

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**

**JOEL DEL BEL PÁDUA**

**Correlação da expressão imuno-histoquímica de proteínas relacionadas ao reparo do  
DNA por recombinação homóloga com parâmetros clinicopatológicos no  
adenocarcinoma gástrico**

**Ribeirão Preto**  
**2021**

**JOEL DEL BEL PÁDUA**

**Correlação da expressão imuno-histoquímica de proteínas relacionadas ao reparo do DNA por recombinação homóloga com parâmetros clinicopatológicos no adenocarcinoma gástrico**

Versão corrigida

A versão original encontra-se disponível no Departamento de Patologia e Medicina Legal e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Patologia

Opção: Patologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Mariângela Ottoboni Brunaldi

**Ribeirão Preto  
2021**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Pádua, Joel Del Bel.

Correlação da expressão imuno-histoquímica de proteínas relacionadas ao reparo do DNA por recombinação homóloga com parâmetros clinicopatológicos no adenocarcinoma gástrico. Ribeirão Preto, 2021.

124 f.:22 il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Patologia.

Orientador: Brunaldi, Mariângela Ottoboni.

1. Câncer gástrico. 2. Recombinação homóloga. 3. Imuno-histoquímica.  
4. Carcinogênese gástrica.

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Joel Del Bel Pádua**

Correlação da expressão imuno-histoquímica de proteínas relacionadas ao reparo do DNA por recombinação homóloga com parâmetros clinicopatológicos no adenocarcinoma gástrico.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:** Patologia

Aprovada em: 09/09/2021

### **Banca Examinadora**

Profa. Dra Mariângela Ottoboni Brunaldi

Instituição: FMRP-USP

Prof. Dr. Rafael Kemp

Instituição: FMRP-USP

Profa. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues Kobayasi

Instituição: FMB-UNESP

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mariângela Ottoboni Brunaldi, minha orientadora, pela condução do trabalho, apoio constante, disponibilidade, acolhimento e incentivo.

Ao Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro, ao Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva (in memoriam) e ao Prof. Dr. Fernando Chahud, do Departamento de Patologia, pela participação na elaboração da pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Sebastião dos Santos, ao Prof. Dr. Ajith Kumar Sankarankutty e à Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, do Departamento de Cirurgia e Anatomia, pelo importante apoio, pelas sugestões na elaboração da pesquisa, pela concessão das amostras do Biorrepositório e disponibilização da estrutura, recursos e pessoal do Laboratório de Biologia Molecular daquele Departamento, onde temos feito estudos de biologia molecular que complementarão esta pesquisa.

Também ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior e a Greice Andreotti de Molfetta, do Centro de Medicina Genômica, indispensáveis à consecução de tais estudos.

À colega de pós-graduação Carolline Fontes Alves Mariano, pela grande participação nas várias etapas desta pesquisa.

A Ana Maria Anselmi Dorigan e aos técnicos de laboratório do Departamento de Patologia Laura Midori Kawasse e Márcia Aparecida Ferreira (imuno-histoquímica), e Guilherme de Paula Lemos, Flávio Henrique Leite e Deisy Mara da Silva (confecção dos TMAs), pela dedicação, esmero, profissionalismo.

A Fermino Sanches Lizarte Neto, Rogério Lenotti Zuliani, Letícia Passi Turra e Cláudia Tarcila Gomes Sares, do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia, pela dedicação, paciência e disponibilidade.

A Creusa Maria Roveri Dal Bó, responsável por grande parte da análise estatística.

Às secretárias do Departamento de Patologia, Camila de Luca Zambonini, Neide Terezinha Gonçalves e Rosângela Mazzucato C. de Paiva, pela disponibilidade e paciência.

Aos oficiais administrativos responsáveis pelo Arquivo do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da FMRPUSP, César Alberto Brigato Júnior e Décio Antônio Barrionovo Filho, atenciosos e prestativos.

Aos meus pais, Heber Vicente de Pádua e Consuelo Soares Del Bel Pádua.

Aos amigos médicos residentes e contratados do Serpat.

À Fapesp e à Capes pelo apoio científico e financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) – código de financiamento nº 2017/24081-0.

## RESUMO

PÁDUA, J.D.B. **Correlação da expressão imuno-histoquímica de proteínas relacionadas ao reparo do DNA por recombinação homóloga com parâmetros clinicopatológicos no adenocarcinoma gástrico.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O câncer gástrico tem, no mundo, a quinta maior incidência e a terceira maior mortalidade dentre as neoplasias malignas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão das proteínas RAD51, ATR, ATM, BRCA1, BRCA2,  $\gamma$ H2AX, CHK2 e p53 em adenocarcinomas gástricos e sua correlação com características clinicopatológicas. Essas proteínas participam diretamente ou têm relação com o mecanismo de reparo das quebras duplas do DNA por recombinação homóloga, e alterações da sua expressão já foram demonstradas em vários tumores. Trata-se de estudo retrospectivo baseado na análise imuno-histoquímica de microarranjos teciduais com amostras de neoplasia e de mucosa gástrica não neoplásica de 121 casos de adenocarcinoma gástrico, obtidas de blocos de parafina arquivados no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, oriundos de peças cirúrgicas de gastrectomia realizadas entre 2008 e 2017. A positividade para RAD51 nuclear nos tumores correlacionou-se com maior sobrevida global (*hazard ratio* = 0,576;  $p = 0,048$ ) e sobrevida livre de doença (HR = 0,531,  $p = 0,022$ ) na análise univariada da população total. A correlação com a sobrevida global foi também estatisticamente significativa no grupo de pacientes com tratamento exclusivamente cirúrgico, mas não naqueles submetidos a terapia adjuvante ou neoadjuvante. Adicionalmente, o tratamento adjuvante mostrou associação com aumento da sobrevida global dentre os pacientes com tumor negativo para RAD51 nuclear, mas não no grupo positivo para o marcador. A positividade do tumor para RAD51 nuclear também se correlacionou com menor frequência de invasão vascular (76,3% contra 95,5%,  $p = 0,044$ ) e de metástase em linfonodos regionais (61,9% contra 95,5%,  $p = 0,002$ ) e a menor tamanho tumoral (5,61 cm contra 7,33 cm,  $p = 0,015$ ). Foi mais frequente após terapia neoadjuvante (93,75% contra 77,01% de casos positivos para RAD51 nuclear,  $p = 0,037$ ). A negatividade para ATR nuclear na neoplasia correlacionou-se com maior tamanho tumoral (6,63 cm contra 4,94 cm,  $p = 0,002$ ) e com maior grau histológico – maior proporção de tumores moderadamente diferenciados e menor proporção de bem diferenciados ( $p = 0,013$ ). A positividade para ATM no tumor foi associada a maior sobrevida livre de doença, na análise multivariada (HR = 0,358,  $p = 0,02$ ). A positividade para BRCA2 nuclear no tumor correlacionou-se com menor sobrevida global na análise multivariada (HR = 1,764,  $p = 0,021$ ) e com tipo histológico difuso ( $p = 0,031$ ); além disso, sua alta expressão associou-se à invasão vascular ( $p = 0,033$ ). No tipo histológico intestinal, contudo, os tumores positivos para BRCA2 nuclear mostraram-se mais bem diferenciados ( $p = 0,003$ ). As correlações mais fortes observadas entre os vários resultados imuno-histoquímicos nas amostras tumorais foram entre ATM e BRCA1 nuclear ( $r = 0,428$ ,  $p < 0,001$ ), entre  $\gamma$ H2AX e p53 ( $r = 0,407$ ,  $p < 0,001$ ), entre  $\gamma$ H2AX e ATR nuclear ( $r = 0,552$ ,  $p < 0,001$ ), e entre  $\gamma$ H2AX e RAD51 nuclear ( $r = 0,491$ ,  $p < 0,001$ ). Concluímos que a ausência de expressão de RAD51 nuclear, ATR nuclear ou ATM ou a expressão de BRCA2 nuclear parecem favorecer a progressão tumoral do adenocarcinoma gástrico. Por outro lado, a presença de RAD51 nuclear aparentemente promove quimiorradiorresistência.

**Palavras-chave:** câncer gástrico; recombinação homóloga; reparo do DNA; RAD51; ATR; ATM; BRCA1; BRCA2;  $\gamma$ H2AX; CHK2; p53; imuno-histoquímica; carcinogênese gástrica.

## ABSTRACT

PÁDUA, J.D.B. **Correlation of immunohistochemical expression of proteins related to DNA repair by homologous recombination with clinicopathological parameters in gastric adenocarcinoma.** Masters dissertation. Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Gastric cancer has the fifth highest incidence and the third highest mortality among malignant neoplasms worldwide. The objective of this work was to evaluate the expression of RAD51, ATR, ATM, BRCA1, BRCA2,  $\gamma$ H2AX, CHK2 and p53 proteins in gastric adenocarcinomas and its correlation with clinicopathological characteristics. These proteins participate directly or are related to the homologous recombination mechanism of DNA double-strand break repair, and changes in their expression have already been demonstrated in several tumors. This is a retrospective study based on immunohistochemical analysis of tissue microarrays with neoplastic and non-neoplastic gastric mucosa samples of 121 cases of gastric adenocarcinoma, obtained from paraffin blocks filed at the Pathology Service of the University Hospital of Ribeirão Preto Medical School, of surgical specimens from gastrectomies performed between 2008 and 2017. Positivity for nuclear RAD51 in tumors correlated with greater overall survival (hazard ratio = 0.576;  $p = 0.048$ ) and disease-free survival (HR = 0.531,  $p = 0.022$ ) in the univariate analysis of the total population. The correlation with overall survival was also statistically significant in the group of patients undergoing surgical treatment exclusively, but not in those with adjuvant or neoadjuvant therapy. In addition, adjuvant treatment associated with increased overall survival among patients with nuclear RAD51 negative tumor, but not in the positive group. Tumor positivity for nuclear RAD51 was also correlated with a lower frequency of vascular invasion (76.3% versus 95.5%,  $p = 0.044$ ) and metastasis to regional lymph nodes (61.9% versus 95.5%,  $p = 0.002$ ) and with smaller tumor size (5.61 cm versus 7.33 cm,  $p = 0.015$ ). It was more frequent after neoadjuvant therapy (93.75% versus 77.01% of nuclear RAD51 positive cases,  $p = 0.037$ ). Negativity for nuclear ATR in neoplasia correlated with a larger tumor size (6.63 cm versus 4.94 cm,  $p = 0.002$ ) and with a higher histological grade - higher proportion of moderately differentiated tumors and lower proportion of well-differentiated ones ( $p = 0.013$ ). Positivity for ATM in the tumor was associated with longer disease-free survival in the multivariate analysis (HR = 0.358,  $p = 0.02$ ). Positivity for nuclear BRCA2 in the tumor correlated with lower overall survival in multivariate analysis (HR = 1.764,  $p = 0.021$ ) and with diffuse histological type ( $p = 0.031$ ); in addition, its high expression was associated with vascular invasion ( $p = 0.033$ ). In the intestinal histological type, however, the positive tumors for nuclear BRCA2 were better differentiated ( $p = 0.003$ ). The strongest correlations observed between the various immunohistochemical results in the tumor samples were between ATM and nuclear BRCA1 ( $r = 0.428$ ,  $p < 0.001$ ), between  $\gamma$ H2AX and p53 ( $r = 0.407$ ,  $p < 0.001$ ), between  $\gamma$ H2AX and nuclear ATR ( $r = 0.552$ ,  $p < 0.001$ ), and between  $\gamma$ H2AX and nuclear RAD51 ( $r = 0.491$ ,  $p < 0.001$ ). We conclude that the absence of expression of nuclear RAD51, nuclear ATR or ATM or the expression of nuclear BRCA2 seems to favor tumor progression of gastric adenocarcinoma. On the other hand, the presence of nuclear RAD51 apparently promotes chemoradioresistance.

**Keywords:** gastric cancer; homologous recombination; DNA repair; RAD51; ATR; ATM; BRCA1; BRCA2;  $\gamma$ H2AX; CHK2; p53; immunohistochemistry; gastric carcinogenesis.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Resposta ao dano do DNA e início da recombinação homóloga. Múltiplas proteínas de reparo acumulam-se no foco de quebra do DNA. Inicialmente, a quebra dupla é detectada pelo complexo MRN, que ativa a quinase ATM, a qual fosforila múltiplas proteínas, ativando-as e levando à excisão das extremidades 5' da quebra pelo complexo formado por CtIP, MRN e BRCA1. RAD51, com a participação de BRCA2, associa-se às extremidades de fitas simples expostas e busca a sequência homóloga que será molde para o reparo. Paralelamente ao processo de reparo, ativação de p53 e/ou de CHK1 para o ciclo celular.....27
- Figura 2. Recombinação homóloga. A alça deslocada pode ser processada por dois mecanismos, chamados de SDSA e DSBR. No SDSA apenas uma das extremidades da quebra invade a fita dupla de DNA que servirá de molde, é alongada e desprende-se. No DSBR, a dupla invasão e alongamento ocasionam a formação de uma junção de Holliday dupla, que pode ser dissolvida pela movimentação das junções, ou resolvida por secções.....29
- Figura 3. Controle da atividade da p53 e seus efeitos. MDM2 e MDMX favorecem a degradação de p53, o que é inibido por ATM, ATR e CHK2. P53 conduz à parada do ciclo celular ou à apoptose. ....31
- Figura 4. Distribuição dos casos por tipo histológico. ....49
- Figura 5. Histologia dos adenocarcinomas gástricos. A: padrão intestinal (400X). B: padrão difuso (400X). C: adenocarcinoma difuso de células em anel de sinete, indicadas por setas (400X). D: área mucinosa (setas) em adenocarcinoma de padrão intestinal (200X). ....51
- Figura 6. Esquemas de terapia adjuvante ou neoadjuvante a que os pacientes foram submetidos.....54
- Figura 7. Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global para a população total em estudo.....55
- Figura 8. Curva de Kaplan-Meier da sobrevida livre de doença para a população total em estudo.....56
- Figura 9. Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global e da sobrevida livre de doença, comparando os pacientes com e sem tratamento neoadjuvante. A sobrevida é maior para aqueles com o tratamento, com significância estatística pelo teste *log-rank*. ....58
- Figura 10. Imuno-histoquímica para p53 nos adenocarcinomas. A: negativo. B: marcação fraca. C: marcação moderada. D: marcação forte. Setas indicam a marcação, nuclear (Aumento de 400X.).....60
- Figura 11. Imuno-histoquímica para CHK2 nos adenocarcinomas. A: marcação fraca. B e C: marcação moderada. D: marcação forte. Setas indicam a marcação, nuclear. (Aumento de 400X.).....61

Figura 12. Imuno-histoquímica para ATM nos adenocarcinomas. A: negativo. B: marcação fraca. C: marcação moderada. D: marcação forte. Setas indicam a marcação, nuclear. (Aumento de 400X.).....	62
Figura 13. Imuno-histoquímica para BRCA1 nos adenocarcinomas. A: marcação principalmente nuclear. B: marcação citoplasmática. C e D: marcação nuclear e citoplasmática. Setas: marcação nuclear. Pontas de seta: marcação citoplasmática. (Aumento de 400X.).....	63
Figura 14. Imuno-histoquímica para BRCA2 nos adenocarcinomas. A: negativo. B: marcação principalmente nuclear. C: marcação citoplasmática. D: marcação nuclear e citoplasmática. Setas: marcação nuclear. Pontas de seta: marcação citoplasmática. (Aumento de 400X.).....	64
Figura 15. Imuno-histoquímica para ATR nos adenocarcinomas. A: negativo. B: marcação nuclear. C: marcação citoplasmática. D: marcação nuclear e citoplasmática. Setas: marcação nuclear. Pontas de seta: marcação citoplasmática. (Aumento de 400X.).....	64
Figura 16. Imuno-histoquímica para RAD51 nos adenocarcinomas. A: negativo. B: marcação principalmente nuclear. C: marcação citoplasmática. D: marcação nuclear e citoplasmática. Setas: marcação nuclear. Pontas de seta: marcação citoplasmática. (Aumento de 400X.).....	65
Figura 17. Imuno-histoquímica para $\gamma$ H2AX nos adenocarcinomas. A: negativo. B: marcação fraca. C: marcação moderada. D: marcação forte. Setas indicam a marcação, nuclear. (Aumento de 400X.).....	65
Figura 18. Imuno-histoquímica na mucosa não neoplásica. As setas indicam marcação nuclear fraca a moderada em células epiteliais. (Aumento de 400X.).....	68
Figura 19. Imuno-histoquímica de um mesmo caso para os vários marcadores. (Aumento de 400X.) Este caso teve alta expressão de p53 e ATM; e baixa expressão de CHK2, BRCA1 nuclear e citoplasmático, BRCA2 citoplasmático, ATR nuclear, RAD51 nuclear e $\gamma$ H2AX; foi negativo para BRCA2 nuclear, ATR citoplasmático e RAD51 citoplasmático. Setas: marcação nuclear. Pontas de seta: marcação citoplasmática. ....	73
Figura 20. Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global e da sobrevida livre de doença, comparando os pacientes com tumores positivos e negativos para RAD51 nuclear, com valores de p calculados pelo teste <i>log-rank</i> . ....	81
Figura 21. Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global, nos grupos sem e com tratamento adjuvante ou neoadjuvante, comparando os pacientes com tumores positivos e negativos para RAD51 nuclear (RAD51n), com valores de p calculados pelo teste <i>log-rank</i> . ....	82
Figura 22. Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida livre de doença, nos grupos sem e com tratamento adjuvante ou neoadjuvante, comparando os pacientes com tumores positivos e negativos para RAD51 nuclear (RAD51n), com valores de p calculados pelo teste <i>log-rank</i> . ....	83

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Mecanismos de reparo do DNA. ....	19
Quadro 2. Fatores que inibem a recombinação homóloga em G1/G0. Apesar de as etapas finais da via estarem supressas, ainda há atividade dos mecanismos iniciais, conduzindo a resposta ao dano do DNA, com ativação de p53 e CHK1 e parada do ciclo celular.....	30
Quadro 3. Estadiamento dos carcinomas gástricos, de acordo com a 8ª edição da classificação TNM da UICC (GOSPODAROWICZ et al., 2017).....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos usados para imuno-histoquímica.....	46
Tabela 2. Sexo e idade na população total e por tipo histológico. ....	50
Tabela 3. Localização e tamanho tumoral na população total e por tipo histológico.....	52
Tabela 4. Características clinicopatológicas na população total e por tipo histológico. ....	53
Tabela 5. Associação a <i>H. pylori</i> , gastrite e metaplasia intestinal na população total e por tipo histológico. ....	54
Tabela 6. Sobrevida global na população total e por tipo histológico.....	55
Tabela 7. Influência das características clinicopatológicas na sobrevida global.....	57
Tabela 8. Influência das características clinicopatológicas na sobrevida livre de doença. ....	57
Tabela 9. Achados imuno-histoquímicos nas amostras tumorais.....	59
Tabela 10. Achados imuno-histoquímicos na mucosa não neoplásica.....	66
Tabela 11. Coeficientes de correlação entre os vários marcadores nas amostras tumorais.....	71
Tabela 12. Correlação entre achados imuno-histoquímicos nas amostras neoplásicas e tamanho tumoral. ....	74
Tabela 13. P53 no tumor e tipo histológico.....	75
Tabela 14. Correlação entre os marcadores citoplasmáticos e tipo e grau histológicos.....	76
Tabela 15. BRCA2 nuclear no tumor e correlação com tipo e grau histológicos. ....	77
Tabela 16. BRCA2 nuclear no tumor e invasão vascular.....	77
Tabela 17. ATR nuclear no tumor e correlação com parâmetros patológicos. ....	78
Tabela 18. RAD51 nuclear no tumor e correlação com parâmetros patológicos. ....	79
Tabela 19. $\gamma$ H2AX no tumor e correlação com parâmetros patológicos.....	79
Tabela 20. RAD51 nuclear (RAD51n) no tumor e sobrevida global. ....	82
Tabela 21. RAD51 nuclear no tumor e sobrevida livre de doença.....	83
Tabela 22. Análise da associação entre tipo de tratamento e sobrevida global e livre de doença, separadamente nos grupos de pacientes com tumor negativo e positivo para RAD51 nuclear. ....	85
Tabela 23. ATM no tumor e sobrevida global e livre de doença. ....	86

Tabela 24. Análise da sobrevida global considerando-se conjuntamente RAD51 nuclear (RAD51n) e $\gamma$ H2AX nos tumores. ....	87
Tabela 25. BRCA2 nuclear no tumor e sobrevida global.....	87
Tabela 26. Análise multivariada da sobrevida global. São mostrados valores de <i>hazard ratio</i> de morte com intervalos de confiança de 95% e valores de p. ....	88
Tabela 27. Análise multivariada da sobrevida livre de doença. São mostrados valores de <i>hazard ratio</i> de morte ou recidiva com intervalos de confiança de 95% e valores de p. ....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APAF1 - apoptotic protease activating factor 1
- APC - adenomatous polyposis coli
- ARID1A - AT-rich interactive domain-containing protein 1A
- ATM - ataxia-telangiectasia mutated
- ATR - ATM and RAD3-related
- BER - base excision repair
- BLAP75 - BLM-associated polypeptide
- BLM - Bloom syndrome protein
- BRCA1 - breast cancer susceptibility protein 1
- BRCA2 - breast cancer susceptibility protein 2
- CA19-9 - antígeno carboidrato 19-9
- CDC25 - cell division cycle 25
- CDH1 - caderina 1 (E-caderina, caderina epitelial)
- CDK - quinase dependente de ciclina
- CHK1 - checkpoint kinase 1
- CHK2 - checkpoint kinase 2
- CtIP - CtBP-interacting protein
- DAB - diaminobenzidina
- DDR - DNA damage response
- dHJ - junção de Holliday dupla
- D-loop - displacement loop
- DNA - ácido desoxirribonucleico
- DNA-PKcs - DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
- D.P. - desvio-padrão
- DSBR - double-strand break repair
- EBP $\beta$  - CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$
- EBV - vírus Epstein-Barr
- ECX - epirrubicina, cisplatina, capecitabina
- EOX - epirrubicina, oxaliplatina, capecitabina
- G0 - fase de repouso do ciclo celular
- G1 - fase de gap 1 do ciclo celular
- G2 - fase de gap 2 do ciclo celular
- GEN1 - endonuclease de aba 5' da junção de Holliday
- HCFMRP-USP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo

HER2 - human epidermal growth factor receptor 2  
*H. pylori* - *Helicobacter pylori*  
HR - homologous recombination  
HR - hazard ratio  
H-score - pontuação histoquímica  
H2AX - histona 2AX  
 $\gamma$ H2AX - histona 2AX fosforilada  
I.C.95% - intervalo de confiança de 95%  
INCA - Instituto Nacional de Câncer  
M - fase de mitose do ciclo celular  
MDC1 - mediator of DNA damage checkpoint protein 1  
MDM2 - murine double minute 2  
MDMX - murine double minute X  
MLH1 - mutL homolog 1  
MMR - mismatch repair  
MRE11 - meiotic recombination 11  
MRN - complexo MRE11-RAD50-NBS1  
MUS81-EME1 - complexo de endonucleases de junção de crossover  
n - número  
NBN - nibrina  
NBS1 - Nijmegen breakage syndrome 1  
NER - nucleotide excision repair  
NHEJ - non-homologous end joining  
p - nível descritivo do teste  
PALB2 - partner and localizer of BRCA2  
PARP - poli(ADP-ribose) polimerase  
PCNA - proliferating cell nuclear antigen  
PD-L1 - programmed death-ligand 1  
(p)TNM - estadiamento (patológico) de tumor, linfonodos, metástases  
p21 - proteína tumoral 21  
p53 - proteína tumoral 53  
r - coeficiente de correlação de postos de Spearman  
RAD3 - recombinase 3  
RAD50 - recombinase 50  
RAD51 - recombinase 51  
RAD51n - RAD51 nuclear  
RAD51B - recombinase 51B

RAD51C - recombinase 51C  
RAD51D - recombinase 51D  
RHOA - ras homolog family member A  
RPA - replication protein A  
S - fase de síntese do ciclo celular  
SDSA - synthesis-dependent strand annealing  
SERPAT - Serviço de Patologia do HCFMRP-USP  
SLX1 - endonuclease estrutura-específica SLX1  
ssDNA - fita simples de DNA  
TCGA - The Cancer Genome Atlas  
TMA - tissue microarray  
TOPOIII $\alpha$  - topoisomerase III $\alpha$   
*TP53* - gene da proteína tumoral 53  
TRF1 - telomeric repeat binding factor 1  
TRF2 - telomeric repeat binding factor 1  
UICC - Union for International Cancer Control  
XPF-ERCC1 - xeroderma pigmentosum group F-complementing protein associada a excision  
repair cross-complementation group 1  
XRCC2 - x-ray repair cross-complementing protein 2  
XRCC3 - x-ray repair cross-complementing protein 3  
53BP1 - proteína de ligação à p53 1



## Sumário

1. Introdução.....	19
2. Revisão da literatura.....	22
2.1 Epidemiologia do câncer gástrico.....	22
2.2 Classificação histológica dos adenocarcinomas gástricos.....	24
2.3 Classificação molecular do adenocarcinoma gástrico.....	25
2.4 Reparo do DNA por recombinação homóloga.....	26
2.5 Aspectos gerais da relação entre recombinação homóloga e câncer.....	32
2.6 Proteínas e genes relacionados à recombinação homóloga no câncer gástrico.....	33
2.6.1 Complexo MRN.....	33
2.6.2 ATM.....	34
2.6.3 CHK2.....	35
2.6.4 BRCA1 e BRCA2.....	35
2.6.5 $\gamma$ H2AX.....	36
2.6.6 P53.....	37
2.6.7 RAD51.....	38
3. Objetivos.....	40
4. Materiais e métodos.....	42
4.1 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	42
4.2 Delineamento do estudo.....	42
4.3 Casuística.....	42
4.3.1 População do estudo.....	42
4.3.2 Critérios de inclusão.....	42
4.3.3 Critérios de exclusão.....	43
4.4 Revisão histológica.....	43
4.5 Análise dos prontuários.....	44

4.6	Confecção dos TMAs .....	45
4.7	Imuno-histoquímica .....	45
4.8	CrITÉrios de avaliaÇão imuno-histoquímica .....	45
4.9	Análise estatística .....	47
5.	Resultados.....	49
5.1	Características gerais da popula�o .....	49
5.2	Influência das características clinicopatológicas na sobrevida.....	56
5.3	Achados imuno-histoquímicos nos adenocarcinomas .....	58
5.4	Achados imuno-histoquímicos na mucosa não neoplásica.....	66
5.5	Influência do tratamento neoadjuvante nos achados imuno-histoquímicos nos adenocarcinomas.....	69
5.6	Correla�o dos resultados imuno-histoquímicos nos tumores dos vários marcadores entre si.....	69
5.7	Correla�o da imuno-histoquímica nos adenocarcinomas com o tamanho tumoral .....	74
5.8	Associa�o entre os marcadores imuno-histoquímicos nos tumores e várias características clinicopatológicas .....	74
5.9	Correla�o entre imuno-histoquímica e sobrevida, análise univariada .....	80
5.10	Análise multivariada da sobrevida.....	88
6.	Discussão.....	91
7.	Conclusões.....	102
	Referências .....	105

## **INTRODUÇÃO**

---

## 1. Introdução

O adenocarcinoma gástrico representa um grupo de tumores biológica e geneticamente heterogêneos, de etiologia multifatorial, que envolve interação entre condições ambientais e alterações genéticas/epigenéticas – ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais (CARNEIRO et al., 2019). Defeitos do reparo do DNA, por permitirem o acúmulo de mutações e aberrações cromossômicas, favorecem o desenvolvimento tumoral (KREJCI et al., 2012).

Lesões do DNA acontecem espontaneamente, porém sua frequência é muito maior em situações como a inflamação, em que há aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, e a exposição à radiação ionizante ou a diversas substâncias exógenas tóxicas, incluindo vários quimioterápicos (KREJCI et al., 2012).

O DNA danificado é reparado por cinco vias principais (QUADRO 1): (1) reparo por excisão de bases (*base excision repair* – BER); (2) reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair* – NER); (3) reparo de pareamento incorreto (*mismatch repair* – MMR); (4) junção não homóloga de extremidades (*non-homologous end joining* – NHEJ); e (5) reparo por recombinação homóloga (*homologous recombination* – HR). A função das duas últimas é o reparo das quebras duplas (bifilamentares) do DNA (COSTA et al., 2010; DEXHEIMER, 2013).

**Quadro 1.** Mecanismos de reparo do DNA.

Tipo de lesão	Mecanismo de reparo
- oxidação da guanina - presença de uracila - sítio abásico - quebra unifilamentar	Reparo por excisão de bases - BER
- pareamento incorreto - inserção - deleção	Reparo de pareamento incorreto - MMR
- adutos - ligações intrafilamentares	Reparo por excisão de nucleotídeos - NER
- quebra bifilamentar	Junção não homóloga de extremidades - NHEJ Recombinação homóloga - HR

Fonte: Dexheimer (2013).

Dentre as várias proteínas que participam do mecanismo da recombinação homóloga, destacam-se: o complexo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), que é o sensor das quebras duplas; a quinase ATM (mutada na ataxia telangiectasia), elemento central do início da cascata de sinalização, que fosforila e ativa múltiplas proteínas; elementos intermediários da via como CHK2 (*checkpoint kinase 2*), BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*), BRCA2, ATR (proteína relacionada a ATM e RAD3) e a histona H2AX; RAD51, que é a grande efetora, responsável pela procura da sequência homóloga de DNA que servirá de molde para o reparo (FORAY et al., 2003; FORGET e KOWALCZYKOWSKI, 2010).

Em decorrência da ativação da via da recombinação homóloga, ocorre também, por vários mecanismos, a ativação da proteína p53, que conduz à parada do ciclo celular ou apoptose (CHENG e CHEN, 2010), e cuja mutação é muito frequente no adenocarcinoma gástrico (YILDIRIM et al., 2015). Nesta doença, foi ainda demonstrada associação entre mau prognóstico e baixa expressão de ATM (ZHANG et al., 2013; ABDEL-FATAH et al., 2013; LEE et al., 2014), de BRCA1 (KIM et al., 2013; CHEN et al., 2013; ZHANG et al., 2013), de BRCA2 (WANG et al., 2018) e de CHK2 (LEE et al., 2014). A presença de  $\gamma$ H2AX, a forma fosforilada da histona H2AX, também mostrou correlação com pior prognóstico (HUSSEIN et al., 2018).

Neste trabalho, fazemos avaliação imuno-histoquímica da expressão de RAD51, ATR, p53, CHK2, ATM, BRCA1, BRCA2 e  $\gamma$ H2AX em amostras de adenocarcinoma gástrico e de mucosa gástrica não tumoral, correlacionando-a com características clinicopatológicas.

**REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 2. Revisão da literatura

### 2.1 Epidemiologia do câncer gástrico

No Brasil, estima-se que tenha havido 21.230 casos novos de câncer de estômago em 2020, sendo 13.360 em homens e 7.870 em mulheres. A doença foi a causa da morte de 9.206 homens e de 5.107 mulheres no país em 2017. No sexo masculino, é o quarto tipo de câncer em incidência, correspondente a 5,9% dos casos, precedido por câncer de próstata, pulmonar e colorretal, e o quarto em mortalidade, após câncer pulmonar, prostático e colorretal; no sexo feminino, é o sexto em incidência, correspondente a 3,5% dos casos, precedido por câncer de mama, colorretal, do colo uterino, pulmonar e da tireoide, e o sexto em mortalidade, após câncer de mama, pulmonar, colorretal, do colo uterino e do pâncreas (INCA, 2020).

No mundo, o câncer gástrico é o quinto em incidência e o terceiro em mortalidade. A incidência é alta na Ásia Oriental (Japão, Coreia, China), na Rússia, na Europa Oriental e na América Central, e baixa nos Estados Unidos, na Europa Ocidental e no Norte da África. A incidência anual estimada de 2018, ajustada por idade, por 100 mil indivíduos do sexo masculino, é de 57,8 na Coreia do Sul, de 40,7 no Japão, de 10,6 no Brasil e de 5,6 nos Estados Unidos (RAWLA e BARSOUK, 2019).

O adenocarcinoma corresponde a 95% dos tumores malignos do estômago; os linfomas, a 3%. Sarcomas, incluindo tumores estromais gastrointestinais (GISTs), são raros (INCA, 2019). Os adenocarcinomas gástricos são histologicamente classificados em dois tipos principais: difuso e intestinal (LAURÉN, 1965).

A incidência do adenocarcinoma gástrico é maior, em torno de 1,5-2,5 vezes, no sexo masculino (RODER, 2002). O predomínio masculino é mais acentuado no tipo histológico intestinal que no difuso (LAURÉN, 1965; RODER, 2002).

A doença é rara antes dos 30 anos, e sua incidência aumenta com a idade. Os casos em pacientes jovens tendem a ser difusos, ocorrer no sexo feminino e ser familiares (LAUWERS et al., 2010).

O principal fator de risco para o adenocarcinoma gástrico é a infecção por *Helicobacter pylori*, que provoca gastrite crônica (RAWLA e BARSOUK, 2019). A progressão da gastrite por *Helicobacter pylori* ao adenocarcinoma do tipo intestinal segue a sequência bem definida de atrofia mucosa, metaplasia intestinal e displasia epitelial de baixo e

de alto grau (CORREA e PIAZUELO, 2011). O adenocarcinoma do tipo difuso, que não tem lesão precursora conhecida, também é relacionado a *Helicobacter pylori*, porém a importância da associação é controversa: o aumento de risco causado pela infecção é semelhante para ambos os tipos histológicos segundo alguns pesquisadores (HUANG et al., 1998; PARSONNET et al., 1991a), mas outros trabalhos sugerem ser maior para o tipo intestinal (PARSONNET et al., 1991b).

Outros fatores de risco são: tabagismo; consumo de álcool; excesso de ingestão de sal, de carnes, principalmente conservadas em sal, defumadas ou processadas, e de alimentos em conserva; baixa ingestão de frutas e vegetais frescos; exposição a radiação; história de cirurgia gástrica, especialmente com reconstrução à Billroth II, que favorece o refluxo biliar; infecção pelo vírus Epstein-Barr (presente em cerca de 5 a 10% dos casos); gastrite autoimune; grupo sanguíneo A (RAWLA e BARSOUK, 2019).

A incidência absoluta do câncer gástrico tem crescido, por causa do envelhecimento da população, porém a ajustada pela idade está em queda (LAUWERS et al., 2010; CARNEIRO et al., 2019). Isso provavelmente se deve a mudanças alimentares, à melhora das condições de higiene, ao aumento do uso de antibióticos e ao tratamento da infecção por *Helicobacter pylori*. A queda de incidência tem sido bem mais acentuada para o tipo intestinal (RODER, 2002; CARNEIRO et al., 2019), que é o predominante nas regiões de alta prevalência, enquanto o difuso predomina onde o câncer gástrico é menos comum (FENOGLIO-PREISER et al., 2003; LAUWERS et al., 2010). Esses dados sugerem que o adenocarcinoma difuso seja menos dependente dos fatores de risco ambientais conhecidos que o intestinal.

