PAULA BALTHAZAR BAMBINO

Imunoexpressão da E-caderina, Beta-catenina e TP53
em câncer gástrico familiar

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: Dr. Osmar Kenji Yagi

São Paulo

2009

PAULA BALTHAZAR BAMBINO

Imunoexpressão da E-caderina, Beta-catenina e TP53
em câncer gástrico familiar

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: Dr. Osmar Kenji Yagi

São Paulo

2009

Espaço reservado à ficha catalográfica

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, **Paulo e Jane**,
pela paciência, amor, dedicação e motivação
em todas as etapas de minha vida.

Aos meus irmãos, **Eric e Fernanda**,
sempre presentes nessa difícil jornada, e
ao mais novo membro da família Bambino,
meu amado sobrinho **Bernardo**.

Ao meu amor, **André Luiz**, pela compreensão,
amor, carinho e atenção dispensados
ao longo da execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ivan Cecconello**, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), pela oportunidade de realizar a minha pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro D’Albuquerque**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação da Área de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela confiança em mim depositada e pelas conversas nos momentos de necessidade.

Ao **Prof. Dr. Bruno Zilberstein**, Chefe do Grupo de Estômago da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo, pelos ensinamentos e confiança em todos os momentos.

Ao **Dr. Osmar Kenji Yagi**, exímio cirurgião e amigo, que muito auxiliou na minha formação pessoal e profissional, desde a iniciação científica até hoje.

Ao **Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Junior**, exemplo de pesquisador, agradeço pela inestimável contribuição neste trabalho, pelos valiosos ensinamentos e estímulo nas horas difíceis.

Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett**, Professor Associado e Chefe do Laboratório de Investigação Médica - LIM50 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e confiança em mim depositados, disponibilizando-me seu laboratório, sem o qual eu não finalizaria este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves**, Professor Titular do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por disponibilizar prontamente os blocos de parafina e lâminas de histologia, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

À **Dra. Adriana Vaz Safatle-Ribeiro**, grande médica e pesquisadora, sempre disposta a ajudar no que for preciso, agradeço também pelos momentos de descontração, conversas agradáveis e bom-humor.

Ao colega Patologista **Dr. Edwin Roger Parra Cuentas**, pela colaboração e ajuda na escolha das lâminas de histologia.

À bióloga “amiga-irmã”, **Bruna Souza de Quevedo**, pela ajuda desmedida na execução laboratorial deste trabalho, por me ensinar a técnica de imunoistoquímica, e também por todos os momentos maravilhosos compartilhados ao longo dos últimos anos.

À querida amiga **Thaíse Yumie Tomokane**, por toda a ajuda e atenção dispensada, pelas conversas e por estar presente durante grande parte desta difícil jornada.

Às minhas outras “amigas-irmãs”, queridas flores, **Talita Rojas Cunha Sanches, Cristiane Masteguim e Natália Mariana Felicio**, por compartilhar inúmeras emoções, necessárias para a manutenção da minha felicidade, agradeço pela compreensão e apoio constantes.

Ao amigo biólogo **Rildo Aparecido Volpini**, pelo indispensável auxílio durante a sessão de fotos deste trabalho e constante bom-humor, sua marca registrada.

À amiga bióloga **Gladis Wilner**, que desempenhou papel essencial para a minha formação profissional, agradeço pela importante contribuição neste trabalho e pelos momentos de descontração.

Às minhas colegas do Projeto Genoma Clínico do Câncer: **Kátia Adriana Tessima Franco e Uana Maria Miguel Jorge**, pelas conversas bem-humoradas, apoio e ajuda quando necessário.

Às estimadas secretárias da Pós-Graduação do Departamento de Gastroenterologia, **Myrtes Freire de Lima Graça e Vilma**

de Jesus Libério, pela competência e paciência que muito facilitaram o meu caminho.

Aos prezados funcionários da secretaria do Departamento de Gastroenterologia, **Fabiana Renata Soares Bispo, Marcos Retzer, Maria Cristina Rabelo, Maria Joelite dos Reis Santos, Marisa Ochner, Marta Regina Rodrigues e Paula Cecília Costa Zobares**, pelo auxílio em todos os momentos.

À todos os funcionários, médicos e residentes do Departamento de Gastroenterologia, que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

Às queridas amigas **Beatriz Jacomino Lopes, Stephanie Moreta e Débora Soifer**, pela amizade incondicional e compreensão nos momentos de ausência necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro oferecido para o desenvolvimento deste trabalho. Nº Processo FAPESP: 05/58079-5.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Referências: adaptado de *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 Fazanelli 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

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE QUADROS E GRÁFICOS	XV
LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XVII
RESUMO.....	XVIII
SUMMARY	XIX
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVOS	15
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	17
3.1 <i>Casuística</i>	17
3.2 <i>Critérios de inclusão</i>	18
3.3 <i>Critérios de exclusão</i>	18
3.4 <i>Dados clínico-patológicos e material biológico</i>	19
3.5 <i>Local do estudo</i>	19
3.6 <i>Estudo imunoistoquímico.....</i>	19
3.7 <i>Análise da imunoexpressão</i>	21
3.8 <i>Análise da imunoexpressão da E-caderina e Beta-catenina</i>	22
3.9 <i>Análise da imunoexpressão de TP53.....</i>	22
3.10 <i>Análise estatística</i>	22
4. RESULTADOS	24
4.2 <i>Imunoexpressão da E-caderina.....</i>	27
4.3 <i>Imunoexpressão da Beta-catenina</i>	32
4.4 <i>Imunoexpressão de TP53.....</i>	35
4.5 <i>Análise estatística</i>	39
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES.....	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Bax	Gene Bax
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
CDH1	Gene <i>Cadherin 1</i>
CGDH	Câncer Gástrico Difuso Hereditário
CGF	Câncer Gástrico Familiar
CpG	Citosina e guanina ligadas por fosfato
DAB	Diaminobenzidina tetrahidrocloreto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EUA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G1	<i>Gap 1</i>
H&E	Hematoxilina-Eosina
HC	Hospital das Clínicas
ICHC	Instituto Central do Hospital das Clínicas
IHQ	Imunoistoquímica
LFS	<i>Li-Fraumeni Syndrome</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MDM2	Oncogene MDM2
MET	Proto-oncogene MET
p.	Página
PBS	Solução salina fosfatada e tamponada

p16	Gene p16
p21	Gene p21
p53	Gene p53
TP53	Proteína p53
<i>Wnt</i>	Via Wnt

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos pacientes de acordo com o critério clínico.....	18
Tabela 2. Dados clínico-patológicos dos adenocarcinomas gástricos e imunoexpressão da E-caderina.....	40
Tabela 3. Comparação entre os resultados de estudo prévio, encontrados no gene CDH1, e o presente estudo.....	40
Tabela 4. Comparação da imunoexpressão entre E-caderina e TP53.....	41

LISTA DE QUADROS E GRÁFICOS

Gráfico 1. Localização do tumor em pacientes com CGF.....	25
Gráfico 2. Distribuição dos tumores segundo a classificação histológica de Laurén.....	25
Gráfico 3. Distribuição dos pacientes quanto ao gênero.....	26
Gráfico 4. Distribuição dos pacientes quanto à presença de <i>Helicobacter pylori</i>	26
Gráfico 5. Imunoexpressão da E-caderina em pacientes com CGF.....	27
Gráfico 6. Imunoexpressão da Beta-catenina em pacientes com CGF.....	32
Gráfico 7. Imunoexpressão de TP53 em pacientes com CGF.....	35
Quadro 1. Imunoexpressão da E-caderina, Beta-catenina e TP53 dos casos-índices.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipo histológico difuso de Laurén.

Figura 2. Tipo histológico intestinal de Laurén.

Figura 3a. Imunoexpressão normal da E-caderina em adenocarcinoma gástrico (CGF), (x 200).

Figura 3b. Imunoexpressão normal da E-caderina em adenocarcinoma gástrico (CGF) em maior aumento (x 400).

