UANA MARIA MIGUEL JORGE

**Tumores gástricos primários múltiplos e únicos:
análise imunohistoquímica comparativa**

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. Ulysses Ribeiro Junior

São Paulo

2006

UANA MARIA MIGUEL JORGE

**Tumores gástricos primários múltiplos e únicos:
análise imunohistoquímica comparativa**

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. Ulysses Ribeiro Junior

São Paulo

2006

DEDICATÓRIA

Ao **Gerson**, querido esposo, agradeço pelo amor, paciência e alegria que tem me proporcionado por tantos anos.

A **Bárbara** e **Juliana**, amadas filhas, razão da minha vida, luta e esforço.

Ao meu primeiro amor, minha falecida mãe **Carolina**, cuja saudosa lembrança é minha inspiração vivificante.

Ao meu pai, irmãos e todos os parentes que constituem o meu núcleo familiar, alicerce de todos os caminhos de minha vida.

A **Deus** Onipotente, agradeço todas as oportunidades que tenho recebido, vergando-me humildemente sob o seu manto protetor.

À Prof. Dra. **Angelita Habr-Gama** e ao Prof. Dr. **Joaquim Gama-Rodrigues**, exemplos de sucesso acadêmico e profissional, pelo inestimável apoio científico e suporte financeiro através do centro de Estudos em Coloproctologia e Cirurgia do Aparelho Digestivo Professor Alípio Corrêa Neto (CECCAD), meu muito obrigada.

Ao Prof. Dr. **Ulysses Ribeiro Júnior**, pela sua orientação firme e segura, e pela sua capacidade ímpar de transmitir seus conhecimentos de forma didática e precisa.

À Dra. **Adriana Vaz Saflate-Ribeiro**, pela intensa e contínua colaboração.

Ao Dr. **Osmar Kenji Yagi**, sempre disposto a lançar idéias, que muito me ajudaram no nosso convívio laboratorial diário.

Ao Dr. **Edwin Roger Parra Cuentas**, patologista amigo e presente em todos os momentos nas revisões das lâminas.

Ao Prof. Dr. **Carlos Eduardo Pereira Corbertt**, Professor Associado e Chefe do Laboratório de Investigação Médica – LIM 50 da FMUSP, pelo apoio e confiança em mim depositados, disponibilizando-me seu laboratório, sem os quais não finalizaria este trabalho.

Ao Prof. Dr. **Venâncio Avancini Ferreira Alves**, Coordenador Científico do Laboratório de Imuno-Histoquímica da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração nas leituras das lâminas e na disponibilização de seu laboratório.

À Prof. Dra. **Suely Roseinblat**, pelo auxílio e pela revisão deste trabalho.

Ao amigo e sobrinho querido **Diego José dos Santos**, pelas palavras de força, ânimo e coragem que muitas vezes me ajudou no desânimo.

À amiga **Gladis Wilner**, exemplo de organização e amizade, o meu muito obrigada por todos estes anos juntas e pelo suporte financeiro.

À **Natália Mariana Felicio**, amiga de todas as horas, presente em todos os momentos deste trabalho, o meu eterno obrigada.

À **Bruna Souza de Quevedo**, amiga de sempre, que não mede esforço para me ajudar neste trabalho incansável.

Às minhas colegas do Projeto Genoma Clínico do Câncer: **Kátia Adriana Tessima Franco, Helena Scavone Paschoale, Paula Balthazar Bambino e Cristiane Masteguim**, pelo apoio e paciência nesta jornada tão difícil.

À amiga **Regina Maria Catarino**, pela colaboração nos resultados de meu trabalho.

Às secretárias da pós-graduação do Departamento de Gastroenterologia, **Myrtes Freire de Lima Graça e Vilma de Jesus Libério**, obrigada pela paciência e alegria em me ajudar.

Aos meus amigos da secretaria do Departamento de Gastroenterologia, **Maria Cristina Rabelo, Fabiana Renata Soares Bispo, Marta Regina Rodrigues, Maria Joelice dos Reis Santos, Marisa Ochner, Paula Cecília Costa Zobares, Juliana Bisok e Marcos Retzer** pelo auxílio e alegria de trabalharmos juntos por tanto tempo.

À amiga **Nadir dos Santos Ferreira**, obrigada pela ajuda em todos os sentidos, pelas palavras muitas vezes confortantes.

À todos os funcionários, principalmente médicos, que me ajudaram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

É preciso dançar sobre os abismos
Rir de tudo e de todos
É preciso superar o “aqui e agora”
“Ser uma ponte e não um fim”
É preciso conviver com incertezas
Desconfiar, desconfiar, desconfiar
Tudo é passível de questionamento
Os valores, os conceitos e preceitos
O “equilíbrio” e a loucura
os sentimentos mais dignos,
a ciência, a história, a religião
Nada, absolutamente nada pode
Ser considerado “definitivo”
Concluir é atrofiar, estagnar, morrer....

IVAN PETROVITCH

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 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

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	02
2 OBJETIVOS	07
3 REVISÃO DA LITERATURA	09
3.1 Câncer gástrico	09
3.2 Câncer gástrico múltiplo	11
3.3 Câncer gástrico e a genética molecular	12
3.4 Instabilidade de microsátelites (hMLH1, hMSH2 e MSH6)	13
3.5 p53	16
3.6 E-caderina	19
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	22
4.1 Casuística	22
4.2. Características clínico-patológicas	23
4.3 Avaliação histológica	25
4.4 Estudo imunohistoquímico	25
4.5 Análise da imunoexpressão	29
4.6 Análise da imunoexpressão de hMLH1, hMSH2 e hMSH6	30
4.7 Análise da imunoexpressão do p53	30
4.8 Análise da imunoexpressão da E-caderina	31
4.9 Análise estatística	31
5 RESULTADOS	33
5.1 Avaliação imuhistoquímica	33
5.2 Análise da imunoexpressão da proteína hMLH1	33
5.3 Análise da imunoexpressão da proteína hMSH2	37
5.4 Análise da imunoexpressão da proteína hMSH6	38
5.5 Análise da imunoexpressão da proteína p53	39

5.6 Análise da imunoexpressão da proteína E-caderina	43
5.7 Análise comparativa dos diversos marcadores	49
5.8 Análise comparativa do p53 vs hMLH1	49
5.9 Análise comparativa do p53 vs E-caderina	50
5.10 Análise comparativa do hMLH1 vs E-caderina	50
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	61
8 ANEXOS	63
Anexo A - Quadro 1. Observações gerais dos tumores únicos	63
Anexo B - Quadro 2. Observações gerais dos tumores múltiplos	64
Anexo C - Quadro. Classificação imunohistoquímica nos tumores únicos	66
Anexo D – Quadro 3. Classificação imunohistoquímica nos tumores múltiplos	67
9 REFERÊNCIAS	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGMP	Adenocarcinoma Gástrico Múltiplo Primário
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G1	Gap1
G2	Gap2
H&E	Hematoxilina-Eosina
hMLH1	<i>Homo sapiens MutL homolog 1</i>
hMSH2	<i>Homo sapiens MutS homolog 2</i>
hMSH6	<i>Homo sapiens MutS homolog 6</i>
HNPCC	Câncer colorretal hereditário não polipóide
hPMS1	<i>Homo sapiens protein homolog 1</i>
hPMS2	<i>Homo sapiens protein homolog 2</i>
LIM 50	Laboratório de Investigação Médica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
M	Mitose
MMR	Mismatch-Repair
MSI	Instabilidade de Microssatélites
p16	Proteína p16
p21	Proteína p21
PBS	Solução salina fosfatada e tamponada
RER	Erro de replicação

S	Síntese
SSCP	Polimorfismo Conformacional de Simples Fita
TP53	Tumor <i>protein</i> 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínico-patológicas de pacientes portadores de AGMP comparado aos de tumores únicos	24
Tabela 2. Caracterização dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica e respectivas diluições	26
Tabela 3. Imunohistoquímica para o hMLH1 nos tumores múltiplos e únicos	34
Tabela 4. Associação de imunoexpressão do hMLH1 com dados clínico-patológicos	36
Tabela 5. Imunohistoquímica para o hMSH6 nos AGMP e únicos	38
Tabela 6. Imunoexpressão do p53 nos AGMP e únicos	40
Tabela 7. Associação de imunoexpressão do p53 com dados clínico-patológicos	41
Tabela 8. Imunohistoquímica para E-caderina no AGMP e únicos	47
Tabela 9. Associação de imunoexpressão da E-caderina com dados clínico-patológicos	48
Tabela 10. p53 vs. hMLH1	49
Tabela 11. p53 vs. E-caderina	50
Tabela 12. hMLH1. vs. E-caderina	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipo Intestinal de Laurén	10
Figura 2. Tipo Difuso de Laurén	11
Figura 3. Via de sinalização do p53	18
Figura 4. Adenocarcinoma gástrico múltiplo primário	25
Figura 5. Imunohistoquímica positiva para hMLH1	34
Figura 6. Imunohistoquímica negativa para hMLH1	35
Figura 7. Imunohistoquímica positiva para hMSH2	37
Figura 8. Imunohistoquímica positiva para hMSH6	39
Figura 9a. Imunohistoquímica positiva para p53 em AGMP	42
Figura 9b. Imunohistoquímica positiva para p53 em tumores únicos	43
Figura 10a. Imunohistoquímica positiva da E-caderina em tecido normal	44
Figura 10b. Imunohistoquímica positiva da E-caderina em tecido tumoral	45
Figura 11. Imunohistoquímica negativa da E-caderina	46

RESUMO

JORGE, UMM. Tumores gástricos primários múltiplos e únicos: análise imunohistoquímica comparativa [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 83p.

Introdução: Adenocarcinomas gástricos múltiplos primários (AGMP) são encontrados em 3,5% a 10% de todos os pacientes com câncer gástrico. A multiplicidade tumoral é amplamente reconhecida como indicador de predisposição genética para o desenvolvimento de neoplasias. Além disso, as rotas de carcinogênese não estão claramente definidas nestes tumores (rota mutadora, ou supressora, ou da E-caderina). **Objetivo:** avaliar a imunexpressão de hMLH1, hMSH2, e hMSH6 (rota mutadora), p53 (rota supressora) e E-caderina nos AGMP comparando-se com adenocarcinomas únicos (pareados quanto ao sexo, idade, tipo histológico, localização e estágio) e sua relação com dados clínico-patológicos. **Casuística:** dezenove pacientes com AGMP foram comparados a 21 pacientes com tumores gástricos únicos quanto a características imunohistoquímicas. **Métodos:** Blocos de tecido fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina foram submetidos a cortes histológicos de 4 μ m, para as avaliações histológica e imunohistoquímica para hMLH1, hMSH2, hMSH6, p53 e E-caderina. **Resultados:** A média de idade dos pacientes com AGMP foi de $66 \pm 9,06$ anos, e de $60 \pm 16,9$ anos nos pacientes com tumor único ($P=0,56$). Vinte e dois tumores estavam localizados na porção distal do estômago; 14, no corpo e cinco na porção proximal. Em 14 pacientes, as lesões eram próximas (< 3 cm), enquanto que, em cinco pacientes, as lesões estavam em outra porção do estômago. O estágio final anatomopatológico pós-operatório foi: 15 no estágio T1 (37,5%) (8 múltiplos e 7 únicos), 7 no estágio T2 (17,5%) (1 múltiplo e 6 únicos), 17 no estágio T3 (42,5%) (9 múltiplos e 8 únicos) e 1 no estágio T4 (27,5%) (1 múltiplo). Segundo a classificação de Laurén, 45 dos tumores foram do tipo intestinal (29 múltiplos e 16 únicos), 16 do tipo gástrico (12 múltiplos e 4 únicos) e um tumor do tipo misto (1 único). O estágio anatomopatológico revelou 30 tumores avançados (16 múltiplos e 14 únicos) e 32 precoces (25 múltiplos e 7 únicos). Na imunohistoquímica, não houve diferença entre a imunexpressão nos dois grupos de tumores quanto a: hMLH1 (24,3% vs. 19% $P=0,64$), hMSH6 (4,8% vs. 2,4%, $P=0,68$), p53 (39% vs. 24%, $P=0,35$) e E-caderina (27% vs. 19%, $P=0,46$). hMSH2 foi positivo em todos os casos. Não houve associação entre os imunomarcadores e os dados clínico-patológicos. **Conclusões:** 1. As rotas de carcinogênese, mutadora, supressora e E-caderina parecem estar independentemente envolvidas no desenvolvimento dos AGMP; 2. Não houve diferença de imunexpressão dos marcadores analisados quando compararam-se os AGMP e os tumores únicos.