Alterações genéticas hereditárias bem definidas são responsáveis por apenas 1-3% dos adenocarcinomas gástricos. São exemplos, todos de herança autossômica dominante, a síndrome do câncer gástrico difuso hereditário, causada por perda de uma das cópias do gene *CDH1*; a síndrome do adenocarcinoma gástrico e polipose proximal do estômago, causada por perda de 5q22; a síndrome de Lynch, causada por mutação de genes que codificam proteínas do reparo do pareamento incorreto do DNA; e a polipose adenomatosa familiar, causada por mutação do gene *APC* (RAWLA e BARSOUK, 2019).

Nos Estados Unidos, a sobrevida média em 5 anos dos pacientes com câncer gástrico é de 31% (RAWLA e BARSOUK, 2019). O principal determinante prognóstico é o estágio. Tumores precoces, i.e., restritos à mucosa ou submucosa, estão associados a cerca de 90% de sobrevida em 10 anos. A sobrevida em 5 anos é de 60-80% para os pacientes cujos tumores invadem a camada muscular própria, e de 50% quando há invasão da subserosa, sem



metástase linfonodal (LAUWERS et al., 2010). Os pacientes com metástase distante têm 5% de sobrevida em 5 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Adicionalmente, correlacionam-se com pior prognóstico: invasão vascular sanguínea ou linfática, metástase em linfonodos regionais (LAUWERS et al., 2010; CARNEIRO et al., 2019), infiltração perineural, borda tumoral infiltrativa (em vez de crescimento expansivo), maior tamanho tumoral, acometimento das margens cirúrgicas, localização no cárdia ou fundo, e padrão histológico difuso (ROSAI, 2011).

## 2.2 Classificação histológica dos adenocarcinomas gástricos

A classificação histológica dos adenocarcinomas gástricos de mais amplo uso e aceitação foi a proposta pelo patologista finlandês Pekka Laurén em 1965, que descreveu dois padrões histológicos principais: intestinal e difuso.

O tipo intestinal, de aspecto similar ao da grande maioria dos adenocarcinomas colorretais, caracteriza-se pela coesão celular e pela tendência à formação de estruturas glandulares bem definidas, de arquitetura tubular ou papilar (vilosa), geralmente com lumens amplos. O tipo difuso caracteriza-se por células incoesas, isoladas ou em pequenos grupamentos; as formações glandulares são ausentes ou muito mal definidas, irregulares e com lumens estreitos (LAURÉN, 1965). É comum no tipo difuso a presença das células em anel de sinete, caracterizadas por um volumoso vacúolo central de mucina, que rechaça o núcleo para a periferia (CARNEIRO et al., 2019).

Pode haver áreas de padrão sólido tanto nos tumores de tipo intestinal menos diferenciados quanto em regiões hipercelulares dos difusos; ainda assim, costuma manter-se perceptível a diferença no grau de coesão celular entre os tipos histológicos (LAURÉN, 1965).

Os adenocarcinomas que não se enquadram nos padrões intestinal e difuso de Laurén são habitualmente separados em dois grupos adicionais: os indeterminados e os mistos (CARNEIRO et al., 2019).

Os indeterminados são inclassificáveis por serem muito pouco diferenciados. A designação de misto é dada a tumores que tenham áreas difusas e intestinais em quantidades semelhantes (LAUWERS et al., 2010). Daí se conclui que casos em que as características de um tipo sejam apenas focais devem ser classificados pelo padrão preponderante.

Grande acúmulo de mucina extracelular pode acontecer tanto nos tumores de tipo intestinal quanto nos difusos, dando origem aos chamados adenocarcinomas mucinosos ou coloides (LAURÉN, 1965).

Os tumores de padrão intestinal são graduados em bem, moderadamente ou pouco diferenciados, de acordo com o quanto as formações glandulares são bem definidas (FENOGLIO-PREISER et al., 2000). A correlação dessa graduação com o prognóstico é, no entanto, pobre (ROSAI, 2011).

Dada a pouca ou ausente formação glandular das áreas difusas, os adenocarcinomas difusos e mistos podem ser considerados todos pouco diferenciados (FENOGLIO-PREISER et al., 2000).

### 2.3 Classificação molecular do adenocarcinoma gástrico

Em 2014, o TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) propôs a divisão do adenocarcinoma gástrico em quatro tipos moleculares (GARATTINI et al., 2017), a saber:

- Com instabilidade cromossômica: cerca de 50% dos casos, aberrações cromossômicas, mutação do *TP53*, amplificação de genes de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas, amplificação do *HER2* em alguns casos, tendência a localização cárdica e tipo histológico intestinal;
- Com estabilidade genômica: cerca de 20% dos casos, mutação de *CDH1*, *ARID1A* e *RHOA*, tipo histológico predominantemente difuso;
- Com instabilidade microsatélite: cerca de 15-30% dos casos, frequente metilação do promotor do *MLH1*, tendência a tipo intestinal, localização distal, sexo feminino e idade avançada;
- Relacionado ao EBV: cerca de 10% dos casos, amplificação do gene *PD-L1*, pacientes mais jovens.

Além do estabelecimento de grupos com características clínicas particulares, há esperança de que a classificação molecular vá adquirir grande importância na definição de tratamentos específicos. Já é o caso dos adenocarcinomas com amplificação do *HER2*, que podem ser tratados com o anticorpo monoclonal anti-HER2 trastuzumabe (GARATTINI et al., 2017).

## 2.4 Reparo do DNA por recombinação homóloga

As quebras bifilamentares do DNA podem ser reparadas pela junção não homóloga de extremidades (NHEJ) ou pela recombinação homóloga (HR). A NHEJ é um processo de junção direta das extremidades produzidas pela quebra; é propensa a erros, porque não refaz segmento intermediário do DNA eventualmente perdido na quebra. Já o reparo por recombinação é mais preciso, pois usa como molde uma sequência homóloga de DNA (DEXHEIMER, 2013). O molde pode ser a cromátide-irmã, o cromossomo homólogo ou mesmo um cromossomo heterólogo com uma sequência de bases igual. A cromátide-irmã é o modelo mais fiel e é usada preferencialmente, com uma frequência 10.000 maior que a do cromossomo homólogo (MOYNAHAN e JASIN, 1997). Isso é facilitado pelo fato de as cromátides-irmãs se manterem unidas por proteínas de coesão (MIYAZAKI e ORR-WEAVER, 1994). Como elas não existem em G1 ou G0, o reparo por recombinação homóloga é praticamente restrito às fases S, G2 e M, diferentemente da NHEJ, que acontece em qualquer período do ciclo celular (MAO et al., 2009).

No primeiro passo da via do reparo por recombinação homóloga (FIGURA 1), o complexo MRN, formado pelas proteínas MRE11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 e NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*, também chamada de nibrina — NBN), liga-se às pontas da quebra do DNA e recruta e ativa a quinase ATM (mutada na ataxia-telangiectasia) (LEE e PAULL, 2005).

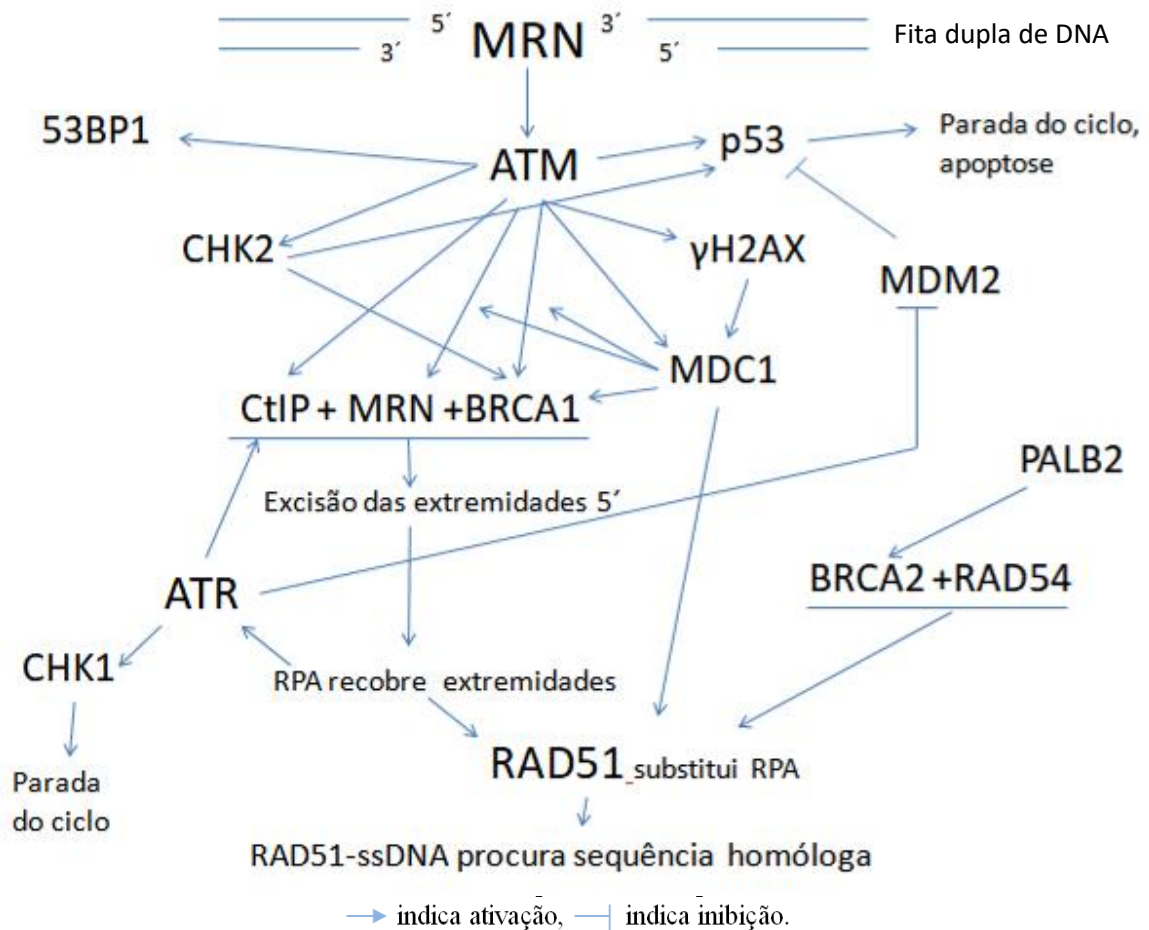
A ATM tem uma função central no início do mecanismo da recombinação homóloga, fosforilando e ativando múltiplas proteínas: a histona H2AX, cuja forma fosforilada passa a ser chamada de  $\gamma$ H2AX (STIFF et al., 2004); MDC1 (mediadora do ponto de checagem do dano do DNA 1) (XU e STERN, 2003); BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*) (LOU et al., 2003); 53BP1 (proteína de ligação à p53 1) (ANDERSON et al., 2000; RAPPOLD et al., 2001); CHK2 (*checkpoint kinase 2*) (WARD et al., 2001); p53 (CHENG e CHEN, 2010); CtIP (*CtBP-interacting protein*) (WANG et al., 2013); além do próprio componente NBS1 do complexo MRN (LIM et al., 2000).

A fosforilação da H2AX é importante por ocasionar um remodelamento da cromatina que mantém as extremidades da quebra próximas (PODHORECKA et al., 2010).

Esses processos de fosforilação e acúmulo de proteínas no foco de lesão são complexos e inter-relacionados. O acúmulo da MDC1 depende da sua ligação à  $\gamma$ H2AX (STUCKI et al., 2005). O acúmulo de BRCA1, por sua vez, é favorecido por MDC1 (LOU et

al., 2003). A ligação de MDC1 a NBS1 é importante para que esta seja fosforilada por ATM (SPYCHER et al., 2008). A presença de BRCA1 é necessária para que ATM fosforile p53, CHK2, NBS1 e CtIP (FORAY et al., 2003). Além disso, BRCA1 é também fosforilada por CHK2 (ZHANG et al., 2004).

**Figura 1.** Resposta ao dano do DNA e início da recombinação homóloga. Múltiplas proteínas de reparo acumulam-se no foco de quebra do DNA. Inicialmente, a quebra dupla é detectada pelo complexo MRN, que ativa a quinase ATM, a qual fosforila múltiplas proteínas, ativando-as e levando à excisão das extremidades 5' da quebra pelo complexo formado por CtIP, MRN e BRCA1. RAD51, com a participação de BRCA2, associa-se às extremidades de fitas simples expostas e busca a sequência homóloga que será molde para o reparo. Paralelamente ao processo de reparo, ativação de p53 e/ou de CHK1 para o ciclo celular.



Fonte: própria do autor.

Decorre desses eventos a formação de um complexo constituído de MRN, CtIP e BRCA1, responsável por excisar as extremidades 5' da quebra do DNA, gerando segmentos de fitas simples com terminações 3' expostas, que são recobertos pela RPA (proteína de replicação A) (CHEN et al., 2008).

A presença de DNA de fita simples (ssDNA) recoberto por RPA ativa a quinase ATR (proteína relacionada a ATM e RAD3) (JAZAYERI et al., 2006), que fosforila adicionalmente CtIP (*CTBP-interacting protein*), promovendo o seu acúmulo na cromatina e a extensão da secção do DNA (PETERSON et al., 2013).

A RPA que cobre a fita simples é, então, substituída pela proteína RAD51, com a participação dos mediadores BRCA2, RAD54, parálogos de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 e XRCC3 [*x-ray repair cross-complementing proteins 2 e 3*]) (FORGET e KOWALCZYKOWSKI, 2010) e MDC1 (ZHANG et al., 2005). A proteína PALB2 (*partner and localizer of BRCA2*) é necessária à estabilidade e localização correta de BRCA2 na cromatina e na matriz nuclear (XIA et al., 2006).

O filamento nucleoproteico RAD51-ssDNA procura pela sequência homóloga na cromátide-irmã e invade-a, formando uma alça deslocada (*displacement-loop* ou *D-loop*) (MCILWRAITH et al., 2000). Após a invasão, RAD54 promove a dissociação entre RAD51 e DNA (KIIANITSA et al., 2006). Inicia-se, então, a síntese de DNA alongando a fita invasora e tendo a fita invadida como molde; essa síntese pode ser catalisada pela DNA-polimerase  $\eta$  (MCILWRAITH et al., 2005), ou pela DNA-polimerase  $\delta$  com a participação de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (LI et al., 2009).

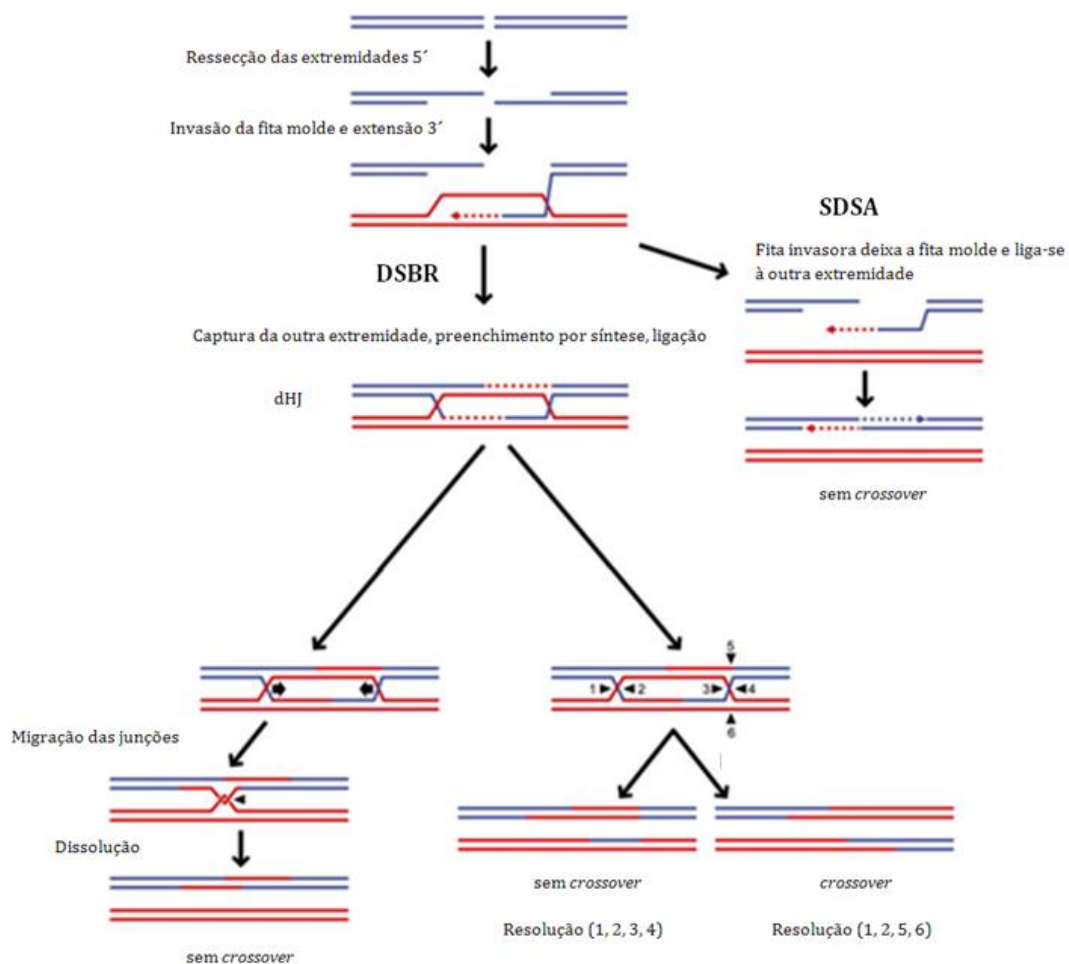
A D-loop pode resolver-se de duas maneiras (FIGURA 2): anelamento de fitas dependente de síntese (SDSA — *synthesis-dependent strand annealing*) e junção de Holliday dupla (via também chamada de DSBR — *double-strand break repair*) (SAN FILIPPO et al., 2008).

No SDSA, a fita invasora é aumentada e depois se desprende e pode unir-se à outra ponta da quebra. Dependendo do alongamento, pode haver aba, que é removida pela endonuclease XPF-ERCC1 (*xeroderma pigmentosum group F-complementing protein* associada a *excision repair cross-complementation group 1*) (AL-MINAWI et al., 2008), ou lacuna, que é completada pela DNA-polimerase  $\delta$  ou  $\epsilon$ , com ligação das extremidades pela DNA-ligase 1 (COSTA et al., 2010). Não há *crossover*.

No DSBR, a outra ponta da quebra também invade a cromátide-irmã e é alongada. A DNA-ligase 1 une as pontas, e forma-se uma junção de Holliday dupla (dHJ). Pode ocorrer a dissolução da dHJ pela helicase BLM (*Bloom syndrome protein*), que move as duas junções

uma em direção à outra, atuando em conjunto com a topoisomerase TOPOIII $\alpha$ , que separa os bifilamentos (SEKI et al., 2006), e com o cofator BLAP75 (*BLM-associated polypeptide*) (RAYNARD et al., 2008), sem *crossover*. A outra possibilidade é a resolução da dHJ por resolvase (GEN1, SLX1 ou MUS81-EME1) (IP et al., 2008). Se ambos os cortes se derem na mesma direção, não haverá *crossover*, apenas troca de um curto segmento entre as cromátides-irmãs. Se em direções opostas, ocorrerá *crossover*.

**Figura 2.** Recombinação homóloga. A alça deslocada pode ser processada por dois mecanismos, chamados de SDSA e DSBR. No SDSA apenas uma das extremidades da quebra invade a fita dupla de DNA que servirá de molde, é alongada e desprende-se. No DSBR, a dupla invasão e alongamento ocasionam a formação de uma junção de Holliday dupla, que pode ser dissolvida pela movimentação das junções, ou resolvida por secções.



Fonte: adaptada de Symington et al. (2014).

Complexos mecanismos concorrem para a inibição da recombinação homóloga em G1 ou G0 (QUADRO 2), muitos dos quais sob a influência de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs). Embora estejam supressos eventos mais tardios como a ressecção das extremidades 5' e a associação entre RAD51 e o DNA, etapas iniciais da via ainda ocorrem e podem conduzir à ativação de mecanismos de parada ciclo celular ou apoptose, mesmo em tais fases do ciclo. Demonstraram-se em G1, por exemplo, ativação de ATM e formação de  $\gamma$ H2AX (TANAKA et al., 2007), ativação de ATM e ATR (RAY et al., 2016), ativação da p53 por ATM (MORGAN e KASTAN, 1997) e por CHK2 (ZANNINI et al., 2014).

**Quadro 2.** Fatores que inibem a recombinação homóloga em G1/G0. Apesar de as etapas finais da via estarem supressas, ainda há atividade dos mecanismos iniciais, conduzindo a resposta ao dano do DNA, com ativação de p53 e CHK1 e parada do ciclo celular.

<p>Inibição da ressecção das extremidades 5':</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Degradação de CtIP (BRANDSMA e VAN GENT, 2012)</li> <li>- Ausência de fosforilação de CtIP (HUERTAS e JACKSON, 2009) e de NBS1 (BRANDSMA e VAN GENT, 2012) por CDKs</li> <li>- Atividade da 53BP1 (DALEY e SUNG, 2014)</li> <li>- RAP80 inibe a interação entre CtIP e BRCA1 (BRANDSMA e VAN GENT, 2012)</li> <li>- Baixos níveis de BRCA1 (MACLACHLAN e EL-DEIRY, 2013)</li> </ul>
<p>Fosforilação de BRCA2 por CDKs, que inibe sua interação com RAD51 (ESASHI et al., 2005)</p>
<p>Baixos níveis de RAD51 (FLYGARE et al., 1996)</p>

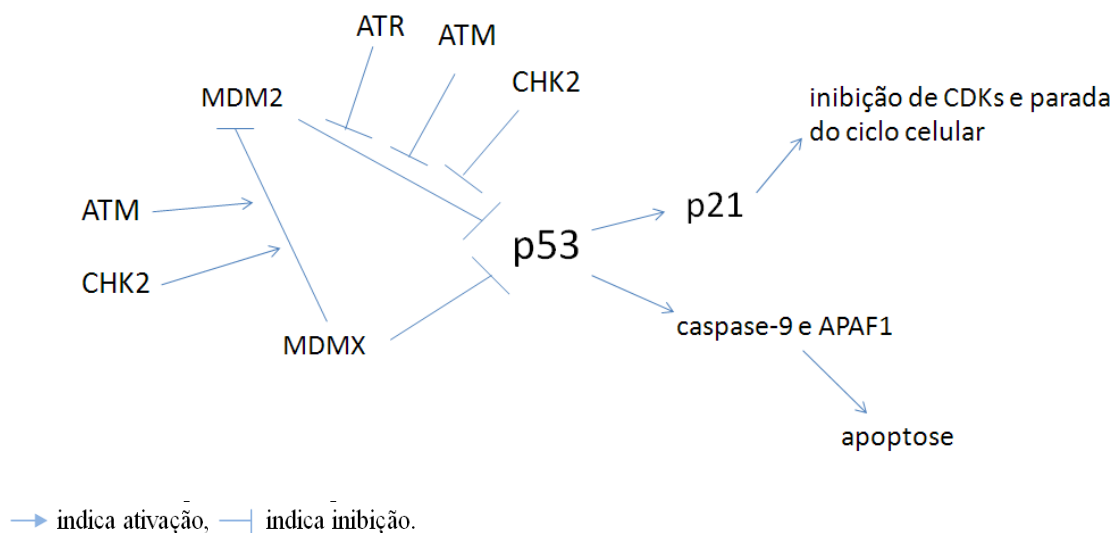
É interessante notar que a ativação da ATR, embora dependente da presença de DNA de fita simples, ocorre em resposta a quebra bifilamentar na fase G1, mesmo estando inibida a excisão de extremidades (GAMPER et al., 2013), talvez por causa da exposição de fitas simples que exista a princípio em algumas quebras duplas irregulares complexas (XUE et al., 2015), e também porque não chega a haver completa supressão da ressecção das extremidades (BIEHS et al., 2017).

Como já mencionado, além do reparo das quebras duplas, as proteínas do início da via da recombinação homóloga funcionam promovendo uma resposta ao dano do DNA (*DNA damage response* — DDR) que pode parar o ciclo celular ou até levar à apoptose. Essa resposta às quebras bifilamentares dá-se por dois mecanismos: ativação de p53 (proteína tumoral 53) e de CHK1 (*checkpoint kinase 1*).

A quebra da fita dupla do DNA estimula p53 de várias maneiras (CHENG e CHEN, 2010). As proteínas MDM2 (duplo minuto murino 2) e MDMX (duplo minuto murino X) são inibidoras de p53 (FIGURA 3). MDM2 forma um complexo com p53 e liga-a à ubiquitina, promovendo a sua degradação. MDMX forma um complexo inativo com p53, e também estimula a ubiquitinação de p53 por MDM2. ATM e CHK2 fosforilam p53, o que inibe a ligação de p53 a MDM2. ATM e CHK2 também fosforilam MDMX, aumentando a ligação desta a MDM2 e assim promovendo a ubiquitinação da MDM2. Além disso, ATR e ATM fosforilam MDM2 e reduzem a sua capacidade de ubiquitar p53.

P53 ativa a transcrição de p21, proteína inibidora de quinases dependentes de ciclina, que é responsável pela parada do ciclo celular não apenas em G1, que é classicamente descrita, mas também em G2 (AGARWAL et al., 1995; BUNZ et al., 1998). P53 pode ainda levar à apoptose pelo estímulo à caspase-9 e ao cofator APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*) (SOENGAS et al., 1999).

**Figura 3.** Controle da atividade da p53 e seus efeitos. MDM2 e MDMX favorecem a degradação de p53, o que é inibido por ATM, ATR e CHK2. P53 conduz à parada do ciclo celular ou à apoptose.



Fonte: própria do autor.



Na outra via, CHK1 é ativada ao ser fosforilada por ATR. CHK1 ativada, então, fosforila várias formas de CDC25 (*cell division cycle 25*), aumentando sua degradação proteossômica e inibindo a formação de diferentes complexos ciclina-CDK, o que para o ciclo celular, em qualquer fase (ZHANG e HUNTER, 2014).

## 2.5 Aspectos gerais da relação entre recombinação homóloga e câncer

Alterações da expressão de proteínas da recombinação homóloga têm sido descritas em vários cânceres esporádicos. A causa dessas alterações permanece desconhecida, em sua maioria; mutações dos respectivos genes são pouco frequentes e geralmente não as justificam (HEEKE et al., 2018).

Em geral, a baixa expressão de proteínas da recombinação homóloga é característica de tumores mais agressivos, que presumivelmente tiveram a progressão favorecida pelo acúmulo de alterações genéticas; tais neoplasias, porém, tendem a ser mais sensíveis à radioterapia e aos quimioterápicos que lesam o DNA (GRAESER et al., 2010; ABDEL-FATAH et al.; 2014; LI et al., 2017).

Há, por exemplo, indícios de que a perda de expressão de ATM favoreça a progressão do carcinoma colorretal (GRABSCH et al., 2006), mamário (KAIROUZ et al., 1999) e pancreático (KIM et al., 2014; RUSSEL et al., 2015); de que a perda de expressão de BRCA1 favoreça a progressão do câncer de mama (RIBEIRO-SILVA et al., 2005); e de que a perda de expressão de CHK2 favoreça a progressão do adenocarcinoma do cólon (PANSANI, 2015) e do carcinoma papilífero da tireoide (ZHAO et al., 2018).

Ocorrem, contudo, alguns exemplos do contrário, i.e., da associação entre alto nível de proteína da recombinação e maior agressividade tumoral, como o do complexo MRN no adenocarcinoma gástrico (ALTAN et al., 2016), de ATR no câncer de mama (ABDEL-FATAH et al., 2015) e de RAD51 em vários tumores, que serão especificados na discussão dos resultados. Não há explicação definitiva para esses achados, mas é possível elaborar várias hipóteses.

Primeiramente, existe a possibilidade de que isso se dê por ser certa eficiência no reparo do DNA necessária à progressão tumoral, já que o não reparo pode ser letal para a célula. Essa é a razão por que drogas experimentais inibidoras de ATR (MIN et al., 2017), de

RAD51 (HE et al., 2014) e de CHK1 (YIN et al., 2017) induzem apoptose e suprimem a proliferação celular em culturas de células de adenocarcinoma gástrico.

Outras hipóteses são a de que um estado de hiper-recombinação possa causar instabilidade cromossômica, como acontece no mieloma múltiplo (SHAMMAS et al., 2009), e promover o desenvolvimento neoplásico; e a de que a alta expressão das proteínas de reparo seja apenas secundária a alguma outra característica tumoral, como alta proliferação, ou compensatória de alguma deficiência. Ademais, especificamente a sobrevida menor observada em alguns trabalhos pode ser explicada, ao menos em parte, pela resistência a quimioterapia ou radioterapia.

Tumores com deficiência da recombinação homóloga, como o câncer de mama e ovário familiar com mutação de *BRCA1* ou *BRCA2*, têm-se mostrado especialmente sensíveis a drogas inibidoras da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), enzima do reparo de quebras simples do DNA (KUBOTA et al., 2014). Isso se explica pelo fato de as lesões unifilamentares do DNA poderem converter-se em quebras duplas durante a replicação (MCGLYNN e LLOYD, 2002).

## 2.6 Proteínas e genes relacionados à recombinação homóloga no câncer gástrico

### 2.6.1 Complexo MRN

A expressão do complexo MRN é maior no adenocarcinoma gástrico que na mucosa gástrica não neoplásica (MATSUTANI et al., 2001). Casos de adenocarcinoma gástrico com altos níveis de MRE11, de RAD50 ou de NBS1, avaliados por imuno-histoquímica, são mais avançados, têm menor sobrevida, pior resposta à quimioterapia e maior risco de recorrência. Também mostram menos histona fosforilada  $\gamma$ H2AX no tecido tumoral, o que indica a presença de menos quebras duplas do DNA, presumivelmente decorrente de reparo mais eficiente (ALTAN et al., 2016).

De acordo com Heeke et al. (2018), mutações do *MRE11*, do *NBS1* e do *RAD50* são presentes em 0,16%, 1,13% e 0,16% dos cânceres gastroesofágicos, respectivamente. Um terço dos adenocarcinomas gástricos com alta instabilidade microssatélite exibe mutação intrônica hereditária do *MRE11* que reduz a expressão da proteína (OTTINI et al., 2004). Por

outro lado, são conhecidas variantes do gene *NBS1* (*NBN*) associadas a menor risco de câncer gástrico (SUN et al., 2015).

Foi descrita uma relação complexa entre a expressão do complexo MRN e os mecanismos que regulam o comprimento dos telômeros. Adenocarcinomas gástricos com alta expressão de TRF1 (*telomeric repeat binding factor 1*), proteína que inibe a telomerase, limitando o comprimento do telômero, têm maior expressão de MRE11 e RAD50. Em contrapartida, aqueles com alta expressão de TRF2, importante na manutenção da integridade do telômero, têm maior expressão de MRE11 e NBS1 (MATSUTANI et al., 2001).

### 2.6.2 ATM

No adenocarcinoma gástrico, baixa expressão de ATM correlaciona-se com menor sobrevida doença-específica e livre de doença, e com ocorrência de metástase linfonodal e de invasão vascular e perineural, de acordo com Abdel-Fatah et al. (2013); com menor sobrevida doença-específica e estágio avançado (LEE et al., 2014); com maior idade, estágio avançado, menor sobrevida global e livre de doença e presença de instabilidade microssatélite (KIM et al., 2014). Ademais, baixo nível da forma fosforilada da proteína foi correlacionado com pouca diferenciação, metástase linfonodal e baixa sobrevida (KANG et al., 2008), o que se contrapõe aos achados nos tumores de mama (SUN et al., 2012) e colo do útero (ROOSSINK et al., 2012), em que ATM fosforilada foi associada a características desfavoráveis.

Por outro lado, há evidências de que os baixos níveis de ATM promovam maior susceptibilidade do câncer gástrico à quimioterapia. Para os pacientes tratados com quimioterapia adjuvante, a relação entre sobrevida e ATM mostrou-se tênue, na pesquisa de Kim et al. (2014). Além disso, no trabalho de Lee et al. (2014), deixou de haver correlação entre ATM e sobrevida no estágio IV, o que, para os autores, provavelmente se explica pela maior importância da quimioterapia para o tratamento nesse estágio avançado, metastático.

Mutações do gene *ATM* parecem ser infrequentes no câncer gástrico, e sua importância na patogênese é indefinida; Kang et al. (2008) detectaram cinco tipos de mutações do gene *ATM* em 6 de 40 casos de adenocarcinoma gástrico (15%), também presentes nas respectivas mucosas não tumorais adjacentes. De acordo com Heeke et al. (2018), mutações do *ATM* são presentes em 3,23% dos cânceres gastroesofágicos.

### 2.6.3 CHK2

A negatividade imuno-histoquímica de CHK2 no adenocarcinoma gástrico foi associada a perda de expressão de ATM, a alto estágio e a menor sobrevida doença-específica (LEE et al., 2014), e a maior risco de recorrência, sendo este visto tanto na ausência de proteína total quanto apenas da sua forma fosforilada (ARAI et al., 2018).

De acordo com Heeke et al. (2018), mutações do *CHEK2*, o gene que codifica a CHK2, são presentes em apenas 0,97% dos cânceres gastroesofágicos. É descrita associação entre algumas variantes do gene e maior risco de desenvolvimento de câncer gástrico (LV et al., 2017).

### 2.6.4 BRCA1 e BRCA2

Negatividade ou marcação reduzida de BRCA1 nos adenocarcinomas gástricos correlacionam-se com estágio avançado, invasão perineural e menor sobrevida livre de doença (KIM et al., 2013); com menor diferenciação tumoral e menor sobrevida global (CHEN et al., 2013); e com menor sobrevida global, tipo histológico difuso, alto grau e estágio clínico avançado (ZHANG et al., 2013). Em contrapartida, os pacientes com tumores negativos para BRCA1 beneficiam-se mais da quimioterapia adjuvante, principalmente quando ela inclui platina (KIM et al., 2013; CHEN et al., 2013), podendo chegar a ter maior sobrevida global e livre de doença que aqueles com alta expressão (ZHANG et al., 2018).