Figura 4a. Imunoexpressão alterada da E-caderina em adenocarcinoma gástrico (CGF), (x 200).

Figura 4b. Imunoexpressão alterada da E-caderina em adenocarcinoma gástrico (CGF) em maior aumento (x 400) – ausência de imunorreatividade da E-caderina.

Figura 5a. Imunoexpressão normal da Beta-catenina em adenocarcinoma gástrico (CGF), (x 100).

Figura 5b. Imunoexpressão alterada da Beta-catenina em adenocarcinoma gástrico (CGF), (x 200).

Figura 6a. Imunoexpressão positiva de TP53 em adenocarcinoma gástrico (CGF), (x 100).

Figura 6b. Imunoexpressão alterada de TP53 em adenocarcinoma gástrico (CGF), (x 200).

LISTA DE SÍMBOLOS

=	igual a
<	menor que
≤	menor ou igual a
>	maior que
%	por cento
°C	grau Celsius
α	alfa
β	beta
γ	gama
kD	quilo Dalton
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
μm	micrômetro

RESUMO

Bambino, PB. Imunoexpressão da E-caderina, Beta-catenina e p53 em câncer gástrico familiar [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 59 p.

Introdução: Agregação familiar é observada em cerca de 10% dos casos de câncer e 1 a 3% é hereditário. O tipo difuso pode estar relacionado à agregação familiar e a alterações genéticas no gene CDH1, que codifica a proteína E-caderina. Alterações na imunoexpressão de Beta-catenina e p53 também são observadas. **Objetivos:** Analisar a imunoexpressão da E-caderina, Beta-catenina e TP53 em adenocarcinomas gástricos de pacientes com câncer gástrico familiar e comparar com os dados clinicopatológicos, além dos achados das alterações genéticas destes pacientes, estudadas previamente nesta Instituição. **Casística e Métodos:** Vinte e seis casos de adenocarcinoma gástrico em blocos de parafina de pacientes do HC-FMUSP foram submetidos ao estudo imunoistoquímico para detecção e análise do padrão de imunoexpressão da E-caderina, Beta-catenina e TP53 através do método da streptavidina-biotina-peroxidase. A análise da imunoexpressão dos marcadores foi classificada segundo escala de intensidade e distribuição e os testes estatísticos utilizados foram o Teste *t* de Student e Exato de Fisher. **Resultados:** A localização predominante do tumor foi no antro (61,5%). 11 (42,3%) casos alterados para a imunoexpressão da E-caderina, sendo todos do tipo difuso; 15 (57,7%) casos normais, sendo 9 do tipo difuso e 6 do tipo intestinal ($p=0,02$). Em estudo prévio realizado nesta instituição, uma mutação *missense* no exon 12 do gene CDH1, códon 617, nucleotídeo 1849 G>A foi encontrada no mesmo caso em que foi observada ausência de imunorreatividade da E-caderina. 11 (42,3%) casos alterados para a imunoexpressão de Beta-catenina e 46,2% de imunorreatividade nuclear positiva para TP53. **Conclusões:** 1) O tipo difuso de Laurén está associado à alteração da imunoexpressão da E-caderina no Câncer Gástrico Familiar; 2) Não houve associação entre a imunoexpressão da E-caderina, idade, gênero e localização do tumor; tampouco houve associação entre a imunoexpressão da Beta-catenina e os dados clínico-patológicos; houve associação inversa entre a imunoexpressão da E-caderina e TP53; 3) Nos casos em que foram detectadas alterações na imunoexpressão, parece haver duas rotas distintas de carcinogênese envolvidas no CGF.

Descritores: 1. Neoplasia gástrica 2. Câncer gástrico familiar 3. E-caderina 4. Beta-catenina 5. p53 6. Imunoexpressão.

SUMMARY

Bambino, PB. Imunoexpression of E-cadherin, Beta-catenin and TP53 in familial gastric cancer [Dissertation]. Sao Paulo: School of Medicine, University of Sao Paulo; 2009. 59 p.

Introduction: Familial clustering is observed in about 10% of the gastric cancer cases and 1-3% is hereditary. Diffuse type gastric cancer is related to genetic alterations in CDH1 gene, which translates the E-cadherin protein. The abnormal expression of E-cadherin is characterized by low expression of cytoplasmatic staining, or loss of membranous immunoreactivity. **Aim:** to analyze the immunoexpression of E-cadherin, Beta-catenin and TP53 in gastric adenocarcinomas in patients with Familial Gastric Cancer and compare with clinical-pathologic data, including the genetic alterations of these patients, found previously on this institution. **Methods:** 26 cases of paraffin-embedded gastric adenocarcinoma tissue of patients of Hospital das Clinicas - School of Medicine of University of Sao Paulo underwent immunostaining to detect the presence and to analyze the pattern of immunoexpression of E-cadherin, Beta-catenin and TP53 using Streptavidine-Biotine-Peroxidase technique. The immunoexpression evaluation was performed utilizing a semiquantitative scale for intensity and distribution. The statistical analysis was done through Student's *t* test and Fisher's Exact test. **Results:** E-cadherin immunoexpression was negative in 11 cases (42.3%), and all of them were diffuse type of Laurén. 15 cases (57.7%) were positive for E-cadherin, from which 9 were of the diffuse type and 6 of intestinal type ($p=0.02$). In previous study performed on this institution, one missense mutation in exon 12 of CDH1 gene, codon 617, nucleotide 1849 G>A was found on the same case that absence of E-cadherin immunostaining was observed. 61.5% of the tumors were located in the antrum. Beta-catenin immunoexpression was altered in 43.2% and TP53 nuclear immunoreactivity was positive in 46.2% of the tumors. TP53 was solely detected in 12 (46.2%) of the tumors, while E-cadherin was altered in 10/26 (38.5%) negative TP53 tumors, $p=0.01$. **Conclusions:** 1) Diffuse type of Laurén is associated to E-cadherin immunoexpression alteration in Familial Gastric Cancer; 2) There was no association between E-cadherin immunoexpression and age, gender or tumor location, as well as there was no association between Beta-catenin and the clinical-pathologic data; there was an inverse association between immunoexpression of TP53 and E-cadherin; 3) There may be two distinct carcinogenesis pathways on familial gastric cancer cases that immunoexpression alterations were detected.

Descriptors: 1.Stomach neoplasms 2.Familial gastric cancer 3.E-cadherin 4. Beta-catenin 5. p53 6. Immunostaining.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer gástrico é a segunda neoplasia maligna mais comum no mundo e uma das principais causas de morte no Brasil. Apesar da prevalência de câncer gástrico ter diminuído em países do ocidente, o prognóstico ainda é desfavorável, com baixa sobrevida de cinco anos. Parecem estar envolvidos na etiopatogenia do câncer gástrico a infecção por *Helicobacter pylori*, dieta e fatores genéticos (Ohene-Abuakwa *et al.*, 2000, Rocco *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas, a incidência global de câncer gástrico vem diminuindo sobretudo pela diminuição da incidência em países desenvolvidos, entretanto em pacientes mais jovens e em casos com agregação familiar a frequência permanece inalterada. É observada agregação familiar de câncer gástrico em aproximadamente 10% dos casos, entretanto somente 1 a 3% dos carcinomas gástricos apresenta caracterização genotípica já estabelecida (Oliveira *et al.*, 2004).

Sob o ponto de vista anatomopatológico, o câncer gástrico é bastante heterogêneo e, por esse motivo, Laurén o classificou em dois tipos histológicos: intestinal e difuso. O primeiro corresponde ao tipo diferenciado da classificação baseada na Escola Japonesa e o tipo difuso corresponde ao tipo indiferenciado, de acordo com a tendência ou não para formação glandular. Estes dois tipos aparentemente apresentam histogênese e progressão distintas e podem ser derivados de rotas de alteração genética diferentes (Watari *et al.*, 2004), como, por exemplo, a E-caderina envolvida

no câncer gástrico difuso (Fiocca *et al.*, 2001). A seguir, nas figuras 1 e 2, pode-se observar, através da coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E), as diferenças histológicas entre os tipos intestinal e difuso de Laurén.