Descritores: 1.Neoplasia gástricas 2.Neoplasias primárias múltiplas 3.Adenocarcima 4.Imunohistoquímica 5.Instabilidade genômica 6.Proteína 2 homóloga a MutS 7.Proteína supressora de tumor p53 8.Caderinas

SUMMARY

JORGE, UMM. Multiple and solitary primary gastric tumors: comparative immunohistochemistry analysis [Dissertation]. São Paulo: 2006. "Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2006. 83p.

Introduction: Multiple primary gastric adenocarcinomas (MPGA) have been reported from 3.5% to 10% of all patients with gastric cancer. Tumoral multiplicity is largely known as an indicator of genetic predisposition for the development of neoplasias. Moreover, the route of carcinogenesis has not been clearly clarified in these tumors (mutator pathway or suppressor pathway). Aim: to evaluate the immunoexpression of hMLH1, hMSH2, and hMSH6 (mutator pathway), p53 (suppressor pathway) and E-cadherin in the MPGA, comparing to solitary adenocarcinomas (similar gender, age, histological type, location and staging) and also the relation to the clinicopathological data.: Casuistics: Nineteen patients (Group 1) with MPGA were compared to 21 patients (Group 2) with solitary gastric tumors regarding clinicopathological characteristics and immunohistochemistry. Methods: Blocks of tissue fixed in 10% formalin and embedded in paraffin were submitted to 4 μ m sections for histological and immunohistochemistry analysis for hMLH1, hMSH2 and hMSH6 (mutator pathway), p53 (suppressor pathway) and E-cadherin. Results: The mean age for the MPGA was 66.8 ± 9.06 years, and 59.0 ± 16.9 years for the solitary tumor group ($P = 0.27$). Twenty-two tumors were in the distal stomach, 14 were in the body and five in the proximal portion. In 14 patients the lesions were close to each other (< 3 cm), while in five patients the neoplasias were distant, in another portion of the stomach. The final postoperative pathological stage was: T1 in 15 (eight multiple and seven solitary), T2 in seven (one multiple and six solitary), T3 in 17 (nine multiple and eight solitary) and T4 in one (one multiple). According to the Laurén classification, 45 tumors were intestinal type (29 multiple and 16 solitary), 16 were diffuse (12 multiple and four solitary) and one mixed type (one solitary). 30 tumors were diagnosed in advanced staging (16 multiple and 14 solitary) and 32 were early (25 multiple and seven solitary). There was no difference between the hMLH1 immunoexpression in the two groups (24.3% vs. 19%, $P=0.64$), hMSH6 (4.8% vs. 2.4%, $P=0.68$), p53 (39% vs. 24%, $P=0.35$) and E-cadherin (27% vs. 19%, $P=0.46$). Immunostaining for hMSH2 was positive in all MPGA, indicating absence of alterations of this repair gene marker. There was no association between the immunomarkers and the clinicopathological data. Conclusions: 1. Routes of carcinogenesis, mutator, suppressor, and E-cadherin appear to be involved independently in the development of MPGA; 2. There was no difference in the markers immunoexpression in the two groups.

Descriptors: 1.Stomach neoplasms 2.multiple primary neoplasms 3.Adenocarcinoma 4.Immunohistochemistry 5.Genomic instability 6.Mut homolog 2 protein 7.Tumor suppressor protein p53 8.cadherins

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer gástrico é a quarta neoplasia maligna mais comum em todo o mundo (Crew et al., 2006), e contribui significativamente para a mortalidade, principalmente no Japão, China e Chile (Abuakwa et al., 2000; Yasui et al., 2005). No Brasil, a estimativa de incidência para o ano de 2006, é de 17 casos novos por 100.000 habitantes para a região Sudeste, nos homens; quanto às mulheres, a estimativa é de, aproximadamente, nove casos por 100.000 habitantes (INCA, 2006).

A prevalência de adenocarcinomas gástricos múltiplos primários (AGMP) é elevada no Japão, variando de 4% a 10%, (Honmyo et al., 1989; Koderá et al., 1995), embora no Ocidente esta ocorrência seja pouco conhecida (Marrano et al., 1987; Wittekind et al., 1997). Os adenocarcinomas gástricos múltiplos primários sincrônicos ocorrem mais freqüentemente quando associados à presença de adenomas, atrofia gástrica intensa ou metaplasia intestinal do que os tumores únicos, sugerindo maior presença de condições pré-malignas associadas (Wittekind et al., 1997; Lee et al., 2001). Além disso, os tumores secundários ocorrem mais comumente nos pacientes com adenocarcinomas gástricos múltiplos primários do que nos com tumores únicos do estômago (Kaibara et al., 1993). Estes dados talvez indiquem que os pacientes com adenocarcinomas

gástricos múltiplos primários apresentem predisposição genética para o desenvolvimento do adenocarcinoma.

A multiplicidade tumoral é amplamente reconhecida como indicador de predisposição genética para o desenvolvimento de neoplasias (Parry et al., 1988).

De acordo com Fioca et al. (2001), parece haver rotas de carcinogênese distintas para a transformação maligna gástrica, como a E-caderina envolvida na câncer gástrico difuso. No que se refere ao tipo intestinal, duas vias podem participar: a via supressora por meio do p53 entre outros e a via mutadora na qual participam a instabilidade de microssatélite (MSI).

Os adenocarcinomas gástricos múltiplos primários talvez se desenvolvam através de uma mesma via de alteração genética: ou devido a defeito nos genes de reparo (rota mutadora), ou devido a defeitos nos genes supressores de tumor (rota supressora) ou alterações na E-caderina (Perucho et al., 1996).

Considerando-se que os tumores múltiplos possam talvez advir das mesmas alterações genéticas e do mesmo microambiente gástrico, torna-se relevante o estudo dos mecanismos de carcinogênese neste grupo de pacientes.

Estudos recentes revelaram a importância da MSI na carcinogênese gástrica, especialmente em tumores gástricos múltiplos (Nakashima, et al., 1995; Perez et al., 2004). A análise de microssatélites pode fornecer uma

representação grosseira dos tumores que se desenvolvem através da via mutadora.

Com os progressos obtidos pela Biologia Molecular, tornou-se possível a elucidação de algumas das alterações genéticas das afecções do trato digestório. Nas células humanas normais, os processos de proliferação celular, diferenciação e apoptose estão integrados para se determinar o tipo e função de determinada célula ou órgão (Kumar et al., 1992). Evidências indicam que o processo de transformação maligna envolve múltiplas etapas, o qual está associado com o acúmulo de alterações gênicas, adquiridas ou não, e que somadas contribuem para o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença (Fearon e Vogelstein, 1990). Durante a progressão da doença, os tumores adquirem propriedades biológicas que afetam a evolução e o prognóstico dos pacientes. Neste contexto participam oncogenes, fatores de crescimento, citocinas, reguladores do ciclo celular, genes supressores de tumor, moléculas de adesão tumoral e erros de replicação, o que resulta em instabilidade do genoma.

Devido à importância das alterações dos genes de reparo, supressores de tumor e E-caderina, neste processo, parece razoável explorar tais marcadores. Embora o método imunohistoquímico possa ser utilizado para avaliar alguns destes marcadores, incluindo-se p53, hMSH2, hMLH1, hMSH6 e E-caderina, os resultados publicados até o presente momento na avaliação do emprego destes marcadores com imunohistoquímica, em pacientes com adenocarcinomas gástricos múltiplos primários sincrônico permanecem ainda controversos.

Atualmente, ressecção local em cunha por laparotomia ou laparoscopia, e mucosectomias podem ser utilizados para o tratamento de lesões pequenas, bem diferenciadas e confinadas à mucosa gástrica. Desta maneira, é essencial determinar se não existem outras lesões no estômago do paciente que irá submeter-se aos procedimentos cirúrgicos protocolares reduzidos.

Portanto, a presença de adenocarcinomas gástricos múltiplos primários, no momento da ressecção, pode alterar a extensão do tratamento cirúrgico (Marrano et al., 1987).

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Efetuar análise comparativa dos adenocarcinomas gástricos múltiplos primários versus os únicos, através do método imunohistoquímico, com o intuito de:

1. Avaliar a frequência de alterações de imunoexpressão de marcadores das principais vias de carcinogênese gástrica: via mutadora (hMLH1, hMSH2 e hMSH6), via supressora (p53) e via da E-caderina em adenocarcinomas gástricos múltiplos primários versus os tumores únicos;
2. Avaliar a associação dos marcadores hMLH1, hMSH2, hMSH6, p53 e E-caderina com dados clínicos-patológicos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer gástrico

Na maioria dos casos, a neoplasia gástrica maligna está associada a agentes carcinogênicos externos como dieta, fumo, álcool, poluição ambiental, *Helicobacter pylori* entre outros (Bresciani et al., 2004). O hábito alimentar representa um dos principais fatores carcinogênicos, sendo responsável por quase 35% de todas as doenças malignas (Bonney et al., 1986; Correa et al., 1994). O carcinoma gástrico pode ser diagnosticado em estágio precoce ou avançado. Como definição, o câncer gástrico precoce apresenta invasão até, no máximo, a camada submucosa do órgão independente da presença de metástase linfonodal.

O conceito de tumor localmente avançado não é empregado de modo uniforme, existindo autores, mais freqüentemente ocidentais, que consideram neoplasia localmente avançada aquela cuja invasão atingiu a serosa gástrica (T3 ou T4), enquanto outros só aplicam tal conceito quando o limite da parede gástrica foi ultrapassado e já houve difusão do tumor para estruturas adjacentes (Roukos, 2000; Del Grande et al., 2002).

De acordo com a classificação histológica de Laurén, os tumores gástricos são divididos em dois tipos morfológicos: intestinal e difuso. Acredita-se que a forma intestinal se origina das células da mucosa gástrica que sofreram metaplasia para células do tipo intestinal. Este padrão de

câncer é mais diferenciado, e representa o tipo mais comum em populações de grande risco (Kumar et al., 1992; Shibata et al., 2003). Acomete basicamente após os 50 anos de idade, com predominância no sexo masculino. Em contraste, acredita-se que a forma difusa origina-se a partir de células nativas da mucosa gástrica, tende a ser pouco diferenciada e ocorre em população mais jovem (Kumar et al., 1992).

Nas Figuras 1 e 2, pode-se observar as diferenças histológicas entre o tipo intestinal e o tipo difuso de Laurén.

Figura 1. Tipo intestinal de Laurén

A figura 1 demonstra neoplasia gástrica do tipo intestinal de Laurén. Observam-se estruturas tubulares, revestidas por células pseudoestratificadas, com intensa hipercromasia nuclear, alteração da relação núcleo-citoplasmática e diminuição dos espaços interglandulares (400x)

Figura 2. Tipo difuso de Laurén

A figura 2 demonstra neoplasia gástrica do tipo difuso de Laurén. Notam-se células neoplásicas difusamente distribuídas, caracterizadas por alteração da relação núcleo-citoplasmática, hipercromasia nuclear, presença de muco intracitoplasmático e nucléolo evidente (400x)

3.2 Câncer gástrico múltiplo

Moertel et al. (1957) definiram critérios para caracterizar adenocarcinoma gástrico múltiplo onde cada lesão deve ser maligna no estudo histopatológico, ter um intervalo de parede gástrica não tumoral entre as neoplasias e uma lesão não pode ser metástase da outra.

De acordo com Miyoshi et al. (2001), o câncer gástrico múltiplo é observado em 3,5% a 10% de todos os pacientes com câncer gástrico, mostrando similaridade morfológica na macroscopia e microscopia com os tumores únicos. Aparentemente apresentam evolução semelhante,

sugerindo mesma linha no desenvolvimento do tumor e mesma predisposição genética (Esaki et al., 1987; Lee et al., 2001). Os tumores gástricos múltiplos podem ser de dois tipos:

- **Sincrônicos:** câncer gástrico primário encontrado simultaneamente ou no decorrer de um ano após a detecção do primeiro câncer gástrico;
- **Metacrônicos:** segundo câncer gástrico primário encontrado pelo menos um ano após a detecção do primeiro câncer gástrico.