Os resultados de Wang et al. (2018) contrariam de certo modo os dos demais pesquisadores. Alta expressão nuclear e baixa expressão citoplasmática de BRCA1 mostraram-se associadas a baixa sobrevida global, estágio TNM avançado, “tipo histológico” (difuso?), tumores pouco diferenciados e altos níveis de CA19-9 e de CEA pré-operatórios. Dentre os trabalhos supracitados, este é o único segundo o qual há os dois padrões de marcação de BRCA1 — nuclear e citoplasmático — na neoplasia gástrica, como discutiremos posteriormente.

Wang et al. (2018) e Zhang et al. (2018) também estudaram a expressão de BRCA2 no câncer gástrico.

De acordo com Wang et al. (2018), baixa expressão de BRCA2 correlaciona-se com baixa sobrevida, estágio avançado, tipo histológico, tumores pouco diferenciados e altos níveis de CA19-9 pré-operatórios.

No estudo de Zhang et al. (2018), dentre os pacientes tratados com quimioterapia à base de platina, aqueles com baixos níveis de BRCA2 no tumor tiveram maior sobrevida. Estranhamente, também foi notada correlação entre positividade de BRCA2 e metástase linfonodal.

Mutações do *BRCA1* e do *BRCA2* são incomuns nos cânceres gastroesofágicos, sendo presentes em 0,48% e 2,91% dos casos, respectivamente (HEEKE et al., 2018). Sahasrabudhe et al. (2017) detectaram mutações do *BRCA1* em apenas três de 362 adenocarcinomas gástricos (0,83%) de pacientes ibéricos e latino-americanos.

Aberrações cromossômicas que afetam o *BRCA1*, contudo, parecem não ser incomuns no adenocarcinoma gástrico, tendo sido descritas perda de heterozigosidade (SEMBA et al., 1998) e ampliações (KOKKOLA et al., 1997; VARIS et al., 2003).

Nas síndromes de câncer de mama e ovário familiar, há também aumento do risco de câncer gástrico, que é quatro vezes maior em portadores de mutação do *BRCA1* e pelo menos duas vezes maior em portadores de mutação do *BRCA2* (CAVANAGH e ROGERS, 2015).

Nos tumores difusos, a hipermetilação do promotor do *BRCA1* é mais frequente dentre os pacientes jovens (BERNAL et al., 2008).

### 2.6.5 $\gamma$ H2AX

A forma fosforilada da histona H2AX,  $\gamma$ H2AX, funciona como marcador de quebra dupla do DNA. Os níveis de  $\gamma$ H2AX são maiores no adenocarcinoma gástrico que na gastrite superficial e na gastrite atrófica, não sendo diferentes nestas duas condições (GUO et al., 2015). Aumentam progressivamente da gastrite crônica para a metaplasia intestinal e desta para a displasia, com pequena redução da displasia para o adenocarcinoma (XIE et al., 2014).

Sentani et al. (2008) mostraram que a positividade imuno-histoquímica de  $\gamma$ H2AX é mais frequente nos cânceres gástricos de sobreviventes da bomba atômica que nos de outros pacientes.

Positividade imuno-histoquímica de  $\gamma$ H2AX no adenocarcinoma gástrico correlaciona-se com menor sobrevida global e livre de doença (HUSSEIN et al., 2018). Altos níveis de

marcação também estão associados a infecção por *Helicobacter pylori*, localização não antral, classificação de Borrmann III ou IV, pouca diferenciação, maior profundidade de invasão, maior estágio TNM e presença de metástase linfonodal (XIE et al., 2014).

### 2.6.6 P53

O *TP53*, supressor tumoral, é o gene mais frequentemente mutado nos cânceres humanos. A relação entre p53, codificada pelo gene *TP53*, e câncer gástrico foi extensamente estudada; a mutação e a resultante perda de função da proteína certamente são frequentes e importantes no desenvolvimento da doença (FENOGLIO-PREISER et al., 2003).

Em condições normais, a proteína p53 é degradada rapidamente, o que não ocorre com algumas formas mutantes; por isso, sua positividade imuno-histoquímica é um indicativo de mutação, porém imperfeito: a proteína selvagem pode acumular-se em algumas situações, por exemplo, se há supressão de MDM2; por outro lado, algumas formas mutantes podem não ser detectadas pela imuno-histoquímica (FENOGLIO-PREISER et al., 2003). A concordância entre a avaliação imuno-histoquímica e a ocorrência de mutação é de 73% no câncer gástrico, de acordo com Soong et al. (1996).

Há discordância sobre o momento na evolução da doença em que ocorre mutação de *TP53*: de acordo com Busuttil et al. (2014), há aumento da expressão na progressão da mucosa normal à metaplasia intestinal e desta ao carcinoma, mas a mutação só é detectada no câncer; já segundo Shiao et al. (1994), há mutações em 25% das mucosas normais adjacentes a um carcinoma invasivo, mesmo que a imuno-histoquímica seja negativa. A maior frequência de mutações é vista em metástases (YAMADA et al., 1991).

Mutações do *TP53* são vistas em 66% dos adenocarcinomas de padrão intestinal e em 28,5% dos de padrão difuso, de acordo com Busuttil et al. (2014). Apesar de esses pesquisadores não terem detectado diferença imuno-histoquímica entre os dois tipos histológicos, trabalhos anteriores já haviam demonstrado que a hiperexpressão imuno-histoquímica de p53 é mais frequente no tipo intestinal (GABBERT et al., 1995; LIU et al., 2001). Neste tipo histológico, ela também ocorre mais precocemente (LIU et al., 2001).

A importância prognóstica da imuno-histoquímica para p53 no adenocarcinoma gástrico não é tão bem estabelecida. Vários trabalhos mostraram associação entre sua positividade ou alta expressão com menor sobrevida, maior frequência de metástases

linfonodais ou distantes, maior profundidade de invasão tumoral, maior estágio; várias outras pesquisas, porém, não encontraram correlação com variáveis clinicopatológicas (FENOGLIO-PREISER et al., 2003). De acordo com uma metanálise recente, a positividade imuno-histoquímica de p53 é, sim, associada a menor sobrevida (YILDIRIM et al., 2015).

Como esperado pelo fato de a disfunção da p53 levar a menor indução de apoptose ou de parada do ciclo em resposta ao dano do DNA, sua positividade imuno-histoquímica é também correlacionada a pior resposta a regimes quimioterápicos variados (FENOGLIO-PREISER et al., 2003), especialmente os que contêm compostos com platina, que promovem indiretamente quebras do DNA (YILDIRIM et al., 2015).

### 2.6.7 RAD51

O polimorfismo G135C do gene *RAD51* é associado a maior risco de câncer gástrico. Seus portadores têm sinais detectáveis de deficiência de reparo do DNA nos linfócitos do sangue periférico (POPLAWSKI et al., 2006). Foi também demonstrado que esse polimorfismo é associado à ocorrência de metaplasia intestinal antral em indivíduos infectados por *Helicobacter pylori* (TRANG et al., 2016), à presença de instabilidade microsatélite nos adenocarcinomas gástricos de padrão intestinal e à infecção por cepas virulentas de *Helicobacter pylori* (SILVA-FERNANDES et al., 2017).

Heeke et al. (2018) não detectaram mutações do *RAD51* em cânceres gastroesofágicos.

Diante do exposto, este trabalho justifica-se pela necessidade de melhor compreender a influência de alterações da recombinação homóloga na patogênese do adenocarcinoma gástrico, especialmente por meio da avaliação de proteínas pouco estudadas (*RAD51*, *ATR*) ou associadas a resultados prévios conflitantes (*BRCA1*, *BRCA2*), mas também pela correlação dessas com outras de importância já mais bem estabelecida (*p53*, *ATM*,  $\gamma$ *H2AX*, *CHK2*). Os achados poderão subsidiar a pesquisa de novos alvos terapêuticos e estabelecer novos biomarcadores prognósticos, de resposta a tratamento e diagnósticos.

**OBJETIVOS**

---



### 3. Objetivos

- Avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas RAD51, ATR, ATM, BRCA2, p53,  $\gamma$ H2AX, CHK2 e BRCA1 em adenocarcinomas gástricos e na mucosa não neoplásica respectiva.
- Correlacionar os resultados imuno-histoquímicos entre si e com várias características clínicas e patológicas, incluindo sobrevida, tipo e grau histológicos, tamanho tumoral, presença de metástases, de invasão vascular, realização prévia de tratamento neoadjuvante, resposta a tratamento adjuvante/neoadjuvante.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP em 1/11/2017, no processo de número 12349/17 (ANEXO A).

### **4.2 Delineamento do estudo**

Este é um estudo caso-controle, retrospectivo e longitudinal, baseado na análise imuno-histoquímica de amostras de adenocarcinoma gástrico e da mucosa gástrica não neoplásica dos mesmos pacientes, provenientes de peças cirúrgicas de gastrectomia total ou subtotal. O material foi obtido de blocos de parafina do arquivo do Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

### **4.3 Casuística**

#### **4.3.1 População do estudo**

Foram estudados pacientes submetidos a gastrectomia total ou subtotal no Hospital das Clínicas da FMRP-USP, para tratamento de adenocarcinoma gástrico, de abril de 2008 a junho de 2017.

#### **4.3.2 Critérios de inclusão**

Foram incluídos somente adenocarcinomas primários do estômago, dos tipos difuso, intestinal ou misto de Laurén.

Apenas tumores que infiltrassem a camada muscular própria, podendo alcançar a serosa ou órgãos adjacentes, foram incluídos.

#### 4.3.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos os casos com óbito menos de 30 dias após a cirurgia.

Foram excluídos os casos cujos blocos de parafina disponíveis tivessem tecido neoplásico escasso ou ausente ou em que não houvesse mucosa gástrica não neoplásica disponível para amostragem.

Casos de tipo indeterminado na classificação de Laurén ou de tipos histológicos especiais foram excluídos, assim como quaisquer neoplasias gástricas que não adenocarcinomas, como tumores neuroendócrinos ou tumores estromais.

Foram excluídos adenocarcinomas que tivessem sido considerados, de acordo com o laudo anatomopatológico, oriundos do esôfago com extensão ao estômago (porém os tumores com centro no estômago com infiltração do esôfago distal não foram excluídos).

#### 4.4 Revisão histológica

Foi feita a revisão histológica dos tumores, que foram classificados de acordo com o esquema de Laurén (LAURÉN, 1965; LAUWERS et al., 2010). Também foi feita a classificação do grau histológico em baixo (grau 1, tumores bem diferenciados), intermediário (grau 2, tumores moderadamente diferenciados) e alto (grau 3, tumores pouco diferenciados) (CARNEIRO et al., 2019). Foi observada a presença de áreas mucinosas (ausentes, ou presentes e correspondentes a menos ou mais de 50% do volume tumoral), de células em anel de sinete, de invasão vascular linfática ou sanguínea, de invasão perineural, de infecção por *Helicobacter pylori*, de gastrite e de metaplasia intestinal. Também foi feito o estadiamento patológico, de acordo com a 8ª edição da classificação TNM da UICC (GOSPODAROWICZ et al., 2017) (QUADRO 3).

#### 4.5 Análise dos prontuários

Foram obtidas as seguintes informações dos prontuários: sexo; idade; tipo de cirurgia; local da lesão; tamanho da lesão; presença e local de metástase; história pessoal de doenças, tabagismo, alcoolismo; história familiar de câncer gástrico ou de outras doenças (especialmente neoplasias); tratamento adjuvante; tratamento neoadjuvante; ocorrência e características de recidiva; sobrevida global a partir da cirurgia; sobrevida livre de doença.

**Quadro 3.** Estadiamento dos carcinomas gástricos, de acordo com a 8ª edição da classificação TNM da UICC (GOSPODAROWICZ et al., 2017).

pT (profundidade de invasão)	pTis: carcinoma in situ (intraepitelial) pT1a: invasão da lâmina própria ou muscular da mucosa pT1b: invasão da submucosa pT2: invasão da muscular própria pT3: invasão da subserosa ou tecido adiposo do omento maior ou menor pT4a: ruptura da serosa pT4b: infiltração de órgãos ou estruturas adjacentes (excluindo-se extensão intramural ao esôfago ou duodeno)
pN (linfonodos regionais)	pN0: ausência de metástase em linfonodos pN1: metástases em 1 ou 2 linfonodos pN2: metástases em 3 a 6 linfonodos pN3a: metástases em 7 a 15 linfonodos pN3b: metástases em 16 ou mais linfonodos
(p)M (metástases distantes)	M0: ausência de metástase distante M1: metástase distante (incluindo implantes peritoneais)
Estádio patológico	0: Tis N0 M0 IA: T1 N0 M0 IB: T1 N1 M0 T2 N0 M0 IIA: T1 N2 M0 T2 N1 M0 T3 N0 M0 IIB: T1 N3a M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T4a N0 M0 IIIA: T2 N3a M0 T3 N2 M0 T4a N1, N2 M0 T4b N0 M0 IIIB: T1, T2 N3b M0 T3, T4a N3a M0 T4b N1, N2 M0 IIIC: T3, T4a N3b M0 T4b N3a, N3b M0 IV: qualquer T, qualquer N, M1

#### 4.6 Confeção dos TMAs

Foram confeccionados blocos de parafina com microarranjos teciduais (*tissue microarrays*, TMAs), retirando-se amostras dos blocos de parafina doadores com agulhas de 2 mm de calibre. De cada caso, foram obtidas duas amostras representativas da neoplasia, em geral uma da porção superficial e outra da porção profunda do tumor, e uma amostra de mucosa gástrica não neoplásica, evitando-se, sempre que possível, áreas com metaplasia intestinal e excluindo-se áreas displásicas.

#### 4.7 Imuno-histoquímica

Dos blocos de parafina contendo os TMAs, foram feitos cortes de 4 $\mu$ m de espessura, que foram depositados sobre lâminas silanizadas. Procedeu-se à desparafinização com banhos sucessivos de xilol e álcool, e, então, à recuperação antigênica, com os tampões especificados abaixo (TABELA 1). Após a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas com os anticorpos discriminados a -4°C, por 1h30min no caso de BRCA2, e por 12h para os demais anticorpos. Foi usado o kit de detecção livre de biotina Reveal (Biogen). Os cortes foram incubados com solução de diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. Foram contracolorados com hematoxilina de Harris e montados com lamínulas com Entelan (Merck).

#### 4.8 Critérios de avaliação imuno-histoquímica

Foi avaliada a intensidade de marcação (fraca, moderada ou forte) e estimada a porcentagem de células marcadas (neoplásicas, nas amostras tumorais; epiteliais foveolares e glandulares, nas amostras de mucosa gástrica). Calculou-se, então, a pontuação histoquímica (*H-score*) de cada caso, obtida da multiplicação da porcentagem de células marcadas por 1, 2 ou 3, respectivamente para marcação fraca, moderada ou forte, portanto com valor possível de

0 a 300. Foram avaliadas separadamente a marcação nuclear e a citoplasmática, quando aplicável.

Os casos com marcação em 10% ou menos das células neoplásicas foram considerados negativos; os com marcação em mais de 10%, positivos. Conquanto não haja na literatura uniformidade dos critérios imuno-histoquímicos para os marcadores avaliados, o ponto de corte de 10% é comumente adotado, já tendo sido usado, com algumas variações, para ATM e CHK2 (LEE et al., 2014), p53 (FENOGLIO-PREISER et al., 2003), BRCA1 (CHEN et al., 2013) e, no adenocarcinoma prostático, para RAD51 (MITRA et al., 2009).

**Tabela 1.** Anticorpos usados para imuno-histoquímica

Anticorpo anti-	Fabricante	Código	Tipo	Recuperação antigênica	Diluição
p53	Novocastra	NCL-p53-DO7	monoclonal camundongo	de Citrato, pH 6,0	1:50
CHK2	Novocastra	DCS270.1	monoclonal camundongo	de Tris-EDTA, pH 9,0	1:100
BRCA1	St John's Laboratory	STJ113833	policlonal coelho	de Diva Decloaker, 10X (Biocare Medical)	1:300
BRCA2	St John's Laboratory	STJ91885	policlonal coelho	de Diva Decloaker, 10X (Biocare Medical)	1:100
ATM	St John's Laboratory	STJ97797	monoclonal camundongo	de Diva Decloaker, 10X (Biocare Medical)	1:400
ATR	Abcam	ab178407	monoclonal coelho	de Diva Decloaker, 10X (Biocare Medical)	1:100
RAD51	St John's Laboratory	STJ95330	policlonal coelho	de Diva Decloaker, 10X (Biocare Medical)	1:100
$\gamma$ H2AX	Abcam	ab26350	monoclonal camundongo	de Diva Decloaker, 10X (Biocare Medical)	1:100

Adicionalmente, para uma análise com maior estratificação dos resultados e que levasse em conta a variação de intensidade de marcação, os casos positivos foram divididos em dois grupos: os de baixa expressão, com *H-score* menor ou igual à mediana dos casos positivos (de cada marcador, e separadamente para as amostras tumorais e não neoplásicas), e com alta expressão, com *H-score* maior que a mediana, assim como feito por Zhang et al. (2018) para estudo de BRCA1 e BRCA2.

#### 4.9 Análise estatística

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas, essa análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias, desvios-padrão e mediana. Para as variáveis qualitativas, calcularam-se frequências absolutas e relativas.

Para a comparação de médias de dois grupos, foi utilizado o teste t de Student (ROSNER, 2015).

Para testar-se a homogeneidade entre as proporções, foi utilizado o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher (ROSNER, 2015).

Para o estudo das correlações entre os marcadores, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (ROSNER, 2015).

O estudo da sobrevida e sobrevida livre de doença foi realizado através da curva de sobrevida de Kaplan-Meier com teste *log-rank* (GAUVREAU e PAGANO, 2004).

Para o cálculo das *hazard ratio*, foi utilizado o modelo de regressão de Cox uni e multivariado (GAUVREAU e PAGANO, 2004).

O software usado para os cálculos foi o SPSS 17.0 para Windows.

O nível de significância considerado para os testes foi de 5%.

O estudo da correlação entre os marcadores pelo coeficiente de Spearman foi feito considerando-se os valores individuais de *H-score*.

A avaliação da correlação entre os achados imuno-histoquímicos e os vários parâmetros clinicopatológicos, incluindo sobrevida global e livre de doença, foi feita de dois modos: com a divisão dos resultados imuno-histoquímicos em três grupos (negativos, positivos com baixa expressão e positivos com alta expressão), e com a divisão em dois grupos (positivos e negativos). Em alguns casos, foi feita também a comparação entre positivos com alta expressão e o conjunto formado por negativos e positivos com baixa expressão. Como exceção, a análise em dois grupos de CHK2 nos tumores foi feita pela comparação entre os casos positivos com baixa expressão e os positivos com alta expressão, porque apenas um caso foi negativo.



## **RESULTADOS**

---

## 5. Resultados

### 5.1 Características gerais da população

De um total inicial de 136 casos de adenocarcinoma gástrico, 11 foram excluídos por óbito antes de 30 dias após a gastrectomia e 4 por não se enquadrarem nos tipos intestinal, difuso ou misto de Laurén – 3 casos de carcinoma medular e 1 caso de carcinoma sólido pouco diferenciado de tipo indefinido –, restando 121 casos em estudo.

Eram do sexo masculino 85 pacientes (70,2%), e do sexo feminino, 36 pacientes (29,8%).

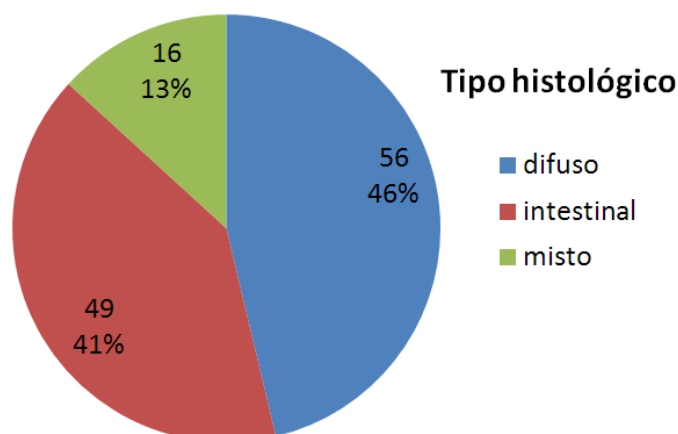
A idade média dos 121 pacientes ao diagnóstico foi 63,10 anos, com mínima de 21 anos, máxima de 94 anos, mediana de 65 anos e desvio padrão de 12,26 anos.

De acordo com a classificação de Laurén, 56 (46,3%) casos eram do tipo difuso, 49 (40,5%), do tipo intestinal, e 16 (13,2%), mistos (TABELA 2 e FIGURAS 4 e 5).

Células em anel de sinete, mesmo que em quantidades mínimas, foram sempre vistas nos casos difusos. Apenas em 5 deles, no entanto, elas eram mais de 50%.

Havia no total 3 carcinomas mucinosos, i.e., com mais de 50% do volume tumoral constituído de mucina (CARNEIRO et al., 2019), destes, 1 era de tipo intestinal, pouco diferenciado, e 2 eram difusos, ambos com mais de 50% das células em anel de sinete. Além disso, havia 15 tumores focalmente mucinosos (com acúmulo de mucina extracelular correspondente a menos de 50% do volume tumoral), sendo 5 difusos (incluindo 1 com predomínio de células em anel de sinete), 3 intestinais (1 bem diferenciado e 2 moderadamente diferenciados) e 7 mistos.

**Figura 4.** Distribuição dos casos por tipo histológico.



**Tabela 2.** Sexo e idade na população total e por tipo histológico.

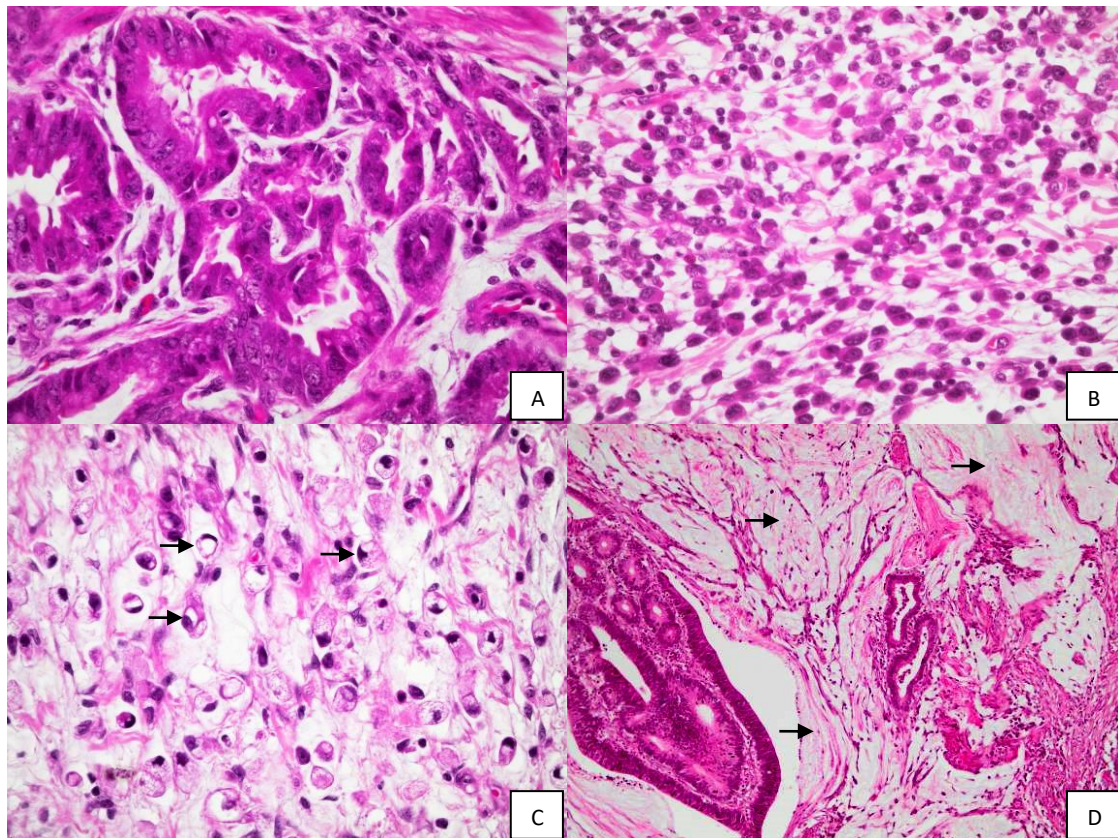
	Total	Difusos	Intestinais	Mistos
Número	121	56 (46,3%)	49 (40,5%)	16 (13,2%)
Sexo M/F	85 / 36 (70,3% / 29,7%)	36 / 20 (64,29% / 35,71%)	36 / 13 (73,47% / 26,53%)	13 / 3 (81,25% / 18,75%)
Idade média (mínima- máxima)	63 anos (21-94)	59 anos (21-81)	67 anos (43-94)	64 anos (49-79)

Os 49 adenocarcinomas de tipo intestinal incluíam 1 caso de padrão túbulo-papilar, moderadamente diferenciado; os demais tinham arquitetura tubular, assim como o componente intestinal de todos os tumores mistos.

Dos tumores de tipo intestinal, 24,49% (12/49) eram bem diferenciados (de grau 1); 57,14% (28/49), moderadamente diferenciados (de grau 2); e 18,37% (9/49), pouco diferenciados (de grau 3). Todos os difusos e mistos foram considerados de grau 3. Portanto, havia no total 12 (9,9%) casos de grau 1, 28 (23,1%) de grau 2 e 81 (66,9%) de grau 3.

Cinquenta e nove (48,8%) pacientes foram submetidos a gastrectomia subtotal, e 62 (51,2%) a gastrectomia total. Em sete casos (dois de gastrectomia subtotal e cinco de gastrectomia total), foram realizados procedimentos adicionais simultâneos para ressecção de outras estruturas acometidas pela neoplasia, como pancectomia, hepatectomia e colectomia segmentares ou esplenectomia. Oito das gastrectomias totais eram mais especificamente degastrectomias; as gastrectomias subtotais prévias tinham sido por úlcera em 5 casos, por motivo não especificado em 2 casos, e por adenocarcinoma gástrico em 1 caso, 7 anos antes da recidiva.

**Figura 5.** Histologia dos adenocarcinomas gástricos. A: padrão intestinal (400X). B: padrão difuso (400X). C: adenocarcinoma difuso de células em anel de sinete, indicadas por setas (400X). D: área mucinosa (setas) em adenocarcinoma de padrão intestinal (200X).



Em 62 casos (51,2%), a neoplasia era localizada na região antral e/ou pilórica; em 24 casos (19,8%), no corpo e/ou fundo; em 8 casos (6,6%), no cárdia; e, em 27 casos (22,3%), em mais de uma dessas regiões (TABELA 3).

O tamanho dos tumores estava especificado no laudo anatomopatológico de 118 casos. Em 3 pacientes, havia duas lesões. O tamanho médio no maior eixo foi 5,91 cm (desvio-padrão: 2,98 cm; mínimo: 1,2 cm; máximo: 16,5 cm), considerando-se no cálculo apenas a lesão maior dos pacientes com duas lesões (TABELA 3).

Foi detectada infiltração neoplásica perineural em 52,9% (64/121) dos casos. Invasão vascular sanguínea ou linfática foi observada em 80,2% (97/121) dos casos (TABELA 4).

**Tabela 3.** Localização e tamanho tumoral na população total e por tipo histológico.

	Total	Difusos	Intestinais	Mistos
Local				
antro/piloro	62 (51,2%)	27 (48,21%)	25 (51,02%)	10 (62,5%)
corpo/fundo	24 (19,8%)	11 (19,64%)	10 (20,41%)	3 (18,75%)
cárdia	8 (6,6%)	4 (7,14%)	2 (4,08%)	2 (12,5%)
mais de uma região	27 (22,3%)	14 (25%)	12 (24,49%)	1 (6,25%)
Tamanho médio	5,91 cm	6,04 cm	6,01 cm	5,16 cm

Com relação à profundidade de invasão, 16,53% (20/121) dos tumores infiltravam apenas até a camada muscular própria (pT2), 66,94% (81/121) até a subserosa ou tecido adiposo perigástrico do omento maior ou menor (pT3), 9,09% (11/121) rompiam a serosa sem acometer outros órgãos ou estruturas (pT4a), e 7,44% (9/121) infiltravam outros órgãos ou estruturas, exceto extensão intramural ao esôfago ou duodeno (pT4b).

Metástase em linfonodos regionais estava presente em 66,9% dos casos (81/121), sendo 15,70% do total (19/121) classificados como pN1, 22,31% (27/121) como pN2, 20,66% (25/121) como pN3a e 8,26% (10/121) como pN3b.

Metástases a distância (estádio IV) estavam presentes na época do diagnóstico em 21 pacientes (17,36%); havia metástase pulmonar em 3 casos, hepática em 5 casos, pancreática em 2 casos, ovariana em 1 caso, no cólon ascendente em 1 caso, implantes peritoneais em 12 casos, e metástases em linfonodos distantes em 2 casos (cervical e pericólico).

Havia registro de história familiar de câncer em parentes de até terceiro grau em 27 pacientes (22,3%). Nove pacientes (7,4% do total) tinham parentes de até terceiro grau com história de câncer gástrico; predominou o tipo histológico intestinal entre esses pacientes (6 intestinais e 3 difusos).

Doze pacientes (9,9%) tiveram outras neoplasias malignas, antes ou depois do câncer gástrico ou simultaneamente. Havia casos de adenocarcinoma de próstata, cólon, endométrio e duodeno; de carcinoma epidermoide da língua, laringe ou esôfago; além de um carcinoma urotelial da bexiga, um linfoma difuso de grandes células B, um carcinoma ameloblástico da mandíbula e um carcinoma basocelular com infiltração orbitária.

**Tabela 4.** Características clinicopatológicas na população total e por tipo histológico.

	Total	Difusos	Intestinais	Mistos
Invasão perineural	64 (52,9%)	31 (55,36%)	22 (44,90%)	11 (68,75%)
Invasão vascular	97 (80,2%)	49 (87,5%)	34 (69,39%)	14 (87,5%)
pT				
pT2	20 (16,53%)	7 (12,5%)	9 (18,37%)	4 (25%)
pT3	81 (66,94%)	37 (66,07%)	34 (69,39%)	10 (62,5%)
pT4	20 (16,53%)	12 (21,43%)	6 (12,24%)	2 (12,5%)
Metástase linfonodal	81 (66,9%)	47 (83,93%)	24 (48,97%)	11 (68,75%)
Metástase distante	21 (17,4%)	9 (16,07%)	9 (18,37%)	3 (18,75%)
Estádio				
I/II	52 (43,0%)	18 (32,14%)	28 (57,14%)	6 (37,5%)
III/IV	69 (57,0%)	38 (67,86%)	21 (42,86%)	10 (62,5%)

Tinham história de tabagismo 46 pacientes (38,0%), e de alcoolismo, 29 (24,0%).

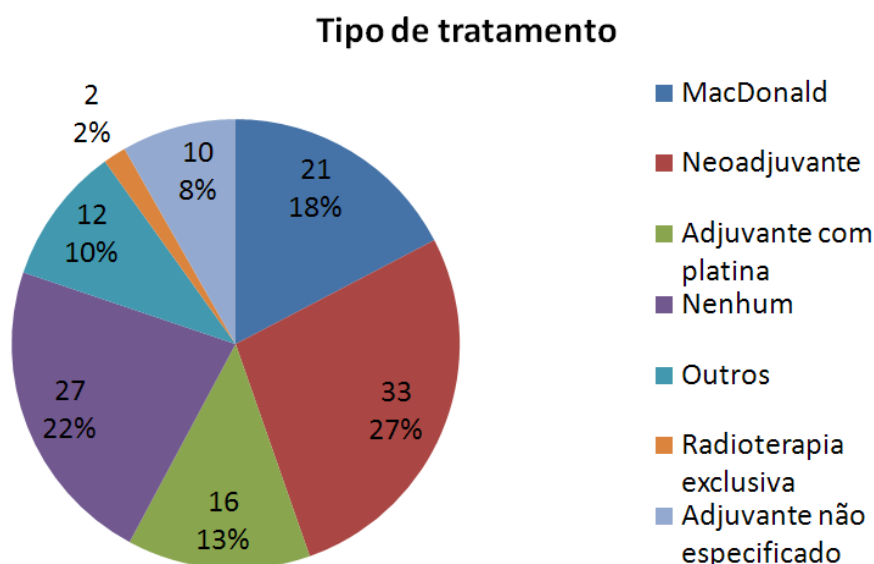
Nas peças cirúrgicas das gastrectomias, foi detectada, por meio de avaliação histológica convencional, presença de *Helicobacter pylori* em 38,0% dos casos (46/121). Gastrite na mucosa não tumoral foi observada em 90,9% dos casos (110/121), e metaplasia intestinal em 47,1% (57/121). Em 45 dos 46 casos (97,8%) com infecção por *Helicobacter pylori*, havia gastrite. Todos os casos de metaplasia intestinal eram associados a gastrite, mas em apenas 42,1% deles (24/57) foi vista *Helicobacter pylori* (TABELA 5).

**Tabela 5.** Associação a *H. pylori*, gastrite e metaplasia intestinal na população total e por tipo histológico.

	Total	Difusos	Intestinais	Mistos
<i>H. pylori</i>	46 (38,0%)	19 (33,93%)	18 (36,73%)	9 (56,25%)
Gastrite	110 (90,9%)	48 (85,71%)	47 (95,92%)	15 (93,75%)
Metaplasia intestinal	57 (47,1%)	19 (33,93%)	31 (63,27%)	7 (43,75%)

Vinte e sete pacientes (22,3%) não foram submetidos a nenhuma terapia adjuvante ou neoadjuvante. Tratamento neoadjuvante foi realizado em 33 pacientes (27,3%), dos quais 32 também foram submetidos a terapia após a cirurgia. Os 61 pacientes restantes (50,4%) tiveram apenas tratamento adjuvante, pós-cirúrgico. Desses 61 pacientes, 21 (17,4%) foram tratados de acordo com o protocolo de MacDonald (fluorouracil, leucovorin e radioterapia), 16 (13,2%) com esquemas variados que incluíam platina, 12 (9,9%) com outros regimes, 10 (8,3%) com tratamento não especificado e 2 (1,7%) exclusivamente com radioterapia (FIGURA 6).

**Figura 6.** Esquemas de terapia adjuvante ou neoadjuvante a que os pacientes foram submetidos.



A neoadjuvância consistiu exclusivamente em ECX (epirrubicina, cisplatina, capecitabina) em 24 pacientes, em EOX (epirrubicina, oxaliplatina, capecitabina) em 1

paciente, em ECX depois substituído por EOX em 1 paciente, e em ECX depois substituído por capecitabina associada a radioterapia em 1 paciente. O esquema de tratamento era em geral mantido após a cirurgia, com algumas exceções. Não encontramos registro do tratamento realizado nos 6 casos restantes.

Setenta e cinco (62,0%) pacientes foram a óbito. O tempo de sobrevida global após a cirurgia (TABELA 6 e FIGURA 7) variou de 2 meses a 10 anos (média de 2,75 anos com desvio-padrão de 2,54 anos e mediana de 1,90 ano).

