

Kleber Simões do Espírito Santo

**Estudo imuno-histoquímico de enzimas de correção dos
erros de pareamento do DNA em adenocarcinomas
gástricos e suas relações com características clínico-
patológicas e prognóstico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Espírito Santo, Kleber Simões do

Estudo imuno-histoquímico de enzimas de correção dos erros de pareamento do DNA em adenocarcinomas gástricos e suas relações com características clínico-patológicas e prognóstico / Kleber Simões do Espírito Santo. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Venâncio Avancini Ferreira Alves.

Descritores: 1.Neoplasias gástricas 2.Adenocarcinoma/patologia 3.Reparo de erro do pareamento de DNA 4.Instabilidade de microssatélites 5.Prognóstico

USP/FM/SBD-266/09

Dedicatória

A minha esposa Andréa pelo amor, carinho, companheirismo e toda a vida que compartilhamos;

Ao meu pai Cláudio, minha mãe Elisa e minhas irmãs Clarissa e Milena pela vida em família;

Aos meus sogros Rubens (*in memorian*) e Teresa.

Agradecimentos

Agradeço especialmente a orientação do Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves pelo valioso apoio durante a pós-graduação e execução deste trabalho, com seu sempre incomparável entusiasmo e valorização das iniciativas em Medicina Investigativa, sobretudo em nosso campo de atuação, a Patologia;

Aos Profs. Drs. Gustavo Ballejo de Olivera, Fernando de Queiroz Cunha e Sérgio Henrique Ferreira do Depto de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) por não só o apoio nas atividades de iniciação científica durante a graduação, mas por terem despertado meu interesse pela pesquisa e abordagem crítica da geração do conhecimento médico;

Ao Prof. Marcello Franco e todos os professores e amigos do Depto de Patologia da Escola Paulista de Medicina-UNIFESP, pela inestimável contribuição a minha formação profissional na residência médica;

A todos os amigos da Divisão de Patologia do Hospital das Clínicas da FMUSP pelo meu recente acolhimento como médico assistente e valiosas trocas de experiências profissionais e ensinamentos;

A Alda Wakamatsu, Iberê Soares, Rodrigo Réssio, Cinthya Cirqueira e Melissa Ratz do Laboratório de Investigação Médica 14 (LIM-14) da Faculdade de Medicina da USP pelo apoio na confecção dos TMAs, amizade e convívio durante a pós-graduação e numerosas demais atividades em que nos envolvemos;

A todos os amigos da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, em especial a Suely Nonogaki, Cristina Kanamura e Regina Catarino, pela incomparável disponibilidade e contribuição técnica na realização dos ensaios imuno-histoquímicos deste trabalho;

A Carlos Eduardo Jacob da disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Depto de Gastroenterologia da FMUSP pela valiosa revisão do artigo submetido a publicação e auxílio para as análises de sobrevida neste trabalho realizadas;

Aos amigos Rimarcs Gomes Ferreira, Adriano Zanon, Munir, Ziva, Maria, Andréa, Adriana e Valkiria, pelo convívio, eterna amizade e experiências trocadas desde 2005 no Serviço de Patologia do Hospital Luzia de Pinho Melo-UNIFESP em Mogi das Cruzes;

A Adhemar Longatto Filho pela amizade e leitura crítica de partes deste trabalho e do artigo submetido a publicação;

A Cristovam Scapulatempo pela amizade e convívio desde a residência médica, com nossas sempre acaloradas não só discussões de casos, mas reflexões e troca de experiências de vida;

A Profa. Fátima Carneiro da Universidade do Porto e IPATIMUP (Portugal) pela oportunidade de convívio, ensinamentos e amizade;

A Fátima Baltazar, Rui Reis, Celine Pinheiro e Olga Martinho da Universidade do Minho (Braga) pela contribuição científica que desenvolvemos nesse período e os artigos que desta resultaram;

A meus tios Fátima e Haroldo pelo apoio, incentivo e convívio em família;

Aos meus cunhados Rodrigo, Régis, Marcelo e Jorge pela amizade e momentos em família.

Normalização adotada

Esta tese segue as seguintes normas em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver);

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

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

Sumário

Lista de abreviaturas
Lista de tabelas
Lista de figuras
Resumo
Summary

INTRODUÇÃO.....	1
1 Epidemiologia do câncer gástrico.....	2
1.1 Estatísticas epidemiológicas no Brasil de hoje.....	2
1.2 Cenário epidemiológico global e tendências recentes.....	3
2 Determinantes prognósticos em adenocarcinomas gástricos	4
2.1 Variáveis clínicas.....	4
2.1.1 Idade	4
2.1.2 Gênero	6
2.2 Variáveis anátomo-patológicas de implicação prognóstica	7
2.2.1 Localização do tumor primário no estômago.....	7
2.2.2 Tamanho do tumor primário	8
2.2.3 Configuração macroscópica – classificação de Borrmann.....	9
2.2.4 Tipo histológico – classificações de Lauren, OMS e Ming.....	10
2.2.5 Infiltrado inflamatório linfomononuclear e reação estromal desmoplásica.....	14
2.2.6 Infiltração perineural	16
2.2.7 Invasão vascular linfática e venosa.....	17
2.2.8 Profundidade de infiltração da parede, estado das cadeias linfonodais locorregionais e metástases a distância: estadiamento patológico TNM.....	18
3 Alterações moleculares na iniciação e progressão da carcinogênese gástrica.....	19
3.1 Instabilidade de Microssatélites.....	23
3.1.1 Histórico: Fenótipo caracterizado por erros de replicação (RER)/instabilidade de microssatélites (MSI) e síndrome de Lynch/HNPCC	23
3.1.2 Identificação e clonagem dos genes codificadores das enzimas de reparo dos erros de pareamento do DNA (“Mismatch repair enzymes” – enzimas MMR)	26
3.1.3 Detecção “in-situ” das enzimas MMR através de metodologia imuno-histoquímica	28

3.2	Instabilidade de microssatélites (MSI) e imunexpressão das enzimas MMR em adenocarcinomas gástricos, sua relação com características clínico-patológicas e prognóstico	32
3.2.1	Histórico	32
3.2.2	Mecanismos de perda de expressão de enzimas MMR em adenocarcinomas gástricos esporádicos.....	33
3.2.3	Perfil clínico-patológico dos adenocarcinomas gástricos portadores de MSI e sua influência prognóstica.....	36
	OBJETIVOS.....	40
1	Objetivos gerais.....	41
2	Objetivos específicos.....	41
	MÉTODOS.....	43
1	Pacientes e amostras	44
2	Técnica histológica convencional	45
3	Variáveis anátomo-patológicas	46
3.1.	Tipo histológico conforme classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS).....	46
3.2.	Tipo histológico conforme classificação de Lauren	46
3.3.	Tipo histológico conforme classificação de Ming.....	46
3.4.	Nível máximo de infiltração pela neoplasia na parede gástrica	46
3.5	Infiltração neural/perineural	47
3.6	Invasões vasculares venosa e linfática	47
3.7	Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intra/peritumoral.....	47
3.8	Reação estromal desmoplásica.....	48
3.9	Estadiamento patológico do estado das cadeias linfonodais locais/regionais (pN).....	48
3.10	Estadiamento patológico global TNM.....	48
4	Construção das micromatrizes teciduais (TMA)	49
5	Ensaio imunohistoquímico.....	51
5.1	Anticorpos primários utilizados e padronização dos ensaios.....	51
5.2	Controles positivos e negativos usados durante os ensaios imunohistoquímicos	56
5.3	Interpretação dos resultados das reações imunohistoquímicas e critérios para validação dos resultados negativos em secções histológicas convencionais	56
6	Análises estatísticas	58

RESULTADOS.....	60
1 Características clínico-patológicas	61
2 Avaliação imuno-histoquímica da expressão das enzimas de reparo dos erros de pareamento do DNA (MMR)	68
2.1 Aproveitamento da série de casos mediante tecnologia de TMA	68
2.2 Estado de imunoexpressão de cada enzima MMR, inicialmente avaliada em TMA e posteriormente confirmada em secção histológica convencional.....	69
2.3 Co-negatividades e correlação entre o estado das diferentes enzimas MMR	71
3 Associações entre a negatividade para cada uma das enzimas MMR individualmente e as características clínico-patológicas.....	73
3.1 MLH1 (Tabela 5).....	73
3.2 MSH2 (Tabela 6)	76
3.3 MSH6 (Tabela 7)	78
3.4 PMS2 (Tabela 8)	80
3.5 Súmula das associações entre as características clínico-patológicas e os marcadores MMR (Tabela 9)	82
4 Associações entre as co-negatividades para os pares MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6 e as variáveis clínico-patológicas	83
4.1 Co-negatividade para MLH1 e PMS2 (Tabela 10).....	83
4.2 Co-negatividade para MSH2 e MSH6 (Tabela 11)	85
4.3 Súmula das associações entre as co-negatividades para os pares MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6 e as variáveis clínico-patológicas (Tabela 12).....	87
5 Análises univariadas do impacto das variáveis clínico-patológicas e do estado de expressão das enzimas MMR na mortalidade relacionada a doença	88
5.1 Perfil prognóstico.....	88
5.2 Análise univariada do impacto das variáveis clínico-patológicas: curvas de Kaplan-Meyer e determinação de LogRank.....	88
5.3 Análise do impacto das variáveis clínico-patológicas na sobrevida: regressão de Cox univariada e determinação dos 'Hazard Ratios' (HR)	99
5.4 Análise univariada do impacto das diferentes enzimas MMR: curvas de Kaplan-Meyer e determinação de LogRank	101
5.5 Análise do impacto do estado das enzimas MMR na sobrevida: regressão de Cox univariada e determinação dos 'Hazard Ratios' (HR)	105

6	Análises multivariadas do impacto das variáveis clínico-patológicas e estado de expressão das enzimas MMR na mortalidade relacionada a doença: modelos de regressão de Cox.....	107
6.1	Modelo composto exclusivamente pelas variáveis clínico-patológicas.....	107
6.2	Modelos compostos simultaneamente pelas variáveis clínico-patológicas e enzimas MMR.....	109
	DISCUSSÃO.....	114
1	Aspectos epidemiológicos da população estudada e impacto do perfil clínico-patológico da doença no prognóstico.....	116
1.1	Epidemiologia.....	116
1.2	Características patológicas e suas associações prognósticas.....	118
2	Imunoexpressão das enzimas MMR.....	125
2.1	Perfis de imunoexpressão de enzimas MMR em carcinomas gástricos esporádicos.....	125
2.2	Associações entre as perdas de expressão de enzimas MMR e características clínico-patológicas.....	133
2.3	Determinação do impacto prognóstico da perda de expressão das enzimas MMR.....	139
2.4	Perspectivas.....	144
	CONCLUSÕES.....	146
	ANEXOS.....	150
	Anexo A. Associação entre local do tumor primário no estômago e profundidade máxima de infiltração da parede do órgão, estado das cadeias linfonodais locorregionais e estadiamento TNM.....	151
	Anexo B. Associações entre tamanho do tumor primário (distribuição em relação a mediana) e estado das cadeias linfonodais locorregionais e estadiamento patológico TNM.....	151
	Anexo C. Distribuição da profundidade de infiltração da parede pelos carcinomas gástricos e tamanho do tumor primário em relação ao padrão histológico de Ming.....	152
	Anexo D. Associações entre local do tumor primário e padrões histológicos conforme as classificações de OMS e Lauren ...	152
	REFERÊNCIAS.....	153
	APÊNDICE: Trabalho submetido a publicação no Virchows Archiv	

Lista de Abreviaturas

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CIMP	Fenótipo metilador de ilhotas CpG
CIN	instabilidade cromossômica ("chromosomal instability")
cm	Centímetros
D.P.	desvio padrão da média
DAB	tetrahydrocloroto de diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
hMLH1	gene codificador para a proteína MLH1
hMSH2	gene codificador para a proteína MSH2
hMSH6	gene codificador para a proteína MSH6
HPCC	Síndrome do câncer colorretal hereditário não associado a polipose
hPMS2	gene codificador para a proteína PMS2
HR	hazard ratio
I.A.	Índice de aproveitamento
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC95%	Intervalo de confiança 95%
IHC	imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IUAC	<i>International Union Against Cancer</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KM	Kaplan Meyer
L.I.	limite inferior
L.S.	limite superior
LIM-14	Laboratório de Investigação Médica 14
LOH	perda de heterozigosidade (<i>loss of heterozygosity</i>)
M:F	Proporção Masculino:Feminino
MLH1	proteína MLH1
mm	Milímetros
MMR	correção de erros de pareamento (<i>mismatch repair</i>)
MSH2	proteína MSH2
MSH6	proteína MSH6
MSI	instabilidade de microssatélites (<i>microsatellite instability</i>)
MSI-H	fenótipo microssatélite instável de alta frequência
MSI-L	fenótipo microssatélite instável de baixa frequência
MSS	fenótipo microssatélite estável

NCI	Instituto Nacional do Câncer dos EUA (<i>National Cancer Institute</i>)
NIH	Instituto Nacional de Saúde dos EUA (<i>National Institutes of Health</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	nível de significância estatística
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	potencial hidrogeniônico
PMS2	proteína PMS2
pN	estadiamento patológico do parâmetro "N" (cadeias linfonodais)
pT	estadiamento patológico do parâmetro "T" (tumor)
RER	fenótipo portador de erros de replicação (<i>replication error</i>)
rho	índice de correlação de Spearman
SP	São Paulo
TMA	micromatriz tecidual (<i>tissue microarray</i>)
TNM	estadiamento Tumor - LinfoNodo - Metástase
USP	Universidade de São Paulo

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Sumário da distribuição das variáveis clínico-patológicas registradas.....	64
Tabela 2 -	Sumário dos resultados obtidos em TMA e os considerados definitivamente como negativos nas secções convencionais.....	71
Tabela 3 -	Frequência absoluta e percentual de todos os possíveis perfis de expressão de enzimas MMR.....	72
Tabela 4 -	Correlações entre o estado de expressão das diferentes enzimas MMR.....	73
Tabela 5 -	Estado do tumor primário para MLH1 e as variáveis clínico-patológicas.....	75
Tabela 6 -	Estado do tumor primário para MSH2 e as variáveis clínico-patológicas.....	77
Tabela 7 -	Estado do tumor primário para MSH6 e as variáveis clínico-patológicas.....	79
Tabela 8 -	Estado do tumor primário para PMS2 e as variáveis clínico-patológicas.....	81
Tabela 9 -	Sumário das associações entre o estado de expressão das enzimas MMR individualmente e as variáveis clínico-patológicas.....	82
Tabela 10 -	Co-negatividade para MLH1 e PMS2 e as variáveis clínico-patológicas.....	84
Tabela 11 -	Co-negatividade para MSH2 e MSH6 e as variáveis clínico-patológicas.....	86
Tabela 12 -	Sumário das associações entre o estado de expressão dos pares heterodiméricos e as variáveis clínico-patológicas da presente série.....	87
Tabela 13 -	Parâmetro (LogRank) e significância (p) das análises univariadas de sobrevida para as características clínico-patológicas	98
Tabela 14 -	Análises univariadas de Cox para determinação do impacto das características clínico-patológicas na sobrevida	100
Tabela 15 -	Parâmetro (LogRank) e significância (p) das análises univariadas de sobrevida para o estado de expressão das enzimas MMR pelos tumores primários.....	105

Tabela 16 - Sumário dos parâmetros obtidos nas análises univariadas de Cox para o impacto do estado de expressão das enzimas MMR na sobrevida	106
Tabela 17 - Análise multivariada (regressão de Cox) para determinação da contribuição diferencial dos parâmetros clínico-patológicos na mortalidade relacionada a doença.....	108
Tabela 18 - Análise multivariada (regressão de Cox) para determinação da contribuição do estado de expressão de MLH1 pelo tumor primário na mortalidade relacionada a doença.....	109
Tabela 19 - Análise multivariada (regressão de Cox) para determinação da contribuição do estado de expressão de MSH6 pelo tumor primário na mortalidade relacionada a doença.....	110
Tabela 20 - Análise multivariada (regressão de Cox) para determinação da contribuição do estado de expressão de PMS2 pelo tumor primário na mortalidade relacionada a doença.....	111
Tabela 21 - Análise multivariada (regressão de Cox) para determinação da contribuição do estado de expressão de MSH2 e MSH6 pelo tumor primário na mortalidade relacionada a doença	112
Tabela 22 - Análise multivariada (regressão de Cox) para determinação da contribuição do estado de expressão de MLH1 e PMS2 pelo tumor primário na mortalidade relacionada a doença	113

Lista de Figuras

Figura 1.	Características patológicas avaliadas ao exame histológico	65
Figura 2.	Padrão de imunoexpressão das enzimas MMR em carcinomas gástricos	70
Figura 3.	Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do sexo na mortalidade relacionada a doença	90
Figura 4.	Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto da idade na mortalidade relacionada a doença	90
Figura 5.	Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do local do tumor primário na mortalidade relacionada a doença	91
Figura 6.	Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do tamanho do tumor primário na mortalidade relacionada a doença	91
Figura 7.	Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do tipo macroscópico de Borrmann na mortalidade relacionada a doença	92
Figura 8.	Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do tipo histológico segundo a OMS na mortalidade relacionada a doença	92
Figura 9.	Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do tipo histológico de Ming na mortalidade relacionada a doença.....	93
Figura 10.	Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do tipo histológico de Lauren na mortalidade relacionada a doença	93
Figura 11.	Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto da profundidade de infiltração da parede na mortalidade relacionada a doença.....	94
Figura 12.	Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do infiltrado linfomononuclear intra-tumoral na mortalidade relacionada a doença.....	94
Figura 13.	Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto da reação estromal desmoplásica na mortalidade relacionada a doença....	95
Figura 14.	Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto da infiltração vascular linfática na mortalidade relacionada a doença	95

Figura 15. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto da infiltração vascular venosa na mortalidade relacionada a doença	96
Figura 16. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto da infiltração perineural na mortalidade relacionada a doença	96
Figura 17. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do estado das cadeias linfonodais locorregionais na mortalidade relacionada a doença.....	97
Figura 18. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do estadiamento TNM na mortalidade relacionada a doença.....	97
Figura 19. Curvas de Kaplan-Meyer ilustrando o impacto do estado de expressão de MLH1 individualmente avaliado na mortalidade relacionada a doença.....	102
Figura 20. Curvas de Kaplan-Meyer ilustrando o impacto do estado de expressão de MSH2 individualmente avaliado na mortalidade relacionada a doença.....	102
Figura 21. Curvas de Kaplan-Meyer ilustrando o impacto do estado de expressão de MSH6 individualmente avaliado na mortalidade relacionada a doença.....	103
Figura 22. Curvas de Kaplan-Meyer ilustrando o impacto do estado de expressão de PMS2 individualmente avaliado na mortalidade relacionada a doença.....	103
Figura 23. Curvas de Kaplan-Meyer ilustrando o impacto do estado de expressão do par MLH1/PMS2 na mortalidade relacionada a doença	104
Figura 24. Curvas de Kaplan-Meyer ilustrando o impacto do estado de expressão do par MSH2/MSH6 na mortalidade relacionada a doença	104

Resumo

Espírito Santo KS, *Estudo imuno-histoquímico de enzimas de correção dos erros de pareamento do DNA em adenocarcinomas gástricos e suas relações com características clínico-patológicas e prognóstico* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 175p.

OBJETIVOS: Caracterizar o perfil de imunoexpressão de MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 em adenocarcinomas gástricos, explorando seu desempenho na identificação de características clínicas e patológicas, bem como sua influência prognóstica isolada e em relação aos demais parâmetros.

MÉTODOS: Cento e trinta e três casos de adenocarcinomas gástricos esporádicos localmente avançados (pT2a ou mais) operados no Hospital das Clínicas/FMUSP foram incluídos pela ausência de metástases a distância ao diagnóstico (M0) e caracterizados clínica (idade, sexo e sobrevida) e patologicamente (tamanho, local, tipo de Borrmann, tipo histológico, infiltração vascular, perineural e variáveis de estadiamento locorregional). Amostras de 1,0 mm foram dispostas em micromatrizes teciduais (TMA) para pesquisa imuno-histoquímica das enzimas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, com detecção por sistema de polímeros curtos conjugados a peroxidase. Casos com resultados negativos ou incertos nas amostras de TMA tiveram repetidas as reações em seções convencionais. A associação entre o estado de expressão dos marcadores com variáveis clínico-patológicas foi avaliada através do teste do qui-quadrado ou exato de Fisher. O impacto dos parâmetros clínico-patológicos e estado de expressão das enzimas na sobrevida foi explorado em modelos uni e multivariados de Cox, com construção de curvas de Kaplan-Meyer. Todas as análises estatísticas foram consideradas significativas ao nível de $p < 0,05$.

RESULTADOS: Quarenta e cinco casos (33,6%) exibiram perda de expressão de ao menos uma enzima, sendo frequente a perda de duas (9/45: 20%), três (14/45:31,2%) ou quatro enzimas (7/45:15,5%). Anormalidade mais frequente ocorreu com o MLH1 (26,7%), seguida de MSH6 (23%), PMS2 (21%) e MSH2 (20,8%). Quando avaliadas em conjunto, houve correlação entre o estado de expressão de todos os possíveis pares, com destaque para MLH1/PMS2 ($\rho=0,467$, $p < 0,001$) e MSH2/MSH6 ($\rho=0,666$, $p < 0,001$). Perda de MLH1 associou-se a tipos I/II de Borrmann ($p < 0,001$), fenótipo intestinal de Lauren ($p=0,005$), tubular/túbulo-papilífero ($p=0,009$), expansivo de Ming ($p=0,027$) e infiltração em muscular própria ($p=0,011$). Com relação a perda de MSH2, tipos I/II de Borrmann ($p < 0,001$), padrões tubular/túbulo-papilífero ($p=0,008$), intestinal ($p=0,001$), expansivo ($p=0,001$), infiltração da muscular própria ($p=0,025$), reação desmoplásica ausente a discreta ($p=0,021$) e ausência de infiltração perineural ($p=0,016$) foram mais frequentes. Perda de MSH6 associou-se aos tipos macroscópicos de Borrmann e histológicos de Lauren, OMS e Ming ($p < 0,001$) e ausência de infiltração perineural ($p=0,036$). Idade mais avançada ($p=0,046$), tipos I/II de Borrmann ($p=0,002$), padrão intestinal de Lauren ($p=0,021$) e menos frequente infiltração perineural ($p=0,035$) foram identificados nos casos com perda de PMS2. A co-negatividade para os

pares MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6, além de reproduzir as associações mencionadas, identificou infiltrado linfoplasmocitário intra/peritumoral acentuado ($p=0,011$ e $p=0,013$), reação estromal desmoplásica ausente a leve para MSH2/MSH6 ($p=0,037$) e tamanho maior do tumor primário para MLH1/PMS2 ($p=0,021$). Pior sobrevida associou-se ao sexo masculino (LogRank: 5,11, $p=0,024$), tamanho do tumor (3,98, $p=0,046$), tipos III/IV de Borrmann (4,75, $p=0,029$), histologia mucinosa/“anel-de-sinete” da OMS (8,61, $p=0,003$) e difuso (11,62, $p=0,003$), infiltração perineural (12,62, $p<0,001$), metástase linfonodal (23,25, $p<0,001$) e estadio TNM (35,60, $p<0,001$) em análises univariadas. Melhor sobrevida associou-se a perda de MLH1, MSH6 e PMS2 isoladamente (5,46, $p=0,019$; 6,08, $p=0,014$; 7,46, $p=0,006$) e dos pares MLH1/PMS2 (7,89, $p=0,005$) e MSH2/MSH6 (5,29, $p=0,021$). Em modelos multivariados compostos pelos parâmetros clínico-patológicos, apenas o sexo masculino (HR=2,42, $p=0,047$), tipo histológico difuso (4,94, $p=0,037$) e estadios II, IIIA e IV (2,23, $p=0,088$; 3,12, $p=0,022$; 33,24, $p=0,005$), constituíram variáveis independentes de determinação prognóstica. Nas análises multivariadas incluindo o estado de expressão das enzimas, evidenciou-se que as perdas de PMS2 e do par MLH1/PMS2 associaram-se significativamente a maior sobrevida (3,84, $p=0,029$ e 9,82, $p=0,028$). **CONCLUSÕES:** O presente estudo demonstra o valor da imunohistoquímica na identificação de alterações na expressão de enzimas MMR, sendo a mais frequentemente negativa a MLH1. A frequente co-negatividade aponta para a importância da dimerização na funcionalidade do sistema de reparo. A perda isolada destes marcadores, e especialmente do par MLH1/PMS2, define perfil clínico-patológico característico, permitindo avanços no conhecimento previamente atribuído a fenótipo microssatélite instável conforme determinado em métodos moleculares. Em análises multivariadas, o estado de expressão de PMS2 isoladamente ou do par MLH1/PMS2 constitui fator independente de determinação prognóstica.

Descritores: 1.Neoplasias gástricas 2.Adenocarcinoma/patologia
3.Reparo de erro do pareamento de DNA 4.Instabilidade de microssatélites
5.Prognóstico

Summary

Espírito Santo KS, *Immunohistochemical study of DNA mismatch-repair enzymes in gastric carcinomas and their relation to clinico-pathological features and prognosis* [thesis], 178p, São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 175p.

OBJECTIVES: To characterize immunoexpression profile of MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 in gastric adenocarcinomas, exploring its performance to identify distinctive clinico-pathological features, as well as their prognostic implications in univariate and multivariate analyses. **METHODS:** A hundred and thirty three cases of locally advanced (pT2a or higher) sporadic gastric adenocarcinomas operated on Hospital das Clínicas/FMUSP were included due to absence of distant metastases at diagnosis (M0). Clinical (age, gender and survival) and pathological features (size, local, Borrmann's type, histological type, vascular and perineural infiltration and locoregional staging parameters) were characterized. One millimeter samples were placed on tissue microarray blocks (TMA) and immunohistochemical detection of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 performed on obtained sections, with revelation developed by peroxidase conjugated short-polymer based reagents. Negative or equivocal results obtained with TMA samples were repeated on conventional sections. Association between expression status for these markers and clinico-pathological features were evaluated by chi-square or Fisher's exact test when appropriate. Impact of clinico-pathological features and expression status on disease specific survival were explored by Cox uni and multivariate models, with Kaplan-Meyer curves being fitted to illustrate these. All statistical results were considered significant at $p < 0,05$. **RESULTS:** Forty five cases (33.6%) showed loss of at least one mismatch-repair enzyme, being frequent loss of two (9/45: 20%), three (14/45:31.2%) or even the four evaluated enzymes (7/45:15.5%). The most frequent abnormality addressed MLH1 (26.7%), followed by MSH6 (23%), PMS2 (21%) and MSH2 (20.8%). When analyses were performed in conjunction, correlation was identified for the expression status of all possible pairs, mainly the functional heterodimers MLH1/PMS2 ($\rho=0.467$, $p < 0.001$) and MSH2/MSH6 ($\rho=0.666$, $p < 0.001$). MLH1 loss was associated to Borrmann's types I/I ($p < 0.001$), Lauren's intestinal phenotype ($p=0.005$), tubular/tubulo-papillary architecture ($p=0.009$), Ming's expansile type ($p=0.027$) and infiltration limited by muscular propria ($p=0.011$). Among cases showing MSH2 loss, Borrmann's I/I ($p < 0.001$), tubular/tubulo-papillary ($p=0.008$), intestinal ($p=0.001$), expansile ($p=0.001$), muscular propria infiltration ($p=0.025$), absent to mild stromal desmoplasia ($p=0.021$) and absent perineural infiltration ($p=0.016$) were more frequent. MSH6 loss was associated to Borrmann's gross type and Lauren, WHO and Ming's histological types ($p < 0.001$), as well as absent perineural infiltration ($p=0.036$). More advanced age ($p=0.046$), Borrmann's types I/I ($p=0.002$), Lauren's intestinal morphology ($p=0.021$) and less frequent perineural infiltration ($p=0.035$) were identified as associated to PMS2 loss. Co-negativity for MLH1/PMS2 and MSH2/MSH6 pairs resumed all the above

mentioned associations and additionally identified heavy lymphoplasmacytic infiltrate ($p=0.011$ e $p=0.013$), absent to mild stromal desmoplasia for MSH2/MSH6 ($p=0.037$) and increased primary tumor size for MLH1/PMS2 ($p=0.021$). In univariate analyses, decreased disease-specific survival was associated to male gender (LogRank: 5.11, $p=0.024$), tumor size (3.98, $p=0.046$), Borrmann's types III/IV (4.75, $p=0.029$), mucinous/"signet-ring" cell morphology according to WHO (8.61, $p=0.003$) and Lauren's diffuse morphology (11.62, $p=0.003$), perineural infiltration (12.62, $p<0.001$), lymph node metastases (23.25, $p<0.001$) and TNM staging (35.60, $p<0.001$). Better survival was seen in cases showing loss of MLH1, MSH6 and PMS2 when individually analyzed (5.46, $p=0.019$; 6.08, $p=0.014$; 7.46, $p=0.006$), as well as MLH1/PMS2 (7.89, $p=0.005$) and MSH2/MSH6 heterodimeric pairs (5.29, $p=0.021$). In multivariate models addressing clinico-pathological features, only male gender (HR=2.42, $p=0.047$), diffuse histological type (4.94, $p=0.037$) and stages II, IIIA and IV (2.23, $p=0.088$; 3.12, $p=0.022$; 33.24, $p=0.005$, respectively) were independent prognostic features. Multivariate analyses including status of MMR enzymes and the most significant clinico-pathological features disclosed that PMS2 and MLH1/PMS2 losses were independent predictors of increased disease-specific survival (3.84, $p=0.029$ e 9.82, $p=0.028$). **CONCLUSIONS:** The present study demonstrates immunohistochemical detection of mismatch-repair enzymes as a tool to identify losses of these markers, being the most frequently negative MLH1. The frequently observed co-negativity points toward the importance of heterodimerization of these proteins in functional activity of mismatch-repair system. Losses of these markers, mainly MLH1/PMS2 pair, define a distinctive clinico-pathological profile and add knowledge to the previously reported associations with microsatellite instability as defined by molecular approach. In multivariate analyses, expression status of PMS2, as well as MLH1/PMS2 pair, revealed independent prognostic impact on disease-specific survival.

Descriptors: 1.Gastric neoplasms 2.Adenocarcinoma/pathology 3.DNA mismatch repair 4.Microsatellite instability 5.Prognosis

INTRODUÇÃO

1 Epidemiologia do câncer gástrico

1.1 Estatísticas epidemiológicas no Brasil de hoje

No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer gástrico representa a terceira neoplasia maligna mais incidente em homens e a quinta em mulheres com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2008 (1) apontando para 14.080 casos novos em homens (14,92 por 100.000 habitantes) e 7.720 casos novos em mulheres (7,93 por 100.000 habitantes).

Reproduzindo distribuição heterogênea observada em diferentes países do mundo, as estimativas do INCA revelam importantes diferenças por regiões do Brasil. No norte e nordeste, o câncer de estômago em homens é o segundo mais incidente (9,92/100.000 e 9,18/100.000 habitantes, respectivamente). Já no sudeste é a quarta neoplasia maligna mais frequente (18,01/100.000 habitantes), ocupando posição intermediária nas regiões sul (20,94/100.000) e centro-oeste (12,18/100.000), nas quais destaca-se na terceira posição. Nas mulheres, representa a quinta neoplasia mais incidente nas regiões sudeste (9,47/100.000), sul (10,44/100.000) e centro-oeste (6,01/100.000), a terceira na região norte (5,44/100.000) e a quarta no nordeste (5,45/100.000).

1.2 Cenário epidemiológico global e tendências recentes

No mundo, o câncer gástrico atualmente representa a quarta neoplasia maligna mais incidente e a segunda causa de mortalidade por neoplasias, superado apenas pelas pulmonares (2, 3). Apesar da tendência histórica global de contínua redução da incidência e mortalidade nas últimas seis décadas, diferentes ritmos são observados a depender da região considerada (4). Tal fato contribui para a disparidade destes indicadores epidemiológicos quando confrontados os dados de países industrializados ocidentais com os de áreas de maior incidência como Japão, Coréia, China, Portugal, costa pacífica da América do Sul e países em desenvolvimento. A redução mais gradual da incidência nestes países tem sido atribuída a maior prevalência e exposição a fatores de risco, notadamente infecção por *Helicobacter pylori* e hábitos dietéticos como maior consumo de sal e alimentos defumados e baixa ingestão de frutas e vegetais. Características genéticas predisponentes e ainda incompletamente elucidadas destas populações também são apontadas como responsáveis pelo quadro epidemiológico diverso.

Ainda que o tratamento do câncer gástrico tenha se aprimorado nas últimas décadas tanto do ponto de vista cirúrgico, como exemplificado pelas cada vez mais amplas disseções linfonodais com menor morbi-mortalidade pós-operatória imediata, bem como pela implementação de regimes quimioterápicos adjuvantes, a mortalidade permanece globalmente elevada,

com figuras de sobrevida em cinco anos raramente ultrapassando 30% na maioria dos países. Exceção a esta regra é representada pelo Japão, país no qual o impacto epidemiológico desta doença reivindicou a implantação de estratégias de rastreio populacional para diagnóstico precoce, acarretando taxas globais de sobrevida em cinco anos em torno de 52% e até 80% no grupo de neoplasias diagnosticadas em estadios precoces (2).

Considerando o cenário acima exposto, esforços têm sido dirigidos não somente a redução da prevalência dos fatores de risco com consequente redução da incidência e melhora das técnicas de tratamento, mas também a melhor compreensão da biologia da doença e busca ativa, através de estudos retrospectivos e prospectivos, de características que permitam melhor estratificar e definir risco de progressão e pior prognóstico, com isso estabelecendo estratégias terapêuticas individualizadas com expectativa de aumento em sua eficácia.

2 Determinantes prognósticos em adenocarcinomas gástricos

2.1 Variáveis clínicas

2.1.1 Idade

O impacto da idade no prognóstico dos pacientes submetidos a tratamento clínico-cirúrgico para adenocarcinoma gástrico tem sido reportado de forma variável na literatura, possivelmente em virtude do

estudo de diferentes populações, submetidas a diferentes protocolos de tratamento e com diferentes parâmetros de desfecho clínico selecionados para aferir o prognóstico.

Kim et al (5) reportaram, em série de 10.783 pacientes, menor sobrevida em 5 anos em pacientes acima de 65 anos quando comparados com aqueles abaixo desta idade.

Saito et al (6) publicaram estudo em série de 1.473 pacientes com adenocarcinomas gástricos submetidos a ressecção curativa e identificaram que, apesar de no grupo de pacientes definidos pelos autores como idosos (acima de 70 anos) conforme critério de Maehara et al (7), ter sido menos frequente linfadenectomia D2/3 ou quimioterapia adjuvante e, ainda, serem mais frequentes neoplasias exibindo invasão vascular linfática, ainda assim a idade mais avançada constituiu fator prognóstico negativo independente quando inserida em modelos multivariados com estes demais parâmetros.

Já Sanchez-Bueno et al (8) reportaram que a idade não se mostrou associada a pior prognóstico, quer em análises uni ou multivariadas, reproduzindo dados previamente reportados por Shiu et al (9).

Park et al (10) recentemente publicaram estudo compreendendo série consecutiva de 3.362 adenocarcinomas gástricos, identificando associação entre idade abaixo de 45 anos e melhor sobrevida em 5 anos em relação aos grupos com idades entre 46 e 70 anos ou acima de 71 anos. Interessantemente, apesar da melhor sobrevida, reportaram que no subgrupo de doentes mais jovens foram mais frequentemente identificadas

neoplasias proximais e de fenótipo pouco diferenciado e difuso ou de células em “anel-de-sinete”, variáveis estas classicamente descritas como associadas a pior prognóstico.

2.1.2 Gênero

A maior incidência de carcinoma gástrico no sexo masculino foi sempre relatada, com a razão M:F atualmente em torno de 2:1 (3), podendo chegar a 5:1 quando consideradas apenas as lesões proximais do cárdia, conforme relatado por El-Serag et al (11) ao estudarem a distribuição desta doença conforme os parâmetros demográficos da população norte-americana.

Embora seja relatada ausência de impacto do gênero na evolução dos carcinomas gástricos em alguns estudos (8, 10, 12), Maguire et al (13) relataram o sexo masculino como fator independente de pior sobrevida em regiões selecionadas da Espanha, mantendo-se esta associação nas análises corrigidas por estadió. Achados semelhantes foram também publicados por Kim et al (5).

No entanto, Maehara et al (14), em série de 1.031 pacientes cirurgicamente tratados, relataram pior sobrevida em 10 anos para as doentes do sexo feminino, assim como Park et al (10) que detectaram maior mortalidade relacionada a doença em 5 anos quando a análise endereçou apenas as mulheres abaixo dos 45 anos, no entanto, não se mantendo tal associação nas análises multivariadas.

2.2 Variáveis anátomo-patológicas de implicação prognóstica

2.2.1 Localização do tumor primário no estômago

O local de origem dos adenocarcinomas no estômago tem sido relacionado a diferentes características clínico-patológicas e epidemiológicas, inclusas as diferentes tendências históricas identificadas em áreas de baixa e alta incidência. Relativo aumento nos carcinomas proximais em áreas de menor incidência e redução da prevalência da doença em topografia corpóreo/antral em áreas de ainda elevada incidência têm sido atribuídas a progressiva redução do número de casos de carcinomas de padrão intestinal/tubular relacionados a sequência gastrite/atrofia/metaplasia/displasia/carcinoma (3).

Rohde et al (15), buscando os determinantes de pior prognóstico nos carcinomas gástricos proximais, identificaram associação entre esta localização e sexo masculino, idade menor de 65 anos, estadió avançado e portanto maior índice de ressecções consideradas não curativas/paliativas, além de tendência a pior sobrevida.

Em grandes séries de neoplasias gástricas, tumores do terço gástrico proximal apresentaram pior sobrevida em cinco anos quando comparadas as do estômago médio ou distal (5, 10). Identificou-se que estas lesões são menos frequentemente de estadió T1 ao diagnóstico quando comparadas às distais, assim como mais frequentes as metástases linfonodais associadas, acarretando, portanto, pior sobrevida em 5 anos conforme estudo recentemente publicado por Kim et al (16). Pacelli et al (17) também

demonstraram que a localização proximal comportou-se como fator independente de pior prognóstico em estudo compreendendo 707 pacientes submetidos a gastrectomia curativa ou paliativa por carcinoma gástrico.

2.2.2 Tamanho do tumor primário

Em neoplasias de sítios primários como pulmão, mama e tireóide o tamanho do tumor primário é incluído no sistema de estadiamento, compondo o parâmetro “T” do sistema TNM 2002 conforme definido pela AJCC/IUAC (18). Para as neoplasias gástricas, apesar de explorada a associação entre tamanho do tumor primário e sobrevida (5, 8, 19), o verdadeiro impacto prognóstico e as associações clínico-patológicas do tamanho da lesão primária foram somente recém elucidados.

Saito et al (20), em 1.473 pacientes submetidos a gastrectomia curativa, determinaram que o limite a partir do qual passou a ser identificado impacto negativo na sobrevida foi 8 cm, sendo as neoplasias acima deste tamanho mais frequentemente pouco diferenciadas e, apresentando, ao exame histológico, mais frequente infiltração vascular venosa e/ou linfática, maior profundidade de infiltração na parede gástrica e metástases linfonodais. Determinaram ainda que, juntamente com os parâmetros supracitados, o tamanho da lesão constituiu fator prognóstico independente.

Estudo recente publicado por Liu et al (21) identificou que, em coorte de 273 pacientes com carcinoma gástrico de estadio T3, houve associação entre o tamanho maior da lesão e fatores classicamente descritos como de pior prognóstico, tais como infiltração vascular linfática, mantendo-se

também como parâmetro independente de determinação prognóstica em modelos multivariados.

Resultados semelhantes têm sido reportados em trabalhos recentes publicados por grupos independentes (22-24), levando a sugestão para a incorporação deste simples parâmetro obtido ao exame macroscópico como estratificador de prognóstico e, portanto, como elemento de auxílio na tomada de decisões clínico-cirúrgicas e terapêuticas em pacientes com diagnóstico de câncer gástrico.

2.2.3 Configuração macroscópica – classificação de Borrmann

Desde a descrição original no ano de 1926 (25, 26), os padrões macroscópicos da classificação de Borrmann (I-polipóide, II-vegetante, III-ulcerado, IV- infiltrativo) têm sido utilizados para efeito de descrição endoscópica e/ou macroscópica das neoplasias gástricas, auxiliando na tomada de decisões terapêuticas, tal como determinação da ressecabilidade da lesão e portanto extensão do tratamento cirúrgico a ser realizado. Associações destes padrões, principalmente o infiltrativo (IV), com parâmetros anátomo-patológicos indicativos de prognóstico adverso foram relatados, incluindo histologia indiferenciada ou de células em “anel-de-sinete”, infiltração de serosa/disseminação peritoneal, metástases linfonodais e pior sobrevida em cinco anos independente do estadió, conforme descrito por Kim et al (27). Recentemente, An et al (28), em série de 4.191 casos confirmaram tais associações, bem como puderam determinar o efeito prognóstico negativo e independente deste tipo

macroscópico em modelos multivariados com a participação de outras variáveis classicamente descritas como determinantes de desfecho clínico, incluindo ressecabilidade da lesão, parâmetros de estadiamento (TNM) e tratamento quimio-radioterápico adjuvante.

2.2.4 Tipo histológico – classificações de Lauren, OMS e Ming

As neoplasias gástricas compõem lesões morfológicamente heterogêneas, ressaltando-se ainda a heterogeneidade quando consideradas diferentes áreas de um mesmo tumor. O fato de diferentes sistemas terem sido usados com a finalidade de classificar histologicamente os carcinomas gástricos possivelmente reflete que nenhum seja completo em obter exequibilidade, reprodutibilidade e significados clínico e biológico, estes últimos principalmente no que diz respeito ao impacto no estadiamento e conseqüentemente na extensão adequada do tratamento cirúrgico a se realizar, bem como na predição de desfecho prognóstico (29).

