001	5 (9,6%)	17 (32,7%)	9 (17,3%)	8 (15,4%)	13 (25%)	p=0,065	8 (14,8%)	8 (14,8%)	10 (18,5%)	8 (14,8%)	20 (37%)	p=0,13
Invasão Sim		3 (60%)	1 (20%)	0	0	1 (20%)	n=67	0	2 (40%)	0	1 (20%)	2 (40%)	n=56	2 (40%)	2 (40%)	0	1 (20%)	0	n=57
Perineural Não		33 (53,2%)	19 (30,6%)	8 (12,9%)	2 (3,2%)	0	p=0,009	5 (9,8%)	16 (31,4%)	9 (17,6%)	10 (19,6%)	11 (21,6%)	p=0,7	6 (11,5%)	8 (15,4%)	10 (19,2%)	8 (15,4%)	20 (38,5%)	p=0,12
Invasão Sim		5(50%)	3 (30%)	1 (10%)	0	1 (10%)	n=67	1 (9,1%)	3 (27,3%)	0	4 (36,4%)	3 (27,3)	n=56	4 (30,8%)	3 (23,1%)	3 (23,1%)	1 (7,7%)	2 (15,4%)	n=57
Linfática Não		31 (54,4%)	17 (29,8%)	7 (12,3%)	2 (3,5%)	0	p=0,19	4 (8,9%)	15 (33,3%)	9 (20%)	7 (15,6)	10 (22,2%)	p=0,3	4 (9,1%)	7 (15,9%)	7 (15,9%)	8 (18,2%)	18 (40,9%)	p=0,1

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

Abe N, Watanabe T, Susuki K, Machida H, Toda H, Nakaya Y, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Atomi Y. Risk factors predictive of lymph node metastasis in depressed early gastric cancer. *Am J Surg*. 2002;183(2):168-72.

Aktas H, Cai H, Cooper GM. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27^{KIP1}. *Mol Cell Biol*. 1997;17(7):3850-7.

Akama Y, Yasui W, Kuniyasu H, Yokosaki H, Akagi M, Tahara H, Ishikawa T, Tabara F. Genetic status and expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors in human gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res*. 1996;87(8):824-30.

Al-Moundhri MS, Nirmala V, Al-Hadabi I, Al-Mawaly K, Burney I, Al-Nabhani M, Thomas V, Ganguly S, Grant C. The prognostic significance of p53, p27kip1, p21 waf1, HER-2/neu, and Ki67 proteins expression in gastric cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study of 121 Arab patients. *J Surg Oncol*. 2005;91(4):243-52.

Al-Refaie WB, Tseng JF, Gay G, Patel-Parekh L, Mansfield PF, Pisters PW, Yao JC, Feig BW. The impact of ethnicity on the presentation and prognosis of patients with gastric adenocarcinoma. Results from the National Cancer Data Base. *Cancer*. 2008;113(3):461-9.

Amemiya RM, Gama-Rodrigues J, Fujita R, Wakasugui S, Iriya K, Novo NF, Juliano Y. Gastric cancer: echoendoscopic assessment of parietal invasion level – correlation with macroscopic and histopathologic findings. *Arq Bras Cir Dig*. 2002;(15):14-8.

Bacani JT, Soares M, Zwingerman R, di Nicola N, Senz J, Riddell R, Huntsman DG, Gallinger S. CDH1/E-cadherin germline mutations in early onset gastric cancer. *J Med Genet*. 2006;43(11):867-72.

Bedikian AY, Chen TT, Khankhanian N, Heilbrun LK, McBride MC, McMurtrey MJ, Bodey GP. The natural history of gastric cancer and prognostic factors influencing survival. *J Clin Oncol*. 1984;2(4):305-10.

Begnami MDFS, Campos JFM, Silva E, Montagnini A, Nascimento CF, Nonogaki S, Soares F. Expressão imuno-histoquímica de c-erb-B2 e p53 em carcinomas gástricos - *J Bras Patol Med Lab*. 2005, (41)4:279-86.