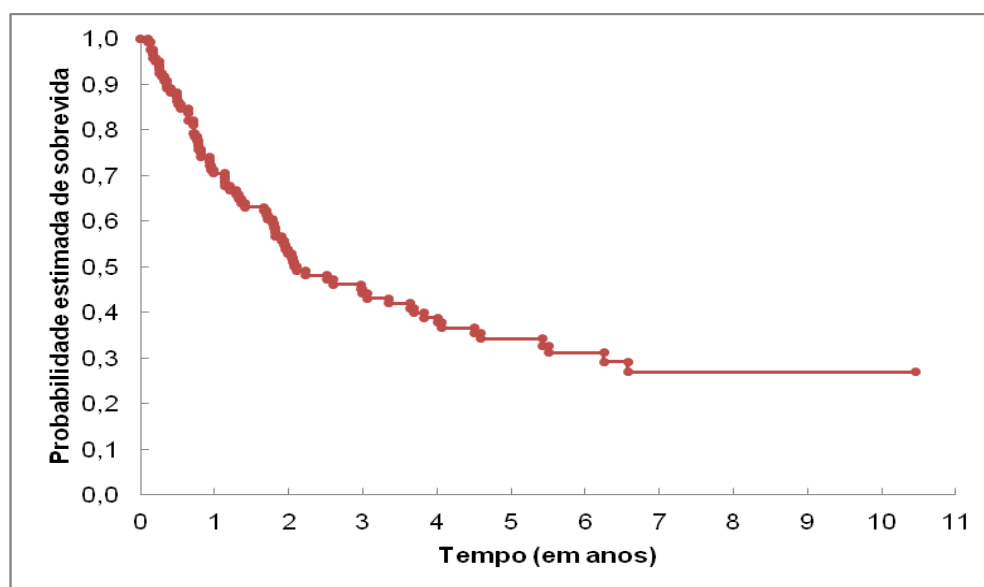
**Tabela 6.** Sobrevida global na população total e por tipo histológico.

Sobrevida global	Total	Difusos	Intestinais	Mistos
2 anos	55,0% (61/111)	43,75%	66,67%	53,33%
	53,0%*	(21/48)	(32/48)	(8/15)
3 anos	43,4% (46/106)	30,43%	56,52%	42,86%
	44,1%*	(14/46)	(26/46)	(6/14)
5 anos	26,8% (26/97)	18,18%	37,5%	23,08%
	34,2%*	(8/44)	(15/40)	(3/13)

(casos com perda do seguimento foram censurados)

\*probabilidade estimada de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier.

**Figura 7.** Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global para a população total em estudo.



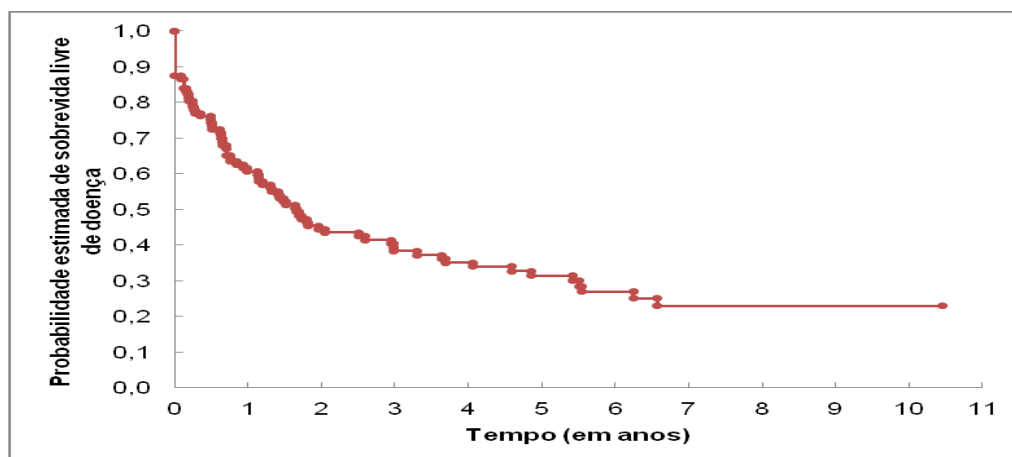
O tempo de sobrevida livre de doença (FIGURA 8) após a cirurgia variou de 0 a 10 anos (média de 2,40 anos com desvio-padrão de 2,65 anos e mediana de 1,31 ano).

Houve recidiva documentada em 28 casos (23,14%). Recidiva local ocorreu em 7 casos, peritoneal em 8 casos, hepática em 6 casos, óssea em 4 casos, pulmonar em 4 casos,



retroperitoneal em 2 casos, em linfonodo hilar hepático em 1 caso, pleural em 1 caso, ovariana em 1 caso, no intestino delgado em 1 caso.

**Figura 8.** Curva de Kaplan-Meier da sobrevida livre de doença para a população total em estudo.



## 5.2 Influência das características clinicopatológicas na sobrevida

A sobrevida global após a cirurgia foi menor, com significância estatística, para os pacientes submetidos a gastrectomia total, para aqueles com maior tamanho tumoral, com tipo histológico difuso, presença de invasão vascular, maior profundidade de invasão tumoral, presença de metástase linfonodal regional, presença de metástase distante, maior estágio, e sem tratamento neoadjuvante (TABELA 7 e FIGURA 9).

**Tabela 7.** Influência das características clinicopatológicas na sobrevida global.

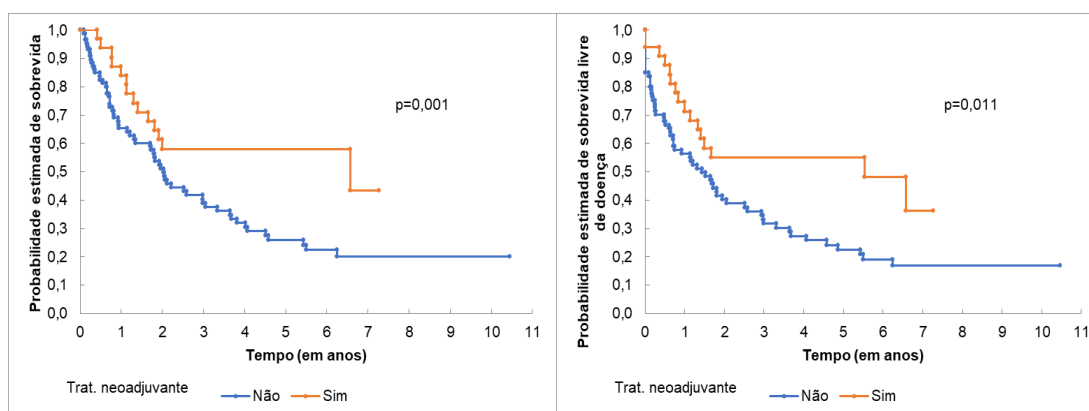
Fatores com influência na sobrevida global	<i>Hazard ratio</i> de morte	p
Tipo de gastrectomia	1,768 (total em relação à subtotal)	0,017
Tamanho tumoral	1,125 (para cada centímetro de aumento)	0,001
Tipo histológico	1,701 (do tipo difuso em relação ao intestinal)	0,036
Invasão vascular	1,527	0,002
Profundidade de invasão tumoral	2,836 (T3-4 em comparação com T2)	0,006
Metástase linfonodal regional	2,727	< 0,001
Metástase distante	1,737	0,047
Estádio	2,699 (III-IV em comparação com I-II)	< 0,001
Tratamento neoadjuvante	0,483	0,014

A sobrevida livre de doença foi menor, com significância estatística, para os pacientes submetidos a gastrectomia total, para aqueles com tumor no cárdia ou com maior tamanho, presença de invasão perineural, presença de invasão vascular, maior profundidade de invasão tumoral, presença de metástase linfonodal regional, presença de metástase distante, maior estágio, e sem tratamento neoadjuvante (TABELA 8 e FIGURA 9).

**Tabela 8.** Influência das características clinicopatológicas na sobrevida livre de doença.

Fatores com influência na sobrevida livre de doença	<i>Hazard ratio</i> de morte ou recidiva	p
Tipo de gastrectomia	1,961 (total em relação à subtotal)	0,004
Localização no cárdia	2,432 (em relação à localização antropilórica)	0,035
Tamanho tumoral	1,116 (para cada centímetro de aumento)	0,001
Invasão perineural	1,697	0,022
Invasão vascular	2,514	0,005
Profundidade de invasão tumoral	2,828 (T3-4 em comparação com T2)	0,004
Metástase linfonodal regional	2,643	< 0,001
Metástase distante	5,604	< 0,001
Estádio	3,409 (III-IV em comparação com I-II)	< 0,001
Tratamento neoadjuvante	0,501	0,014

**Figura 9.** Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global e da sobrevida livre de doença, comparando os pacientes com e sem tratamento neoadjuvante. A sobrevida é maior para aqueles com o tratamento, com significância estatística pelo teste *log-rank*.



Idade, sexo, grau histológico, presença de áreas tumorais mucinosas, predomínio de células em anel de sinete, história familiar de câncer gástrico, história pessoal de outros tipos de câncer, história de tabagismo ou alcoolismo, presença de gastrite, de infecção por *Helicobacter pylori* ou de metaplasia intestinal não tiveram influência estatisticamente significativa na sobrevida global ou na livre de doença.

### 5.3 Achados imuno-histoquímicos nos adenocarcinomas

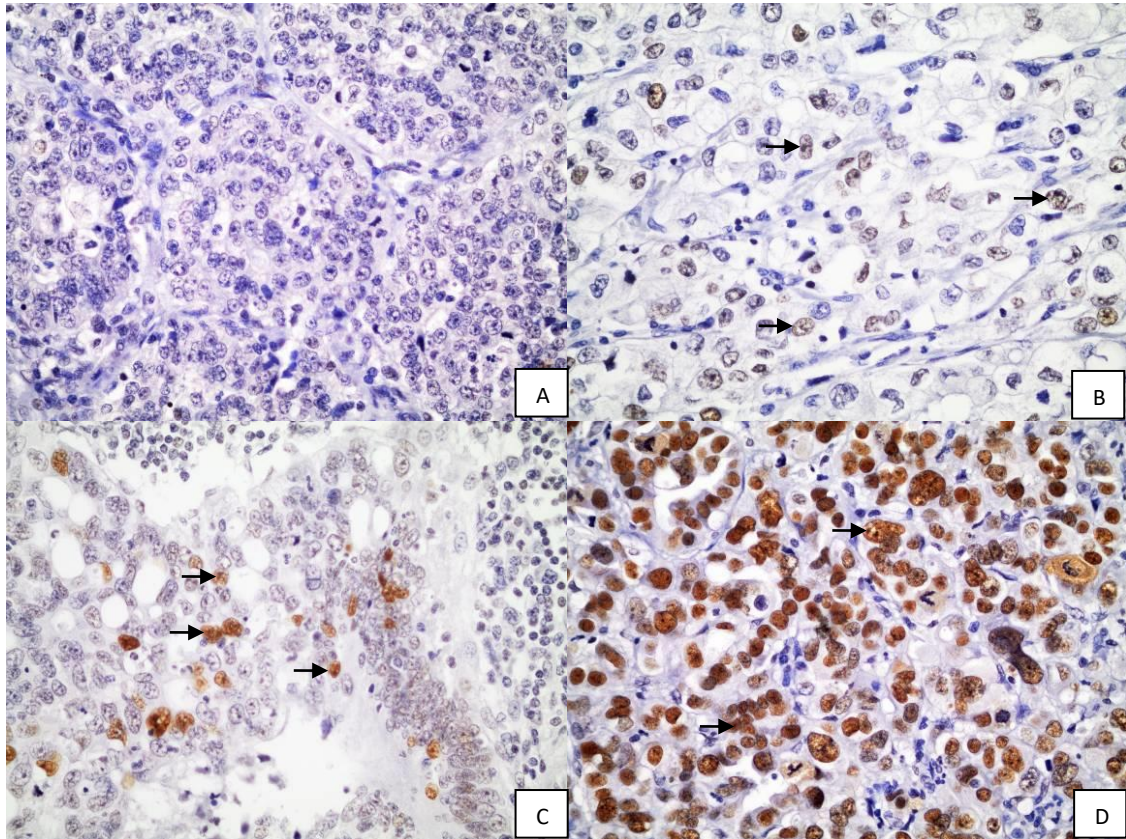
P53 e CHK2 tiveram apenas marcação nuclear. De BRCA1, BRCA2, ATR e RAD51, foi avaliada separadamente a marcação nuclear e a citoplasmática nos tumores. ATM e  $\gamma$ H2AX mostraram marcação nuclear e marcação citoplasmática fraca, aparentemente inespecífica, a qual não foi considerada na avaliação. Os resultados imuno-histoquímicos nas amostras tumorais estão sumarizados abaixo (TABELA 9).

**Tabela 9.** Achados imuno-histoquímicos nas amostras tumorais.

Resultado imuno-histoquímico no tumor	ausência completa de marcação	negativo ( $\leq 10\%$ das células)	positivo (total)	positivo com baixa expressão	positivo com alta expressão	total
p53	34 (28,10%)	54 (44,63%)	67 (55,37%)	34 (28,10%)	33 (27,27%)	121
CHK2	0	1 (0,83%)	120 (99,17%)	69 (57,02%)	51 (42,15%)	121
ATM	4 (3,36%)	7 (5,88%)	112 (94,12%)	62 (52,10%)	50 (42,02%)	119
BRCA1 nuclear	12 (10,0%)	18 (15,00%)	102 (85,00%)	56 (46,67%)	46 (38,33%)	120
BRCA1 citoplasmático	4 (3,33%)	8 (6,61%)	113 (93,39%)	59 (48,76%)	54 (44,63%)	121
BRCA2 nuclear	64 (52,89%)	77 (63,64%)	44 (36,36%)	22 (18,18%)	22 (18,18%)	121
BRCA2 citoplasmático	71 (58,68%)	74 (61,16%)	47 (38,84%)	26 (21,49%)	21 (17,36%)	121
ATR nuclear	44 (36,67%)	71 (59,17%)	49 (40,83%)	29 (24,17%)	20 (16,67%)	120
ATR citoplasmático	42 (35%)	75 (62,50%)	45 (37,50%)	28 (23,33%)	17 (14,17%)	120
RAD51 nuclear	17 (14,29%)	22 (18,49%)	97 (81,51%)	49 (41,18%)	48 (40,34%)	119
RAD51 citoplasmático	13 (10,92%)	19 (15,97%)	100 (84,03%)	50 (42,02%)	50 (42,02%)	119
$\gamma$ H2AX	45 (37,19%)	57 (47,11%)	64 (52,89%)	33 (27,27%)	31 (25,62%)	121

O *H-score* mediano dos casos positivos para p53 (FIGURA 10) foi 160, e o máximo foi 285 (marcação forte em 95% das células neoplásicas).

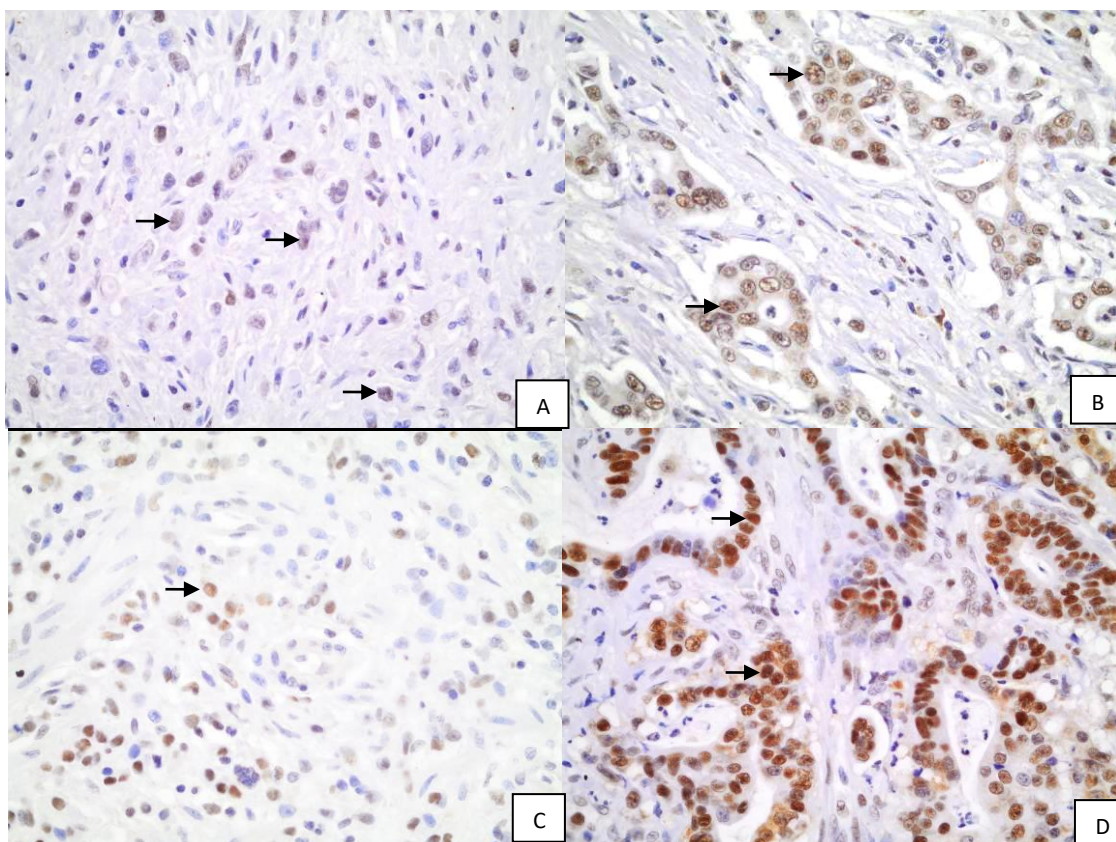
**Figura 10.** Imuno-histoquímica para p53 nos adenocarcinomas. A: negativo. B: marcação fraca. C: marcação moderada. D: marcação forte. Setas indicam a marcação, nuclear. (Aumento de 400X.)



O marcador CHK2 (FIGURA 11) foi considerado negativo em apenas um dos tumores (0,83%), um adenocarcinoma difuso mucinoso em que havia marcação nuclear em cerca de 5% das células. O *H-score* mediano dos casos positivos foi 210, e o máximo foi 285 (marcação forte em 95% das células neoplásicas).



**Figura 11.** Imuno-histoquímica para CHK2 nos adenocarcinomas. A: marcação fraca. B e C: marcação moderada. D: marcação forte. Setas indicam a marcação, nuclear. (Aumento de 400X.)

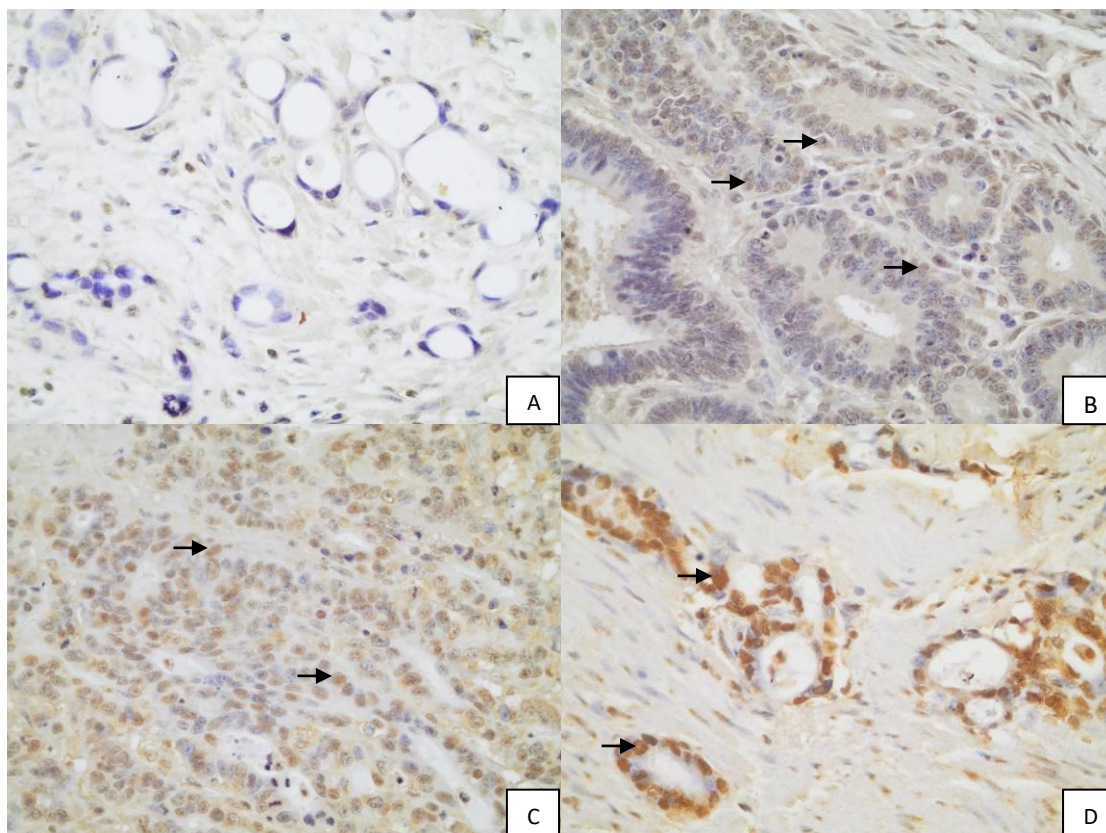


O *H-score* mediano dos casos positivos para ATM (FIGURA 12) foi 90, e o máximo foi 285 (marcação forte em 95% das células neoplásicas).

O *H-score* mediano dos casos positivos para BRCA1 nuclear (FIGURA 13) foi 120, e o máximo foi 300 (marcação forte em 100% das células neoplásicas).

O *H-score* mediano dos casos positivos para BRCA1 citoplasmático (FIGURA 13) foi 180, e o máximo foi 300 (marcação forte em 100% das células neoplásicas).

**Figura 12.** Imuno-histoquímica para ATM nos adenocarcinomas. A: negativo. B: marcação fraca. C: marcação moderada. D: marcação forte. Setas indicam a marcação, nuclear. (Aumento de 400X.)



O *H-score* mediano dos casos positivos para BRCA2 nuclear (FIGURA 14) foi 35, e o máximo foi 210 (marcação forte em 70% das células neoplásicas).

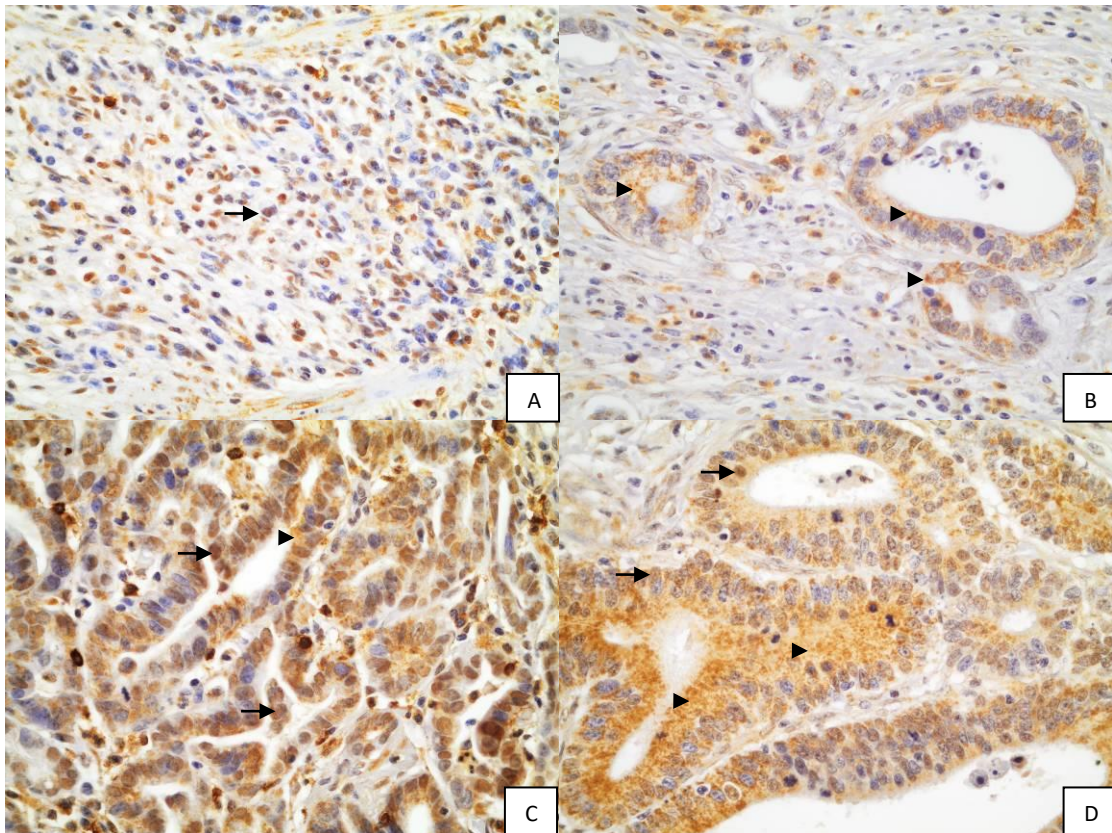
O *H-score* mediano dos casos positivos foi para BRCA2 citoplasmático (FIGURA 14) foi 80, e o máximo foi 240 (marcação forte em 80% das células neoplásicas).

O *H-score* mediano dos casos positivos para ATR nuclear (FIGURA 15) foi 60, e o máximo foi 270 (marcação forte em 90% das células neoplásicas).

O *H-score* mediano dos casos positivos para ATR citoplasmático (FIGURA 15) foi 60, e o máximo foi 285 (marcação forte em 95% das células neoplásicas).



**Figura 13.** Imuno-histoquímica para BRCA1 nos adenocarcinomas. A: marcação principalmente nuclear. B: marcação citoplasmática. C e D: marcação nuclear e citoplasmática. Setas: marcação nuclear. Pontas de seta: marcação citoplasmática. (Aumento de 400X.)



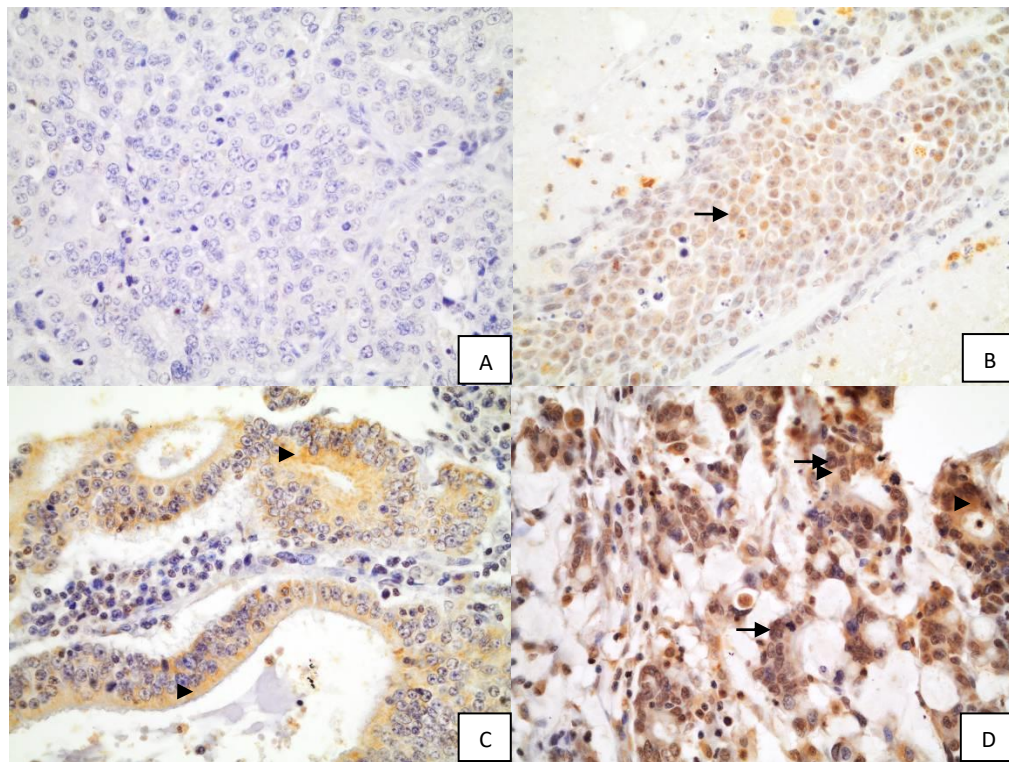
O *H-score* mediano dos casos positivos para RAD51 nuclear (FIGURA 16) positivos foi 80, e o máximo foi 300 (marcação forte em 100% das células neoplásicas).

O *H-score* mediano dos casos positivos para RAD51 citoplasmático (FIGURA 16) foi 155, e o máximo foi 300 (marcação forte em 100% das células neoplásicas).

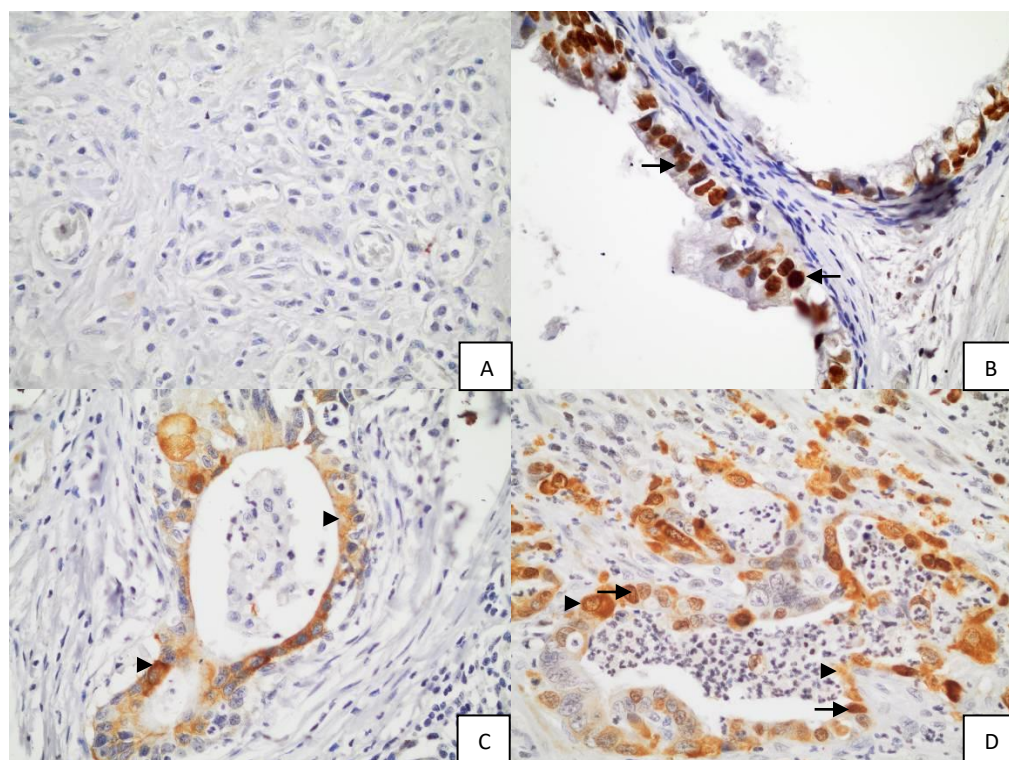
O *H-score* mediano dos casos positivos para  $\gamma$ H2AX (FIGURA 17) foi 70, e o máximo foi 210 (marcação forte em 70% das células neoplásicas).



**Figura 14.** Imuno-histoquímica para BRCA2 nos adenocarcinomas. A: negativo. B: marcação principalmente nuclear. C: marcação citoplasmática. D: marcação nuclear e citoplasmática. Setas: marcação nuclear. Pontas de seta: marcação citoplasmática. (Aumento de 400X.)

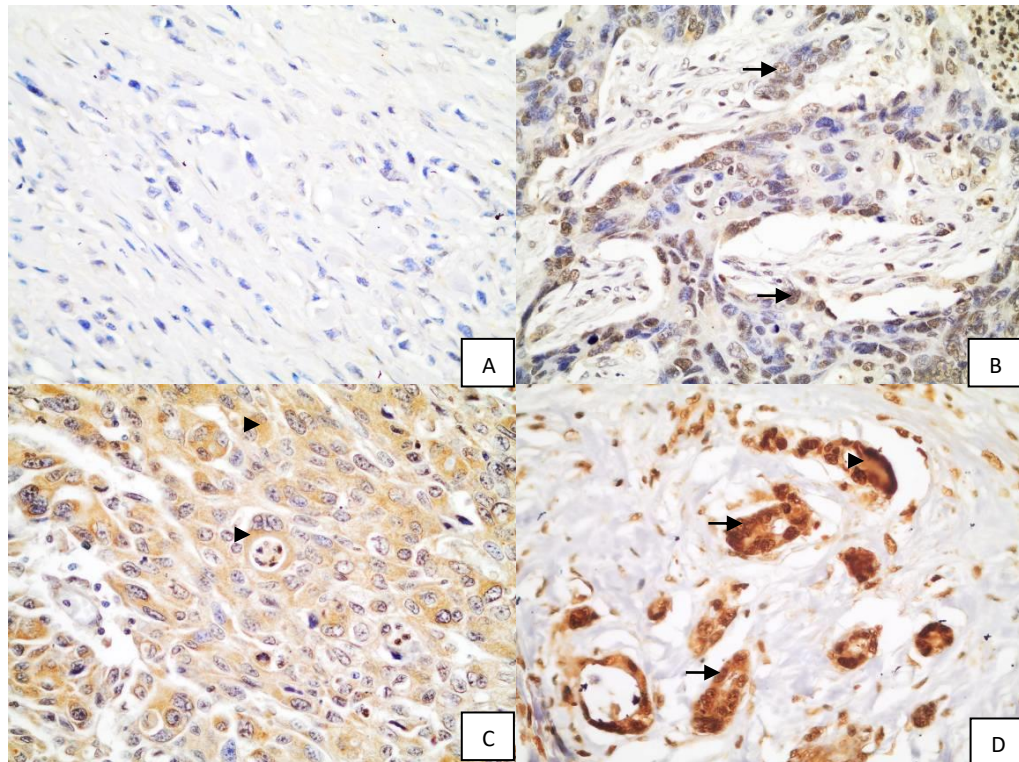


**Figura 15.** Imuno-histoquímica para ATR nos adenocarcinomas. A: negativo. B: marcação nuclear. C: marcação citoplasmática. D: marcação nuclear e citoplasmática. Setas: marcação nuclear. Pontas de seta: marcação citoplasmática. (Aumento de 400X.)