Ainda hoje, dentre os sistemas de classificação mais amplamente utilizados, encontra-se o descrito por Lauren (30) e que divide os carcinomas gástricos em tipos histológicos intestinal e difuso a depender da disposição e inter-relação das células neoplásicas. Caracteriza o primeiro a coesividade, formação glandular e de blocos de células tumorais e o segundo o crescimento dispersivo e discoeso das células neoplásicas em meio a estroma desmoplásico, frequentemente contendo vacúolos citoplasmáticos de mucina que rechaçam o núcleo ao pólo oposto da célula, definindo a semelhança desta com o “anel-de-sinete”. Dentre 85 a 90% dos carcinomas

gástricos são classificáveis em uma destas categorias, representando o tipo intestinal cerca de 80% das lesões nas áreas endêmicas de maior incidência e mais frequentemente localizadas no antro, com 10% a 15% representadas por carcinomas difusos, estes de incidência em progressivo aumento relativo nestas mesmas regiões (31). Os restantes 5 a 10% representam neoplasias de fenótipo misto ou de tipos histológicos especiais ou ainda não glandulares (32).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em publicação do ano 2000 considera, para efeito de classificação histológica, o padrão de arranjo arquitetural dos adenocarcinomas gástricos, dividindo-os basicamente nos subtipos a seguir morfológicamente definidos (26, 32):

Tubular: constituído por glândulas dilatadas e/ou anastomosantes, revestidas por células tumorais colunares ou cuboidais que podem conter mucina citoplasmática. Os núcleos exibem atipias que variam de baixo a alto grau;

Papilífero: representado por carcinomas frequentemente bem diferenciados e de conformação macroscópica exofítica, arquiteturalmente predominando eixos fibroconjuntivo-vasculares longos e delicados, revestidos por células neoplásicas colunares/cuboidais que exibem atipias de baixo grau;

de células em “anel-de-sinete”: composto por células que infiltram a parede de forma isolada, sendo que em mais de 50% destas são identificados vacúolos de mucina intra-citoplasmática positivos as reações histoquímicas de PAS e azul de alcian. Tais

vacúolos rechaçam o núcleo a periferia da célula e impõem aspecto classicamente identificado como de células em “anel-de-sinete”. Tal fenótipo celular predomina na porção mais superficial da lesão, com a tendência, ao aproximar-se da profundidade, de que as células tornem-se menos conspícuas por estarem imersas em estroma acentuadamente desmoplásico. Este fenótipo corresponde ao difuso da classificação de Lauren (30).

Carcinoma mucinoso: sinônimo da antiga designação de carcinoma colóide e, de forma semelhante aos demais órgãos onde é descrito, por definição constituído em mais de 50% da sua extensão por lagos extracelulares de mucina. Em relação a substância mucóide, as células neoplásicas estão perifericamente dispostas, compondo grupamentos irregulares ou livremente dispersas. Células em “anel-de-sinete” podem também estar presentes, porém não dominam o quadro morfológico.

A classificação originalmente publicada por Ming na década de 1970 (33), buscando identificar elementos morfológicos definidores de comportamento biológico, estabeleceu dois tipos principais de adenocarcinomas gástricos quando avaliado o padrão de crescimento e invasividade em relação a parede gástrica: infiltrativo e expansivo. O primeiro foi identificado em 67% da série estudada (114/171 casos) e caracterizado pela formação de blocos coesos de células neoplásicas, independentemente do grau de maturação e/ou diferenciação celular

observado. Os limites destes blocos foram descritos como circunscritos, com aspecto de crescimento por expansão em relação ao estroma adjacente. Com relação a diferenciação da neoplasia, o aspecto mais comum foi o de formação glandular neste grupo, no entanto, padrões sólido, de eventuais glândulas e/ou células isoladas e de lagos de mucina contendo glândulas esparsas também puderam ser observados. No restante 33% da série (57/171 casos), o tipo definido foi o denominado infiltrativo e caracterizado por ampla e profunda infiltração da parede por células isoladas e/ou pequenos grupamentos glandulares, ocorrendo em toda ou na maior parte da neoplasia. O autor pôde ainda observar que, em relação aos infiltrativos, os tumores expansivos eram de padrão macroscópico predominantemente polipóide, superficial ou vegetante, acometiam mais frequentemente a região antro-pilórica e menos o estômago como um todo, associavam-se a metaplasia intestinal/displasia na mucosa adjacente, eram mais frequentes em pacientes de sexo masculino e tiveram melhor sobrevida em cinco anos (27,4% vs 9,9%).

Em estudo publicado mais recentemente, Luebke et al (29) ratificaram os achados do trabalho original de Ming, definindo a associação do padrão infiltrativo com parâmetros de agressividade biológica tais como estadió T3/T4, presença de metástases linfonodais e a distância e pior sobrevida em análises univariadas.

2.2.5 Infiltrado inflamatório linfomononuclear e reação estromal desmoplásica

A interação tumor-hospedeiro tem sido cada vez mais implicada como fator determinante do desfecho clínico em pacientes portadores de neoplasias malignas, levando a compreensão que a resposta imune celular e/ou humoral pode afetar positivamente o prognóstico destes doentes. Neste contexto, várias têm sido as metodologias a explorar as associações entre a qualidade da resposta imune do paciente e prognóstico, sendo o parâmetro anátomo-patológico mais usado a densidade e qualidade do infiltrado leucocitário intra e/ou peritumoral.

Watanabe et al (34), em 1.041 pacientes portadores de carcinomas gástricos, identificaram padrão morfológico definido como “carcinoma com estroma linfóide” em 4% dos casos e o definiram pela presença de estroma semelhante a tecido linfonodal, podendo ocorrer centros germinativos foliculares. Outro aspecto característico foi o de ninhos celulares neoplásicos bem delimitados e circunscritos. Na população de pacientes afetados por este tipo histológico foi observada melhor sobrevida, de forma semelhante ao que fora descrito para os carcinomas mamários definidos como de tipo histológico medular também pelo acentuado infiltrado linfóide (35).

Minamoto et al (36), visando a compreensão do melhor prognóstico destas lesões, caracterizaram imunologicamente as células linfóides infiltrantes das mesmas. Determinaram, por imuno-histoquímica, que os linfócitos T dispõem-se de forma mais próxima as células neoplásicas e que os elementos de linhagem B tendem a concentrar-se em folículos/agregados

linfóides, levando-os a postular que as respostas imunes celular e humoral concorrem no benefício prognóstico observado nos pacientes portadores deste tipo de lesão.

Além do tipo histológico especial acima definido nas quais as observações prognósticas originais foram obtidas, carcinomas gástricos convencionais também evidenciaram correlação prognóstica positiva com a densidade do infiltrado linfóide, inclusive como fator independente em análises multivariadas (37, 38).

O equilíbrio entre estroma e células neoplásicas na promoção e/ou inibição do crescimento tumoral tem sido apontado como mecanismo geral para as neoplasias, sendo o estroma atualmente entendido como elemento dinâmico e modulatório desses processos, afetando assim o crescimento tumoral, diferenciação, inibição e metástase (39-41).

Desde a publicação seminal de Inokuchi et al (42) no ano de 1967 em que foi descrito o impacto positivo da reação estromal no prognóstico das neoplasias gástricas, o tema da deposição de colágeno e sua relação com parâmetros prognósticos e/ou anátomo-patológicos foi raramente abordada de forma específica na literatura (43). Mais recentemente, Ohno et al (44) identificaram associação entre deposição estromal de colágeno e pior sobrevida, no entanto sem este parâmetro constituir fator prognóstico independente. Tal achado, associado a diminuição no número de linfócitos CD8 positivos intra-tumorais e expressão aumentada de ligante do receptor Fas pelas células neoplásicas, levou a formulação de que ao constituir uma barreira física, o colágeno atuaria em concerto com os mecanismos de

evasão imunológica normalmente operantes na interação entre neoplasias malignas e sistema imune, com o efeito resultante final de pior sobrevida observada.

2.2.6 Infiltração perineural

Infiltração neural e/ou perineural tem sido definida como o comprometimento do perineuro e/ou dos fascículos neurais propriamente ditos por células neoplásicas. Sua associação com pior sobrevida em neoplasias pancreáticas ou de vias biliares (45, 46) foi reportada e culminou no entendimento deste processo como de importância na disseminação local de neoplasias desta região e portanto potencial candidato a determinante prognóstico.

Com relação aos carcinomas gástricos, Tanaka et al (47, 48) relataram a importância deste achado como determinante prognóstico independente em carcinomas cujo acometimento da parede era restrito a muscular própria (T2), bem como fator associado a mais frequente recidiva na cavidade peritoneal.

Duraker et al (49), em estudo de 354 carcinomas gástricos empregando técnica histológica convencional, detectaram infiltração perineural em 59,6% dos casos, sendo mais frequente em lesões proximais, maiores, de padrão morfológico indiferenciado, mais profundamente infiltrativas e que exibiam tanto invasão vascular linfática quanto metastases linfonodais. Apesar de associação com pior sobrevida em

análises global e ajustada para pacientes de estadió T3, não representou fator prognóstico independente em modelos multivariados.

Tianhang et al (50) em 1.632 espécimes de gastrectomia por carcinoma, identificaram infiltração perineural em 31,7% das lesões, reproduzindo a associação deste achado com fenótipo indiferenciado, tamanho maior, estadió local mais avançado (pT) e disseminação peritoneal. Apesar de limitações impostas pela natureza retrospectiva e curto período de seguimento, demonstraram a infiltração perineural como fator prognóstico independente neste estudo.

2.2.7 Invasão vascular linfática e venosa

Células neoplásicas no interior de espaços revestidos por células endoteliais e/ou circundados por células musculares lisas definem infiltração vascular linfática e venosa respectivamente, tendo sido tais achados associados a pior prognóstico e relatados em até 86% dos carcinomas gástricos (51).

Inada et al (52) relataram infiltração vascular venosa em 48,3% dos adenocarcinomas gástricos, associando-se este achado a maior profundidade de infiltração, menor grau de diferenciação, infiltração vascular linfática, metástases linfonodais e pior prognóstico. Noguchi et al (53) demonstraram que metástases hepáticas por carcinomas primários do estômago associaram-se a extensão e tipo de comprometimento das estruturas vasculares venosas.

Setala et al (54) reportaram que infiltração dos sistemas vasculares venoso e linfático constituiu fator prognóstico adverso e independente, assim como o estadiamento TNM e o tipo histológico de Lauren.

Já Hyung et al (55) identificaram, em 280 carcinomas sem evidências de metástase linfonodal, infiltração vascular linfática e venosa em 20% e 5% dos casos respectivamente. Apesar de não associados aos demais parâmetros clínicos e patológicos, infiltração vascular linfática ou venosa determinou pior sobrevida em cinco anos e foi fator prognóstico independente tanto com relação ao risco de recorrência quanto a morte relacionada a doença.

Em estudo recente, del Casar et al (51) identificaram infiltração vascular linfática ou venosa em 31,9% de série de 144 adenocarcinomas gástricos, estando tal achado associado a estadiamentos II/IV, tipo histológico difuso e comprometimento de cadeias linfonodais, além de constituir parâmetro prognóstico independente em modelos multivariados. Achados semelhantes foram reportados por Dicken et al (56) em série de 114 adenocarcinomas gástricos.

2.2.8 Profundidade de infiltração da parede, estado das cadeias linfonodais locorregionais e metástases a distância: estadiamento patológico TNM

O estadiamento patológico do sistema TNM conforme elaborado pelo American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer (AJCC/IUAC) (18) depende de criteriosa avaliação do espécime cirúrgico e

compreende o conjunto da avaliação da extensão da neoplasia primária em profundidade ao longo dos estratos que compõem a parede gástrica (pT) e da presença de metástases linfonodais (pN) e/ou sistêmicas (pM). Por englobar três parâmetros de central relevância no potencial de extensão locorregional e sistêmica da doença, têm sido o principal fator prognóstico independente identificado em séries avaliadas (5, 8, 57).

3 Alterações moleculares na iniciação e progressão da carcinogênese gástrica

Ottini et al (58), em recente revisão da literatura e de forma similar ao já definido para os carcinomas colorretais (59), chamaram a atenção para os diferentes perfis de instabilidade genética envolvidos na carcinogênese gástrica, definidos como Instabilidade Cromossômica (CIN), Instabilidade de Microssatélites (MSI) e Fenótipo Metilador de Ilhotas CpG (CIMP), realçando suas eventuais intersecções e respectivas implicações clínico-patológicas e prognósticas.

O fenótipo CIN, caracterizado por anormalidades cariotípicas grosseiras como alterações numéricas (aneuploidia ou poliploidia) e/ou de regiões específicas dos cromossomos, estas incluindo perdas alélicas/de heterozigidade (LOH) ou deleções/amplificações gênicas, é imputado como mecanismo frequente pela ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores tumorais envolvidos na iniciação e progressão das

neoplasias malignas em geral. É identificado como o mais comum nos carcinomas gástricos, ocorrendo em cerca de 60% dos casos (60). Nesse fenótipo, o gene supressor de tumores *APC* (“adenomatous polyposis coli”), inicialmente identificado em virtude de sua associação com a síndrome do câncer colorretal hereditário associado a polipose (61, 62), tem sido reportado como mutado em cerca de 10% dos adenocarcinomas gástricos e perda de heterozigidade no seu locus em até 40% dos casos (63-65).

Já o produto do gene supressor de tumores *p53* consiste em fosfoproteína de 53 kDa codificada por gene localizado no cromossomo 17 (17p13) que contém 11 exons e 10 Kb de DNA genômico. Está funcionalmente implicado como importante controlador negativo dos processos de crescimento e proliferação celular, bem como na indução de apoptose, sendo reportadas mutações geradoras de proteínas truncadas com consequentes perdas funcionais na maioria das neoplasias malignas humanas (66, 67). Nos carcinomas gástricos, mutações no gene *p53* podem estar presentes em até 40% dos casos, sendo sugerido o seu aparecimento de forma precoce no processo de carcinogênese (65, 68, 69). Funcionalmente, promove a parada na fase G1 do ciclo celular caso danos ao material genético sejam identificados, promovendo a expressão de genes envolvidos no reparo do DNA. Caso não obtenha êxito, o *p53* põe em curso o processo que culminará com a apoptose e consequente eliminação da célula alterada (70).

Alterações/mutações e perda de função do produto do gene *p53* têm sido reportadas como seguindo o modelo clássico proposto por Knudson e

conhecido como a teoria “two-hit” ou de “dois eventos”, ou seja, ambos os alelos devem ser inativados para estabelecimento da perda funcional, frequentemente o primeiro por perda de heterozigosidade (LOH) e o segundo por mutação, portanto sem o envolvimento de fenômenos epigenéticos (65, 71).

Alguns estudos têm reportado frequência progressivamente aumentada de alterações no gene *p53* nas etapas histologicamente sequenciais da carcinogênese gástrica conforme postulado por Correa (72, 73). São identificadas em até 10% das amostras de metaplasia intestinal e displasia, assim implicadas no estabelecimento dos carcinomas de fenótipo intestinal/tubular (74), os quais, por sua vez, são os que demonstradamente mais exibem alterações nas funções dependentes de *p53* (71).

Além da inativação dos genes supressores de tumores e suas consequências funcionais contributórias ao estabelecimento e progressão do fenótipo neoplásico, alterações ativadoras dos oncogenes também têm importância no fenótipo CIN. Dentre essas, destacam-se as relacionadas aos fatores de crescimento e seus receptores. O proto-oncogene *c-met*, codificador de receptor tirosina-quinase para o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), encontra-se hiperexpresso em níveis de amplificação gênica, transcricionais e também proteicos em até 50% dos carcinomas gástricos (75), sendo identificada sua associação a pior sobrevida (76, 77).

Outro proto-oncogene que merece menção é o *c-erb-B2*, codificador do receptor tirosina-quinase de membrana HER-2/*neu*, mostrando expressão aumentada em até 25% dos carcinomas gástricos por mecanismo

envolvendo principalmente amplificação (aumento do número de cópias do gene), sobretudo em neoplasias avançadas ao diagnóstico (78). Apesar de alguns estudos negarem a influência prognóstica da hiperexpressão desse receptor (79), outros identificaram que se associa a invasividade e disseminação locorregional/sistêmica e portanto a pior sobrevida relacionada ao câncer gástrico (80, 81).

A proteína p21ras, produto de expressão do oncogene *ras* e membro da família das proteínas com atividade GTPase, participa de mecanismos de transdução do sinal relacionados às proteínas G tanto em condições fisiológicas quanto em células neoplásicas. Foi descrita expressão aumentada na transformação da mucosa normal a metaplasia/displasia e finalmente ao carcinoma, sendo identificada nas fases iniciais desse processo e de forma mais importante nos carcinomas de fenótipo intestinal do que nos difusos (82-84).

O outro fenótipo molecular importante é o Microssatélite Instável (MSI), inicialmente identificado em neoplasias colorretais hereditárias não associadas a polipose (síndrome de Lynch) e posteriormente relacionado a subgrupo de neoplasias esporádicas de características clínico-patológicas próprias (85-87). É caracterizado por alterações esparsas ao longo do genoma envolvendo o comprimento de sequências repetitivas mono, di, tri ou tetranucleotídeas e designadas microssatélites. Atribui-se a origem de tais alterações a perda de fidelidade do processo de replicação do DNA, decorrente do não reparo dos erros de pareamento que normalmente ocorrem na fase S do ciclo celular (58, 75). Apesar de no contexto

hereditário a perda de atividade de reparo decorrer de mutações germinativas nos genes das proteínas de reparo dos erros de pareamento do DNA (MMR: “mismatch-repair enzymes”), averiguou-se que nos casos esporádicos o silenciamento da expressão dos mesmos genes dava-se por mecanismos epigenéticos de metilação nas ilhotas CpG (59).

A semelhança do identificado em carcinomas colorretais, o fenótipo MSI foi descrito também em carcinomas gástricos, sendo reportado entre 10% e 50% das séries estudadas quando análises sistemáticas foram realizadas (58, 75).

3.1 Instabilidade de Microssatélites

3.1.1 Histórico: Fenótipo caracterizado por erros de replicação (RER)/instabilidade de microssatélites (MSI) e síndrome de Lynch/HNPCC

Buscando identificar a potencial contribuição dos erros de replicação do DNA na transformação e progressão tumoral, Ionov et al (88) pioneiramente descreveram fenótipo molecular caracterizado por deleções somáticas em sequências poli-AT, assim como em outras sequências repetitivas ao longo do genoma, em 12% dos casos de série de carcinomas colorretais, estando presentes tais alterações tanto em neoplasias invasivas quanto nos adenomas dos mesmos pacientes. Tal descoberta levou-os a concluir pela existência de mecanismo ainda não descrito de carcinogênese àquela época, caracterizado pelo acúmulo de mutações especificamente

endereçando estas sequências repetitivas. Postularam ainda que possivelmente seria secundário a déficit de fidelidade e/ou atividade de reparo durante o processo de replicação do DNA, de forma similar ao que fora documentado em estudo com leveduras (89). Os mesmos autores especularam ainda acerca de possível predisposição inata ao desenvolvimento desta alteração, que denominaram “fenótipo portador de erros de replicação” (RER: “*Replication Error phenotype*”).

Simultaneamente, Aaltonen et al (85) e Peltomaki et al (86, 90) identificaram locus no cromossomo 2 predisponente aos carcinomas colorretais familiares da síndrome de Lynch (91), identificando em mais de 90% destes difusas alterações em sequências repetitivas ao longo do genoma. Constataram a ocorrência de tais alterações também em casos esporádicos, estes exibindo características clínico-patológicas superponíveis àquelas dos casos familiares.

Thibodeau et al (87) foram os primeiros a utilizar o termo “instabilidade de microssatélites” (MSI: “*microsatellite instability*”) para as alterações de comprimento em sequências repetitivas esparsas quando compararam o DNA de tecidos não neoplásicos com o de carcinomas colorretais, identificando tal fenótipo em 28% da série por eles estudada. Neste subgrupo de casos verificaram maior frequência de localização proximal e melhor sobrevida, bem como perfil genético diverso daquele observado na via de carcinogênese até então classicamente descrita como envolvendo perda de heterozigidade em genes supressores de tumores.

Com o reconhecimento do fenótipo microssatélite instável como inerente aos carcinomas colorretais e outras neoplasias associadas a síndrome de Lynch/HNPCC, tornou-se mandatório definir critérios para a seleção de casos visando a determinação deste fenótipo em nível molecular a fim de eleger pacientes e famílias ao diagnóstico molecular definitivo daquela síndrome através de sequenciamento dos genes codificadores das enzimas de reparo dos erros de pareamento do DNA. Os critérios de Amsterdam faziam tal seleção baseados apenas em achados clínicos e epidemiológicos dos pacientes (92), e a partir de esforço colaborativo realizado no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (NCI) no ano de 1996, os critérios de Bethesda foram estabelecidos com o intuito de estabelecer as diretrizes para a seleção de pacientes candidatos, bem como uniformizar o diagnóstico molecular (93, 94).

A literatura abordando a caracterização molecular deste fenótipo logo aumentou sobremaneira e de forma não uniforme, incluindo não apenas neoplasias colorretais como também de outros órgãos, muita heterogeneidade sendo observada não só no que diz respeito ao painel de marcadores usados para o diagnóstico, mas também a forma de interpretar os resultados e classificar os achados (95-102).

Bocker et al (103) chamaram a atenção para a falta de padronização na interpretação de resultados em diferentes centros por eles estudados na Alemanha. O mesmo foi simultaneamente apontado por Dietmaier et al (104) com relação a ausência de critérios diagnósticos e quais marcadores microssatélites investigar na triagem de pacientes para estudos

subsequentes de sequenciamento. Em decorrência disto, padronização dos critérios para identificação molecular do fenótipo MSI foi realizada no mencionado encontro no NCI em 1997. Neste foi formalmente adotado o termo instabilidade de microssatélites (MSI) para se referir ao fenótipo molecular caracterizado por alterações em sequências genômicas repetitivas, sendo recomendada investigação de painel de cinco marcadores para definição molecular deste fenótipo. Foram ainda definidos os tipos microssatélite estáveis (MSS), microssatélite instáveis de baixa frequência (MSI-L) e microssatélite instáveis de alta frequência (MSI-H) a depender se nenhum, apenas um ou dois ou mais dos marcadores avaliados estivessem alterados, com evidências já acumuladas até aquele momento de que apenas os carcinomas colorretais MSI-H apresentavam características clínico-patológicas distintas dos demais (93).

3.1.2 Identificação e clonagem dos genes codificadores das enzimas de reparo dos erros de pareamento do DNA (“Mismatch repair enzymes” – enzimas MMR)

Com a descrição do fenótipo MSI e seu reconhecimento como característica molecular de subgrupo de carcinomas colorretais com características clínicas e patológicas próprias, esforços foram dirigidos a identificação do fator funcionalmente deficiente no processo de replicação do DNA e responsável pelo acúmulo de alterações nos microssatélites esparsos no DNA tumoral.

Parsons et al (105) identificaram mutações em sequências poli-(CA)_n com frequência 100 vezes maior em linhagens celulares neoplásicas portadoras de fenótipo caracterizado por erros de replicação (RER) associados a perda de atividade de reparo dos erros de pareamento do DNA que habitualmente ocorrem durante o processo de replicação. Quase simultaneamente, Leach et al e Fishel et al (106, 107), baseados em dados de ligação entre o braço cromossômico 2p e predisposição ao câncer colorretal hereditário não associado a polipose (86), identificaram nesta região o locus contendo o gene hMSH2 e o clonaram. No ano seguinte, Bronner et al (108), baseados na ligação entre o braço cromossômico 3p21-23 e aquela mesma condição clínica, identificaram e clonaram nesta região gene homólogo ao codificador da proteína de reparo do DNA bacteriano denominado MutL. Este, pela semelhança com a proteína de reparo do DNA previamente descrita em leveduras e denominada MLH1, levou os autores a nomearem o gene homólogo humano de hMLH1. Concluíram ainda, a partir do encontro de mutações em indivíduos afetados e provenientes de famílias portadoras de síndrome de Lynch ligada ao cromossomo 3, que mutações deste gene eram causadoras da condição (108), assim como o fizeram, a mesma época, Papadopoulos et al (109).

Nesse mesmo período, Nicolaidis et al (110) reportaram, em pacientes portadores de síndrome de Lynch/HNPCC, mutações em linhagem germinativa de dois novos genes codificadores de proteínas homólogas do complexo MutL, denominando-os hPMS1 e hPMS2.

3.1.3 Detecção “in-situ” das enzimas MMR através de metodologia imuno-histoquímica

A partir da clonagem dos genes e disponibilização de proteínas recombinantes produzidas em larga escala, procedeu-se a estratégias de produção de anticorpos contra epítomos específicos das enzimas MMR e consequente caracterização da imuno-expressão destes antígenos em tecidos humanos normais e neoplásicos (111).

Dentre as primeiras publicações reportando a detecção *in situ* de enzimas MMR através de método imuno-histoquímico, destaca-se a de Thibodeau et al (112) que identificaram perda de expressão de MLH1 e MSH2 em carcinomas colorretais portadores de instabilidade de microssatélites secundária a síndrome de Lynch/HNPCC, assim como também em parcela de casos esporádicos. Sugeriram, já naquela época, que a detecção imuno-histoquímica das enzimas MMR poderia ser utilizada, em conjunto com a detecção molecular de MSI, como método de rastreio de pacientes selecionados pelos critérios de Amsterdam e Bethesda para diagnóstico molecular, auxiliando, ainda, na determinação de qual gene priorizar para o sequenciamento.

No ano seguinte, Dietmaier et al (104) mostraram relação entre fenótipo MSI-H em carcinomas colorretais e perda de expressão de MLH1 ou MSH2, bem como expressão normal destas duas enzimas em casos por eles definidos como MSS/MSI-L através da análise molecular.

Após este dois trabalhos seminais, apesar da detecção de fenótipo MSI através de PCR permanecer como metodologia padrão para rastreio de

pacientes suspeitos de portarem síndrome de Lynch/HNPCC (93), ou mesmo para identificar neoplasias esporádicas com características clínico-patológicas suspeitas de MSI, devido a mais fácil execução, disponibilidade técnica e mais baixo custo, a literatura empregando imuno-histoquímica para detecção das enzimas MMR expandiu-se sobremaneira, tendo como foco tanto populações compreendendo casos esporádicos e hereditários (113-116), assim como exclusivamente portadoras de carcinomas colorretais esporádicos/consecutivos (117-120).

Klimstra et al (121) revisaram analiticamente a literatura em 2004, perfazendo total de 4.471 pacientes portadores de carcinomas colorretais em trabalhos publicados entre 1997 e 2004. Concluíram que a sensibilidade e especificidade da imuno-histoquímica para detecção de fenótipo MSI foram de 90% e acima de 99% respectivamente. Nesta mesma revisão reportaram ainda que a sensibilidade/especificidade da imuno-histoquímica em detectar mutações dos genes hMLH1 e hMSH2 em linhagem germinativa foram de 74%/81% e 91%/90% respectivamente. Estes achados levaram os autores a vislumbrar que tal método, apesar de até aquele momento apenas ferramenta de pesquisa, tinha potencial aplicabilidade na prática clínica como elemento para identificação de neoplasias portadoras de deficiência de atividade de enzimas MMR e portando fenótipo MSI (121).

Aqueles mesmos autores publicaram estudo comparando o desempenho da imuno-histoquímica com o de métodos moleculares como preditora de mutações em genes codificadores das enzimas MMR em carcinomas e adenomas colorretais. Concluíram que a imuno-histoquímica

identificou parcela significativa de casos associados à síndrome de Lynch/HNPCC, com sensibilidade de 79% e especificidade de 83%, levando-os a reforçar a sugestão pela incorporação deste método ao algoritmo diagnóstico de pacientes suspeitos de portarem esta condição hereditária (122). Chamaram a atenção para a não infrequente heterogeneidade de sinal imuno-histoquímico quando avaliadas diferentes áreas de uma mesma neoplasia (30 a 40% dos casos), principalmente com referência a MLH1, o que poderia constituir manifestação de mutação geradora de proteína que apesar de truncada e não funcionante, ainda seria imuno-histoquimicamente detectável (122).

Ainda que os estudos reportando boa sensibilidade e especificidade da detecção imuno-histoquímica das enzimas MMR como preditora do fenótipo MSI tenham se acumulado, controvérsias acerca de qual método utilizar primariamente recrudesciam principalmente quando consideradas questões referentes a heterogeneidade do sinal nuclear em diferentes áreas de uma mesma neoplasia (123), bem como a maior variabilidade de resultados, principalmente com referência a enzima MLH1 (124).

Face aos relatos de dificuldades técnicas na padronização dos ensaios imuno-histoquímicos para as enzimas MMR, Manavis et al (125) foram os primeiros a aprimorar os resultados empregando protocolos de recuperação antigênica com panela de pressão, assim como adaptando reagentes bloqueadores de biotina endógena comercialmente disponíveis. O mais recente advento dos sistemas de revelação baseados em polímeros conjugados ao anticorpo secundário e contendo moléculas de peroxidase,

sem o uso de complexo avidina-biotina (126, 127), marcou de forma significativa o emprego da imuno-histoquímica na detecção das enzimas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, possibilitando resultados consistentes e reprodutíveis ao prover maior sensibilidade e especificidade as reações, permitindo ainda redução do tempo de incubação e maior diluição dos anticorpos primários conforme relatados por Hansen et al (128).

Apesar de ainda não consensual, a sugestão para incorporação da imuno-histoquímica para as enzimas MMR como etapa triadora no algoritmo diagnóstico de neoplasias colorretais suspeitas de síndrome de Lynch/HNPCC ou MSI esporádicas (115, 129) parece ser altamente promissora pela execução técnica relativamente simples e rápida do método, seu baixo custo e ampla disponibilidade mesmo em laboratórios de patologia sem o aparato técnico necessário a execução dos mais elaborados e custosos métodos moleculares baseados na detecção do fenótipo MSI por PCR. No entanto, devido as implicações clínicas, prognósticas, de aconselhamento genético e de progressão diagnóstica envolvidas na detecção de síndromes de câncer hereditário, muito recentemente Overbeek et al (130) chamaram a atenção para a baixa reprodutibilidade inter-observador quando avaliados cem carcinomas colorretais para a expressão de MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 por sete patologistas, principalmente quando a avaliação foi empreendida por profissionais pouco experimentados neste procedimento. Tal fato levou os mesmos autores a concluírem que a interpretação da imunoexpressão das enzimas MMR deve ser realizada apenas em centros especializados,

nos quais resultados qualificados como de expressão “aberrante” ou “indefinida” segundo os critérios estabelecidos por de Jong et al (131), podem ser sucedidos por estudos moleculares visando a determinação definitiva do fenótipo MSI (130).

3.2 Instabilidade de microssatélites (MSI) e imunoexpressão das enzimas MMR em adenocarcinomas gástricos, sua relação com características clínico-patológicas e prognóstico

3.2.1 Histórico

Quase simultaneamente a identificação do fenótipo MSI como mecanismo alternativo de carcinogênese em tumores colorretais no início da década de 1990, empreendeu-se a busca pelo mesmo perfil de alteração molecular em neoplasias de outros órgãos, dentre estas as do estômago.

Han et al (132) pioneiramente descreveram instabilidade genética em duas sequências microssatélites em 22 de 57 casos de adenocarcinomas gástricos, sendo tal alteração mais prevalente em neoplasias de padrão histológico pouco diferenciado. Tal achado levou-os a especular acerca da existência de mecanismos genéticos diversos para os diferentes subtipos morfológicos de carcinomas de estômago, uma vez que a até então relatada alteração no gene APC como a mais prevalente e hipoteticamente mais implicada na tumorigênese gástrica, apesar de frequente em carcinomas bem diferenciados (20 a 40% dos casos), era excepcionalmente encontrada nos pouco diferenciados (133).

Rhyu et al (134) reportaram instabilidade de microssatélites em 31% dos carcinomas gástricos por eles estudados (16/52), adicionando evidências de que o fenótipo recém-descrito em neoplasias colorretais àquela época não constituía fenômeno exclusivo das lesões daquele órgão.

Mironov et al (135), no ano seguinte, estudando microssatélites caracterizados por sequências poli-CA, verificaram que alterações nestas e no gene p53 constituíam fenômenos mutuamente exclusivos em carcinomas gástricos, fortalecendo o conceito de que o fenótipo RER/MSI representava mecanismo alternativo de carcinogênese em relação aos descritos até aquele momento. Achados e conclusões semelhantes foram relatados por Strickler et al (136) na mesma época, destacando que enquanto as lesões MSI localizavam-se de forma predominante no estômago distal, aquelas associadas a mutações do p53 tinham predileção por localização mais proximal.

3.2.2 Mecanismos de perda de expressão de enzimas MMR em adenocarcinomas gástricos esporádicos

A partir do conhecimento de que o fenótipo MSI, fosse em carcinomas colorretais esporádicos ou hereditários, envolvia perda de expressão das enzimas MMR conforme descrito por Thibodeau e Moslein et al (112, 137), Halling et al (138) demonstraram, também em neoplasias gástricas, que a perda de expressão das enzimas MLH1 e MSH2 associava-se ao fenótipo MSI e, portanto, poderia ser imputada como responsável por tal fenótipo molecular.

Neste contexto, esforços foram dirigidos para a compreensão dos mecanismos responsáveis pela perda das enzimas MMR em neoplasias gástricas esporádicas, de forma semelhante ao que já fora constatado em carcinomas colorretais e endometriais como envolvendo mecanismos epigenéticos de silenciamento de expressão gênica (139-141).

Considerando a metilação de ilhas CpG em regiões promotoras responsável pelo silenciamento da expressão gênica potencialmente contributória a iniciação e progressão dos processos neoplásicos quando em genes supressores de tumores (142, 143), Fleisher et al (144) reportaram este fenômeno na região promotora do gene hMLH1 em carcinomas gástricos esporádicos que exibiam fenótipos MSI-H e MSI-L (77,8% e 75% respectivamente). Postularam ainda, dada a frequente associação deste achado com perda da expressão de MLH1 determinada por imunohistoquímica, que o referido mecanismo epigenético seria o responsável pelo silenciamento da expressão deste gene, com conseqüente perda de atividade do sistema de reparo dos erros de pareamento do DNA e, por fim, pelo fenótipo MSI. Resultados semelhantes, porém em série menor de casos, haviam sido publicados por Leung et al (145), reportando que em 100% dos casos de fenótipo MSI-H foi detectada metilação da região promotora do gene hMLH1 e que em 90% destes havia perda completa da expressão da proteína MLH1.

Waki et al (146), estudando tecidos de necrópsia, identificaram metilação na região promotora do gene hMLH1 em neoplasias gástricas e em mucosa não neoplásica adjacente, levando-os a propor que tal alteração

seria fenômeno precoce e predisponente ao desenvolvimento de neoplasias gástricas, constituindo portanto potencial marcador para identificação de pacientes em risco. Achados semelhantes foram publicados pelo mesmo grupo de pesquisadores em carcinomas gástricos solitários e múltiplos de fenótipo MSI-H, com metilação da região promotora do gene hMLH1 não apenas identificada em amostras de tecido neoplásico, mas também na mucosa adjacente ou distante da lesão primária, fortalecendo a proposição que alterações epigenéticas no tecido sadio poderiam constituir fator de risco ao desenvolvimento subsequente de malignidade (147).

O espectro das múltiplas etapas morfológicas sequenciais ao longo da via de carcinogênese gástrica conforme proposto pelas observações de Correa, e compreendendo a gastrite crônica, atrofia mucosa, metaplasia intestinal seguida por displasia/neoplasia intra-epitelial e ultimada pela neoplasia invasiva (72, 73, 148, 149), levou Leung et al (150) a comparar a distribuição do fenótipo MSI na mucosa metaplásica intestinal de pacientes com e sem neoplasia gástrica, assim como já fora previamente reportado como mecanismo potencialmente implicado na progressão da carcinogênese (151, 152). Naquele estudo, os autores descreveram fenótipo MSI-H em 26,7% e 9,3% das amostras de carcinoma e metaplasia intestinal respectivamente, bem como maior frequência de MSI-H nas amostras metaplásicas provenientes de pacientes com do que naqueles sem neoplasia, concluindo pela participação do acúmulo de fenótipo MSI ao longo da progressão histológica da metaplasia intestinal ao carcinoma (150).

A semelhança do que fora descrito para as neoplasias invasivas com relação ao silenciamento da expressão gênica por mecanismos epigenéticos (144), Kang et al (153) conduziram estudo sobre o padrão de metilação da região promotora de cinco genes, dentre eles o hMLH1, a fim de elucidar a participação destes mecanismos ao longo das etapas morfológicas da carcinogênese gástrica. Constataram aumento progressivo da frequência de metilação da região promotora do gene hMLH1: 20,3% das amostras de carcinoma, 9,8% nos adenomas, 6,3% nas de metaplasia e ausente nas de mucosa gástrica exibindo apenas alterações inflamatórias. Estes achados levaram os autores a concluir que os mesmos mecanismos responsáveis pelo silenciamento de expressão gênica nas neoplasias malignas atuavam já nas fases consideradas pré-malignas, reforçando o entendimento de que as mesmas acumulam-se de forma gradual ao longo da progressão da carcinogênese.

3.2.3 Perfil clínico-patológico dos adenocarcinomas gástricos portadores de MSI e sua influência prognóstica

Apesar das evidências acumuladas apontarem para neoplasias de padrão histológico intestinal/tubular, localização distal e estadiamento menos avançado ao diagnóstico para os carcinomas gástricos de fenótipo MSI (38, 58, 154, 155), há, incluindo o impacto deste fenótipo molecular na evolução clínica destes pacientes (154, 156-162), grande variação de resultados entre os estudos que buscam associações entre este fenótipo molecular e características clínico-patológicas e prognósticas em neoplasias gástricas, o

que potencialmente reflete uma miríade de fatores. Inicialmente a base populacional com relação a não só o perfil epidemiológico da doença, mas também genético, acarreta diferentes frequências de não só o fenótipo MSI mas também da distribuição dos parâmetros clínico-patológicos avaliados (163, 164). Apesar dos recentes esforços em padronizar a metodologia molecular para identificação de MSI em carcinomas gástricos (165) e, diferentemente do estabelecido para os carcinomas colorretais no contexto do diagnóstico molecular da síndrome de Lynch/HNPCC conforme definido pelos critérios de Bethesda (93, 94), a literatura mostra grande heterogeneidade de painéis de marcadores moleculares, executados em laboratórios diferentes e com níveis diversos de proficiência técnica. Somam-se a isso os diferentes critérios usados para definição do fenótipo MSI a depender da quantidade e qualidade dos marcadores alterados, com alguns estudos reproduzindo as categorias MSS, MSI-L e MSI-H conforme recomendado pelos critérios de Bethesda (93), outros baseados apenas na definição qualitativa do fenótipo MSI, independentemente de quantos ou quais marcadores alterados, e ainda outros definindo esse perfil molecular pela alteração em apenas um marcador mononucleotídeo (166).

Considerando a relatada distinção clínico-patológica do fenótipo MSI-H em relação ao MSS/MSI-L e que tal padrão decorre no contexto esporádico da perda de atividade de reparo do DNA secundária a mecanismos epigenéticos de silenciamento de expressão dos genes das enzimas MMR (93, 167), o estudo da expressão imuno-histoquímica destas proteínas surge como importante e acessível ferramenta para identificação

do fenótipo MSI de forma específica e sensível (115, 121). Tal fato é reforçado quando levados em conta os recentes avanços dos ensaios imuno-histoquímicos utilizando diferentes protocolos de recuperação antigênica e sistemas de visualização livres de complexo avidina-biotina (125, 128) e as recomendações, ainda que cautelosas, para a incorporação desta técnica como etapa triadora no algoritmo de seleção de pacientes suspeitos de portarem neoplasias de fenótipo MSI para ensaios moleculares subsequentes, seja no contexto hereditário ou esporádico (129, 130). Soma-se ainda à execução técnica mais simples, rápida e de menor custo da imuno-histoquímica, a não necessidade de aparato técnico para estudos moleculares dos marcadores microssatélites, bem como a possibilidade de se investigar cada enzima MMR isoladamente, tendo os controles positivos internos no próprio tecido avaliado e portanto sem a necessidade de se obter tecido de mucosa não neoplásica ou de linfócitos do sangue periférico com a finalidade de pareamento comparativo como nos estudos moleculares por PCR (124).

Estudos baseados em séries de carcinomas colorretais têm definido a detecção imuno-histoquímica como método específico em distinguir o fenótipo MSI-H do MSS/MSI-L, com suas respectivas implicações clínico-patológicas e prognósticas bem estabelecidas neste contexto (115, 118, 121, 122, 168). Já as séries de neoplasias gástricas até o presente momento publicadas, quando utilizaram a detecção *in situ* das enzimas MMR, o fizeram como elemento confirmatório dos dados obtidos em análises moleculares. Utilizam para tal finalidade painéis compreendendo, na maioria

das vezes, apenas as enzimas MLH1 e MSH2, empregando protocolos anteriores aos atualmente definidos como adequados (128) e limitando-se em comparar a sensibilidade e especificidade destes marcadores em relação aos métodos moleculares, ainda adotados como “padrão ouro” nestes estudos.

Deste cenário resulta a necessidade de se caracterizar o perfil de imuno-expressão das enzimas MMR em neoplasias gástricas incorporando os avanços técnicos mais recentes, confrontando o padrão clínico-patológico das neoplasias gástricas esporádicas com o estado de imunoexpressão destas enzimas. Tais estudos devem incorporar diferentes sistemas de classificação histológica e parâmetros de agressividade biológica tumoral como infiltração perineural, invasão vascular venosa/linfática, além das variáveis de estadiamento individualmente consideradas, elementos nem sempre explorados de forma simultânea nos estudos publicados. Com relação ao impacto prognóstico, é também necessária análise sistemática de sobrevida em séries com tempo estendido de seguimento clínico-ambulatorial, a fim de explorar a independência do fenótipo MSI em relação aos demais parâmetros avaliados como determinantes de desfecho clínico adverso.

OBJETIVOS

1 Objetivos gerais

Determinar o perfil de expressão imuno-histoquímica de um painel de quatro enzimas MMR (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) em série de adenocarcinomas gástricos esporádicos e localmente avançados de pacientes que foram submetidos a cirurgia curativa e posterior seguimento clínico-ambulatorial programado, a fim de explorar o desempenho deste método em identificar subgrupos de neoplasias de características clínicas e patológicas distintas, bem como sua influência prognóstica isoladamente e em relação as demais variáveis classicamente descritas como de impacto.