Borie F, Millat B, Fiingerhut A, Hay JM, Fagniez PL, De Saxce B. Lymphatic involvement in early gastric cancer. Prevalence and prognosis in France. *Arch Surg*. 2000;135(10):1218-23.

Bos JL. Ras oncogene in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989;49(17):4682-9.

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*. 1987;327(6120):293-7.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2008*: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Bresciani CJC, Gama-Rodrigues J, Jacob CE, Sakano AL, Siqueira LT, Abe ES. Câncer gástrico precoce: novas perspectivas: ressecção laparoscópica – técnicas e resultados. In: Habr-Gama A, Gama-Rodrigues J, Cecconelo I, Zilberstein B, Machado MCC, Saad WA, Bresciani CJC, ed. *Atualização em cirurgia do aparelho digestivo e coloproctologia*. São Paulo: Frontis, 2001; p. 85-96.

Bu DS, Han SH, Bae BN, Kim KH, Kim HJ, Kim YD, Kim HY, Park KM. Expression of p27Kip1 protein associated with poor clinical outcome in human gastric cancer. *J Korean Surg Soc*. 2001; 61(2):153-7.

Buonsanti G, Calistri D, Padovan L, Luinetti O, Fiocca R, Solcia E, Ranzani GN. Microsatellite instability in intestinal- and diffuse-type gastric carcinoma. *J Pathol.* 1997;182(2):167-73.

Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, Yokota J, Wiesner GL, Powell SM, Lewis FR, Huntsman DG, Pharoah PD, Jankowski JA, MacLeod P, Vogelsang H, Keller G, Park KG, Richards FM, Maher ER, Gayther SA, Oliveira C, Grehan N, Wight D, Seruca R, Roviello F, Ponder BA, Jackson CE. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet.* 1999;36(12):873-80.

Carr AM. Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle. *Science.* 2000; 287(5459): 1765-6

Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27^{Kip1} protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med.* 1997;3(2):227-30.

Cesar ACG, Silva AE, Tajara EH. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. *Arq Gastroenterol.* 2002;39(4):253-9.

Chen F, Chang D, Goh M, Klibanov SA, Ljungman M. Role of p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposure to proteasome inhibitors. *Cell Growth Differ.* 2000;11(5):239-46.

Chesa PG, Rettig WJ, Melamed MR, Old LJ, Niman HL. Expression of p21ras in normal and malignant human tissues: lack of association with proliferation and malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(10):3234-3.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Pathologic basis of disease.* 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1999.

Craanen ME, Blok P, Offerhaus GJ, Meijer GA, Dekker WM. Kuipers EJ, Meuwissen SGM. p21^{Waf1/Cip1} expression and the p53 feedback loop in gastric carcinogenesis. *J Pathol.* 1999;189(4):481-6.

Czerniak B, Herz F, Gorczyca W, Koss LG: Expression of ras oncogene p21 protein in early gastric carcinoma and adjacent gastric epithelia. *Cancer.* 1989;64(7):1467-73.

Dell'Aquila Jr NF *Detecção de micrometástases linfonodais no adenocarcinoma gástrico por método histoquímico e imuno-histoquímico, comparação entre os métodos e impacto no estágio segundo as classificações JGCA 1998 e UICC TNM 1997* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.

Drumm B, Rowland M. The epidemiology of *Helicobacter pylori*: Where to from here? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;36(1):7-8.

Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1997;57(16):3381-5.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983;33(2):389-96.

Everett SM, Axon ATR. Early gastric cancer in Europe. *Gut.* 1997;41(2):142-50.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759-67.

Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Stemmermann GN, Noffsinger A. TP53 and gastric carcinoma: a review. *Hum Mutat.* 2003;21(3):258-70.

Folli S, Dente M, Dell'Amore D, Gaudio M, Nanni O, Saragoni L, Vio A. Early gastric cancer: prognostic factors in 223 patients. *Br J Surg.* 1995;82(7):952-6.

Fujita K, Ohuchi N, Yao T, Okumura M, Fukushima Y, Kanakura Y, Kitamura Y, Fujita J. Frequent over-expression, but not activation by point mutation, of ras genes in primary human gastric cancers. *Gastroenterology*. 1987;93:1339-45.