Comparado com os casos de tumores únicos, os pacientes com tumores gástricos múltiplos têm idade mais avançada e a doença está comumente associada à metaplasia intestinal na mucosa adjacente (Marrano et al., 1987; Honmyo et al., 1989). Ademais, os tumores metacrônicos parecem ocorrer também em maior número em pacientes acometidos por tumores múltiplos sincrônicos do que naqueles com tumores únicos (Kaibara et al., 1993). Estes fatos constituem-se em fortes indícios de predisposição genética para o desenvolvimento de câncer gástrico múltiplo.

3.3 O Câncer gástrico e a genética molecular

Com o emprego da biologia molecular, têm ocorrido avanços no rastreamento, diagnóstico e no prognóstico do câncer.

O câncer gástrico decorre de múltiplas etapas. Mudanças genéticas de genes supressores de tumor e oncogenes facilitam a expansão de clones de células que adquiriram vantagens de crescimento seletivo. A somatória destas alterações nas células provocam mudanças para fenótipo cada vez

mais maligno (Ribeiro et al., 2004). O conhecimento atual nesta área da ciência, conseguiu esclarecer 3 vias principais de carcinogênese: 1) instabilidade de microssátelites; 2) alterações nos genes supressores de tumor; 3) alterações nas moléculas de adesão.

Estes relevantes mecanismos de carcinogênese são descritos a seguir:

3.4 Instabilidade de microssatélite (hMLH1, hMSH2 e hMSH6)

A instabilidade de microssátelites (MSI) é um dos eventos mais importantes para o acúmulo de mudanças gênicas que ocasionam a predisposição à carcinogênese humana (Miyoshi et al., 2001). Microssátelites são regiões genômicas com seqüências de DNA curtas de repetições de nucleotídeos, existindo normalmente centenas de milhares destas no genoma humano (Ribeiro et al., 2004). A maioria dos microssátelites ocorre nas regiões não codificadoras de DNA, portanto, a instabilidade causa pequeno ou nenhum efeito na função da proteína. Durante a replicação de DNA, podem ocorrer mutações em algumas destas regiões resultando na contração ou alongamento do microssatélite conhecida como instabilidade de microssatélite (Miyoshi et al., 2001). Geralmente estas anormalidades são corrigidas por uma proteína denominada “mismatch-repair” (MMR), a qual repara erros na base nitrogenada durante a replicação celular. Porém, há genes que possuem

microssatélites em suas regiões codificadoras e, neste caso, originam uma proteína anômala (Lynch et al., 2003).

A instabilidade de microssatélites foi primariamente descrita em pacientes com câncer colorretal hereditário não polipóide (HNPCC), constando de mutações na linhagem germinativa em genes de reparo de DNA, incluindo-se hMSH2, hMLH1, e hMSH6.

Ao estudar biópsias gástricas, Kashiwagi et al. (2000) revelaram que a MSI pode prever o risco de progressão de adenoma para adenocarcinoma bem diferenciado. Adenomas e metaplasia intestinal estão frequentemente associados com a maior frequência de MSI, sugerindo associação com condições pré-cancerosas (Wittekind et al., 1997; Kim et al., 2000; Lee et al., 2001). Por outro lado, a frequência de MSI no câncer gástrico também depende da região geográfica estudada (Sepulveda et al., 1999).

A instabilidade de microssatélites também tem sido encontrada na pancreatite crônica, colite ulcerativa e metaplasia intestinal. Alguns autores sugerem que a contínua regeneração celular em condições inflamatórias crônicas talvez origine a saturação do sistema de reparo do DNA, ocasionando a instabilidade (Lynch et al., 2003).

A diminuição da expressão da proteína hMLH1 associou-se à metilação da região promotora do gene, ocorrendo na maioria dos tumores esporádicos. Vários estudos relatam a associação entre MSI e metilação do hMLH1 (Leung et al., 1999). Portanto, tumores com alta frequência de MSI podem associar-se a metilação do referido gene (Jung et al., 2001). Por

outro lado, existe associação entre a hipermetilação do gene hMLH1 e a diminuição da expressão desta proteína (Sakata et al., 2002).

No câncer gástrico múltiplo, a incidência de MSI varia entre 15% a 39%, (Han et al., 1993; Chong et al., 1994; Strickler et al., 1994). Outras publicações referem maior frequência de MSI nos tumores múltiplos do que os tumores únicos, sugerindo que erros de replicação podem participar da carcinogênese neste grupo de pacientes (Nakashima et al., 1995; Shinmura et al., 1995). Entretanto, estes estudos apresentam como fatores limitantes o pequeno número de casos e a definição, muitas vezes, incorreta de MSI. O estudo de Lee et al. (2001) sugere que erros de replicação são importantes em tumores múltiplos associados a adenomas.

Pelo menos três hipóteses podem explicar as disparidades clínico-patológicas entre tumores com múltiplos loci alterados, em relação aos demais: A primeira hipótese refere-se à ocorrência de MSI em poucos loci, o que talvez represente um evento randômico ou uma anormalidade de DNA polimerase, enquanto que a de múltiplos loci poderia indicar anormalidades de genes do sistema de correção MMR. Outra hipótese considera que mutações em diferentes genes de correção ou diferentes domínios podem ocasionar estados de predisposição a outras alterações. Por último, tem-se a hipótese de que mutações inativadoras em gene de correção causando sua deficiência poderiam ocorrer durante diferentes fases da progressão tumoral (Strand et al., 1993).

Apesar do número limitado de análise de mutações em células germinativas e/ou somáticas dos genes hMLH1 e hMSH2 nos cânceres

gástricos, mutações do tipo *protein-truncating mutations* podem ocorrer. Todavia, uma alta porcentagem de tumores gástricos com instabilidade de microssatélite exibem hipermetilação da região promotora do gene hMLH1, contribuindo para o silêncio epigenético destes genes e para o diagnóstico de deficiência de MMR (Honmyo et al., 1989; Fleisher et al., 1999; Bevilacqua et al., 2000). O mecanismo básico para o MSI no câncer gástrico resulta da hipermetilação somática bialélica da região promotora do gene hMLH1 e pouca ou nenhuma contribuição das mutações sejam elas germinativas ou somáticas.

3.5 p53

Outra via citada é a supressora, correspondendo a outro mecanismo de predisposição aos tumores gástricos. Esta via interfere no ciclo celular que é dividido em quatro fases: G1 (gap), S (síntese de DNA), G2 (gap 2) e M (mitose).

O p53 é um gene supressor, localizado no cromossomo 17p, é o mais comumente implicado na carcinogênese humana (Hollstein et al., 1991) e apresenta alteração em cerca da metade dos casos. Em seres humanos, a proteína p53 selvagem inibe a proliferação e a transformação celular e atua quando a célula permanece em repouso (fase G1). Além de exercer papel importante na regulação celular, a alteração do p53 tem apresentado implicações na síntese e na reparação do DNA, na manutenção da estabilidade genômica, na diferenciação celular e na apoptose (Kastan et al.,

1991). Em aproximadamente 80% dos casos, a mutação do p53 ocorre nos exons 5 – 8, sendo “missense”, ou seja, conduz para a substituição de um aminoácido, assim alterando a conformação da proteína e aumentando sua instabilidade (Nigro et al., 1989; Hussain e Harris, 1998).

Mutações de p53 freqüentemente aumentam a estabilidade da proteína e, portanto, sua vida média, resultando na possibilidade de caracterização por imunohistoquímica (Fricke et al., 2003), pois a proteína animal tem vida média muito curta, mensurada em minutos, sendo difícil sua detecção. Mutações dominantes negativas podem não suprimir completamente a atividade de p53 selvagem, mas favorecem a expansão de populações celulares alteradas (Blondal e Benchimol, 1994).

Segundo Nigro et al. (1989), tanto a mutação “missense” como a mutação “frame shift” podem ser responsáveis pela inativação do p53. Estes resultados foram obtidos através da execução da técnica Single Strand Conformation polymorphism (SSCP) e seqüenciamento de DNA.

A imunoexpressão de p53 pode também ter valor prognóstico em pacientes com câncer gástrico, pois índice maior de detecção da proteína tem sido demonstrado em tumores com maior envolvimento de linfonodos e a sobrevivência de 5 anos tem sido menor em casos com tumor que apresenta p53, quando comparado aos casos negativos (Jureidine, 2002; Pan et al., 2006).

Alterações de p53 são demonstradas em cerca de 30% a 60% dos tumores gástricos, (Chang et al., 2002) e parecem ocorrer no estágio inicial de carcinogênese (Tahara, 1993). Demonstrou-se que hiperexpressão e

mutação de p53 foram detectadas em mucosa gástrica benigna, adjacente ao tumor (Safatle-Ribeiro et al., 1996). Alterações de p53 foram demonstradas em até cerca de 37,5% dos casos na metaplasia intestinal, de 30% a 58,3% nos adenomas gástricos ou displasia e de 43% a 66,7% nos carcinomas gástricos, indicando que p53 participa das fases iniciais da carcinogênese gástrica (Tahara, 1993). A Figura 3 demonstra a via de sinalização do p53.

Figura 3. Via de sinalização do p53

3.6 E-caderina

Outra rota sugerida na carcinogênese gástrica é a da E-caderina, que atua como molécula de adesão. Alterações nesta via são relevantes e ocorrem com frequência elevada de aproximadamente 50% nos tumores gástricos difusos de Laurén e em determinados grupos de pacientes com história familiar positiva para câncer gástrico (Guilford et al., 1998; Graziano et al., 2003).

As famílias das caderinas clássicas compreendem aproximadamente 30 membros compostos por domínio citoplasmático com terminal carboxílico altamente conservado, domínio transmembrana único e cinco subdomínios extracelulares repetidos (C1 a C5, onde C1 é o mais distante da membrana) com uma sequência HAV (letras referem-se a código dos aminoácidos) em C1, apontado como essencial para a adesão célula-célula (Gallin, 1998).

As caderinas foram primeiramente definidas como uma família de glicoproteínas transmembranas mediadoras das adesões célula-célula dependentes de Ca^{2+} .

Evidências se acumulam indicando que as caderinas participam na adesão intercelular, possuem papel na embriogênese, participam na sinalização, proliferação e diferenciação celular mantendo assim a integridade das células (Berx et al., 1998; Knudsen et al., 1998).

A função básica da E-caderina é unir células e estabilizar as ligações com o citoesqueleto. O gene responsável pela codificação desta proteína é o CDH1 que está localizado no braço longo do cromossomo 16 (16q22.1) (Takeichi, 1994).

As conseqüências destas adesões são: a estabilidade tecidual e processos morfogenéticos como o rearranjo celular, migração celular, formação de tecidos, estabilização e manutenção das redes neuronais (Guilford et al., 1998). As caderinas podem também participar de eventos de sinalização celular, afetando diferenciação, proliferação e migração. Em geral, a E-caderina tem sido considerada promotora de diferenciação de músculo cardíaco e esquelético, ossos, nervos, cartilagens e epitélios (Taicheichi et al., 1994; Guilford et al., 1998).

A expressão anormal da E-caderina é observada em vários tipos de tumores malignos e está freqüentemente associada a tumores pouco diferenciados ou indiferenciados e em carcinomas invasivos (Smith et al., 1997). Além disso, mutações no gene da E-caderina e a perda de heterozigosidade têm sido observadas no câncer gástrico difuso (Becker et al., 1994; Muta et al., 1996; Guilford et al., 1998), no carcinoma lobular de mama (Berx et al., 1998) e nos carcinomas de endométrio e ovário (Risinger et al., 1994), apoiando a hipótese de que a E-caderina apresenta papel de gene supressor de tumor.

No carcinoma gástrico, há clara associação entre a expressão anormal de E-caderina e o padrão histológico do tipo difuso, composto de células isoladas (Mayer et al., 1993; Shino et al., 1995; Gabbert et al., 1996; Jawhari et al., 1997; Machado et al., 1998). Mutações do gene da E-caderina foram encontrados em 50% dos carcinomas gástricos esporádicos (Becker et al., 1994).