2 Objetivos específicos

2.1. Caracterizar a presente série de adenocarcinomas gástricos com relação a distribuição das variáveis clínicas e patológicas;

2.2. Determinar o padrão de imunoexpressão de cada uma das enzimas MMR e de suas combinações em amostras de neoplasias primárias contidas em blocos de micromatrizes teciduais (“tissue microarray” – TMA), confrontando os achados com aqueles obtidos em secções histológicas convencionais;

2.3. Comparar a distribuição das variáveis clínicas e patológicas com o estado de expressão de cada enzima MMR isoladamente, bem como com relação aos pares heterodiméricos MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6;

2.4. Determinar, em análises de sobrevida univariada, o impacto prognóstico das variáveis clínicas, patológicas e de estado de expressão de enzimas MMR, e a partir desta, compor modelos de análise multivariada incluindo as variáveis mais significativas a fim de determinar os parâmetros independentes de determinação prognóstica.

MÉTODOS

1 Pacientes e amostras

Cento e trinta e três casos com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico avançado operados entre fevereiro de 1993 e dezembro de 2002 pela equipe da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP foram selecionados por satisfazerem os critérios de inclusão conforme abaixo relacionados.

Critérios de inclusão:

- a) tumores infiltrativos na parede gástrica até pelo menos o nível da camada muscular própria - pT2a ou mais, conforme sistema de estadiamento TNM 2002 AJCC/IUAC ;
- b) ausência de evidências clínicas, de imagem ou cirúrgicas de doença metastática a distância por ocasião do diagnóstico (M0);
- c) tratamento conforme protocolo cirúrgico padronizado pelo Departamento de Gastroenterologia (HC-FMUSP), incluindo gastrectomia total ou subtotal (a depender da localização do tumor primário e sua extensão na parede gástrica) e linfadenectomia D2 ou D3;
- d) Ausência de história familiar de câncer gástrico em parentes de primeiro grau;
- e) Disponibilidade de blocos de parafina representativos da neoplasia nos arquivos da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Além dos blocos de parafina dos espécimes cirúrgicos, foram ainda obtidas as lâminas contendo as secções histológicas bem como os laudos anátomo-patológicos originais.

2 Técnica histológica convencional

Dos blocos de parafina originais, novas secções histológicas de 4 μ M de espessura foram obtidas em micrótomo Leica e submetidas a protocolo de coloração pela hematoxilina e eosina conforme a seguir:

- Desparafinização em xilol a 60°C por 10 minutos e Xilol em temperatura ambiente por 10 minutos;
- Hidratação em 3 passagens em álcool absoluto, álcool 95% e álcool 80%, respectivamente;
- Hidratação em água corrente e água destilada;
- Hematoxilina de Harris por 3 minutos;
- Lavagem em água corrente e água destilada;
- Oito imersões em solução de hidróxido de amônio 0,5%;
- Lavagem em água corrente e água destilada;
- Passagens sucessivas em álcool 50%, álcool 80% e álcool absoluto;
- Eosina por 2 minutos;
- Quatro passagens em álcool absoluto para desidratação;
- Diafanização em xilol (4 passagens);
- Montagem em Entellan (Merck, EUA).

3 Variáveis anátomo-patológicas

Procedeu-se a revisão dos laudos anátomo-patológicos originais para obtenção de informes como idade ao diagnóstico, sexo, localização do tumor primário e seu tipo macroscópico conforme a classificação de Borrmann. Mediante avaliação das novas secções histológicas obtidas a partir dos blocos originais, foram determinadas as seguintes variáveis patológicas:

3.1. Tipo histológico conforme classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS): determinado como tubular, túbulo-papilífero ou papilífero, de células em “anel-de-sinete” ou mucinoso conforme descrito na seção 2.B.4 (26) ;

3.2. Tipo histológico conforme classificação de Lauren: determinado como intestinal, difuso ou misto conforme descrito na seção 2.B.4 (30);

3.3. Tipo histológico conforme classificação de Ming: a depender da configuração predominante das bordas dos blocos de células neoplásicas em sua interface com o estroma da parede gástrica, os padrões expansivo ou infiltrativo foram assinalados, conforme descrito na seção 2.B.4 (33);

3.4. Nível máximo de infiltração pela neoplasia na parede gástrica: determinado como em muscular própria, tecido conjuntivo-adiposo

de subserosa, com rompimento de serosa ou acometendo estruturas adjacentes contíguas. Esta informação foi utilizada, a posteriori e em conjunto com os dados de estadiamento das cadeias linfonodais locorreionais, para se obter o estadiamento patológico TNM global conforme definição AJCC/IUAC (18);

3.5 Infiltração neural/perineural: qualitativamente determinada como presente ou não identificada, dependendo do encontro de blocos celulares neoplásicos ou células tumorais isoladas acometendo o perineuro de forma parcial ou circunferencialmente, ou ainda infiltrando o feixe neural propriamente dito;

3.6 Invasão vascular venosa e linfática: determinadas como presentes ou não identificadas, a depender da ocorrência de células tumorais localizadas no interior de espaços vasculares reconhecidamente revestidos por endotélio ao exame histológico convencional, circundados por camada muscular lisa no caso de infiltração vascular venosa;

3.7 Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intra/peritumoral: determinado, mediante avaliação qualitativa/semi-quantitativa dos elementos leucocitários linfomonucleares intimamente imiscuídos por entre as células neoplásicas ou em suas adjacências, como ausente, leve a moderado ou acentuado;

3.8 Reação estromal desmoplásica: avaliada mediante determinação qualitativa/semi-quantitativa de tecido fibroconjuntivo em íntima relação com a neoplasia e qualificada como ausente a leve ou moderada a acentuada;

3.9 Estadiamento patológico do estado das cadeias linfonodais locorregionais (pN): determinado através da contagem do número de linfonodos acometidos por metástase de carcinoma ao exame histológico e classificado, segundo TNM 2002 AJCC/IUAC (18), conforme a seguir:

pN0 – ausência de metástases linfonodais;

pN1 – metástase em 1 a 6 linfonodos;

pN2 – metástase em 7 a 15 linfonodos;

pN3 – metástase em mais de 15 linfonodos.

3.10 Estadiamento patológico global TNM: determinado, segundo TNM 2002 AJCC/IUAC (18), conforme segue:

Estadio 0: Tis N0 M0;

Estadio IA: T1 N0 M0;

Estadio IB: T1 N1 M0;

T2a/b N0 M0;

Estadio II: T1 N2 M0;

T2a/b N1 M0;

T3 N0 M0;

Estadio IIIA: T2a/b N2 M0;

T3 N1 M0;

T4 N0 M0;

Estadio IIIB: T3 N2 M0;

Estadio IV: T4 N1-3 M0;

T1-3 N3 M0.

4 Construção das micromatrizes teciduais (TMA)

Simultaneamente a reavaliação das novas secções histológicas coradas pela hematoxilina-eosina, áreas de interesse para posterior confecção dos blocos de TMA foram marcadas sobre as lâminas e endereçando o tumor primário.

Conforme metodologia descrita por Konnonen et al (169) e utilizando equipamento MTA1 (Manual Tissue Microarrayer, Beecher Instruments, EUA), foram confeccionados blocos de TMA com agulhas de 1,0 milímetro de diâmetro para extração dos cilindros teciduais dos blocos doadores, que foram dispostos nos blocos receptores com espaçamento de 0,3 milímetro, procedimentos realizados no LIM-14, Patologia Hepática, FMUSP. Para efeito de orientação de posição, na primeira linha horizontal e nas primeiras três posições da primeira coluna foram dispostos tecidos controles obtidos de necropsia (rim ou pulmão). Os blocos receptores foram confeccionados com parafina Histosec em pastilhas (Merck, EUA).

Com vistas a minimizar as perdas parciais físicas e/ou de representatividade inerentes a tecnologia de TMA, cada caso foi representado em duplicata no primeiro bloco receptor, bem como confeccionado simultaneamente bloco de segurança idêntico ao primeiro, também contendo, sempre que possível, duas amostras de cada caso.

Por tratar-se de sistema de orientação matricial, previamente a confecção dos blocos elaborou-se planilha em Excel (Microsoft Office 2003, EUA) designando para cada posição o respectivo caso contido com a finalidade de posterior registro dos resultados.

A seguir a relação dos blocos gerados com suas designações representando número de controle interno para uso do LIM-14 (T00--), o respectivo número de amostras e tecidos controle contidos em cada um, bem como a categoria tecidual neles representada:

- **T0038 e T0039** - Tumor primário em casos que não apresentam metástase linfonodal (95 amostras/12 controles e 91 amostras/16 controles respectivamente);

- **T0040 e T0041** - Tumor primário em casos que apresentam metástase linfonodal – parte 1 (78 amostras/15 controles e 77 amostras/16 controles respectivamente);

- **T0042 e T0043** - Tumor primário em casos que apresentam metástase linfonodal – parte 2 (117 amostras/14 controles e 116 amostras/15 controles respectivamente);

No presente estudo, apenas os blocos de TMA contendo amostras de tecido referentes as neoplasias primárias foram utilizados: T0039, T0041 e T0042, totalizando avaliação de 290 amostras de tumores primários provenientes dos 133 casos que compõem a presente série de adenocarcinomas gástricos (média de 2,18 amostras/caso).

Visando evitar perdas inerentes a necessidade de se aparar o bloco de parafina, os mesmos foram submetidos a sessão única de microtomia, na qual foi obtida, por bloco de TMA, média de 70 a 80 secções que foram dispostas em lâminas silanizadas, submetidas a banho de parafina e arquivadas em caixa escura em freezer -20 °C visando a preservação da antigenicidade das amostras conforme descrito por DiVito et al (170).

5 Ensaios imuno-histoquímicos

Os procedimentos imuno-histoquímicos foram realizados em conjunto pelas equipes do LIM-14/Patologia hepática/FMUSP e laboratório de imuno-histoquímica da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

5.1 Anticorpos primários utilizados e padronização dos ensaios

Para o presente estudo foram utilizados anticorpos primários monoclonais gerados em camundongos e dirigidos contra os antígenos produtos dos genes codificadores das enzimas de reparo dos erros de

pareamento do DNA: anti-MLH1 (clone G168-15), anti-MSH2 (clone G219-1129), anti-MSH6 (clone 44-MSH6) e anti-PMS2 (clone A16-4), os quatro oriundos da fabricante BD Pharmingen (San Jose, CA, EUA). As condições ideais do ensaio para cada um dos antígenos pesquisados foram determinadas mediante avaliação das diversas possíveis combinações das variáveis envolvidas na execução das reações imunohistoquímicas, referentes as condições de recuperação antigênica em calor úmido, título do anticorpo primário e sistema de revelação, conforme descritos a seguir:

- a) **Recuperação antigênica (RA):** testada em pH=6,0 e pH=3,0 (tampão citrato de sódio 10mM) e pH=9,0 (tampão Tris-EDTA 1mM), executadas tanto em panela de pressão por 3 minutos quanto panela a vapor por 40 minutos;
- b) **Título do anticorpo primário:** para os quatro antígenos pesquisados, os respectivos anticorpos primários foram testados em diferentes títulos conforme a seguir:
 - anti-MLH1: 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800;
 - anti-MSH2: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 e 1/1600;
 - anti-MSH6: 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800;
 - anti-PMS2: 1/50, 1/100, 1/250, 1/500 e 1/1000.
- c) **Sistemas de revelação:** Foram comparados dois sistemas de revelação baseados em polímeros curtos: Novolink (Novocastra, Newcastle, Reino Unido) e Superpicture (Zymed/Invitrogen, Carlsbad, EUA), livres de complexos avidina-biotina, sendo

avaliado o desempenho de cada um com relação a sensibilidade (intensidade de sinal nuclear) e especificidade (ausência de marcação de fundo inespecífica).

As condições ótimas padronizadas para os quatro anticorpos alvos do presente estudo seguem abaixo:

Anticorpo	Clone	RA	Título	Revelação
anti-MLH1	G168-15	- panela vapor; - pH=6,0;	1:100	NovoLink
anti-MSH2	G219-1129	- panela vapor; - pH=6,0;	1:800	NovoLink
anti-MSH2	44/MSH6	- panela vapor; - pH=6,0;	1:100	NovoLink
anti-PMS2	A16-4	- panela pressão; - pH=6,0;	1:1000	NovoLink

Procedeu-se, dessa forma, aos ensaios imuno-histoquímicos conforme etapas discriminadas a seguir:

Desparafinização das lâminas de TMA

- Xilol a 60⁰ C por 20 minutos;
- Xilol a temperatura ambiente por 20 minutos;
- Etanol 100% 3 vezes 30 segundos cada passagem;

- Etanol 95% 30 segundos;
- Etanol 80% 30 segundos;
- Etanol 70% 30 segundos;
- Lavar as lâminas em água corrente e destilada;

Bloqueio de peroxidase endógena

- Mergulhar as lâminas em H₂O₂ 6%, com 3 trocas de 10 minutos cada;
- Lavar em água corrente e destilada;
- Lavar com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM, pH= 7,4 por 5 minutos.

Anticorpos primários

- Diluídos os anticorpos primários em tampão PBS contendo albumina bovina 1% (BSA) (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, nos títulos previamente estabelecidos;
- Incubação durante 30 min a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida;
- Lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Anticorpos secundários/Sistema de revelação

- Incubação com o bloqueador pós-primário (Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Newcastle, Reino Unido), por 30 minutos a 37°C;

- Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- Incubar com o polímero (polymer) do mesmo kit, por 30 minutos a 37°C;
- Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Revelação com cromógeno

- Incubar as lâminas, por 5 minutos, a 37^o C e ao abrigo da luz, em solução contendo substrato cromógeno assim preparada: 100 mg% de 3,3' tetrahidrocloroto de diaminobenzidina (DAB) (Sigma, D-5637, EUA), 1 ml dimetilsulfóxido (DMSO), 1 ml de H₂O₂ 6%, 100 ml de PBS;

Contra-coloração

- Mergulhar as lâminas em solução de Hematoxilina de Harris por 1 minuto;
- Lavar em água corrente e destilada;
- Imergir por 2 vezes em solução de hidróxido de amônio 0,5%, lavando em seguida em água corrente e destilada;
- Desidratar as lâminas em sequência de concentrações crescentes de etanol (50%, 80%, 95%, 100%, 3 passagens de 30 segundos cada) e xilol (4 passagens de 30 segundos cada);
- Montagem das lâminas com lamínula e Entellan (Merck, 1.07961, Alemanha).

5.2 Controles positivos e negativos usados durante os ensaios imuno-histoquímicos

Para os trabalhos de padronização dos ensaios imuno-histoquímicos, bem como em paralelo a todas reações realizadas na série de casos deste trabalho, foram utilizados como controles positivos duas amostras de adenocarcinoma colorretal que sabidamente expressam os quatro marcadores avaliados no presente estudo. Optou-se por amostras que, além de contemplarem o tecido neoplásico, apresentavam nas suas adjacências mucosa não tumoral ou tecido linfóide, uma vez que estes dois compartimentos exibem frequente positividade nuclear para as enzimas MMR.

Os controles negativos foram obtidos mediante a omissão da etapa de incubação com o anticorpo primário, sendo realizados tanto sobre as amostras de adenocarcinomas colorretais já mencionadas, quanto em uma lâmina de cada bloco de TMA empregado no estudo desta série de casos.

5.3 Interpretação dos resultados das reações imuno-histoquímicas e critérios para validação dos resultados negativos em secções histológicas convencionais

As reações imuno-histoquímicas foram qualitativamente interpretadas como positivas, negativas ou de resultado incerto nas amostras dos tumores primários representados nas secções obtidas a partir dos blocos

de TMA, conforme descrito a seguir e reportado por de Jong et al (131). Resultado positivo foi assinalado para as amostras em que foi identificada inequívoca deposição do produto cromógeno sobre os núcleos das células neoplásicas, independentemente da proporção ou número de células marcadas, em reação na qual não tenha sido identificada marcação de fundo interpretada como inespecífica. Amostras nas quais não foi evidenciada imuno-marcação sobre o núcleo das células neoplásicas foram qualificadas como negativas quando concomitantemente observados controles teciduais positivos, os mesmos representados por mucosa não neoplásica, elementos estromais ou leucócitos linfomononucleares. Resultado incerto foi atribuído as amostras nas quais houve ausência de imuno-marcação nas células neoplásicas na ausência de controle interno ou quando a imuno-marcação nuclear foi de menor intensidade do que aquela observada nos controles internos.

Situações em que as duas amostras de mesmo caso não concordaram quanto ao resultado obtido no TMA, tiveram considerados como definitivo o resultado positivo quando este pôde ser observado em alguma das amostras.

Como estratégia para evitar resultados imuno-histoquímicos falso negativos por viés de amostragem inerente a técnica de TMA, os casos qualificados como negativos ou de resultado incerto para determinado marcador conforme avaliação em TMA, tiveram os blocos dos tumores primários recuperados e as reações imuno-histoquímicas repetidas em secções convencionais para os marcadores em questão.

6 Análises estatísticas

A distribuição das diferentes variáveis clínico-patológicas avaliadas ao longo desta série de casos foi feita mediante determinação da frequência absoluta e percentual de cada categoria das referidas variáveis.

A comparação das distribuições das diferentes variáveis clínico-patológicas de acordo com o estado dos marcadores avaliados (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) foi realizada através do teste do qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher quando apropriado, ambos considerados significativos quando $p < 0,05$.

A influência das diferentes variáveis clínico-patológicas, assim como do estado de expressão das diferentes enzimas MMR, na mortalidade relacionada a doença foi determinada através da determinação do qui-quadrado de LogRank, considerado significativo quando $p < 0,05$. Simultaneamente a determinação do LogRank, curvas de Kaplan-Meier foram determinadas para cada uma das variáveis avaliadas.

Paralelamente, modelos univariados de regressão de Cox foram construídos a fim de se estimar os riscos relativos ('hazard ratios'), assim como suas significâncias estatísticas, inerentes tanto as variáveis clínico-patológicas quanto ao estado de expressão das enzimas MMR neste estudo avaliadas.

Modelos multivariados de regressão de Cox foram construídos para avaliar a contribuição diferencial de cada uma das variáveis clínico-patológicas e do estado das enzimas MMR na mortalidade relacionada a doença. A seleção

das variáveis para inclusão nestes modelos foi baseada na associação em análises univariadas com $p < 0,10$, bem como no julgamento da independência de uma variável em relação as demais. Inicialmente, cada uma das enzimas foi incluída de forma individualizada em cada modelo, sendo posteriormente avaliados da mesma forma os pares heterodiméricos MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6. Para as análises estatísticas foi utilizado o software SPSS, versão 13.0 (SPSS Inc, Chicago, EUA).

RESULTADOS

1 Características clínico-patológicas

Dos 133 pacientes que compõem a série de casos usada para o presente estudo, 93 são do sexo masculino (69,9%) e 40 do sexo feminino (30,1%), com razão M:F de 2,32:1. A idade ao diagnóstico foi de $60,1 \pm 12,7$ anos (média \pm D.P.), com a mediana representada por 61 anos. O tamanho médio do tumor primário foi de $5,9 \pm 3,0$ cm (média \pm D.P), com a mediana em 5,5 cm.

A localização proximal do tumor primário (originados no cárdia, fundo e corpo proximal do estômago) foi observada em 43 casos (32,3%), com os demais 90 (67,7%) tendo localização primária relatada como em estômago distal, compreendendo corpo distal e região antro-pilórica. De acordo com a classificação de Borrmann, a presente série de adenocarcinomas gástricos teve seus tumores primários assim distribuídos com relação ao tipo macroscópico: tipo I: 12 (9,0%), tipo II: 27 (20,3%), tipo III: 69 (51,9%), tipo IV: 25 (18,8%).

Pela classificação histológica de Lauren 132 casos foram classificáveis, com 83 casos (62,4%) assinalados como de tipo intestinal e 49 (36,8%) como difusos. Já pela classificação histológica da Organização Mundial de Saúde (OMS), 77 casos (57,9%) foram definidos como pertencentes as categorias dos adenocarcinomas tubulares e túbulo-papilares, enquanto o tipo mucinoso

foi assinalado para 8 casos (6,0%) e o de células em “anel-de-sinete” em 44 dos tumores primários (33,1%). Para cada uma das categorias “não determinável” e “outros” foram alocados dois casos (1,5%).

A classificação histológica de Ming foi aplicada sobre os casos da presente série de adenocarcinomas gástricos, sendo que em 103 casos (77,4%) a interface da neoplasia com os tecidos da parede gástrica foi qualificada como de padrão infiltrativo, enquanto os demais 30 (22,6%) foram determinados como de tipo expansivo.

A avaliação do nível de profundidade de infiltração da parede gástrica pelos adenocarcinomas mostrou que em 58 casos (43,6%) o tumor primário atingia a camada muscular própria, em 74 casos (55,6%) ultrapassava os limites da muscular, comprometendo os tecidos conjuntivo e adiposo de subserosa e em 1 caso (0,8%) foi possível documentar extensão a órgãos adjacentes, nomeadamente o pâncreas.

O infiltrado linfoplasmocitário intra/peritumoral foi qualificado como ausente em 8 casos (6,0%), leve a moderado em 93 (69,9%) e acentuado em 32 amostras de tumores primários (24,1%). Já a reação estromal desmoplásica foi avaliada como ausente a leve em 62 casos (46,6%) e moderada a acentuada nos demais 71 casos (53,4%).

Ao exame histológico convencional em secções coradas pela hematoxilina-eosina, invasão vascular linfática pôde ser identificada em 67 casos (50,4%), assim como invasão vascular venosa em 23 casos (17,3%). Estruturas neurais foram evidenciadas como comprometidas pela neoplasia em 70 casos (52,6%).

O estado de comprometimento neoplásico das cadeias linfonodais locorreionais foi determinado mediante reavaliação histológica, a fim de se assinalar a categoria “pN” da classificação TNM. Com relação a esta variável, a presente série de adenocarcinomas gástricos distribuiu-se conforme a seguir: pN0 em 42 casos (31,6%), pN1 em 63 (47,4%), pN2 em 26 (19,5%) e pN3 em 2 (1,5%).

O estadio final segundo a classificação TNM2002/AJCC distribuiu-se da seguinte forma: estadio IB: 41 casos (30,8%), estadio II: 59 (44,4%), estadio IIIA: 29 (21,8%), estadio IIIB: 2 (1,5%) e estadio IV: 2 (1,5%).

Sumário das frequências das categorias de cada variável clínico-patológica pode ser visto na tabela 1 e fotomicrografias exemplificando os parâmetros histológicos são expostas na figura 1.

Tabela 1 - Sumário da distribuição das variáveis clínico-patológicas registradas

	n	%
Sexo	Masculino	93 69,9%
	Feminino	40 30,1%
Idade (mediana)	< 61 anos	63 47,4%
	> ou = 61 anos	70 52,6%
Idade (média + D.P.)	60,1± 12,7	
Local do Tumor primário	Proximal (cardia, fundo e corpo proximal)	43 32,3%
	Distal (corpo distal e região antro-pilórica)	90 67,7%
Tamanho do tumor primário	< 5,5 cm	60 45,1%
	> ou = 5,5 cm	73 54,9%
Tipo macroscópico de Borrmann	I e II	39 29,3%
	III e IV	94 70,7%
Tipo histológico OMS	Tubular/Tubulo-papilífero	77 57,9%
	Adenocarcinoma mucinoso	8 6,0%
	Carcinoma de células em "anel-de-sinete"	44 33,1%
	Outros	2 1,5%
	Indiferenciados	2 1,5%
Tipo histológico de Lauren	intestinal	83 62,4%
	difuso	49 36,8%
Tipo histológico de Ming	Infiltrativo	103 77,4%
	Expansivo	30 22,6%
Profundidade de infiltração	muscular própria	58 43,6%
	subserosa	74 55,6%
	estruturas adjacentes	1 0,8%
Reação estromal desmoplásica	ausente a leve	62 46,6%
	moderada a acentuada	71 53,4%
Infiltrado linfomononuclear	ausente	8 6,0%
	leve a moderado	93 69,9%
	acentuado	32 24,1%
Invasão vascular linfática	não detectada	66 49,6%
	presente	67 50,4%
Invasão vascular venosa	não detectada	110 82,7%
	presente	23 17,3%
Infiltração perineural	não detectada	63 47,4%
	presente	70 52,6%
Metástase linfonodal	ausentes	42 31,6%
	metástases em 1 a 6 linfonodos (pN1)	63 47,4%
	metástases em 7 a 15 linfonodos (pN2)	26 19,5%
	metástases em mais de 15 linfonodos (pN3)	2 1,5%
Estadiamento patológico (TNM)	Estádio IB	41 30,8%
	Estádio II	59 44,4%
	Estádio IIIA	29 21,8%
	Estádio IIIB	2 1,5%
	Estádio IV	2 1,5%

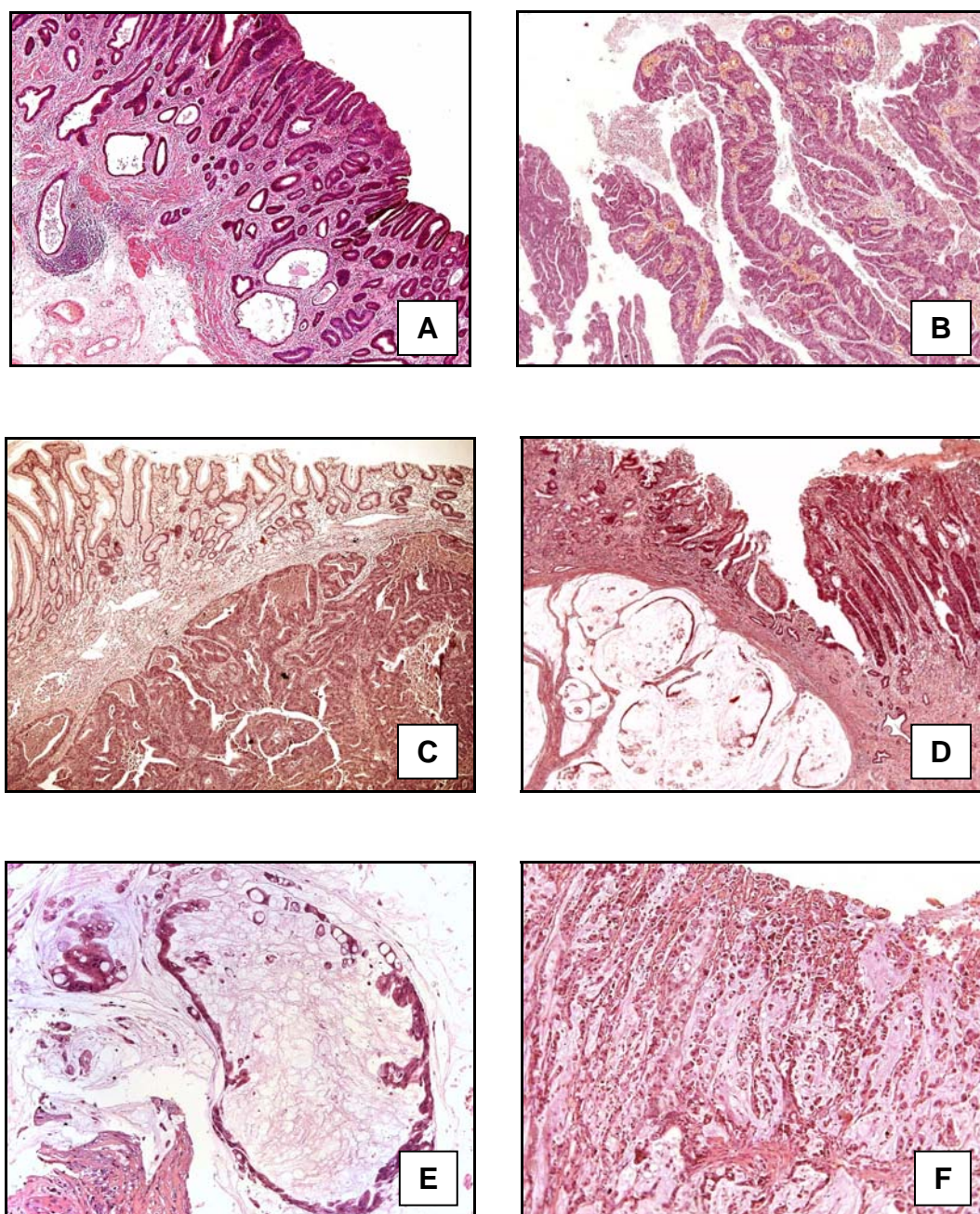


Figura 1. Características patológicas avaliadas. (A) Padrão histológico tubular (OMS) ou intestinal (Lauren), (B) Papilífero, (C) Túbulo-papilífero (OMS), (D) e (E) Mucinoso (OMS), (F) de células em “anel-de-sinete” (OMS) ou difuso (Lauren). Fotomicrografias em aumentos de 20x a 200x. Continua a seguir;

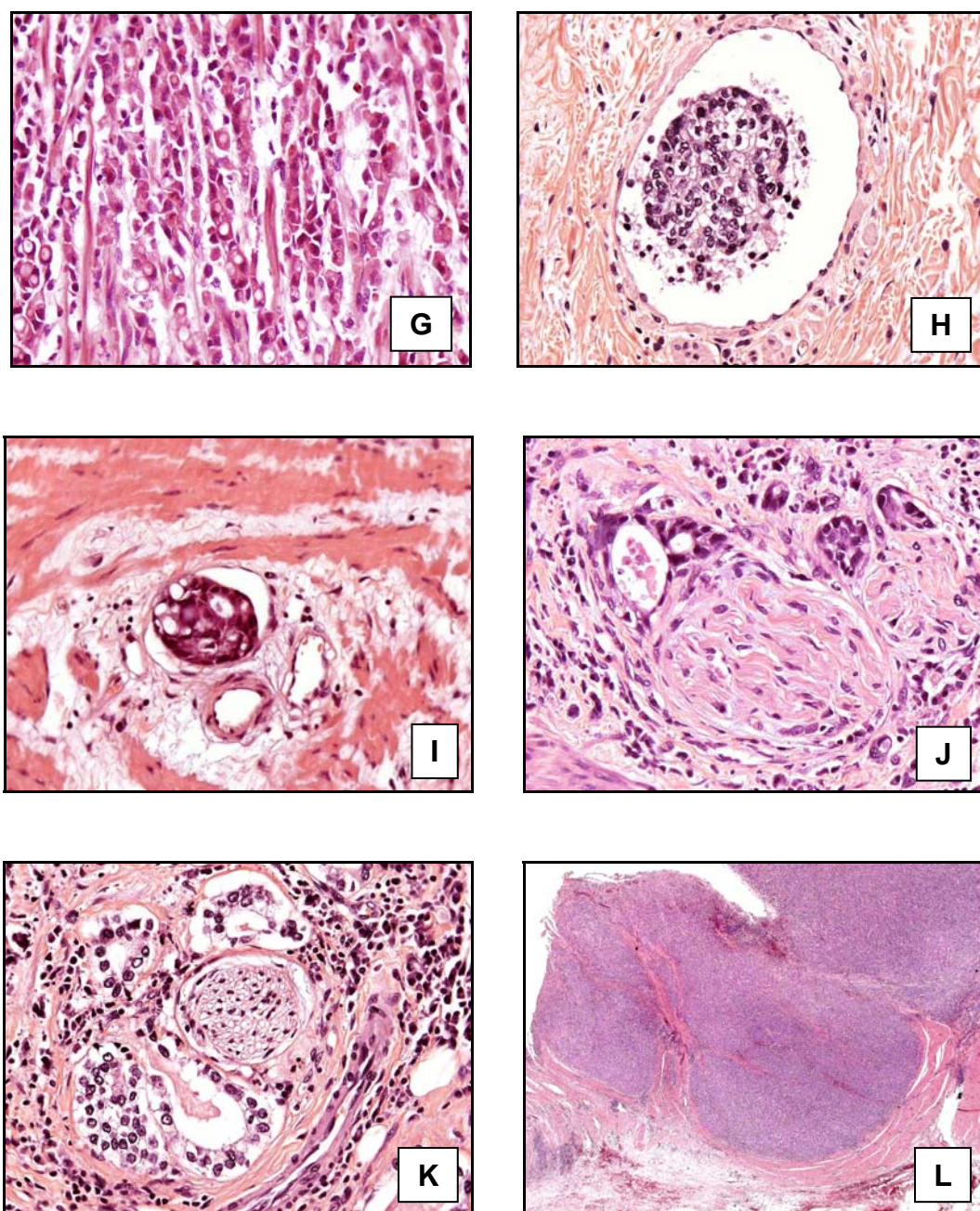


Figura 1. Características patológicas avaliadas. (G) Padrão histológico difuso (Lauren) ou de células em “anel-de-sinete” (OMS), (H) infiltração vascular venosa, (I) Infiltração vascular linfática, (J) e (K) Infiltração perineural, (L) padrão expansivo da classificação histológica de Ming. Fotomicrografias em aumentos de 20x a 400x. Continua a seguir;

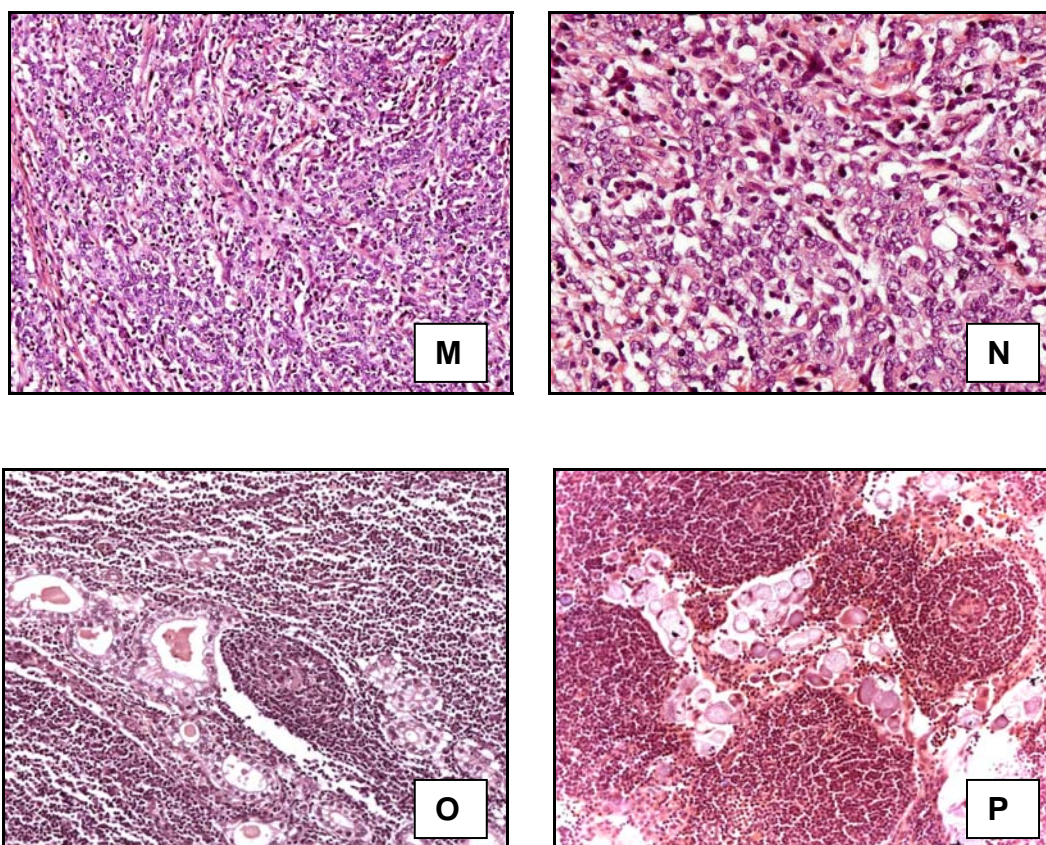


Figura 1. Características patológicas avaliadas. (M) e (N) carcinoma indiferenciado (OMS) com infiltrado linfoplasmocitário intra e peritumoral qualificado como acentuado, (O) metástase linfonodal de adenocarcinoma de padrão tubular, (P) metástase linfonodal de adenocarcinoma de células em “anel-de-sinete”. Fotomicrografias em aumentos de 200x a 400x

2 Avaliação imuno-histoquímica da expressão das enzimas de reparo dos erros de pareamento do DNA (MMR)

2.1 Aproveitamento da série de casos mediante tecnologia de TMA

Devido a perdas inerentes (física e/ou de representatividade) a tecnologia de TMA, para cada um dos anticorpos avaliados no presente estudo, foi gerado um índice de aproveitamento (I.A.) das secções histológicas obtidas do bloco original de TMA, conforme equação:

$$\text{I.A.} = \frac{\text{casos avaliáveis}}{\text{total de casos}} \times 100 = \text{Aproveitamento (\%)}$$

A seguir, discriminado, para cada um dos anticorpos, o aproveitamento dos blocos de TMA:

- a) MLH1: 116 casos avaliáveis de 133 (I.A. = 87,2%);
- b) MSH2: 120 casos avaliáveis de 133 (I.A. = 90,2%);
- c) MSH6: 126 casos avaliáveis de 133 (I.A. = 94,5%);
- d) PMS2: 119 casos avaliáveis de 133 (I.A. = 89,5%).

2.2 Estado de imunoexpressão de cada enzima MMR, inicialmente avaliada em TMA e posteriormente confirmada em secção histológica convencional

Conforme descrito na secção referente a interpretação dos resultados imuno-histoquímicos, os casos qualificados como negativos ou incertos mediante avaliação em secções obtidas dos blocos de TMA foram posteriormente submetidos ao mesmo protocolo imuno-histoquímico em cortes histológicos convencionais. Após esta, foi determinado o definitivo estado de expressão dos quatro marcadores, o que evidenciou que quarenta e cinco casos da presente série (33,6%) mostraram-se negativos para pelo menos uma das enzimas MMR avaliadas. Considerando o estado dos marcadores individualmente, e em relação ao número de casos avaliáveis para estes, trinta e um casos mostraram perda de expressão de MLH1 (26,7%), 25 perda de MSH2 (20,8%), 29 para MSH6 (23%) e 25 para PMS2 (21%).

Fotomicrografias de casos representativamente negativos ou positivos para cada um dos quatro marcadores avaliados no presente estudo pode ser vista na figura 2.

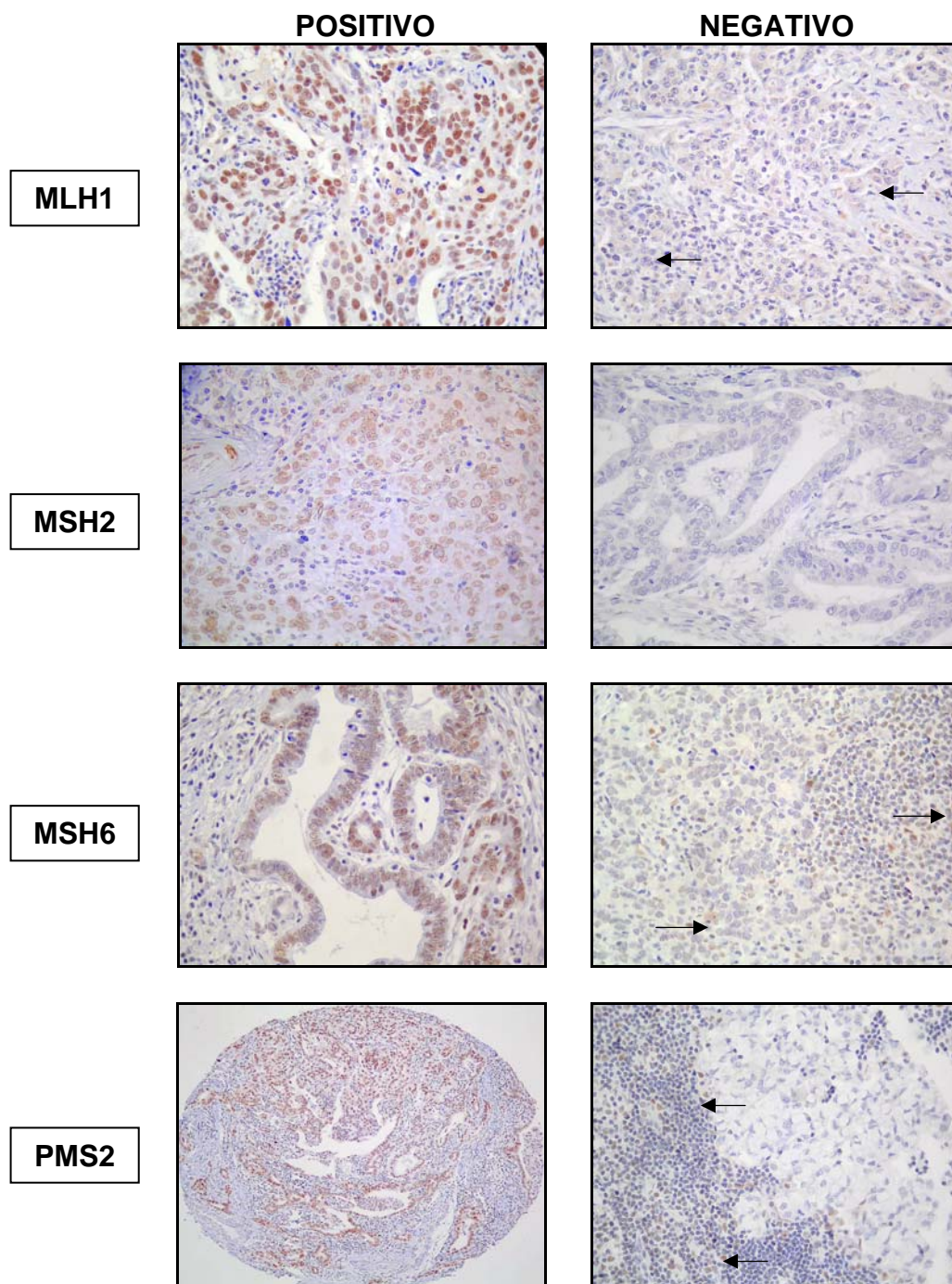


Figura 2. Padrão de imunoposição das enzimas MMR em carcinomas gástricos

Na tabela 2 discrimina-se o sumário, para cada um dos marcadores avaliados, do número de casos submetidos a reavaliação imuno-histoquímica em secção convencional, o número de casos considerados definitivamente como negativos após esta e sua percentagem em relação ao total de casos avaliáveis para cada enzima MMR.