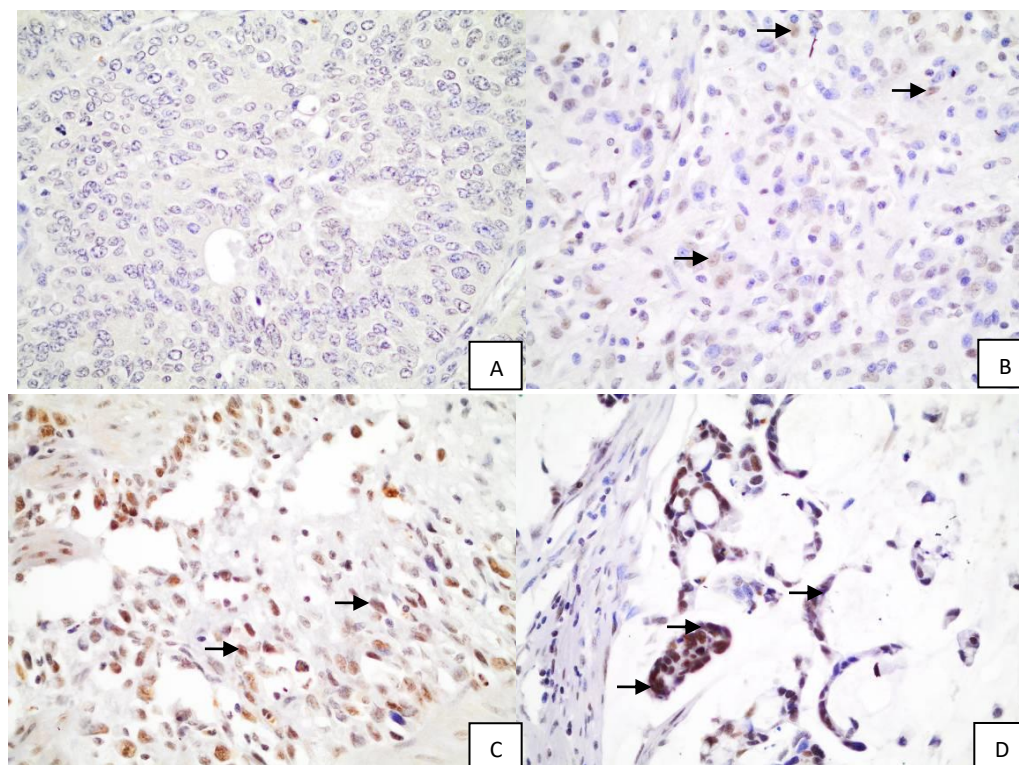




**Figura 16.** Imuno-histoquímica para RAD51 nos adenocarcinomas. A: negativo. B: marcação principalmente nuclear. C: marcação citoplasmática. D: marcação nuclear e citoplasmática. Setas: marcação nuclear. Pontas de seta: marcação citoplasmática. (Aumento de 400X.)



**Figura 17.** Imuno-histoquímica para  $\gamma$ H2AX nos adenocarcinomas. A: negativo. B: marcação fraca. C: marcação moderada. D: marcação forte. Setas indicam a marcação, nuclear. (Aumento de 400X.)



#### 5.4 Achados imuno-histoquímicos na mucosa não neoplásica

Havia amostras de mucosa gástrica não neoplásica avaliáveis nos TMAs de 117 casos, sendo 93 de mucosa oxíntica, 10 de mucosa antral, 3 de mucosa cárdica, 3 de mucosa de transição corpo-antral e 8 de mucosa de local indefinido.

Enquanto nos adenocarcinomas houve ampla variação de intensidade de marcação e da proporção das células marcadas para todas as proteínas avaliadas, notando-se muitos casos de marcação forte e difusa, a marcação na mucosa gástrica não neoplásica foi mais uniforme, focal e fraca ou, no máximo, moderada (FIGURA 18).

Não houve nenhuma marcação para p53 nas amostras não tumorais.

Para todas as demais proteínas avaliadas, foi observada marcação nuclear em células epiteliais foveolares ou glandulares (oxínticas, antrais ou cárdicas). BRCA1, ATM e RAD51 mostraram marcação nuclear fraca a moderada no epitélio glandular e foveolar, em cerca de 30% das células. Para CHK2, houve marcação nuclear fraca a moderada difusa na porção inferior das fovéolas (compartimento proliferativo), e apenas em esparsas células na porção superior das fovéolas e nas glândulas.

Tal tendência a marcação nuclear mais intensa e difusa na porção inferior das fovéolas foi também observada com BRCA2, ATR e  $\gamma$ H2AX. Os resultados de marcação nuclear para estas três proteínas foram variados e puderam ser classificados de acordo com os critérios especificados previamente (TABELA 10), enquanto os dos demais marcadores foram semelhantes em todas as amostras.

**Tabela 10.** Achados imuno-histoquímicos na mucosa não neoplásica.

Marcador na mucosa gástrica não neoplásica	ausência completa de marcação	negativo ( $\leq 10\%$ das células)	positivo (total)	positivo com baixa expressão	positivo com alta expressão
BRCA2	40 (34,19%)	78 (66,67%)	39 (33,33%)	33 (28,21%)	6 (5,13%)
ATR	26 (22,22%)	43 (36,75%)	74 (63,25%)	56 (47,86%)	18 (15,38%)
$\gamma$ H2AX	31 (26,5%)	60 (51,28%)	57 (48,72%)	29 (24,79%)	28 (23,93%)

O *H-score* mediano dos casos positivos para BRCA2 foi 20, correspondente à marcação fraca em cerca de 20% das células vista nos casos positivos com baixa expressão, e o máximo foi 40 (marcação moderada em 20% das células epiteliais).

O *H-score* mediano dos casos positivos para ATR foi 40 (38 casos apresentaram marcação moderada em cerca de 20% das células), e o máximo foi 100 (marcação moderada em 50% das células epiteliais).

O *H-score* mediano dos casos positivos para  $\gamma$ H2AX foi 20, correspondente à marcação fraca em cerca de 20% das células vista nos casos positivos com baixa expressão. e o máximo foi 100 (marcação moderada em 50% das células epiteliais).

Dos 40 casos em que a mucosa não neoplásica teve total ausência de marcação nuclear para BRCA2, houve total ausência de marcação (nuclear ou citoplasmática) no respectivo tecido tumoral em 14. Para ATR, em 1 dos 26 casos. Para  $\gamma$ H2AX, em 18 dos 31 casos. Considerando-se os valores individuais de *H-score*, a marcação de BRCA2 na mucosa mostrou correlação positiva significativa com BRCA2 nuclear no tumor ( $r$  de Spearman = 0,185,  $p = 0,045$ ), mas não com BRCA2 citoplasmático no tumor ( $r = -0,044$ ,  $p = 0,640$ ). A marcação de ATR na mucosa mostrou correlação positiva significativa com ATR nuclear no tumor ( $r = 0,402$ ,  $p < 0,001$ ), mas não com ATR citoplasmático no tumor ( $r = 0,048$ ,  $p = 0,612$ ). A marcação de  $\gamma$ H2AX na mucosa mostrou correlação positiva significativa com  $\gamma$ H2AX no tumor ( $r = 0,201$ ,  $p = 0,030$ ).

Além da marcação nuclear nas células epiteliais, foi vista marcação citoplasmática provavelmente inespecífica nas glândulas oxínticas, antrais ou cárdicas, principalmente nas células parietais. Tal marcação foi fraca a moderada com ATM, BRCA1, RAD51 e  $\gamma$ H2AX; e muito fraca e ocasional com CHK2, ATR e BRCA2.

Também ocorreu marcação nuclear de linfócitos – numerosos com ATM, BRCA1 e RAD51; alguns com CHK2; raros com ATR e  $\gamma$ H2AX. Marcação provavelmente inespecífica no citoplasma de plasmócitos, histiócitos e neutrófilos foi vista com ATM, BRCA1, RAD51,  $\gamma$ H2AX e, em menor grau, com CHK2 e BRCA2. Os feixes nervosos mostraram marcação nuclear e citoplasmática para ATR.

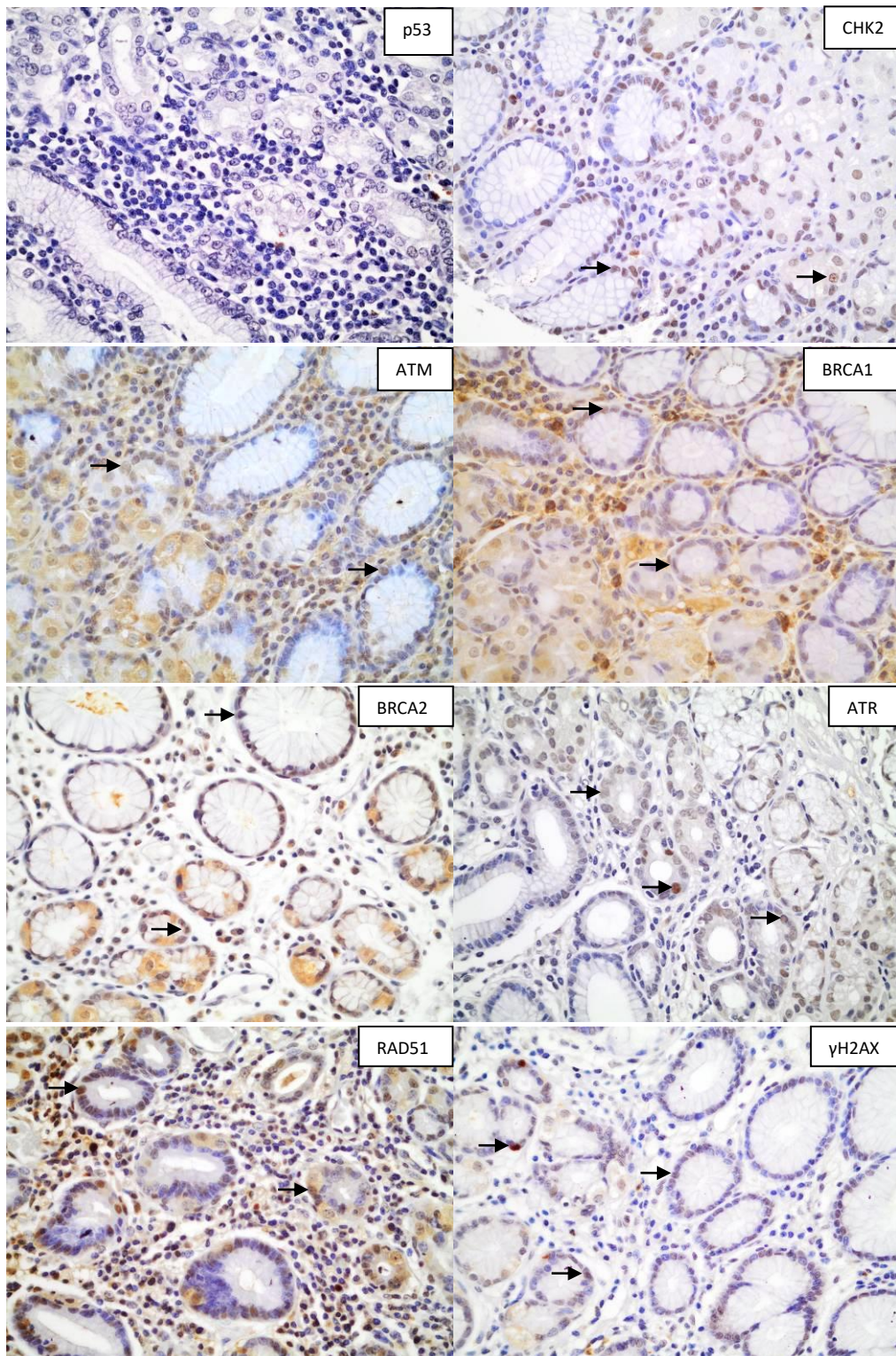
Focos de metaplasia intestinal estavam presentes em 21 das 117 amostras de mucosa não neoplásica. O padrão de marcação na metaplasia foi semelhante ao da mucosa adjacente, para todas as proteínas avaliadas.

Para comparação, fizemos adicionalmente a imuno-histoquímica em cortes de mucosa gástrica normal oriundos de um caso de cirurgia bariátrica, que teve positividade com baixa



expressão para BRCA2, ATR e  $\gamma$ H2AX, e resultados semelhantes às das amostras não tumorais dos pacientes em estudo para os demais marcadores.

**Figura 18.** Imuno-histoquímica na mucosa não neoplásica. As setas indicam marcação nuclear fraca a moderada em células epiteliais. (Aumento de 400X.)



Houve correlação estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre a imunohistoquímica para BRCA2 na mucosa não neoplásica e o tipo de mucosa avaliada, notando-se maior frequência de positividade na mucosa antral (8/10; 80%) que na oxíntica (22/93; 23,66%). Para ATR e  $\gamma$ H2AX, não houve associação com o tipo de mucosa.

Os vários parâmetros clinicopatológicos avaliados, incluindo a presença de gastrite, metaplasia intestinal ou infecção por *Helicobacter pylori*, não tiveram correlação com os resultados da imunohistoquímica na mucosa não neoplásica.

### **5.5 Influência do tratamento neoadjuvante nos achados imunohistoquímicos nos adenocarcinomas**

A terapia neoadjuvante levou a um aumento estatisticamente significativo no número de tumores positivos para RAD51 nuclear – 77,01% (67/87) de positividade nos casos sem tratamento neoadjuvante e 93,75% (30/32) naqueles pós-neoadjuvância ( $p = 0,037$ ).

Os outros marcadores imunohistoquímicos nos tumores não mostraram correlação significativa com o tratamento neoadjuvante.

### **5.6 Correlação dos resultados imunohistoquímicos nos tumores dos vários marcadores entre si**

Foi calculado o coeficiente de correlação  $r$  de postos de Spearman dos valores de *H-score* das amostras tumorais dos vários marcadores imunohistoquímicos entre si (TABELA 11).

Houve fraca correlação positiva ( $r = 0,180$ ,  $p = 0,048$ ) entre a expressão nuclear e a citoplasmática de RAD51 nos tumores. Já entre as respectivas marcações nuclear e citoplasmática de BRCA1, BRCA2 e ATR, não se observou correlação ( $r = -0,007$ ,  $p = 0,941$ ;  $r = -0,060$ ,  $p = 0,515$ ;  $r = 0,006$ ,  $p = 0,945$ ; respectivamente).

As expressões citoplasmáticas dos marcadores BRCA1, BRCA2, ATR e RAD51, que são maiores no tipo histológico intestinal que no difuso, mostraram correlações positivas entre si (TABELA 11).

As mais fortes correlações vistas, todas positivas, foram entre ATM e BRCA1 nuclear ( $r = 0,428$ ,  $p < 0,001$ ), e entre  $\gamma$ H2AX e as proteínas p53 ( $r = 0,407$ ,  $p < 0,001$ ), ATR nuclear ( $r = 0,552$ ,  $p < 0,001$ ) e RAD51 nuclear ( $r = 0,491$ ,  $p < 0,001$ ).

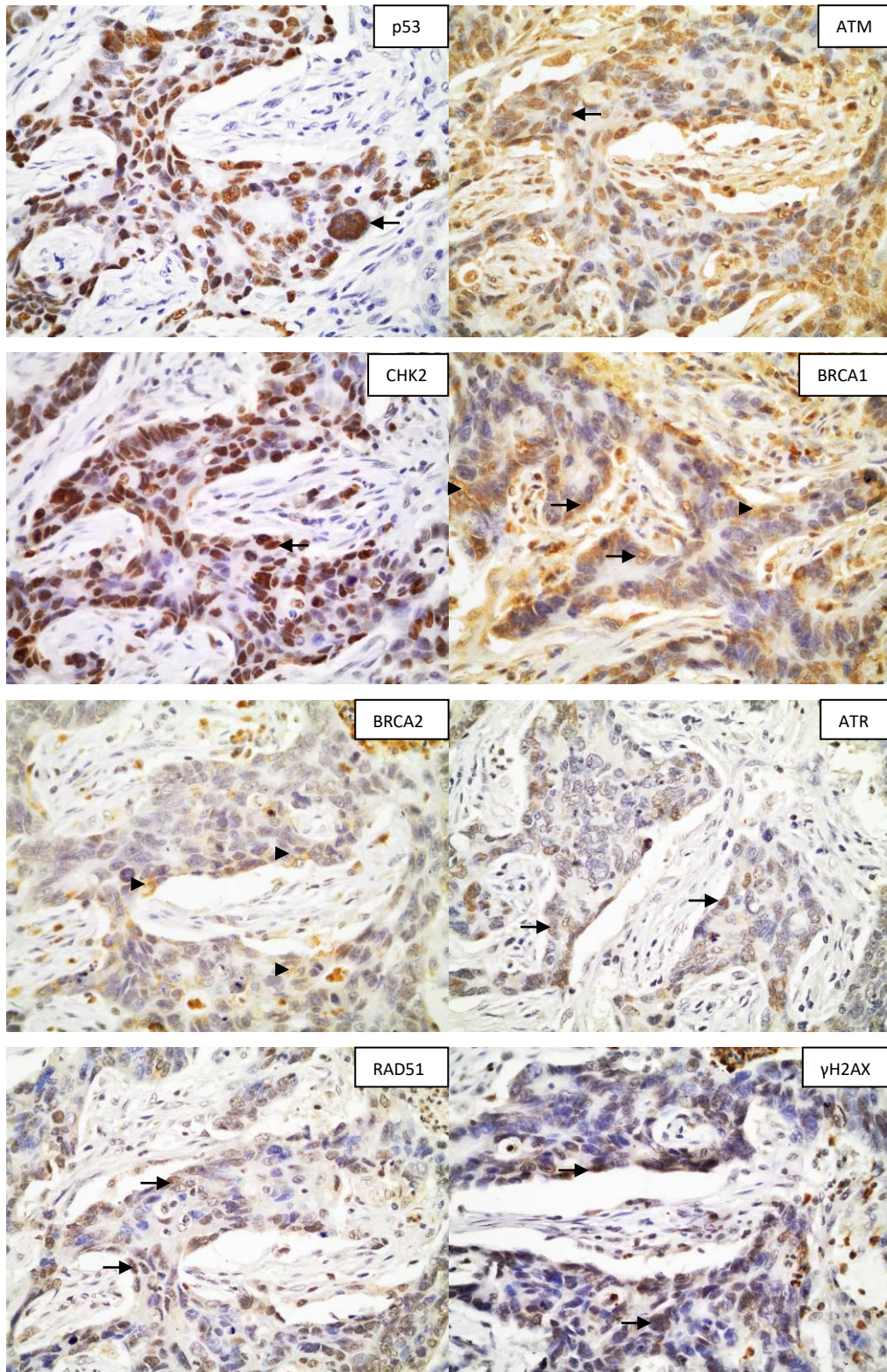
**Tabela 11.** Coeficientes de correlação entre os vários marcadores nas amostras tumorais.

		CHK2	ATM	BRCA1 nuclear	BRCA1 citoplasmático	BRCA2 nuclear	BRCA2 citoplasmático	ATR nuclear	ATR citoplasmático	RAD51 nuclear	RAD51 citoplasmático	$\gamma$ H2AX
p53	r	0,195	-0,029	-0,188	0,096	0,108	0,057	0,300	0,101	0,134	0,141	<b>0,407</b>
	p	<b>0,032</b>	0,753	<b>0,039</b>	0,293	0,238	0,531	<b>0,001</b>	0,272	0,144	0,123	<b>&lt;0,001</b>
CHK2	r		0,120	0,021	0,167	0,165	0,065	0,219	-0,027	0,163	0,106	0,195
	p		0,189	0,820	0,066	0,070	0,482	<b>0,016</b>	0,767	0,073	0,249	<b>0,032</b>
ATM	r			<b>0,428</b>	-0,206	0,126	-0,227	0,102	-0,137	0,332	-0,137	0,253
	p			<b>&lt;0,001</b>	<b>0,023</b>	0,167	<b>0,012</b>	0,265	0,134	<b>&lt;0,001</b>	0,133	<b>0,005</b>
BRCA1 nuclear	r				-0,007	0,133	-0,158	0,055	-0,134	0,255	-0,142	0,136
	p				0,941	0,146	0,083	0,547	0,143	<b>0,005</b>	0,120	0,137
BRCA1 citoplasmático	r					-0,076	0,391	-0,008	0,275	-0,115	0,392	-0,127
	p					0,408	<b>&lt;0,001</b>	0,930	<b>0,002</b>	0,209	<b>&lt;0,001</b>	0,165
BRCA2 nuclear	r						-0,060	0,318	-0,140	0,227	-0,032	0,397
	p						0,515	<b>&lt;0,001</b>	0,127	<b>0,012</b>	0,727	<b>&lt;0,001</b>
BRCA2 citoplasmático	r							0,069	0,321	-0,072	0,308	-0,086
	p							0,451	<b>&lt;0,001</b>	0,434	<b>0,001</b>	0,347
ATR nuclear	r								0,006	0,306	0,114	<b>0,552</b>
	p								0,945	<b>0,001</b>	0,215	<b>&lt;0,001</b>
ATR citoplasmático	r									-0,137	0,307	-0,067
	p									0,135	<b>0,001</b>	0,466
RAD51 nuclear	r										0,180	<b>0,491</b>
	p										<b>0,048</b>	<b>&lt;0,001</b>
RAD51 citoplasmático	r											0,009
	p											0,925



Houve ainda correlações positivas fracas de p53 com CHK2 e com ATR nuclear; de  $\gamma$ H2AX com CHK2, com ATM e com BRCA2 nuclear; e entre ATM e RAD51 nuclear; CHK2 e ATR nuclear; BRCA1 nuclear e RAD51 nuclear; BRCA2 nuclear e ATR nuclear; BRCA2 nuclear e RAD51 nuclear; ATR nuclear e RAD51 nuclear; e correlações fracas negativas de ATM com BRCA1 citoplasmática e com BRCA2 citoplasmática. P53 teve fraca correlação negativa com BRCA1 nuclear e não mostrou correlação com BRCA1 citoplasmática (TABELA 11 e FIGURA 19).

**Figura 19.** Imuno-histoquímica de um mesmo caso para os vários marcadores. (Aumento de 400X.) Este caso teve alta expressão de p53 e ATM; e baixa expressão de CHK2, BRCA1 nuclear e citoplasmático, BRCA2 citoplasmático, ATR nuclear, RAD51 nuclear e  $\gamma$ H2AX; foi negativo para BRCA2 nuclear, ATR citoplasmático e RAD51 citoplasmático. Setas: marcação nuclear. Pontas de seta: marcação citoplasmática.



### 5.7 Correlação da imuno-histoquímica nos adenocarcinomas com o tamanho tumoral

O tamanho médio no maior eixo foi maior, com significância estatística, nos tumores negativos para RAD51 nuclear (7,33 cm nos negativos e 5,61 cm nos positivos,  $p = 0,015$ ) e nos negativos para ATR nuclear (6,63 cm nos negativos e 4,94 cm nos positivos,  $p = 0,002$ ) (TABELA 12).

Embora a positividade de RAD51 fosse mais frequente após o tratamento neoadjuvante, que causa redução tumoral (o tamanho médio foi de 4,61 cm nos casos com neoadjuvância e de 6,39 cm nos demais), observamos que a terapia neoadjuvante ( $p = 0,011$ ) e a positividade de RAD51 ( $p = 0,043$ ) nuclear tiveram influência independente sobre o tamanho tumoral.

Os demais marcadores não mostraram associação com o tamanho tumoral.

**Tabela 12.** Correlação entre achados imuno-histoquímicos nas amostras neoplásicas e tamanho tumoral.

Marcador	Classe	n	Tamanho médio (cm)	d.p.	Mínimo	Máximo	p
ATR nuclear.	Negativo	68	6,63	3,10	2,00	16,50	<b>0,002</b>
	Positivo	49	4,94	2,55	1,20	10,50	
RAD51 nuclear	Negativo	22	7,33	1,96	3,00	10,50	<b>0,015</b>
	Positivo	94	5,61	3,11	1,20	16,50	

### 5.8 Associação entre os marcadores imuno-histoquímicos nos tumores e várias características clinicopatológicas

Foi estudada a relação entre a expressão dos vários marcadores imuno-histoquímicos nas amostras tumorais e o tipo histológico, grau histológico, presença de componente mucinoso, invasão perineural, invasão vascular, profundidade de invasão, presença de metástase linfonodal e de metástase distante, estágio, história familiar de câncer gástrico e presença de *Helicobacter pylori*, gastrite e metaplasia intestinal.

Alta expressão de p53 mostrou-se associada a maior proporção de tumores de tipo intestinal e misto e menor de tumores difusos (TABELA 13). Os demais parâmetros

clinicopatológicos avaliados não tiveram associação estatisticamente significativa com a expressão de p53.

**Tabela 13.** P53 no tumor e tipo histológico.

Tipo histológico	P53 nos adenocarcinomas			<b>p = 0,018</b>
	Negativo	Baixa expressão	Alta expressão	
Difuso	30 (55,56%)	17 (50,00%)	9 (27,27%)	
Intestinal	17 (31,48%)	16 (47,06%)	16 (48,48%)	
Misto	7 (12,96%)	1 (2,94%)	8 (24,24%)	

A expressão de CHK2, a de ATM e a de BRCA1 nuclear não mostraram correlação estatisticamente significativa com as características clinicopatológicas.

Todos os marcadores citoplasmáticos avaliados (BRCA1, BRCA2, ATR e RAD51) tiveram associação estatisticamente significativa com o tipo histológico, notando-se maior proporção de casos intestinais e menor proporção de difusos nos casos com alta expressão de BRCA1 citoplasmático e nos positivos para BRCA2, ATR e RAD51 citoplasmáticos. Em decorrência direta disso, houve também menor proporção de grau histológico 3 dentre esses casos (TABELA 14).

**Tabela 14.** Correlação entre os marcadores citoplasmáticos e tipo e grau histológicos.

BRCA1 citoplasmático	negativo ou baixa expressão (n = 67)	alta expressão (n = 54)	p
Difuso	42 (62,69%)	14 (25,93%)	
Intestinal	15 (22,39%)	34 (62,36%)	< 0,001
Misto	10 (14,93%)	6 (11,11%)	
Grau 3	57 (85,07%)	24 (44,44%)	< 0,001
BRCA2 citoplasmático	negativo (n = 74)	positivo (n = 47)	
Difuso	43 (58,1%)	13 (27,7%)	
Intestinal	21 (28,4%)	28 (59,6%)	0,002
Misto	10 (13,5%)	6 (12,8%)	
Grau 3	58 (78,38%)	23 (48,94%)	< 0,001
ATR citoplasmático	negativo (n = 75)	positivo (n = 45)	
Difuso	43 (57,3%)	12 (26,7%)	
Intestinal	19 (25,3%)	30 (66,7%)	< 0,001
Misto	13 (17,3%)	3 (6,7%)	
Grau 3	59 (78,67%)	21 (46,67%)	< 0,001
RAD51 citoplasmático	negativo (n = 19)	positivo (n = 100)	
Difuso	15 (78,9%)	40 (40%)	
Intestinal	2 (10,5%)	47 (47%)	0,005
Misto	2 (10,5%)	13 (13%)	
Grau 3	17 (89,47%)	62 (62%)	0,020

A positividade de BRCA2 nuclear teve correlação com o tipo histológico difuso (59,1% de tumores difusos e 25% de intestinais, dentre os casos positivos; 39% de difusos e 49,4% de intestinais, dentre os negativos;  $p = 0,031$ ). Os casos positivos mostraram maior proporção de graus histológicos 3 e 1 e menor de grau 2, em comparação com os negativos, na população total (TABELA 12). No entanto, avaliando-se isoladamente os casos de tipo histológico intestinal, há maior proporção de grau 1 e menor proporção de graus 2 e 3 dentre os tumores positivos para BRCA2 nuclear (TABELA 15).



**Tabela 15.** BRCA2 nuclear no tumor e correlação com tipo e grau histológicos.

Variável	BRCA2 nuclear				p
	Negativo (n=77)		Positivo (n=44)		
	n	%	n	%	
Tipo histológico					<b>0,031</b>
Difuso	30	39,0	26	59,1	
Intestinal	38	49,4	11	25,0	
Misto	9	11,7	7	15,9	
Grau histológico					<b>0,003</b>
1	5	6,5	7	15,9	
2	25	32,5	3	6,8	
3	47	61,0	34	77,3	
Grau histológico – apenas no tipo intestinal					<b>0,003</b>
1	5/38	13,16	7/11	63,64	
2	25/38	65,79	3/11	27,27	
3	8/38	21,05	1/11	9,09	

Invasão vascular foi mais frequente nos adenocarcinomas com alta expressão de BRCA2 nuclear (95,45%) do que nos negativos ou com baixa expressão (76,77%,  $p = 0,047$ ). Este padrão manteve-se na análise separada por tipo histológico, embora com perda da significância estatística, devida à redução do número de casos (TABELA 16).

**Tabela 16.** BRCA2 nuclear no tumor e invasão vascular.

Presença de invasão vascular	BRCA2 nuclear		p
	negativo ou positivo com baixa expressão	positivo com alta expressão	
População total	76,77% (76/99)	95,45% (21/22)	<b>0,047</b>
- Tipo difuso	85,71% (36/42)	92,86% (13/14)	0,484
- Tipo intestinal	65,91% (29/44)	100% (5/5)	0,117
- Tipo misto	84,62% (11/13)	100% (3/3)	0,468

ATR nuclear teve correlação estatisticamente significativa com o grau histológico. A quantidade de casos de grau 3 foi semelhante para os casos positivos e negativos, mas houve maior proporção de casos de grau 2 entre os negativos e de grau 1 entre os positivos; isso se mantém, como esperado, na avaliação isolada do tipo intestinal (TABELA 17).

**Tabela 17.** ATR nuclear no tumor e correlação com parâmetros patológicos.

Variável	ATR nuclear				p
	Negativo (n=71)		Positivo (n=49)		
	n	%	n	%	
Tipo histológico					0,953
Difuso	32	45,1	23	46,9	
Intestinal	29	40,8	20	40,8	
Misto	10	14,1	6	12,2	
Grau histológico					0,013
1	3	4,2	9	18,4	
2	21	29,6	7	14,3	
3	47	66,2	33	67,3	
Grau histológico, apenas no tipo intestinal					0,013
1	3/29	10,3	9/20	45	
2	21/29	72,4	7/20	35	
3	5/29	17,2	4/20	20	

Os tumores negativos para RAD51 nuclear apresentaram maior frequência de invasão vascular (95,5% contra 76,3% dos positivos,  $p = 0,044$ ) e de metástase em linfonodos regionais (95,5% contra 61,9% dos positivos,  $p = 0,002$ ) (TABELA 18).

Dada a influência da terapia neoadjuvante sobre a expressão de RAD51 nuclear, fizemos também a avaliação com exclusão dos casos com neoadjuvância, com resultados semelhantes (TABELA 18).

**Tabela 18.** RAD51 nuclear no tumor e correlação com parâmetros patológicos.

Variável	RAD51 nuclear na população total				p
	Negativo (n=22)		Positivo (n=97)		
	n	%	n	%	
Invasão vascular	21	95,5	74	76,3	<b>0,044</b>
Metástase linfonodal	21	95,5	60	61,9	<b>0,002</b>
Variável	RAD51 nuclear nos casos sem neoadjuvância				p
	Negativo (n=20)		Positivo (n=67)		
	n	%	n	%	
Invasão vascular	19	95	54	80,6	<b>0,124</b>
Metástase linfonodal	19	95	43	64,2	<b>0,008</b>

Em comparação com os tumores negativos para  $\gamma$ H2AX, os positivos tiveram maior proporção de casos com grau histológico 3 e 1 e menor proporção de grau 2 (TABELA 19). A maior proporção de grau 3 dentre os positivos reflete a maior ocorrência do tipo histológico difuso entre eles, que, no entanto, não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,089$ ). Analisando separadamente os casos de tipo histológico intestinal, vemos que há dentre os casos positivos para  $\gamma$ H2AX há maior proporção de grau histológico 1 e menor proporção de graus 2 e 3 (TABELA 19).

Tabelas extensas de correlação dos marcadores com os parâmetros clinicopatológicos são mostradas nos Apêndices.

**Tabela 19.**  $\gamma$ H2AX no tumor e correlação com parâmetros patológicos.

Variável	$\gamma$ H2AX				p
	Negativo (n=57)		Positivo (n=64)		
	n	%	n	%	
Tipo histológico					0,089
Difuso	22	38,6	34	53,1	
Intestinal	29	50,9	20	31,3	
Misto	6	10,5	10	15,6	
Grau histológico					<b>0,021</b>
1	3	5,3	9	14,1	
2	19	33,3	9	14,1	
3	35	61,4	46	71,9	
Grau histológico, apenas no tipo intestinal					<b>0,019</b>
1	3/29	10,3	9/20	45	
2	19/29	65,6	9/20	45	
3	7/29	24,1	2/20	10	



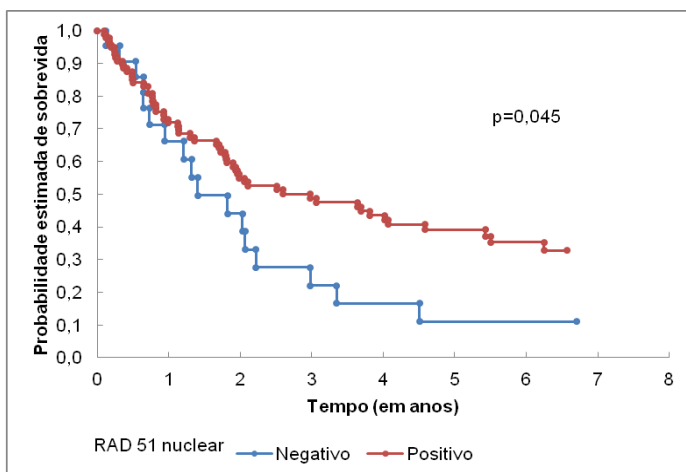
### 5.9 Correlação entre imuno-histoquímica e sobrevida, análise univariada

De todos os marcadores avaliados, nos tumores e na mucosa não tumoral, apenas RAD51 nuclear nos adenocarcinomas mostrou correlação estatisticamente significativa com a sobrevida, na análise univariada (APÊNDICES A4 e A5).