Figura 1. Tipo histológico difuso de Laurén.

A figura 1 mostra células neoplásicas difusamente distribuídas, caracterizadas por alteração da relação núcleo-citoplasmática, hipercromasia nuclear e nucléolo evidente (x 400).

Figura 2. Tipo histológico intestinal de Laurén.

A figura 2 mostra estruturas tubulares neoplásicas, revestidas por células pseudoestratificadas, com intensa hipercromasia nuclear, alteração da relação núcleo-citoplasmática e diminuição dos espaços interglandulares (x 400).

O câncer pode ser considerado uma doença genética, pois é desencadeado por alterações no DNA da célula; no entanto, ao contrário das demais síndromes genéticas humanas, o câncer não é necessariamente uma doença hereditária. Cerca de 90% dos casos de câncer são esporádicos, isto é, sem antecedente familiar. Nestes casos, as alterações genéticas que ocasionam a formação de tumores ocorrem nas células somáticas do indivíduo e, portanto, não foram herdadas nem serão

transmitidas para seus descendentes, restringindo-se apenas às células da mesma linhagem que se originam a partir da célula que sofre mutação, no referido indivíduo (Camargo *et al.*, 1999, Wilner, 2005).

As mutações também podem estar presentes nas células de linhagem germinativa. No câncer, as mutações germinativas estão diretamente associadas à predisposição familiar para o desenvolvimento de tumores e, nestes casos específicos, o câncer pode ser considerado doença genética e hereditária. Mutações germinativas relacionadas ao câncer são detectadas, com maior frequência, em genes supressores de tumor do que em proto-oncogenes (Camargo *et al.*, 1999). Considerando a necessidade de inativação dos dois alelos para que haja o desenvolvimento do tumor, indivíduos com mutações germinativas em genes supressores de tumor apresentam maior probabilidade de desenvolver neoplasia maligna e geralmente o fazem mais precocemente, uma vez que uma das mutações é herdada, basta um único evento mutacional (que inativa o alelo normal) para que haja a formação do câncer (Knudson, 1971).

A proteína E-caderina é membro da família das caderinas, moléculas de adesão que desempenham importante papel na adesão homofílico-homofílico celular e está expressa em todas as células epiteliais. É uma molécula de adesão cálcio-dependente que se liga a outras moléculas de E-caderina em células adjacentes e está localizada nos contatos látero-laterais das células epiteliais. A adesão celular funcional dependente de caderina requer a formação de complexos entre a E-caderina e proteínas citoplasmáticas conhecidas como cateninas (Zhou *et al.*, 2002).

A catenina, que interage com o domínio citoplasmático da E-caderina, consiste de pelo menos três proteínas: alfa (α), beta (β) e gama (γ)-catenina (Yu *et al.*, 2000). A Beta-catenina é importante proteína multifuncional que forma um complexo com E-caderina, enquanto alfa-catenina liga este complexo ao citoesqueleto de actina. A perda da adesão celular pode contribuir para a perda da inibição de contato e assim desenvolve papel no estágio mais precoce do processo neoplásico (Zhou *et al.*, 2002). O papel da adesão celular alterada é crítico para o desenvolvimento de cânceres epiteliais. . A Beta-catenina também é um elemento importante na rota de sinalização *Wnt* durante o desenvolvimento embrionário (Nabais *et al.*, 2003). Segundo Park *et al.*, 1999, níveis elevados de Beta-catenina citoplasmática por mutações no gene da Beta-catenina ou *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) foram propostos como importante passo oncogênico em vários tumores. Estes achados levantam a possibilidade de que mutações da Beta-catenina possam também estar associadas ao desenvolvimento do câncer gástrico.

Estudos prévios mostraram evidências de que a perturbação da adesão celular mediada pela E-caderina está envolvida na progressão tumoral e metástases, apoiando a hipótese de que a E-caderina desempenha papel de gene supressor de tumor. A perda da expressão ou função da E-caderina *in vitro* foi associada com perda da diferenciação e aumento da capacidade de invasão de linhagens celulares cancerosas. Vários tipos de câncer humano exibem expressão alterada da E-caderina, que se correlaciona a alto grau e estágio tumoral avançado. Estas mudanças

podem ser resultado de deleções, mutações pontuais no gene da E-caderina ou metilação nas ilhas CpG na região promotora do gene (Zhou *et al.*, 2002). A mutação e inativação do gene da E-caderina e expressão anormal da sua proteína estão associados à diferenciação de células de fenótipo gástrico (difuso), mas não de fenótipo intestinal (Watari *et al.*, 2004). Mutações no gene da E-caderina foram encontradas em 50% dos carcinomas gástricos difusos, mas não nos carcinomas gástricos do tipo intestinal. Devido à adesão célula-célula mediada pela E-caderina desenvolver papel fundamental na sobrevivência da célula epitelial, mutações na E-caderina podem alterar o comportamento apoptótico das células tumorais.

A primeira descrição de alteração genética originando o câncer gástrico familiar foi a publicação da inativação de linhagem germinativa do tipo *truncation* por mutação no gene da E-caderina / *CDH1* em três famílias da etnia Maori, que apresentavam câncer gástrico com alta agregação familiar e em idade mais jovem do que a observada habitualmente (Guilford *et al.*, 1998). Semelhante resultado foi observado em famílias que apresentavam o mesmo tipo de doença e que eram de ascendência européia (Salahshor *et al.*, 2001). Atualmente, já podemos observar comunicações deste mesmo achado em várias etnias, como por exemplo, em descendentes de africanos (Guilford *et al.*, 1999), japoneses (Shinmura *et al.*, 1999), coreanos (Yoon *et al.*, 1999), entre outros. Entretanto, a frequência de mutações de linhagem germinativa do gene *CDH1* é baixa, mesmo em famílias com agregação de câncer gástrico (Yamada *et al.*, 2007). Kim *et al.*, 2003 relataram recentemente uma mutação de linhagem

germinativa do tipo *missense* no gene do receptor de tirosina-quinase MET em pacientes portadores de câncer gástrico familiar sem mutação de linhagem germinativa do *CDH1*. Esses resultados sugerem que fatores genéticos são importantes para a patogênese do câncer gástrico com agregação familiar e que mutações na linhagem germinativa de outros genes, além do *CDH1*, podem contribuir para o desenvolvimento do câncer gástrico familiar (Yamada *et al.*, 2007).

Em 1999, Caldas *et al.* estabeleceram dois Critérios Clínicos para o diagnóstico de Câncer Gástrico Difuso Hereditário para facilitar a identificação das famílias portadoras de alterações da E-caderina / *CDH1* e que, conseqüentemente, apresentam a síndrome de Câncer Gástrico Difuso Hereditário (CGDH).

Brooks-Wilson *et al.* (2004), estabeleceram sete critérios para o diagnóstico de Câncer Gástrico Familiar (CGF), sendo que os critérios 1 e 2 são os mesmos pré-estabelecidos anteriormente para CGDH:

(1) Dois ou mais casos documentados de câncer gástrico difuso em parentes de primeiro grau, com pelo menos um diagnosticado antes dos 50 anos;

(1A) Dois ou mais casos de câncer gástrico, com pelo menos um câncer gástrico difuso diagnosticado antes dos 50 anos;

(2) Três ou mais casos documentados de câncer gástrico difuso de parente de primeiro grau, diagnosticados em qualquer idade;

(2A) Três ou mais casos de câncer gástrico diagnosticados em qualquer idade, com pelo menos um caso de câncer gástrico difuso documentado;

(3) Indivíduo isolado com câncer gástrico difuso diagnosticado antes dos 45 anos;

(4) Indivíduo isolado com câncer gástrico difuso e carcinoma lobular de mama;

(5) Um membro da família diagnosticado com câncer gástrico difuso e outro com carcinoma lobular de mama;

(6) Um membro da família diagnosticado com câncer gástrico difuso e outro com câncer de cólon;

(7) Câncer gástrico intestinal.