Tabela 2 - Sumário dos resultados inicialmente qualificados como negativos ou incertos em secções histológicas obtidas dos blocos de TMA, os considerados definitivamente como negativos nas secções convencionais e o respectivo resultado do cálculo da especificidade para identificação de casos negativos em secções obtidas de blocos de TMA

	(-)s ou incertos TMA	(+)s s em secção grande	(-)s definitivos	especificidade TMA
MLH1	36	5	31	86,1%
MSH2	32	7	25	78,1%
MSH6	34	5	29	85,3%
PMS2	29	4	25	86,2%

2.3 Co-negatividades e correlação entre o estado das diferentes enzimas MMR

Dos mencionados 45 casos negativos para ao menos um dos marcadores avaliados, apenas 15 mostraram perda de expressão de uma única enzima MMR (33,3%), sendo 9 negativos para duas enzimas MMR (20%), 14 para três (31,2%) e os 7 restantes para todas as quatro enzimas MMR avaliadas (15,5%). Frequência absoluta e percentual de todos os possíveis perfis envolvendo perda de expressão individual ou combinada das enzimas MMR pode ser vista na tabela 3.

Tabela 3 - Sumário da frequência absoluta e percentual de todos os possíveis perfis de expressão de enzimas MMR. Frequência percentual expressa em relação aos casos com alguma negatividade para os marcadores avaliados (n=45)

	n	%	
	MLH1- MSH2+ MSH6+ PMS2+	5	11,1%
	MLH1+ MSH2+ MSH6- PMS2+	6	13,3%
uma enzima MMR negativa	MLH1+ MSH2+ MSH6+ PMS2-	4	8,9%
	MLH1- MSH2+ MSH6- PMS2+	1	2,2%
	MLH1- MSH2+ MSH6+ PMS2-	5	11,1%
	MLH1+ MSH2- MSH6- PMS2+	2	4,5%
duas enzimas MMR negativas	MLH1+ MSH2- MSH6+ PMS2-	1	2,2%
	MLH1+ MSH2- MSH6- PMS2-	3	6,7%
	MLH1- MSH2+ MSH6- PMS2-	2	4,5%
	MLH1- MSH2- MSH6+ PMS2-	2	4,5%
três enzimas MMR negativas	MLH1- MSH2- MSH6- PMS2+	7	15,5%
todas enzimas MMR negativas	MLH1- MSH2- MSH6- PMS2-	7	15,5%
TOTAL	45	100%	

Dezesseis casos (35,5%) foram identificados quando considerada a co-negatividade para o par MLH1/PMS2, bem como 19 casos (42,2%) com relação a co-negatividade para MSH2/MSH6.

A análise de correlação entre o estado das enzimas MMR duas a duas evidenciou correlação entre a perda de expressão para todos os pares possíveis, com destaque para a associação entre as co-negatividades de MSH2 e MSH6 ($\rho=0,666$, $p<0,001$), MLH1 e MSH2 ($\rho=0,490$, $p<0,001$) e MLH1 e PMS2 ($\rho=0,467$, $p<0,001$). Na tabela 4 seguem discriminados os resultados das avaliações de correlação entre o estado das enzimas MMR duas a duas.

Tabela 4 - Sumário das correlações entre o estado das diferentes enzimas MMR quando comparadas duas a duas. (rho: índice de correlação de Spearman)

	MLH1 (n, %)		rho, p	MSH2 (n,%)		rho, p	MSH6 (n,%)		rho, p
	(-)	(+)		(-)	(+)		(-)	(+)	
MLH1 (-)	x	x		x	x		x	x	
MLH1 (+)	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MSH2 (-)	16 (53,3%)	7 (8,6%)		x	x		x	x	
MSH2 (+)	14 (46,7%)	74 (91,4%)	0,490, <0,001	x	x	x	x	x	x
MSH6 (-)	17 (56,7%)	11 (13,4%)		20 (80%)	9 (9,9%)		x	x	
MSH6 (+)	13 (43,3%)	71 (86,6%)	0,442, <0,001	5 (20%)	82 (90,1%)	0,666, <0,001	x	x	x
PMS2 (-)	16 (53,3%)	8 (21,8%)		13 (56,5%)	11 (12,5%)		12 (41,4%)	13 (15,3%)	
PMS2 (+)	14 (46,7%)	72 (78,2%)	0,467, <0,001	10 (43,5%)	77 (87,5%)	0,433, <0,001	17 (58,6%)	72 (84,7%)	0,275, 0,003

3 Associações entre a negatividade para cada uma das enzimas MMR individualmente e as características clínico-patológicas

3.1 MLH1 (Tabela 5)

Quando a presente série de casos foi analisada de acordo com o estado de MLH1, os tumores primários negativos para este marcador exibiram conformação macroscópica, segundo classificação de Borrmann, predominantemente polipóide e/ou vegetante (tipos I e II: 67,7% vs 18,9%, $p < 0,001$). Segundo a classificação histológica de Lauren, apenas quatro tumores negativos para MLH1 foram qualificados como de fenótipo difuso (12,9% vs 40,5%, $p = 0,005$). Utilizando a classificação histológica da Organização Mundial de Saúde (OMS), os tumores primários negativos para MLH1 foram mais frequentemente de tipo tubular/túbulo-papilífero (87,1% vs 52,9%, $p = 0,009$). O tipo expansivo de Ming foi mais frequentemente

identificado dentre os tumores negativos do que positivos para MLH1 (38,7% vs 18,8%, $p=0,027$), assim como profundidade máxima de infiltração limitada a camada muscular própria (67,7% vs 36,5%, $p=0,011$).

Apesar de não ter atingido o nível de significância estatística, o infiltrado inflamatório linfomononuclear intra/peritumoral mostrou tendência em ser mais comumente qualificado como acentuado nos casos negativos para MLH1 (13/31: 41,9% vs 18/85: 21,2%, $p=0,064$).

Sexo, idade, local do tumor primário, infiltração vascular venosa ou linfática, reação estromal desmoplásica, infiltração perineural, estado das cadeias linfonodais ou estadiamento TNM não se mostraram associados com o estado do tumor primário para MLH1.

Tabela 5 - Associação entre o estado do tumor primário para MLH1 e as variáveis clínico-patológicas da série

		MLH1		p
		NEGATIVO n (%)	POSITIVO n (%)	
Sexo	Masculino	22 (71%)	59 (69,4%)	0,872
	Feminino	9 (29%)	26 (30,6%)	
Idade (média \pm D.P.)		62,1 + 15,1	60,1 + 11,9	0,446
Local do Tumor primário	Proximal	9 (30%)	30 (35,3%)	0,598
	Distal	21 (70%)	55 (64,7%)	
Tamanho do tumor primário	< 5,5 cm	10 (32,3%)	40 (47,1%)	0,154
	> ou = 5,5 cm	21 (67,7%)	45 (52,9%)	
Tipo macroscópico de Borrmann	I e II	21 (67,7%)	16 (18,9%)	<0,001
	III e IV	10 (32,3%)	69 (81,1%)	
Tipo histológico OMS	Tubular/Tubulo-papilífero	27 (87,1%)	45 (52,9%)	0,009
	Adenocarcinoma mucinoso	2 (6,5%)	4 (4,7%)	
	Células em "anel-de-sinete"	2 (6,5%)	32 (37,6%)	
	Outros	0	2 (2,4%)	
	Indiferenciados	0	2 (2,4%)	
Tipo histológico de Lauren	intestinal	27 (87,1%)	50 (59,5%)	0,005
	difuso	4 (12,9%)	34 (40,5%)	
Tipo histológico de Ming	Infiltrativo	19 (61,3%)	69 (81,2%)	0,027
	Expansivo	12 (38,7%)	16 (18,8%)	
Profundidade de infiltração	muscular própria	21 (67,7%)	31 (36,5%)	0,011
	subserosa	10 (32,3%)	53 (62,4%)	
	estruturas adjacentes	0	1 (1,2%)	
Infiltrado linfomononuclear	ausente	2 (6,5%)	4 (4,7%)	0,064
	leve a moderado	16 (51,6%)	63 (74,1%)	
	acentuado	13 (41,9%)	18 (21,2%)	
Reação estromal desmoplásica	ausente a leve	13 (41,9%)	43 (50,6%)	0,409
	moderada a acentuada	18 (58,1%)	42 (49,4%)	
Invasão vascular linfática	não detectada	17 (54,8%)	39 (45,9%)	0,393
	presente	14 (45,2%)	46 (54,1%)	
Invasão vascular venosa	não detectada	27 (87,1%)	67 (78,8%)	0,315
	presente	4 (12,9%)	18 (21,2%)	
Infiltração perineural	não detectada	18 (58,1%)	37 (43,5%)	0,165
	presente	13 (41,9%)	48 (56,5%)	
Metástase linfonodal	pN0	11 (35,5%)	25 (29,4%)	0,186
	pN1	18 (58,1%)	39 (45,9%)	
	pN2	2 (6,5%)	20 (23,5%)	
	pN3	0	1 (1,2%)	
Estadiamento patológico (TNM)	Estadio IB	10 (32,3%)	25 (29,4%)	0,254
	Estadio II	18 (58,1%)	35 (41,2%)	
	Estadio IIIA	3 (9,7%)	22 (25,9%)	
	Estadio IIIB	0	1 (1,2%)	
	Estadio IV	0	2 (2,4%)	

3.2 MSH2 (Tabela 6)

Com relação a expressão de MSH2, os tumores primários negativos para este marcador apresentaram configuração macroscópica predominantemente polipóide/vegetante (tipos I/II) segundo a classificação de Borrmann (88% vs 16,8%, $p < 0,001$). Pela classificação histológica de Lauren, os tumores MSH2 negativos foram mais frequentemente assinalados como de fenótipo intestinal (96% vs 59,6%, $p = 0,001$), isto refletindo-se também na da OMS, sendo os adenocarcinomas de tipo tubular/túbulo-papilar mais frequentemente encontrado dentre os casos MSH2 negativos (92% vs 53,7%, $p = 0,008$). Com relação a classificação de Ming, foi possível constatar que o tipo expansivo foi mais frequente dentre os casos negativos para MSH2 (48% vs 15,8%, $p = 0,001$), assim como seu nível de infiltração máxima restrito a camada muscular própria (68% vs 37,9%, $p = 0,025$). Já a infiltração perineural foi menos frequentemente detectada entre os tumores primários negativos para MSH2 (32% vs 57,9%, $p = 0,016$). Os tumores primários negativos para MSH2 tiveram ainda a reação estromal desmoplásica menos frequentemente qualificada como moderada a acentuada (32% vs 58,9%, $p = 0,021$).

Sexo, idade, local ou tamanho do tumor primário, infiltrado linfomononuclear intra/peritumoral, infiltração vascular venosa ou linfática, estado de comprometimento das cadeias linfonodais locorregionais e estadiamento TNM não mostraram-se associadas a perda de expressão de MSH2.

Tabela 6 - Associação entre o estado do tumor primário para MSH2 e as variáveis clínico-patológicas da série

		MSH2		p
		NEGATIVO n (%)	POSITIVO n (%)	
Sexo	Masculino	18 (72%)	65 (68,4%)	0,730
	Feminino	7 (28%)	30 (31,6%)	
Idade (média ± D.P.)		64,5 ± 11,9	59,5 ± 12,8	0,081
Local do Tumor primário	Proximal	5 (20%)	37 (39,4%)	0,072
	Distal	20 (80%)	57 (60,6%)	
Tamanho do tumor primário	< 5,5 cm	8 (32%)	43 (45,3%)	0,233
	> ou = 5,5 cm	17 (68%)	52 (54,7%)	
Tipo macroscópico de Borrmann	I e II	22 (88%)	16 (16,8%)	<0,001
	III e IV	3 (12%)	79 (83,2%)	
Tipo histológico OMS	Tubular/Tubulo-papilífero	23 (92%)	51 (53,7%)	0,008
	Adenocarcinoma mucinoso	0	8 (8,4%)	
	Células em "anel-de-sinete"	1 (4%)	33 (37,7%)	
	Outros	0	2 (2,1%)	
	Indiferenciados	1 (4%)	1 (1,1%)	
Tipo histológico de Lauren	intestinal	24 (96%)	56 (59,6%)	0,001
	difuso	1 (4%)	38 (40,4%)	
Tipo histológico de Ming	Infiltrativo	13 (52%)	60 (84,2%)	0,001
	Expansivo	12 (48%)	15 (15,8%)	
Profundidade de infiltração	muscular própria	17 (68%)	36 (37,9%)	0,025
	subserosa	8 (32%)	58 (61,1%)	
	estruturas adjacentes	0	1 (1,1%)	
Infiltrado linfomononuclear	ausente	1 (4%)	5 (5,3%)	0,191
	leve a moderado	14 (56%)	69 (72,6%)	
	acentuado	10 (40%)	21 (22,1%)	
Reação estromal desmoplásica	ausente a leve	17 (68%)	40 (42,1%)	0,021
	moderada a acentuada	8 (32%)	55 (57,9%)	
Invasão vascular linfática	não detectada	12 (48%)	45 (47,4%)	0,955
	presente	13 (52%)	50 (52,6%)	
Invasão vascular venosa	não detectada	21 (84%)	76 (80%)	0,651
	presente	4 (16%)	19 (20%)	
Infiltração perineural	não detectada	17 (68%)	39 (41,1%)	0,016
	presente	8 (32%)	56 (58,9%)	
Metástase linfonodal	pN0	7 (28%)	31 (32,6%)	0,426
	pN1	15 (60%)	41 (43,2%)	
	pN2	3 (12%)	22 (23,2%)	
	pN3	0	1 (1,1%)	
Estadiamento patológico (TNM)	Estadio IB	6 (24%)	31 (32,6%)	0,190
	Estadio II	16 (64%)	36 (37,9%)	
	Estadio IIIA	3 (12%)	25 (26,3%)	
	Estadio IIIB	0	1 (1,1%)	
	Estadio IV	0	2 (2,1%)	

3.3 MSH6 (Tabela 7)

Tumores primários mais comumente pertencentes aos tipos I e II da classificação de Borrmann foram identificados dentre as lesões MSH6 negativas (82,8% vs 14,4%, $p < 0,001$). Fenótipo intestinal segundo a classificação de Lauren e expansivo conforme a de Ming foram mais comumente assinalados para os tumores primários MSH6 negativos (96,6% vs 55,2%, $p < 0,001$ e 55,2% vs 13,4%, $p < 0,001$, respectivamente). Conforme antecipado, a distribuição dos casos segundo a classificação de Lauren refletiu-se pela classificação da OMS, com o fenótipo tubular/túbulo-papilífero mais frequentemente assinalado para os casos MSH6 negativos (93,1% vs 49,5%, $p = 0,001$). Ainda, infiltração perineural foi menos detectada dentre as neoplasias primárias MSH6 negativas (34,5% vs 56,7%, $p = 0,036$).

Ainda que sem atingir o nível de significância estatística, as análises realizadas puderam identificar tendência de associação entre negatividade para MSH6 e infiltrado linfomononuclear acentuado e reação desmoplásica qualificada como ausente a discreta (12/29: 41,4% vs 20/97: 20,6%, $p = 0,079$ e 18/29: 62,1% vs 42/97: 43,3%, $p = 0,076$, respectivamente).

Sexo, idade, local ou tamanho do tumor primário, profundidade máxima de infiltração na parede gástrica, invasão vascular venosa ou linfática, estado das cadeias linfonodais regionais e estadiamento TNM não se mostraram associados a expressão de MSH6 pelo tumor primário.

Tabela 7. Associação entre o estado do tumor primário para MSH6 e as variáveis clínico-patológicas da série

		MSH6		p
		NEGATIVO n (%)	POSITIVO n (%)	
Sexo	Masculino	20 (69%)	68 (70,1%)	0,907
	Feminino	9 (31%)	29 (29,9%)	
Idade (média ± D.P.)		59,1 ± 14,4	60,7 ± 12,6	0,559
Local do Tumor primário	Proximal	11 (37,9%)	31 (32,3%)	0,573
	Distal	18 (62,1%)	65 (67,7%)	
Tamanho do tumor primário	< 5,5 cm	10 (34,5%)	47 (48,5%)	0,185
	> ou = 5,5 cm	19 (65,5%)	50 (51,5%)	
Tipo macroscópico de Borrmann	I e II	24 (82,8%)	14 (14,4%)	<0,001
	III e IV	5 (17,2%)	83 (85,6%)	
Tipo histológico OMS	Tubular/Tubulo-papilífero	27 (93,1%)	48 (49,5%)	0,001
	Adenocarcinoma mucinoso	0	7 (7,2%)	
	Células em "anel-de-sinete"	1 (3,4%)	39 (40,2%)	
	Outros	1 (3,4%)	1 (1%)	
	Indiferenciados	0	2 (2,1%)	
Tipo histológico de Lauren	intestinal	28 (96,6%)	53 (55,2%)	<0,001
	difuso	1 (3,4%)	43 (44,8%)	
Tipo histológico de Ming	Infiltrativo	13 (44,8%)	84 (86,6%)	<0,001
	Expansivo	16 (55,2%)	13 (13,4%)	
Profundidade de infiltração	muscular própria	16 (55,2%)	041 (42,3%)	0,427
	subserosa	13 (44,8%)	55 (56,7%)	
	estruturas adjacentes	0	1 (1%)	
Infiltrado linfomononuclear	ausente	1 (3,4%)	5 (5,2%)	0,079
	leve a moderado	16 (55,2%)	72 (74,2%)	
	acentuado	12 (41,4%)	20 (20,6%)	
Reação estromal desmoplásica	ausente a leve	18 (62,1%)	42 (43,3%)	0,076
	moderada a acentuada	11 (37,9%)	55 (56,7%)	
Invasão vascular linfática	não detectada	14 (48,3%)	50 (51,5%)	0,757
	presente	15 (51,7%)	47 (48,5%)	
Invasão vascular venosa	não detectada	25 (86,2%)	78 (80,4%)	0,478
	presente	4 (13,8%)	19 (19,6%)	
Infiltração perineural	não detectada	19 (65,5%)	42 (43,3%)	0,036
	presente	10 (34,5%)	55 (56,7%)	
Metástase linfonodal	pN0	9 (31%)	32 (33%)	0,662
	pN1	15 (51,7%)	44 (45,4%)	
	pN2	4 (13,8%)	20 (20,6%)	
	pN3	1 (3,4%)	1 (1%)	
Estadiamento patológico (TNM)	Estadio IB	8 (27,6%)	32 (33%)	0,645
	Estadio II	15 (51,7%)	40 (41,2%)	
	Estadio IIIA	5 (17,2%)	22 (22,7%)	
	Estadio IIIB	0	2 (2,1%)	
	Estadio IV	1 (3,4%)	1 (1%)	

3.4 PMS2 (Tabela 8)

Os pacientes portadores de tumores negativos para PMS2 foram significativamente mais idosos do que aqueles positivos para este marcador ($59,1 \pm 12,4$ anos vs $64,8 \pm 13,3$ anos, $p=0,046$). Assim como para os outros três marcadores, houve predomínio dos tipos macroscópicos polipóide e vegetante (tipos I e II) da classificação de Borrmann (56% vs 24,5%, $p=0,002$) e fenótipo intestinal da classificação de Lauren (84% vs 59,1%, $p=0,021$) dentre os casos negativos. Infiltração perineural esteve menos frequentemente associada a ausência de expressão de PMS2 (36% vs 59,6%, $p=0,035$).

Os demais parâmetros clínico-patológicos não mostraram associação estatisticamente significativa com o estado de expressão de PMS2.

Tabela 8 - Associação entre o estado do tumor primário para PMS2 e as variáveis clínico-patológicas da série

		PMS2		p
		NEGATIVO n (%)	POSITIVO n (%)	
Sexo	Masculino	19 (76%)	65 (69,1%)	0,504
	Feminino	6 (24%)	29 (30,9%)	
Idade (média ± D.P.)		64,8 + 13,3	59,1 + 12,4	0,046
Local do Tumor primário	Proximal	5 (20%)	34 (36,6%)	0,118
	Distal	20 (80%)	59 (63,4%)	
Tamanho do tumor primário	< 5,5 cm	8 (32%)	44 (46,8%)	0,185
	> ou = 5,5 cm	17 (68%)	50 (53,2%)	
Tipo macroscópico de Borrmann	I e II	14 (56%)	23 (24,5%)	0,002
	III e IV	11 (44%)	71 (75,5%)	
Tipo histológico OMS	Tubular/Tubulo-papilífero	20 (80%)	51 (54,3%)	0,063
	Adenocarcinoma mucinoso	2 (8%)	4 (4,3%)	
	Células em "anel-de-sinete"	2 (8%)	36 (38,3%)	
	Outros	0	2 (2,1%)	
	Indiferenciados	1 (4%)	1 (1,1%)	
Tipo histológico de Lauren	intestinal	21 (84%)	55 (59,1%)	0,021
	difuso	4 (16%)	38 (40,9%)	
Tipo histológico de Ming	Infiltrativo	18 (72%)	71 (75,5%)	0,718
	Expansivo	7 (28%)	23 (24,5%)	
Profundidade de infiltração	muscular própria	15 (60%)	37 (39,4%)	0,169
	subserosa	10 (40%)	56 (59,6%)	
	estruturas adjacentes	0	1 (1,1%)	
Infiltrado linfomononuclear	ausente	2 (8%)	4 (4,3%)	0,121
	leve a moderado	13 (52%)	69 (73,4%)	
	acentuado	10 (40%)	21 (22,3%)	
Reação estromal desmoplásica	ausente a leve	11 (44%)	44 (46,8%)	0,802
	moderada a acentuada	14 (56%)	50 (53,2%)	
Invasão vascular linfática	não detectada	10 (40%)	46 (48,9%)	0,426
	presente	15 (60%)	48 (51,1%)	
Invasão vascular venosa	não detectada	22 (88%)	75 (79,8%)	0,347
	presente	3 (12%)	19 (20,2%)	
Infiltração perineural	não detectada	16 (64%)	38 (40,4%)	0,035
	presente	9 (36%)	56 (59,6%)	
Metástase linfonodal	pN0	10 (40%)	28 (29,8%)	0,413
	pN1	13 (52%)	45 (47,9%)	
	pN2	2 (8%)	20 (21,3%)	
	pN3	0	1 (1,1%)	
Estadiamento patológico (TNM)	Estadio IB	9 (36%)	28 (29,8%)	0,357
	Estadio II	14 (56%)	40 (42,6%)	
	Estadio IIIA	2 (8%)	23 (24,5%)	
	Estadio IIIB	0	1 (1,1%)	
	Estadio IV	0	2 (2,1%)	

3.5 Súmula das associações entre as características clínico-patológicas e os marcadores MMR (Tabela 9)

Para maior facilidade na comparação das diversas associações entre o estado de cada marcador MMR e as características clínico-patológicas, uma súmula das significâncias (p)  reapresentada na Tabela 9.

Tabela 9 - Sumário das significâncias das associações entre o estado das quatro enzimas MMR avaliadas individualmente no tumor primário e as variáveis clínico-patológicas da presente série

	MLH1, p	MSH2, p	MSH6, p	PMS2, p
Sexo	0,872	0,730	0,907	0,504
Idade	0,446	0,081	0,559	0,046
Local do tumor primario	0,598	0,072	0,573	0,118
Tamanho do tumor primário	0,154	0,223	0,185	0,185
Tipo macroscópico de Borrmann	<0,001	<0,001	<0,001	0,002
Tipo histológico OMS	0,009	0,008	0,001	0,063
Tipo histológico de Lauren	0,005	0,001	<0,001	0,021
Tipo histológico de Ming	0,027	0,001	<0,001	0,718
Profundidade de infiltração	0,011	0,025	0,427	0,169
Infiltrado linfomononuclear	0,064	0,191	0,079	0,121
Reação estromal desmoplásica	0,409	0,021	0,076	0,802
Invasão vascular linfática	0,393	0,955	0,757	0,426
Invasão vascular venosa	0,315	0,651	0,478	0,347
Infiltração perineural	0,165	0,016	0,036	0,035
Metástase linfonodal	0,186	0,426	0,662	0,413
Estadiamento patológico (TNM)	0,254	0,190	0,645	0,357

4 Associações entre as co-negatividades para os pares MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6 e as variáveis clínico-patológicas

4.1 Co-negatividade para MLH1 e PMS2 (Tabela 10)

Tomados como um grupo, os dezesseis tumores primários concomitantemente negativos para MLH1 e PMS2 ocorreram em pacientes significativamente mais idosos ($65,7 \pm 13,8$ vs $59,1 \pm 12,1$ anos, $p=0,050$), foram de tamanho maior (com relação a mediana de 5,5 cm, 81,3% vs 50%, $p=0,021$) e foram de padrão macroscópico predominantemente polipóide/vegetante (tipos I e II de Borrmann, 68,8% vs 13,6%, $p<0,001$). Com relação ao padrão histológico conforme classificação da OMS, houve predomínio dos fenótipos tubular e túbulo-papilífero dentre os tumores negativos para estes marcadores (93,8% vs 43,2%, $p=0,005$), distribuição esta reproduzida quando a série foi avaliada segundo a classificação de Lauren no que tange ao predomínio do fenótipo intestinal (93,8% vs 48,3%, $p=0,001$). O padrão expansivo de Ming predominante dentre os tumores negativos quando as análises foram feitas para MLH1, MSH2 e MSH6, foi também verificado para os casos MLH1/PMS2 negativos (37,5% vs 14,8%, $p=0,030$). Os casos negativos tiveram o infiltrado linfomononuclear intra/peritumoral mais frequentemente qualificado como acentuado (50% vs 17%, $p=0,011$). Sexo, local do tumor primário, Infiltração vascular linfática e venosa ou perineural, reação estromal desmoplásica, assim como o

estadiamento global ou das cadeias linfonodais, não mostraram associação com estado de negatividade simultânea do par MLH1/PMS2.

Tabela 10 - Associação entre a co-negatividade para MLH1 e PMS2 e as variáveis clínico-patológicas da série

		MLH1 e PMS2		p
		positivos n, (%)	negativos n, (%)	
Sexo	Masculino	60 (68,2%)	11 (68,8%)	0,964
	Feminino	28 (31,8%)	5 (13%)	
Idade (média \pm D.P.)		59,1 \pm 12,1	65,7 \pm 13,8	0,050
Local do Tumor primário	Proximal	27 (30,7%)	3 (15,8%)	0,190
	Distal	61 (69,3%)	16 (84,2%)	
Tamanho do tumor primário	< 5,5 cm	44 (50%)	3 (18,8%)	0,021
	> ou = 5,5 cm	44 (50%)	13 (81,3%)	
Tipo macroscópico de Borrmann	I e II	12 (13,6%)	11 (68,8%)	< 0,001
	III e IV	76 (86,4%)	5 (31,3%)	
Tipo histológico OMS	Tubular/Tubulo-papilífero	38 (43,2%)	15 (93,8%)	0,005
	Adenocarcinoma mucinoso	6 (6,8%)	1 (6,3%)	
	Células em "anel-de-sinete"	42 (47,7%)	0	
	Outros	1 (1,1%)	0	
	Indiferenciados	1 (1,1%)	0	
Tipo histológico de Lauren	intestinal	42 (48,3%)	15 (93,8%)	0,001
	difuso	45 (51,7%)	1 (6,3%)	
Tipo histológico de Ming	Infiltrativo	75 (85,2%)	10 (62,5)	0,030
	Expansivo	13 (14,8%)	6 (37,5%)	
Profundidade de infiltração	muscular própria	31 (35,2%)	11 (68,8%)	0,041
	subserosa	56 (63,6%)	5 (31,3%)	
	estruturas adjacentes	1 (1,1%)	0,0	
Infiltrado linfomononuclear	ausente	4 (4,5%)	1 (6,3%)	0,011
	leve a moderado	69 (78,4%)	7 (43,8%)	
	acentuado	15 (17%)	8 (50%)	
Reação estromal desmoplásica	ausente a leve	37 (42%)	5 (31,3%)	0,418
	moderada a acentuada	51 (58%)	11 (68,8%)	
Invasão vascular linfática	não detectada	44 (50%)	6 (37,5%)	0,367
	presente	44 (50%)	10 (62,5%)	
Invasão vascular venosa	não detectada	69 (78,4%)	13 (81,3%)	0,798
	presente	19 (21,6%)	3 (18,7%)	
Infiltração perineural	não detectada	35 (39,8%)	10 (62,5%)	0,091
	presente	53 (60,2%)	6 (37,5%)	
Metástase linfonodal	pN0	26 (29,5%)	6 (37,5%)	0,427
	pN1	40 (45,5%)	9 (56,3%)	
	pN2	21 (23,9%)	1 (6,3%)	
	pN3	1 (1,1%)	0	
Estadiamento patológico (TNM)	Estadio IB	26 (29,5%)	5 (31,3%)	0,411
	Estadio II	37 (42%)	10 (62,5%)	
	Estadio IIIA	22 (25%)	1 (6,3%)	
	Estadio IIIB	2 (2,3%)	0	
	Estadio IV	1 (1,1%)	0	

4.2 Co-negatividade para MSH2 e MSH6 (Tabela 11)

O grupo de 19 lesões em que houve perda simultânea de expressão de MSH2 e MSH6 exibiu fenótipo macroscópico predominantemente polipóide/vegetante (100% vs 13,6%, $p < 0,001$) e segundo a classificação da OMS foi verificado, assim como para os casos com perda de expressão simultânea de MLH1 e PMS2, predomínio de fenótipos tubular e túbulo-papilífero (94,7% vs 43,2%, $p = 0,002$), este reproduzido na classificação de Lauren no que diz respeito ao fenótipo intestinal (94,7% vs 48,3%, $p < 0,001$). A perda de MSH2 e MSH6 esteve associada a padrão expansivo segundo classificação de Ming (57,9% vs 14,8%, $p < 0,001$), profundidade máxima de infiltração restrita a camada muscular própria (68,4% vs 35,2%, $p = 0,028$), infiltrado linfomononuclear qualificado como acentuado (47,4% vs 17%, $p = 0,013$) e reação estromal desmoplásica qualificada como ausente/leve (68,4% vs 42%, $p = 0,037$). Apesar de estatisticamente não significativa, houve tendência de associação entre co-negatividade para MSH2 e MSH6 e a não detecção de infiltração perineural (53/88: 60,2% vs 7/19: 36,8%, $p = 0,063$).

Sexo, idade, local ou tamanho do tumor primário, Infiltração vascular venosa ou linfática, estado das cadeias linfonodais ou estadiamento patológico TNM não se mostraram associados ao estado de expressão simultânea de MSH2 e MSH6.

Tabela 11 - Associação entre a co-negatividade para MSH2 e MSH6 e as variáveis clínico-patológicas da série

		MSH2 e MSH6		p
		positivos n, (%)	negativos n, (%)	
Sexo	Masculino	60 (68,2%)	13 (68,4%)	0,984
	Feminino	28 (31,8%)	6 (31,6%)	
Idade (média ± D.P.)		59,1 + 12,1	62,3 + 12,5	0,295
Local do Tumor primário	Proximal	27 (30,7%)	4 (25%)	0,648
	Distal	61 (69,3%)	12 (75%)	
Tamanho do tumor primário	< 5,5 cm	44 (50%)	5 (26,3%)	0,060
	> ou = 5,5 cm	44 (50%)	14 (73,7%)	
Tipo macroscópico de Borrmann	I e II	12 (13,6%)	19 (100%)	<0,001
	III e IV	76 (86,4%)	0	
Tipo histológico OMS	Tubular/Tubulo-papilífero	38 (43,2%)	19 (94,7%)	0,002
	Adenocarcinoma mucinoso	6 (6,8%)	0	
	Células em "anel-de-sinete"	42 (47,7%)	1 (5,3%)	
	Outros	1 (1,1%)	0	
	Indiferenciados	1 (1,1%)	0	
Tipo histológico de Lauren	intestinal	42 (48,3%)	18 (94,7%)	<0,001
	difuso	45 (51,7%)	1 (5,3%)	
Tipo histológico de Ming	Infiltrativo	75 (85,2%)	8 (42,1%)	<0,001
	Expansivo	13 (14,8%)	11 (57,9%)	
Profundidade de infiltração	muscular própria	31 (35,2%)	13 (68,4%)	0,028
	subserosa	56 (63,6%)	6 (31,6%)	
	estruturas adjacentes	1 (1,1%)	0	
Infiltrado linfomononuclear	ausente	4 (4,5%)	0	0,013
	leve a moderado	69 (78,4%)	10 (52,6%)	
	acentuado	15 (17%)	9 (47,4%)	
Reação estromal desmoplásica	ausente a leve	37 (42%)	13 (68,4%)	0,037
	moderada a acentuada	51 (58%)	6 (31,6%)	
Invasão vascular linfática	não detectada	44 (50%)	10 (52,6%)	0,835
	presente	44 (50%)	9 (47,4%)	
Invasão vascular venosa	não detectada	69 (78,4%)	16 (84,2%)	0,570
	presente	19 (21,6%)	3 (15,8%)	
Infiltração perineural	não detectada	35 (39,8%)	12 (63,2%)	0,063
	presente	53 (60,2%)	7 (36,8%)	
Metástase linfonodal	pN0	26 (29,5%)	7 (36,8%)	0,305
	pN1	40 (45,5%)	11 (57,9%)	
	pN2	21 (23,9%)	1 (5,3%)	
	pN3	1 (1,1%)	0	
Estadiamento patológico (TNM)	Estadio IB	26 (29,5%)	6 (31,6%)	0,285
	Estadio II	37 (42%)	12 (63,2%)	
	Estadio IIIA	22 (25%)	1 (5,3%)	
	Estadio IIIB	2 (2,3%)	0	
	Estadio IV	1 (1,1%)	0	

4.3 Súmula das associações entre as co-negatividades para os pares MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6 e as variáveis clínico-patológicas (Tabela 12)

Para maior facilidade na comparação das diversas associações entre as co-negatividades para cada par heterodimérico de enzimas MMR e as características clínico-patológicas, uma súmula de suas significâncias (p)  reapresentada na Tabela 12.

Tabela 12 - Sumário das significâncias das associações entre o estado dos pares específicos de enzimas MMR avaliadas conjuntamente no tumor primário e as variáveis clínico-patológicas da presente série

	MLH1 e PMS2, p	MSH2 e MSH6, p
Sexo	0,964	0,984
Idade	0,050	0,295
Local do tumor primário	0,190	0,648
Tamanho do tumor primário	0,021	0,061
Tipo macroscópico de Borrmann	<0,001	<0,001
Tipo histológico OMS	0,005	0,002
Tipo histológico de Lauren	0,001	<0,001
Tipo histológico de Ming	0,030	<0,001
Profundidade de infiltração	0,041	0,028
Infiltrado linfomononuclear	0,011	0,013
Reação estromal desmoplásica	0,418	0,037
Invasão vascular linfática	0,367	0,835
Invasão vascular venosa	0,798	0,570
Infiltração perineural	0,091	0,063
Metástase linfonodal	0,427	0,305
Estadiamento patológico (TNM)	0,411	0,285

5 Análises univariadas do impacto das variáveis clínico-patológicas e do estado de expressão das enzimas MMR na mortalidade relacionada a doença

5.1 Perfil prognóstico

Dos 133 pacientes estudados, informes sobre o estado dos mesmos em seguimento clínico-ambulatorial estiveram disponíveis em 109 (81,9%). A média (\pm D.P.) de seguimento clínico-ambulatorial foi de $54,3 \pm 40,5$ meses e a sua mediana foi 49 meses. Dos 44 pacientes (40,3%) com evolução a óbito durante o período de seguimento, o tempo médio para este evento foi de $30,9 \pm 22,6$ e a mediana de 27 meses.

5.2 Análise univariada do impacto das variáveis clínico-patológicas: curvas de Kaplan-Meyer e determinação de LogRank

Mortalidade relacionada ao câncer gástrico mostrou-se significativamente maior nos pacientes do sexo masculino (LogRank: 5,11, $p=0,024$) e nos portadores de lesões maiores que 5,5 cm (LogRank: 3,98, $p=0,046$). Configuração macroscópica de padrões III ou IV conforme classificação de Borrmann também se associou a aumento da mortalidade (LogRank: 4,75, $p=0,029$).

Com relação aos sistemas de classificação histológica empregados no presente estudo, neoplasias de morfologia consistente com fenótipos de células em “anel-de-sinete” ou mucinoso pela classificação da OMS impactaram negativamente a sobrevida relacionada a doença (LogRank: 8,61, $p=0,003$), o mesmo sendo observado para o fenótipo difuso conforme classificação de Lauren (LogRank: 11,62, $p=0,003$).

Ainda, infiltração perineural impactou negativamente a sobrevida na presente série (LogRank: 12,62, $p<0,001$), assim como o estadiamento das cadeias linfonodais regionais (LogRank: 23,25, $p<0,001$). O estadiamento patológico TNM foi o elemento estratificador de sobrevida mais robusto na presente série (LogRank: 35,60, $p<0,001$).

As curvas ajustadas de Kaplan-Meier ilustrando o impacto das diferentes variáveis clínico-patológicas na sobrevida relacionada a doença podem ser vistas nas figuras 3 a 18.