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

No período de janeiro de 1998 a março de 2003 foram submetidos a tratamento cirúrgico 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, 537 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico, sendo que em 21 destes, verificou-se a presença de adenocarcinomas gástricos múltiplos primários, representando 4% do total. Incluíram-se nesta pesquisa 19 casos devido à falta de material para análise histológica de dois pacientes.

Criou-se banco de dados com informações sobre cada paciente, incluindo-se o diagnóstico anatomopatológico estabelecido por ocasião da gastrectomia. A partir deste banco de dados foram selecionados todos os casos de tumores gástricos múltiplos sincrônicos para a revisão do diagnóstico de acordo com os critérios estabelecidos por Laurén em 1965 (Miyhoshi et al., 2001). Após a revisão histopatológica dos casos e a confirmação dos diagnósticos, foram selecionados para o estudo, 19 casos de adenocarcinomas gástricos múltiplos sincrônicos e 21 adenocarcinomas gástricos únicos para estudo comparativo, agrupados de acordo com as

mesmas características clinicopatológicas, incluindo-se: sexo, idade, localização tumoral, tipo histológico, morfologia e estágio, (pTNM) (UICC,2002).

4.2 Características clínico- patológicas

A população estudada incluiu 19 pacientes com adenocarcinomas gástricos múltiplos primários sincrônicos e 21 pacientes com tumores gástricos únicos esporádicos. A média de idade foi de 66,8 anos nos pacientes com tumores sincrônicos, e de 59,5 anos nos pacientes com tumores únicos. Dos 19 casos com tumores múltiplos sincrônicos, 13 (68%) foram do sexo masculino e seis (32%) do sexo feminino. Enquanto que dos 21 tumores únicos, 13 (62%) eram do sexo masculino e oito (38%) do sexo feminino.

Quanto ao tipo histológico, segundo a classificação de Laurén, 45 dos tumores estudados eram do tipo intestinal (29 sincrônicos e 16 únicos), 16 do tipo difuso (12 sincrônicos e 4 únicos) e um tumor do tipo misto (1 único). O estágio anatomopatológico revelou 30 tumores avançados (14 únicos e 16 sincrônicos) e 32 precoces (7 únicos e 25 sincrônicos). Metástases linfonodais foram detectadas em seis casos de tumores únicos e em seis casos dos tumores múltiplos (ANEXOS A e B).

A tabela 1 demonstra as principais características clínico-patológicas dos dois grupos estudados.

Na Figura 4, pode-se observar o aspecto macroscópico do estômago ressecado com dois adenocarcinomas primários sincrônicos.

Tabela 1. Características clínico-patológicas de pacientes portadores de AGMP comparados aos de tumores únicos

Variável	Categoria	Múltiplos	Únicos	P
Idade	Média	66,8	59,5	0,27
Gênero	Masculino	13	13	0,74
	Feminino	6	8	
Localização	Fundo	5	3	0,97
	Cárdia/Corpo	14	7	
	Antro-piloro	22	11	
Laurén	Intestinal	29	16	0,98
	Difuso	12	4	
	Misto	0	1	
Classificação T	T1	8	7	0,20
	T2	1	6	
	T3	9	8	
	T4	1	-	
Estádio N	N0	13	15	0,20
	N1	1	4	
	N2	5	2	
Precoce vs. Avançado	T1	9	7	0,51
	T2 ou >	10	14	

Figura 4. Adenocarcinoma gástrico múltiplo primário

A figura 4 demonstra foto cirúrgica revelando a presença de dois AGPM

4.3 Avaliação histológica

Dos blocos de tecido, fixados em formalina e incluídos em parafina, realizaram-se cinco cortes histológicos de 4 μ m de cada bloco designado, para as avaliações histológica e imunohistoquímica (H&E).

4.4 Estudo imunohistoquímico

Para o rastreamento de possíveis alterações gênicas relacionadas a genes que controlam a MSI, foi realizada a pesquisa de antígenos hMLH1,

hMSH2 e hMSH6, mediante incubação com os anticorpos hMLH1 (clone G168-728), hMSH2 (clone G219-1129) e hMSH6 (clone 44) (Pharmigen, San Diego, CA, EUA) (Tabela 2) e padronizados no laboratório de Imuno-histoquímica da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. O método empregado foi o sistema de amplificação de sinal tiramida livre de biotina (DakoCytomation CSA II, Carpinteria, CA 93013, EUA). (Bobrow et al., 1991).

Tabela 2. Caracterização dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica e respectivas diluições

Anticorpos	Clone	Laboratório	Diluição
p53	DO7	Novocastra	1:100
hMLH1	G168-728	BD Pharmigen	1:150
hMSH2	G219-1129	BD Pharmigen	1:300
hMSH6	G44	BD Pharmigen	1:2000
E-caderina	NCH-38	BD Biosciences	1:150

Os cortes histológicos com 4µm de espessura foram montados em lâminas cobertas com 3-aminopropil-triethoxisilano (SIGMA-Aldrich Co. St. Louis, USA), desparafinados e hidratados por meio de xilóis e álcoois. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por imersão em peróxido de hidrogênio a 6% (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ). Em seguida, foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas com soro normal de cavalo a 3% diluído em BSA 1% em PBS (tampão fosfato pH 7,4

(Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ) e azida sódica 0,1% (SIGMA-Aldrich Co. St. Louis, USA).

Os anticorpos monoclonais primários nas titulações padronizadas para o hMSH2 1:300, hMLH1 1:150 e hMSH6 1:2000 foram diluídos em BSA 1% em PBS (tampão fosfato pH 7,4) e azida sódica 0,1%. Os cortes foram incubados em câmara úmida a 4 °C, por um período de 16 a 18 horas. A seguir os tecidos foram lavados em tampão PBS pH 7,4, por 3 vezes, 5 minutos cada troca e incubados com anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 30 minutos a 37 °C. Seguiram-se novas lavagens com PBS, 3 vezes, 5 minutos cada troca e foram incubados com o reagente amplificador 30 minutos a 37 °C. Após, seguiram-se as lavagens com PBS, por três vezes, 5 minutos cada troca e incubaram-se os cortes com anticorpo anti-fluoresceína conjugada a peroxidase, por 30 minutos a 37 °C. Os cortes foram lavados com PBS, por três vezes, 5 minutos cada troca e em seguida procedeu-se a etapa da revelação com substrato cromogênico 3'3 diaminobenzidina tetrahydrocloro (SIGMA-Aldrich Co. St. Louis, USA) 1mg/mL com 0,1% (vol/vol) de peróxido de hidrogênio (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ) em tampão fosfato pH 7,4, com a imersão dos cortes por 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas em águas corrente e destilada.

Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, desidratados e em seguida procedeu-se a montagem das lâminas com meio de Entellan® (Merck KGaA-Alemanha). Os cortes histológicos de adenocarcinoma gástrico, previamente conhecidos por expressarem níveis

elevados de hMLH1, hMSH2, e hMSH6 foram usados como controles positivos. Os controles negativos corresponderam a cortes histológicos de adenocarcinoma gástrico com a omissão do anticorpo primário que foi substituído por PBS.

Para a detecção do p53 foi utilizado anticorpo monoclonal (NCL- p53-DO7, Laboratório Novocastra, Newcastle, UK), que tem a capacidade de detectar ambos os tipos de proteína: selvagem e mutante, e para a detecção da E-caderina foi utilizado o anticorpo monoclonal primário Anti-E-Cadherin (AEC) (Transduction Laboratories, BD Biosciences). O método empregado foi o do complexo da streptavidina-biotina-peroxidase.

A técnica imunohistoquímica teve por base experiências descritas anteriormente (Hsu et al., 1981; Shi et al., 1991; Saflate-Ribeiro et al., 1996; Ribeiro Jr. et al., 1998; Saflate-Ribeiro et al., 2000) e padronizada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - LIM 50 . Resumidamente, a detecção das proteínas envolveu o uso de cortes histológicos, com 4 µm de espessura, de tecido fixado em formalina e incluído em parafina. 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 tamponada com fosfato (PBS) e incubados com 10% de soro de cavalo para bloquear as ligações não-específicas. Após remoção do soro, aplicou-se o anticorpo monoclonal primário. Após nova lavagem com PBS, com três

trocas, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário, Link do LASB + System (Laboratório Dako, K0690, E.U.A.) por 30 minutos a 37 °C, lavados três vezes e tratados com o complexo da streptavidina-biotina-peroxidase LSAB + System (Laboratório Dako, K0690, E.U.A.). Seguindo-se nova lavagem com PBS (três trocas), foram incubados em solução de diaminobenzidina tetrahydrochloride/PBS (Sigma, D-5637, E.U.A.) a 0,05%, 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO), peróxido de hidrogênio 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).

Utilizaram-se cortes histológicos de adenocarcinoma gástrico como controles positivos. Para garantir a uniformidade das reações viabilizando a análise imunohistoquímica semiquantitativa, a determinação de cada antígeno foi efetuada em uma única reação. Os controles negativos corresponderam a cortes histológicos de adenocarcinoma gástrico com a omissão do anticorpo primário que foi substituído por PBS.

4.5 Análise da imunoexpressão

Todos os cortes histológicos foram examinados, usando-se sistema pré-definido de graduação. A coloração específica nuclear por meio de imunohistoquímica foi empregada para os marcadores hMLH1, hMSH2, hMSH6, p53 e de membrana/citoplasmática para a E-Caderina. A

reatividade nuclear e citoplasmática foi classificada semiquantitativamente numa escala de 0 a 4 para intensidade e distribuição (intensidade: 0 = ausência de coloração; 1 = coloração dificilmente visível; 2 = facilmente visível, contudo fraca; 3 = intensa, porém não tanto como o controle; 4 = coloração tão intensa quanto o controle; distribuição: 0 = ausência de coloração ou menos de 5% da amostra corada; 1 = células positivas esparsas, entre 5% a 25% da amostra; 2 = várias áreas de positividade, correspondendo a 26% a 50% da amostra celular; 3 = positividade difusa intercalada com células sem coloração, equivalente até à 75% das células; e 4 = quase todas as células uniformemente positivas, ou acima de 75%).

4.6 Análise da imunoexpressão de hMLH1, hMSH2 e hMSH6

A análise da imunohistoquímica para hMLH1, hMSH2 e hMSH6 corresponde à coloração nuclear.

Foi considerada alterada para os marcadores hMLH1, hMSH2 e hMSH6, quando a reatividade da leitura foi menor do que 2 na escala 1, 2, 3 ou 4 para intensidade e distribuição.

4.7 Análise da imunoexpressão de p53

A análise da imunohistoquímica para p53 corresponde à coloração nuclear. Foi considerada positiva para o marcador p53, quando a

intensidade de leitura foi classificada como maior do que 2 na escala, e a distribuição como 2,3 ou 4.

4.8 Análise da imunoexpressão da E-caderina

A análise da imunohistoquímica para E-caderina corresponde à coloração citoplasmática/membrana.

Foi considerada alterada para o marcador E-caderina, quando a reatividade da leitura foi menor do que 1 na escala 1, 2, 3 ou 4.

4.9 Análise estatística

Os dados quantitativos foram referidos como média $\pm$ DP e analisados usando-se o teste *t* de Student para amostras independentes. As variáveis categóricas foram expressas em valores absoluto e percentual. Estas foram analisadas pelo teste Qui quadrado. Em casos em que as freqüências esperadas na tabela 2 X 2 foram pequenas (menor que 10 em cada casela), aplicou-se a correção de Yates ou o teste exato de Fisher.

Desta forma avaliaram-se as diferenças entre os tumores múltiplos gástricos sincrônicos e os tumores únicos esporádicos.

Utilizou-se o programa estatístico SPSS para Windows, versão 10.0 (SPSS Inc., Philadelphia, E.U.A).

Estabeleu-se o nível de significância em 5%, ou seja $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação imunohistoquímica

Foram utilizados o tecido tumoral e a mucosa adjacente. A mucosa gástrica normal foi utilizada como controle.

As mucosas adjacentes aos tumores de ambos os grupos, múltiplos e únicos, revelaram imunexpressão fortemente positiva para os marcadores (hMLH1, hMSH2, hMLH6 e E-caderina), denotando a normalidade de expressão gênica.