O gene supressor de tumor p53 está localizado no cromossomo 17p, codifica uma proteína nuclear de 53 kD, contém 11 exons e é o mais comumente envolvido na carcinogênese humana (Finlay *et al.*, 1989; Hollstein *et al.*, 1991; Joypaul *et al.*, 1993; Safatle-Ribeiro *et al.*, 1996; Levine, 1997; Chang *et al.*, 2002). Participa da regulação do ciclo celular, causando um efeito inibitório na proliferação e transformação, levando a célula ao repouso na fase G1 do ciclo celular (Levine, 1997). É também responsável pela síntese e reparo do DNA, sendo considerado o “guardião do genoma”. O p53 também é um importante regulador da apoptose celular (Fricke *et al.*, 2003), atua na manutenção da estabilidade genômica, diferenciação celular e apoptose pela ligação dímera do gene Bax com o proto-oncogene Bcl-2. A perda da função do p53 pode resultar em defeito na replicação do DNA e transformação maligna (Nigro *et al.* 1989; Blondal e Benchimol, 1994; Fenoglio-Preiser *et al.*, 2003) com aumento da instabilidade genômica,

mudanças na ploidia e sobrevida das células com aumento de mutações (Levine, 1997).

Em 1988, foram descobertas as mutações do gene p53 e a atividade supressora do p53 selvagem (Vogelstein *et al.*, 1988). Alterações de p53 são demonstradas de 30% a 60% dos tumores gástricos (Chang *et al.*, 2002) e parecem ocorrer no estágio inicial da carcinogênese (Tahara, 1993).

A proteína supressora de tumor p53 serve como mediadora do *growth arrest* ou apoptose em resposta ao estresse celular potencialmente oncogênico tal como danos no DNA, e a perda de função do p53 desempenha, portanto, papel fundamental no desenvolvimento do câncer. Muitas mutações somáticas do gene p53 levam à perda da sua função e são detectadas no câncer gástrico. Mutações na linhagem germinativa do p53 são conhecidas por causarem a Síndrome de Li-Fraumeni (LFS), e uma nova mutação na linhagem germinativa do p53 foi recentemente relatada em pequeno grupo portador de câncer gástrico familiar na Europa e Coreia (Yamada *et al.*, 2007).

O p53 desempenha um importante papel na prevenção do câncer, pois age como fator de transcrição que induz negativamente a expressão de alvos que controlam o crescimento e viabilidade celular (Yamada *et al.*, 2007).

Mutações do p53 freqüentemente aumentam a estabilidade da proteína e, portanto, sua vida média, resultando na possibilidade de caracterização por imunoistoquímica (Fricke *et al.*, 2003), pois a proteína

animal tem vida média muito curta, mensurada em minutos, sendo difícil sua detecção.

O p53 é um fator de transcrição pouco expresso em células normais sendo inativado pela oncoproteína MDM2 e pela ação da ubiquitina, uma vez que, por meio das ubiquitinas, o gene p53 é degradado no proteossomo. A função do p53 é manter a progressão da célula por meio do ciclo celular, porém, caso haja dano ao DNA, o p53 participa do reparo do DNA, atua na parada do ciclo celular pela ativação dos genes p16^{INK4a} e p21 e também participa de apoptose por meio do proto-oncogene Bcl-2 caso o dano não possa ser reparado.

Demonstrou-se que hiperexpressão e mutação de p53 foram detectadas em mucosa gástrica benigna, adjacente ao tumor (Safatle-Ribeiro *et al.*, 1996). Alteração de p53 foi demonstrada em cerca de 37,5% dos casos de metaplasia intestinal, de 30% a 58,3% nos adenomas gástricos ou displasia e de 43% a 66,7% nos carcinomas gástricos, indicando que o p53 participa das fases iniciais de carcinogênese gástrica (Tahara, 1993). Em 2003, Fricke *et al.*, demonstraram que a expressão de TP53 é significativamente mais frequente em tumores sem mutações na E-caderina (62,5%) do que em adenocarcinomas gástricos com mutações na E-caderina (18,8%) com $p=0,03$. Estes dados sugerem que mais de uma via de carcinogênese pode estar envolvida no desenvolvimento do CGF.

A perda da função de p53 poderia decorrer de: 1) mutações; 2) deleções bi-alélicas dos genes resultando em perda de TP53 e 3) polimorfismos genéticos que podem resultar em diferentes proteínas

codificadas. Células com disfunção de p53 seriam, portanto, mais propensas a adquirirem outras mutações em outros oncogenes ou genes supressores de tumor. Como o câncer requer múltiplas alterações gênicas, a inativação de p53 poderia iniciar este processo.

As mutações são, preferencialmente, localizadas nas chamadas regiões de “*hot spots*”, nos exons 5 a 8, sendo detectadas nessas regiões clássicas conservadas (Nigro *et al.*, 1989). São freqüentemente mutações do tipo *missense*, ou seja, ocorrem quando a substituição de uma base por outra no DNA promove a substituição de um aminoácido por outro e, conseqüentemente, a proteína é alterada.

As alterações genéticas podem ocasionar mudança na expressão protéica. Existem várias técnicas com a finalidade de verificar essa alteração na expressão. Uma das metodologias mais úteis empregadas para avaliar a expressão protéica é a imunoistoquímica (IHQ). Segundo Ohene-Abuakwa *et al.* (2000), a expressão anormal da E-caderina e Beta-catenina caracteriza-se por baixa expressão, coloração citoplasmática ou perda de imunorreatividade membranosa (Tanaka *et al.*, 2002; Jankowski *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 2002). Estas alterações são mais frequentes nos tipos difuso e misto do que no tipo intestinal. A associação com baixa sobrevida sugere que o complexo da E-caderina possa ser marcador prognóstico útil para aprimorar a análise patológica tecidual, modificar o seguimento e vigilância e orientar a conduta terapêutica (Zhou *et al.*, 2002).

Realizou-se previamente nesta Instituição, investigação genética por sequenciamento dos 16 exons do *CDH1*, observando-se diversas alterações,

incluindo polimorfismos e mutações. É, portanto, relevante o estudo da imunoexpressão da E-caderina para se avaliar a significância clínica destas alterações.

A melhor compreensão dos mecanismos de progressão da lesão pode trazer informações importantes para futuros métodos diagnósticos, estratégias de prevenção além da modificação e criação de tratamentos alternativos.

Apesar de haver imunoistoquímica de câncer gástrico, seria muito importante análise de Câncer Gástrico Familiar e Câncer Gástrico Difuso Hereditário.

As alterações genéticas no gene CDH1 que encontramos em trabalho prévio, uma mutação *missense*, uma alteração rara na região promotora do gene e diversos polimorfismos, precisam ser analisadas sob o ponto de vista protéico.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- 1) Analisar a imunexpressão da E-caderina, Beta-catenina e TP53 em adenocarcinomas gástricos de pacientes com Câncer Gástrico Familiar (CGF);
- 2) Comparar os achados da imunexpressão destes marcadores com os dados clínico-patológicos;
- 3) Averiguar a imunexpressão da E-caderina nas variantes: 1. na região promotora (-54 G>C) e 2. no exon 12 (1849 G>A), do gene CDH1, detectadas previamente nesta instituição.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

No período de novembro de 2001 a julho de 2004, 34 pacientes com diagnóstico de câncer gástrico, membros de 34 famílias distintas, foram selecionados previamente no Serviço de Estômago, Duodeno e Intestino Delgado da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) para estudo de rastreamento de alterações genéticas em portadores de câncer gástrico familiar, incluindo-se a síndrome de câncer gástrico difuso hereditário. Após a revisão histopatológica dos 34 casos, 26 adenocarcinomas gástricos em blocos de parafina foram selecionados para o presente estudo.

Os critérios utilizados para inclusão dos pacientes neste protocolo de pesquisa foram os mesmos criados recentemente por Brooks-Wilson *et al.* (2004) para o diagnóstico de CGF. Na tabela 1, está representada a distribuição da casuística de acordo com os referidos critérios clínicos.