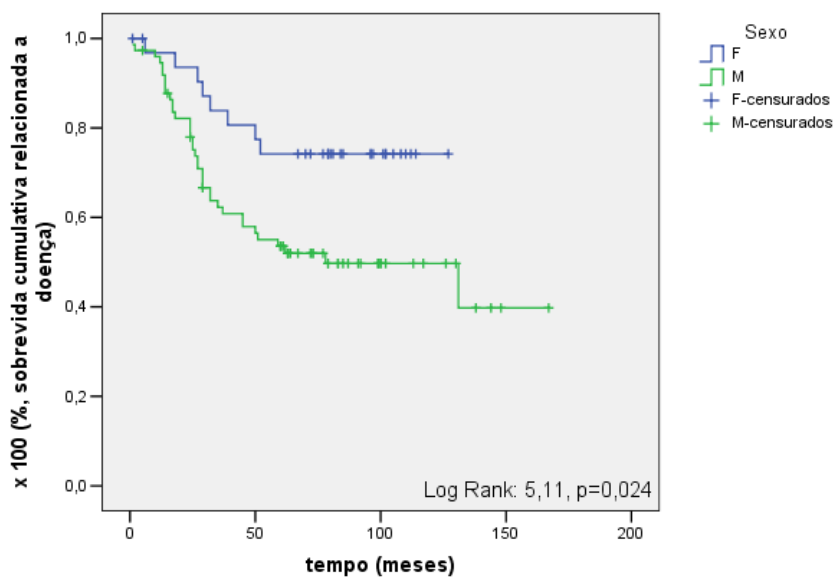


Figura 3. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do sexo na mortalidade relacionada a doença

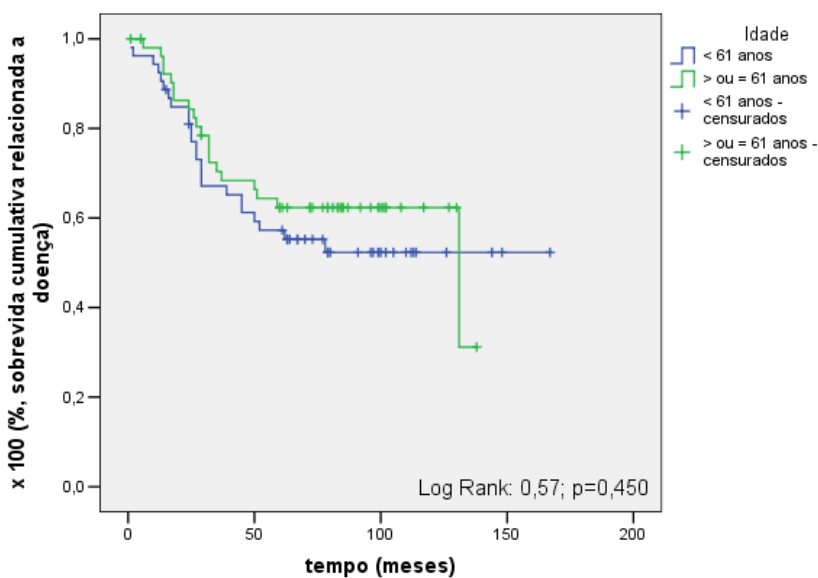


Figura 4. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto da idade na mortalidade relacionada a doença

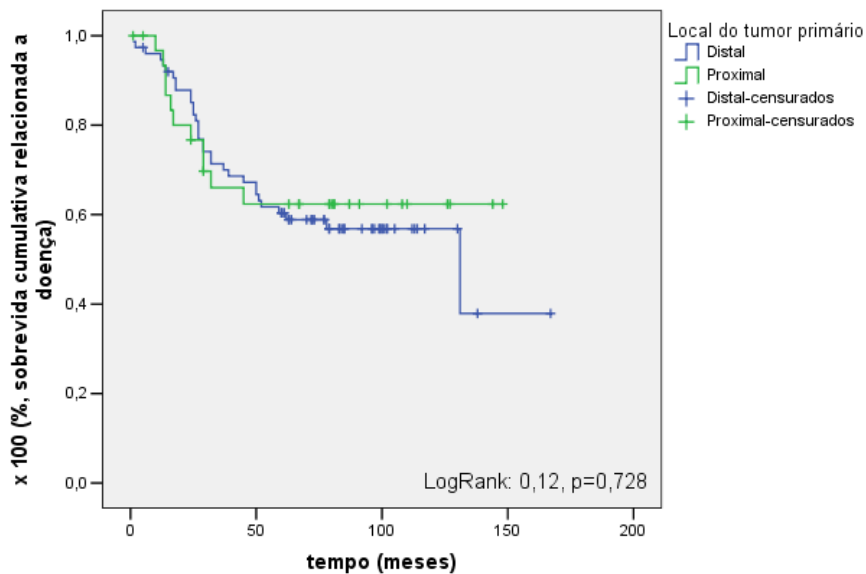


Figura 5. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do local do tumor primário na mortalidade relacionada a doença

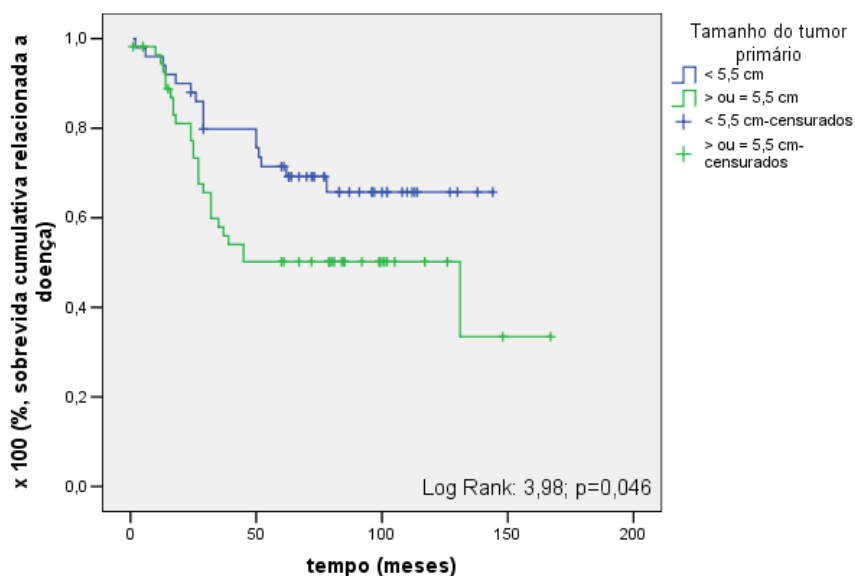


Figura 6. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do tamanho do tumor primário na mortalidade relacionada a doença

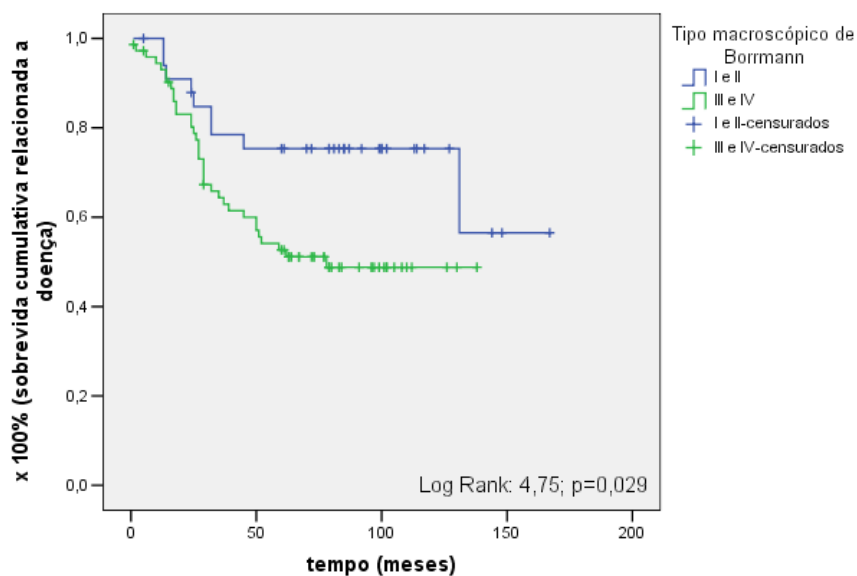


Figura 7. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do tipo macroscópico de Borrmann na mortalidade relacionada a doença

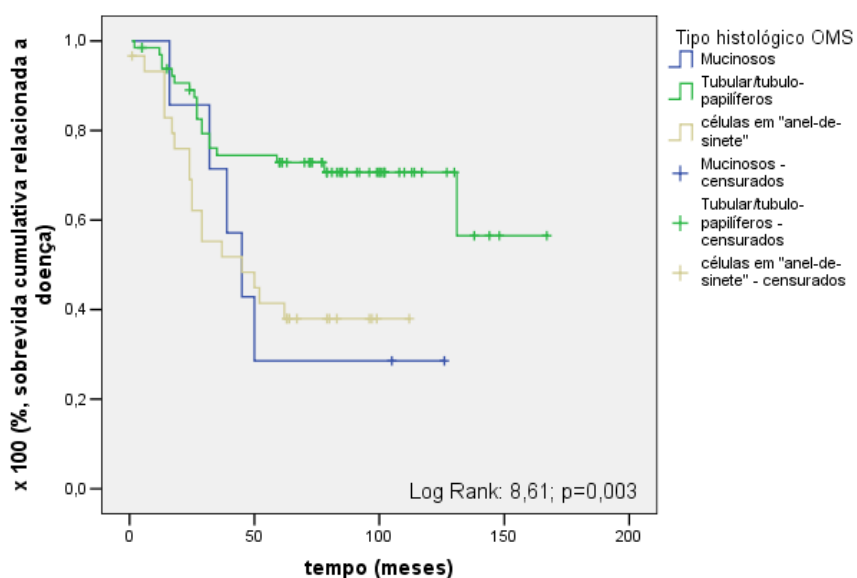


Figura 8. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do tipo histológico segundo a OMS na mortalidade relacionada a doença

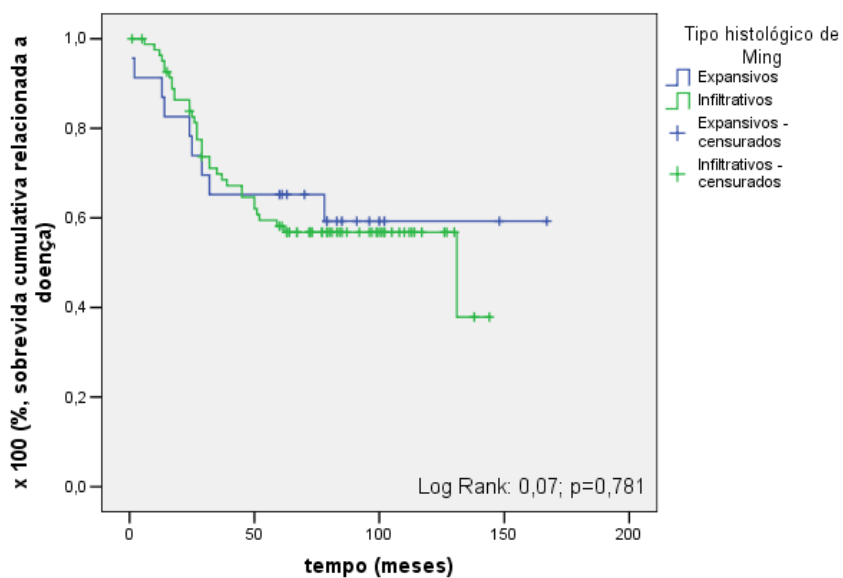


Figura 9. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do tipo histológico de Ming na mortalidade relacionada a doença

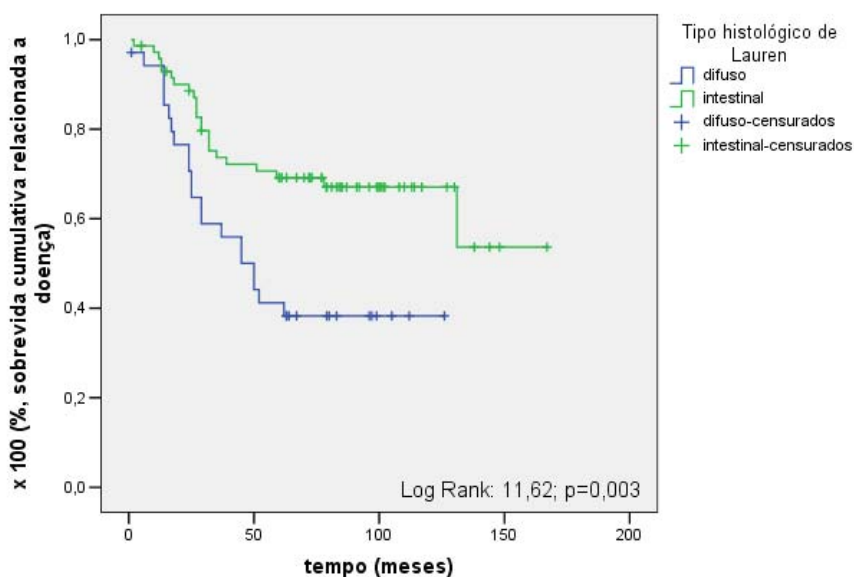


Figura 10. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto do tipo histológico de Lauren na mortalidade relacionada a doença

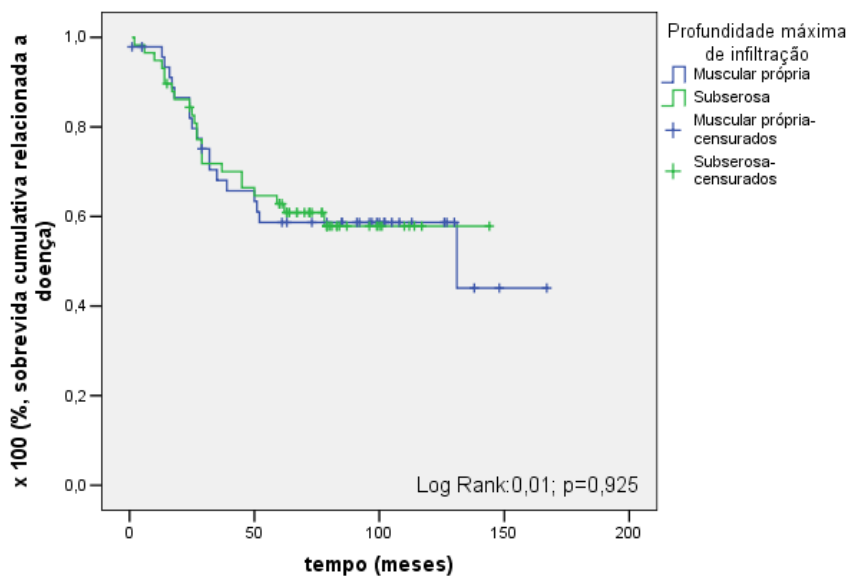


Figura 11. Curvas de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da profundidade de infiltração da parede na mortalidade relacionada a doença

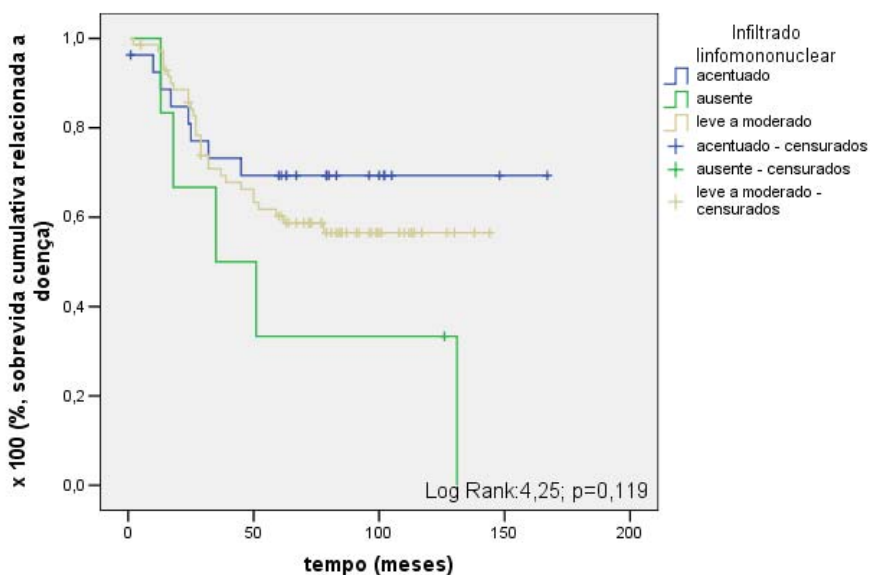


Figura 12. Curvas de Kaplan-Meier demonstrando o impacto do infiltrado linfomononuclear intra-tumoral na mortalidade relacionada a doença

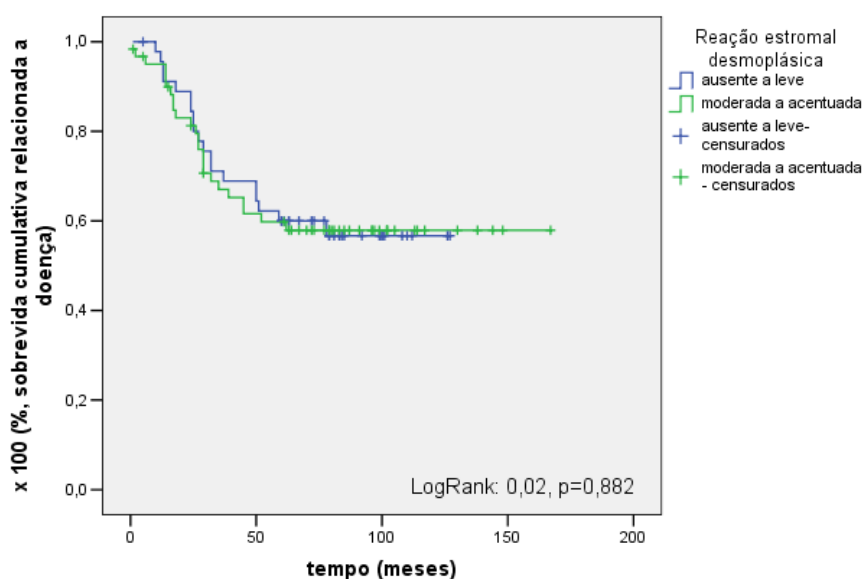


Figura 13. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto da reação estromal desmoplásica na mortalidade relacionada a doença

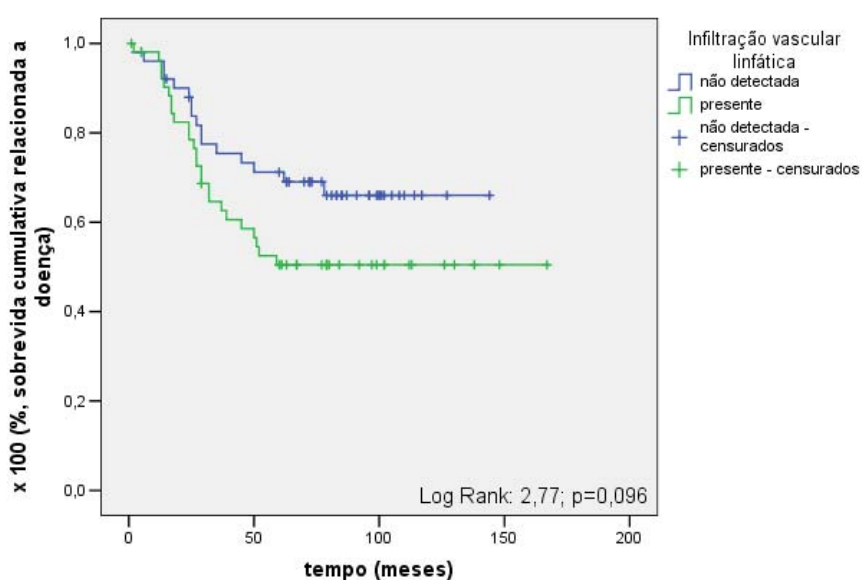


Figura 14. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto da infiltração vascular linfática na mortalidade relacionada a doença

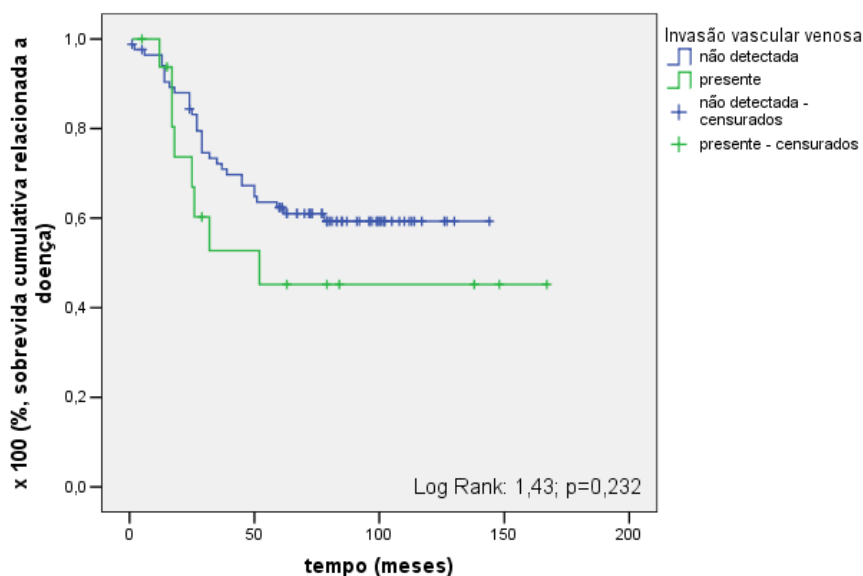


Figura 15. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto da infiltração vascular venosa na mortalidade relacionada a doença

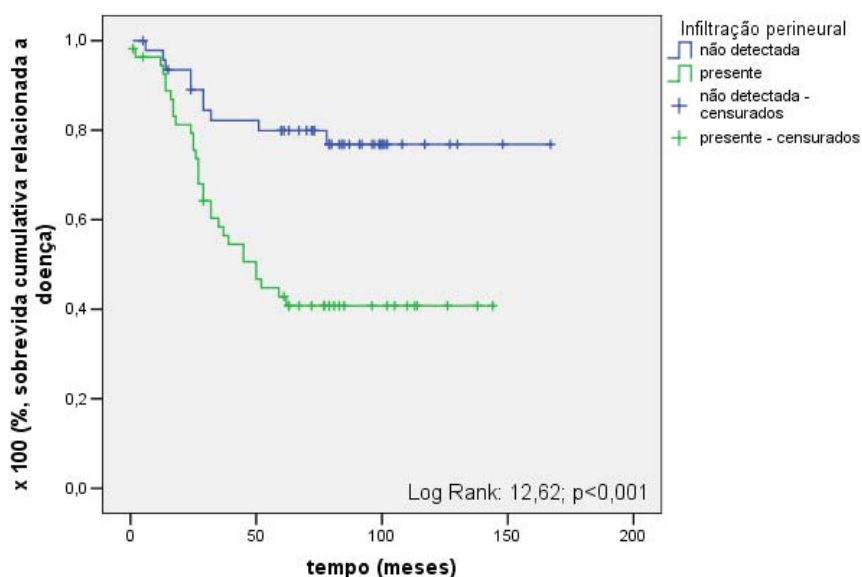


Figura 16. Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto da infiltração perineural na mortalidade relacionada a doença

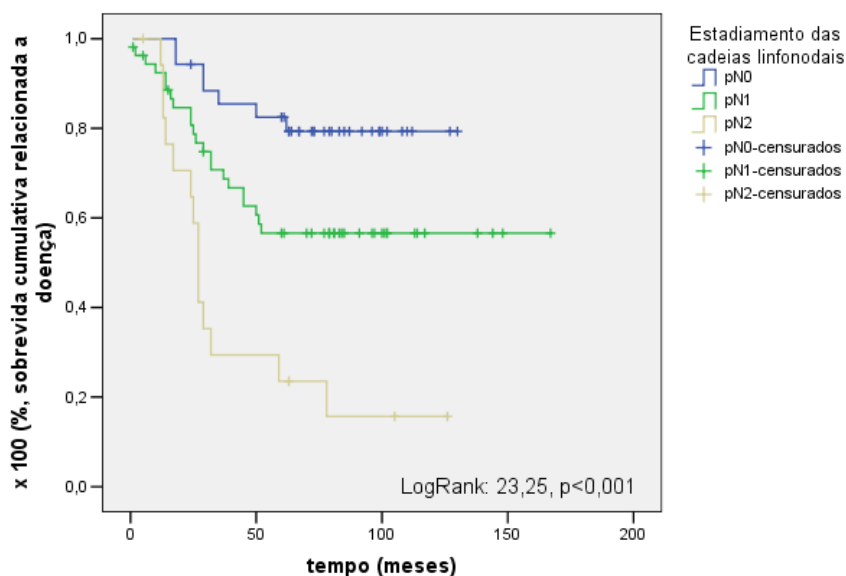


Figura 17. Curvas de Kaplan-Meier demonstrando o impacto do estado das cadeias linfonodais locorreionais na mortalidade relacionada a doença

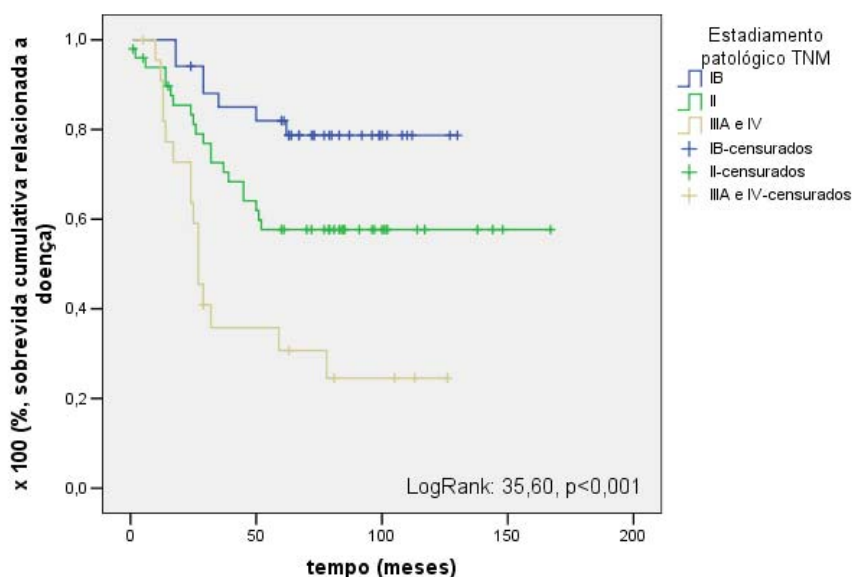


Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier demonstrando o impacto do estadiamento TNM na mortalidade relacionada a doença

Sumário dos parâmetros obtidos na análise univariada de sobrevida para o ajuste das curvas de Kaplan-Meyer encontra-se representado na tabela 13 a seguir.

Tabela 13 - Parâmetro (LogRank) e significância (p) da análise de sobrevida univariada para as diferentes variáveis clínico-patológicas avaliadas

	Log Rank	p
Sexo	5,11	0,024
Idade	0,57	0,450
Local tumor primário	0,12	0,728
Tamanho tumor primário	3,98	0,046
Tipo macroscópico de Borrmann	4,75	0,029
Tipo histológico OMS	8,61	0,003
Tipo histológico Lauren	11,62	0,003
Tipo histológico Ming	0,07	0,781
Profundidade máxima de infiltração	0,01	0,925
Infiltrado linfomononuclear	4,25	0,119
Reação estromal desmoplásica	0,02	0,882
Invasão vascular linfática	2,77	0,096
Invasão vascular venosa	1,43	0,232
Infiltração perineural	12,62	<0,001
Metástase linfonodal	23,25	<0,001
Estadiamento patológico TNM	35,60	<0,001

5.3 Análise do impacto das variáveis clínico-patológicas na sobrevida: regressão de Cox univariada e determinação dos 'Hazard Ratios' (HR)

Posteriormente a determinação da associação entre as variáveis clínico-patológicas e a sobrevida relacionada a doença através das curvas de Kaplan-Meyer e das estatísticas de LogRank conforme descrito na seção anterior, foram determinadas, mediante regressão de Cox univariada, os riscos relativos ("Hazard ratios") para estes mesmos parâmetros, conforme pode ser visto na tabela 14 a seguir.

Tabela 14 - Sumário das análises univariadas de Cox para determinação do impacto das características clínico-patológicas na sobrevida

		HR	I.C. 95%		p
			L.I.	L.S.	
Sexo	Feminino	1,00			
	Masculino	2,43	1,12	5,26	0,023
Idade	< 61 anos	1,00			
	> ou = 61 anos	0,78	0,43	1,41	0,408
Local do Tumor primário	Proximal	1,00			
	Distal	1,13	0,57	2,24	0,730
Tamanho do tumor primário	< 5,5 cm	1,00			
	> ou = 5,5 cm	1,83	0,99	3,39	0,050
Tipo macroscópico de Borrmann	I e II	1,00			
	III e IV	2,18	1,03	4,59	0,039
Tipo histológico OMS	Tubular/Tubulo-papilífero	1,00			
	Adenocarcinoma mucinoso	2,71	1,01	7,29	0,047
	células em "anel-de-sinete"	2,70	1,41	5,15	0,003
	Outros	0,00	0,00		0,980
Tipo histológico de Lauren	Indiferenciados	3,26	0,43	24,46	0,250
	intestinal	1,00			
Tipo histológico de Ming	difuso	2,41	1,32	4,39	0,004
	Expansivo	1,00			
Profundidade de infiltração	Infiltrativo	1,17	0,56	2,44	0,674
	muscular própria	1,00			
	subserosa	0,91	0,50	1,67	0,782
Infiltrado linfomononuclear	estruturas adjacentes	24,56	2,68	225,1	0,005
	ausente	1,00			
	leve a moderado	0,58	0,22	1,50	0,261
Reação estromal desmoplásica	acentuado	0,45	0,15	1,35	0,155
	ausente a leve	1,00			
	moderada a acentuada	0,98	0,54	1,78	0,949
Invasão vascular linfática	não detectada	1,00			
	presente	1,49	0,82	2,72	0,186
Invasão vascular venosa	não detectada	1,00			
	presente	1,43	0,65	3,14	0,365
Infiltração perineural	não detectada	1,00			
	presente	2,86	1,49	5,49	0,002
Metástase linfonodal	pN0	1,00			
	pN1	2,23	0,99	5,03	0,050
	pN2	6,45	2,68	15,51	<0,001
Estadiamento patológico (TNM)	Estadio IB	1,00			
	Estadio II	2,07	0,91	4,71	0,083
	Estadio IIIA	5,09	2,14	12,08	<0,001
	Estadio IV	59,93	6,07	591,13	<0,001

5.4 Análise univariada do impacto das diferentes enzimas

MMR: curvas de Kaplan-Meyer e determinação de LogRank

Impacto significativo na sobrevida relacionada a doença foi observado para o estado de expressão de MLH1 (LogRank: 5,46, $p=0,019$), MSH6 (LogRank: 6,08, $p=0,014$) e PMS2 (LogRank: 7,46, $p=0,006$). Apesar de não ter atingido significância estatística, foi observada tendência a impacto positivo na sobrevida para a perda de expressão de MSH2 (LogRank: 2,41, $p=0,120$).

Quando a análise e as curvas foram estimadas tomando os pares de MMR, a perda simultânea de expressão de MLH1 e PMS2 pelos tumores primários mostrou associação positiva com a sobrevida (LogRank: 7,89, $p=0,005$), assim como a de MSH2 e MSH6 (LogRank: 5,29, $p=0,021$).

As curvas de Kaplan-Meyer e sumário das estatísticas de LogRank podem ser vistas nas figura 18 a 23 e tabela 15 respectivamente.

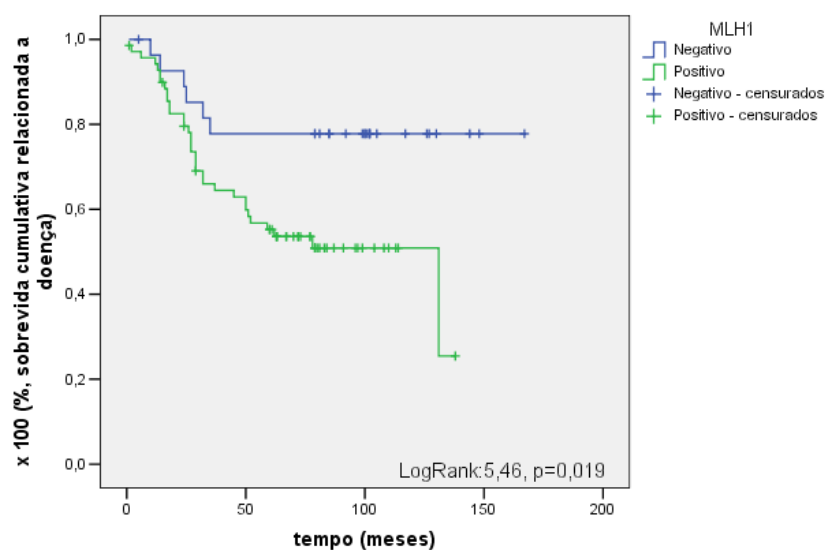


Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier ilustrando o impacto do estado de expressão de MLH1 individualmente avaliado na mortalidade relacionada a doença

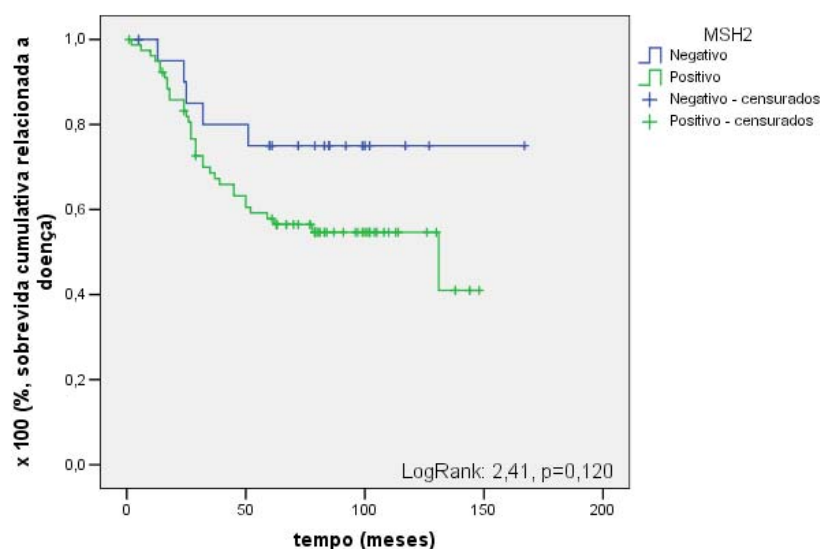


Figura 20. Curvas de Kaplan-Meier ilustrando o impacto do estado de expressão de MSH2 individualmente avaliado na mortalidade relacionada a doença

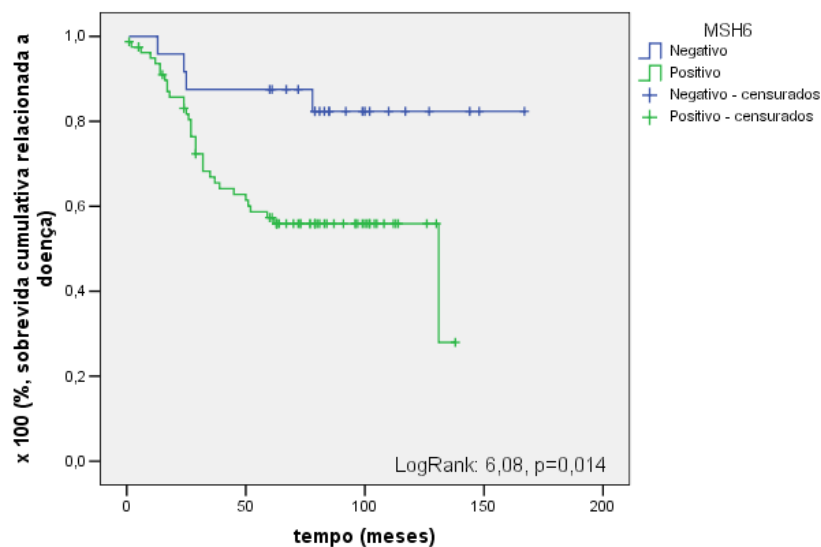


Figura 21. Curvas de Kaplan-Meier ilustrando o impacto do estado de expressão de MSH6 individualmente avaliado na mortalidade relacionada a doença

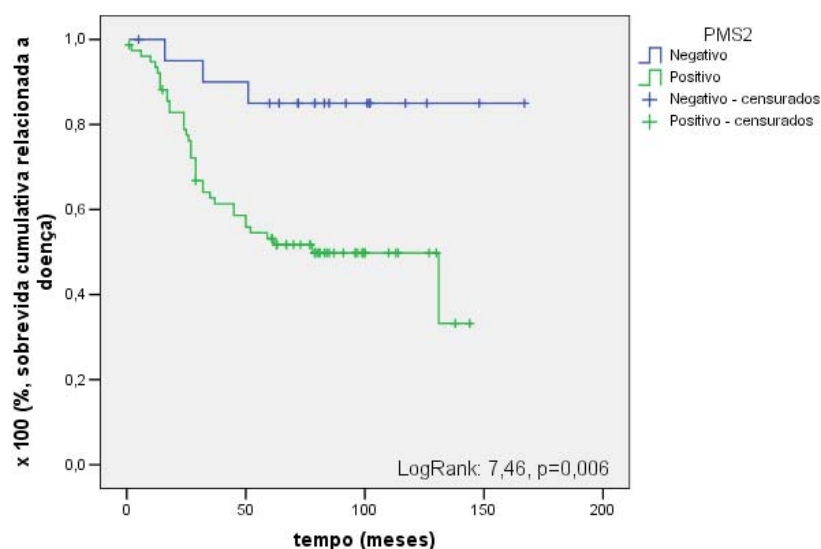


Figura 22. Curvas de Kaplan-Meier ilustrando o impacto do estado de expressão de PMS2 individualmente avaliado na mortalidade relacionada a doença

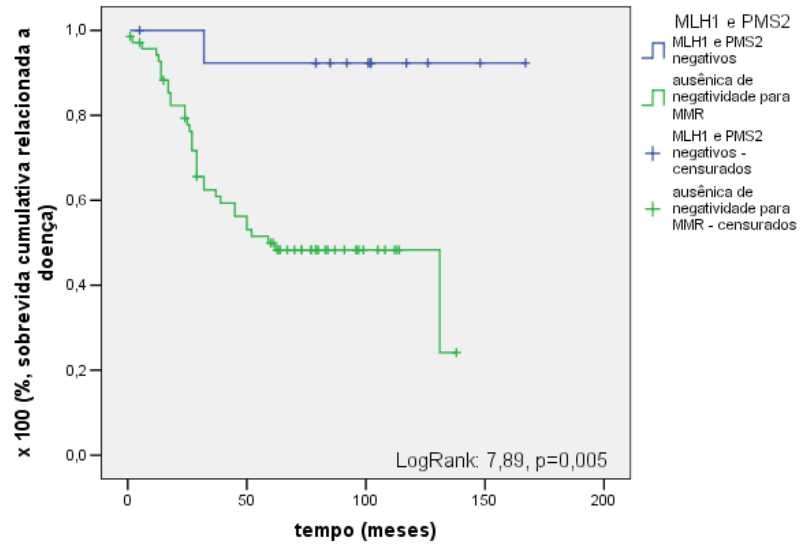


Figura 23. Curvas de Kaplan-Meier ilustrando o impacto do estado de expressão do par MLH1/PMS2 na mortalidade relacionada a doença

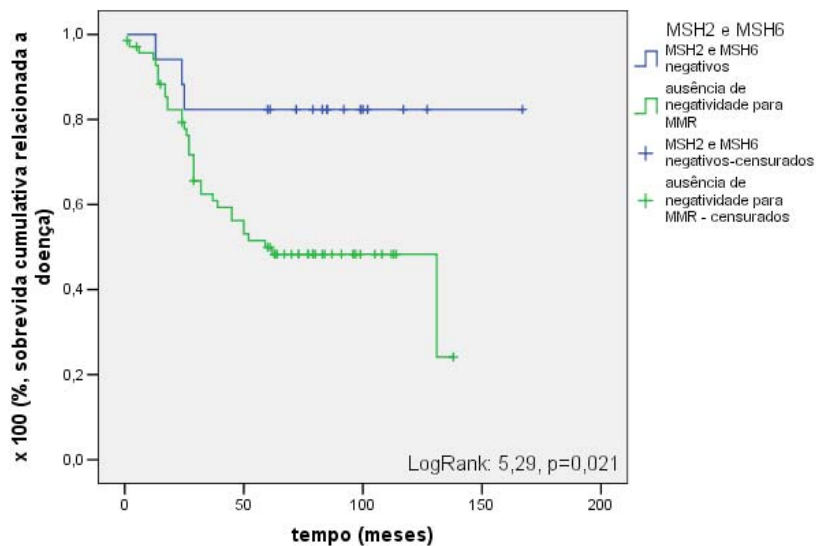


Figura 24. Curvas de Kaplan-Meier ilustrando o impacto do estado de expressão do par MSH2/MSH6 na mortalidade relacionada a doença

Tabela 15 - Parâmetro (LogRank) e significância (p) da análise de sobrevida univariada para o estado das enzimas MMR nos tumores primários

	Log Rank	p
MLH1	5,46	0,019
MSH2	2,41	0,120
MSH6	6,08	0,014
PMS2	7,46	0,006
MLH1/PMS2	7,89	0,005
MSH2/MSH6	5,29	0,021

5.5 Análise do impacto do estado das enzimas MMR na sobrevida: regressão de Cox univariada e determinação dos 'Hazard Ratios' (HR)

Paralelamente ao ajuste das curvas de Kaplan-Meyer e determinação das estatísticas de LogRank, para ilustrar o impacto do estado das diferentes enzimas MMR na sobrevida relacionada a doença conforme descrito na seção anterior, foram determinadas, mediante análises univariadas de Cox, os riscos relativos ("hazard ratios") para estas mesmas variáveis, conforme pode ser visto na tabela 16 a seguir.

Tabela 16 - Sumário dos parâmetros obtidos nas análises univariadas de Cox para determinação do impacto do estado de expressão das enzimas MMR na mortalidade relacionada a doença

		HR	I.C. 95%		p
			L.I.	L.S.	
MLH1	Negativo	1,00			
	Positivo	2,82	1,17	6,77	0,020
MSH2	Negativo	1,00			
	Positivo	2,13	0,83	5,45	0,113
MSH6	Negativo	1,00			
	Positivo	3,54	1,24	10,04	0,017
PMS2	Negativo	1,00			
	Positivo	4,43	1,36	14,38	0,013
MLH1/PMS2	Negativos	1,00			
	Postividade para MMR	9,99	1,36	73,32	0,024
MSH2/MSH6	Negativos	1,00			
	Postividade para MMR	3,61	1,1	11,75	0,033

6 Análises multivariadas do impacto das variáveis clínico-patológicas e estado de expressão das enzimas MMR na mortalidade relacionada a doença: modelos de regressão de Cox

6.1 Modelo composto exclusivamente pelas variáveis clínico-patológicas

Conforme mencionado na seção de métodos, a seleção das variáveis para composição das equações de Cox baseou-se nas suas respectivas significâncias obtidas nas análises univariadas precedentes e definidas como ao nível de $p < 0,10$, bem como a não existência de interdependência entre variáveis a se incluir em cada análise.

Previamente a inclusão das enzimas MMR nestas equações, procedeu-se a composição de um modelo contendo apenas as variáveis clínico-patológicas, o que evidenciou, como fatores independentes de impacto negativo na sobrevida relacionada a doença, o sexo masculino (HR= 2,42, $p=0,047$), tipo histológico difuso segundo classificação de Lauren (HR= 4,94, $p=0,037$) e estadiamento TNM (Estadio II: HR= 2,23, $p= 0,088$; Estadio IIIA: HR= 3,12, $p= 0,022$; Estadio IV: HR= 33,24, $p= 0,005$). Sumário desta análise pode ser vista na tabela 17 a seguir.

Tabela 17 - Sumário da análise multivariada para o impacto dos parâmetros clínico-patológicos na mortalidade relacionada a doença

		HR	I.C. 95%		p
			L.I.	L.S.	
Sexo	Feminino	1,00			
	Masculino	2,42	1,01	5,76	0,047
Tamanho do tumor primário	< 5,5 cm	1,00			
	> ou = 5,5 cm	2,16	1,02	4,56	0,412
Tipo macroscópico de Borrmann	I e II	1,00			
	III e IV	1,51	0,56	4,04	0,412
Tipo histológico OMS	Tubular/Tubulo-papilífero	1,00			
	Adenocarcinoma mucinoso	1,49	0,31	7,19	0,619
	células em "anel-de-sinete"	4,13	0,58	29,17	0,155
	Indiferenciados	3,42	0,38	31,06	0,274
Tipo histológico de Lauren	intestinal	1,00			
	difuso	4,94	1,32	11,96	0,037
Invasão vascular linfática	não detectada	1,00			
	presente	1,20	0,57	2,50	0,633
Infiltração perineural	não detectada	1,00			
	presente	1,67	0,77	3,62	0,198
Estadiamento patológico (TNM)	Estádio IB	1,00			
	Estádio II	2,23	0,89	5,60	0,088
	Estádio IIIA	3,12	1,18	8,26	0,022
	Estádio IV	33,24	2,89	382,71	0,005

6.2 Modelos compostos simultaneamente pelas variáveis clínico-patológicas e enzimas MMR

As variáveis clínico-patológicas selecionadas para compor os modelos de regressão multivariada de Cox foram o sexo, tipo histológico de Lauren, infiltração perineural e estadiamento patológico TNM. Cada uma das enzimas MMR significativa nas análises univariadas foi inserida de forma individual em cada equação (MLH1, MSH6 e PMS2), assim como os pares específicos (MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6).

Sumário dos parâmetros e significâncias obtidas nessas análises pode ser vista nas tabelas 18 a 22.