5.2 Análise da imunexpressão da proteína hMLH1

A Figura 5 representa imunoreatividade positiva para o hMLH1 e a figura 6 demonstra perda de expressão, com imunoreatividade menor do que 2, caracterizando proteína alterada.

Observou-se perda de expressão do hMLH1 em 10/41 (24%) tumores múltiplos e 4/21 (19%) nos tumores únicos ($P=0,64$) (Tabela 3).

Os resultados da imunohistoquímica do hMLH1 versus os dados clínico-patológicos estão distribuídos na Tabela 4.

Tabela 3. Imunohistoquímica para o hMLH1 nos tumores múltiplos e únicos

hMLH1	Múltiplos (%)	Únicos (%)
Alterado	10 (24%)	4(19%)
Normal	31 (76 %)	17 (81%)
Total	41(100%)	21(100%)

Fisher, P=0,64

Figura 5. Imunohistoquímica positiva para hMLH1

A figura 5 demonstra imunohistoquímica não alterada >2/2 para hMLH1 em AGMP. Observa-se intensa imunoreatividade nuclear em quase todas as células tumorais

Figura 6. Imunohistoquímica negativa para hMLH1

A figura 6 demonstra imunohistoquímica negativa $< 2/2$ para hMLH1 em AGMP caracterizando alteração desta proteína (400X)

Tabela 4. Associação da imunoeexpressão do hMLH1 com os dados clínico-patológicos

Variável	Categoria	hMLH1				
		Múltiplos		Únicos		
		Não alterado	Alterado	P	Não alterado	Alterado P
Idade	Média	60,3	68,0	0,46	64,2	58,3 0,66
Gênero	Masculino	6	7	0,2	3	10 0,54
	Feminino	0	6		1	7
Localização	Fundo	0	5	0,1	0	3 0,52
	Cárdia/Corpo	2	12		1	6
	Antro-piloro	8	14		3	8
Laurén	Intestinal	8	22	0,7	3	11 0,8
	Difuso	2	9		1	5
	Misto	0	0		0	0
Classificação T	T1	9	15	0,1	1	6 0,36
	T2	0	1		2	4
	T3	1	14		1	7
	T4	0	1			
Estádio N	N0	4	9	0,73	2	13 0,21
	N1	0	1		2	2
	N2	2	3		0	2

5.3 Análise da imunoexpressão da proteína hMSH2

Em todos os casos avaliados observou-se imunoreatividade positiva maior que 2/2 para hMSH2, como demonstrada na figura 7, portanto, não houve alteração na imunoexpressão do hMSH2 em nenhum dos casos estudados.

Figura 7. Imunohistoquímica positiva para hMSH2

Na figura 7 nota-se imunoexpressão nuclear positiva para hMSH2, indicando que não houve alteração na expressão desta proteína (400X).

5.4 Análise da imunexpressão da proteína hMSH6

Houve perda de expressão do hMSH6 nos tumores múltiplos e em tumores únicos, como demonstrado na Tabela 5. Na Figura 8 demonstra-se a imunoreatividade do hMSH6.

Tabela 5. Imunohistoquímica para o hMSH6 nos AGMP e únicos

hMSH6	Múltiplos (%)	Únicos(%)
Alterado	2 (4,8%)	1 (2,4%)
Normal	39 (95,2%)	20 (97,6%)
Total	41(100%)	21(100%)

Fisher, P= 0,68

Figura 8. Imunohistoquímica positiva para hMSH6

Na figura 8 observa-se imunoreatividade nuclear para o hMSH6, caracterizando a normalidade da imunoexpressão protéica (400X).

5.5 Análise da imunoexpressão da proteína p53

A análise imunohistoquímica da proteína p53 revelou padrão variável de coloração, desde completamente ausente até distribuição difusa e com intensa reatividade (Figuras 9a e 9b representam a imunoexpressão do p53). Na Tabela 7. observam-se os resultados da imunohistoquímica associados aos dados clínico-patológicos.

Entre estes extremos, a intensidade e a distribuição da coloração variaram de fraco/localizado para fraco/difuso, ou intenso/localizado.

Observou-se positividade para a proteína p53 em dezesseis de 41 tumores do grupo AGMP (39%) e em cinco tumores de 21 (24%) adenocarcinomas únicos $P = 0,35$ (Tabela 6).

Por outro lado, a imunoeexpressão do p53 foi negativa em todas as mucosas adjacentes avaliadas.

Tabela 6. Imunoexpressão do p53 nos AGMP e únicos

Grupo estudado	Mútiplos	Únicos
Positivo	16 (39%)	5 (24%)
Negativo	25(61%)	16(76%)
Total	41(100%)	21(100%)

Fisher, $p = 0,35$

Tabela 7. Associação da imunoeexpressão do p53 com os dados clínico-patológicos

Variável	Categoria	p53			
		Positivo	Múltiplos Negativo	Positivo	Únicos Negativo
Idade	Média	67,2	66,4	0,38	58,7
Gênero	Masculino	3	10	0,2	9
	Feminino	5	1	1	7
Localização	Fundo	4	1	0,1	2
	Cárdia/Corpo	4	10	0	7
	Antro-piloro	8	14	4	7
Laurén	Intestinal	11	19	0,6	9
	Difuso	5	6	0	6
	Misto	0	0	0	0
Classificação T	T1	7	17	0,2	7
	T2	1	0	2	4
	T3	8	7	3	5
	T4	0	1	0	0
Estádio N	N0	6	7	0,3	12
	N1	1	0	1	3
	N2	1	4	1	1
Precoce/Avançado	T1	7	17	0,1	7
	T2 ou >	9	8	5	9

Figura 9a. Imunohistoquímica positiva para p53 em AGMP

A figura 9a demonstra imunoreatividade nuclear intensa do p53 em AGMP (400X)

Figura 9b. Imunohistoquímica positiva para p53 em tumores únicos

A figura 9b. demonstra imunoreatividade nuclear intensa do p53 em tumor gástrico único (400X)

5.6 Análise da imunoexpressão da proteína E-caderina

Nas áreas de mucosa adjacente aos tumores, a imunoexpressão correspondeu à coloração marrom das membranas celulares, principalmente na porção apical das glândulas.

Nos tumores, a imunohistoquímica para a E-caderina variou desde totalmente ausente (0/0), até as membranas intensamente coradas com ampla distribuição pelo tumor (4/4) (Figura 10a, 10b e 11). Não houve detecção de imunoexpressão da E-caderina nas áreas de necrose ou hemorragia dentro do tumor; assim como houve perda de expressão nas

áreas menos diferenciadas ou com presença de muco dentro do mesmo tumor (n=1).

Figura 10a. Imunoexpressão positiva da E-caderina no tecido normal

A figura 10a demonstra a imunoreatividade para E-caderina revelando coloração citoplasmática principalmente na porção apical das glândulas da mucosa adjacente aos tumores (200X)

Figura 10b. Imunohistoquímica positiva para E-caderina no tecido tumoral

A figura 10b demonstra a imunoreatividade da E-caderina. Notam-se membranas celulares coradas em marrom (400X).

Figura 11. Imunohistoquímica negativa da E-caderina

Na figura 11 observa-se ausência da expressão da E-caderina em adenocarcinoma do tipo difuso (400X).

Observou-se perda de expressão da E-caderina em 11/41 (27%) no grupo AGMP e em 4/21 (19%) do grupo de tumores únicos, como demonstrado na Tabela 6 $P=0,46$.

O dados da Tabela 9 revelam que não houve associação entre a imunoexpressão da E-caderina e os diversos dados clinico-patológicos.

Tabela 8. Imunohistoquímica para E-caderina nos AGMP e únicos

E-caderina	Mútiplos (%)	Únicos(%)
Alterado	11 (27%)	4 (19%)
Normal	30 (73%)	17 (81%)
Total	41(100%)	21/(100%)

Fisher, P= 0,46

Tabela 9. Associação da imunoe expressão da E-caderina com os dados clínico-patológicos

Variável	Categoria	E-caderina				
		Múltiplos		Únicos		
		Não alterada	Alterada	P	Não alterada	Alterada P
Idade	Média	65,2	69,8	0,39	58,6	63,0 0,22
Gênero	Masculino	9	4	0,9	9	4 0,1
	Feminino	4	2		8	0
Localização	Fundo	4	1	0,6	2	1 0,8
	Cárdia/Corpo	9	5		6	1
	Antro-piloro	17	5		9	2
Laurén	Intestinal	23	7	0,4	12	2 0,3
	Difuso	7	4		4	2
	Misto	0	0		0	0
Classificação T	T1	17	7	0,8	6	1 0,6
	T2	0	1		4	2
	T3	3	2		7	1
	T4	0	0		0	0
Estádio N	N0	8	5	0,6	12	3 0,3
	N1	1	0		4	0
	N2	4	1		1	1
Precoce/Avançado	T1	17	7	0,7	6	1 0,7
	T2 ou >	13	4		11	3

5.7 Análise comparativa dos diversos marcadores

Em 78% dos AGMP e em 48% dos tumores únicos pelo menos uma das três vias de carcinogênese estava alterada (ANEXOS C e D).

A análise comparativa entre os diversos marcadores demonstrou que houve associação entre o p53 e o hMLH1 nos AGMP, ou seja, quando houve imunopositividade para o p53 o hMLH1 estava normal; enquanto que quando houve imunopositividade para o hMLH1 o p53 era negativo.

5.8 Análise comparativa do p53 vs. hMLH1

A tabela 10 demonstra a correlação da análise imunohistoquímica entre p53 e hMLH1.

Tabela 10. p53 vs. hMLH1

p53	hMLH1			
	Mútiplos		Únicos	
	Alterado	Normal	Alterado	Normal
Negativo	10	15	2	14
Positivo	0	16	2	3
P = 0,03				P = 0,22

5.9 Análise comparativa do p53 vs. E-caderina

A tabela 11 demonstra a correlação da análise imunohistoquímica entre p53 e E-caderina.

Tabela 11. p53 vs. E-caderina

p53	E-caderina			
	Múltiplo		Únicos	
	Alterado	Normal	Alterado	Normal
Negativo	6	19	4	2
Positivo	5	11	3	2
P = 0,72				P = 0,22

5.10 Análise comparativa do hMLH1 vs. E-caderina

A tabela 12 demonstra a correlação da análise imunohistoquímica entre hMLH1 e E-caderina.

Tabela 12. hMLH1 vs. E-caderina

hMLH1	E-caderina			
	Múltiplo		Únicos	
	Alterado	Normal	Negativo	Normal
Negativo	7	23	1	3
Positivo	3	8	3	14
P = 0,54				P = 0,60

6 DISCUSSÃO

Os carcinomas gástricos sincrônicos são encontrados em 3,5% a 10% das neoplasias gástricas. Acredita-se que se originam de um mesmo microambiente no estômago e poderiam, portanto, apresentar alterações gênicas similares (Honmyo et al., 1989; Koda et al 1995; Lee et al 2001). Desta maneira, é sempre útil a investigação destes tumores, quanto aos mecanismos de carcinogênese envolvidos.

O câncer gástrico múltiplo freqüentemente mostra similaridade na morfologia macroscópica e microscópica no mesmo doente (Esaki et al., 1987). Da mesma forma, um câncer secundário ocorre mais amiúde em paciente com câncer gástrico múltiplo, quando comparado a um câncer gástrico único, podendo talvez indicar predisposição genética de desenvolvimento de câncer (Kaibara et al., 1993).

Na presente investigação, utilizou-se o grupo controle composto por adenocarcinomas gástricos únicos com características clínico-patológicas similares. Isto ocorreu com o intuito de se comparar, adequadamente, com o grupo de adenocarcinoma gástrico múltiplo sincrônico quanto às alterações imunohistoquímicas e esclarecer as rotas carcinogênicas envolvidas no desenvolvimento dos tumores múltiplos.

Estudo anterior demonstrou que os adenocarcinomas gástricos múltiplos primários ocorrem na mesma faixa etária, sexo e localização dos

tumores gástricos únicos (Kang et al., 1997). Entretanto, o tipo histológico que predomina nos tumores gástricos múltiplos é o tipo intestinal de Laurén, quando comparado aos únicos. São menos invasivos no momento do diagnóstico, e são mais comumente diagnosticados no estágio precoce e não apresentam comprometimento linfonodal (N0) (Honmyo et al, 1989; Wittekind et al, 1997; Kang et al, 1999; Lee et al, 2001).