O critério de número oito, que se denominou como “outros”, inclui os pacientes que não se enquadraram em nenhum dos critérios descritos previamente por Brooks-Wilson *et al.* (2004). Nesta casuística há cinco casos-índices classificados como critério oito e todos foram diagnosticados com câncer gástrico do tipo difuso de Laurén. O caso-índice nº 3 foi diagnosticado aos 60 anos e apresenta familiares com câncer de pulmão,

câncer de útero e câncer de rim, porém é o único indivíduo com câncer gástrico na família. O caso-índice nº 11 foi diagnosticado aos 56 anos e seu familiar apresentou câncer gástrico aos 51 anos, apesar de termos a comprovação histológica do tipo difuso de Laurén do próprio caso-índice e do irmão acometido, não foi possível classificá-lo como critério 1 devido à idade de aparecimento do câncer no irmão ser 51 anos. Os casos-índices nº 16, nº 20 e nº 21 foram diagnosticados aos 54, 51 e 75 anos de idade, respectivamente, sendo casos isolados de câncer gástrico na família.

Critério Clínico	Famílias (n)	Caso-índice	Descrição
1A	7	(2, 5, 8, 12, 15, 18, 22)	CGF
2A	3	(1, 6, 7)	CGF
3	4	(10, 13, 19, 24)	CGF
7	7	(4, 9, 14, 17, 23, 25, 26)	CGF
8	5	(3, 11, 16, 20, 21)	Outros
TOTAL	26		

Tabela 1. Distribuição dos pacientes de acordo com o critério clínico.

3.2 Critérios de inclusão

Respeitaram-se os Critérios Clínicos para o Diagnóstico de Câncer Gástrico Familiar descritos previamente por Brooks-Wilson *et al.* (2004).

3.3 Critérios de exclusão

Sete casos foram excluídos devido a material biológico insuficiente e um caso pertencia à outra instituição.

3.4 Dados clínico-patológicos e material biológico

Os dados clínico-patológicos, as lâminas e os blocos de parafina dos adenocarcinomas gástricos foram obtidos no Departamento de Anatomia Patológica do HC-FMUSP.

3.5 Local do estudo

Os cortes dos tecidos em blocos de parafina para a confecção das lâminas, assim como o estudo imunoistoquímico, foram realizados no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas – LIM 50 (chefiado pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.6 Estudo imunoistoquímico

Estudaram-se E-caderina, Beta-catenina, e TP53.

Dos blocos de tecido fixados em formalina e incluídos em parafina, realizaram-se cortes histológicos de 4µm, para as avaliações histológica (hematoxilina e eosina) e imunoistoquímica (Franco, 2006).

A técnica imunoistoquímica teve por base experiências descritas anteriormente (Hsu *et al.*, 1981; Ribeiro Jr. *et al.*, 1996; Safatle-Ribeiro *et al.*, 1996; Safatle-Ribeiro *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 1991) e padronizada no Instituto Adolfo Lutz (Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves) e na Faculdade de

Medicina da Universidade de São Paulo - LIM 50 (Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett). Os cortes histológicos foram colocados em banho-maria a 60 °C por 24 horas. As lâminas foram lavadas em xilol e rehidratadas com álcool de várias gradações.

A atividade da peroxidase endógena foi eliminada utilizando-se peróxido de hidrogênio a 4% em metanol, por 30 minutos. Em seguida, foram lavados com solução salina fosfatada e tamponada (PBS) e incubados com 10% de soro de cavalo para bloquear as ligações não-específicas. Após remoção do soro, aplicou-se o respectivo anticorpo monoclonal primário - anti-E-caderina (DakoCytomation, Clone NCH-38, Biogen), anti-Beta-catenina (DakoCytomation, Clone β -Catenina-1, Biogen) ou anti-p53 (DakoCytomation, Clone DO-7, Biogen). Após nova lavagem com PBS, com três trocas, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário, biotina do LASB + System (DakoCytomation, K0690, EUA), por 30 minutos a 37 °C, lavados três vezes e tratados com o complexo da streptavidina-peroxidase LSAB + System (DakoCytomation, K0690, EUA).

Foram realizadas três novas lavagens com PBS e incubados em solução de diaminobenzidina tetrahydroclorato / PBS (Sigma, D-5637, EUA) a 0,06%, 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 6%, durante cinco minutos a 37 °C ao abrigo da luz. Os cortes foram lavados com água destilada, contra-corados com hematoxilina de Harris e desidratados através de álcoois e xilol com posterior montagem em lâminas com Entellan (Laboratório Merck, 107961, Alemanha). Cortes histológicos de adenocarcinoma gástrico foram usados como controles positivos. Para

garantir a uniformidade das reações viabilizando a análise imunoistoquímica semi-quantitativa, a determinação de cada antígeno foi efetuada em única reação. Os controles negativos corresponderam a cortes histológicos de adenocarcinoma gástrico com a omissão do anticorpo primário que foi substituído por PBS.

3.7 Análise da imunoexpressão

Todos os cortes histológicos foram examinados e classificados usando-se sistema pré-definido de graduação. A reatividade nuclear e citoplasmática/membranosa foi classificada semiquantitativamente numa escala de 0 a 4 para a intensidade e distribuição (intensidade: 0 = ausência de coloração; 1 = coloração dificilmente visível; 2 = facilmente visível, contudo fraca; 3 = intensa, porém não tanto quanto o controle; e 4 = coloração tão intensa quanto o controle; distribuição: 0 = ausência de coloração ou < 10% da amostra corada; 1 = células positivas esparsas, entre 11% e 25% da amostra; 2 = várias áreas de positividade entre 26% e 50%; 3 = positividade difusa equivalente a até 75% das células; e 4 = quase todas células uniformemente positivas ou acima de 75%) (Franco, 2006).

3.8 Análise da imunoexpressão da E-caderina e Beta-catenina

A coloração específica para E-caderina e Beta-catenina corresponde à reatividade citoplasmática/membranosa.

Foi considerada alterada para os marcadores E-caderina e Beta-catenina quando a reatividade da leitura foi < 1 na escala 1, 2, 3 ou 4 para intensidade e distribuição.

3.9 Análise da imunoexpressão de TP53

A coloração específica para TP53 corresponde à reatividade nuclear.

Foi considerada positiva para o marcador TP53 quando a intensidade de leitura foi classificada como maior do que 2 na escala e a distribuição como 2, 3 ou 4.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram analisados usando-se os testes t de Student e exato de Fisher com auxílio do programa estatístico SPSS para Windows, versão 10.0 (SPSS Inc, Philadelphia, Pensylvania, EUA) com valor $p < 0,05$ considerado significativo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

O gráfico 1 mostra a localização do tumor. Observa-se a predominância no antro em 61,5% da casuística, seguido do fundo com 23,1%.

A distribuição dos tumores segundo a classificação histológica de Lauren está representada no gráfico 2, sendo que 76,9% dos tumores eram do tipo difuso.

O gráfico 3 mostra a distribuição dos pacientes quanto ao gênero. Catorze casos pertencem ao sexo masculino (53,8%) e 12 casos, ao sexo feminino (46,2%).

A distribuição quanto à presença de *Helicobacter pylori*, representada no gráfico 4, mostra que 31% dos casos eram negativos, 11% positivo e em 58% dos casos o exame não foi realizado.

A média de idade dos pacientes foi de 49,6 anos, variando entre 13 e 80 anos.

Gráfico 1. Localização do tumor em pacientes com CGF.

Gráfico 2. Distribuição dos tumores segundo a classificação histológica de Laurén.

Gráfico 3. Distribuição dos pacientes quanto ao gênero.

Gráfico 4. Distribuição dos pacientes quanto à presença de *H.pylori*.

4.2 Imunoexpressão da E-caderina

O gráfico 5 mostra a imunoexpressão de E-caderina em pacientes com CGF. Onze casos (42,3%) mostraram-se alterados para a imunoexpressão da E-caderina e 15 casos (57,7%), normais.

Gráfico 5. Imunoexpressão da E-caderina em pacientes com CGF.