Tabela 18 - Análise multivariada (regressão de Cox) para determinação da contribuição do estado de expressão de MLH1 pelo tumor primário na mortalidade relacionada a doença, frente as variáveis clínico-patológicas mais significativas nos modelos univariados

		MLH1			p
		HR	IC 95%		
			L.I.	L.S.	
Sexo	Feminino	1,00			
	Masculino	2,05	0,88	4,75	0,094
Tipo histológico de Lauren	intestinal	1,00			
	difuso	2,13	1,06	4,26	0,034
Infiltração perineural	não detectada	1,00			
	presente	1,69	0,76	3,74	0,195
Estadiamento patológico TNM	Estádio IB	1,00			
	Estádio II	1,96	0,80	4,81	0,144
	Estádio IIIA	3,08	1,15	8,24	0,025
	Estádio IV	35,80	3,25	393,94	0,003
Estado de expressão de MMR	negativo	1,00			
	positivo	2,34	0,96	5,71	0,062

Tabela 19 - Análise multivariada (regressão de Cox) para determinação da contribuição do estado de expressão de MSH6 pelo tumor primário na mortalidade relacionada a doença, frente as variáveis clínico-patológicas mais significativas nos modelos univariados

		MSH6			p
		HR	IC 95%		
			L.I.	L.S.	
Sexo	Feminino	1,00			
	Masculino	2,94	1,18	7,28	0,020
Tipo histológico de Lauren	intestinal	1,00			
	difuso	1,74	0,86	3,53	0,123
Infiltração perineural	não detectada	1,00			
	presente	1,16	0,50	2,66	0,729
Estadiamento patológico TNM	Estádio IB	1,00			
	Estádio II	2,96	1,15	7,61	0,024
	Estádio IIIA	4,41	1,58	12,31	0,005
	Estádio IV	50,41	4,51	563,71	0,001
Estado de expressão de MMR	negativo	1,00			
	positivo	3,03	0,95	9,68	0,061

Tabela 20 - Análise multivariada (regressão de Cox) para determinação da contribuição do estado de expressão de PMS2 pelo tumor primário na mortalidade relacionada a doença, frente as variáveis clínico-patológicas mais significativas nos modelos univariados

		PMS2			p
		HR	IC 95%		
			L.I.	L.S.	
Sexo					
	Feminino	1,00			
	Masculino	2,18	0,92	5,16	0,076
Tipo histológico de Lauren					
	intestinal	1,00			
	difuso	2,22	1,12	4,39	0,022
Infiltração perineural					
	não detectada	1,00			
	presente	1,23	0,57	2,65	0,589
Estadiamento patológico TNM					
	Estádio IB	1,00			
	Estádio II	2,25	0,95	5,36	0,066
	Estádio IIIA	4,12	1,60	10,56	0,003
	Estádio IV	49,92	4,59	542,62	0,001
Estado de expressão de MMR					
	negativo	1,00			
	positivo	3,84	1,14	12,86	0,029

Tabela 21 - Análise multivariada (regressão de Cox) para determinação da contribuição do estado de expressão de MSH2 e MSH6 pelo tumor primário na mortalidade relacionada a doença, frente as variáveis clínico-patológicas mais significativas nos modelos univariados

		MSH2/MSH6			
		HR	IC 95%		p
			L.I.	L.S.	
Sexo	Feminino	1,00			
	Masculino	1,94	0,86	4,35	0,108
Tipo histológico de Lauren	intestinal	1,00			
	difuso	1,89	0,93	3,84	0,080
Infiltração perineural	não detectada	1,00			
	presente	1,46	0,60	3,56	0,407
Estadiamento patológico TNM	Estádio IB	1,00			
	Estádio II	2,39	0,93	6,12	0,070
	Estádio IIIA	4,25	1,50	12,00	0,006
	Estádio IV	60,74	5,04	732,48	0,001
Estado de expressão de MMR	negativos	1,00			
	positivos	2,15	0,57	8,05	0,257

Tabela 22 - Análise multivariada (regressão de Cox) para determinação da contribuição do estado de expressão de MLH1 e PMS2 pelo tumor primário na mortalidade relacionada a doença, frente as variáveis clínico-patológicas mais significativas nos modelos univariados

		MLH1/PMS2			
		HR	IC 95%		p
			L.I.	L.S.	
Sexo	Feminino	1,00			
	Masculino	1,94	0,85	4,44	0,117
Tipo histológico de Lauren	intestinal	1,00			
	difuso	1,70	0,84	3,44	0,142
Infiltração perineural	não detectada	1,00			
	presente	1,16	0,48	2,84	0,738
Estadiamento patológico TNM	Estádio IB	1,00			
	Estádio II	2,59	1,00	6,76	0,051
	Estádio IIIA	4,22	1,44	12,35	0,009
	Estádio IV	58,56	4,79	715,35	0,001
Estado de expressão de MMR	negativos	1,00			
	positivos	9,82	1,28	75,51	0,028

DISCUSSÃO

O presente estudo buscou, inicialmente, caracterizar esta série de pacientes portadores de adenocarcinomas gástricos localmente avançados, submetidos de modo programado a cirurgias radicais com linfadenectomia D2 ou D3 e acompanhados clinicamente na Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastroenterologia o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) com relação ao perfil clínico e anátomo-patológico, bem como sua evolução prognóstica, explorando eventuais semelhanças e/ou diferenças entre estas características e aquelas reportadas pela literatura, bem como buscando razões para tal.

Como cerne deste estudo, determinou-se o perfil de expressão das enzimas de reparo dos erros de pareamento do DNA (MMR) em adenocarcinomas gástricos esporádicos por imuno-histoquímica, executada conforme padronizações técnicas recentemente recomendadas e aceitas como de resultado ótimo. O estado dos tumores primários com relação a imunoexpressão anormal ou ausente das enzimas MMR foi determinado, sendo exploradas eventuais relações não casuais entre o estado de expressão de diferentes enzimas pelos mesmos casos.

As associações entre os marcadores estudados e as variáveis clínicas e anátomo-patológicas caracterizadas para a presente série também

foram determinadas, tomando o estado de imunoexpressão das enzimas MMR isoladamente ou em pares heterodiméricos de importância funcional.

Do ponto de vista de relevância prognóstica, inicialmente foram exploradas as associações entre sobrevida relacionada a doença e características clínico-patológicas ou estado de expressão das enzimas MMR em análises univariadas.

Uma vez identificados os fatores mais relevantes associados a mortalidade relacionada a doença, modelos de múltiplas variáveis foram construídos a fim de determinar a contribuição diferencial das variáveis clínicas e patológicas associadas a pior sobrevida. Foi explorado também o papel do estado de imunoexpressão das enzimas MMR como determinante prognóstico em modelos multivariados, frente as demais variáveis clínico-patológicas de importância prognóstica nesta série.

1 Aspectos epidemiológicos da população estudada e impacto do perfil clínico-patológico da doença no prognóstico

1.1 Epidemiologia

A presente série de adenocarcinomas gástricos distribuiu-se, com relação a representação de pacientes dos sexos masculino (M) e feminino (F), seguindo razão M:F de 2,32:1, o que se assemelha, independentemente

se em áreas de alta ou baixa incidência, ao observado em diferentes países do mundo conforme dados da base GLOBOCAN recentemente compilados em publicação de autoria de Parkins et al (2).

Nas últimas seis décadas, e de forma mais precoce e acentuada nos países industrializados ocidentais, acompanhando as reduções na incidência e mortalidade têm sido observadas mudanças no perfil clínico e patológico dos adenocarcinomas gástricos. A diminuição da ocorrência de neoplasias de fenótipo intestinal distalmente localizadas (antro e corpo) e relacionadas a postulada via de carcinogênese gastrite/atrofia/metaplasia/displasia ocasionou aumento relativo na frequência de carcinomas de padrão difuso e/ou mais proximalmente localizados no cárdia. Tal tendência foi desde a década de 1970 identificada por Muñoz et al (171, 172) e mais recentemente confirmada em série de 1.021 casos operados no mesmo serviço do qual a presente série é oriunda, conforme identificado por Jacob et al (173). Apesar do mencionado trabalho ter compreendido pacientes operados entre 1971 e 1998, a presente série, de forma semelhante, também contemplou neoplasias predominantemente distais (90/133 – 67,6%). No entanto, as frequências aqui observadas provavelmente já refletem em parte a mencionada mudança de padrão clínico-patológico quando considerada a distribuição de topografia.

Segundo a classificação de Lauren, foram identificados 83 casos de tipo intestinal (62,4%) e 49 difusos (36,8%), tal distribuição refletida quando o sistema de classificação empregado foi o da OMS, com 77 casos (57,9%) de fenótipo tubular/túbulo-papilar e 44 de células em “anel-de-sinete”

(33,1%). Considerando a importância da proporção entre carcinomas de fenótipos intestinal e difuso em aferir tendências históricas e de risco em estudos epidemiológicos (171, 172), tal razão no presente estudo foi de 1,6, mais compatível portanto com o de cenário epidemiológico transicional de alto para intermediário risco quando considerados os índices de diferentes regiões do mundo conforme revistos por Lauren et al (31).

A faixa etária dos pacientes ao diagnóstico variou de 30 a 87 anos, tendo média de $60,1 \pm 12,7$ anos e mediana de 61 anos, distribuição compatível com o pico de incidência entre a quinta e sétima décadas conforme reportado por estudos recentes e de base populacional (3, 4).

1.2 Características patológicas e suas associações prognósticas

Na presente série foi identificada associação de pior sobrevida com o sexo masculino em análises univariadas (LogRank=5,11, $p=0,024$ e HR=2,43, $p=0,023$), constituindo este parâmetro também fator prognóstico independente no modelo multivariado composto com as demais variáveis clínico-patológicas (HR=2,42, $p=0,047$). Estes dados reproduzem aqueles descritos por Maguire et al (13) e Kim et al (5), sendo que as populações estudadas, apesar de muito maiores do que a aqui reportada, assemelham-se a presente série no que diz respeito a distribuição de gênero. Apesar de alguns estudos reportarem, ao contrário do aqui descrito, associação de pior sobrevida com o sexo feminino, como os publicados por Park et al (10) e Maehara et al (14), tal ocorrência foi identificada de forma não independente

e apenas nas pacientes abaixo dos 45 anos, sendo mais frequentes neste grupo neoplasias de fenótipos indiferenciado e de células em “anel-de-sinete”, mais proximais e de estadio mais avançado ao diagnóstico, fatores que potencialmente justificam, naquelas séries, a pior sobrevida nas mulheres abaixo da mencionada idade.

Apesar de relatada em trabalhos anteriores como fator prognóstico negativo (15), a localização proximal das neoplasias gástricas na presente série não mostrou qualquer associação com pior sobrevida, nem mesmo em análises univariadas (LogRank=0,12, $p=0,728$ e HR=1,13, $p=0,730$). Tal achado negativo é potencialmente atribuível, apesar do cenário epidemiológico transicional conforme discutido, a ainda relativa menor proporção de tumores localizados no estômago proximal (42/133, 32,6%) quando, por exemplo, comparada esta série com a descrita por Rhode et al (15) que reportaram 506 de 990 (51,4%) das lesões naquela topografia. Outra possível causa para a ausência de associação entre a localização do tumor e a sobrevida foi não ter havido diferença de parâmetros como profundidade de infiltração na parede gástrica, estado das cadeias linfonodais locorregionais ou estadio final entre carcinomas aqui definidos como proximais e distais (anexo A). A distribuição diferencial destes parâmetros de estadiamento foi considerada por Kim et al (16) como determinante para o pior prognóstico dos carcinomas proximalmente localizados, bem como por Pacelli et al (17) que demonstraram que a localização proximal foi mais frequentemente associada a neoplasias mais avançadas, necessitando ressecções estendidas e portanto de maior morbi-mortalidade.

Tamanho e padrão macroscópico de Borrmann são características que em estudos recentes têm mostrado impacto na sobrevida relacionada ao câncer gástrico (20-22). Apesar de na presente casuística, associação entre estes dois parâmetros e sobrevida relacionada a doença ter sido identificada nas análises univariadas (HR=1,83, $p=0,050$ para “ $> \text{ ou } = 5,5 \text{ cm vs } < 5,5 \text{ cm}$ ” e HR=2,18, $p=0,039$ para “Borrmann III/IV vs I/II”), nenhuma influência prognóstica independente pôde ser averiguada quando estas mesmas variáveis compuseram modelos multivariados ($p=0,412$ para ambas). A não independência do tamanho como fator prognóstico é atribuível a associação entre maior diâmetro tumoral e o estado das cadeias linfonodais locorregionais (pN) e estadiamento final, sendo estas duas variáveis as mais impactantes do ponto de vista prognóstico em análises uni e multivariadas (anexo B).

Apesar do predomínio de neoplasias de fenótipos intestinal pela classificação de Lauren e tubular/túbulo-papilífero pela OMS, na presente série foi observado importante contingente de lesões de padrão difuso (49/133, 36,8%) ou de células em “anel-de-sinete” (44/133, 33,1%). Tal fato foi interpretado como atribuível ao já mencionado perfil epidemiológico transicional na população a partir da qual foi selecionada a presente série. Com relação ao impacto prognóstico do tipo histológico segundo as diferentes classificações utilizadas, pôde ser identificada pior sobrevida para as neoplasias qualificadas como de tipo difuso segundo Lauren, bem como para as de células em “anel-de-sinete” da OMS em análises univariadas (HR=2,41, $p=0,004$ para “difuso vs intestinal” e HR=2,70, $p=0,003$ para

“células em anel-de-sinete vs tubulares/túbulo-papilíferos”). Também comparados ao padrão tubular/túbulo-papilífero, os carcinomas mucinosos exibiram impacto prognóstico semelhante aos de células em “anel-de-sinete” (HR=2,71, p=0,047). Já nas análises de múltiplas variáveis exclusivamente para os parâmetros clínicos e patológicos, impacto prognóstico independente foi identificado apenas para o tipo difuso definido por Lauren (HR=4,94, p=0,037 para “difuso vs intestinal”), fato aqui interpretado como decorrente de que um sistema de classificação binária é capaz de prover maior robustez em análises estatísticas por não dispersar a população estudada em número maior de subcategorias. Estes achados discordam parcialmente dos recém publicados por Yamashita et al (174) que, mesmo reconhecendo a pior sobrevida dos carcinomas de fenótipo difuso, não identificaram efeito prognóstico independente deste padrão histológico quando incluído em modelos multivariados juntamente com parâmetros de estadiamento. Resultados semelhantes foram publicados por Park et al (175) que, apesar de concluírem que o tipo histológico não constitui parâmetro independente, identificaram associação entre pior sobrevida e fenótipo de células em “anel-de-sinete”, sobretudo em pacientes de estadio IV.

Já os dados reportados por Theuer et al (176) não identificaram qualquer influência do carcinoma de células em “anel-de-sinete” na sobrevida, quer em análises uni quanto multivariadas. Diferentemente, as análises de sobrevida empreendidas neste estudo reproduzem os achados reportados por Davessar et al (37) que, ao compararem o impacto prognóstico do tipo histológico definido conforme diferentes sistemas de

classificação, identificaram efeito adverso e independente apenas para o fenótipo difuso de Lauren, tendo menor importância os tipos histológicos da classificação da OMS quando incluídos em modelos multivariados. O impacto prognóstico adverso das neoplasias gástricas de células em “anel-de-sinete” decorre de potencial biológico de maior agressividade destes tumores, fato que pode ser entendido do ponto de vista molecular pela ausência de expressão de moléculas de adesão como a e-caderina, provendo maior invasividade e potencial de disseminação das células neoplásicas (177).

A distribuição da presente série de neoplasias gástricas segundo o padrão histológico definido por Ming (33) apresenta sobre-representação do fenótipo infiltrativo (103/133, 77,4%) em relação aos dados originalmente publicados por aquele autor (55/171, 33%), bem como por outros grupos na literatura (37, 178). Os dados aqui obtidos assemelham-se, dessa forma, a distribuição da série recém estudada por Luebke et al (29), na qual foram identificados 61,5% (71/117) dos casos com fenótipo infiltrativo. Os critérios de seleção e entrada no presente estudo podem ter contribuído para a distribuição observada. Apesar de não ter havido associação estatisticamente significativa do padrão histológico de Ming com tamanho e profundidade de infiltração da parede, a maioria dos casos aqui estudados representaram lesões extensivas até a subserosa e portanto de estadiamento pT2b (74/133, 55,6%), o mesmo ocorrendo com as grandes dimensões das neoplasias ao diagnóstico ($5,9 \pm 3,0$ cm, média \pm D.P.), características que potencialmente contribuíram para a preponderância do padrão infiltrativo

aqui observado (anexo C). Apesar de estudos reportarem efeito prognóstico adverso do fenótipo infiltrativo de Ming em análises univariadas (29, 37, 178, 179), o mesmo não pôde ser averiguado na presente série de carcinomas gástricos (LogRank=0,07, p=0,781 e HR=1,17, p=0,674).

Apesar de estatisticamente não significativa, foi identificada melhor sobrevida dos pacientes cujas neoplasias exibiram infiltrado linfomononuclear qualificado como acentuado (LogRank=4,25, p=0,119 e HR=0,45, p=0,155 para “infiltrado acentuado vs ausente”). Estes dados, ainda que estatisticamente não significativos, sinalizam no mesmo sentido dos reportados por outros grupos, alguns destes inclusive identificando o infiltrado linfomononuclear como parâmetro prognóstico independente (37, 38), achados recentemente confirmados por Lee et al (180).

No presente estudo, a reação estromal desmoplásica foi qualitativamente determinada como “ausente a leve” ou “moderada a acentuada” a depender da quantidade de estroma fibroconjuntivo neoformado por entre os blocos de células tumorais, tendo a série se distribuído de forma homogênea entre essas duas categorias (46,6% e 53,4%, respectivamente). Embora Inokuchi et al (42) tenham pioneiramente descrito relação entre melhor prognóstico do câncer gástrico e reação estromal na forma de deposição de colágeno tanto no tumor primário quanto nas metástases linfonodais e achados mais recentes terem identificado relação inversa entre sobrevida e deposição de colágeno conforme descrito por Ohno et al (44), nenhum impacto na sobrevida pôde ser averiguado para este parâmetro na presente série.

Infiltração perineural foi identificada em 70 dos 133 tumores primários avaliados (52,6%), associando-se a pior sobrevida relacionada a doença em análises univariadas e, de forma semelhante aos achados reportados tanto por Tanaka et al (48) quanto por Duraker et al (49), não constituindo fator independente em modelos multivariados (HR=1,67, p=0,198). Potencial fator contributivo a não independência desse parâmetro como fator prognóstico inclui a preponderância de casos com metástase linfonodal (92/133, 69,2%) aqui observados, repercutindo na robustez do estadiamento TNM na determinação prognóstica em modelos multivariados. Essa interpretação indica que, do ponto de vista de plausibilidade biológica, a disseminação regional/sistêmica prepondera na evolução dos pacientes quando comparada a possibilidade de disseminação peritoneal, este último parâmetro reportado por Tanaka et al (47, 48) como o único independentemente determinado pela infiltração perineural.

Diferentemente dos estudos que reportaram influência prognóstica da infiltração vascular venosa e linfática (52, 54, 55), apenas tendência a pior sobrevida para casos com infiltração vascular linfática pôde ser identificada em análises univariadas. Estudos futuros com maior casuística e com discriminação do padrão de invasão com uso de marcadores imuno-histoquímicos para discriminação entre vasos linfáticos (D2-40) e sanguíneos (CD31 e actina de músculo liso) poderão abordar com mais propriedade esta questão.

Assim como em grandes séries (16, 57, 181), bem como em neoplasias de outros órgãos, o estadio TNM foi o que de forma mais

significativa figurou como fator independente de determinação prognóstica nos modelos multivariados empregados no presente estudo. Estes achados são classicamente interpretados como decorrentes da incomparável possibilidade do estadiamento TNM em prever a evolução clínica dos pacientes por diretamente aferir a agressividade biológica, principalmente no que tange a extensão local, regional e sistêmica da doença.

2 Imunoexpressão das enzimas MMR

2.1 Perfis de imunoexpressão de enzimas MMR em carcinomas gástricos esporádicos

Após a identificação do fenótipo MSI em carcinomas gástricos na década de 1990 (132, 134, 136, 182), a determinação das enzimas MMR através de método imuno-histoquímico passou a ser utilizada tão logo os genes foram clonados, proteínas recombinantes produzidas e portanto anticorpos específicos disponíveis. Apesar da identificação quase simultânea deste perfil de alteração molecular em carcinomas gástricos e de cólon (85, 87, 90), o conhecimento acerca da expressão das enzimas MMR em neoplasias do estômago contrasta com o das colorretais.

Enquanto sistemáticas revisões da literatura tenham identificado sensibilidade acima de 90 % e especificidade de mais de 95% para identificação do fenótipo MSI através da ausência de imunoexpressão dos

marcadores MLH1 e MSH2 em amostras de carcinomas colorretais fixadas em formalina e incluídas em parafina (121, 122), nos carcinomas gástricos, desde as primeiras publicações empregando a detecção imuno-histoquímica destas proteínas, a sua determinação tem sido utilizada apenas no sentido de fundamentar a implicação funcional da perda deste sistema enzimático na origem do fenótipo MSI ou averiguar as consequências da metilação da região promotora de seus genes no silenciamento da expressão destes (144, 145).

No presente estudo, quarenta e cinco dos 133 casos estudados (33,6%) exibiram negatividade para pelo menos uma das quatro enzimas MMR. Apesar da frequência reportada de instabilidade de microssatélites em neoplasias gástricas variar na literatura em virtude de questões técnicas, perfis populacionais e não uniformidade dos critérios utilizados na interpretação dos resultados obtidos em estudos moleculares, é relativamente consensual que o fenótipo MSI-H resulta da perda de atividade de reparo dos erros de pareamento de DNA (58, 167, 183). Esta, por sua vez, foi demonstrada como secundária a perda de expressão das proteínas que compõem o sistema enzimático MMR (138, 144). Neste sentido, os dados aqui obtidos através da detecção de anormalidades de expressão dessas proteínas por método imuno-histoquímico, aproximam-se das frequências do fenótipo MSI molecularmente determinadas em outras séries de carcinomas gástricos esporádicos, tanto naquelas pioneiramente publicadas por Han et al (132) e Chong et al (182) em que painéis limitados (2 a 3 marcadores microssatélites) foram usados, quanto em estudos em que painéis estendidos e/ou definidos pelos critérios de Bethesda foram

empregados para definir o fenótipo MSI em nível molecular, como reportado por Lin et al (184), Ottini et al (154) e Wu et al (166, 185).

Sob o ponto de vista técnico, o adequado contraste entre sinal nuclear específico bem definido e quase ausência de marcação inespecífica de fundo obtido no presente trabalho propiciaram resultados consistentes, robustos e reproduzíveis. Tais resultados puderam ser creditados, além da reconhecida excelência e da experiência da equipe do laboratório de imunohistoquímica do LIM14-FMUSP e do Instituto Adolfo Lutz, ao emprego de sistema de revelação baseado em polímeros curtos e portanto sem a interposição de complexos avidina-biotina (126, 127), recentemente recomendado como o de melhor resultado para obtenção de sinal nuclear específico para as enzimas MMR (128). A interpretabilidade dos resultados obtidos é especialmente relevante porque a identificação do potencial fenótipo de implicação clínico-prognóstica (MSI) depende de resultado negativo para os marcadores em questão e, portanto, deve ser gerado em ensaio que concilie alta especificidade sem perda de sensibilidade. Tomando em consideração as questões recentemente levantadas por Overbeek et al (130) com relação a reprodutibilidade da interpretação dos resultados, a negatividade foi no presente trabalho assumida apenas na vigência de controle tecidual interno positivo conforme descrito por de Jong et al (131), valorizando-se a reatividade das células inflamatórias linfomononucleares, do epitélio não-neoplásico ou dos elementos teciduais do estroma.

Outro avanço que propiciou o estudo da presente série com numerosas amostras foi o uso de metodologia de micromatrizes teciduais

(TMA), com cada neoplasia representada em duplicata a fim de reduzir as perdas físicas e/ou de representatividade inerentes ao método, bem como ampliar a representatividade em relação a diferentes áreas da neoplasia primária. Importa ressaltar que para a padronização desta metodologia, nosso grupo contou com o apoio dos pioneiros da técnica de TMA em nosso meio, especialmente a equipe do departamento de patologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo (186) e Dra Andréa C. Pires da Universidade Federal Fluminense (187).

Como o informe relevante nas pesquisas de enzimas MMR por imuno-histoquímica é a reação negativa refletindo perda de expressão das enzimas de reparo, a validação de pequenas amostras usadas em TMA como indicador do estado do tumor como um todo é especialmente importante. Jourdan et al (188), apesar de utilizarem amostras de 0,6 mm de diâmetro, validaram a tecnologia de TMA para a detecção imuno-histoquímica de enzimas MMR (MLH1 e MSH2) em série de carcinomas colorretais utilizando como padrão comparativo os resultados obtidos em seções convencionais. Concluíram que a avaliação em três amostras reproduzia os achados obtidos nas seções convencionais em 98,8% dos casos para MLH1 e 99,2% para MSH2. Achados semelhantes validando a tecnologia de TMA para a expressão de enzimas MMR foram obtidos também por Hendriks et al (189) em neoplasias colorretais suspeitas de portarem fenótipo MSI e por Hardisson et al (190) em carcinomas e hiperplasias de endométrio. Apesar deste respaldo, no presente estudo foi tomada a precaução de se confirmar os resultados qualificados como

negativos ou incertos no TMA mediante repetição das reações para os marcadores em questão sobre secções convencionais destes mesmos casos, uma vez que dados de validação semelhantes aos anteriormente citados para neoplasias colorretais e de endométrio não são disponíveis para carcinomas do estômago, tampouco foi escopo deste trabalho a validação dos achados de TMA em toda a série estudada.

Nos TMAs, a negatividade ou resultado incerto para MLH1 ocorreu em 36 casos, para MSH2 em 32, para MSH6 em 34 e para PMS2 em 29 casos. Quando os mesmos casos foram avaliados em secções convencionais, 31, 25, 29 e 25 casos mostraram resultados negativos para estes marcadores conforme critérios de de Jong et al (131), demonstrando concordância de negatividades entre os resultados de TMA e secções convencionais de 86,1%, 78,1%, 81,3% e 86,2% para MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 respectivamente, com concordância global de negatividade de 83,9% quando todas as enzimas foram consideradas. O emprego de painel de quatro enzimas MMR em neoplasias gástricas esporádicas amplia a compreensão em relação aos estudos anteriores que, baseados na associação entre fenótipo MSI e perda de expressão de MLH1 por metilação da região promotora em mais de 90% dos casos conforme pioneiramente descrito por Leung et al (145), restringiram-se a abordar apenas a expressão de MLH1 (144) e, quando mais de uma enzima avaliada, também o MSH2 (138, 159, 185).

Apesar de o marcador mais frequentemente a mostrar perda de expressão na presente série ter sido o MLH1 (31 de 116 casos avaliáveis, 26,7%), frequências semelhantes foram também observadas para

MSH2 (20,8%), MSH6 (23%) e PMS2 (21%). Numa primeira abordagem, apesar de inconsistente com os relatos que atribuem o fenótipo MSI no contexto esporádico a perda de expressão de MLH1 conforme mencionado (144, 145), a utilização de painel estendido com mais três enzimas MMR foi capaz de ampliar o subgrupo detectado com alguma negatividade em 16 casos, provendo assim maior capacidade de identificação quando comparado o painel com aquele marcador isoladamente.

Quando analisadas em conjunto com a finalidade de se obter perfil de imunoexpressão das enzimas MMR, a presente série de carcinomas gástricos evidenciou que muito frequentemente a perda de expressão ocorreu de forma simultânea, com 9 dos 45 casos (20%) que exibiam alguma negatividade apresentando alteração de duas enzimas, 14 (31,2%) com três enzimas negativas e 7 (15,5%) com todas as enzimas avaliadas resultando negativas. Estes dados obtidos na presente série contrastam com os reportados por Leung et al (145), em que a perda de expressão de MLH1 em 10 dos 11 carcinomas gástricos definidos como de fenótipo MSI-H foi atribuída como causa exclusiva deste, mantendo-se preservada a expressão de MSH2, a semelhança de achados mais tarde reproduzidos tanto por Falchetti et al (162) quanto Beghelli et al (191). Diferentemente destes estudos, Halling et al (138) identificaram que o fenótipo MSI também poderia ser atribuído à perda de expressão de MSH2, no entanto este constituía fenômeno mutuamente exclusivo em relação a perda de MLH1. Ressalte-se que como possível origem dessas discordâncias resida o fato que nas publicações anteriores foram utilizados protocolos imuno-histoquímicos

diferentes dos atualmente recomendados e aqui empregados. Ainda, os autores anteriores não tiveram como objetivo específico a questão da perda de expressão simultânea das enzimas MMR em carcinomas gástricos e suas correlações clínico-patológicas e prognósticas como aqui abordadas. Empregaram, no máximo, anticorpos para duas enzimas MMR (MLH1 e MSH2) e não painel de quatro como aqui realizado, o que proveu detecção de 10 casos adicionais aos que teriam sido identificados apenas com o uso de MLH1 e MSH2. Os dados aqui obtidos são também respaldados pela necessidade de formação de complexos heterodiméricos das enzimas MMR bem como sua cinética de degradação celular (192), assim como parcialmente reproduzidos em estudo publicado em série de carcinomas colorretais por Jansson et al (193). Deste último estudo resultou o achado que a perda combinada de expressão de MLH1, MSH2 e MSH6 resultou em menor funcionalidade do sistema de reparo, maior frequência de instabilidade de microssatélites e capacidade de constituir parâmetro prognóstico independente em análises multivariadas, este último de forma semelhante ao aqui identificado para a co-negatividade de MLH1 e PMS2.

Como resultado das associações de perda de expressão das enzimas MMR, na presente série puderam ser averiguadas correlações entre o estado de expressão de diferentes proteínas quando as análises tomaram os marcadores dois a dois. Destacaram-se as co-negatividades para MSH2 e MSH6 ($\rho=0,666$, $p<0,001$) e também MLH1 e PMS2 ($\rho=0,467$, $p<0,001$). Estes achados reiteram em parte os mecanismos de ação conhecidos das proteínas de reparo dos erros de pareamento do DNA e funcionalmente

dependentes da formação de pares heterodiméricos, nomeadamente MSH2/MSH6 e MLH1/PMS2. Enquanto o primeiro par é implicado no reconhecimento de pareamentos errados bem como reparo de alças originadas em sequências microssatélites devido a inserções/deleções nas mesmas, o segundo promove o pareamento correto entre as bases previamente a atuação dos fatores envolvidos nos mecanismos de reparo propriamente ditos (192).

Ainda que 46,7% dos casos MLH1 negativos aqui estudados tenham mostrado positividade para PMS2 (14/31) e 20% dos casos MSH2 negativos positividade para MSH6 (5/20), houve correlação estatisticamente significativa entre o estado de expressão destes marcadores na presente série. A cinética de degradação celular destas proteínas, envolvendo estabilidade superior de MLH1 e MSH2 em relação a MSH6 e PMS2, leva a degradação destas últimas na ausência de expressão das primeiras (192), sendo potencial candidata a justificar os resultados aqui obtidos. Co-negatividades para as enzimas MMR em ensaios imuno-histoquímicos foi fenômeno também demonstrado em carcinomas colorretais por Truninger et al (194) e Jansson et al (193).

Considerando que a perda de expressão de MLH1 é implicada na origem do fenótipo MSI em neoplasias gástricas esporádicas e tendo o gene hMSH2 microssatélites em sua região codificadora (86), poder-se-ia sugerir que as associações de perda de expressão das diferentes enzimas MMR aqui observadas decorreriam, em origem, do silenciamento de expressão do gene hMLH1 por alterações epigenéticas de metilação (144). Tal evento

desencadearia, como fenômeno secundário, a perda de expressão de hMSH2 por mutações em suas sequências microssatélites e da proteína PMS2 por degradação, decorrente da ausência de seu par heterodimérico (MLH1). De forma semelhante a perda de PMS2, a proteína MSH6 seria degradada em virtude de sua instabilidade na ausência de seu par heterodimérico, MSH2 (192, 194). Dessa forma, contribuir-se-ia a compreensão dos achados aqui relatados e ainda não reportados pela literatura de que dois terços (66,7%) dos carcinomas gástricos com perda de ao menos uma enzima MMR apresentarem perda de três ou mais destas.

2.2 Associações entre as perdas de expressão de enzimas MMR e características clínico-patológicas

Na presente série de casos, nenhuma associação entre o estado de expressão das enzimas MMR e o sexo dos pacientes pôde ser identificada. Dados semelhantes foram reportados por Seruca et al (155), Lin et al (184), Ottini et al (154) e mais recentemente por Falchetti et al (162) em estudos que caracterizaram clínico-patologicamente os carcinomas gástricos com relação ao fenótipo MSI, apesar de neste último ter sido identificada tendência a associação significativa daquele fenótipo com o sexo feminino ($p=0,08$). Este último achado foi recentemente confirmado em série maior publicada por Beghelli et al (191), na qual foi identificada frequência significativamente maior de fenótipo MSI em pacientes do sexo feminino (25% vs 11%, $p<0,001$).

Idade média ao diagnóstico significativamente maior pôde ser identificada para os pacientes cujas neoplasias exibiram perda de expressão de PMS2 e perda concomitante de MLH1 e PMS2, havendo tendência a associação com perda de expressão também de MSH2 ($p=0,081$). Ainda que a maior parte dos trabalhos que exploraram associação entre fenótipo MSI e características clínicas de pacientes portadores de carcinomas gástricos neguem essa associação (161, 162, 183, 184), estudo publicado por Nakashima et al (164), apesar de realizado em pequena série de pacientes japoneses, corroboram os achados aqui reportados, assim como os publicados mais recentemente por Beghelli et al (191). No fenótipo molecular caracterizado pela instabilidade de microssatélites as alterações endereçam apenas sequências repetitivas em nível gênico, sendo infrequentes aberrações cariotípicas como as encontradas no fenótipo por perda de heterozigosidade (58). Tal fato poderia justificar a associação entre expressão anormal das enzimas MMR e idade mais avançada ao diagnóstico, possivelmente em virtude do tempo maior necessário ao estabelecimento do fenótipo neoplásico associado a estas alterações moleculares, ou mesmo, decorrer da reportada maior frequência de fenômenos epigenéticos de metilação dependente da idade (167).

Na presente casuística foi possível documentar associação consistente dos padrões macroscópicos predominantemente polipóide/vegetante (I e II) da classificação de Borrmann, dos tipos histológicos intestinal conforme classificação de Lauren, tubular/túbulo-papilífero da OMS e expansivo de Ming com perda de expressão de

praticamente todas as enzimas MMR aqui avaliadas. As associações entre padrão intestinal de Lauren/tubular da OMS e fenótipo MSI são amplamente reportadas em adenocarcinomas gástricos (136, 166, 183, 191, 195). Já as associações de negatividade para as enzimas MMR com o padrão macroscópico de Borrmann predominantemente exofítico assim como fenótipo expansivo de Ming foram descritos apenas por Ohmura et al (196) e Falchetti et al (162) respectivamente. Os achados documentados na presente série acrescentam consistência as associações com parâmetros patológicos de menor agressividade biológica para as neoplasias gástricas deste fenótipo molecular.

Assim como desde sua descrição é conhecido o predomínio de neoplasias colorretais de fenótipo MSI em cólon direito/proximal (87), o conhecimento da localização preferencialmente antral dos tumores gástricos de fenótipo MSI acumulou-se progressivamente na literatura (150, 154, 166), apesar de raros estudos identificarem o contrário (184, 197). Na presente série, no entanto, apesar de em termos absolutos e relativos os tumores com expressão anormal de enzimas MMR terem ocorrido de forma mais frequente no estômago distal, este tipo de associação não pôde ser averiguada de forma significativa. Tal fato provavelmente decorre do predomínio de neoplasias de padrão intestinal/tubular em estômago distal e maior frequência dos padrões difuso/de células em “anel-de-sinete”/ mucinoso em localização proximal, com as análises comparativas empregando ambos sistemas de classificação histológica e local atingindo o nível de tendência a significância estatística nesta série de casos (Anexo D).

Na presente série de casos pôde ser identificada, apesar de não ter atingindo nível de significância estatística, associação entre perda de expressão de MLH1 e MSH6 com infiltrado linfomononuclear mais frequentemente qualificado como acentuado ($p=0,064$ e $p=0,079$, respectivamente), tal associação manifestando-se de forma significativa quando as análises endereçaram os pares heterodiméricos MLH1/PMS2 ($p=0,011$) e MSH2/MSH6 ($p=0,013$). Dados semelhantes foram reportados por Halling et al (138) e Grogg et al (38) que postularam que resposta imune mais efetiva e manifesta pela contagem aumentada de linfócitos intra-tumorais poderia constituir mecanismo responsável pelo melhor prognóstico dos pacientes portadoras de neoplasias microssatélite instáveis. Apesar de ter apenas sido identificada tendência a associação ao desfecho clínico na presente série, o impacto prognóstico positivo da população linfomononuclear intra/peritumoral foi recentemente embasado por estudo que identificou contagem aumentada de linfócitos intra-tumorais como fator independente de melhor prognóstico em neoplasias gástricas (180).

Infiltração vascular linfática ou venosa determinada através de estudo histológico convencional não mostrou qualquer tipo de associação com o estado de expressão das enzimas MMR aqui estudadas, isoladamente ou em conjunto. Estes achados são concordantes com os reportados na literatura (154, 161, 185, 198).

Elemento prognóstico de fundamental importância e não abordada sua relação com o fenótipo MSI em estudos anteriores, a infiltração perineural mostrou-se, além de fator associado a pior sobrevida na presente

série, menos frequente nos tumores com perda de expressão de MSH2, MSH6 e PMS2 isoladamente, bem como tendência a associação com a perda dos pares heterodiméricos MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6 ($p=0,091$ e $p=0,063$, respectivamente). Estes achados são consistentes com perfil clínico-patológico geral de menor agressividade biológica em neoplasias gástricas portadoras de fenótipo MSI (58, 167).

A presente série distribuiu-se de forma homogênea com relação ao parâmetro pT do sistema de estadiamento TNM, principalmente quando considerado o critério de entrada dos casos no presente estudo e que definiu a profundidade de infiltração da parede gástrica como no mínimo ao nível da camada muscular própria, qualificando os casos estudados como de estadio pT2 (132/133 casos, 99,2%). Quando os mesmos foram estratificados em relação aos dois níveis que compõem esta categoria (pT2a: muscular própria e pT2b: subserosa), pôde ser identificado que a perda de expressão de MLH1 e MSH2 associou-se de forma significativa a infiltração máxima limitada pela muscular própria (67,7% vs 36,5%, $p=0,011$ e 68% vs 37,9%, $p=0,025$, respectivamente). Apesar dos estudos que exploraram associação entre fenótipo MSI e o parâmetro pT terem reportado ausência de associação entre estas variáveis (154, 161, 162), a abordagem foi empreendida considerando as categorias pT de forma estanque, sem a estratificação em categorias como aqui realizada. Achado semelhante ao neste estudo reportado foi publicado por Beghelli et al (191), em que foi constatada distribuição diferencial do parâmetro pT quando comparados os tumores MSS com os MSI, nestes últimos sendo observada maior frequência de lesões restritas a camada muscular própria/subserosa (pT2a/pT2b).

O estado de comprometimento metastático das cadeias linfonodais locorreionais por carcinoma, importante parâmetro de estadiamento, apesar de reportado por Wu et al e Beghelli et al como significativamente menos frequentes no fenótipo MSI (166, 191), na presente série de casos não foi identificada qualquer relação com o estado de expressão das enzimas MMR. Os achados do presente estudo, dessa forma, assemelham-se aos mais comumente relatados na literatura (154, 161, 185, 198, 199). Apesar de Grogg et al (38) ter reportado importância do fenótipo MSI na metastatização a distância, achados semelhantes e mais comumente relatados atribuem a ausência de associação entre este perfil molecular e disseminação sistêmica na evolução de pacientes portadores de adenocarcinomas gástricos (185, 191, 198).

A mencionada homogeneidade da presente série com relação a distribuição do parâmetro pT, bem como a ausência de associação entre expressão anormal das enzimas MMR e o parâmetro pN, ocasionaram ausência de relação entre o estadio global TNM e a expressão destas enzimas. Tal fato foi também reportado por Wu et al (185, 198) em séries em o fenótipo MSI foi molecularmente determinado. Disto resulta substrato para a especulação que, uma vez identificado como parâmetro associado a melhor sobrevida, o fenótipo MSI afetaria a evolução destes pacientes de modo independente em relação aos parâmetros classicamente imputados como de maior importância prognóstica. Seriam assim necessárias abordagens e estudos de sobrevida e desfecho clínico através da inclusão de múltiplas variáveis a fim de pesar a contribuição diferencial deste fenótipo molecular frente aos demais parâmetros de importância na evolução destes doentes.

2.3 Determinação do impacto prognóstico da perda de expressão das enzimas MMR

Diferentemente do já caracterizado para as neoplasias colorretais (200, 201), as publicações abordando a implicação prognóstica do fenótipo MSI em neoplasias gástricas têm reportado resultados heterogêneos. Enquanto alguns trabalhos neguem qualquer impacto deste perfil molecular no desfecho clínico, outros reportam apenas associação a melhor sobrevida em análises univariadas e ainda em alguns este parâmetro é definido como determinante independente de melhor prognóstico em modelos multivariados.

Hayden et al (158), estudando série de casos definidos como portadores de fenótipo RER/MSI em apenas 9% das lesões, além de não identificar qualquer associação com características clínico-patológicas, não evidenciaram influência significativa deste padrão molecular na sobrevida em 5 anos. Wirtz et al (161), em série maior, com maior número de marcadores microssatélites e maior frequência reportada de fenótipo MSI (56/126: 44,5%), também não identificaram associações com parâmetros classicamente identificados como de impacto prognóstico como profundidade de infiltração pela neoplasia na parede gástrica, estado linfonodal, tipo ou grau de diferenciação histológica. Tampouco sobrevida diferente foi observada entre os grupos definidos como portadores e não de MSI.

Ottini et al (154), em série de carcinomas gástricos com sobre-representação de casos com histórico familiar, identificaram fenótipo RER/MSI em 30,6% das amostras, não detectando qualquer impacto na sobrevida, mesmo em análises multivariadas corrigidas pelo estadiamento da lesão.

Na presente série, no entanto, pôde ser identificada que a perda de expressão de MLH1, MSH6 e PMS2 associou-se de forma significativa a melhor sobrevida em análises univariadas. Apesar de usar a imunoexpressão apenas da enzima MLH1 como determinante do fenótipo MSI, Grogg et al (38) reportaram achados semelhantes em análise univariada de sobrevida, assim como também os dados publicados por Beghelli et al (191) e Lee et al (160) em estudos em que o fenótipo MSI foi molecularmente determinado. Os achados do presente estudo reforçam portanto a compreensão da menor agressividade biológica das neoplasias gástricas associadas ao fenótipo MSI, acrescentando que a determinação indireta deste fenótipo molecular através da expressão anormal das enzimas MMR constitui alternativa robusta aos métodos moleculares, provendo significado biológico ao identificar pacientes portadores de neoplasias de perfil clínico-patológico e implicação prognóstica próprios. Os achados aqui reportados assemelham-se, dessa forma, aos de Beghelli et al (191) que identificaram benefício prognóstico do fenótipo MSI em série de carcinomas gástricos, havendo concordância entre os resultados de estudos moleculares e imuno-histoquímicos acima de 95%.

As associações prognósticas do estado de expressão das enzimas MMR aqui detectadas e também reportadas em neoplasias colorretais (168, 202), alçam a determinação imuno-histoquímica destes marcadores ao patamar de importante e acessível estratificador de risco para desfecho clínico desfavorável em neoplasias gástricas.

A exploração do potencial papel prognóstico independente do estado de expressão de cada enzima MMR, bem como dos seus pares heterodiméricos, foi realizada mediante inclusão de cada um dos marcadores em rodada individual de análise multivariada e juntamente com os demais parâmetros identificados como mais associados a prognóstico, nomeadamente gênero, tipo histológico de Lauren, infiltração perineural e estadiamento TNM. Apesar de tendência a associação significativa, os estados de expressão de MLH1 ($p=0,062$) e MSH6 ($p=0,061$) não puderam ser averiguados como fatores prognósticos independentes. Já nas análises em que foi endereçado o papel do PMS2 ($HR=3,84$, $p=0,029$), sobrevida melhor associada a perda de expressão deste marcador foi identificada como fator prognóstico independente, além do estadiamento e fenótipo histológico conforme classificação de Lauren.