Gama-Rodrigues J, Bresciani CJC, Jacob CE, Matsuda M, Zilberstein B, Habr-Gama A. Treatment of early gastric cancer. Results of D2 lymphadenectomy. In: Brennan MF, Karpeh MS, ed. *Proceedings of the 4th International Gastric Cancer Congress*. Bologna: Monduzzi; 2001. p. 823-7.

Gama-Rodrigues J, Bresciani CJC, Waitzberg DL, Matsuda M, Malzoni CE, Pinotti HW. Resultados do tratamento do câncer gástrico precoce. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 1992;7:86-9.

Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev*. 1998;12(19):2973-83.

Gotoda T, Sasako M, Ono H, Katai H, Sano T, Shimoda T. Avaluation of the necessity for gastrectomy with lymph node dissection for patients with submucosal invasive gastric cancer. *Br J Surg*. 2001;88(3):444-9.

Gotoda T, Yanagisawa A, Sasako M, Ono H, Nakanishi Y, Shimoda T, Kato Y. Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric Cancer*. 2000;3(4):219-25.

Grady WM: Genetics of gastric cancer. In: Cowell JK, editor. *Molecular genetics of cancer*, 2nd ed. Guilford: Bios Scientific Publishers Limited; 2001. p. 115-36.

Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu,X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y. Growth suppression by p18^{INK4C}, a p16^{INK4A/MTS1} and p14^{INK4B/MTS2}-related CDK inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev*. 1994;8(24):2939-52.

Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*. 1998;392(6674):402-8.

Hall EJ. Etiology of cancer: physical factors. In: De Vita Junior VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Principles & practice of oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott- Raven; 1997. p. 203-18.

Han S, Kim HY, Park K, Lee MS, Kim HJ, Kim YD. Expression of p27Kip1 and cyclin D1 proteins is inversely correlated and is associated with poor clinical outcome in human gastric cancer. *J Surg Oncol*. 1999;71(3):147-54.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993;75(4):805-16.

He XS, Su Q, Chen ZC, He XT, Long ZF, Ling H, Zhang LR. Expression, deletion [was deletion] and mutation of p16 gene in human gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2001;7(4):515-21.

Hemminki K, Jiang Y. Familial and second gastric carcinomas. *Cancer*. 2002;94(4):1157-65.

Hioki K, Nakane Y, Yamamoto M. Surgical strategy for early gastric cancer. *Br J Surg*. 1990;77(12):1330-4.

Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*. 1995;15(5):2672-81.

Hirota T, Itabashi M, Daibo M, Kitaoka H, Oguro Y, Yamada T, Ichikawa H. Chronological changes in the morphological features of early gastric cancer, especially recent changes in macroscopic findings. *Jpn J Clin Oncol.* 1984;14(2):181-99.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991;253(5015):49-53.

Howson CP, Hiyama T, Wynder EL. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev.* 1986;8:1-26.

Ichinoe M, Mitomi H, Kikuchi S, Tanabe S, Akino F, Okayasu I. Mucosal high apoptotic activity and low p21WAF1/CIP1 expression and submucosal low proliferative activity in superficially spreading early gastric cancers: comparison with the penetrating growth type. *Pathol Int.* 2003;53(2):81-9.

Ichiyoshi Y, Oiwa H, Tomisaki S, Sakaguchi Y, Ohno S, Maehara Y, Sugimachi K. Overexpression of p53 is associated with growth pattern and prognosis in advanced gastric cancer. *Hepatogastroenterology.* 1997;44(14):546-53.

Igaki H, Sasaki H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Kimura T, Harada Y, Sugimura T, Terada M. Mutation frequency of the p16/CDKN2 gene in primary cancers in the upper digestive tract. *Cancer Res.* 1995;55(15):3421-3.

Inoue K, Tobe T, Kan N, Nio Y, Sakai M, Takeuchi E, Sugiyama T. Problems in the definition and treatment of early gastric cancer. *Br J Surg.* 1991;78(7):818-21.

Inoue M, Tsugane S. Epidemiology of gastric cancer in Japan. *Postgrad Med J.* 2005;81(257):419-24.