A figura 3a representa o adenocarcinoma gástrico do caso-índice nº 14, cuja imunoexpressão da E-caderina apresentou-se normal (x 200). Na figura 3b, observa-se a imunoexpressão da E-caderina em maior aumento (x 400).

Figura 3a. Imunoexpressão normal da E-caderina em adenocarcinoma gástrico (CGF), (x 200).

A figura 3a demonstra imunoistoquímica normal para E-caderina em adenocarcinoma gástrico. Observa-se imunorreatividade membranosa e citoplasmática em quase todas as células.

Figura 3b. Imunoexpressão normal da E-caderina em adenocarcinoma gástrico (CGF) em maior aumento (x 400).

A figura 3b ilustra membranas celulares coradas em marrom.

A foto do adenocarcinoma gástrico do caso-índice nº 8 está representada na figura 4a, onde a imunoexpressão da E-caderina apresentou-se alterada (x 200) e a figura 3b representa a ausência de imunorreatividade da E-caderina em maior aumento (x 400).

Figura 4a. Imunoexpressão alterada da E-caderina em adenocarcinoma gástrico (CGF), (x 200).

Na figura 4a nota-se a ausência de expressão da E-caderina em adenocarcinoma gástrico do tipo difuso.

Figura 4b. Imunoexpressão alterada da E-caderina em adenocarcinoma gástrico (CGF) em maior aumento (x 400).

A figura 4b apresenta ausência de imunorreatividade da E-caderina.

4.3 Imunoexpressão da Beta-catenina

O gráfico 6 mostra a imunoexpressão da Beta-catenina em pacientes com CGF. Assim como a E-caderina, 11 casos (42,3%) mostraram-se alterados para a imunoexpressão da Beta-catenina e 15 casos (57,7%), normais.

Gráfico 6. Imunoexpressão da Beta-catenina em pacientes com CGF.

Figura 5a. Imunoexpressão normal da Beta-catenina em adenocarcinoma gástrico (CGF), (x 100).

A figura 5a demonstra a imunorreatividade da Beta-catenina revelando coloração citoplasmática e membranosa no tecido gástrico tumoral (x100).

Figura 5b. Imunoexpressão alterada da Beta-catenina em adenocarcinoma gástrico (CGF), (x 200).

Na figura 3b nota-se a perda de expressão da Beta-catenina em adenocarcinoma gástrico do tipo difuso (x200).

4.4 Imunoexpressão de TP53

O gráfico 7 mostra a imunoexpressão de TP53 em pacientes com CGF. 12 casos (46,2%) mostraram-se alterados para a imunoexpressão de TP53 e 14 casos (53,8%), normais.

Gráfico 7. Imunoexpressão de TP53 em pacientes com CGF.

A análise imunoistoquímica de TP53 revelou padrão variável de coloração, desde completamente ausente até distribuição difusa e com intensa reatividade.

A figura 6a apresenta imunoexpressão de TP53 do caso-índice número 14, que demonstrou padrão normal para as proteínas E-caderina e Beta-catenina.

Em contrapartida, a foto do caso-índice número 8 (Figura 6b) mostra reação negativa para TP53, que demonstrou padrão alterado para as proteínas E-caderina e Beta-catenina.

Figura 6a. Imunoistoquímica positiva de TP53 em adenocarcinoma gástrico (CGF), (x 400).

A figura 6a demonstra imunorreatividade nuclear de TP53 em adenocarcinoma gástrico (CGF).

Figura 6b. Imunoexpressão normal de TP53 em adenocarcinoma gástrico (CGF), (x 400).

A figura 6b apresenta ausência de imunorreatividade para TP53 em CGF (x 400), o que caracteriza o padrão normal desta proteína.

Quadro 1. Imunoexpressão da E-caderina, Beta-catenina e TP53 dos casos-índices.

Nº caso-índice	E-caderina	Beta-catenina	TP53
1	Normal	Normal	Alterado
2	Normal	Normal	Alterado
3	Normal	Normal	Normal
4	Normal	Normal	Alterado
5	Normal	Normal	Normal
6	Alterada	Alterada	Alterado
7	Alterada	Alterada	Normal
8	Alterada	Alterada	Normal
9	Alterada	Alterada	Normal
10	Normal	Alterada	Normal
11 *	Alterada	Alterada	Normal
12	Alterada	Normal	Normal
13	Alterada	Alterada	Normal
14 ♂	Normal	Normal	Alterado
15	Normal	Alterada	Alterado
16	Normal	Normal	Alterado
17	Normal	Normal	Alterado
18	Alterada	Alterada	Normal
19	Normal	Normal	Alterado
20	Normal	Alterada	Normal
21	Alterada	Normal	Alterado
22	Alterada	Alterada	Normal
23	Normal	Normal	Normal
24	Alterada	Normal	Normal
25	Normal	Normal	Alterado
26	Normal	Normal	Alterado

* Mutao *missense* encontrada no gene CDH1 em estudo prvio.

♂ Polimorfismo raro detectado no gene CDH1 em estudo prvio.

4.5 Análise estatística

A tabela 2 apresenta os dados clínico-patológicos dos adenocarcinomas gástricos e a imunexpressão da E-caderina. Após aplicação do teste exato de Fisher, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre a imunexpressão da E-caderina e a classificação histológica de Laurén ($p = 0,02$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre idade, gênero e localização do tumor.

A tabela 3 mostra a comparação entre os resultados de estudo prévio, encontrados no gene CDH1, e o presente estudo. Um caso foi encontrado alterado em ambos os estudos, outro caso apresentou-se normal no presente estudo, porém alterado no rastreamento de alterações genéticas do gene CDH1. Dez casos apresentaram-se alterados para a imunexpressão da E-caderina, mas normais para alterações genéticas no gene CDH1 e finalmente, 14 casos eram normais em ambos os estudos. Após aplicação do teste exato de Fisher, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos dois estudos ($p = 0,7$).

Após aplicação do teste exato de Fisher, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre a imunexpressão da Beta-catenina e os dados clínico-patológicos. No entanto, houve associação inversa entre a imunexpressão da E-caderina e TP53 ($p=0,01$) (Tabela 4).

Tabela 2. Dados clínico-patológicos dos adenocarcinomas gástricos e imunoexpressão da E-caderina.

	n		%	p
Pacientes	26			
Média Idade (anos)	49,6 DP = 16,2			NS
Gênero	Normal	Alterada		
Masculino	9	5	53,8	NS
Feminino	6	6	46,2	
Localização Tumor	Normal	Alterada		
Antro	7	9	61,5	NS
Fundo	5	1	23,1	
Corpo	2	0	7,7	
Não especificado	1	1	7,7	
Classificação de Laurén	Normal	Alterada		
Difuso	9	11	76,9	0,02
Intestinal	6	0	23,1	

Tabela 3. Comparação entre os resultados de estudo prévio, encontrados no gene CDH1, e o presente estudo.

Imunoexpressão E-caderina \ Alterações genéticas CDH1	Alterado	Normal
	Alterado	Normal
Alterado	1	10
Normal	1	14

p=0,7

Tabela 4. Comparação da imunoexpressão entre E-caderina e TP53.

E-caderina \ TP53	Alterada	Normal
	Alterada	Normal
Alterada	2	9
Normal	10	4

p=0,01

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A patogênese do câncer gástrico permanece desconhecida. Apesar das inúmeras alterações genéticas ou moleculares descritas em carcinoma gástrico, a sequência exata desses acontecimentos ainda está para ser estabelecida (Delchier et al., 1998).

Estudos histopatológicos indicam que a gastrite atrófica e metaplasia intestinal representam importantes passos intermediários na patogênese do câncer gástrico do tipo intestinal (Tahara et al., 1996). Por outro lado, tais lesões pré-cancerosas não são encontradas no carcinoma do tipo difuso (Tahara, 1995). Estes estudos sugerem rotas de carcinogênese e progressão distintas nos dois tipos de carcinoma gástrico. O primeiro passo que leva à invasão tecidual e metástase requer modulação nas interações célula-célula (Tanaka et al., 2002).