Com relação aos pares heterodiméricos, diferentemente dos resultados obtidos em análises univariadas nas quais ambos mostraram associação significativa com sobrevida relacionada a doença (LogRank: 7,89 e $p=0,005$ para MLH1/PMS2 e LogRank: 5,29 e $p=0,021$ para MSH2/MSH6), nos modelos multivariados apenas o par MLH1/PMS2 constituiu fator prognóstico independente ($HR: 9,82$, $p=0,028$ para “MLH/PMS2 positivos vs negativos”).

Os achados do presente estudo reproduzem parcialmente aqueles publicados no ano de 2001 por Manzoni et al (157), em que o fenótipo MSI foi, juntamente com o estadiamento, determinado como fator prognóstico independente em carcinomas gástricos. Achados semelhantes foram também recentemente reportados por Falchetti et al (162) em série de 159

casos pacientes em cujos tumores gástricos o fenótipo MSI foi molecularmente definido.

Como potencial justificativa a estes achados, neoplasias colorretais e endometriais portadoras de fenótipo MSI (203, 204) foram caracterizadas através da determinação de perfis transcricionais (perfis de expressão gênica – “*cDNA microarrays*”), permitindo a identificação de um padrão global de expressão distinto em relação às neoplasias qualificadas como microssatélites estáveis. Postulou-se, portanto, que as neoplasias malignas de fenótipo MSI provavelmente desenvolvem-se por comprometimento de vias moleculares distintas, com consequências funcionais distintas, refletidas estas em diferentes perfis clínico-patológicos e prognósticos.

Mais recentemente, utilizando métodos e lógica semelhante, dois estudos abordaram as alterações genéticas alvo do fenótipo MSI em neoplasias gástricas, especulando acerca de suas potenciais repercussões no perfil clínico-patológico e prognóstico. Falchetti et al (162) identificaram, em 27 neoplasias gástricas MSI-H, mutações em sequências repetitivas contidas em genes envolvidos no controle do crescimento celular, incluindo *TGFβRII* (16/27, 59,3%), *IGFIIR* (5/27, 18,5%) e *TCF4* (6/27, 22,2%), assim como no controle da apoptose como *BAX* (9/27, 33,3%) e *CASPASE 5* (2/27, 7,4%). Puderam constatar ainda que as alterações envolviam diferentes genes de forma simultânea em um mesmo caso e que provavelmente este perfil de assinatura genética contribuiria as diferenças clínico-patológicas e benefício prognóstico independente conferido pelo fenótipo MSI-H conforme determinado pelos autores. Apesar de empreendido em série de apenas 38

casos, estudo muito recentemente publicado por D'Errico et al (205) determinou que o perfil de expressão gênica diferencial associado ao fenótipo MSI endereçou principalmente genes envolvidos na capacidade da neoplasia desencadear resposta imune apropriada, bem como aqueles relacionados às vias dependentes de ativação pelo p53. Estes achados levaram os autores a postular que tais mecanismos seriam os implicados no benefício prognóstico identificado para os carcinomas gástricos deste fenótipo molecular.

Os achados deste estudo, interpretados em seu conjunto e à luz dos mencionados de literatura, corroboram a imuno-histoquímica como método aplicável para identificação da influência prognóstica do fenótipo MSI associado a perda de expressão das enzimas MMR, principalmente quando avaliadas na forma de painel e de modo a contemplar a importância funcional da dimerização destas proteínas na atividade de reparo dos erros de pareamento do DNA.

Imputam ainda, as potenciais consequências funcionais da perda de expressão do par heterodimérico MLH1/PMS2, papel central na origem do subgrupo de neoplasias de perfil clínico-patológico de menor agressividade biológica no contexto esporádico, especialmente por identificar que a perda combinada de expressão destes marcadores constitui fator independente de melhor sobrevida relacionada a doença frente as demais variáveis classicamente determinantes de pior prognóstico. Permitem ainda inferir que a menor importância dos marcadores MSH2 e MSH6, isoladamente ou em conjunto avaliados, seja na sua associação com as variáveis clínico-

patológicas ou na determinação prognóstica, potencialmente reflete o fato que sua perda de expressão seja secundária tanto ao fenótipo MSI primariamente determinado pela perda de expressão de MLH1 quanto aos mecanismos de degradação das proteínas que compõem os dímeros funcionais na ausência de seus pares específicos.

2.4 Perspectivas

Os presentes achados reforçam que, ainda que indireto, o papel da imuno-histoquímica em determinar a funcionalidade do sistema de reparo dos erros de pareamento do DNA (MMR), é de aplicabilidade no contexto de pesquisa ou, conforme demonstrarem estudos em maiores séries seguidas por períodos mais longos, de constituir, em curto prazo, método auxiliar de não só determinação de fenótipo molecular de um subgrupo de neoplasias gástricas esporádicas, mas também a implicação deste como estratificador prognóstico independente.

Apesar de uma “assinatura molecular” geral para as neoplasias determinadas como portadoras de fenótipo MSI, as alterações de comprimento nas sequências repetitivas (microsatélites) precisam ainda ser caracterizadas com relação a sua presença em genes alvo, suas consequências funcionais resultantes e, portanto, identificação das vias moleculares responsáveis pela determinação não só do mencionado perfil clínico-patológico das neoplasias originadas neste contexto, mas também com relação a sua influência prognóstica neste subgrupo de pacientes.

Estas e outras associações abrangentes e compreensivas da fisiopatologia molecular das neoplasias gástricas devem ser obtidas mediante estudos futuros empregando séries maiores de casos, endereçando não só o fenótipo MSI pela perda de imunexpressão das enzimas MMR, mas também as potenciais alterações em vias moleculares associadas a este fenótipo molecular e que permitam determinar a origem de sua distinção clínico-patológica e prognóstica conforme aqui determinado.

Além destas análises, estudos envolvendo a comparação do perfil de expressão das enzimas MMR tanto em amostras pré-neoplásicas quanto em amostras de metástases, poderão trazer maior compreensão sobre aspectos relacionados a dinâmica e fase de estabelecimento desse fenótipo, inclusos seus desdobramentos no potencial de progressão da doença.

Em estudos de base clínica, descortina-se ainda a aplicabilidade dos resultados aqui obtidos em aferir respostas diferentes a protocolos de tratamento diversos a depender do estado de expressão das enzimas MMR como indicador indireto do fenótipo MSI. Além disso, na prática clínica, seu uso como determinante de desfecho clínico pode ser proposto a partir dos achados aqui obtidos.

CONCLUSÕES

- 1) Os novos métodos para estudo imuno-histoquímico da perda de expressão das enzimas MMR permitiram reações com resultados consistentes em amostras de TMA, concordantes com aquelas obtidas em secções convencionais. Cerca de um terço de casos de adenocarcinomas gástricos evidenciou perda de expressão de alguma das enzimas MMR, sendo MLH1 a mais frequentemente negativa, seguida de MSH6, PMS2 e MSH2;
- 2) As co-negatividades para diferentes enzimas MMR foram frequentes, com destaque para os pares MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6, em consonância com evidências moleculares que a correção dos erros de pareamento do DNA por este grupo de enzimas é funcionalmente dependente da heterodimerização;
- 3) A perda de expressão das enzimas MMR avaliadas isoladamente ou em conjunto mostrou-se capaz de identificar subgrupo de adenocarcinomas gástricos de perfil patológico de potenciais desdobramentos clínico-prognósticos, nomeadamente lesões polipóides/vegetantes, fenótipos intestinal segundo a classificação de Lauren e tubular/túbulo-papilar da OMS, fenótipo expansivo da classificação de Ming, infiltração máxima

limitada pela camada muscular própria e a não detecção de infiltração perineural;

- 4) A co-negatividade para os pares heterodiméricos MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6 mostrou-se capaz de resumir as associações previamente determinadas do perfil clínico-patológico quando a avaliação foi feita com as alterações individuais de cada enzima MMR, associando-se adicionalmente com infiltrado linfoplasmocitário intra/peritumoral acentuado para ambos os pares, reação estromal desmoplásica mais frequentemente determinada como ausente a leve para o par MSH2/MSH6 e idade mais avançada assim como tamanho maior do tumor primário relacionados a alterações na expressão do par MLH1/PMS2;

- 5) As características clínicas e patológicas que aqui se mostraram associadas com menor sobrevida em modelos univariados foram sexo masculino, maior tamanho do tumor primário, padrões macroscópicos III/IV da classificação de Borrmann, tipos histológicos difuso de Lauren e mucinoso/de células em “anel-de-sinete” da classificação da OMS, infiltração perineural, metástase para linfonodos locorregionais e estadió patológico segundo a classificação TNM 2002 AJCC/IUAC. Como características clínico-patológicas prognósticas independentes determinadas por modelo multivariado permaneceram apenas o sexo

masculino, tipo histológico difuso segundo classificação de Lauren e estadiamento TNM;

- 6) As enzimas MMR cuja perda de expressão associou-se a melhor sobrevida em análises univariadas para o estado de expressão analisado individualmente foram MLH1, MSH6 e PMS2. Com relação as análises considerando os pares heterodiméricos funcionais, destaque ficou para a perda concomitante de expressão de MLH1 e PMS2. A perda de expressão do par MLH1/PMS2 ou de PMS2 isoladamente constituiu, em modelos multivariados, fator prognóstico independente de melhor prognóstico.

ANEXOS

Anexo A. Associação entre local do tumor primário no estômago e profundidade máxima de infiltração da parede do órgão, estado das cadeias linfonodais locorregionais e estadiamento TNM

		Local do tumor primário		p
		Proximal n (%)	Distal n (%)	
Linfonodos	pN0	12 (27,9%)	29 (32,6%)	0,909
	pN1	21 (48,8%)	42 (47,2%)	
	pN2	9 (20,9%)	17 (19,1%)	
	pN3	1 (2,3%)	1 (1,1%)	
Profundidade de infiltração	Muscular própria	19 (44,2%)	38 (42,7%)	0,779
	Subserosa	24 (55,8%)	50 (56,2%)	
	Estruturas adjacentes	0	1 (1,1%)	
TNM	Estadio IB	12 (27,9%)	28 (31,5%)	0,883
	Estadio II	18 (41,9%)	41 (46,1%)	
	Estadio IIIA	11 (25,6%)	18 (20,2%)	
	Estadio IIIB	1 (2,3%)	1 (1,1%)	
	Estadio IV	1 (2,3%)	1 (1,1%)	

Anexo B. Associações entre tamanho do tumor primário (distribuição em relação a mediana) e estado das cadeias linfonodais locorregionais e estadiamento patológico TNM

		Tamanho do tumor primário		p
		< 5,5 cm n (%)	> ou = 5,5 cm n (%)	
Linfonodos	pN0	26 (43,3%)	16 (21,9%)	0,009
	pN1	28 (46,7%)	35 (47,9%)	
	pN2	6 (10%)	20 (27,4%)	
	pN3	0	2 (2,7%)	
TNM	Estadio IB	26 (43,3%)	15 (20,5%)	0,014
	Estadio II	26 (43,3%)	33 (45,2%)	
	Estadio IIIA	8 (13,3%)	21 (28,8%)	
	Estadio IIIB	0	2 (2,7%)	
	Estadio IV	0	2 (2,7%)	

Anexo C. Distribuição da profundidade de infiltração da parede pelos carcinomas gástricos e tamanho do tumor primário em relação ao padrão histológico de Ming

		Histologia de Ming		p
		Infiltrativo n (%)	Expansivo n (%)	
Profundidade de infiltração	Muscular própria	40 (38,8%)	18 (60%)	0,112
	Subserosa	62 (60,2%)	12 (40%)	
	Estruturas adjacentes	1 (1%)	0	
Tamanho do tumor primário	< 5,5 cm	47 (45,6%)	13 (43,3%)	0,824
	> ou = 5,5 cm	56 (54,4%)	17 (56,7%)	

Anexo D. Associações entre local do tumor primário e padrões histológicos conforme as classificações de OMS e Lauren

		Local do tumor primário		p
		Proximal n (%)	Distal n (%)	
Tipo histológico OMS	Tubular/Tubulo-papilífero	19 (44,2%)	57 (64%)	0,055
	Adenocarcinoma mucinoso	4 (9,3%)	4 (4,5%)	
	Células em "anel-de-sinete"	17 (39,5%)	27 (30,3%)	
	Outros	2 (4,7%)	0	
	Indiferenciados	1 (2,3%)	1 (1,1%)	
Tipo histológico de Lauren	intestinal	22 (52,4%)	60 (67,4%)	0,097
	difuso	20 (47,6%)	29 (32,6%)	

REFERÊNCIAS

1. Estimativa 2008 - *Incidência de Câncer no Brasil*. 2007 [updated 2007; cited]; Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
3. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2006 Jan 21;12(3):354-62.
4. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2002 Jan-Feb;52(1):23-47.
5. Kim JP, Lee JH, Kim SJ, Yu HJ, Yang HK. Clinicopathologic characteristics and prognostic factors in 10 783 patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*. 1998 Mar;1(2):125-33.
6. Saito H, Osaki T, Murakami D, Sakamoto T, Kanaji S, Tatebe S, et al. Effect of age on prognosis in patients with gastric cancer. *ANZ J Surg*. 2006 Jun;76(6):458-61.
7. Maehara Y, Oshiro T, Oiwa H, Oda S, Baba H, Akazawa K, et al. Gastric carcinoma in patients over 70 years of age. *Br J Surg*. 1995 Jan;82(1):102-5.
8. Sanchez-Bueno F, Garcia-Marcilla JA, Perez-Flores D, Perez-Abad JM, Vicente R, Aranda F, et al. Prognostic factors in a series of 297 patients with gastric adenocarcinoma undergoing surgical resection. *Br J Surg*. 1998 Feb;85(2):255-60.
9. Shiu MH, Perrotti M, Brennan MF. Adenocarcinoma of the stomach: a multivariate analysis of clinical, pathologic and treatment factors. *Hepatogastroenterology*. 1989 Feb;36(1):7-12.
10. Park JC, Lee YC, Kim JH, Kim YJ, Lee SK, Hyung WJ, et al. Clinicopathological aspects and prognostic value with respect to age: An analysis of 3,362 consecutive gastric cancer patients. *J Surg Oncol*. 2009 Apr 3.

11. El-Serag HB, Mason AC, Petersen N, Key CR. Epidemiological differences between adenocarcinoma of the oesophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia in the USA. *Gut*. 2002 Mar;50(3):368-72.
12. Wile AG, Hourani L, Schell MJ. The contributions of patient factors, physician delay, and tumor biology to the outcome of gastric cancer. *Am Surg*. 1993 Dec;59(12):850-4.
13. Maguire A, Porta M, Sanz-Anquela JM, Ruano I, Malats N, Pinol JL. Sex as a prognostic factor in gastric cancer. *Eur J Cancer*. 1996 Jul;32A(8):1303-9.
14. Maehara Y, Watanabe A, Kakeji Y, Emi Y, Moriguchi S, Anai H, et al. Prognosis for surgically treated gastric cancer patients is poorer for women than men in all patients under age 50. *Br J Cancer*. 1992 Mar;65(3):417-20.
15. Rohde H, Bauer P, Stutzer H, Heitmann K, Gebbensleben B. Proximal compared with distal adenocarcinoma of the stomach: differences and consequences. German Gastric Cancer TNM Study Group. *Br J Surg*. 1991 Oct;78(10):1242-8.
16. Kim DY, Joo JK, Ryu SY, Park YK, Kim YJ, Kim SK. Clinicopathological characteristics and prognosis of carcinoma of the gastric cardia. *Dig Surg*. 2006;23(5-6):313-8.
17. Pacelli F, Papa V, Caprino P, Sgadari A, Bossola M, Doglietto GB. Proximal compared with distal gastric cancer: multivariate analysis of prognostic factors. *Am Surg*. 2001 Jul;67(7):697-703.
18. *AJCC Cancer Staging Manual*. Sixth ed. Frederick L. Greene and others e, editor. Chicago, IL: American Joint Committee on Cancer; 2002.
19. Hewin DF. Prognostic factors in a series of 297 patients with gastric adenocarcinoma undergoing surgical resection. *Br J Surg*. 1998 Jun;85(6):874.

20. Saito H, Osaki T, Murakami D, Sakamoto T, Kanaji S, Oro S, et al. Macroscopic tumor size as a simple prognostic indicator in patients with gastric cancer. *Am J Surg*. 2006 Sep;192(3):296-300.
21. Liu X, Xu Y, Long Z, Zhu H, Wang Y. Prognostic Significance of Tumor Size in T3 Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2009 Apr 17.
22. Giuliani A, Caporale A, Di Bari M, Demoro M, Gozzo P, Corona M, et al. Maximum gastric cancer diameter as a prognostic indicator: univariate and multivariate analysis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2003 Dec;22(4):531-8.
23. Kunisaki C, Makino H, Takagawa R, Oshima T, Nagano Y, Kosaka T, et al. Tumor diameter as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Ann Surg Oncol*. 2008 Jul;15(7):1959-67.
24. Wang X, Wan F, Pan J, Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Tumor size: a non-neglectable independent prognostic factor for gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2008 Mar 1;97(3):236-40.
25. Bormann R. *Geshwulste des Magens und Duodenums* in Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie. Henke F LO, editor. Berlin: *Springer-Verlag*; 1926.
26. C. Fenoglio-Preiser NM, F. Carneiro, S.M. Powell, P. Correa, M. Rugge, P. Guilford, M. Sasako, R. Lambert, M. Stolte, F. Megraud, H. Watanabe. Tumours of the Stomach. In: Stanley R. Hamilton LAA, editor. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon, France: *IARC Press*; 2000.
27. Kim DY, Kim HR, Kim YJ, Kim S. Clinicopathological features of patients with Borrmann type IV gastric carcinoma. *ANZ J Surg*. 2002 Oct;72(10):739-42.
28. An JY, Kang TH, Choi MG, Noh JH, Sohn TS, Kim S. Borrmann type IV: an independent prognostic factor for survival in gastric cancer. *J Gastrointest Surg*. 2008 Aug;12(8):1364-9.
29. Luebke T, Baldus SE, Grass G, Bollschweiler E, Thiele J, Dienes HP, et al. Histological grading in gastric cancer by Ming classification: correlation with histopathological subtypes, metastasis, and prognosis. *World J Surg*. 2005 Nov;29(11):1422-7; discussion 8.

30. Lauren T. The two histologic main types of gastric carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1962;64:34.
31. Lauren PA, Nevalainen TJ. Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. A time-trend study in Finland with comparison between studies from high- and low-risk areas. *Cancer*. 1993 May 15;71(10):2926-33.
32. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger, A. E., Stemmermann, G. N., Lantz, P. E., Isaacson, P.G. *The Neoplastic Stomach. Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text* 3rd ed. Fenoglio-Preiser CM, editor.; 2008.
33. Ming SC. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer*. 1977 Jun;39(6):2475-85.
34. Watanabe H, Enjoji M, Imai T. Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer*. 1976 Jul;38(1):232-43.
35. Moore OS, Jr., Foote FW, Jr. The relatively favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer*. 1949 Jul;2(4):635-42.
36. Minamoto T, Mai M, Watanabe K, Ooi A, Kitamura T, Takahashi Y, et al. Medullary carcinoma with lymphocytic infiltration of the stomach. Clinicopathologic study of 27 cases and immunohistochemical analysis of the subpopulations of infiltrating lymphocytes in the tumor. *Cancer*. 1990 Sep 1;66(5):945-52.
37. Davessar K, Pezzullo JC, Kessimian N, Hale JH, Jauregui HO. Gastric adenocarcinoma: prognostic significance of several pathologic parameters and histologic classifications. *Hum Pathol*. 1990 Mar;21(3):325-32.
38. Grogg KL, Lohse CM, Pankratz VS, Halling KC, Smyrk TC. Lymphocyte-rich gastric cancer: associations with Epstein-Barr virus, microsatellite instability, histology, and survival. *Mod Pathol*. 2003 Jul;16(7):641-51.
39. Mueller MM, Fusenig NE. Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation*. 2002 Dec;70(9-10):486-97.

40. Jodele S, Blavier L, Yoon JM, DeClerck YA. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Mar;25(1):35-43.
41. Crawford HC, Matrisian LM. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis.* 1994;14(1-6):234-45.
42. Inokuchi K, Inutsuka S, Furusawa M, Soejima K, Ikeda T. Stromal reaction around tumor and metastasis and prognosis after curative gastrectomy for carcinoma of the stomach. *Cancer.* 1967 Nov;20(11):1924-9.
43. Inberg MV, Lauren P, Vuori J, Viikari SJ. Prognosis in intestinal-type and diffuse gastric carcinoma with special reference to the effect of the stromal reaction. *Acta Chir Scand.* 1973;139(3):273-8.
44. Ohno S, Tachibana M, Fujii T, Ueda S, Kubota H, Nagasue N. Role of stromal collagen in immunomodulation and prognosis of advanced gastric carcinoma. *Int J Cancer.* 2002 Feb 20;97(6):770-4.
45. Takahashi T, Ishikura H, Motohara T, Okushiba S, Dohke M, Katoh H. Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas. *J Surg Oncol.* 1997 Jul;65(3):164-70.
46. Nagakawa T, Mori K, Nakano T, Kadoya M, Kobayashi H, Akiyama T, et al. Perineural invasion of carcinoma of the pancreas and biliary tract. *Br J Surg.* 1993 May;80(5):619-21.
47. Tanaka A, Yoshikawa H, Okuno K, Koh K, Watatani M, Matsumura E, et al. The importance of neural invasion (NI) as a prognostic factor in diffuse invasive gastric cancer. *Surg Today.* 1997;27(8):692-5.
48. Tanaka A, Watanabe T, Okuno K, Yasutomi M. Perineural invasion as a predictor of recurrence of gastric cancer. *Cancer.* 1994 Feb 1;73(3):550-5.
49. Duraker N, Sisman S, Can G. The significance of perineural invasion as a prognostic factor in patients with gastric carcinoma. *Surg Today.* 2003;33(2):95-100.

50. Tianhang L, Guoen F, Jianwei B, Liye M. The effect of perineural invasion on overall survival in patients with gastric carcinoma. *J Gastrointest Surg.* 2008 Jul;12(7):1263-7.
51. del Casar JM, Corte MD, Alvarez A, Garcia I, Bongera M, Gonzalez LO, et al. Lymphatic and/or blood vessel invasion in gastric cancer: relationship with clinicopathological parameters, biological factors and prognostic significance. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008 Feb;134(2):153-61.
52. Inada K, Shimokawa K, Ikeda T, Ozeki Y. The clinical significance of venous invasion in cancer of the stomach. *Jpn J Surg.* 1990 Sep;20(5):545-52.
53. Noguchi Y. Blood vessel invasion in gastric carcinoma. *Surgery.* 1990 Feb;107(2):140-8.
54. Setälä LP, Kosma VM, Marin S, Lipponen PK, Eskelinen MJ, Syrjänen KJ, et al. Prognostic factors in gastric cancer: the value of vascular invasion, mitotic rate and lymphoplasmacytic infiltration. *Br J Cancer.* 1996 Sep;74(5):766-72.
55. Hyung WJ, Lee JH, Choi SH, Min JS, Noh SH. Prognostic impact of lymphatic and/or blood vessel invasion in patients with node-negative advanced gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2002 Jul;9(6):562-7.
56. Dicken BJ, Graham K, Hamilton SM, Andrews S, Lai R, Listgarten J, et al. Lymphovascular invasion is associated with poor survival in gastric cancer: an application of gene-expression and tissue array techniques. *Ann Surg.* 2006 Jan;243(1):64-73.
57. Hundahl SA, Phillips JL, Menck HR. The National Cancer Data Base Report on poor survival of U.S. gastric carcinoma patients treated with gastrectomy: Fifth Edition American Joint Committee on Cancer staging, proximal disease, and the "different disease" hypothesis. *Cancer.* 2000 Feb 15;88(4):921-32.
58. Ottini L, Falchetti M, Lupi R, Rizzolo P, Agnese V, Colucci G, et al. Patterns of genomic instability in gastric cancer: clinical implications and perspectives. *Ann Oncol.* 2006 Jun;17 Suppl 7:vii97-102.

59. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):113-30.
60. Choi SW, Park SW, Lee KY, Kim KM, Chung YJ, Rhyu MG. Fractional allelic loss in gastric carcinoma correlates with growth patterns. *Oncogene*. 1998 Nov 19;17(20):2655-9.
61. Miyoshi Y, Ando H, Nagase H, Nishisho I, Horii A, Miki Y, et al. Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 May 15;89(10):4452-6.
62. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*. 1992 Jul;1(4):229-33.
63. el-Rifai W, Powell SM. Molecular and biologic basis of upper gastrointestinal malignancy. Gastric carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2002 Apr;11(2):273-91, viii.
64. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Kato Y, et al. The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. *Cancer Res*. 1992 Jun 1;52(11):3231-3.
65. Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2006 Jan 14;12(2):192-8.
66. Levine AJ. The p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*. 1992 May 14;326(20):1350-2.
67. Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2 Suppl):S67-9, 1 p following S9.
68. Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. *Int J Cancer*. 1993 Jul 9;54(5):759-64.
69. Maesawa C, Tamura G, Suzuki Y, Ogasawara S, Sakata K, Kashiwaba M, et al. The sequential accumulation of genetic alterations characteristic of the colorectal adenoma-carcinoma sequence does not occur between gastric adenoma and adenocarcinoma. *J Pathol*. 1995 Jul;176(3):249-58.

70. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):323-31.
71. Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Stemmermann GN, Noffsinger A. TP53 and gastric carcinoma: a review. *Hum Mutat*. 2003 Mar;21(3):258-70.
72. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*. 1992 Dec 15;52(24):6735-40.
73. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*. 1988 Jul 1;48(13):3554-60.
74. Ranzani GN, Luinetti O, Padovan LS, Calistri D, Renault B, Burrel M, et al. p53 gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995 Apr-May;4(3):223-31.
75. Zheng L, Wang L, Ajani J, Xie K. Molecular basis of gastric cancer development and progression. *Gastric Cancer*. 2004;7(2):61-77.
76. Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, et al. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer*. 1999 May 1;85(9):1894-902.
77. Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer*. 2000 Jan 1;88(1):238-40.
78. Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest*. 2001;19(5):554-68.
79. Tateishi M, Toda T, Minamisono Y, Nagasaki S. Clinicopathological significance of c-erbB-2 protein expression in human gastric carcinoma. *J Surg Oncol*. 1992 Apr;49(4):209-12.
80. Mizutani T, Onda M, Tokunaga A, Yamanaka N, Sugisaki Y. Relationship of C-erbB-2 protein expression and gene amplification to invasion and metastasis in human gastric cancer. *Cancer*. 1993 Oct 1;72(7):2083-8.

81. Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol.* 2000 Jun;18(11):2201-9.
82. Czerniak B, Herz F, Gorczyca W, Koss LG. Expression of ras oncogene p21 protein in early gastric carcinoma and adjacent gastric epithelia. *Cancer.* 1989 Oct 1;64(7):1467-73.
83. Ohuchi N, Hand PH, Merlo G, Fujita J, Mariani-Costantini R, Thor A, et al. Enhanced expression of c-Ha-ras p21 in human stomach adenocarcinomas defined by immunoassays using monoclonal antibodies and in situ hybridization. *Cancer Res.* 1987 Mar 1;47(5):1413-20.
84. Yamamoto T, Hattori T, Tahara E. Interaction between transforming growth factor-alpha and c-Ha-ras p21 in progression of human gastric carcinoma. *Pathol Res Pract.* 1988 Nov;183(6):663-9.
85. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science.* 1993 May 7;260(5109):812-6.
86. Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science.* 1993 May 7;260(5109):810-2.
87. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993 May 7;260(5109):816-9.
88. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993 Jun 10;363(6429):558-61.
89. Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature.* 1993 Sep 16;365(6443):274-6.
90. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res.* 1993 Dec 15;53(24):5853-5.

91. Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF. Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch Syndrome). *Int J Cancer*. 1996 Feb 20;69(1):38-43.
92. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*. 1991 May;34(5):424-5.
93. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Nov 15;58(22):5248-57.
94. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Dec 3;89(23):1758-62.
95. Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS. Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol*. 1996 May;148(5):1671-8.
96. Horii A, Han HJ, Shimada M, Yanagisawa A, Kato Y, Ohta H, et al. Frequent replication errors at microsatellite loci in tumors of patients with multiple primary cancers. *Cancer Res*. 1994 Jul 1;54(13):3373-5.
97. Katabuchi H, van Rees B, Lambers AR, Ronnett BM, Blazes MS, Leach FS, et al. Mutations in DNA mismatch repair genes are not responsible for microsatellite instability in most sporadic endometrial carcinomas. *Cancer Res*. 1995 Dec 1;55(23):5556-60.
98. Kobayashi K, Sagae S, Kudo R, Saito H, Koi S, Nakamura Y. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: frequent replication errors in tumors of early onset and/or of poorly differentiated type. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995 Oct;14(2):128-32.
99. Larson AA, Kern S, Sommers RL, Yokota J, Cavenee WK, Hampton GM. Analysis of replication error (RER+) phenotypes in cervical carcinoma. *Cancer Res*. 1996 Mar 15;56(6):1426-31.

100. Larson RS, Scott MA, McCurley TL, Vnencak-Jones CL. Microsatellite analysis of posttransplant lymphoproliferative disorders: determination of donor/recipient origin and identification of putative lymphomagenic mechanism. *Cancer Res.* 1996 Oct 1;56(19):4378-81.
101. Toyama T, Iwase H, Yamashita H, Iwata H, Yamashita T, Ito K, et al. Microsatellite instability in sporadic human breast cancers. *Int J Cancer.* 1996 Nov 15;68(4):447-51.
102. Yamamoto H, Sawai H, Perucho M. Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res.* 1997 Oct 1;57(19):4420-6.
103. Bocker T, Diermann J, Friedl W, Gebert J, Holinski-Feder E, Karner-Hanusch J, et al. Microsatellite instability analysis: a multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Res.* 1997 Nov 1;57(21):4739-43.
104. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res.* 1997 Nov 1;57(21):4749-56.
105. Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, et al. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell.* 1993 Dec 17;75(6):1227-36.
106. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):1027-38.
107. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell.* 1993 Dec 17;75(6):1215-25.
108. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature.* 1994 Mar 17;368(6468):258-61.
109. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science.* 1994 Mar 18;263(5153):1625-9.

110. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*. 1994 Sep 1;371(6492):75-80.
111. Leach FS, Polyak K, Burrell M, Johnson KA, Hill D, Dunlop MG, et al. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2 in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res*. 1996 Jan 15;56(2):235-40.
112. Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, et al. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res*. 1996 Nov 1;56(21):4836-40.
113. Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H, Sutherland F, Haine L, Longfellow M, et al. Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. *Gut*. 1999 Sep;45(3):409-15.
114. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol*. 1999 Oct;23(10):1248-55.
115. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol*. 2002 Feb 15;20(4):1043-8.
116. Ruzkiewicz A, Bennett G, Moore J, Manavis J, Rudzki B, Shen L, et al. Correlation of mismatch repair genes immunohistochemistry and microsatellite instability status in HNPCC-associated tumours. *Pathology*. 2002 Dec;34(6):541-7.
117. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res*. 1998 Apr 15;58(8):1713-8.

118. Lanza G, Gafa R, Maestri I, Santini A, Matteuzzi M, Cavazzini L. Immunohistochemical pattern of MLH1/MSH2 expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. *Mod Pathol*. 2002 Jul;15(7):741-9.
119. Jeong SY, Shin KH, Shin JH, Ku JL, Shin YK, Park SY, et al. Microsatellite instability and mutations in DNA mismatch repair genes in sporadic colorectal cancers. *Dis Colon Rectum*. 2003 Aug;46(8):1069-77.
120. Rigau V, Sebbagh N, Olschwang S, Paraf F, Mourra N, Parc Y, et al. Microsatellite instability in colorectal carcinoma. The comparison of immunohistochemistry and molecular biology suggests a role for hMSH6 [correction of hMLH6] immunostaining. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Jun;127(6):694-700.
121. Shia J, Ellis NA, Klimstra DS. The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins. *Virchows Arch*. 2004 Nov;445(5):431-41.
122. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, Markowitz AJ, et al. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2005 Jan;29(1):96-104.
123. Valentini AM, Armentano R, Pirrelli M, Gentile M, Caruso ML. Immunohistochemical mismatch repair proteins expression in colorectal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006 Mar;14(1):42-5.
124. de La Chapelle A. Microsatellite instability phenotype of tumors: genotyping or immunohistochemistry? The jury is still out. *J Clin Oncol*. 2002 Feb 15;20(4):897-9.
125. Manavis J, Gilham P, Davies R, Ruszkiewicz A. The immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins (MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2): practical aspects in antigen retrieval and biotin blocking protocols. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003 Mar;11(1):73-7.
126. Shi Sea. Sensitivity and detection efficiency of a novel two-step detection system (PowerVision) for immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 1999;7:201-8.

127. Petrosyan K TR, Joseph D. Sensitivity of a novel biotin-free detection reagent (Powervision+™) for immunohistochemistry. *J Histotechnology*. 2002;25:247-50.
128. Hansen TP, Nielsen O, Fenger C. Optimization of antibodies for detection of the mismatch repair proteins MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2 using a biotin-free visualization system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006 Mar;14(1):115-21.
129. Lynch HT, Boland CR, Rodriguez-Bigas MA, Amos C, Lynch JF, Lynch PM. Who should be sent for genetic testing in hereditary colorectal cancer syndromes? *J Clin Oncol*. 2007 Aug 10;25(23):3534-42.
130. Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW, Hermens RP, Blokx WA, Dubois SV, et al. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol*. 2008 Aug;32(8):1246-51.
131. de Jong AE, van Puijtenbroek M, Hendriks Y, Tops C, Wijnen J, Ausems MG, et al. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Feb 1;10(3):972-80.
132. Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res*. 1993 Nov 1;53(21):5087-9.
133. Nakatsuru S, Yanagisawa A, Ichii S, Tahara E, Kato Y, Nakamura Y, et al. Somatic mutation of the APC gene in gastric cancer: frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. *Hum Mol Genet*. 1992 Nov;1(8):559-63.
134. Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene*. 1994 Jan;9(1):29-32.
135. Mironov NM, Aguelon MA, Potapova GI, Omori Y, Gorbunov OV, Klimenkov AA, et al. Alterations of (CA)_n DNA repeats and tumor suppressor genes in human gastric cancer. *Cancer Res*. 1994 Jan 1;54(1):41-4.

136. Strickler JG, Zheng J, Shu Q, Burgart LJ, Alberts SR, Shibata D. p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: when guardians fail. *Cancer Res.* 1994 Sep 1;54(17):4750-5.
137. Moslein G, Tester DJ, Lindor NM, Honchel R, Cunningham JM, French AJ, et al. Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. *Hum Mol Genet.* 1996 Sep;5(9):1245-52.
138. Halling KC, Harper J, Moskaluk CA, Thibodeau SN, Petroni GR, Yustein AS, et al. Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *Am J Pathol.* 1999 Jul;155(1):205-11.
139. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1998 Aug 1;58(15):3455-60.
140. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene.* 1998 Nov 5;17(18):2413-7.
141. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 9;95(12):6870-5.
142. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 1999 Feb;21(2):163-7.
143. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001 Apr 15;61(8):3225-9.
144. Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1999 Mar 1;59(5):1090-5.

145. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res.* 1999 Jan 1;59(1):159-64.
146. Waki T, Tamura G, Tsuchiya T, Sato K, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of E-cadherin, hMLH1, and p16 genes in nonneoplastic gastric epithelia. *Am J Pathol.* 2002 Aug;161(2):399-403.
147. Sakata K, Tamura G, Endoh Y, Ohmura K, Ogata S, Motoyama T. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in solitary and multiple gastric cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer.* 2002 Feb 12;86(4):564-7.
148. Correa P, Cuello C, Duque E, Burbano LC, Garcia FT, Bolanos O, et al. Gastric cancer in Colombia. III. Natural history of precursor lesions. *J Natl Cancer Inst.* 1976 Nov;57(5):1027-35.
149. Correa P. Precursors of gastric and esophageal cancer. *Cancer.* 1982 Dec 1;50(11 Suppl):2554-65.
150. Leung WK, Kim JJ, Kim JG, Graham DY, Sepulveda AR. Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol.* 2000 Feb;156(2):537-43.
151. Semba S, Yokozaki H, Yamamoto S, Yasui W, Tahara E. Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach. *Cancer.* 1996 Apr 15;77(8 Suppl):1620-7.
152. Hamamoto T, Yokozaki H, Semba S, Yasui W, Yunotani S, Miyazaki K, et al. Altered microsatellites in incomplete-type intestinal metaplasia adjacent to primary gastric cancers. *J Clin Pathol.* 1997 Oct;50(10):841-6.
153. Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res.* 2001 Apr 1;61(7):2847-51.
154. Ottini L, Palli D, Falchetti M, D'Amico C, Amorosi A, Saieva C, et al. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with tumor location and family history in a high-risk population from Tuscany. *Cancer Res.* 1997 Oct 15;57(20):4523-9.

155. Seruca R, Santos NR, David L, Constancia M, Barroca H, Carneiro F, et al. Sporadic gastric carcinomas with microsatellite instability display a particular clinicopathologic profile. *Int J Cancer*. 1995 Feb 20;64(1):32-6.
156. An C, Choi IS, Yao JC, Worah S, Xie K, Mansfield PF, et al. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005 Jan 15;11(2 Pt 1):656-63.
157. de Manzoni G, Tomezzoli A, Di Leo A, Moore PS, Talamini G, Scarpa A. Clinical significance of mutator phenotype and chromosome 17p and 18q allelic loss in gastric cancer. *Br J Surg*. 2001 Mar;88(3):419-25.
158. Hayden JD, Cawkwell L, Quirke P, Dixon MF, Goldstone AR, Sue-Ling H, et al. Prognostic significance of microsatellite instability in patients with gastric carcinoma. *Eur J Cancer*. 1997 Dec;33(14):2342-6.
159. Kitajima Y, Miyazaki K, Matsukura S, Tanaka M, Sekiguchi M. Loss of expression of DNA repair enzymes MGMT, hMLH1, and hMSH2 during tumor progression in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2003;6(2):86-95.
160. Lee HS, Choi SI, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kang GH, et al. Distinct clinical features and outcomes of gastric cancers with microsatellite instability. *Mod Pathol*. 2002 Jun;15(6):632-40.
161. Wirtz HC, Muller W, Noguchi T, Scheven M, Ruschoff J, Hommel G, et al. Prognostic value and clinicopathological profile of microsatellite instability in gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 1998 Jul;4(7):1749-54.
162. Falchetti M, Saieva C, Lupi R, Masala G, Rizzolo P, Zanna I, et al. Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival. *Hum Pathol*. 2008 Jun;39(6):925-32.
163. Theuer CP, Campbell BS, Peel DJ, Lin F, Carpenter P, Ziogas A, et al. Microsatellite instability in Japanese vs European American patients with gastric cancer. *Arch Surg*. 2002 Aug;137(8):960-5; discussion 5-6.
164. Nakashima H, Inoue H, Mori M, Ueo H, Ikeda M, Akiyoshi T. Microsatellite instability in Japanese gastric cancer. *Cancer*. 1995 Mar 15;75(6 Suppl):1503-7.

165. Musulen E, Moreno V, Reyes G, Sancho FJ, Peinado MA, Esteller M, et al. Standardized approach for microsatellite instability detection in gastric carcinomas. *Hum Pathol*. 2004 Mar;35(3):335-42.
166. Wu MS, Lee CW, Sheu JC, Shun CT, Wang HP, Hong RL, et al. Alterations of BAT-26 identify a subset of gastric cancer with distinct clinicopathologic features and better postoperative prognosis. *Hepatogastroenterology*. 2002 Jan-Feb;49(43):285-9.
167. Simpson AJ, Caballero OL, Pena SD. Microsatellite instability as a tool for the classification of gastric cancer. *Trends Mol Med*. 2001 Feb;7(2):76-80.
168. Lanza G, Gafa R, Santini A, Maestri I, Guerzoni L, Cavazzini L. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006 May 20;24(15):2359-67.
169. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):844-7.
170. DiVito KA, Charette LA, Rimm DL, Camp RL. Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. *Lab Invest*. 2004 Aug;84(8):1071-8.
171. Munoz N, Connelly R. Time trends of intestinal and diffuse types of gastric cancer in the United States. *Int J Cancer*. 1971 Jul 15;8(1):158-64.
172. Munoz N, Asvall J. Time trends of intestinal and diffuse types of gastric cancer in Norway. *Int J Cancer*. 1971 Jul 15;8(1):144-57.
173. Jacob CE, Gama-Rodrigues J, Bresciani CJ, Zilberstein B, Proscurshim I, Iriya K, et al. Trends in tumor location in gastric carcinoma over a 28-year period. *Hepatogastroenterology*. 2007 Jun;54(76):1297-301.
174. Yamashita K, Sakuramoto S, Katada N, Futawatari N, Moriya H, Hirai K, et al. Diffuse type advanced gastric cancer showing dismal prognosis is characterized by deeper invasion and emerging peritoneal cancer cell: the latest comparative study to intestinal advanced gastric cancer. *Hepatogastroenterology*. 2009 Jan-Feb;56(89):276-81.