Neste trabalho, os adenocarcinomas gástricos múltiplos primários apresentam-se com resultados similares aos da literatura. Houve nítido predomínio dos tumores do tipo intestinal de Laurén, em indivíduos com idade avançada, predominantemente homens, e com predomínio de estágio precoce sem metástase linfonodal. Em 26% dos pacientes com adenocarcinomas gástricos múltiplos primários, os tumores eram distantes, em outra porção do estômago. Desta maneira, Honmyo et al. (1989) ressaltam que o exame endoscópico digestivo alto cauteloso e cuidadoso deve ser realizado em todos os indivíduos com câncer gástrico para que se possa diagnosticar lesões secundárias as quais podem estar em áreas distintas do estômago. Este dado pode alterar o planejamento cirúrgico com vistas à cura do paciente, muitas vezes necessitando ampliação da margem de ressecção.

Atualmente, ainda não existem marcadores moleculares que possam prever com alto índice de acurácia os pacientes que irão, ou não, desenvolver os adenocarcinomas gástricos múltiplos primários. Nesta investigação, exploraram-se as principais vias da carcinogênese gástrica,

mutadora, supressora e da E-caderina, no intuito de se adquirir novos conhecimentos no processo carcinogênico do estômago.

Utilizou-se a detecção de proteínas através da imunohistoquímica, como alternativa aos estudos moleculares, baseados em reação de cadeia da polimerase. Ressalta-se que a perda da expressão gênica por meio de mecanismos epigenéticos - por exemplo nos genes hMLH1, p16 e p21, freqüentes nos tumores gástricos - ocorre na ausência de mutações - e representa uma alternativa para mutações somáticas e germinativas na inativação da função destes genes. O acúmulo protéico da proteína p53 correlaciona-se bem com a análise mutacional deste gene (Fiocca et al., 2001).

A instabilidade de microssatélites (MSI) consiste na expansão e/ou contração de DNA dentro das seqüências simples, incluindo cytosine-adenine (CA)_n dinucleotides de repetição (Miyoshi et al., 2001). Estas alterações gênicas compreendem as que são denominadas erros de replicação (RERs).

Mutações dos genes que participam do sistema de “mismatch repair”, incluindo hMSH2, hMLH1, hPMS1 e hPMS2, têm sido encontradas em pacientes com tumor colorretal hereditário não polipóide (HNPCC), nas células normais e nos tumores (Kim et al., 1998). A instabilidade gênica causada por aberrações no sistema dos genes de reparo é característica comum em famílias com HNPCC, mas também é encontrada nos tumores colorretais esporádicos e em outros carcinomas como o do estômago (Kim et al., 1998).

No câncer gástrico, a incidência de MSI varia de 15% a 39% (Chong et al., 1994; Perez et al., 2004). Entretanto, existem poucos relatos sobre a incidência de MSI em tumores gástricos múltiplos (Nakashima et al., 1995; Lee et al., 2001; Miyoshi et al 2001). Alguns estudos demonstraram haver maior incidência de instabilidade de microssatélite em tumores gástricos sincrônicos quando comparados aos tumores únicos (Nakashima et al., 1995; Yamasita et al., 2000; Miyoshi et al., 2001).

Sepulveda et al. (1999) demonstraram que a MSI ocorre mais freqüentemente em pacientes oriundos da Coréia (50%), quando comparados aos da Colômbia (15%) e Estados Unidos (7%) ($P = 0,003$ e $P = 0,03$, respectivamente), sugerindo que existe importância relativa de diferentes rotas de carcinogênese e que estas rotas podem variar de acordo com as regiões do mundo. Esta assertiva demonstra a necessidade de conhecimento destas alterações nos pacientes em nosso meio.

Apesar de mutações do hMLH1, hMHS2, ou hMSH6 serem raras nas neoplasias gástricas, a hipermetilação da região promotora do hMLH1 é a maior causa do aparecimento nos tumores humanos do fenótipo do tipo instabilidade de microssatélite (Fleisher et al., 1999; Kang et al., 1999). Sakata et al. (2002) referem que a metilação da região promotora do hMLH1 é evento freqüente nos tumores gástricos do tipo MSI-alto, tanto em tumores únicos quanto nos múltiplos, e a metilação correlaciona-se com a expressão protéica do hMLH1 (Leung et al., 1999; Jung et al., 2001; Sakata et al., 2002). Conseqüentemente, a imunohistoquímica para o hMLH1 pode ser utilizada como marcador de MSI-alto.

Nesta pesquisa, observou-se diminuição da imunoeexpressão do hMLH1 em 24% dos adenocarcinomas gástricos múltiplos primários, ocorrência similar à dos tumores únicos (19%). Estes dados são semelhantes aos da Literatura (Lee et al., 2001).

Os resultados desta pesquisa demonstraram haver concordância de expressão imunohistoquímica do hMLH1 (fenótipo mutador) nos diversos tumores do mesmo paciente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com tumores sincrônicos do cólon que demonstraram concordância sobre o MSI (Pedroni et al., 1999). Existiu concordância na expressão protéica dos tumores de um mesmo indivíduo, sugerindo alterações gênicas e epigênicas comuns aos genes de reparo nestes casos.

Entretanto, o fenótipo concordante MSI não implica origem clonal, porque os resultados do MSI nos tumores gástricos múltiplos diferem individualmente em cada tumor.

É possível que a exposição a carcinógenos em um mesmo meio ambiente gástrico - e não fatores genéticos específicos - sejam os responsáveis pelo desenvolvimento dos tumores gástricos múltiplos. Demonstrou-se que os adenocarcinomas gástricos múltiplos primários são exemplos de “cancerização de campo”, isto é, a exposição repetida aos carcinógenos, em todo o epitélio, predispõe todo o epitélio ao desenvolvimento de tumores múltiplos (Kang et al., 1997). Com relação à clonalidade dos adenocarcinomas gástricos múltiplos, a teoria propondo a multicentricidade ou origem independente, ao invés da invasão local e à

distância de um câncer (multifocalidade) têm sido privilegiada (Collins et al., 1952; Kang et al., 1997).

Na literatura, não existem na literatura pesquisas sobre a imunoeexpressão do hMSH6 nos tumores gástricos múltiplos. Neste estudo, observou-se alteração da proteína hMSH6 em 4,8% nos adenocarcinomas gástricos múltiplos primários e em 2,4% nos únicos.

Estes resultados sugerem a participação restrita das alterações deste gene na carcinogênese gástrica.

A rota supressora representada pelo p53 tem sido investigada principalmente através da análise imunohistoquímica, que é um método rápido, barato e fácil de detecção da proteína (Park et al., 2005).

A imunoeexpressão do p53 é evento freqüente nas neoplasias gástricas, e ocorrem em aproximadamente 60% dos casos, desde as lesões pré-cancerosas, adenomas, metaplasia intestinal até os tumores (Nigro et al., 1989; Joypaul et al., 1993; Hussain e Harris, 1998).

Neste estudo, não houve diferença de imunoeexpressão da proteína p53 quando se compararam os tumores únicos e múltiplos, nos tumores múltiplos foram observados 39% de positividade para a proteína p53, concordando com a literatura. Nos tumores únicos, a freqüência de imunoreatividade para o p53 foi relativamente menor (24%), apesar de não ser estatisticamente signicante. Uma possível explicação para tal fato pode ser a presença de mutação “nonsense”, resultando em proteína mais curta ou “frameshift”, proteína truncada, e, conseqüentemente imunohistoquímica negativa para o p53.

Estudos anteriores demonstraram que 43% dos carcinomas gástricos sincrônicos apresentam mutações do p53 e que as mutações eram discordantes nos tumores do mesmo paciente, isto é, as mutações diferiam nos diversos tumores do mesmo paciente, fortificando a teoria do “campo de cancerização” em carcinogênese gástrica (Kang et al., 1997).

A imunohistoquímica para o p53 foi concordante em 70% dos casos, inferindo diferente “status” de imunoexpressão para os diversos tumores de um mesmo indivíduo. Isto também favorece a teoria do “campo de cancerização”. Salienta-se que o método ideal para avaliar as diferentes mutações é o seqüenciamento do gene, não realizado neste trabalho.

Relatos anteriores sobre tumores avançados não mostraram evidência para a independência da rota supressora, principalmente representada pelas mutações do p53 e a rota mutadora, representada pela MSI (Park et al., 2005). Na presente investigação, não houve coincidência por p53 ou MSI no mesmo tumor. Estes dados sugerem que estas rotas principais de carcinogênese gástrica são independentes, ao menos no estágio inicial do desenvolvimento dos tumores gástricos múltiplos (Iacopetta et al., 1999; Ogata et al., 2001). Por outro lado, metade dos tumores múltiplos apresentaram alterações concordantes de E-caderina e do p53. É possível que os agentes carcinogênicos ajam sobre estas duas vias ao mesmo tempo no mesmo indivíduo; todavia, a independência das alterações não pode ser descartada.

Selecionou-se a E-caderina por ser marcador que tem importante papel na carcinogênese gástrica. Suas alterações gênicas e epigênicas ocorrem

principalmente nos tumores do tipo difuso de Laurén, em pacientes jovens, e também nos casos de câncer gástrico familiar (Wilner, 2005).

Wittekind et al. (1997) também verificaram alterações da proteína p53 e da E-caderina em 134 tumores múltiplos, observando que 33% tinham positividade para a proteína p53 e 25% para a E-caderina. Desta maneira, os resultados deste trabalho, assim como os da literatura, corroboram a participação das vias supressora e da E-caderina na carcinogênese gástrica dos tumores múltiplos.

Os AGMPs resultam do crescimento progressivo e coalescente de tumores menores e vizinhos com alterações genéticas semelhantes (Kodera et al., 1995; Shinmura et al., 1995). A heterogeneidade na diferenciação tumoral dentro de um mesmo tumor talvez seja devido à instabilidade gênica subsequente do clone original, mas também pode ser secundária aos efeitos do meio ambiente durante a evolução tumoral (Aretxabala et al., 1988; Tannapfel et al., 1994).

Portanto, adenocarcinomas gástricos múltiplos primários apresentam alta frequência de tumores do tipo intestinal e são diagnosticados em estádios menos avançados dos que os tumores únicos. Exame endoscópico digestivo alto cuidadoso, com verificação de todas as regiões gástricas, independente do diagnóstico de lesão maior, deve ser realizado em todos os pacientes, especialmente nos tumores do tipo intestinal, para se evitar lesões não diagnosticadas. As principais rotas de carcinogênese - mutadora, supressora e da E-caderina - participam da carcinogênese gástrica, tanto nos tumores únicos como nos múltiplos.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Dentro das condições de realização da presente investigação, utilizando-se um painel de marcadores moleculares imunohistoquímicos, pode-se concluir que:

1. As principais rotas de carcinogênese gástrica – via mutadora (hMLH1, hMSH2 e hMSH6), via supressora (p53) e via da E-caderina - estão envolvidas no desenvolvimento dos adenocarcinomas gástricos múltiplos primários;
2. Os adenocarcinoma gástricos múltiplos primários parecem resultar das mesmas alterações que ocorrem nos tumores únicos;
3. Não houve associação entre os marcadores estudados e os dados clínico-patológicos.