Sabe-se que o tipo histológico difuso de Laurén pode estar associado à alteração da proteína E-caderina, conforme demonstrado por Fiocca *et al.* em 2001. Outros estudos prévios também demonstram essa relação, de acordo com Syrigos et al. (1995), Gabbert et al. (1996), Jawhari et al. (1997), e Blok et al. (1999). Nosso estudo confirmou os achados destes grupos e levanta questionamentos no subgrupo de CGF sobre o manejo clínico dos portadores de mutação no gene CDH1. Estudos adicionais são necessários para determinar a penetrância de mutações de linhagem germinativa do CDH1 e o manejo adequado dos indivíduos com tais mutações.

Masciari *et al.* (2007) demonstraram que diversos métodos de detecção possuem baixa sensibilidade para detectar câncer gástrico precoce em pacientes portadores da síndrome de CGDH, incluindo endoscopia, ultrassom endoscópico, cromoendoscopia e PET scan, que falharam em detectar câncer gástrico difuso precoce em seis pacientes na semana anterior à gastrectomia profilática.

A imunoistoquímica, ao combinar técnicas anatomopatológicas, imunológicas e bioquímicas, permite localizar componentes tissulares definidos mediante o uso de anticorpos específicos e de moléculas marcadas.

A marcação de anticorpos com diversas enzimas (principalmente a peroxidase) possibilitou localizar determinantes antigênicos em células de tecidos fixados e processados por métodos histológicos convencionais.

A técnica imunoistoquímica se baseia numa reação antígeno-anticorpo. Para a identificação de uma proteína (antígeno) específica, um determinado anticorpo reconhecerá um domínio específico. O anticorpo liga-se ao antígeno específico, que por sua vez é reconhecido por um anticorpo secundário, ao qual se liga o complexo enzimático streptavidina-biotina-peroxidase. A peroxidase transforma uma substância cromogênica, em geral a diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB), que confere à reação positiva uma coloração acastanhada.

Os achados de Tanaka *et al.*, (2002), sugerem que anormalidades na E-caderina e Beta-catenina provavelmente ocorrem em fase tardia na progressão do câncer gástrico em carcinomas diferenciados e que as

mesmas anormalidades contribuem para a carcinogênese do câncer gástrico precoce nos carcinomas não-diferenciados.

Uma vez que a E-caderina e Beta-catenina são componentes cruciais para a formação do complexo de adesão célula-célula, a sua perda pode resultar em perturbação da função do complexo, que pode causar adesão celular fraca e conferir propriedades invasivas ao tumor. Além disso, a adesão celular reduzida está associada à perda da inibição de contato, permitindo assim falha na sinalização do controle de crescimento, desencadeando a carcinogênese humana (Huiping et al., 2001).

O sistema de adesão celular mediada pela E-caderina é conhecido por atuar como “sistema supressor de invasão” (Shiozaki et al., 1996; Rugge et al. 2000; Lee et al., 2001) e os tumores com imunoexpressão reduzida de E-caderina também foram relatados como tendo maior frequência de envolvimento linfonodal, metástases à distância e maior grau morfológico de invasão tecidual do que aqueles tumores com imunoexpressão preservada (Takeichi, 1993).

No presente estudo, a imunoistoquímica para a E-caderina e Beta-catenina nos tumores variou desde totalmente ausente (0/0) até as membranas intensamente coradas com ampla distribuição pelo tumor (4/4). Foi possível estabelecer associação entre a E-caderina e o tipo histológico difuso de Laurén, com resultados semelhantes aos da literatura. Em contrapartida, não foi possível estabelecer relação entre a proteína Beta-catenina e os dados clínico-patológicos.

A comparação entre os resultados de estudo prévio, encontrados no gene CDH1, e a presente investigação mostra que há diferenças entre os métodos de detecção de alterações genéticas e moleculares, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. A mutação genética *missense* detectada no caso-índice nº 8 pode estar relacionada à alteração no padrão de imunoexpressão da proteína E-caderina encontrada no mesmo caso, porém estudos adicionais são necessários para análise detalhada. No entanto, não podemos relacionar o polimorfismo raro do caso-índice nº 14 uma vez que não houve alteração na imunoexpressão da E-caderina.

A análise imunoistoquímica de TP53 revelou padrão variável de coloração, desde completamente ausente até distribuição difusa e com intensa reatividade. Entre estes extremos, a intensidade e distribuição da coloração variaram de fraco/localizado para fraco/difuso, ou intenso/localizado e houve a associação inversa entre a imunoexpressão de E-caderina e TP53.

Estes resultados sugerem que assim como a E-caderina e Beta-catenina, o p53 deve ser incluído no rastreamento de famílias portadoras de câncer gástrico familiar.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. O tipo difuso de Laurén mostrou estar associado à alteração da imunoexpressão da E-caderina no Câncer Gástrico Familiar;
2. Não houve associação entre a imunoexpressão da E-caderina, idade, gênero e localização do tumor, tampouco entre a imunoexpressão da Beta-catenina e os dados clínico-patológicos; houve associação inversa entre a imunoexpressão de E-caderina e TP53.
3. No casos em que foram detectadas alterações na imunoexpressão destes marcadores, parece haver duas rotas distintas de carcinogênese envolvidas no desenvolvimento do CGF; a alteração na imunoexpressão da E-caderina pode estar relacionada à alteração genética *missense* detectada em estudo prévio nesta Instituição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Blok P, Craanen ME, Dekker W, Tytgat GN. Loss of E-cadherin expression in early gastric cancer. *Histopathology*. 1999 Nov;35(5):477-8.

Blondal JA, Benchimol S. The role of p53 in tumor progression. *Semin Cancer Biol*. 1994 Jun;5(3):177-86.

Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, Leach S, Senz J, Grehan N, Butterfield YS, Jeyes J, Schinas J, Bacani J, Kelsey M, Ferreira P, MacGillivray B, MacLeod P, Micek M, Ford J, Foulkes W, Australie K, Greenberg C, LaPointe M, Gilpin C, Nikkel S, Gilchrist D, Hughes R, Jackson CE, Monaghan KG, Oliveira MJ, Seruca R, Gallinger S, Caldas C, Huntsman D. Germline *E-cadherin* mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet*. 2004 Jul;41(7):508-17.

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 Dec;36(12):873-80.

Camargo AA, Neto ED, Simpson AJG. Mutao e cncer. In: Rossi BM, Pinho M, editores. *Gentica e biologia molecular para o cirurgo*. So Paulo: Lemar;1999;111-23.

Chang MS, Kim HS, Kim CW, Kim YI, Lan Lee B, Kim WH. Epstein-Barr virus, p53 protein, and microsatellite instability in the adenoma-carcinoma sequence of the stomach. *Hum Pathol*. 2002 Apr;33(4):415-20.

Delchier JC, Ebert M, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* in gastric lymphoma and carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol*. 1998; (14)Supl 1: s41-5.

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

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. 1989 Jun 30;57(7):1083-93.

Fiocca R, Luinetti O, Villani L, Mastracci L, Quilici P, Grillo F, Ranzani GN. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of gastric carcinoma: interactions between genetic alterations, cellular phenotype and cancer histotype. *Hepatogastroenterol*. 2001 Nov-Dec;48(42):1523-30.

Franco, K. A. T. Adenomas gstricos: caracterizao do tipo histolgico atravs de mucinas e imunoexpresso de marcadores moleculares.

[Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Fricke E, Keller G, Becker I, Rosivatz E, Schott C, Plaschke S, Rudelius M, Hermannstadter C, Busch R, Hofler H, Becker KF, Lubert B. Relationship between *E-cadherin* gene mutation and p53 gene mutation, p53 accumulation, Bcl-2 expression and Ki-67 staining in diffuse-type gastric carcinoma. *Int J Cancer*. 2003 Mar 10;104(1):60-5.

Gabbert HE, Mueller W, Schneiders A, Meier S, Moll R, Birchmeier W, Hommel G. Prognostic value of E-cadherin expression in 413 gastric carcinomas. *Int J Cancer*. 1996 Jun 21;69(3):184-9.