International and Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma - 2nd english edition. *Gastric Cancer.* 1998;1:10-24.

Jacob CE. *Câncer gástrico precoce: estudo dos parâmetros clínicos e histopatológicos; correlação com a sobrevivência a longo prazo [tese].* São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2003.

Jang SJ, Ahn MJ, Paik SS, Kong G, Keum JS, Park YW, Lee JD. Expression of cyclin dependent kinase inhibitor p21 WAF1 alone and in combination with p27KIP1 shows prognostic value in gastric carcinoma. *J Korean Med Sci.* 1998;13(4):369-376

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ; American Cancer Society. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004;54(1):8–29.

Johnson DG, Walker CL Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:295-312.

Kim DH, Lee HI, Nam ES, Shin HS, Sohn JH, Park CH, Yoon DS, Song SY, Park YE. Reduced expression of the cell-cycle inhibitor p27^{Kip1} is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology.* 2000;36(3):245-51.

Kim SS, Park YG, Jun KH, Jung H, Song GY, Kim JJ, Chin HM, Kim W, Park CH, Park SM, Lim KW, Kim SN, Jeon HM. Clinical analysis according to p21(Waf1/Cip1) and p27(Kip1) expression in gastric cancer. *J Korean Gastric Cancer Assoc.* 2006;6(1):36-42.

Kim YB, Han JY, Kim TS, Kim PS, Chu YC. Overexpression of c-H-ras p21 is correlated with vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in advanced gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15(12):1393-9.

Kim YJ, Ghu HD, Kim DY, Kim HJ, Kim SK, Park CS. Expression of cellular oncogenes in human gastric carcinoma: c-myc, c-erb B2 and c-Ha-ras. *J Surg Oncol.* 1993;54(3):167-70.

Kishimoto I, Mitomi H, Ohkura Y, Kanazawa H, Fukui N, Watanabe M. Abnormal expression of p16^{INK4a}, cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 and retinoblastoma protein in gastric carcinomas. *J Surg Oncol*. 2008;98(1):60-6.

Kitamura K, Taniguchi H, Yamaguchi T, Takahashi T. Early gastric cancer in young adults. *Tohoku J Exp Med*. 1996;179(2):93-100.

Kokkola, A; Haapiainen R; Laxen F; Puolakkainen, P; Kivilä, E; Virtamo, J; Sipponen, P. Risk of gastric carcinoma in patients with mucosal dysplasia associated with atrophic gastritis: a follow-up study. *J Clin Pathol*. 1996;49(12):979-84.

Konishi N, Hiasa Y, Matsuda H, Tao M, Tsuzuki T, Hayashi I, Kitahori Y, Shiraishi T, Yatani R, Shimazaki J. Intratumor cellular heterogeneity and alterations in ras oncogene and p53 tumor suppressor gene in human prostate carcinoma. *Am J Pathol*. 1995;147(4):1112-22.

Kurihara N, Kubota T, Otani Y, Ohgami M, Kumai K, Sugiura H, Kitajima M. Lymph node metastasis of early gastric cancer with submucosal invasion. *Brit J Surg*. 1998;85(6):835-9.

Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.

Laurén PA, Nevalainen TJ: Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric cancer: A time-trend study in Finland with comparison between studies from high- and low-risk areas. *Cancer*. 1993;71(10):2926-33.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88(3):323-31.

Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Suehiro Y, Tsushimi K, Tsushimi M, Sasaki K. Combined examination of p27^{Kip1}, p21^{Waf1/Cip1} and p53 expression allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma. *Histopathology* 2001;39(6):603-10.

Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:851-91.

Lynch HT, Grady W, Suriano G, Huntsman D. Gastric cancer: new genetic developments. *J Surg Oncol*. 2005;90(3):114-33.

Lynch HT, Kaurah P, Wirtzfeld D, Rubinstein WS, Weissman S, Lynch JF, Grady W, Wiyrick S, Senz J, Huntsman DG. Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis, genetic counseling, and prophylactic total gastrectomy. *Cancer*. 2008;112(12): 2655-63.

Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res*. 1996;56(11):2649-54.