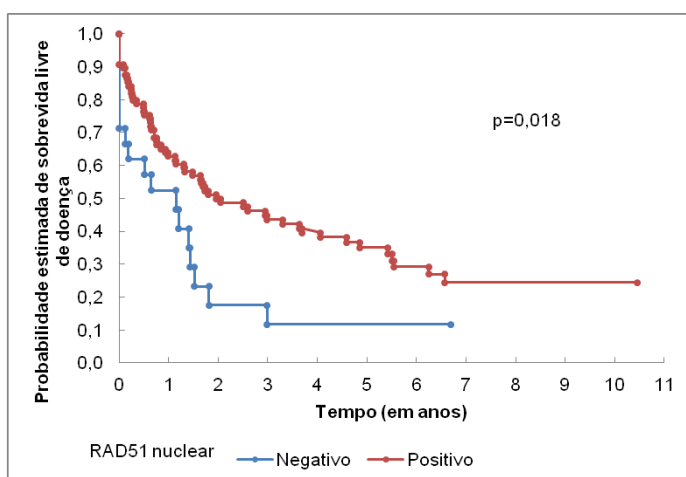
A sobrevida global média após a cirurgia foi maior para os pacientes cujos tumores eram positivos para RAD51 nuclear, sendo de 1073 dias para estes e de 684 dias para aqueles com tumores negativos. A *hazard ratio* de morte do grupo positivo foi de 0,576 ( $p = 0,048$ ) em relação ao negativo. A sobrevida livre de doença também foi maior para os tumores positivos para RAD51 nuclear (HR = 0,531,  $p = 0,022$ ). A curva de Kaplan-Meier (FIGURA 20) mostrou resultados semelhantes em relação à sobrevida global (teste de log-rank:  $p = 0,045$ ) e à sobrevida livre de doença (teste de log-rank:  $p = 0,018$ ).

Para avaliar a possível influência da expressão das proteínas na resposta à quimioterapia ou radioterapia, analisamos separadamente a sobrevida global e a livre de doença dos pacientes que não foram submetidos a nenhum tratamento além da cirurgia e daqueles que passaram por tratamento adjuvante ou neoadjuvante (TABELAS 20 e 21 e FIGURAS 21 e 22).

**Figura 20.** Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global e da sobrevida livre de doença, comparando os pacientes com tumores positivos e negativos para RAD51 nuclear, com valores de p calculados pelo teste *log-rank*.



Tempo (em anos)	Probabilidade estimada de sobrevida	
	RAD51n Negativo	RAD51n Positivo
0	1,000	1,000
1	0,662	0,719
2	0,441	0,549
3	0,221	0,488
4	0,166	0,435
5	0,110	0,392
7	0,110	0,300
10	-	0,300



Tempo (em anos)	Probabilidade estimada de sobrevida livre de doença	
	RAD51n Negativo	RAD51n Positivo
0	1,000	1,000
1	0,524	0,616
2	0,116	0,487
3	0,116	0,436
4	0,116	0,396
5	0,116	0,350
7	0,116	0,245
10	-	0,245

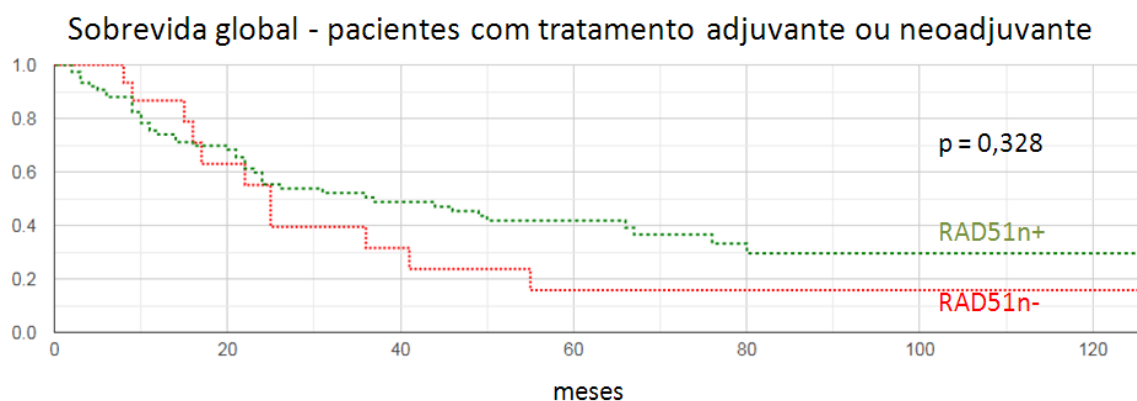
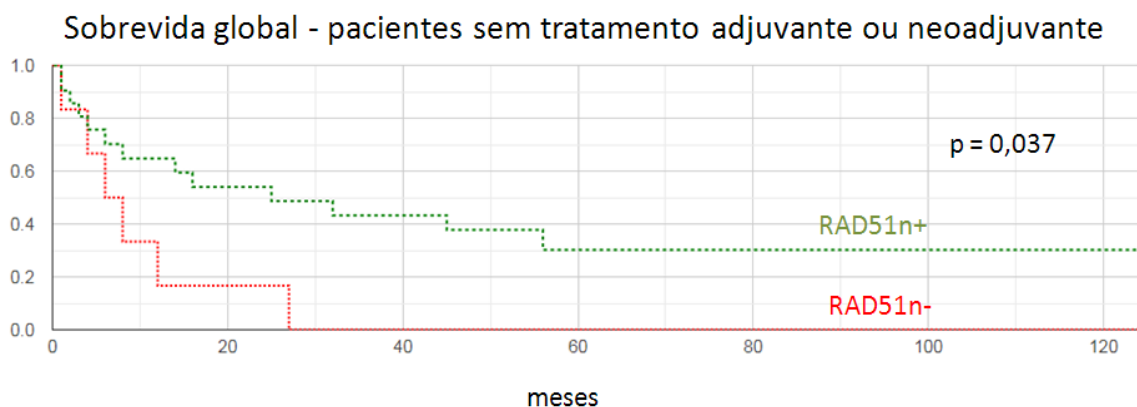
Nos pacientes sem tratamento adjuvante ou neoadjuvante, manteve-se a maior sobrevida global estatisticamente significativa associada à positividade de RAD51 nuclear, aparentemente de maneira mais acentuada que na população total, i.e., com *hazard ratio* de morte de 0,345 ( $p = 0,044$ ), embora a diferença entre os *hazard ratios*, observável pelos intervalos de confiança, não tenha sido estatisticamente significativa. Já nos pacientes com tratamento adjuvante ou neoadjuvante, não foi estatisticamente significativo o aumento de sobrevida associado à positividade de RAD51 nuclear ( $HR = 0,718$ ,  $p = 0,327$ ). O padrão observado na análise da sobrevida livre de doença é semelhante; porém, em ambas as subpopulações (com e sem tratamento), perde-se a significância estatística vista na população total (TABELA 21 e FIGURA 22).

**Tabela 20.** RAD51 nuclear no tumor e sobrevida global. É mostrada a *hazard ratio* dos casos positivos em relação aos negativos. RAD51n+: RAD51 nuclear positivo. RAD51n-: RAD51 nuclear negativo. I.C.: intervalo de confiança.

Sobrevida global após a cirurgia	RAD51n- sobrevida média em dias (número de pacientes)	RAD51n+ sobrevida média em dias (número de pacientes)	<i>Hazard ratio</i>	I.C. de 95%	p
Pacientes sem tratamento adjuvante ou neoadjuvante	121 (n = 6)	982 (n = 21)	0,345	0,123-0,972	<b>0,044</b>
Pacientes com tratamento adjuvante ou neoadjuvante	831 (n = 16)	1098 (n = 76)	0,718	0,370-1,393	0,327
- Pacientes com tratamento neoadjuvante	1479 (n = 2)*	1123 (n = 30)	-*	-*	-*
- Pacientes com tratamento adjuvante	739 (n = 14)	1082 (n = 46)	0,745	0,343-1,616	0,416
População total	684 (n = 22)	1073 (n = 97)	0,576	0,334-0,995	<b>0,048</b>

\* Como há apenas dois casos negativos neste grupo, não é possível um resultado fiável.

**Figura 21.** Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global, nos grupos sem e com tratamento adjuvante ou neoadjuvante, comparando os pacientes com tumores positivos e negativos para RAD51 nuclear (RAD51n), com valores de p calculados pelo teste *log-rank*.



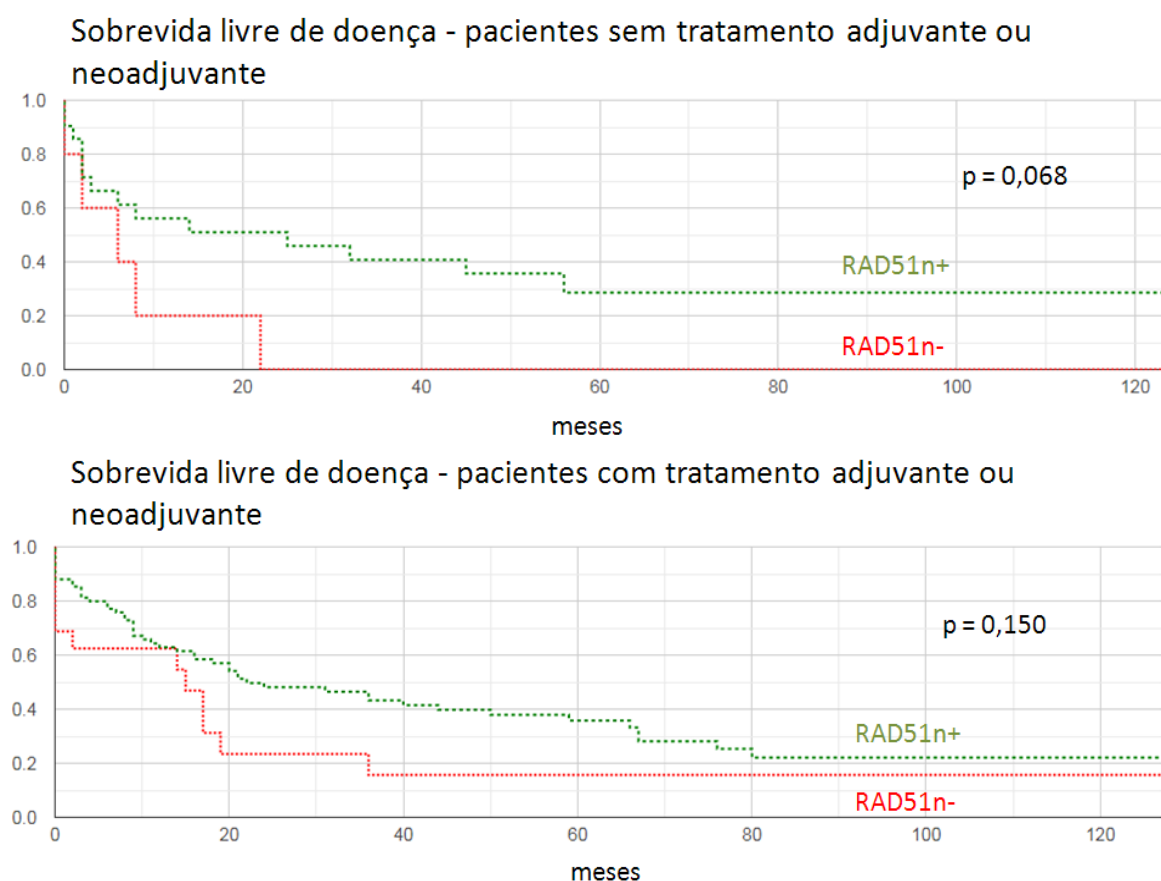
**Tabela 21.** RAD51 nuclear no tumor e sobrevida livre de doença. É mostrada a *hazard ratio* dos casos positivos em relação aos negativos. RAD51n+: RAD51 nuclear positivo. RAD51n-: RAD51 nuclear negativo. I.C.: intervalo de confiança.

Sobrevida livre de doença	RAD51n- sobrevida média em dias (número de pacientes)	RAD51n+ sobrevida média em dias (número de pacientes)	<i>Hazard ratio</i>	I.C. de 95%	p
Pacientes sem tratamento adjuvante ou neoadjuvante	226 (n = 5)	949 (n = 21)	0,332	0,110-1,005	0,051
Pacientes com tratamento adjuvante ou neoadjuvante	549 (n = 16)	959 (n = 75)	0,616	0,327-1,171	0,141
- Pacientes com tratamento neoadjuvante	1479 (n = 2)*	1034 (n = 30)	-*	-*	-*
- Pacientes com tratamento adjuvante	416 (n = 14)	909 (n = 45)	0,581	0,261-1,294	0,113
População total	472 (n = 21**)	957 (n = 96**)	0,531	0,308-0,914	0,022

\* Como há apenas dois casos negativos neste grupo, não é possível um resultado fiável.

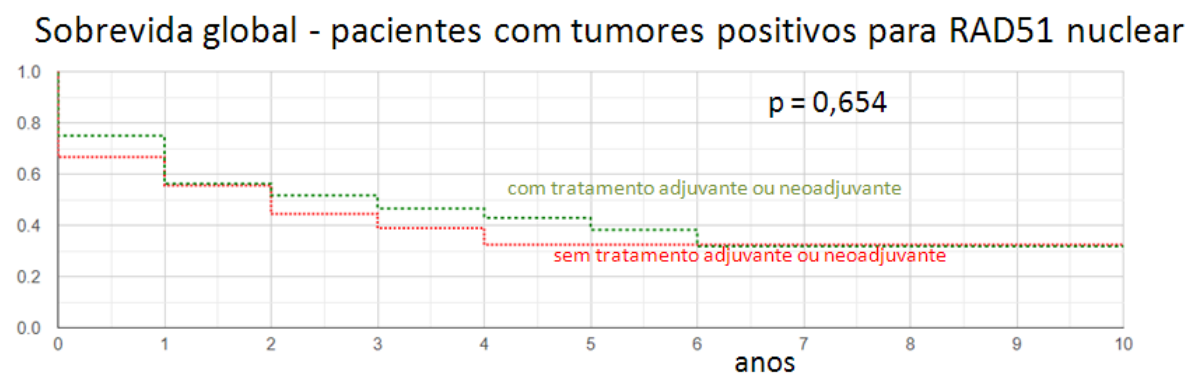
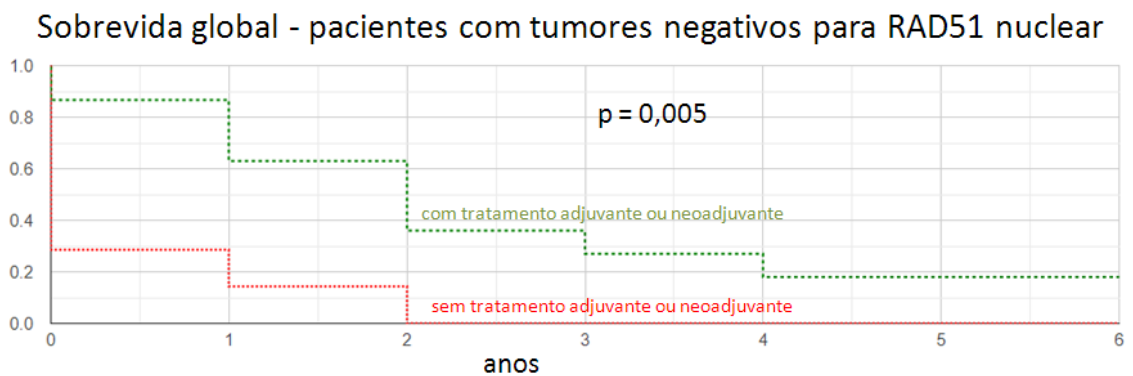
\*\*A sobrevida livre de doença era desconhecida em dois casos, que foram desconsiderados, por isso o número total é menor que o do cálculo da sobrevida global.

**Figura 22.** Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida livre de doença, nos grupos sem e com tratamento adjuvante ou neoadjuvante, comparando os pacientes com tumores positivos e negativos para RAD51 nuclear (RAD51n), com valores de p calculados pelo teste *log-rank*.



Por outro lado, fizemos também a avaliação da associação entre tipo de tratamento e sobrevida nos grupos de pacientes separados de acordo com o resultado de RAD51 nuclear. No grupo de pacientes com tumor negativo para RAD51 nuclear, o tratamento adjuvante ou neoadjuvante (HR: 0,260, intervalo de confiança: 0,078-0,872,  $p = 0,004$ ) ou exclusivamente adjuvante (HR: 0,280, I.C.: 0,087-0,903,  $p = 0,008$ ) foi associado a maior sobrevida global em relação ao tratamento exclusivamente cirúrgico (TABELA 22 e FIGURA 23), o que não ocorreu no grupo com tumor positivo para RAD51 nuclear (adjuvante ou neoadjuvante: HR: 0,739, I.C.: 0,384-1,423,  $p = 0,322$ ; adjuvante: HR: 0,900, I.C.: 0,472-1,714,  $p = 0,742$ ). Para o tratamento adjuvante isoladamente, os resultados não foram estatisticamente significativos em nenhum dos dois grupos (TABELA 22). É importante considerar que, no grupo negativo para RAD51 nuclear, apenas dois pacientes tinham tratamento neoadjuvante.

**Figura 23.** Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global, nos grupos com tumor negativo e positivo para RAD51 nuclear, comparando os pacientes com e sem tratamento adjuvante ou neoadjuvante, com valores de  $p$  calculados pelo teste *log-rank*.



**Tabela 22.** Análise da associação entre tipo de tratamento e sobrevida global e livre de doença, separadamente nos grupos de pacientes com tumor negativo e positivo para RAD51 nuclear (RAD51n). Valores de *hazard ratio* em relação ao tratamento apenas cirúrgico.

		Sobrevida global			Sobrevida livre de doença		
		<i>Hazard ratio</i>	I.C. de 95%	p	<i>Hazard ratio</i>	I.C. de 95%	p
RAD51n negativo	Tratamento adjuvante ou neoadjuvante n = 16	0,260	0,078-0,872	0,004	0,427	0,097-1,887	0,152
	Tratamento adjuvante n = 14	0,280	0,087-0,903	0,008	0,485	0,116-2,034	0,238
	Tratamento neoadjuvante n = 2*	_*	_*	_*	_*	_*	_*
	Tratamento apenas cirúrgico n = 6	1	-	-	1	-	-
RAD51n positivo	Tratamento adjuvante ou neoadjuvante n = 76	0,739	0,384-1,423	0,322	0,890	0,458-1,730	0,722
	Tratamento adjuvante n = 46	0,900	0,472-1,714	0,742	1,103	0,568-2,142	0,777
	Tratamento neoadjuvante n = 30	0,567	0,255-1,261	0,142	0,706	0,320-1,561	0,375
	Tratamento apenas cirúrgico n = 21	1	-	-	1	-	-

\* Como há apenas dois casos negativos neste grupo, não é possível um resultado fiável.

Na análise separada por tipo de tratamento, achados semelhantes aos de RAD51 nuclear são vistos com ATM, porém não são significativos estatisticamente (TABELA 23). A *hazard ratio* de morte dos casos positivos, no grupo de pacientes sem tratamento adjuvante ou neoadjuvante, mostra aparentemente menor valor que o da população total ou dos pacientes tratados, e é próxima da significância estatística ( $p = 0,066$ ).

**Tabela 23.** ATM no tumor e sobrevida global e livre de doença.

ATM e sobrevida global	<i>Hazard ratio</i> de morte (positivos em relação aos negativos)	Intervalo de confiança	p
População total	0,691	0,300-1,594	0,386
Pacientes sem tratamento adjuvante ou neoadjuvante	0,222	0,044-1,107	0,066
Pacientes com tratamento adjuvante ou neoadjuvante	0,939	0,339-2,602	0,904
ATM e sobrevida livre de doença	<i>Hazard ratio</i> de morte ou recidiva (positivos em relação aos negativos)	Intervalo de confiança	p
População total	0,531	0,230-1,226	0,138
Pacientes sem tratamento adjuvante ou neoadjuvante	0,339	0,070-1,641	0,179
Pacientes com tratamento adjuvante ou neoadjuvante	0,672	0,242-1,861	0,444

A expressão de  $\gamma$ H2AX nos adenocarcinomas não teve correlação estatisticamente significativa com a sobrevida – a *hazard ratio* de morte dos tumores positivos em relação aos negativos foi de 1,310 na população total ( $p = 0,244$ ), de 1,108 no grupo de pacientes sem tratamento adjuvante ou neoadjuvante ( $p = 0,824$ ), e de 1,396 no grupo com tratamento ( $p = 0,216$ ).

Por haver correlação positiva entre a expressão de RAD51 nuclear e  $\gamma$ H2AX, e pelo fato de este marcador ser indicativo de lesão do DNA, avaliamos a relação da sobrevida com os resultados destes marcadores em conjunto (TABELA 24). A sobrevida global média foi maior nos casos de tumores positivos para RAD51 nuclear e negativos para  $\gamma$ H2AX (1295 dias, HR = 0,425), seguidos dos positivos para ambas as proteínas (930 dias, HR = 0,739), dos negativos para ambas (733 dias, HR = 1) e dos negativos para RAD51 nuclear e positivos

para  $\gamma$ H2AX (376 dias, HR = 1,367, este grupo tinha apenas 3 casos); porém só houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos RAD51-/ $\gamma$ H2AX- e RAD51+/ $\gamma$ H2AX- ( $p = 0,014$ ). Tanto no grupo sem tratamento adjuvante ou neoadjuvante quanto no grupo com algum desses tratamentos, os resultados foram semelhantes aos da população total.

**Tabela 24.** Análise da sobrevida global considerando-se conjuntamente RAD51 nuclear (RAD51n) e  $\gamma$ H2AX nos tumores. +: positividade imuno-histoquímica. -: negatividade imuno-histoquímica.

Sobrevida global média após a cirurgia (em dias)	RAD51n-/ $\gamma$ H2AX+ sobrevida média em dias (número de pacientes)	RAD51n-/ $\gamma$ H2AX- sobrevida média em dias (número de pacientes)	RAD51n+/ $\gamma$ H2AX+ sobrevida média em dias (número de pacientes)	RAD51n+/ $\gamma$ H2AX- sobrevida média em dias (número de pacientes)
Pacientes sem tratamento adjuvante ou neoadjuvante	115 (n = 1)	327 (n = 5)	812 (n = 13)	1259 (n = 8)
Pacientes com tratamento adjuvante ou neoadjuvante	506 (n = 2)	878 (n = 14)	963 (n = 46)	1305 (n = 30)
População total	376 (n = 3)	733 (n = 19)	930 (n = 59)	1295 (n = 38)
<i>Hazard ratio</i> de morte (população total) em relação ao grupo negativo para ambos os marcadores (intervalo de confiança de 95%)	1,367 (0,311-6,006) $p = 0,679$	1,000	0,739 (0,406-1,348) $p = 0,324$	0,425 (0,215-0,839) $p = 0,014$

Por causa da correlação entre BRCA2 nuclear e tipo histológico, avaliamos a sobrevida relacionada a este marcador também separadamente por tipo histológico (TABELA 25). Não houve resultados estatisticamente significativos.

**Tabela 25.** BRCA2 nuclear no tumor e sobrevida global.

BRCA2 nuclear e sobrevida global	<i>Hazard ratio</i> de morte (positivo em relação ao negativo)	Intervalo de confiança de 95%	p
População total	1,401	0,877-2,237	0,159
Tipo difuso	1,600	0,821-3,116	0,149
Tipo intestinal	1,691	0,650-4,337	0,204
Tipo misto	0,374	0,108-1,294	0,138
Pacientes sem tratamento adjuvante ou neoadjuvante	1,323	0,499-3,505	0,574
Pacientes com tratamento	1,482	0,866-2,536	0,152



### 5.10 Análise multivariada da sobrevida

Na análise multivariada da sobrevida global pelo modelo de Cox, mostraram-se associadas à sobrevida global: estágio, tratamento neoadjuvante e BRCA2 nuclear (TABELA 26).

Nessa análise foram consideradas as variáveis: tipo de gastrectomia, tamanho tumoral, tipo histológico, localização tumoral, invasão vascular, estágio, tratamento, infecção por *Helicobacter pylori*, BRCA2 nuclear no tumor e RAD51 nuclear no tumor.

Os pacientes com estágio III ou IV apresentaram chance de óbito em 10 anos 2,7 vezes maior do que a dos pacientes com estágio I ou II.

Os pacientes sem tratamento neoadjuvante apresentaram chance de óbito em 10 anos 2 vezes maior do que a dos pacientes com tratamento neoadjuvante.

Os pacientes com BRCA2 nuclear positivo no tumor apresentaram chance de óbito em 10 anos 1,8 vezes maior do que a dos pacientes com BRCA2 nuclear negativo.

**Tabela 26.** Análise multivariada da sobrevida global. São mostrados valores de *hazard ratio* de morte com intervalos de confiança de 95% e valores de p.

Sobrevida global	Análise multivariada, etapa inicial	Análise multivariada, etapa final
<i>Hazard ratio</i> de morte (intervalo de confiança) p		
Positividade de BRCA2 nuclear no tumor	1,761 (0,994-3,121) 0,053	<b>1,764 (1,088-2,860) 0,021</b>
Tratamento neoadjuvante	0,482 (0,244-0,951) 0,035	<b>0,483 (0,266-0,875) 0,017</b>
Estádio (III-IV vs. I-II)	1,688 (0,937-3,041) 0,081	<b>2,663 (1,604-4,421) &lt;0,001</b>
Gastrectomia total vs. subtotal	1,996 (0,869-4,589) 0,104	-
Positividade de RAD51 nuclear no tumor	0,695 (0,374-1,294) 0,251	-
Cárdia vs. antro-piloro	1,084 (0,336-3,496) 0,893	-
Corpo-fundo vs. antro-piloro	0,679 (0,262-1,761) 0,426	-
Mais de uma região vs. antro-piloro	0,613 (0,255-1,474) 0,274	-
Tamanho (por aumento de cm)	1,036 (0,948-1,132) 0,436	-
Tipo difuso vs. intestinal	1,288 (0,742-2,238) 0,368	-
Tipo misto vs. intestinal	1,061 (0,467-2,409) 0,888	-
Invasão vascular	2,235 (0,912-5,480) 0,079	-
Infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	0,644 (0,384-1,079) 0,095	-

Na análise multivariada da sobrevida livre de doença pelo modelo de Cox, mostraram-se associadas à sobrevida global: tipo de gastrectomia, estágio, tratamento neoadjuvante e ATM (TABELA 27).

Nessa análise foram consideradas as variáveis: tipo de gastrectomia, tamanho tumoral, localização tumoral, invasão perineural, invasão vascular, estágio, tratamento, ATM nuclear no tumor e RAD51 nuclear no tumor.

Os pacientes com gastrectomia total apresentaram chance de óbito/recidiva em 10 anos 1,7 vezes maior do que a dos pacientes com gastrectomia subtotal.

Os pacientes com estágio III ou IV apresentaram chance de óbito/recidiva em 10 anos 3 vezes maior do que a dos pacientes com estágio I ou II.

Os pacientes sem tratamento neoadjuvante apresentaram chance de óbito/recidiva em 10 anos 2,5 vezes maior do que a dos pacientes com tratamento.

Os pacientes com ATM negativo apresentaram chance de óbito/recidiva em 10 anos 2,5 vezes maior do que a dos pacientes com ATM positivo.

**Tabela 27.** Análise multivariada da sobrevida livre de doença. São mostrados valores de *hazard ratio* de morte ou recidiva com intervalos de confiança de 95% e valores de p.

Sobrevida livre de doença	Análise multivariada, etapa inicial		Análise multivariada, etapa final
<i>Hazard ratio</i> de morte ou recidiva (intervalo de confiança) p			
Positividade de ATM no tumor	0,430 (0,158-1,171)	0,099	<b>0,358 (0,151-0,851) 0,020</b>
Tratamento neoadjuvante	0,443 (0,236-0,833)	0,011	<b>0,447 (0,253-0,789) 0,006</b>
Estádio (III-IV vs. I-II)	2,292 (1,238-4,241)	0,008	<b>3,063 (1,844-5,087) &lt;0,001</b>
Gastrectomia total vs. subtotal	2,089 (0,945-4,616)	0,069	<b>1,749 (1,083-2,827) 0,022</b>
Positividade de RAD51 nuclear no tumor	0,803 (0,446-1,446)	0,465	-
Cárdia vs. antro-piloro	1,021 (0,325-3,208)	0,972	-
Corpo-fundo vs. antro-piloro	0,806 (0,316-2,067)	0,652	-
Mais de uma região vs. antro-piloro	0,654 (0,287-1,492)	0,313	-
Tamanho (por aumento de cm)	1,031 (0,951-1,118)	0,458	-
Invasão perineural	1,156 (0,695-1,923)	0,578	-
Invasão vascular	1,476 (0,677-3,215)	0,328	-

**DISCUSSÃO**

---

## 6. Discussão

As características gerais da população do presente estudo, como a idade (63,1 anos de média) e o predomínio do sexo masculino (2,36M:1F), são similares aos dados epidemiológicos de adenocarcinoma gástrico da literatura (LAUWERS et al., 2010; RODER, 2002).

O predomínio do padrão histológico difuso que observamos (46,3% dos casos, contra 40,5% de tipo intestinal e 13,2% de tipo misto) é típico de regiões com baixa incidência de câncer gástrico, como Estados Unidos e Europa Ocidental, enquanto, em locais de alta incidência, como o Leste Asiático, predomina o tipo intestinal (FENOGLIO-PREISER et al., 2003; LAUWERS et al., 2010). Estudos brasileiros mostram ampla variação das proporções de tipos histológicos. Na casuística de Lemes et al. (2002), de Belo Horizonte, 33% dos casos eram difusos, e 54%, intestinais. Na de Abib et al. (1997), do Rio de Janeiro, 71% eram difusos. Nosso achado é, portanto, intermediário em relação aos desses trabalhos, mas já típico de uma região não endêmica de câncer gástrico.

A distribuição de localizações do tumor vista, com predomínio da região antral/pilórica (51,2%), é também a habitual de acordo com a literatura internacional (LAUWERS et al., 2010), principalmente em regiões de alta incidência (CARNEIRO et al., 2019) e semelhante à proporção de 62,8% observada por Moreno et al. (2005), na Santa Casa de São Paulo.

Tiveram influência negativa na sobrevida global ou na livre de doença o maior tamanho tumoral, o tipo histológico difuso, a invasão vascular linfática ou sanguínea, a invasão perineural, a maior profundidade de invasão, a presença metástase linfonodal regional, a presença de metástase distante, o maior estágio e a localização cárdica. Isso confirma o conhecimento prévio sobre fatores prognósticos (CARNEIRO et al., 2019; LAUWERS et al., 2010; ROSAI, 2011).

O padrão de marcação imuno-histoquímica visto, nuclear ou citoplasmático, é compatível com a localização celular já conhecida das oito proteínas avaliadas em vários tecidos – nucleoplasma para p53 e ATM; nucleoplasma e grânulos intercromatínicos para  $\gamma$ H2AX; principalmente nucleoplasma e adicionalmente complexo de Golgi para CHK2 (que se mostrou exclusivamente nuclear) e ATR (que apresentou ambas as marcações); nucleolar, mitocondrial e citosólica para RAD51; nuclear e citoplasmática para BRCA1 e BRCA2 (THE HUMAN PROTEIN ATLAS, 2019). Além disso, estudos prévios específicos de adenocarcinoma gástrico descrevem como nuclear a marcação de ATM (ZHANG et al., 2013;

LEE et al., 2014; KIM et al., 2014), CHK2 (LEE et al., 2014), p53 (FENOGLIO-PREISER et al., 2003) e  $\gamma$ H2AX (SENTANI et al., 2008).

Na mucosa não neoplásica, não houve marcação para p53 e, para todos os demais marcadores avaliados, ela foi exclusiva ou preponderantemente nuclear, sendo a citoplasmática mais fraca e possivelmente inespecífica. Já era descrita a positividade imunohistoquímica da mucosa gástrica não neoplásica para ATM (KANG et al., 2008) e CHK2 (SHIGEISHI et al., 2002).

Há grande controvérsia na literatura sobre a localização celular de BRCA1 na mucosa e nos adenocarcinomas gástricos. Assim como Wang et al. (2018), observamos dois tipos de marcação – nuclear e citoplasmática – para a proteína nos tumores. Contudo, ela é apenas nuclear segundo outros autores (KIM et al., 2013; ZHANG et al., 2013; ZHANG et al., 2018) e, de acordo com Chen et al. (2013), é citoplasmática no tumor e nuclear na mucosa normal.

A correlação que observamos entre a alta expressão citoplasmática de BRCA1 e menor grau histológico (1 ou 2), que na verdade decorre da maior proporção do tipo histológico intestinal e menor proporção do tipo difuso dentre esses casos, é semelhante a achados de Wang et al. (2018) e de Chen et al. (2013). Também os demais marcadores citoplasmáticos avaliados por nós (BRCA2, ATR e RAD51) mostraram-se associados ao tipo intestinal, o que possivelmente reflete uma tendência geral de maior acúmulo de proteínas no citoplasma nesse tipo histológico, talvez relacionada ao fato de o citoplasma ser em geral mais volumoso nesses tumores e escasso nos difusos.

Já com relação à expressão nuclear de BRCA1, que não mostrou correlação com características clinicopatológicas, divergimos tanto daqueles que associam várias características de pior prognóstico à ausência de BRCA1 nuclear (KIM et al., 2013; ZHANG et al., 2013) quanto dos que, em contrário, as associam à sua presença (WANG et al., 2018).

Essas divergências de resultados provavelmente se devem a diferenças de sensibilidade e especificidade dos anticorpos e métodos usados. Observamos total ausência de marcação nuclear para BRCA1 em 10% dos adenocarcinomas, enquanto a proporção descrita por Zhang et al. (2013) é de 21,4%.

Também é controversa a localização celular de BRCA2; segundo Zhang et al. (2018), a marcação imunohistoquímica é nuclear e citoplasmática, e, segundo Wang et al. (2018), exclusivamente citoplasmática. Assim como para BRCA1, detectamos e avaliamos separadamente ambos os tipos de marcação, nas amostras tumorais.

Graeser et al. (2010) avaliaram com imunofluorescência a formação de focos nucleares de reparo de DNA contendo RAD51 em biópsias de carcinoma mamário obtidas

após tratamento neoadjuvante. No entanto, aparentemente nosso trabalho é o primeiro a comparar a expressão imuno-histoquímica de proteínas relacionadas à recombinação homóloga de pacientes submetidos previamente a tratamento neoadjuvante com a de pacientes não tratados. Observamos maior proporção de adenocarcinomas gástricos positivos para RAD51 nuclear dentre aqueles com tratamento neoadjuvante prévio. Supomos que haja uma reação de defesa da neoplasia à lesão do DNA ocasionada pelo tratamento que leve à expressão de RAD51.

Em concordância com a hipótese geral de que a perda de expressão de uma proteína de reparo do DNA favoreça a progressão tumoral, por causar acúmulo de mutações e aberrações cromossômicas, nossos achados sugerem que a negatividade de RAD51 nuclear, de ATR nuclear ou de ATM se correlacione com tumores mais agressivos. A relação entre BRCA2 nuclear e as características do adenocarcinoma gástrico mostrou-se complexa; no entanto, em geral parece acontecer o contrário, i.e., a expressão ser característica dos adenocarcinomas gástricos mais agressivos.