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 Mar 26;392(6674):402-5.

Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, Markowitz SD, Willis J, Lynch H, Rajput A, Wiesner GL, Lindor NM, Burgart LJ, Toro TT, Lee D, Limacher JM, Shaw DW, Findlay MP, Reeve AE. *E-cadherin* germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat*. 1999;14(3):249-55.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991 Jul 5;253(5015):49-53.

Hsu AM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1981 Nov; 29(11): 1349-53.

Huiping C, Kristjansdottir S, Jonasson JG, Magnusson J, Egilsson V, Ingvarsson S. Alterations of E-cadherin and beta-catenin in gastric cancer. *BMC Cancer*. 2001;1:16.

Jankowski JA, Goodlad RA, Wright NA. Maintenance of normal intestinal mucosa: function, structure, and adaptation. *Gut*. 1994 Jan; 35(1 Suppl):S1-4.

Jawhari A, Jordan S, Poole S, Browne P, Pignatelli M, Farthing MJ. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterology*. 1997 Jan;112(1):46-54.

Joypaul BV, Newman EL, Hopwood D, Grant A, Qureshi S, Lane DP, Cuschieri A. Expression of p53 protein in normal, dysplastic, and malignant gastric mucosa: an immunohistochemical study. *J Pathol*. 1993 Jul;170(3):279-83.

Kim IJ, Park JH, Kang HC, Shin Y, Lim SB, Ku JL, Yang HK, Lee KU, Park JG. A novel germline mutation in the MET extracellular domain in a Korean

patient with the diffuse type of familial gastric cancer. *J Med Genet.* 2003 Aug;40(8):e97.

Knudson AG Jr., Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971 Apr;68(4):820-3.

Lee JH, Koh JT, Shin BA, Ahn KY, Roh JH, Kim YJ, Kim KK. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. *Int J Oncol.* 2001 Feb;18(2):355-61.

Levine AJ. (1997). *Cell*, 88: 323-331.

Masciari S, Larsson N, Senz J, Boyd N, Kaurah P, Kandel MJ, Harris LN, Pinheiro HC, Troussard A, Miron P, Tung N, Oliveira C, Collins L, Schnitt S, Garber JE, Huntsman D. Germline E-cadherin mutations in familial lobular breast cancer. *J Med Genet.* 2007 Nov;44(11):726-31.

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

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature.* 1989 Dec 7;342(6250):705-8.

Ohene-Abuakwa Y, Noda M, Perenyi M, Kobayashi N, Kashima K, Hattori T, Pignatelli M. Expression of the *E-cadherin/catenin* (alpha-, beta-, and gamma-) complex correlates with the macroscopic appearance of early gastric cancer. *J Pathol.* 2000 Dec;192(4):433-9.

Oliveira C, Ferreira P, Nabais S, Campos L, Ferreira A, Cirnes L, Alves CC, Veiga I, Fragoso M, Regateiro F, Dias LM, Moreira H, Suriano G, Machado JC, Lopes C, Castedo S, Carneiro F, Seruca R. E-Cadherin (*CDH1*) and p53 rather than SMAD4 and Caspase-10 germline mutations contribute to genetic predisposition in Portuguese gastric cancer patients. *Eur J Cancer.* 2004 Aug;40(12):1897-903.

Park WS, Oh RR, Park JY, Lee SH, Shin MS, Kim YS, Kim SY, Lee HK, Kim PJ, Oh ST, Yoo NJ, Lee JY. Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res.* 1999 Sep 1;59(17):4257-60.

Ribeiro Jr U, Posner MC, Safatle-Ribeiro AV, Reynolds JC. Risk factors for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Br J Surg.* 1996 Sep; 83(9): 1174-85.

Rocco A, Staibano S, Ottini L, Mezza E, Somma P, Mariani-Costantini R, Budillon G, Nardone G. Is there a link between environmental factors and a genetic predisposition to cancer? A lesson from a familial cluster of gastric

cancers. *Eur J Cancer*. 2003 Jul;39(11):1619-24.

Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, Riddell RH, Sipponen P, Watanabe H. Gastric dysplasia: the Padova international classification. *Am J Surg Pathol*. 2001 May;25(5):694.

Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Jr U, Reynolds JC, Gama-Rodrigues JJ, Iriya K, Kim R, Bakker A, Swalsky PA, Pinotti HW, Finkelstein SD. Morphologic, histologic, and molecular similarities between adenocarcinomas arising in the gastric stump and the intact stomach. *Cancer*. 1996 Dec; 78(11):2288-99.

Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Jr U, Lopasso FP, Deutsch C, Mucerino DR, Arab-Fadul R, Mester M, Gama-Rodrigues JJ. Fatores de risco para o câncer gástrico. In: Gama-Rodrigues JJ, Lopasso FP, Del Grande JC, Safatle NF, Bresciani C, Malheiros CA, Lourenço LG, Kassab P, editores. Câncer de estômago: aspectos atuais do diagnóstico e tratamento. São Paulo: Andrei; 2002. 29-58.

Salahshor S, Haixin L, Huo H, Kristensen VN, Loman N, Sjoberg-Margolin S, Borg A, Borresen-Dale AL, Vorechovsky I, Lindblom A. Low frequency of *E-cadherin* alterations in familial breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2001;3(3):199-207.

Shi SR, Key ME, Kabra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 1991 Jun; 39(6):741-8.

Shinmura K, Kohno T, Takahashi M, Sasaki A, Ochiai A, Guilford P, Hunter A, Reeve AE, Sugimura H, Yamaguchi N, Yokota J. Familial gastric cancer: clinicopathological characteristics, RER phenotype and germline p53 and *E-cadherin* mutations. *Carcinogenesis*. 1999 Jun;20(6):1127-31.

Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M, et al. Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol*. 1991 Jul;139(1):17-23.

Syrigos KN, Krausz T, Waxman J, Pandha H, Rowlinson-Busza G, Verne J, Epenetos AA, Pignatelli M. E-cadherin expression in bladder cancer using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with histopathological grade, tumour stage and survival. *Int J Cancer*. 1995 Dec 20;64(6):367-70.

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

Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. *Cancer*. 1995 Mar 15;75(6 Suppl):1410-7.

Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol*. 1996 Jun;23(3):307-15.

Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol*. 1993 Oct;5(5):806-11.

Tanaka Y, Notohara K, Kato K, Ijiri R, Nishimata S, Miyake T, Fukunaga M, Horisawa M, Nakatani Y. Usefulness of beta-catenin immunostaining for the differential diagnosis of solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas. *Am J Surg Pathol*. 2002 Jun;26(6):818-20.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):525-32.

Watari J, Saitoh Y, Fujiya M, Shibata N, Tanabe H, Inaba Y, Okamoto K, Maemoto A, Ohta T, Yasuda A, Ayabe T, Ashida T, Yokota K, Obara T, Kohgo Y. Reduction of syndecan-1 expression in differentiated type early gastric cancer and background mucosa with gastric cellular phenotype. *J Gastroenterol*. 2004;39(2):104-12.

Wilner, G. Alterações genéticas da E-caderina / *CDH1* no câncer gástrico familiar [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

Yamada H, Shinmura K, Okudela K, Goto M, Suzuki M, Kuriki K, Tsuneyoshi T, Sugimura H. Identification and characterization of a novel germ line p53 mutation in familial gastric cancer in the Japanese population. *Carcinogenesis*. 2007 Sep;28(9):2013-8.

Yoon KA, Ku JL, Yang HK, Kim WH, Park SY, Park JG. Germline mutations of *E-cadherin* gene in Korean familial gastric cancer patients. *J Hum Genet*. 1999;44(3):177-80.

Yu J, Ebert MP, Miehlike S, Rost H, Lendeckel U, Leodolter A, Stolte M, Bayerdörffer E, Malfertheiner P. Alpha-catenin expression is decreased in human gastric cancers and in the gastric mucosa of first degree relatives. *Gut*. 2000 May;46(5):639-44.

Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of *E-cadherin* and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol*. 2002 Dec;8(6):987-93.