Mattioli E, Vogiatzi P, Sun A, Abbadessa G, Angeloni G, D'Ugo D, Trani D, Gaughan JP, Vecchio FM, Cevenini G, Persiani R, Giordano A, Claudio PP. Immunohistochemical analysis of pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16^{INK4A}, p27KIP1, p21^{WAF1}, Ki-67 expression patterns in gastric cancer. *J Cel Physiol.* 2007;210(1):183-91.

Mitsuhashi T, Aoki Y, Eksioglu YZ, Takahashi T, Bhide PG, Reeves SA, Caviness VS Jr. Overexpression of p27Kip1 lengthens the G1 phase in a mouse model that targets inducible gene expression to central nervous system progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(11):6435-40.

Moch H, Schraml P, Rubendorf L, Mirlacher M, Kokonen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 1999;154(4):981-6.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275(5307):1787-90.

Nakanishi M, Robetorye RS, Pereira-Smith OM, Smith JR. The C-terminal region of p21^{SDI1/WAF1/CIP1} is involved in proliferating cell nuclear antigen binding but does not appear to be required for growth inhibition. *J Biol Chem.* 1995;270(29):17060-3.

Nitti D, Belluco C, Mammano E, Marchet A, Ambrosi A, Mencarelli R, Segato P, Lise M. Low level of p27(Kip1) protein expression in gastric adenocarcinoma is associated with disease progression and poor outcome. *J Surg Oncol.* 2002;81(4):167-76.

Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Growth pattern and expressions of cell cycle regulator proteins p53 and p21^{WAF1/CIP1} in early gastric carcinoma. *Cancer.* 2001;92(7):1828-35.

Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Increased proliferative activity caused by loss of p21(WAF1/CIP1) expression and its clinical significance in patients with early-stage gastric carcinoma. *Cancer.* 2002;94(7):2107-12.

Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell.* 2000;100(1):71-8.

Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Ogawa A, Dorfman I, Loda M, Fuchs CS. Down-regulation of p21 (CDKN1A/CIP1) is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *J Pathol.* 2006;210(2):147-54.

Ohtani M, Isozaki H, Fujii K, Nomura E, Niki M, Mabuchi H, Nishiguchi K, Toyoda M, Ishibashi T, Tanigawa N. Impact of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 and apoptosis in tumor cells on the overall survival of patients with non-early stage gastric carcinoma. *Cancer*. 1999;85(8):1711-8.

Ohuchi N, Hand PH, Merlo G, Fujita J, Mariani-Costantini R, Thor A, Nose M, Callahan R, Schlom J. Enhanced expression of c-Ha-ras p21 in human stomach adenocarcinomas defined by immunoassays using monoclonal antibodies and in situ hybridization. *Cancer Res*. 1987;47(5):1413-20.

Oiwa H, Maehara Y, Ohno S, Sakaguchi Y, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Growth pattern and p53 overexpression in patients with early gastric cancer. *Cancer*. 1995;75(6 Suppl):1454-9.

Okabayashi T, Kobayashi M, Nishimori I, Sugimoto T, Namikawa T, Onishi S, Hanazaki K. Clinicopathological features and medical management of early gastric cancer. *Am J Surg*. 2008;195(2):229-32.

Ranaldi R, Santinelli A, Verdolini R, Rezai B, Mannello B, Bearzi I. Long-term follow-up in early gastric cancer: evaluation of prognostic factors. *J Pathol*. 1995;177(4):343-51.

Pan W, Ishii H, Ebihara Y, Gobe G. Prognostic use of growth characteristics of early gastric cancer and expression patterns of apoptotic, cell proliferation, and cell adhesion proteins. *J Surg Oncol*. 2003;82(2):104-10.

Park Y, Choi K, Choi Y. p21 expression and mutation in gastric carcinoma: analysis by immunohistochemistry and PCR-SSCP. *J Korean Med Sci*. 1998;13(5):507-12.

Perdigão J, Tavares A. Ciclo celular e novas terapias contra o cancro (o ano do Nobel). *Bol Biotecnol*. 2001;70:7-14.