A negatividade de RAD51 nuclear no adenocarcinoma mostrou-se associada a maior tamanho tumoral (independentemente da influência do tratamento neoadjuvante sobre o tamanho), maior frequência de invasão vascular linfática ou sanguínea e de metástase em linfonodos regionais, e a menor sobrevida global e livre de doença, na análise univariada.

Semelhante associação entre mau prognóstico e baixa expressão imuno-histoquímica de RAD51 já havia sido descrita, para a marcação nuclear, citoplasmática ou total, no glioblastoma (WELSH et al., 2009) e, para a marcação nuclear, no carcinoma mamário (ALSHAREEDA et al., 2016; SÖDERLUND et al., 2007) e no carcinoma pulmonar de não pequenas células (GACHECHILADZE et al., 2017).

Vários estudos há, contudo, que tiveram resultados opostos, encontrando correlação entre RAD51 e características desfavoráveis, como alto grau histológico, metástases linfonodais ou menor sobrevida, no câncer de cólon (TENNSTEDT et al., 2013; LI et al., 2017), no carcinoma de mama (MAACKKE et al., 2000; WIEGMANS et al., 2014), no carcinoma espinocelular esofágico (NAKANOKO et al., 2014), em tumores de cabeça e pescoço (CONNELL et al., 2006), no câncer pulmonar de não pequenas células (QIAO et al., 2005) e no adenocarcinoma prostático (MITRA et al., 2009). Uma possível causa para os achados contrários nesses tumores é o fato de RAD51 estimular a expressão de EBP $\beta$ , fator de transcrição relacionado à transição epitélio-mesenquimal e síntese de metaloproteinases (WIEGMANS et al., 2014), o que pode facilitar a disseminação tumoral. Também existe a hipótese de que o excesso de RAD51 promova instabilidade cromossômica por recombinação

excessiva (WIEGMANS et al., 2014). Os mecanismos que controlam a expressão de RAD51 são pouco conhecidos, sua baixa expressão em alguns carcinomas mamários pode ser resultado da presença do microRNA 155 (miR-155) (GASPARINI et al., 2014). Schmutte et al. (1999) não detectaram mutações nem metilação do *RAD51* em tumores de mama primários nem em metástases cerebrais de diversas neoplasias.

Poucos são os trabalhos em que se avaliaram separadamente a marcação nuclear e a citoplasmática de RAD51. De acordo com Alshareeda et al. (2016), os carcinomas mamários mais agressivos tendem a ser negativos para RAD51 nuclear e positivos para RAD51 citoplasmática. Nossos resultados, porém, indicam que a expressão nuclear e a citoplasmática tendem fracamente a coincidir, embora apenas a primeira tenha tido correlação com prognóstico. Também Welsh et al. (2009) e Söderlund et al. (2007) notaram que a expressão citoplasmática tende a acompanhar a nuclear, respectivamente no glioblastoma e no câncer de mama.

Vários experimentos com culturas de células cancerosas diversas demonstraram que RAD51 promove resistência a agentes que lesam o DNA, incluindo mostardas nitrogenadas, compostos de platina, inibidores da histona desacetilase, inibidores de PARP, inibidores da timidilato sintase, radiação ionizante e mitomicina (GACHECHILADZE et al., 2017). Especificamente em culturas de câncer gástrico, a proteína foi associada a resistência a cisplastina, 5-fluorouracil e doxorubicina (TAN et al., 2020).

Corroborando esses achados *in vitro* prévios, notamos que o tratamento adjuvante (ou o adjuvante e o neoadjuvante avaliados em conjunto) foi associado a aumento da sobrevida global (em relação ao tratamento apenas cirúrgico) apenas para pacientes com tumor negativo para RAD51 nuclear. Isso sugere que a imuno-histoquímica de RAD51 possa ser usada para determinar a necessidade de tratamento adjuvante ou para indicar tipos específicos de terapia, dependendo dos resultados de pesquisas adicionais. Uma das limitações deste estudo é incluir diversos esquemas terapêuticos diferentes, com um pequeno número de pacientes para permitir a análise separada de cada um.

O tratamento neoadjuvante, como o adjuvante, não mostrou efeito estatisticamente significativo de aumento da sobrevida dentre os pacientes com tumor positivo para RAD51 nuclear. Já a avaliação do seu efeito no grupo negativo para o marcador foi impossibilitada pelo reduzido número de casos – apenas dois pacientes com neoadjuvância no grupo. É necessário considerar que o resultado imuno-histoquímico de RAD51 nuclear dos pacientes com terapia neoadjuvante estava presumivelmente sob influência da exposição prévia ao

tratamento e provavelmente não corresponde ao que seria observado em biópsias pré-tratamento, em que esperaríamos maior proporção de casos negativos.

Uma análise inversa, separando a população total pelo tipo de tratamento, também forneceu um indício, indireto, da quimiorradiorresistência causada por RAD51: a ausência de correlação estatisticamente significativa entre RAD51 nuclear e sobrevida global no grupo de pacientes submetidos a tratamento adjuvante ou neoadjuvante, em contraste com a significativa associação entre a expressão nuclear da proteína e maior sobrevida global observada nos pacientes tratados exclusivamente com cirurgia. Embora a diferença de *hazard ratio* entre os dois grupos não seja significativa estatisticamente, os dados sugerem que a susceptibilidade ao tratamento dos tumores negativos para RAD51 nuclear atenua ou até anula a redução de sobrevida normalmente associada à perda de expressão.

Os resultados de Gachechiladze et al. (2017), no carcinoma pulmonar de não pequenas células, são muito semelhantes – observaram pior prognóstico relacionado à ausência de RAD51 nuclear apenas no grupo de pacientes tratados exclusivamente com cirurgia.

Num recente trabalho, Tan et al. (2020) analisaram a expressão imuno-histoquímica de RAD51 em 52 casos de adenocarcinoma gástrico e não detectaram associação com sobrevida na população total, mas observaram pior prognóstico dos pacientes com tumores positivos para RAD51 dentre aqueles tratados com 5-fluorouracil. Esse achado, no sentido de ser também sugestivo de resistência ao tratamento ocasionada pela RAD51, corrobora os nossos.

Ademais, note-se que a maior sobrevida associada à positividade de RAD51 que demonstramos não é atribuível à correlação entre RAD51 e neoadjuvância, já que é vista também no grupo de pacientes sem tratamento.

A análise conjunta da expressão de RAD51 nuclear e de  $\gamma$ H2AX nos adenocarcinomas gástricos e sua relação com a sobrevida global sugeriu, apesar da não significância estatística, que a expressão de RAD51 seja benéfica mesmo quando associada à presença de quebra do DNA, indicada pela  $\gamma$ H2AX, em comparação com a situação em que não há nem expressão de RAD51 nem de  $\gamma$ H2AX. Uma possível explicação é que, apesar de haver lesão do DNA presente, a expressão de RAD51 levaria ao seu reparo correto. A melhor situação, no entanto, parece ser a de expressão de RAD51 nuclear combinada à presumida e possivelmente decorrente ausência de lesão do DNA (negatividade de  $\gamma$ H2AX). Este grupo (pacientes com tumor positivo para RAD51 nuclear e negativo para  $\gamma$ H2AX) teve maior sobrevida estatisticamente significativa, em comparação com o grupo negativo para ambas as proteínas.

A negatividade de ATR nuclear nas amostras neoplásicas mostrou-se associada a maior tamanho tumoral e, no tipo histológico intestinal, a maior grau histológico (i.e., maior



proporção de grau 2 menor de grau 1 em comparação com os casos positivos). Zhang et al. (2013), no entanto, não haviam detectado correlação entre a expressão de ATR no câncer gástrico e características clinicopatológicas, e nossos achados contrastam com a associação entre a expressão de ATR e maior agressividade tumoral no câncer de mama (ABDEL-FATAH et al., 2015).

A análise multivariada mostrou que a perda de expressão de ATM no adenocarcinoma gástrico correlaciona-se com menor sobrevida livre de doença. A correlação entre baixa expressão de ATM e menor sobrevida foi também notada por Abdel-Fatah et al. (2013), Lee et al. (2014) e Kim et al. (2014).

Nossa análise univariada da sobrevida global e da livre de doença com separação dos grupos com e sem tratamento, embora não estatisticamente significativa, sugere, como no caso da proteína RAD51, que o ganho de sobrevida relacionado à positividade de ATM seja mais pronunciado nos pacientes sem tratamento adjuvante ou neoadjuvante, o que pode ser interpretado como evidência de que a presença de ATM cause alguma resistência à terapia, como observado por Lee et al. (2014) e Kim et al. (2014).

A positividade de BRCA2 nuclear correlacionou-se com menor sobrevida global na análise multivariada. Além disso, a alta expressão de BRCA2 nuclear nas amostras neoplásicas mostrou-se associada a maior frequência de invasão vascular linfática ou sanguínea, em comparação com os casos negativos ou com baixa expressão. Isso corrobora, de certo modo, os achados de Zhang et al. (2018), que correlacionaram a expressão nuclear de BRCA2 com maior frequência de metástase linfonodal.

A positividade de BRCA2 nuclear no adenocarcinoma gástrico foi mais frequente no tipo histológico difuso que no intestinal. Na população total, dentre os tumores positivos para BRCA2 nuclear, os graus histológicos 3 e 1 foram vistos em maior proporção, em comparação com os negativos, e o grau 2, em menor. Tal associação com o grau 3 foi consequência direta da correlação entre positividade imuno-histoquímica e tipo histológico difuso (sempre de grau 3). Avaliando-se isoladamente os casos de tipo histológico intestinal, nota-se maior proporção relativa de grau 1 e menor proporção de graus 2 e 3 dentre os tumores positivos para BRCA2 nuclear.

Em decorrência dessa associação com os tumores intestinais bem diferenciados, poder-se-ia supor que a relação entre BRCA2 nuclear e os fatores indicativos de agressividade tumoral seria, no grupo de tumores de padrão intestinal, contrária à observada na população total. Contudo, parece não ser esse o caso: a ocorrência de invasão vascular foi maior dentre os tumores com alta expressão do marcador também na avaliação de cada tipo histológico

separadamente, embora com perda da significância estatística, dada a redução do número de casos nos subgrupos. Também a análise univariada da sobrevida mostrou valores de *hazard ratio* maiores que 1 tanto no grupo de tumores intestinais quanto dentre os difusos (ambos sem significância estatística). Portanto, o papel da expressão de BRCA2 nuclear nos adenocarcinomas gástricos de padrão intestinal possivelmente é complexo, com a expressão sendo associada aos tumores bem diferenciados, e a alta expressão, a tumores agressivos.

Pode-se concluir que, em geral, a relação entre BRCA2 nuclear e o comportamento neoplásico do adenocarcinoma gástrico é oposta à de ATM, ATR nuclear e RAD51 nuclear; no caso destes três marcadores, é a negatividade que é vista nos tumores mais agressivos. Apesar disso, houve correlação positiva entre a expressão de BRCA2 nuclear e a de cada uma dessas outras proteínas, só não estatisticamente significativa no caso de ATM.

Não se pode atribuir, ao menos exclusivamente, o pior prognóstico associado à positividade tumoral para BRCA2 nuclear a sensibilidade reduzida à quimioterapia ou radioterapia, porque, na análise univariada, embora os resultados não tivessem sido estatisticamente significativos, notamos que os casos positivos para o marcador tiveram pior prognóstico tanto no grupo com tratamento adjuvante ou neoadjuvante quanto no grupo sem tratamento.

Também não é explicável o pior prognóstico apenas pela associação entre BRCA2 nuclear e tipo histológico difuso, já que o tipo histológico foi considerado na análise multivariada, e ainda pelo resultado da análise univariada separada por tipo histológico, que mencionamos acima.

A proporção de casos positivos para p53 nas amostras tumorais (55,37%) foi semelhante à de vários outros trabalhos (FENOGLIO-PRAISER et al., 2003). A mucosa gástrica não neoplásica foi negativa em todas as amostras, como na maioria dos estudos (FENOGLIO-PRAISER et al., 2003), mesmo em áreas de metaplasia intestinal. Alguns pesquisadores, em contrário, relatam a ocorrência de expressão imuno-histoquímica de p53 na mucosa gástrica normal e na metaplásica, porém em baixos níveis na maioria dos casos (BUSUTTIL et al., 2014).

A maior expressão de p53 que vimos nos tumores de padrões histológicos intestinal e misto está de acordo com o observado em trabalhos anteriores (GABBERT et al., 1995; LIU et al., 2001), e reflete a maior frequência de mutações do *TP53* do tipo intestinal, em comparação com o difuso (FENOGLIO-PREISER et al., 2003).

Já os outros parâmetros clinicopatológicos avaliados não mostraram associação estatisticamente significativa com p53. Assim, embora a metanálise de Yildirim et al. (2015)

tenha concluído que a positividade imuno-histoquímica de p53 é um fator de pior prognóstico no câncer gástrico, nós, como vários estudos anteriores (FENOGLIO-PREISER et al., 2003), não conseguimos demonstrá-lo.

Notamos que os tumores positivos para  $\gamma$ H2AX tiveram maior proporção de grau histológico 3 que os negativos; isso reflete a maior ocorrência do tipo histológico difuso entre os positivos, que, no entanto, não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,089$ ). No tipo histológico intestinal, analisado isoladamente, a positividade para  $\gamma$ H2AX mostrou-se associada a menor grau histológico. Assim, embora a interpretação da razão biológica desses resultados seja difícil, eles são conciliáveis, quando consideramos apenas os casos de padrão intestinal, com os de Guo et al. (2015), que observaram maior marcação imuno-histoquímica nos tumores moderadamente diferenciados que nos pouco diferenciados, e também com os achados de Hussein et al. (2018), que encontraram correlação entre altos níveis de  $\gamma$ H2AX e alto grau tumoral, quando consideramos a população total. A maior expressão de  $\gamma$ H2AX no adenocarcinoma que na mucosa gástrica não neoplásica, como observamos, também já tinha sido descrita previamente (GUO et al., 2015; XIE et al., 2014).

Observamos uma alta expressão de CHK2 nos adenocarcinomas gástricos, com positividade em 99,17% dos casos, achado similar ao de Arai et al. (2018), que tiveram cerca de 95% de tumores positivos.

Diferentemente de Lee et al. (2014), que demonstraram correlação entre a negatividade de CHK2 e pior prognóstico, não detectamos nenhuma associação entre a expressão da proteína e características clinicopatológicas. O número de casos avaliados por esses pesquisadores era, contudo, bem maior que o deste trabalho.

Houve correlação positiva entre a respectiva marcação no tumor e na mucosa não neoplásica no caso de ATR nuclear,  $\gamma$ H2AX e BRCA2 nuclear. Isso pode ser entendido como indício de que a expressão em ambos os tecidos esteja sujeita à influência de fatores ambientais comuns, mas também pode ser interpretado como sinal de que há tendência de a neoplasia manter o padrão de expressão proteica da mucosa que a originou.

Houve correlação positiva entre as expressões de p53 e  $\gamma$ H2AX nas amostras tumorais. Considerando que  $\gamma$ H2AX seja indicativa da presença de quebras bifilamentares do DNA (ALTAN et al., 2016), e que a positividade imuno-histoquímica de p53 comumente reflita a presença de proteína mutante disfuncional (FENOGLIO-PREISER et al., 2003), podemos atribuir a associação entre os marcadores à provável tendência ao acúmulo de quebras do DNA em tumores com mutação de p53, devida à não ocorrência de apoptose ou parada do ciclo celular que a proteína normal induziria em resposta a dano do DNA. Outra explicação

possível para a correlação, mais direta, é que a quebra dupla do DNA leva tanto à fosforilação de H2AX quanto à redução da ubiquitinação da proteína p53 pela MDM2, por vários mecanismos (CHENG e CHEN, 2010). Essa redução da ubiquitinação, apesar de acontecer também com a p53 mutada, dá-se principalmente com a proteína selvagem (LUKASHCHUK e VOUSDEN, 2007), que normalmente é rapidamente degradada, e pode fazê-la alcançar níveis detectáveis pela imuno-histoquímica (FENOGLIO-PREISER et al., 2003). Outra possível relação entre  $\gamma$ H2AX e p53 é o fato de que H2AX é fosforilada, independentemente da presença de quebra do DNA, durante a apoptose induzida pela caspase-3 (SENTANI et al., 2008), mecanismo apoptótico que pode ser secundário à atividade da p53 (SCHULER et al., 2000).

Em contrapartida, a associação, nas amostras tumorais, de  $\gamma$ H2AX com ATR nuclear, RAD51 nuclear, CHK2, ATM e BRCA2 nuclear sugere a hipótese de que haja um estímulo à expressão reacional dessas proteínas em situações de alta ocorrência de lesão do DNA, de causa a ser esclarecida (talvez a própria mutação de p53). De certo modo, esses achados contrariam o de Altan et al. (2016), que detectaram menores níveis de  $\gamma$ H2AX nos adenocarcinomas gástricos com maior expressão do complexo MRN, concluindo que maior presença das proteínas de reparo do complexo favoreceria um pronto reparo das quebras.

Supomos que a presença de maior número de quebras do DNA, evidenciada pela presença de  $\gamma$ H2AX, não implique necessariamente ausência do seu efetivo reparo. Parece corroborar tal hipótese nossa análise conjunta de RAD51 nuclear e  $\gamma$ H2AX e sua relação com a sobrevida, em que os casos positivos simultaneamente para ambos os marcadores tiveram melhor prognóstico, embora não estatisticamente significativo, que os negativos.

Há que considerar, ainda, a hipótese de que a ausência de  $\gamma$ H2AX, em alguns casos, possa decorrer de perda ou disfunção de ATM mais que da real ausência de quebra do DNA. Isso parece improvável, no entanto, como a fosforilação de H2AX não é todo dependente de ATM, mas também efeito da ação redundante de DNA-PKcs (subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA), que atua na NHEJ, e, em menor grau, de ATR (STIFF et al., 2004).

Note-se que a correlação positiva entre ATM e  $\gamma$ H2AX foi também vista no carcinoma de tireoide por Hu et al. (2015).

P53 teve fraca correlação negativa com BRCA1 nuclear e não mostrou correlação com BRCA1 citoplasmática, nas amostras neoplásicas. Esse resultado é inesperado e contrário ao observado no carcinoma de mama (JIANG et al., 2011) – como p53 promove o transporte da proteína BRCA1 do núcleo para o citoplasma, por inibir diretamente a associação entre esta e

a proteína BARD1, tínhamos a hipótese de que tumores com maior expressão de p53, presumivelmente mutada e não funcionante, teriam mais BRCA1 nuclear e menos BRCA1 citoplasmática. Além disso, como BRCA1 é necessária para que ATM fosforile e estabilize p53, uma correlação positiva entre BRCA1 nuclear e p53 seria esperada, teoricamente, mesmo em casos sem mutação de p53. Uma possível explicação para o achado é que a expressão imuno-histoquímica de p53 pode corresponder, em alguns casos, na verdade à presença da proteína não mutada acumulada (FENOGLIO-PREISER et al., 2003), que atuaria no transporte de BRCA1. Saliente-se, ademais, que a correlação negativa observada, conquanto significativa estatisticamente, foi fraca.

P53 também mostrou correlação positiva fraca com CHK2 e com ATR nuclear. O fato de ambas as proteínas estabilizarem p53 – CHK2 por fosforilação direta e ATR por fosforilação de MDM2 (CHENG e CHEN, 2010) – é possível explicação para o achado, situação em que haveria acúmulo de p53 mesmo na forma selvagem, além da hipótese supramencionada de que a mutação de p53 possa levar a uma expressão reacional de proteínas do reparo. A associação entre CHK2 e p53 já fora demonstrada no câncer gástrico (SHIGEISHI et al., 2002).

Em geral, conclui-se que tende a haver concordância na expressão nuclear de várias proteínas de reparo avaliadas.

A ausência de correlação entre a expressão nuclear e a citoplasmática de BRCA1 no adenocarcinoma gástrico, em nossos resultados, contrasta com a correlação inversa entre as duas descrita por Wang et al. (2018).

As correlações positivas dos marcadores citoplasmáticos BRCA1, BRCA2, ATR e RAD51 entre si, nas amostras tumorais, provavelmente se explicam pela associação deles com o tipo histológico, já discutida.

**CONCLUSÕES**

---

## 7. Conclusões

- Nos adenocarcinomas gástricos, há expressão nuclear variável de p53, CHK2, ATM e  $\gamma$ H2AX, e expressão nuclear e citoplasmática variável de RAD51, ATR, BRCA1 e BRCA2.
- Na mucosa gástrica não neoplásica, os marcadores CHK2, ATM, RAD51 e BRCA1 são positivos; BRCA2, ATR e  $\gamma$ H2AX têm expressão variável; p53 é negativo.
- A negatividade imuno-histoquímica para RAD51 nuclear nos adenocarcinomas gástricos correlaciona-se com menor sobrevida global e livre de doença na análise univariada. Também é associada a maior frequência de invasão vascular e de metástase em linfonodos regionais e a maior tamanho tumoral.
- A correlação com menor sobrevida dá-se principalmente nos pacientes não submetidos a tratamento adjuvante ou neoadjuvante. Naqueles com tratamento, não há correlação estatisticamente significativa. O tratamento adjuvante correlaciona-se com maior sobrevida global nos pacientes com tumor negativo para RAD51 nuclear, mas não nos positivos. Tais achados sugerem que a presença de RAD51 nuclear promova resistência à quimioterapia ou radioterapia.
- A proporção de adenocarcinomas gástricos positivos para RAD51 nuclear é maior dentre aqueles com quimioterapia neoadjuvante prévia.
- A negatividade imuno-histoquímica para ATR nuclear nos adenocarcinomas gástricos correlaciona-se com maior tamanho tumoral e, no tipo histológico intestinal, com maior grau histológico.
- A negatividade imuno-histoquímica para ATM nos adenocarcinomas gástricos correlaciona-se com menor sobrevida livre de doença, na análise multivariada.
- A positividade imuno-histoquímica para BRCA2 nuclear nos adenocarcinomas gástricos correlaciona-se com menor sobrevida global na análise multivariada e com o tipo histológico difuso. Além disso, sua alta expressão associa-se a maior frequência de invasão vascular. No tipo histológico intestinal, contudo, BRCA2 nuclear correlaciona-se com baixo grau histológico.
- Nos adenocarcinomas gástricos de tipo histológico intestinal, a positividade para  $\gamma$ H2AX é associada a menor grau histológico.
- A expressão citoplasmática de BRCA1, BRCA2, ATR e RAD51 é maior nos adenocarcinomas gástricos de padrão intestinal.

- Nos adenocarcinomas gástricos, há correlação positiva relativamente forte entre a expressão de ATM e a de BRCA1 nuclear, entre  $\gamma$ H2AX e p53, entre  $\gamma$ H2AX e ATR nuclear, e entre  $\gamma$ H2AX e RAD51 nuclear.

Em suma, nosso trabalho sugere a importância dos marcadores imuno-histoquímicos nucleares ATM, RAD51 e BRCA2, estes dois últimos particularmente pouco estudados previamente, como indicadores prognósticos do adenocarcinoma gástrico. Adicionalmente, corrobora estudos prévios, em sua maioria in vitro, que associam a proteína RAD51 a resistência a quimiorradioterapia, e sugere que o tratamento adjuvante ou neoadjuvante possa não ser efetivo nos pacientes cujo tumor expresse RAD51 nuclear.



## **REFERÊNCIAS**

---

## Referências

- ABDEL-FATAH, Tarek et al. Are DNA repair factors promising biomarkers for personalized therapy in gastric cancer? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 18, p. 2392-2398, 2013.
- ABDEL-FATAH, Tarek MA et al. ATM, ATR and DNA-PKcs expressions correlate to adverse clinical outcomes in epithelial ovarian cancers. **BBA clinical**, v. 2, p. 10-17, 2014.
- ABDEL-FATAH, Tarek MA et al. Untangling the ATR-CHEK1 network for prognostication, prediction and therapeutic target validation in breast cancer. **Molecular oncology**, v. 9, n. 3, p. 569-585, 2015.
- ABIB, Andréia R.; OLIVEIRA, Ivanir M. de; KOIFMAN, Sérgio. Histopatologia do câncer de estômago (classificação de Lauren) em amostra de pacientes hospitalares no Rio de Janeiro, 1980-1995. **Cadernos de saúde pública**, v. 13, p. S99-S104, 1997.
- AGARWAL, Munna L. et al. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 18, p. 8493-8497, 1995.
- AL-MINAWI, Ali Z.; SALEH-GOHARI, Nasrollah; HELLEDAY, Thomas. The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ALSHAREEDA, Alaa Tarig et al. Clinical and biological significance of RAD51 expression in breast cancer: a key DNA damage response protein. **Breast cancer research and treatment**, v. 159, n. 1, p. 41-53, 2016.
- ALTAN, Bolag et al. High Expression of MRE11–RAD50–NBS1 Is Associated with Poor Prognosis and Chemoresistance in Gastric Cancer. **Anticancer research**, v. 36, n. 10, p. 5237-5247, 2016.
- AMERICAN CANCER SOCIETY, Stomach cancer survival rates, 2019. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>>. Acesso em: 30 de setembro de 2019.
- ANDERSON, Lindsay; HENDERSON, Catherine; ADACHI, Yasuhisa. Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 5, p. 1719-1729, 2001.
- ARAI, Hiroki et al. Expression of DNA damage response proteins in gastric cancer: Comprehensive protein profiling and histological analysis. **International journal of oncology**, v. 52, n. 3, p. 978-988, 2018.
- BERNAL, Carolina et al. DNA methylation profile in diffuse type gastric cancer: evidence for hypermethylation of the BRCA1 promoter region in early-onset gastric carcinogenesis. **Biological research**, v. 41, n. 3, p. 303-315, 2008.

- 
- BIEHS, Ronja et al. DNA double-strand break resection occurs during non-homologous end joining in G1 but is distinct from resection during homologous recombination. **Molecular cell**, v. 65, n. 4, p. 671-684. e5, 2017.
  - BRANDSMA, Inger; VAN GENT, Dik C. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. **Genome integrity**, v. 3, n. 1, p. 9, 2012.
  - BUNZ, Fred et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. **Science**, v. 282, n. 5393, p. 1497-1501, 1998.
  - BUSUTTIL, Rita A. et al. Role of p53 in the progression of gastric cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 23, p. 12016, 2014.
  - CARNEIRO, Fátima et al. Gastric Adenocarcinoma. In: WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD. **WHO classification of tumours: digestive system tumours**. Lyon: IARC, 2019.
  - CAVANAGH, Helen; ROGERS, Katherine MA. The role of BRCA1 and BRCA2 mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers. **Hereditary cancer in clinical practice**, v. 13, n. 1, p. 16, 2015.
  - CHEN, Longchuan et al. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1· CtIP· MRN is important for DNA double-strand break repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 12, p. 7713-7720, 2008.
  - CHEN, Wenjiao et al. Prognostic significance of BRCA1 expression in gastric cancer. **Medical oncology**, v. 30, n. 1, p. 423, 2013.
  - CHENG, Qian; CHEN, Jiandong. Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. **Cell cycle**, v. 9, n. 3, p. 472-478, 2010.
  - CONNELL, Philip P. et al. Pilot study examining tumor expression of RAD51 and clinical outcomes in human head cancers. **International journal of oncology**, v. 28, n. 5, p. 1113-1119, 2006.
  - CORREA, Pelayo; PIAZUELO, M. Blanca. Helicobacter pylori infection and gastric adenocarcinoma. **US gastroenterology & hepatology review**, v. 7, n. 1, p. 59, 2011.
  - COSTA, R.M.A. et al. Processos de reparo do DNA. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. Editora Atheneu, 2010.
  - DALEY, James M.; SUNG, Patrick. 53BP1, BRCA1 and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. **Molecular and cellular biology**, p. MCB. 01639-13, 2014.
  - DEXHEIMER, T.S. DNA repair pathways and mechanisms. In: MATHEWS, L.A. et al. **DNA repair of cancer stem cells**. Dordrecht: Springer, 2013.
  - ESASHI, Fumiko et al. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. **Nature**, v. 434, n. 7033, p. 598, 2005.

- 
- FENOGLIO-PREISER, C. et al. Gastric carcinoma. **Pathology and genetics of tumours of the digestive system**, v. 1, p. 35-52, 2000.
  - FENOGLIO-PREISER, C. M. et al. TP53 and gastric carcinoma: a review. **Human mutation**, v. 21, n. 3, p. 258-270, 2003.
  - FLYGARE, Jenny; BENSON, Fiona; HELLGREN, Dennis. Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1312, n. 3, p. 231-236, 1996.
  - FORAY, Nicolas et al. A subset of ATM-and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. **The EMBO journal**, v. 22, n. 11, p. 2860-2871, 2003.
  - FORGET, Anthony L.; KOWALCZYKOWSKI, Stephen C. Single-molecule imaging brings Rad51 nucleoprotein filaments into focus. **Trends in cell biology**, v. 20, n. 5, p. 269-276, 2010.
  - GABBERT, Helmut Erich et al. The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. **Cancer**, v. 76, n. 5, p. 720-726, 1995.
  - GACHECHILADZE, Mariam et al. Prognostic and predictive value of loss of nuclear RAD51 immunoreactivity in resected non-small cell lung cancer patients. **Lung Cancer**, v. 105, p. 31-38, 2017.
  - GAMPER, Armin M. et al. ATR kinase activation in G1 phase facilitates the repair of ionizing radiation-induced DNA damage. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 22, p. 10334-10344, 2013.
  - GARATTINI, Silvio Ken et al. Molecular classifications of gastric cancers: Novel insights and possible future applications. **World journal of gastrointestinal oncology**, v. 9, n. 5, p. 194, 2017.
  - GASPARINI, Pierluigi et al. Protective role of miR-155 in breast cancer through RAD51 targeting impairs homologous recombination after irradiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 12, p. 4536-4541, 2014.
  - GAUVREAU, KIMBERLEE; PAGANO, MARCELLO. Princípios de bioestatística. **São Paulo: Cengage**, 2004.
  - GOSPODAROWICZ, Mary K.; BRIERLEY, James D.; WITTEKIND, Christian (Ed.). **TNM classification of malignant tumours**. John Wiley & Sons, 2017.
  - GRABSCH, Heike et al. Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1 predicts survival in colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. 1494-1500, 2006.
  - GRAESER, Monika Karla et al. A marker of homologous recombination predicts pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. **Clinical Cancer Research**, p. clincanres. 1027.2010, 2010.

- 
- GUO, Zhong et al. Expression of the  $\gamma$ -phosphorylated histone H2AX in gastric carcinoma and gastric precancerous lesions. **Oncology letters**, v. 9, n. 4, p. 1790-1794, 2015.
  - HE, Wei-Ling et al. RAD51 potentiates synergistic effects of chemotherapy with PCI-24781 and cis-diamminedichloroplatinum on gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 29, p. 10094, 2014.
  - HEEKE, Arielle L. et al. Prevalence of Homologous Recombination–Related Gene Mutations Across Multiple Cancer Types. **JCO precision oncology**, v. 2, p. 1-13, 2018.
  - Hu, J. L., Hu, S. S., Hou, X. X., Zhu, X., Cao, J., Jiang, L. H., & Ge, M. H. (2015). Abnormal expression of DNA double-strand breaks related genes, ATM and gammaH2AX, in thyroid carcinoma. *International journal of endocrinology*, 2015.
  - HUANG, Jia-Qing et al. Meta-analysis of the relationship between Helicobacter pylori seropositivity and gastric cancer. **Gastroenterology**, v. 114, n. 6, p. 1169-1179, 1998.
  - HUERTAS, Pablo; JACKSON, Stephen P. Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 14, p. 9558-9565, 2009.
  - HUSSEIN, Usama Khamis et al. Expression of oxidized protein tyrosine phosphatase and  $\gamma$ H2AX predicts poor survival of gastric carcinoma patients. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 836, 2018.
  - INCA, Câncer de estômago, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-estomago>>. Acesso em: 24 de abril de 2020.
  - INCA, Estatísticas de câncer, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 24 de abril de 2020.
  - IP, Stephen CY et al. Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. **Nature**, v. 456, n. 7220, p. 357, 2008.
  - JAZAYERI, Ali et al. ATM-and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. **Nature cell biology**, v. 8, n. 1, p. 37, 2006.
  - JIANG, Juhong et al. p53-dependent BRCA1 nuclear export controls cellular susceptibility to DNA damage. **Cancer research**, 2011.
  - KAIROUZ, R. et al. ATM protein synthesis patterns in sporadic breast cancer. **Molecular Pathology**, v. 52, n. 5, p. 252, 1999.
  - KANG, Bin et al. Expression status of ataxia-telangiectasia-mutated gene correlated with prognosis in advanced gastric cancer. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 638, n. 1, p. 17-25, 2008.
  - KIIANITSA, Konstantin; SOLINGER, Jachen A.; HEYER, Wolf-Dietrich. Terminal association of Rad54 protein with the Rad51–dsDNA filament. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 26, p. 9767-9772, 2006.

- 
- KIM, Haeryoung et al. Having pancreatic cancer with tumoral loss of ATM and normal TP53 protein expression is associated with a poorer prognosis. **Clinical cancer research**, v. 20, n. 7, p. 1865-1872, 2014.
  - KIM, Jin Won et al. Ataxia-telangiectasia-mutated protein expression with microsatellite instability in gastric cancer as prognostic marker. **International journal of cancer**, v. 134, n. 1, p. 72-80, 2014.
  - KIM, Jin Won et al. Differing effects of adjuvant chemotherapy according to BRCA1 nuclear expression in gastric cancer. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 71, n. 6, p. 1435-1443, 2013.
  - KOKKOLA, Arto et al. 17q12-21 amplicon, a novel recurrent genetic change in intestinal type of gastric carcinoma: A comparative genomic hybridization study. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 20, n. 1, p. 38-43, 1997.
  - KREJCI, Lumir et al. Homologous recombination and its regulation. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 13, p. 5795-5818, 2012.
  - KUBOTA, Eiji et al. Low ATM protein expression and depletion of p53 correlates with olaparib sensitivity in gastric cancer cell lines. **Cell Cycle**, v. 13, n. 13, p. 2129-2137, 2014.
  - LAURÉN, Pekka. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 64, n. 1, p. 31-49, 1965.
  - LAUWERS, G. Y. et al. WHO classification of tumours of the digestive system. **Lyon: IARC**, 2010.
  - LEE, HeeEun et al. DNA damage response-related proteins in gastric cancer: ATM, Chk2 and p53 expression and their prognostic value. **Pathobiology**, v. 81, n. 1, p. 25-35, 2014.
  - LEE, Ji-Hoon; PAULL, Tanya T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 551-554, 2005.
  - LEMES, Laura de Oliveira Andrade et al. Carcinoma gástrico: avaliação comparativa das classificações de Laurén e Carneiro. **Rev Med Minas Gerais**, v. 13, n. 2, p. 79-83, 2002.
  - LI, Yan et al. Overexpression of Rad51 predicts poor prognosis in colorectal cancer: our experience with 54 patients. **PloSone**, v. 12, n. 1, p. e0167868, 2017.
  - LI, Yinyan et al. Expression of ATM, CHK2 and BRCA1 predicts the clinical outcome of non-small cell lung cancer in patients receiving platinum-based chemotherapy. **INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL PATHOLOGY**, v. 10, n. 6, p. 7035-7043, 2017.
  - LI, Xuan et al. PCNA is required for initiation of recombination-associated DNA synthesis by DNA polymerase  $\delta$ . **Molecular cell**, v. 36, n. 4, p. 704-713, 2009.
  - LIM, Dae-Sik et al. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 613, 2000.