ANEXO A - Quadro 1. Observações gerais dos tumores únicos

Caso	Registro	Gênero	Idade	Tipo Histológico	Grau de diferenciação	Macroscopia	T	N	M	Tamanho lesão
1C	2946325I	M	65	Intestinal	Bem	Avançado	2	0	0	2,0 cm
3C	2949596H	F	55	Intestinal	Bem	Avançado	2	0	0	1,5 cm
4C	2901285K	M	70	Intestinal	Bem	Precoce	0	0	0	
5C	3031843E	M	67	Intestinal	Moderado	Avançado	2	0	0	13,0 cm
6C	3073069B	M	56	Intestinal	Moderado	Precoce	1	1	0	3,7 cm
7C	5192884E	M	58	Intestinal	Moderado	Avançado	2	1	0	4,5 cm
8C	3096973H	M	69	Intestinal	Pouco	Avançado	3	2	0	14,0 cm
9C	3080870G	F	56	Intestinal	Moderado	Avançado	3	1	0	5,5 cm
10C	3106481H	M	55	Intestinal	Moderado	Avançado	3	0	0	2,5 cm
12C	2705830A	M	63	Intestinal	Moderado	Precoce	1	0	0	
13C	2479914B	M	66	Intestinal	Moderado	Avançado	3	0	0	8,0 cm
14C	3140747H	F	54	Intestinal	Moderado	Precoce	1	2	0	4,0 cm
15C	3166300 ^a	M	61	Intestinal	Moderado	Avançado	2	0	0	6,0 cm
16C	3178256 ^a	M	52	Intestinal	Bem	Precoce	1	0	0	
17C	2476773H	F	78	Intestinal	Pouco	Avançado	3	0	0	6,0 cm
18C	3196414E	F	53	Difuso	Pouco	Avançado	2	0	0	2,5 cm
19C	3201719E	F	49	Difuso	Pouco	Avançado	3	1	0	6,5 cm
20C	3173690D	M	67	Intestinal	Bem	Avançado	3	0	0	2,0 cm
21C	3207178D	M	61	Misto	Moderado	Precoce	1	0	0	0,5 cm
22C	2311779D	F	36	Difuso	Moderado	Avançado	3	0	0	2,5 cm
23C	2459961B	M	66	Difuso	Moderado	Precoce	1	0	0	3,0 cm

ANEXO B - Quadro 2. Observações gerais dos tumores múltiplos

Caso	Registro	Gênero	Idade	Tipo Histológico			Grau de diferenciação			Macroscopia		
				1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
1M	2963595E	F	74	Intes.	Intes.	-	Mod.	Mod.	-	Precoce	Precoce	-
2M	2298509a	M	74	Intes.	Intes.	-	Bem	Bem	-	Precoce	Precoce	-
5M	3098053G	M	60	Difuso	Difuso	-	Pouco	Pouco	-	Avançado	Avançado	-
6M	3108800G	M	53	Difuso	Intes.	-	Mod.	Pouco	-	Avançado	Precoce	-
8M	3198112I	M	67	Intes.	Intes.	-	Mod.	Mod.	-	Avançado	Precoce	-
10M	3229246K	F	77	Difuso	Difuso	-	Pouco	Pouco	-	Avançado	Precoce	-
11M	3252136B	M	81	Intes.	Intes.	Intes.	Mod.	Mod.	Mod.	Avançado	Avançado	Avançado
12M	3253560K	F	15	Intes.	Intes.	-	Mod.	Mod.	-	Precoce	Precoce	-
13M	5176247H	M	52	Intes.	Intes.	Intes.	Mod.	Mod.	Mod.	Avançado	Precoce	Avançado
14M	5258385K	M	81	Intes.	Difuso	-	Pouco	Pouco	-	Avançado	Avançado	-
15M	3347158a	M	72	Intes.	Intes.	-	Mod.	Mod.	-	Precoce	Precoce	-
16M	44202008B	M	71	Intes.	Intes.	-	Bem	Mod.	-	Precoce	Precoce	-
17M	13564382a	F	74	Intes.	Intes.	-	Mod.	Bem	-	Precoce	Precoce	-
18M	2482004D	M	83	Difuso	Intes.	-	Pouco	Mod.	-	Avançado	Precoce	-
20M	2416900E	F	74	Intes.	Intes.	-	Bem	Bem	-	Precoce	Precoce	-
21M	2431318I	M	61	Intes.	Intes.	-	Mod.	Mod.	-	Precoce	Precoce	-
23M	2779446a	M	74	Difuso	Difuso	-	Pouco	Pouco	-	Avançado	Precoce	-
24M	13653368E	F	65	Intes.	Intes.	Intes.	Pouco	Bem	Bem	Avançado	Precoce	Precoce
25M	13640055K	M	68	Difuso	Difuso	-	Pouco	Pouco	-	Avançado	Precoce	-

Continuação das observações gerais dos tumores múltiplos

Caso	Registro	Estadiamento			Tamanho lesão		
		T	N	M	1ª lesão	2ª lesão	3ª lesão
1M	2963595E	1	0	0	2,0 cm	2,5 cm	
2M	2298509A	1	0	0	3,2 cm	0,6 cm	
5M	3098053G	3	2	0	6,0 cm	1,0 cm	
6M	3108800G	4	2	0	7,0 cm	3,0 cm	
8M	3198112I	3	2	0	2,0 cm	0,4 cm	
10M	3229246K	3	1	0	3,5 cm	2,0 cm	
11M	3252136B	3	0	0	6,0 cm	5,0 cm	2,5 cm
12M	3253560K	1	0	0	1,5 cm	1,5 cm	
13M	5176247H	3	0	0	4,0 cm	2,5 cm	6,0 cm
14M	5258385K	3	2	0	5,2 cm	2,4 cm	
15M	3347158A	1	0	0	2,0 cm	2,0 cm	
16M	44202008B	1	0	0	2,0 cm	1,2 cm	
17M	13564382A	1	0	0	2,5 cm	1,7 cm	
18M	2482004D	3	0	0	5,5 cm	1,5 cm	
20M	2416900E	1	0	0	1,2 cm	0,7 cm	
21M	2431318I	1	0	0	5,5 cm	3,5 cm	
23M	2779446A	2	0	0	6,5 cm	0,5 cm	
24M	13653368E	3	0	0	11,0 cm	4,2 cm	2,0 cm
25M	13640055K	3	2	0	5,0 cm	2,0 cm	

ANEXO C – Quadro 3. Classificação imunohistoquímica dos tumores únicos

Número	RG	Idade	Sexo	p53		hMLH1		hMSH2		hMSH6		E-Caderina	
				Intens.	Distr. *	Intens.	Distr. *	Intens.	Distr. *	Intens.	Distr. *	Intens.	Distr. *
1C	2946325I	65	M	0	0	-	3	4	-	3	3	-	3
3C	2949596H	55	F	0	0	-	3	4	-	4	4	-	3
4C	2901285K	70	M	0	0	-	0	0	+	4	-	-	3
5C	3031843E	67	M	2	2	+	1	1	+	4	2	-	0
6C	3073069B	56	M	0	0	-	3	4	-	4	3	-	3
7C	5192884E	58	M	3	2	+	1	1	+	3	3	-	3
8C	3096973H	58	M	2	3	+	3	4	-	4	2	-	0
9C	3080870G	69	F	0	0	-	1	2	+	4	3	-	3
10C	3106481H	56	F	0	0	-	2	3	-	4	-	-	3
12C	2705830A	55	M	0	0	-	2	2	-	4	4	-	4
13C	2479914B	63	M	0	0	-	1	3	-	3	4	-	3
14C	3140747H	54	F	0	0	-	2	4	-	3	3	-	4
15C	3166300A	61	M	0	0	-	3	4	-	4	-	-	0
16C	3178256A	52	M	0	0	-	-	-	-	3	3	-	3
17C	2476773H	78	F	1	2	+	2	3	-	4	4	-	3
18C	3196414E	53	F	0	0	-	3	4	-	4	2	-	3
19C	3201719E	49	F	0	0	-	2	3	-	4	4	-	4
20C	3173690D	67	M	2	3	+	3	4	-	4	3	-	2
21C	3207178D	61	M	0	0	-	4	4	-	4	4	-	4
22C	2311779D	36	F	0	0	-	4	4	-	4	3	-	3
23C	2459961B	66	M	0	0	-	3	4	-	2	2	-	0

* Resultado final

ANEXO D – Quadro 4. Classificação imunohistoquímica dos tumores múltiplos

N°		RG	Idade	Sexo	Tumor	p53		hMLH1		hMSH2		hMSH6		E-caderina			
						Intens.	Distr.	*	Intens.	Distr.	*	Intens.	Distr.	*	Intens. Distr.		
1M	2963595E	74	F	T1	3	2	+	3	4	4	-	4	4	-	1 2	+	
				T2	2	4	+	2	3	4	-	4	4	-	0 0	+	
2M	2298509A	74	M	T1	0	0	-	0	0	2	3	-	2	3	-	2 3	-
				T2	0	0	-	0	0	2	3	-	-	-	2 0	+	
5M	3098053G	60	M	T1	4	3	+	3	4	3	3	-	2	3	-	4 4	-
				T2	4	3	+	3	4	3	4	-	-	-	4 4	-	
6M	3108800G	53	M	T1	0	0	-	4	4	3	4	-	1	4	-	0 0	+
				T2	3	1	+	2	3	-	-	2	1	-	4 3	-	
8M	3198112I	67	M	T1	0	0	-	3	2	3	4	-	4	4	-	3 3	-
				T2	0	0	-	3	3	3	3	-	4	4	-	4 4	-
10M	3229246K	77	F	T1	0	0	-	1	3	2	3	-	2	2	-	0 0	+
				T2	0	0	-	0	0	-	-	-	-	-	3 3	-	
11M	3252136B	81	M	T1	2	3	+	3	4	4	-	3	2	-	4 4	-	
				T2	3	2	+	3	4	4	-	3	2	-	4 4	-	
				T3	3	3	+	3	4	4	-	3	3	-	3 4	-	
12M	3253560K	15	F	T1	0	0	-	1	2	3	3	-	3	2	-	3 4	-
				T2	0	0	-	1	2	3	4	-	3	2	-	3 4	-

* Resultado final

Continuação da classificação imunohistoquímica dos tumores múltiplos

N	RG	Idade	Sexo	Tumor	p53 Intens. Distr. *	hMLH1 Intens. Distr. *	hMSH2 Intens. Distr. *	hMSH6 Intens. Distr. *	E-caderina Intens. Distr. *		
13M	5176247H	52	M	T1	0	-	4	2	4	0	+
				T2	0	-	3	-	-	4	-
				T3	0	-	-	-	-	4	-
14M	5258385K	81	M	T1	0	-	4	4	4	4	-
				T2	0	-	4	4	4	4	-
15M	3347158 ^a	72	M	T1	0	-	2	3	3	2	+
				T2	0	-	3	3	3	4	-
	44202008B	71	M	T1	0	-	2	3	4	2	+
16M				T2	0	-	2	4	3	4	-
17M	13564382A	74	F	T1	3	+	2	3	0	3	-
				T2	0	-	3	4	2	3	-
18M	2482004D	83	M	T1	3	+	4	3	2	4	-
				T2	3	+	2	4	4	4	-
20M	2416900E	74	F	T1	2	+	2	3	2	1	+
				T2	0	-	2	3	2	2	+
21M	2431318I	61	M	T1	0	-	0	3	2	3	-
				T2	0	-	0	3	3	3	-
23M	2779446 ^a	74	M	T1	2	+	-	2	3	0	+
				T2	4	+	-	3	0	3	-
24M	13653368E	65	F	T1	4	+	4	3	4	4	-
				T2	2	+	4	3	4	4	-
				T3	0	-	4	3	-	4	-
25M	13640055K	68	M	T1	0	-	-	4	4	4	-
				T2	0	-	-	3	4	4	-

* Resultado final

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abuakwa-O Y, Noda M, Perenyi M, Kobayashi N, Kashima K, Hattotr T, Pignatelli M. Expression of the E-cadherin/catenin (α , β -, and γ -)complex correlates with the macroscopic appearance of early gastric cancer. J. Pathol. 2000; 192: 433-439.

Aretxabala X, Yonemura Y, Sugiyama K, Kamata T, Konishi K, Miwa K and Miyazakil. DNA ploidy pattern and tumor spread in gastric cancer. Br J Surg. 1988;75: 770-773

Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, and Hofler H. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. Cancer Res. 1994;54:3845-52

Berx G, Becker KF, Hofler H, van Roy F. Mutations of the human *cadherin* (*CDH1*) gene. Hum Mutat 1998; 12: 226-37.

Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. Int J Cancer. 2000;15(87):200-3.

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

Bobrow MN, Shaughnessy KJ, Litt GJ. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification, application to membrane immunoassays. *J Immunol Methods*. 1991;137(1):103-12.