Perez RO. *Determinação da expressão da ciclina G no câncer do reto* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Ponce-Castañeda MV, Lee MH, Latres E, Polyak K, Lacombe L, Montgomery K, Mathew S, Krauter K, Sheinfeld J, Massague J. p27Kip1: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res* 1995;55(6):1211-4.

Ribeiro JRU, Alves VA, Souza PMSB, Ribeiro AVS, Rawet V, Nonogaki S, Rodrigues JG, Habr-Gama A. Correlação das proteínas p53 e Ki67 com o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma do reto distal, *Rev bras Coloproct*. 2000;20(4):248-56.

Rocco A, Schandl L, Nardone G, Tulassay Z, Staibano S, Malfertheiner P, Ebert MP. Loss of expression of tumor suppressor p16^{INK4} protein in human primary gastric cancer is related to the grade of differentiation. *Dig Dis*. 2002;20(1):102-5.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366(6456):704-7.

Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB. . Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cel Physiol*. 2000;183:18-27.

Shimizu K, Birnbaum D, Ruley MA, Fasano O, Suard Y, Edlund L, Taparowsky E, Goldfarb M, Wigler M. Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature*. 1983;304(5926):497-500.

So JB, Samarasinge K, Raju GC, Moolchala SM, Ti TK. Expression of cell-cycle regulators p27 and cyclin E correlates with survival in gastric carcinoma patients. *J Surg Res*. 1999;94(1):56-60.

Suriano G, Oliveira C, Ferreira P, Machado JC, Bordin MC, De Wever O, Bruyneel EA, Moguilevsky N, Grehan N, Porter TR, Richards FM, Hruban RH, Roviello F, Huntsman D, Mareel M, Carneiro F, Caldas C, Seruca R. Identification of CDH1 germline missense mutations associated with functional inactivation of the E-cadherin protein in young gastric cancer probands. *Hum Mol Genet.* 2003;12(5):575-82.

Tabin, CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, Dhar R, Lowy DR, Chang EH. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 1982;300(5888):143-9.

Tahara E. Molecular mechanisms of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1993;119(5):265-72.

Takeshita K, Seki I, Tani M, Honda T, Saito N, Endo M. Rational lymphadenectomy for early gastric cancer with submucosal invasion: a clinicopathological study. *Surg Today.* 1998;28(6):580-6.

Takuwa N, Takuwa Y. Ras activity late in G1 phase required for p27kip1 downregulation, passage through the restriction point, and entry into S phase in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1997;17(9):5348-58.

Teh M, Lee YS. An immunohistochemical study of ras oncoprotein expression in gastric carcinoma. *Cancer*. 1993;72(6):1846-8.

Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*. 1994;78(1):67-74.

Tsujie M, Yamamoto H, Tomita N, Sugita Y, Ohue M, Sakita I, Tamaki Y, Sekimoto M, Doki Y, Inoue M, Matsuura N, Monden T, Shiozaki H, Monden M. Expression of tumor suppressor gene p16^{INK4} products in primary gastric cancer. *Oncology*. 2000;58(2):126-36.

Tsujitani S, Oka S, Saito H, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Less invasive surgery for early gastric cancer based on the low probability of lymph node metastasis. *Surgery*. 1999;125(2):148-54.

Wang X, Gorospe M, Huang Y, Holbrook N. p27Kip1 overexpression causes apoptotic death of mammalian cells. *Oncogene* 1997;15(24):2991-7.

Wu CW, Tsay SH, Chang TJ, Chang HM, Hsieh MC, Lui WY, P'eng FK, Chi CW. Clinicopathologic comparisons between estrogen receptor-positive and -negative gastric cancers. *J Surg Oncol*. 1992;51(4):231-5.

Xie HL, Su Q, He XS, Liang XQ, Zhou JG, Song Y, Li YQ. Expression of p21(WAF1) and p53 and polymorphism of p21(WAF1) gene in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004;10(8):1125-31.

Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, Yokozaki H, Semra S, Shimamoto F, Tahara E. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1} in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: relationship with p53 status and proliferative activity. *J Pathol*. 1996;180(2):122-8.

Zheng J, Wang W, Li K, Guan W, Yan W. Effect of p27^{KIP1} on cell cycle and apoptosis in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2005;11(45):7072-7.