- 
- LIU, Xiu ping et al. Expression of p53 protein as a prognostic indicator of reduced survival time in diffuse-type gastric carcinoma. **Pathology international**, v. 51, n. 6, p. 440-444, 2001.
  - LOU, Zhenkun et al. Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 regulates BRCA1 localization and phosphorylation in DNA damage checkpoint control. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 16, p. 13599-13602, 2003.
  - LUKASHCHUK, Natalia; VOUSDEN, Karen H. Ubiquitination and degradation of mutant p53. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 23, p. 8284-8295, 2007.
  - LV, Zhongchuan et al. Mutations in CHEK2 and risk of gastric cancer: a case-control study. **Biomedical Research**, v. 28, n. 17, 2017.
  - MAACKKE, Heiko et al. Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. **International journal of cancer**, v. 88, n. 6, p. 907-913, 2000.
  - MACLACHLAN, Timothy K.; EL-DEIRY, Wafik. Functional Interactions Between BRCA1 and the Cell Cycle. 2013.
  - MAO, Zhiyong et al. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. **Cell cycle**, v. 7, n. 18, p. 2902-2906, 2008.
  - MATSUTANI, N. et al. Expression of MRE11 complex (MRE11, RAD50, NBS1) and hRap1 and its relation with telomere regulation, telomerase activity in human gastric carcinomas. **Pathobiology**, v. 69, n. 4, p. 219-224, 2001.
  - MCGLYNN, Peter; LLOYD, Robert G. Recombinational repair and restart of damaged replication forks. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 859, 2002.
  - MCILWRAITH, Michael J. et al. Human DNA polymerase  $\eta$  promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. **Molecular cell**, v. 20, n. 5, p. 783-792, 2005.
  - MCILWRAITH, Michael J. et al. Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins1. **Journal of molecular biology**, v. 304, n. 2, p. 151-164, 2000.
  - MIN, Ahum et al. AZD6738, a novel oral inhibitor of ATR, induces synthetic lethality with ATM-deficiency in gastric cancer cells. **Molecular cancer therapeutics**, p. molcanther. 0378.2016, 2017.
  - MITRA, Anita et al. Overexpression of RAD51 occurs in aggressive prostatic cancer. **Histopathology**, v. 55, n. 6, p. 696-704, 2009.
  - MIYAZAKI, Wesley Y.; ORR-WEAVER, Terry L. Sister-chromatid cohesion in mitosis and meiosis. **Annual review of genetics**, v. 28, n. 1, p. 167-187, 1994.
  - MORENO, Ruth Patricia Velandia et al. Análise dos fatores prognósticos do câncer gástrico. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 50, n. 3, p. 85-91, 2005.

- 
- MORGAN, Susan E.; KASTAN, Michael B. Foundations in cancer research p53 and ATM: Cell cycle, cell death, and cancer. In: **Advances in cancer research**. Academic Press, 1997. p. 1-25.
  - MOYNAHAN, Mary Ellen; JASIN, Maria. Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 17, p. 8988-8993, 1997.
  - NAKANOKO, Tomonori et al. Rad51 expression is a useful predictive factor for the efficacy of neoadjuvant chemoradiotherapy in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Annals of surgical oncology**, v. 21, n. 2, p. 597-604, 2014.
  - OTTINI, Laura et al. MRE11 expression is impaired in gastric cancer with microsatellite instability. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 12, p. 2337-2343, 2004.
  - PANSANI, Fabianna. **Expressão imuno-histoquímica do Chk2 e associação com características clínico-patológicas e desfecho em pacientes com câncer de cólon metastático**. 2015. Dissertação (Mestrado em Diferenciação Celular Normal e Neoplásica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
  - PARSONNET, Julie et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 16, p. 1127-1131, 1991a.
  - PARSONNET, Julie et al. Helicobacter pylori infection in intestinal and diffuse-type gastric adenocarcinomas. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 9, p. 640-643, 1991b.
  - PETERSON, Shaun E. et al. Activation of DSB processing requires phosphorylation of CtIP by ATR. **Molecular cell**, v. 49, n. 4, p. 657-667, 2013.
  - PODHORECKA, Monika; SKLADANOWSKI, Andrzej; BOZKO, Przemyslaw. H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. **Journal of nucleic acids**, v. 2010, 2010.
  - POPLAWSKI, Tomasz et al. DNA damage and repair in gastric cancer—a correlation with the hOGG1 and RAD51 genes polymorphisms. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 601, n. 1, p. 83-91, 2006.
  - QIAO, G. B. et al. High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. **British journal of cancer**, v. 93, n. 1, p. 137, 2005.
  - RAPPOLD, Irene et al. Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage—signaling pathways. **The Journal of cell biology**, v. 153, n. 3, p. 613-620, 2001.
  - RAY, Alo et al. ATR-and ATM-mediated DNA damage response is dependent on excision repair assembly during G1 but not in S phase of cell cycle. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0159344, 2016.



- 
- RAYNARD, Steven et al. Functional role of BLAP75 in BLM-topoisomerase III $\alpha$ -dependent Holliday junction processing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 23, p. 15701-15708, 2008.
  - RAWLA, Prashanth; BARSOUK, Adam. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. **Przegląd gastroenterologiczny**, v. 14, n. 1, p. 26, 2019.
  - REDDY, A. et al. Analysis of CHK2 in vulval neoplasia. **British journal of cancer**, v. 86, n. 5, p. 756, 2002.
  - RIBEIRO-SILVA, Alfredo et al. Impacto prognóstico da expressão imuno-histoquímica do BRCA1 nos carcinomas mamários esporádicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 3, p. 197-203, 2005.
  - RODER, David M. The epidemiology of gastric cancer. **Gastric cancer**, v. 5, n. 1, p. 5-11, 2002.
  - ROOSSINK, Frank et al. The role of ATM and 53BP1 as predictive markers in cervical cancer. **International journal of cancer**, v. 131, n. 9, p. 2056-2066, 2012.
  - ROSAI, Juan. **Rosai and Ackerman's surgical pathology e-book**. Elsevier Health Sciences, 2011.
  - ROSNER, Bernard. **Fundamentals of biostatistics**. Nelson Education, 2015.
  - RUSSELL, Ronan et al. Loss of ATM accelerates pancreatic cancer formation and epithelial–mesenchymal transition. **Nature communications**, v. 6, p. 7677, 2015.
  - SAHASRABUDHE, Ruta et al. Germline mutations in PALB2, BRCA1, and RAD51C, which regulate DNA recombination repair, in patients with gastric cancer. **Gastroenterology**, v. 152, n. 5, p. 983-986. e6, 2017.
  - SAN FILIPPO, Joseph; SUNG, Patrick; KLEIN, Hannah. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 77, p. 229-257, 2008.
  - SCHMUTTE, Christoph et al. Characterization of the human Rad51 genomic locus and examination of tumors with 15q14–15 loss of heterozygosity (LOH). **Cancer research**, v. 59, n. 18, p. 4564-4569, 1999.
  - SCHULER, Martin et al. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 10, p. 7337-7342, 2000.
  - SEKI, Masayuki et al. Bloom helicase and DNA topoisomerase III $\alpha$  are involved in the dissolution of sister chromatids. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 16, p. 6299-6307, 2006.
  - SEMBA, S. et al. Frequent microsatellite instability and loss of heterozygosity in the region including BRCA1 (17q21) in young patients with gastric cancer. **International journal of oncology**, v. 12, n. 6, p. 1245-1296, 1998.

- 
- SENTANI, Kazuhiro et al. Positive immunohistochemical staining of  $\gamma$ H2AX is associated with tumor progression in gastric cancers from radiation-exposed patients. **Oncology reports**, v. 20, n. 5, p. 1131-1136, 2008.
  - SHAMMAS, Masood A. et al. Dysfunctional homologous recombination mediates genomic instability and progression in myeloma. **Blood**, v. 113, n. 10, p. 2290-2297, 2009.
  - SHIAO, Yih-Hong et al. p53 alteration in gastric precancerous lesions. **The American journal of pathology**, v. 144, n. 3, p. 511, 1994.
  - SHIGEISHI, Hideo et al. Increased expression of CHK2 in human gastric carcinomas harboring p53 mutations. **International journal of cancer**, v. 99, n. 1, p. 58-62, 2002.
  - SILVA-FERNANDES, Isabelle Joyce de Lima et al. The intricate interplay between MSI and polymorphisms of DNA repair enzymes in gastric cancer H. pylori associated. **Mutagenesis**, v. 32, n. 4, p. 471-478, 2017.
  - SÖDERLUND, Karin et al. The BRCA1/BRCA2/Rad51 complex is a prognostic and predictive factor in early breast cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 84, n. 3, p. 242-251, 2007.
  - SOENGAS, María S. et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 156-159, 1999.
  - SOONG, Richie et al. Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. **Human pathology**, v. 27, n. 10, p. 1050-1055, 1996.
  - SPYCHER, Christoph et al. Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11–RAD50–NBS1 complex to damaged chromatin. **The Journal of cell biology**, v. 181, n. 2, p. 227-240, 2008.
  - STIFF, Tom et al. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. **Cancer research**, v. 64, n. 7, p. 2390-2396, 2004.
  - STUCKI, Manuel et al. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. **Cell**, v. 123, n. 7, p. 1213-1226, 2005.
  - SUN, Mianen et al. Activation of the ATM-Snail pathway promotes breast cancer metastasis. **Journal of molecular cell biology**, v. 4, n. 5, p. 304-315, 2012.
  - SUN, Ping et al. Genetic Variation in the 3'-Untranslated Region of NBN Gene Is Associated with Gastric Cancer Risk in a Chinese Population. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0139059, 2015.
  - SYMINGTON, Lorraine S.; ROTHSTEIN, Rodney; LISBY, Michael. Mechanisms and regulation of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 198, n. 3, p. 795-835, 2014.
  - TAN, Lulu et al. Interferon regulatory factor-1 suppresses DNA damage response and reverses chemotherapy resistance by downregulating the expression of RAD51 in gastric cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 10, n. 4, p. 1255, 2020.

- 
- TANAKA, Toshiki et al. Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide: relation to cell cycle phase. **Cell cycle**, v. 6, n. 3, p. 371-376, 2007.
  - TENNSTEDT, Pierre et al. RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. **International journal of cancer**, v. 132, n. 9, p. 2118-2126, 2013.
  - THE HUMAN PROTEIN ATLAS. ATM, c2019. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000149311-ATM>>. Acesso em: 3 de agosto de 2019.
  - THE HUMAN PROTEIN ATLAS. ATR, c2019. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000175054-ATR>>. Acesso em: 3 de agosto de 2019.
  - THE HUMAN PROTEIN ATLAS. BRCA1, c2019. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG0000012048-BRCA1>>. Acesso em: 3 de agosto de 2019.
  - THE HUMAN PROTEIN ATLAS. BRCA2, c2019. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000139618-BRCA2>>. Acesso em: 3 de agosto de 2019.
  - THE HUMAN PROTEIN ATLAS. CHK2, c2019. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183765-CHEK2>>. Acesso em: 3 de agosto de 2019.
  - THE HUMAN PROTEIN ATLAS. H2AX, c2019. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000188486-H2AFX>>. Acesso em: 3 de agosto de 2019.
  - THE HUMAN PROTEIN ATLAS. P53, c2019. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141510-TP53/cell>>. Acesso em: 3 de agosto de 2019.
  - THE HUMAN PROTEIN ATLAS. Rad51, c2019. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000051180-RAD51>>. Acesso em: 3 de agosto de 2019.
  - TRANG, T. T. H. et al. RAD51 G135C genetic polymorphism and their potential role in gastric cancer induced by Helicobacter pylori infection in Bhutan. **Epidemiology & Infection**, v. 144, n. 2, p. 234-240, 2016.
  - VAN DER POST, Rachel S. et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. **Journal of medical genetics**, v. 52, n. 6, p. 361-374, 2015.
  - VARIS, Asta et al. DNA copy number changes in young gastric cancer patients with special reference to chromosome 19. **British journal of cancer**, v. 88, n. 12, p. 1914, 2003.
  - WANG, Gui-Hua et al. BRCA1 and BRCA2 expression patterns and prognostic significance in digestive system cancers. **Human pathology**, v. 71, p. 135-144, 2018.

- 
- WANG, Hailong et al. The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair. **PLoS genetics**, v. 9, n. 2, p. e1003277, 2013.
  - WARD, Irene M.; WU, Xianglin; CHEN, Junjie. Threonine 68 of Chk2 is phosphorylated at sites of DNA strand breaks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 51, p. 47755-47758, 2001.
  - WELSH, James W. et al. Rad51 protein expression and survival in patients with glioblastoma multiforme. **International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics**, v. 74, n. 4, p. 1251-1255, 2009.
  - WIEGMANS, Adrian P. et al. Rad51 supports triple negative breast cancer metastasis. **Oncotarget**, v. 5, n. 10, p. 3261, 2014.
  - XIA, Bing et al. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. **Molecular cell**, v. 22, n. 6, p. 719-729, 2006.
  - XIE, Chuan et al. Expression of  $\gamma$ H2AX in various gastric pathologies and its association with Helicobacter pylori infection. **Oncology letters**, v. 7, n. 1, p. 159-163, 2014.
  - XU, Xingzhi; STERN, David F. NFB1/KIAA0170 is a chromatin-associated protein involved in DNA damage signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8795-8803, 2003.
  - XUE, Lian et al. The complexity of DNA double strand break is a crucial factor for activating ATR signaling pathway for G2/M checkpoint regulation regardless of ATM function. **DNA repair**, v. 25, p. 72-83, 2015.
  - YAMADA, Yukishige et al. p53 gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases. **Cancer research**, v. 51, n. 21, p. 5800-5805, 1991.
  - YILDIRIM, Mustafa et al. Prognostic significance of p53 in gastric cancer: a meta-analysis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 1, p. 327-332, 2015.
  - YIN, Yuping et al. Chk1 inhibition potentiates the therapeutic efficacy of PARP inhibitor BMN673 in gastric cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 3, p. 473, 2017.
  - ZANNINI, Laura; DELIA, Domenico; BUSCEMI, Giacomo. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. **Journal of molecular cell biology**, v. 6, n. 6, p. 442-457, 2014.
  - ZHANG, Donghui et al. Sterigmatocystin-induced DNA damage triggers G2 arrest via an ATM/p53-related pathway in human gastric epithelium GES-1 cells in vitro. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. e65044, 2013.
  - ZHANG, Junran et al. MDC1 interacts with Rad51 and facilitates homologous recombination. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 12, n. 10, p. 902, 2005.
  - ZHANG, Junran et al. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 2, p. 708-718, 2004.

- ZHANG, Yiyin et al. Prognostic Value of the Expression of DNA Repair–Related Biomarkers Mediated by Alcohol in Gastric Cancer Patients. **The American journal of pathology**, v. 188, n. 2, p. 367-377, 2018.
- ZHANG, Youwei; HUNTER, Tony. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. **International journal of cancer**, v. 134, n. 5, p. 1013-1023, 2014.
- ZHANG, Zi-Zhen et al. Loss of BRCA1 expression leads to worse survival in patients with gastric carcinoma. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 12, p. 1968, 2013.
- ZHAO, Wenjing et al. CHK2 promotes Anoikis and is associated with the progression of papillary thyroid Cancer. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 1590-1602, 2018.

## **APÊNDICES E ANEXOS**

## Apêndices

**Tabela A1.** Correlação entre as expressões de RAD51 nuclear, ATR nuclear, ATM e BRCA2 nuclear e parâmetros clinicopatológicos no adenocarcinoma gástrico.

	RAD51 nuclear			ATR nuclear			ATM			BRCA2 nuclear		
	positivo n = 97	negativo n = 22	p	positivo n = 49	negativo n = 71	p	positivo n = 112	negativo n = 7	p	positivo n = 44	negativo n = 77	p
<b>Tipo histológico</b>			0,840			0,953			0,758			<b>0,031</b>
- difuso	44 (45,4)	11 (50,0)		23 (46,9)	32 (45,1)		52 (46,4)	4 (57,1)		<b>26 (59,1)</b>	<b>30 (39,0)</b>	
- intestinal	40 (41,2)	9 (40,9)		20 (40,8)	29 (40,8)		46 (41,1)	2 (28,6)		<b>11 (25,0)</b>	<b>38 (49,4)</b>	
- misto	13 (13,4)	2 (9,1)		6 (12,2)	10 (14,1)		14 (12,5)	1 (14,3)		<b>7 (15,9)</b>	<b>9 (11,7)</b>	
<b>Grau</b>			0,098			<b>0,013</b>			1,000			<b>0,003</b>
- 1	12 (12,4)	0		<b>9 (18,4)</b>	<b>3 (4,2)</b>		12 (10,7)	0		<b>7 (15,9)</b>	<b>5 (6,5)</b>	
- 2	20 (20,6)	8 (36,4)		<b>7 (14,3)</b>	<b>21 (29,6)</b>		25 (22,3)	2 (28,6)		<b>3 (6,8)</b>	<b>25 (32,5)</b>	
- 3	65 (67,0)	14 (63,6)		<b>33 (67,3)</b>	<b>47 (66,2)</b>		75 (67,0)	5 (71,4)		<b>34 (77,3)</b>	<b>47 (61,0)</b>	
<b>Invasão vascular</b>	<b>74 (76,3)</b>	<b>21 (95,5)</b>	<b>0,044</b>	39 (79,6)	57 (80,3)	0,926	89 (79,5)	6 (85,7)	1,000	35 (79,5)	62 (80,5)	0,897
<b>Invasão perineural</b>	49 (50,5)	15 (68,2)	0,134	24 (49,0)	40 (56,3)	0,427	57 (50,9)	5 (71,4)	0,442	24 (54,5)	40 (51,9)	0,783
<b>pT2</b>	17 (17,5)	2 (9,1)	0,521	12 (24,5)	8 (11,3)	0,056	19 (17,0)	1 (14,3)	1,000	8 (18,2)	12 (15,6)	0,711
<b>pT3-4</b>	80 (82,5)	20 (90,2)		37 (75,5)	63 (88,7)		93 (83,0)	6 (85,7)		36 (81,8)	65 (84,4)	
<b>Metástase linfonodal</b>	<b>60 (61,9)</b>	<b>21 (95,5)</b>	<b>0,002</b>	30 (61,2)	51 (71,8)	0,223	76 (67,9)	5 (71,4)	1,000	28 (63,6)	54 (70,1)	0,462
<b>Metástase distante</b>	15 (15,5)	6 (27,3)	0,218	8 (16,3)	13 (18,3)	0,779	19 (17,0)	2 (28,6)	0,605	6 (13,6)	15 (19,5)	0,414
<b>Estádio</b>			0,102			0,158			1,000			0,729
- I-II	45 (46,4)	6 (27,3)		25 (51,0)	27 (38,0)		48 (42,9)	3 (42,9)		18 (40,9)	34 (44,2)	
- III-IV	52 (53,6)	16 (72,7)		24 (49,0)	44 (62,0)		64 (57,1)	4 (57,1)		26 (59,1)	43 (55,8)	
<b>Tamanho tumoral (cm) – média±D.P.</b>	<b>5,61±3,11</b>	<b>7,33±1,96</b>	<b>0,015</b>	<b>4,94±2,55</b>	<b>6,63±3,10</b>	<b>0,002</b>	5,93±3,03	5,55±2,23	0,762	6,08±3,44	5,82±2,71	0,675

**Tabela A2.** Correlação entre as expressões de p53,  $\gamma$ H2AX, CHK2 e BRCA1 nuclear e parâmetros clinicopatológicos no adenocarcinoma gástrico.

	p53		p	$\gamma$ H2AX		p	CHK2		p	BRCA1 nuclear		p
	positivo n = 67	negativo n = 54		positivo n = 64	negativo n = 57		alta expressão n = 67	baixa expressão n = 54		positivo n = 103	negativo n = 18	
<b>Tipo histológico</b>			0,152			0,089			0,297			0,230
- difuso	26 (38,8)	30 (55,6)		34 (53,1)	22 (38,6)		24 (47,1)	31 (44,9)		51 (49,5)	5 (27,8)	
- intestinal	32 (47,8)	17 (31,5)		20 (31,3)	29 (50,9)		23 (45,1)	26 (37,7)		39 (37,9)	10 (55,6)	
- misto	9 (13,4)	7 (13,0)		10 (15,6)	6 (10,5)		4 (7,8)	12 (17,4)		13 (12,6)	3 (16,7)	
<b>Grau</b>			0,323			<b>0,021</b>			0,393			0,265
- 1	8 (11,9)	4 (7,4)		<b>9 (14,1)</b>	<b>3 (5,3)</b>		7 (13,7)	5 (7,2)		11 (10,7)	1 (5,6)	
- 2	18 (26,9)	10 (18,5)		<b>9 (14,1)</b>	<b>19 (33,3)</b>		13 (25,5)	15 (21,7)		21 (20,4)	7 (38,9)	
- 3	41 (61,2)	40 (74,1)		<b>46 (71,9)</b>	<b>35 (61,4)</b>		31 (60,8)	49 (71,0)		71 (68,9)	10 (55,6)	
<b>Invasão vascular</b>	53 (79,1)	44 (81,5)	0,745	50 (78,1)	47 (82,5)	0,551	38 (74,5)	58 (84,1)	0,196	83 (80,6)	14 (77,8)	0,755
<b>Invasão perineural</b>	35 (52,2)	29 (53,7)	0,873	29 (45,3)	35 (61,4)	0,077	24 (47,1)	40 (58,0)	0,236	52 (50,5)	12 (66,7)	0,205
<b>pT2</b>	12 (17,9)	8 (14,8)	0,649	12 (18,8)	8 (14,0)	0,486	10 (19,6)	9 (13,0)	0,330	16 (15,5)	4 (22,2)	0,496
<b>pT3-4</b>	55 (82,1)	46 (85,2)		52 (81,3)	49 (86,0)		41 (80,4)	60 (87,0)		87 (84,5)	14 (77,8)	
<b>Metástase linfonodal</b>	41 (61,2)	41 (75,9)	0,085	40 (62,5)	42 (73,3)	0,189	32 (62,7)	49 (71,0)	0,339	68 (66,0)	14 (77,8)	0,325
<b>Metástase distante</b>	11 (16,4)	10 (18,5)	0,762	11 (17,2)	10 (17,5)	0,959	9 (17,6)	12 (17,4)	0,971	17 (16,5)	4 (22,2)	0,515
<b>Estádio</b>			0,236			0,359	25 (49,0)	26 (37,7)	0,214	46 (44,7)	6 (33,3)	0,370
- I-II	32 (47,8)	20 (37,0)		30 (46,9)	22 (38,6)		26 (51,0)	43 (62,3)		57 (55,3)	12 (66,7)	
- III-IV	35 (52,2)	34 (63,0)		34 (53,1)	35 (61,4)							
<b>Tamanho tumoral (cm)</b>	6,18 $\pm$ 3,29	5,57 $\pm$ 2,54	0,271	5,65 $\pm$ 3,08	6,20 $\pm$ 2,86	0,318	6,16 $\pm$ 3,32	5,74 $\pm$ 2,73	0,458	5,74 $\pm$ 2,90	7,01 $\pm$ 3,36	0,105
<b>média<math>\pm</math>D.P.</b>												



**Tabela A3.** Correlação entre as expressões dos marcadores citoplasmáticos e parâmetros clinicopatológicos no adenocarcinoma gástrico.

	RAD51 citoplasmático			ATR citoplasmático			BRCA1 citoplasmático			BRCA2 citoplasmático		
	positivo n = 100	negativo n = 19	p	positivo n = 45	negativo n = 75	p	positivo n = 113	negativo n = 8	p	positivo n = 47	negativo n = 74	p
<b>Tipo</b>						<b>&lt;0,001</b>			0,208			<b>0,002</b>
<b>histológico</b>	<b>40 (40)</b>	<b>15 (78,9)</b>										
- difuso	47 (47)	2 (10,5)	<b>0,005</b>	12 (26,7)	43 (57,3)		50 (44,2)	6 (75)		13 (27,7)	43 (58,1)	
- intestinal	13 (13)	2 (10,5)		30 (66,7)	19 (25,3)		48 (42,5)	1 (12,5)		28 (59,6)	21 (28,4)	
- misto				3 (6,7)	13 (17,3)		15 (13,3)	1 (12,5)		6 (12,8)	10 (13,5)	
<b>Grau</b>						<b>0,002</b>			0,156			<b>0,003</b>
- 1	12 (12)	0		7 (15,6)	5 (6,7)		12 (10,6)	0		8 (17,0)	4 (5,4)	
- 2	26 (26)	2 (10,5)	0,069	17 (37,8)	11 (14,7)		28 (24,8)	0		16 (34,0)	12 (16,2)	
- 3	62 (62)	17 (89,5)		21 (46,7)	59 (78,7)		73 (64,6)	8 (100)		23 (48,9)	58 (78,4)	
<b>Invasão vascular</b>	82 (82)	13 (68,4)	0,213	35 (77,8)	61 (81,3)	0,637	92 (81,4)	5 (62,5)	0,194	38 (80,9)	59 (79,7)	0,880
<b>Invasão perineural</b>	53 (53)	11 (57,9)	0,695	24 (53,3)	40 (53,3)	1,000	62 (54,9)	2 (25)	0,146	28 (59,6)	36 (48,6)	0,241
<b>pT2</b>	17 (17)	2 (10,5)	0,734	7 (15,6)	13 (17,3)	0,800	18 (15,9)	2 (25)	0,618	6 (12,8)	14 (18,9)	0,375
<b>pT3-4</b>	83 (83)	17 (89,5)		38 (84,4)	62 (82,7)		95 (84,1)	6 (75)		41 (87,2)	60 (81,1)	
<b>Metástase linfonodal</b>	68 (68)	13 (68,4)	0,971	28 (62,2)	53 (70,7)	0,339	78 (69,0)	4 (50)	0,270	34 (72,3)	48 (64,9)	0,391
<b>Metástase distante</b>	17 (17)	4 (21,1)	0,734	4 (8,9)	17 (22,7)	0,055	20 (17,7)	1 (12,5)	1,000	9 (19,1)	12 (16,2)	0,678
<b>Estádio</b>			0,563			0,568			0,724			0,228
- I-II	44 (44)	7 (36,8)		21 (46,7)	31 (41,3)		48 (42,5)	4 (50)		17 (36,2)	35 (47,3)	
- III-IV	56 (56)	12 (63,2)		24 (53,3)	44 (58,7)		65 (57,5)	4 (50)		30 (63,8)	39 (52,7)	
<b>Tamanho tumoral (cm)</b>	5,88±2,98	6,24±3,16	0,645	6,03±3,46	5,85±2,69	0,753	6,03±3,02	4,06±1,49	0,090	6,19±2,56	5,73±3,22	0,421
<b>média±D.P.</b>												

**Tabela A4.** Análise uni e multivariada da sobrevida global.

Sobrevida global <i>Hazard ratio</i> (intervalo de confiança) p	Análise univariada		Análise multivariada**	
	Sem terapia adjuvante ou neoadjuvante	Com terapia adjuvante ou neoadjuvante	População total	
RAD51 nuclear	<b>0,345 (0,123-0,972) 0,044</b>	0,718 (0,370-1,393) 0,327	<b>0,576 (0,334-0,995) 0,048</b>	
RAD51 citoplasmático	2,318 (0,925-5,808) 0,073	1,056 (0,477-2,339) 0,893	1,048 (0,537-2,045) 0,892	
ATR nuclear	1,049 (0,421-2,617) 0,918	1,136 (0,649-1,990) 0,655	1,145 (0,714-1,835) 0,574	
ATR citoplasmático	1,547 (0,574-4,169) 0,388	0,601 (0,344-1,050) 0,074	0,727 (0,449-1,178) 0,196	
ATM (nuclear)	0,222 (0,044-1,107) 0,066	0,39 (0,339-2,602) 0,904	0,691 (0,300-1,594) 0,386	
BRCA2 nuclear	1,323 (0,99-3,505) 0,574	1,482 (0,866-2,536) 0,152	1,401 (0,877-2,237) 0,159	<b>1,764 (1,088-2,860) p=0,021</b>
BRCA2 citoplasmático	2,318 (0,925-5,808) 0,073	0,609 (0,344-1,078) 0,089	0,865 (0,537-1,392) 0,550	
$\gamma$ H2AX (nuclear)	1,108 (0,449-2,735) 0,824	1,396 (0,824-2,366) 0,216	1,310 (0,831-2,066) 0,244	
p53 (nuclear)	1,324 (0,530-3,308) 0,549	1,092 (0,643-1,854) 0,746	1,176 (0,745-1,856) 0,488	
CHK2 (nuclear)*	0,698 (0,249-1,958) 0,494	1,205 (0,711-2,042) 0,489	1,003 (0,631-1,592) 0,991	
BRCA1 nuclear	0,950 (0,340-2,653) 0,923	1,319 (0,597-2,914) 0,494	1,090 (0,587-2,023) 0,784	
BRCA1 citoplasmático	- ***	1,818 (0,656-5,038) 0,250	1,930 (0,704-5,293) 0,202	
Estádio (III-IV vs. I-II)			<b>2,699 (1,638-4,447) &lt;0,001</b>	<b>2,663 (1,604-4,421) p&lt;0,001</b>
Terapia neoadjuvante			<b>0,483 (0,270-0,864) 0,014</b>	<b>0,483(0,266-0,875) p=0,017</b>

\*Para CHK2, hazard ratio dos casos com alta expressão em relação aos de baixa expressão; para os outros marcadores, de casos positivos em relação aos negativos.

\*\*As variáveis avaliadas foram tipo de gastrectomia, tamanho tumoral, tipo histológico, localização tumoral, invasão vascular, estágio, terapia neoadjuvante, infecção por *Helicobacter pylori*, BRCA2 nuclear e RAD51 nuclear. e RAD51 nuclear.

\*\*\*Apenas casos positivos neste grupo.

**Tabela A5.** Análise uni e multivariada da sobrevida livre de doença.

Sobrevida livre de doença	Análise univariada			Análise multivariada**
	Hazard ratio (intervalo de confiança) p	Sem terapia adjuvante ou neoadjuvante	Com terapia adjuvante ou neoadjuvante	
RAD51 nuclear	0,332 (0,110-1,005) 0,51	0,619 (0,327-1,171) 0,141	<b>0,531 (0,308-0,914) 0,022</b>	
RAD51 citoplasmático	0,578 (0,165-2,018) 0,390	1,205 (0,572-2,540) 0,624	1,081 (0,570-2,049) 0,811	
ATR nuclear	0,812 (0,317-2,078) 0,665	1,000 (0,582-1,717) 1,000	0,987 (0,620-1,569) 0,954	
ATR citoplasmático	1,339 (0,469-3,827) 0,586	0,797 (0,475-1,339) 0,392	0,866 (0,547-1,373) 0,541	
ATM (nuclear)	0,339 (0,070-1,641) 0,179	0,672 (0,242-1,861) 0,444	0,531 (0,230-1,226) 0,138	<b>0,358 (0,151-0,851) p=0,020</b>
BRCA2 nuclear	1,435 (0,532-3,870) 0,475	1,257 (0,748-2,111) 0,387	1,283 (0,812-2,028) 0,286	
BRCA2 citoplasmático	1,723 (0,667-4,447) 0,261	0,800 (0,471-1,359) 0,409	0,981 (0,620-1,551) 0,934	
γH2AX (nuclear)	1,039 (0,411-2,628) 0,936	1,063 (0,642-1,758) 0,812	1,041 (0,669-1,619) 0,859	
p53 (nuclear)	1,377(0,542-3,498) 0,501	0,953 (0,574-1,580) 0,851	1,046 (0,671-1,631) 0,842	
CHK2 (nuclear)*	0,757(0,267-2,143) 0,600	1,054 (0,634-1,752) 0,840	0,951 (0,605-1,494) 0,827	
BRCA1 nuclear	1,017 (0,332-3,115) 0,976	0,844 (0,415-1,714) 0,639	0,881 (0,486-1,598) 0,678	
BRCA1 citoplasmático	- ***	1,274 (0,547-2,971) 0,574	1,297 (0,563-2,988) 0,542	
Estádio (III-IV vs. I-II)			<b>3,409 (2,080-5,589) &lt;0,001</b>	<b>3,063 (1,844-5,087) p&lt;0,001</b>
Terapia neoadjuvante			<b>0,501 (0,289-0,868) 0,014</b>	<b>0,447 (0,253-0,789) p=0,006</b>
Tipo de gastrectomia (total vs. subtotal)			<b>1,961 (1,241-3,098) 0,004</b>	<b>1,749 (1,083-2,827) p=0,022</b>

\*Para CHK2, hazard ratio dos casos com alta expressão em relação aos de baixa expressão; para os outros marcadores, de casos positivos em relação aos negativos.

\*\*As variáveis avaliadas foram tipo de gastrectomia, tamanho tumoral, localização tumoral, invasão perineural, invasão vascular, estágio, terapia neoadjuvante, ATM e RAD51 nuclear.

\*\*\*Apenas casos positivos neste grupo.

## Anexo A. Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética do HCFMRP-USP.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	
Ofício nº 3291/2017 CEP/IMGV		
Ribeirão Preto, 01 de novembro de 2017.		
<b>Processo HCRP nº 12349/2017</b>		
Prezados Pesquisadores,		
O trabalho intitulado "IMPACTO DO PERFIL PROTEICO-MOLECULAR DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS", foi analisado "AD REFERENDUM" pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: <b>APROVADO</b> , bem como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.		
<i>De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.</i>		
<i>Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.</i>		
Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.		
Atenciosamente,		
		 <b>DRA. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA</b> Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP
Ilustríssimos Senhores <b>JOEL DEL BEL PADUA</b> <b>PROFA DRA MARIÂNGELA OTTOBONI BRUNALDI (ORIENTADORA)</b> Depto. de Patologia e Medicina Legal		
<hr/> HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Campus Universitário – Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto - SP Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP FIA-03002730; IRB-00002186 e Registro PS/CONEP nº 5440 (16)3602-2228cep@hcrp.usp.br		
<a href="http://www.hcrp.usp.br">www.hcrp.usp.br</a>		