Bonney GE, Elston RC, Correa P, Haenszel W, Zavala DE, Zarama G, Collazos T, Cuello C. Genetic etiology of gastric carcinoma: I. Chronic atrophic gastritis. *Genet Epidemiol*. 1986;3:213-24.

Bresciane C, Ribeiro U. Jr, Safatle-Ribeiro AV, Oliva R, Jacob CE, Zilberstein B, Gama-Rodrigues JJ. Dieta e Cancer Gastrico. In: autores do livro. *Dieta, Nutricao e Câncer*. São Paulo: Atheneu; 2004. 3238-43.

Chong JM, Fukayama M, Hayashi Y, Takizawa T, Koike M, Konishi M, Kikuchi R-Y, Miyaki M. Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res*. 1994; 54(17):4595-97.

Collins WT, Gall EA. Gastric carcinoma: a multicentric lesion. *Cancer*. 1952; 5:62-72.

Correa P, Chen VW. Gastric cancer. *Cancer Surv*. 1994;19(20):55-76.

Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J. Gastroenterol*. 2006;12(3):354-362.

Del Grande JC, Lourenço LG, Haddad CM. *Câncer do Estômago Aspectos atuais do diagnóstico e tratamento*. In: Gama-Rodrigues JJ, Lopasso FP, Del Grande JC, Safatle NF, Bresciani C, Malheiros CA, Lorenço LG, Kassab P. editores. *Câncer Gástrico localmente Avançado: Tratamento Cirúrgico*. São Paulo: Andrei; 2002. 263-73.

Esaki Y, Hirokawa K, Yamashiro M. Multiple gastric cancer in the aged with special reference to intramucosal cancers. *Cancer*. 1987; 59(3) :560-5.

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

Esaki Y, Hirokawa K, Yamashiro M. Multiple gastric cancer in the aged with special reference to intramucosal cancers. *Cancer*. 1987; 59(3) :560-5.

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

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. *Hepato-Gastroenterol*. 2001;48:1523-30.

Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1999; 59(5): 1090-95.

Fricke E, Keller G, Becker I, Rosivatz E, Schott C, Plaschke S, Rudelius M, Hermannstadter C, Busch R, Hofler H, Becker KF, Luber 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;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;21;69(3):184-9.

Gallin WJ. Evolution of the "classical" cadherin family of cell adhesion molecules in vertebrates: *Mol Biol Evol.* 1998; 15(9): 1099-107.

Graziano F, Humar B, Guilford P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. *Ann Oncol.* 2003;14:1705-13.

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.

Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated types of gastric cancer. *Cancer Research*. 1993;53(21):5087-89.

Hollstein MC, Sidrankis D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253:49-53.

Honmyio U, Misumi A, Murakami A, Hagan Y, Akagi M. Clinicopathological analysis of synchronous multiple gastric carcinoma. *Eur Surg Oncol*. 1989; 15:316-21.

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

Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer. *Recent Results Cancer Res*. 1998; 154:22-36.

Iacopetta BJ, Soong R, House AK, Hamelin R. Gastric carcinomas with microsatellite instability: clinical features and mutations to the TGF- β type II receptor, IGFII receptor, and Bax genes. *J Pathol*. 1999;187:428-32.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. <http://www.inca.org.br>, Rio de Janeiro, 2006.

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.

Jung H, Jung K, Shin Y, Ro J, Kang G. Metilation of the hMLH1 promoter in multiple gastric carcinomas with microsatellite instability. *Pathol Intern*. 2001;51: 445-51.

Jureidine R. Inflência da expressão do gene p53 na resposta à quimioterapia FAM para o carcinoma gástrico avançado.(Doutorado). São Paulo:Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Kaibara N, Maeta M, Ikeguchi M. Patients with multiple primary gastric cancers tend to develop second primaries in organs other than the stomach. *Surg Today*. 1993;23(2):186-88.

Kang GH, Kim CJ, Kim WH, Kang YK, Kim HO, Kim YI. Genetic evidence for the multicentric origin of synchronous gastric carcinoma. *Lab Invest*. 1997; 76(3):407-17.

Kang GH, Yoon GS, Lee HK, Kwon YM, Ro JY. Clinicopathologic characteristics of replication error-positive gastric carcinoma. *Mod P Pathol*. 1999;12:15-20.

Kashiwagi K, Watanabe M, Ezaki T, Kanai T, Ishii H, Mukai M. Clinical usefulness of microsatellite instability for the prediction of gastric adenoma or adenocarcinoma in patients with chronic gastritis. *Br Journal Cancer*. 2000; 82(11):1814-18.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*. 1991;51(51): 6304-11.

Kim WH, Lee HW, Park SH, Kim YI, Chi JG. Microsatellite instability in young age colorectal cancer. *Pathol Int*. 1998;48:586-94.

Knudsen Ka, Frankowski C, Jonhson KR, Wheelock MJ. A role for cadherins in cellular signaling and differentiation. *J Cell Biochem Suppl*. 1998;30-31:168-76.

Kodera Y, Yamamura Y, Torii A, Uesaka K, Iría T, Yasui K. Incidence, diagnosis and significance of multiple gastric cancer. *Br J Surg*. 1995;82:1540-43.

Kumar Vinay, Ramzi S. Cotran, Stanley C. Robbins. Trato gastrointestinal. In: Patologia básica. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan S.A; 1992. 394 – 401.

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

Lee H, Lee BL, Kim SH, Woo DK, Kim HS, Kim WH. Microsatellite instability in synchronous gastric carcinomas. Int J Cancer. 2001;91: 619-24.

Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Cham AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. Cancer Res. 1999; 59(1): 159-164.

Lynch HT, Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl Journal Med. 2003; 348(10): 919-32.

Machado JC, Carneiro F, Beck S, Rossi S, lopes J, Taveira-Gomes A, cardoso-Oliveira M. E-caderin expression is associated with the isolated cell/diffusehistotype and with features of biological aggressiveness of gastric carcinoma. Int JH Surg Pathol. 1998;6:135-44.

Marrano D, Viti G, Grigioni W, Marra A. Synchronous and metachronous cancer of the stomach. *Eur J Surg Oncol*. 1987;13(6): 493-98.

Mayer B, Jonhson JP, Leidl F, Jauch KW, Heiss MM, Schildberg FW, Birchmeier W, Funke I. E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: Down- regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res*. 1993; 53:1690-5.

Miyoshi E, Haruma K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Shimamoto F, Chayama K. Microsatellite instability is a genetic marker for the development of multiple gastric cancers. *Int J Cancer*. 2001;95: 350-53.

Moertel CG, Borgen JA, Soule EH. Multiple gastric cancers. Review of the Literature and study of 42 cases. *Gastroenterology*. 1957;32:1095-103.

Muta H, Noguchi M, Kanai Y, Ochiai A, Nawata H, and Hirohashi S. E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Jpn J Cancer Res*. 1996;87: 843-848.

Nakashima H, Honda M, Inoue H, Shibuta K, Arinaga S, Era S, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T. Microsatellite instability in multiple gastric cancers. *Int J Cancer*. 1995;64:239-42.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Davilee P. Mutation in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature*. 1989;342:705-8.

Ogata S, Tamura G, Endoh Y, Sakata K, Ohmura K, Motoyama T. Microsatellite alterations and target gene mutations in the early stages of multiple gastric cancer. *J Pathol*. 2001;194:334-40.

Pan Y, Ma B, Levine AJ, Nussinov R. Coparison of the human and worm p53 structures suggests a way for enhancing stability. *Biochemistry*. 2006;12:3925-33.

Park IJ, Kim HC, Kim JS, Yu ES, Chang SY, Kim JC. Correlation between hMLH1/hMSH2 and p53 protein expression in sporadic colorectal cancer. *Hepato-Gastroenterol*. 2005;52:450-54.

Parry DM, Mulvihill JJ, Miller RW, Berg K, Carter CL. Strategies for controlling cancer through genetics. *Cancer Res*. 1988;47:6814-17.

Pedroni M, Tammassia MG, Percesepe A, Roncucci L, Benatti P, Lanza G, et al. Microsatellite instability in multiple colorectal tumors. *Int J Cancer*. 1999;81:1-5.

Perez RO, Jacob CE, D`Otaviano FL, Alvarenga C, Safatle-Ribeiro A, Ribeiro Jr, U, Bresciani C, Zilberstein B, Krieger JE, Habr-Gama A, Gama-Rodrigues J. Microsatellite instability in solitary and sporadic gastric cancer. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*. 2004; 59(5):279-85.

Perucho M. Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nature Med*. 1996;2:630-31.

Ribeiro U Jr, Safatle-Ribeiro AV. *Biologia Celular e Marcadores do Câncer Gástrico*. In: Gama-Rodrigues JJ, Del Grande JC, Martinez JC, editores. *Tratado de Clínica Cirúrgica do Sistema Digestório*. São Paulo: Atheneu; 2004. p.557-65.

Ribeiro, U Jr, Finkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV, Landreneau RJ, Clarke MR, Bakker A, Swalsky PA, Gooding WE, Posner MC. p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer*. 1998;83(1): 7-18.

Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, and Boyd J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet*. 1994;7: 98-102.

Roukos DH. Current status and future perspectives in gastric cancer management. *Cancer treat*. 2000;26: 243-55.

Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Jr U, Reynolds JC, Gama-Rodrigues JJ, Iryia 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;78(11): 2288-99.

Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Jr U, Sakai P, Clarke MR, Fylyk S, Shinichi I, Gama-Rodrigues J, Finkelstein SD, Reynolds JC. Integrated p53 histopathologic genetic analysis of premalignant lesions of the esophagus. *Cancer Detection and Prevention*. 2000;24(1):13-23.

Sakata K, Tamura G, Endoh Y, Ohmura K, Ogata S, Motoyama T. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in solitary and multiple gastric cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer*. 2002;86:564-67.

Sepulveda AR, Santos AC, Yamaoka Y, Wu L, Gutierrez O, Kim JG, Graham DY. Marked differences in the frequency of microsatellite instability in gastric cancer from different countries. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:3034-8.

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.

Shibata N, Watari J, Fujiya M, Tanno S, Saiitoh Y, Kohgo Y, Cell Kinetics and genetic instabilities in differentiated type early gastric cancers with different mucin phenotype. *Hum Pathol.* 2003;34:32-40.

Shinmura K, Sugimura H, Naito Y, Shields PG, Kino I. Frequent co-occurrence of mutator phenotype in synchronous independent multiple cancers of the stomach. *Carcinogenesis.* 1995;16(12):2989-93.

Shino Y, Watanabe A, Yamada Y, Tanase M, Yamada T, Matsuda M, Yamashita J, Tatsumi M, Miwa T, Nakano H. Clinicopathologic evaluation of immunohistochemical E-cadherin expression in human gastric carcinomas. *Cancer.* 1995; 76: 2193201.

Smith ME, Pignatelli M. The molecular histology of neoplasia: the role of the cadherin/catenin complex. *Histopathology.* 1997 Aug; 31(2): 107-11.

Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutation affecting DNA mismatch repair. *Nature.* 1993;365(6443):207-08.

Strickler JG, Zheng J, Shu Q, Burgart L, Alberts S, Chibata D. P53 mutation microsatellite instability in sporadic gastric cancer: when guardians fail. *Cancer Research.* 1994; 54:4750-55.

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

Takeichi M. The cadherin cell adhesion receptor family: roles in multicellular organization and neurogenesis. Pro Clin Biol Res. 1994; 390:145-53.

Tannapfel A, Yokozaki H, Yasui W, Wittekind Ch and Tahara E. Effect of hepatocyte growth factor (HGF) scatter factor (SF) on the expression of E- and P-cadherin in gastric carcinoma cell lines. Virchows Arch. 1994;425:139-44.

Wilner Gladis. Alterações genéticas da E-caderina /CDH1 no câncer gástrico familiar. (Mestrado). São Paulo: Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

Wittekind C, Klimpfinger M, Hermanek P, Tannapfel A. Multiple simultaneous gastric carcinomas. Br J Cancer. 1997;76(12):1604-09.

Yamasita K, Arimura Y, Kurokawa S. Microsatellite instability in patients with multiple primary cancers of the gastrointestinal tract. Gut. 2000;46:790-94.

Yasui W. Molecular-pathological diagnosis of gastric cancer. Gan To Kagaku Ryoho. 2005;32(4): 427-31.