175. Park JM, Jang YJ, Kim JH, Park SS, Park SH, Kim SJ, et al. Gastric cancer histology: clinicopathologic characteristics and prognostic value. *J Surg Oncol*. 2008 Dec 1;98(7):520-5.
176. Theuer CP, Nastanski F, Brewster WR, Butler JA, Anton-Culver H. Signet ring cell histology is associated with unique clinical features but does not affect gastric cancer survival. *Am Surg*. 1999 Oct;65(10):915-21.
177. Chan AO. E-cadherin in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2006 Jan 14;12(2):199-203.
178. Ribeiro MM, Sarmento JA, Sobrinho Simoes MA, Bastos J. Prognostic significance of Lauren and Ming classifications and other pathologic parameters in gastric carcinoma. *Cancer*. 1981 Feb 15;47(4):780-4.
179. Cimerman M, Repse S, Jelenc F, Omejc M, Bitenc M, Lamovec J. Comparison of Lauren's, Ming's and WHO histological classifications of gastric cancer as a prognostic factor for operated patients. *Int Surg*. 1994 Jan-Mar;79(1):27-32.
180. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2008 Nov 18;99(10):1704-11.
181. Shiraishi N, Sato K, Yasuda K, Inomata M, Kitano S. Multivariate prognostic study on large gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2007 Jul 1;96(1):14-8.
182. Chong JM, Fukayama M, Hayashi Y, Takizawa T, Koike M, Konishi M, et al. Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res*. 1994 Sep 1;54(17):4595-7.
183. dos Santos NR, Seruca R, Constancia M, Seixas M, Sobrinho-Simoes M. Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma: clinicopathologic implications and prognosis. *Gastroenterology*. 1996 Jan;110(1):38-44.
184. Lin JT, Wu MS, Shun CT, Lee WJ, Wang JT, Wang TH, et al. Microsatellite instability in gastric carcinoma with special references to histopathology and cancer stages. *Eur J Cancer*. 1995 Oct;31A(11):1879-82.

185. Wu CW, Chen GD, Jiang KC, Li AF, Chi CW, Lo SS, et al. A genome-wide study of microsatellite instability in advanced gastric carcinoma. *Cancer*. 2001 Jul 1;92(1):92-101.
186. Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, Hirata R, Jr., Pelosof A, Gomes LI, et al. Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa. *Cancer Res*. 2004 Feb 15;64(4):1255-65.
187. Pires AR, Andreiuolo Fda M, de Souza SR. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diagn Pathol*. 2006;1:14.
188. Jourdan F, Sebbagh N, Comperat E, Mourra N, Flahault A, Olschwang S, et al. Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression. *Virchows Arch*. 2003 Aug;443(2):115-21.
189. Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, De Leeuw W, Wijnen J, Dreef E, et al. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol*. 2003 Feb;162(2):469-77.
190. Hardisson D, Moreno-Bueno G, Sanchez L, Sarrio D, Suarez A, Calero F, et al. Tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair (hMLH1 and hMSH2 genes) in endometrial carcinoma and atypical endometrial hyperplasia: relationship with microsatellite instability. *Mod Pathol*. 2003 Nov;16(11):1148-58.
191. Beghelli S, de Manzoni G, Barbi S, Tomezzoli A, Roviello F, Di Gregorio C, et al. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with better prognosis in only stage II cancers. *Surgery*. 2006 Mar;139(3):347-56.
192. Jiricny J, Marra G. DNA repair defects in colon cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2003 Feb;13(1):61-9.
193. Jansson A, Arbman G, Zhang H, Sun XF. Combined deficiency of hMLH1, hMSH2, hMSH3 and hMSH6 is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2003 Jan;22(1):41-9.

194. Truninger K, Menigatti M, Luz J, Russell A, Haider R, Gebbers JO, et al. Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2005 May;128(5):1160-71.
195. Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Sheu JC, et al. Clinicopathological significance of altered loci of replication error and microsatellite instability-associated mutations in gastric cancer. *Cancer Res*. 1998 Apr 1;58(7):1494-7.
196. Ohmura K, Tamura G, Endoh Y, Sakata K, Takahashi T, Motoyama T. Microsatellite alterations in differentiated-type adenocarcinomas and precancerous lesions of the stomach with special reference to cellular phenotype. *Hum Pathol*. 2000 Sep;31(9):1031-5.
197. Perez RO, Jacob CE, D'Ottaviano FL, Alvarenga C, Ribeiro AS, Ribeiro U, Jr., et al. *Microsatellite instability in solitary and sporadic gastric cancer*. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 2004 Oct;59(5):279-85.
198. Wu M, Semba S, Oue N, Ikehara N, Yasui W, Yokozaki H. BRAF/K-ras mutation, microsatellite instability, and promoter hypermethylation of hMLH1/MGMT in human gastric carcinomas. *Gastric Cancer*. 2004;7(4):246-53.
199. Liu P, Zhang XY, Shao Y, Zhang DF. Microsatellite instability in gastric cancer and pre-cancerous lesions. *World J Gastroenterol*. 2005 Aug 21;11(31):4904-7.
200. Benatti P, Gafa R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res*. 2005 Dec 1;11(23):8332-40.
201. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005 Jan 20;23(3):609-18.
202. Parc Y, Gueroult S, Mourra N, Serfaty L, Flejou JF, Tiret E, et al. Prognostic significance of microsatellite instability determined by immunohistochemical staining of MSH2 and MLH1 in sporadic T3N0M0 colon cancer. *Gut*. 2004 Mar;53(3):371-5.

203. di Pietro M, Sabates Bellver J, Menigatti M, Bannwart F, Schnider A, Russell A, et al. Defective DNA mismatch repair determines a characteristic transcriptional profile in proximal colon cancers. *Gastroenterology*. 2005 Sep;129(3):1047-59.
204. Risinger JI, Maxwell GL, Chandramouli GV, Aprelikova O, Litz T, Umar A, et al. Gene expression profiling of microsatellite unstable and microsatellite stable endometrial cancers indicates distinct pathways of aberrant signaling. *Cancer Res*. 2005 Jun 15;65(12):5031-7.
205. D'Errico M, de Rinaldis E, Blasi MF, Viti V, Falchetti M, Calcagnile A, et al. Genome-wide expression profile of sporadic gastric cancers with microsatellite instability. *Eur J Cancer*. 2009 Feb;45(3):461-9.

APÊNDICE



IMMUNOHISTOCHEMICAL PATTERNS OF MISMATCH REPAIR ENZYMES (MMR) IN GASTRIC ADENOCARCINOMAS ARE ASSOCIATED WITH PATHOLOGICAL FEATURES AND CAN PREDICT SURVIVAL.

Journal:	<i>Virchows Archiv</i>
Manuscript ID:	draft
Type of Manuscript:	Original Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	<p>Simoes, Kleber; University of Sao Paulo School of Medicine, Pathology Alves, Venancio; University of Sao Paulo School of Medicine, Pathology Gama-Rodrigues, Joaquim; University of Sao Paulo School of Medicine, Gastroenterology Bresciani, Cláudio; University of Sao Paulo School of Medicine, Gastroenterology Jacob, Carlos Eduardo; University of Sao Paulo School of Medicine, Gastroenterology Ressio, Rodrigo; University of Sao Paulo School of Medicine, Pathology Longatto Filho, Adhemar; Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Pathology; Adolfo Lutz Institute, Pathology Nonogaki, Suely; Adolfo Lutz Institute, Pathology Wakamatsu, Alda; University of Sao Paulo School of Medicine, Pathology</p>
General Pathology:	tumor pathology (inc. classification grading prognosis invasion and metastasis)
Systemic Pathology:	stomach and duodenum
Special Techniques in Pathology:	arrays (inc. DNA RNA and protein), immunohistochemistry
Free Keywords:	microsatellite instability, mismatch repair enzymes
Keywords (old), please do	microsatellite instability, mismatch repair enzymes

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

IMMUNOHISTOCHEMICAL PATTERNS OF MISMATCH REPAIR ENZYMES (MMR) IN GASTRIC ADENOCARCINOMAS ARE ASSOCIATED WITH PATHOLOGICAL FEATURES AND CAN PREDICT SURVIVAL.

AUTHORS

Kleber Simões, M.D.¹

Rui M. Reis, PhD²

Suely Nonogaki, B.Sc.³

Rodrigo Albergaria Réssio, B.Sc¹

Alda Wakamatsu, M.Sc.¹

Inês Almeida, B.Sc.²

Carlos Eduardo Jacob, M.D., PhD⁴

Cláudio Bresciani, M.D., PhD⁴

Bruno Zylberstein, M.D., PhD⁴

Joaquim Jose Gama-Rodrigues, MD, PhD⁴

Ivan Ceconello, M.D., PhD⁴

Adhemar Longatto Filho, M.Sc., PhD, P.M.I.A.C.^{2,3}

Venâncio Avancini Ferreira Alves, M.D., PhD^{1,3}

¹Department of Pathology, University of Sao Paulo School of Medicine, Brazil (LIM14)

²Life and Health Sciences Research Institute, School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal

³Division of Pathology, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

⁴Department of Gastroenterology, University of Sao Paulo School of Medicine, Brazil.

Corresponding author: Kleber Simões, M.D.

e-mail: klesims@yahoo.com

tel: +55 11 3061-7433, +55 11 3069-6091

ABSTRACT

Gastric cancer remains a clinical concern due to its high prevalence and mortality, thus efforts for comprehensive molecular subtyping, as related to morphology and prognosis, is demanded. In this study we correlated immuno-expression profile of a panel of four mismatch-repair (MMR) enzymes (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2) with clinico-pathological features and prognosis in a series of 133 locally advanced gastric cancers systematically operated and followed-up. MMR negativity was identified in 45 cases (33.6%), with 31 MLH1 negative cases (26.7%), 29 to MSH6 (23%), 25 to MSH2 (20.8%) and 25 to PMS2 (21%). Sixteen cases showed co-negativity to MLH1/PMS2 pair and nineteen to MSH2/MSH6. In general, MMR negativity was associated to clinico-pathological features as predominantly polypoid and fungating macroscopic types (Bormann's type I and II), intestinal and tubular morphology according to Lauren's and WHO systems respectively, Ming's expansile type, heavy lymphoplasmacytic infiltrate and absent perineural infiltration. As related to prognosis, absent MMR immuno-expression showed a beneficial impact on disease-specific survival for MLH1, MSH6 and PMS2 (LogRank: 5.46, $p=0.019$; 6.08, $p=0.014$; 7.46, $p=0.006$), with simultaneous loss of MLH1 and PMS2 as well as PMS2 when individually analyzed showing independent prognostic impact at multivariate models (3.84, $p=0.029$ and 9.82, $p=0.028$). Taken together, these results validate biological significance of immunohistochemical detection of MMR enzymes as a method to identify specific pathological features and to assess prognosis in gastric cancer.

Keywords: microsatellite instability, mismatch repair enzymes, gastric cancer, pathology, prognosis.

INTRODUCTION

Despite of progressive reduction in incidence in the last six decades and improvement on surgical and oncological treatment strategies, gastric cancer still carries high mortality rates and remains among the most important causes of cancer-related death worldwide, mainly in high incidence areas (1, 2). Thus, further efforts for a better molecular subtyping, as related to morphology, is demanded.

This scenario contrast with colorectal cancer (CRC), in which at least two apparently exclusive oncogenic phenotypes have already been documented and their pathological characteristics and prognostic significance well characterized: chromosomal instability versus microsatellite instability (MSI) pathways, the latter being related to methylator phenotype. Chromosomal instability is characterized by significant structural genetic aberrations, such as loss of chromosomal arms, large deletions, insertions, translocations and rearrangements, commonly associated to the classical APC, k-ras and p53 mutation sequence, usually leading to a worse prognosis. The alternate molecular phenotype, microsatellite instability (MSI), is generated due to loss of function of DNA mismatch repair system (MMR), leading to mutations at specific DNA repetitive sequences (microsatellites) (3). Although initially identified as a phenotype of hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome-related tumors (HNPCC or Lynch syndrome), MSI has also been detected in 15% to 20% of sporadic CRC (4-6). Although this subdivision is not yet well

1
2
3 acknowledged in gastric cancer, similar rates of MSI have been reported from
4
5 25% to 50% of gastric carcinomas (3, 7-11). For tumors of different organs,
6
7 immunohistochemical assessment of MMR enzymes expression (MLH1, MSH2,
8
9 MSH6 and PMS2) has been validated as a predictive tool for microsatellite
10
11 instability (MSI) phenotype detection, being an alternative to expensive
12
13 molecular studies as the initial approach in research or diagnostic settings,
14
15 including screening of tumors of patients fulfilling Amsterdam and/or Bethesda
16
17 criteria for Lynch syndrome (12, 13). However, similar data in gastric
18
19 adenocarcinoma are scant (7, 14, 15).
20
21
22
23

24
25 Taking into account recent technical recommendations about MMR
26
27 status determination employing well controlled and standardized
28
29 immunohistochemical assays (16, 17)], as well as stringent guidelines for
30
31 results interpretation, the present study aims at the assessment of the protein
32
33 expression status of MMR enzymes (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2) in a
34
35 series of gastric adenocarcinomas treated according to a well established
36
37 surgical protocol in a reference center and to explore its association to main
38
39 pathological features as well as to their impact on clinical outcome.
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **MATERIAL AND METHODS**

49 **Patients and specimens**

50
51
52
53 Paraffin blocks from 133 gastrectomy specimens operated on between
54
55 February 1993 and December 2002 at the Department of Gastroenterology
56
57 were retrieved from the files of Department of Pathology, Hospital das Clinicas,
58
59
60

1
2
3 University of Sao Paulo, School of Medicine. Inclusion criteria for this study
4 encompassed localized tumors, not showing distant metastatic disease at
5 diagnosis, infiltrating at least muscularis propria (pT2a and higher according to
6 TNM 2002 AJCC staging system), irrespective of lymph node status. All
7 patients were treated according to a well established surgical protocol
8 (gastrectomy and D2 lymph node dissection following the Japanese Gastric
9 Cancer Association Rules) at the Department of Gastroenterology, Hospital das
10 Clinicas, University of Sao Paulo, a national reference center for gastric surgery
11 with more than one hundred gastrectomies each year (18)]. Patients with family
12 history of gastric cancer were excluded from this study. Clinical status and
13 outpatient follow-up data of patients last updated was in July 2008.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 Assessment of pathological variables

33
34 Four micrometer histological sections were obtained from original
35 paraffin blocks and, after hematoxylin-eosin staining, submitted to histological
36 review. Primary tumors were histologically classified according to World Health
37 Organization (19) in tubular, tubulo/papillary, signet-ring cell and mucinous
38 categories. Lauren and Ming's (20, 21) systems were also applied to primary
39 tumors, stratifying lesions into diffuse or intestinal and infiltrating or expansile
40 types respectively, the latter derived from evaluation of deepest tumoral edge.
41 The maximum level of tumoral infiltration in gastric wall was determined as
42 muscularis propria, subserosa, penetrating subserosa or direct invasion of
43 adjacent structures. Lymphatic vascular and perineural invasion was assessed
44 as non-detected or present. Pathological nodal status (pN) was determined by
45 counting of histologically affected lymph nodes and classified as pN0, pN1, pN2
46 or pN3 according to AJCC TNM Staging system (22). Information about largest
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 dimension of primary tumor was obtained from original surgical pathology
4 reports, as well as its main location, classified as proximal (cardia, fundus and
5 proximal corpus) or distal tumors (distal corpus, antrum and prepyloric region).
6
7
8 Borrmann classification (23) was also obtained from the original macroscopic
9 reports and cases were grouped in polypoid/fungating (types I and II) or
10 ulcerated/infiltrative/mixed categories (types III and IV). Peri/intratumoral
11 inflammatory infiltrate was semi-quantitated as absent, mild/moderate and
12 intense whereas desmoplastic stromal response as absent to mild or moderate
13 to intense. Final pathological TNM stage was also assessed.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 Tissue microarrays

28
29 All hematoxylin-eosin stained slides were re-evaluated, allowing
30 selection of primary tumor areas for Tissue Microarray (TMA) spotting. The
31 respective paraffin blocks were marked and TMA constructed using a 1.0 mm
32 gauge for tissue cylinder extraction of donor and placement on receptor block,
33 using a Manual Tissue Microarrayer from Beecher Instruments (model MTA1).
34 Each individual case was sampled twice on receptor block as a strategy for
35 overcoming representativity losses inherent to TMA method, as stated in papers
36 describing validation of this technology (24-29). TMA paraffin blocks were
37 sectioned on a Leica microtome in 3 µm sections.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 Immunohistochemistry

54
55 *In situ* detection of MMR enzymes was achieved through
56 immunohistochemistry (IHC) employing primary monoclonal antibodies to MLH1
57 (clone G168-15, dilution 1:100), MSH2 (clone G219-1129, dilution 1:800),
58 MSH6 (clone 44-MSH6, dilution 1:100) and PMS2 (clone A16-4, dilution
59
60

1
2
3 1:1.000), all purchased from BD Biosciences Pharmingen. For IHC assays,
4
5 sectioned slides from TMA paraffin blocks were dewaxed, rehydrated and
6
7 submitted to heat induced antigen retrieval in pH=6.0 citrate buffer using a
8
9 steamer for 30 minutes. Endogenous peroxidase was blocked using 6% H₂O₂
10
11 and sections from primary tumors overnightly incubated with primary antibodies
12
13 at 4°C. Avidin-biotin free short polymer-based peroxidase amplification system
14
15 (Novolink, Novocastra, UK) and diaminobenzidine as chromogen were used for
16
17 development of reaction products. Positive controls represented by two cases of
18
19 colorectal adenocarcinoma known to express all four MMR enzymes were used,
20
21 as well as negative controls established by omitting the primary antibody
22
23 incubation step, were used in every reaction. Lymphocytes and, whenever
24
25 present, non-neoplastic gastric foveolar cells served as in-built controls.
26
27 Representative and duplicate spots of each primary tumor placed on TMA were
28
29 evaluated and scored as negative or positive, considering that at least some
30
31 degree of well-defined nuclear immunostaining must be seen for a case to be
32
33 regarded as positive. Positive internal controls (lymphocytes or non-neoplastic
34
35 mucosa) must have been found in a particular sample to validate the absence
36
37 of neoplastic nuclear staining as a true negative result.
38
39
40
41
42
43
44

45
46 Each MMR enzyme was individually assessed, as well as their all
47
48 possible combination sets of negativities, with respective frequencies of each
49
50 enzyme and combination set reported.
51
52
53
54

55 Validation of TMA findings in large sections

56
57
58

59 All cases with TMA samples resulting negative were validated on
60
conventional large sections for that particular marker, with the same stringent

1
2
3 criteria used for positive or negative assignment. Cases with negative result in
4
5 TMA and positive in large section were considered positive.
6
7
8
9

10 Statistical analysis

11
12 Clinico-pathological features were compared between MLH1, MSH2,
13 MSH6 or PMS2 negative and positive groups using Pearson's chi-square test
14 and considered significant at $p < 0.05$. To demonstrate influence of different
15 clinico-pathological variables, as well as primary tumor MMR enzymes status on
16 gastric cancer related mortality, univariate comparisons were made by Log-rank
17 test (considered significant at $p < 0.05$ level). Cox multivariate proportion of
18 hazards models were constructed to assess differential contributions of clinico-
19 pathological variables and MMR status of primary tumors on disease related
20 mortality, with variables selected for inclusion in these models based on their
21 result at univariate analysis ($p < 0.10$), as well as their independence in relation
22 to each other.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 RESULTS

42 Clinico-pathological features

43
44
45 From 133 cases, 93 were male (69.9%) and 40 (30.1%) were female.
46 Mean age was 60.1 ± 12.8 years old (mean \pm S.D.) with a median of 61 years.
47 Mean primary tumor size was 5.9 ± 3.0 cm, with a median of 5.5 cm. Proximal
48 tumors comprising those arising in cardia, fundus and proximal corpus
49 represented 32.3% of lesions, with the remaining 67.7% arising in distal corpus,
50 antral and pre-pyloric regions. Macroscopic types according to Borrmann
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 classification were distributed as follows, type I: 12 (9.0%), type II: 27 (20.3%),
4
5 type III: 69 (51.9%) and type IV: 25 (18.8%).
6
7

8 According to the Lauren histological classification, 83 cases (62.4%)
9
10 were intestinal-type and 49 (36.8%) diffuse-type. Using World Health
11
12 Organization (WHO) classification, tubular/tubulo-papillary carcinoma
13
14 comprised 77 cases (57.9%), mucinous type occurred in 8 cases (6.0%) and
15
16 signet-ring cell carcinoma type was assigned to 44 cases (33.1%).
17
18

19 According to Ming classification, 103 cases (77.4%) showed an
20
21 infiltrating pattern, whereas 30 (22.6%) were found expansive. Histological
22
23 evaluation of infiltrating level of primary tumor showed that in 58 cases (43.6%)
24
25 carcinoma compromised muscularis propria, 74 cases (55.6%) had subserosa
26
27 connective tissue invasion and in 1 case (0.8%) adjacent structures were
28
29 compromised.
30
31
32

33 Intratumoral lymphoplasmacytic infiltrate was absent in 8 cases (6.0%),
34
35 mild to moderate in 93 (69.9%) and intense in 32 cases (24.1%). Desmoplastic
36
37 stromal response was evaluated as absent to mild in 62 cases (46.6%) and
38
39 moderate to heavy in 71 (53.4%). Lymphatic invasion was detected in 67 cases
40
41 (50.4%) and blood vessel invasion in 23 cases (17.3%). Perineural infiltration
42
43 was detected in 70 cases (52.6%).
44
45
46
47

48 Lymph node status determined by pathological TNM stratified cases as
49
50 follows: pN0 in 42 cases (31.6%), pN1 in 63 (47.4%), pN2 in 26 (19.5%) and
51
52 pN3 in 2 (1.5%). Pathological staging according to TNM showed the following
53
54 frequencies: Stage IB: 41 cases (30.8%), Stage II: 59 (44.4%), Stage IIIA: 29
55
56 (21.8%), Stage IIIB: 2 (1.5%) and Stage IV: 2 (1.5%).
57
58
59
60

MMR status

1
2
3 Despite inherent TMA methodological issues (spot physical or
4 representatively losses), 116 cases were found adequate for MLH1 evaluation
5 (87.2%), 120 for MSH2 (90.2%), 126 for MSH6 (94.5%) and 119 for PMS2
6 (89.5%). Forty-five cases (33.6%) showed at least one negative MMR enzyme.
7
8 Thirty-one gastric adenocarcinoma cases showed negative for MLH1 (26.7%),
9 25 were negative for MSH2 (20.8%), 29 negative for MSH6 (23%) and 25
10 negative for PMS2 (21%). **Figures 1 to 8.**

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Forty-five cases (33.6% of total) showed absent immunoeexpression of at least one MMR enzyme. In 15 (20%), 14 cases negative for three MMR (31.2%) and the remaining 7 negative for all the four MMR enzymes evaluated (15.5%). Interestingly, loss of immuno-expression of both MLH1 and PMS2 was seen in 16 (35.5%), whereas loss of both MSH2/MSH6 occurred in 19 cases (42.2%). Frequencies of the various patterns of MMR enzyme immunoeexpression profiles are shown at table 1.

MMR status and clinico-pathological features

Summary of association between clinico-pathological features and MLH1, MSH2, MSH6 or PMS2 status are depicted at table 2. MLH1 negative tumors featured a predominantly polypoid and/or fungating Borrmann's macroscopic types I and II (67.7% vs 18.8%, $p < 0.001$). Only four MLH1 negative tumors were classified as having diffuse/"signet-ring" cell morphology according to Lauren (12.9% vs 40.5%, $p = 0.005$) or WHO classification ($p = 0.009$). Ming's expansile type was more commonly seen among MLH1 negative tumors when compared to positive ones (38.7% vs 18.8%, $p = 0.027$). Most MLH1 negative tumors invaded only muscularis propria (67.7%), whereas most MLH1 positive tumors invaded subserosa (62.4%, $p = 0.011$). Inflammatory

1
2
3 infiltrate showed a trend to be more commonly qualified as intense in MLH1
4
5 negative tumors (41.9% vs 21.2%, $p=0.064$).
6
7

8 MSH2 negative tumors showed a predominantly polypoid/fungating (I/II)
9
10 Borrmann's macroscopic phenotype (88% vs 16.8%, $p<0.001$), intestinal
11
12 phenotype according to Lauren (96% vs 59.6%, $p=0.001$) and tubular/tubulo-
13
14 papillary to WHO classifications ($p=0.008$), and more commonly showed Ming's
15
16 expansile type (48% vs 15.8%, $p=0.001$). Deeper infiltration up to muscularis
17
18 propria was more common among MSH2 negative tumors (68% vs 37.9%,
19
20 $p=0.025$). Perineural infiltration was more commonly seen among MSH2
21
22 positive tumors (58.9% vs 32%, $p=0.016$) as well as moderate to heavy
23
24 desmoplastic stromal response (57.9% vs 32%, $p=0.021$).
25
26
27
28

29 Among MSH6 negative tumors there was a predominance of
30
31 polypoid/fungating (I/II) Borrmann's macroscopic types (82.8% vs 14.4%,
32
33 $p<0.001$). Lauren's intestinal and Ming's expansile histological types were more
34
35 common among MSH6 negative tumors (96.6% vs 55.2%, $p<0.001$ and 55.2%
36
37 vs 13.4%, $p<0.001$). Perineural invasion were more common among MSH6
38
39 positive tumors (56.7% vs 34.5%, $p=0.036$).
40
41
42

43 Older patients more frequently harbored PMS2 negative tumors ($59.1 \pm$
44
45 12.4 y.o. vs 64.8 ± 13.3 y.o., $p=0.046$). Polypoid/fungating (I/II) Borrmann's
46
47 macroscopic types (56% vs 24.5%, $p=0.002$) and Lauren's intestinal phenotype
48
49 (84% vs 59.1%, $p=0.021$) more commonly occurred among PMS2 negative
50
51 tumors. Perineural invasion was more commonly detected in PMS2 positive
52
53 lesions (59.6% vs 36%, $p=0.035$).
54
55
56

57 Tables 3 and 4 summarize distribution of clinico-pathological features
58
59 according to simultaneous negativity of the heterodimeric pairs MLH1/PMS2
60

1
2
3 and MSH2/MSH6, resuming all the above mentioned associations when
4
5 analysis were performed for each individual enzyme.
6
7

8 Gender, tumor location, venous or lymphatic vascular invasion, lymph
9
10 node status or TNM staging did not show any significant relationship with the
11
12 status of primary tumors regarding the four MMR enzymes studied herein.
13
14
15

16 17 Survival analyses

18
19
20
21
22 Univariate survival analysis showed that increased gastric cancer related
23
24 mortality was significantly related to male gender (LogRank: 5.11, $p=0.024$),
25
26 tumors greater than 5,5 cm (LogRank: 3.98, $p=0.046$), tumors showing a
27
28 macroscopic Borrmann types III or IV (LogRank: 4.75, $p=0.029$). Patients
29
30 harboring tumors with a “signet-ring” or mucinous morphology according to
31
32 WHO classification (LogRank: 8.61, $p=0.003$), diffuse morphology according to
33
34 Lauren’s classification (LogRank: 11.62, $p=0.003$) and perineural infiltration
35
36 (LogRank: 12.62, $p<0.001$) also followed a worse prognosis. Presence of lymph
37
38 node metastases (LogRank: 23.25, $p<0.001$) and higher TNM stages
39
40 (LogRank: 35.60, $p<0.001$) were also significantly related to poorer survival.
41
42 Age, tumor location, Ming’s histological type, deepest level of neoplastic
43
44 infiltration on gastric wall, inflammatory infiltrate and lympho-vascular or venous
45
46 invasion were not found statistically related to survival in univariate analyses.
47
48
49
50
51
52
53 Summary of univariate survival analyses parameters for the clinico-pathological
54
55 features can be seen in table 5, in which hazard ratios according to univariate
56
57 Cox regression models are also depicted.
58
59

60
Significant beneficial impact of MMR protein status on survival were seen
for patients having MLH1 negative tumors (LogRank: 5.46, $p=0.019$), MSH6

1
2
3 negative tumors (LogRank: 6.08, $p=0.014$), PMS2 negative tumors (LogRank:
4
5 7.46, $p=0.006$), MLH1/PMS2 negative tumors (LogRank: 7.89, $p=0.005$) and
6
7 MSH2/MSH6 simultaneously negative tumors (LogRank: 5.29, $p=0.021$) at
8
9 univariate analysis, as shown in table 6.
10
11

12 The most important features for prognosis at univariate analyses
13 (gender, Lauren histological classification, perineural infiltration and TNM stage)
14 were included in multivariate Cox hazard proportions models including one of
15 each statistically significant MMR enzyme at each run (MLH1, MSH6 and
16 PMS2). After this first approach, specific pairs of MMR evaluated, MLH1/PMS2
17 and MSH2/MSH6, were also analyzed in the same manner.
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 When MLH1 was included in the Cox model with the above mentioned
28 variables, expression of this marker by primary tumor showed a marginal
29 association with survival (HR=2.34, $p=0.062$), with only Lauren's diffuse
30 histological type and pathological TNM stages IIIA and IV showing independent
31 impact on survival (HR=2.13, $p=0.034$; HR=3.08, $p=0.025$ and HR=35.80,
32 $p=0.003$ respectively). Similarly, when MSH6 expression status was included in
33 multivariate analysis (HR=3.03, $p=0.061$), only male gender and TNM stages II,
34 IIIA and IV were found independent prognostic factors (HR=2.94, $p=0.020$;
35 HR=2.96, $p=0.024$, HR=4.41, $p=0.005$ and HR=50.43, $p=0.001$, respectively).
36
37 PMS2 immunoexpression was found an independent prognostic factor for
38 disease specific mortality in multivariate analysis (HR=3.84, $p=0.029$), with
39 Lauren diffuse histological type and TNM stages II, IIA and IV also negatively
40 impacting prognosis in this approach (HR=2.22, $p=0.022$; HR=2.25, $p=0.066$;
41 HR=4.12, $p=0.003$ and HR=49.92, $p=0.001$ respectively). An independent
42 prognostic impact for MLH1/PMS2 status of primary tumor (HR=9.82, $p=0.028$)
43 was found, the same not occurring with MSH2/MSH6 (HR=2.15, $p=0.257$).
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Table 7 summarizes the results for multivariate Cox analyses for each individual
4 enzyme and the values found with specific pairs of enzymes are depicted at
5
6
7
8 table 8.
9

10 11 12 **DISCUSSION** 13 14 15 16

17 Genetic aberrations in gastric cancer have been classified as due to
18 microsatellite instability (MSI) or to LOH phenotypes, two almost mutually
19 exclusive pathways of carcinogenesis (3, 30-32). Analysis of the length of PCR-
20 derived fragments of mono and/or dinucleotide markers has been used as the
21 gold standard for genetic determination of MSI phenotype in gastric cancer as
22 well as in neoplasm from other primary sites, mainly colorectal tumors, either as
23 a research or as screening tool for patients with suspected familial cancer
24 syndromes (13, 33, 34).
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 Molecular classification of MSI phenotype as stable (MSS)/low frequency
37 MSI (MSI-L) and high frequency MSI (MSI-H) has been shown capable to
38 stratify sporadic cases of gastric cancer into subsets with clinico-pathological
39 features such as predominant distal location, advanced age at diagnosis, mainly
40 intestinal/tubular histological type, as well as less advanced pathological stage
41 and better prognosis for tumors of MSI phenotype (7, 8, 11, 35-39)].
42
43
44
45
46
47
48
49

50 Immunohistochemistry has been used only as a validating tool to
51 demonstrate defective mismatch repair enzyme (MMR) expression in cases
52 with known MSI status or as a screening method to select candidates for
53 molecular validation and sequencing analyses (8, 12, 40). Furthermore,
54 although recent studies have suggested an important role of
55 immunohistochemistry for assessing MSI in tumors from other organs (41-47),
56
57
58
59
60

1
2
3 data characterizing MMR enzymes immuno-expression in sporadic gastric
4 cancer are still lacking, and its usefulness for the assessment of clinico-
5 pathological features, including prognosis, are yet infrequently and incompletely
6 explored (8, 14). In this context, our data are the first to fully characterize
7 expression of a panel of MMR enzymes in a series of sporadic gastric cancer
8 cases employing a well controlled immunohistochemistry protocol according to
9 recent recommendations, including antigen retrieval techniques and avidin-
10 biotin free visualization systems with second generation short polymer
11 peroxidase reagents (17, 48). Also, correlations between status of different
12 MMR analyzed, as related to clinico-pathological features and prognosis were
13 also explored.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 Defective immuno-expression of at least one MMR enzyme was
30 observed in 45 of 133 gastric cancer cases studied herein (33.6%), which is
31 quite similar to the range of frequencies of microsatellite instability as
32 determined by molecular approaches reported in literature (11, 39, 49, 50).
33 However, the present study sheds light on the immuno-expression profiles of
34 MMR in gastric cancer and on showing that negativity of MMR enzymes more
35 commonly occurs in association, with only 15 out of 45 cases with some
36 defective MMR enzymes showing only one negative marker (33.3%).
37 Moreover, 14 out of 45 (31.1%) and 7 out of 45 cases (15.5%) had three or all
38 the four MMR enzymes tested negative, respectively.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 Association between negative results for MMR studied might raise a
54 questioning whether technical issues, such as tissue preservation, problems
55 with antigen retrieval or visualization system, could have induced false-negative
56 results. Thus for, reviewing all cases with stringent criteria for interpretation of
57 negativity (16, 51), presence of normal reactivity in non-neoplastic epithelium
58
59
60

1
2
3 and leukocytes in each sample, as well as validating every TMA negative or
4
5 inconclusive result in large sections and the already mentioned employment of
6
7 a well controlled and literature validated immunohistochemistry procedures (42,
8
9 48) fully corroborate our *in situ* findings.

10
11
12 Regarding association of immunohistochemical profile of MMR enzyme
13
14 with clinical and pathological features, the present study demonstrates that
15
16 tumors featuring a predominant polypoid and fungating macroscopic types
17
18 (Borrmann's types I and II) and intestinal histological type according to Lauren
19
20 classification are associated with defective expression of all MMR repair
21
22 enzymes assessed (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2). Tubular and/or tubulo-
23
24 papillary histological phenotype of WHO classification, the counterparts of
25
26 intestinal type of Lauren's classification, was significantly associated to loss of
27
28 immuno-expression of MLH1, MSH2 and MSH6.
29
30
31
32
33

34 Other important clinico-pathological features found related to MMR
35
36 negativity were expansile Ming's histological type (MLH1, MSH2 and MSH6),
37
38 tumoral infiltration restricted to muscularis propria (MLH1 and MSH2), absent
39
40 perineural infiltration (MSH2, MSH6 and PMS2) and increased age at diagnosis
41
42 (PMS2). Intratumoral lymphoplasmacytic infiltrate showed a trend to be
43
44 associated with loss of immuno-expression of MLH1 and MSH6, as well as
45
46 absent/mild desmoplastic stromal reaction (MSH6). These data represent a
47
48 more comprehensive approach to characterization of clinico-pathological
49
50 features associated to MSI/MMR deficiency in gastric cancer, but also partially
51
52 reproduce what is already known for colorectal cancer, strongly relating
53
54 microsatellite unstable phenotype with pathological features classically
55
56 described as related to a more favorable clinical outcome (52-57). Moreover,
57
58 prognostic impact of MMR immunohistochemistry could be demonstrated at
59
60

1
2
3 univariate disease-specific survival analyses of primary tumor status for MLH1,
4
5 MSH6 and PMS2, with just a trend for MSH2. Our data show, in gastric
6
7 adenocarcinoma, associations between MMR status and clinico-pathological
8
9 features as well as prognosis in a similar manner as reported for tumors of other
10
11 sites, in which immunohistochemical determination of MMR protein status,
12
13 although inferential for MSI status, is a sensible and specific alternative tool for
14
15 determination of this molecular phenotype. This provide meaningful biological
16
17 information to stratify patients in groups portending tumors with different
18
19 pathological features as already demonstrated in colorectal, ovarian, urothelial,
20
21 biliary and germinative malignant neoplasms (42, 58-60).

22
23
24
25
26
27 Based on the fact that mismatch-repair activity is functionally achieved
28
29 through heterodimerization involving specific MMR enzymes in the so called
30
31 MutS α (MLH1/PMS2) and MutL α (MSH2/MSH6) complexes (61-63), we have
32
33 also explored associations between MMR protein profile and clinico-
34
35 pathological features as well as survival. The concurrent loss of expression of
36
37 MLH1 and PMS2 resumed all associations reported with clinico-pathological
38
39 features when analysis was undertaken for each isolated MMR enzyme.
40
41 Moreover, Cox multivariate survival analyses showed that concurrent loss of
42
43 MLH1 and PMS2 was a significant and independent prognostic factor for
44
45 improved survival. The concurrent loss of the pair MSH2/MSH6 was also
46
47 related to clinico-pathological features of better prognosis, but did not behaved
48
49 as an independent prognostic factor in Cox multivariate models.

50
51
52
53
54
55 Although MSI frequency in gastric cancer varies widely depending on
56
57 studied group, from 7.1% in American patients of European descent up to 76%
58
59 of intestinal phenotype gastric cancer in selected oriental populations (50, 64,
60
65), it is well known that this phenotype is characterized by scattered genomic

1
2
3 frameshift mutations at mono and/or dinucleotide repeats and results from
4
5 deficient mismatch-repair enzymatic activity. Also, it is well characterized that
6
7 increasing frequencies of microsatellite instability occur along morphological
8
9 progression through gastritis, metaplasia, dysplasia and neoplasia sequence
10
11 (66-68) as first stated by Correa (69). Although the already mentioned deficit of
12
13 MMR activity is known to result due to loss of MLH1 and/or MSH2 protein
14
15 secondary to epigenetic silencing of gene expression achieved by CpG island
16
17 methylation in the sporadic setting (34, 70-72), the prognostic implications of
18
19 deficient MMR status as determined by immunohistochemistry in gastric cancer
20
21 has not yet been addressed in a comprehensive manner as reported by our
22
23 results.
24
25
26
27
28

29
30 Although a better prognosis of microsatellite unstable phenotype in
31
32 gastric carcinomas has been reported (7, 8, 14) and reproduced at the
33
34 immunohistochemical level in the present study, thus supporting the notion of
35
36 an independent carcinogenic pathway (73), the resulting alterations in selected
37
38 molecular pathways responsible for these are just recently being characterized
39
40 (74, 75). Frameshift mutations in repeating mono and/or dinucleotide
41
42 sequences occurring in MSI phenotype were described in genes involved in
43
44 different homeostatic molecular pathways, mainly those involved in cell
45
46 proliferation/apoptosis as the inactivation of growth control imposed by
47
48 TGF β /TGF β RII pathway (8), and can explain the distinctive clinico-pathological
49
50 features and the better prognosis of our series of immunohistochemically
51
52 detected MSI gastric cancers. More recently, functional p53 activated
53
54 molecular pathways, as well as a patent immune response, were implicated as
55
56 the responsible for the improved survival seen in patients harboring MSI gastric
57
58
59
60

1
2
3 cancers in studies comparing gene expression profiles of unstable and stable
4 tumors (74).
5
6

7
8 In conclusion, in the present study, we characterized the expression
9 profile of a panel of the four main MMR enzymes in a series of gastric
10 carcinomas employing properly standardized immunohistochemical detection of
11 these antigens and identified this approach as an adequate tool to detect cases
12 presenting certain clinico-pathological features. Also, a survival benefit from
13 MMR loss of expression could be demonstrated, mainly when analysis were
14 undertaken considering simultaneous loss of MLH1 and PMS2. Taken together
15 these results validate the biological significance of *in situ* immunohistochemical
16 detection of MMR enzymes as a low cost and widespread available method to
17 identify certain features and to assess prognosis in gastric cancer.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 Conflict of interest statement - We declare that we have no conflict of interest.
35
36
37

38 **REFERENCES**

- 39
40
41 1. Jemal A, Thomas A, Murray T *et a* (2002) Cancer statistics, 2002. CA
42 Cancer J Clin. 52(1):23-47.
43 2. Crew KD, Neugut AI (2006) Epidemiology of gastric cancer. World J
44 Gastroenterol. 12(3):354-62.
45 3. Ottini L, Falchetti M, Lupi R *et al* (2006) Patterns of genomic instability in
46 gastric cancer: clinical implications and perspectives. Ann Oncol.17 Suppl
47 7:vii97-102.
48 4. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA *et al* (1993) Microsatellite instability
49 is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis
50 colorectal carcinoma syndrome. Cancer Res. 53(24):5853-5.
51 5. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in
52 cancer of the proximal colon. Science 260(5109):816-9.
53 6. Jass JR (2007) Classification of colorectal cancer based on correlation of
54 clinical, morphological and molecular features. Histopathology 50(1):113-30.
55 7. Beghelli S, de Manzoni G, Barbi S *et al* (2006) Microsatellite instability in
56 gastric cancer is associated with better prognosis in only stage II cancers.
57 Surgery 139(3):347-56.
58
59
60

- 1
- 2
- 3 8. Falchetti M, Saieva C, Lupi R *et al* (2008) Gastric cancer with high-level
- 4 microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and
- 5 long-term survival. *Hum Pathol.* 39(6):925-32.
- 6
- 7 9. Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y *et al* (1993) Genetic instability in
- 8 pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res.*
- 9 53(21):5087-9.
- 10
- 11 10. Hayden JD, Cawkwell L, Quirke P *et al* (1997) Prognostic significance of
- 12 microsatellite instability in patients with gastric carcinoma. *Eur J Cancer.*
- 13 33(14):2342-6.
- 14
- 15 11. Seruca R, Santos NR, David L *et al* (1995) Sporadic gastric carcinomas
- 16 with microsatellite instability display a particular clinicopathologic profile. *Int J*
- 17 *Cancer.* 64(1):32-6.
- 18
- 19 12. Lucci-Cordisco E, Boccuto L, Neri G *et al* (2006) The use of
- 20 microsatellite instability, immunohistochemistry and other variables in
- 21 determining the clinical significance of MLH1 and MSH2 unclassified variants in
- 22 Lynch syndrome. *Cancer Biomark.* 2(1-2):11-27.
- 23
- 24 13. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR *et al* (1998) A National Cancer
- 25 Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial
- 26 predisposition: development of international criteria for the determination of
- 27 microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58(22):5248-57.
- 28
- 29 14. Grogg KL, Lohse CM, Pankratz VS *et al* (2003) Lymphocyte-rich gastric
- 30 cancer: associations with Epstein-Barr virus, microsatellite instability, histology,
- 31 and survival. *Mod Pathol.* 16(7):641-51.
- 32
- 33 15. Chiaravalli AM, Furlan D, Facco C *et al* (2001) Immunohistochemical
- 34 pattern of hMSH2/hMLH1 in familial and sporadic colorectal, gastric,
- 35 endometrial and ovarian carcinomas with instability in microsatellite sequences.
- 36 *Virchows Arch.* 438(1):39-48.
- 37
- 38 16. Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW *et al* (2008) Interpretation of
- 39 immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a
- 40 specialized setting. *Am J Surg Pathol.* 32(8):1246-51.
- 41
- 42 17. Hansen TP, Nielsen O, Fenger C (2006) Optimization of antibodies for
- 43 detection of the mismatch repair proteins MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2
- 44 using a biotin-free visualization system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*
- 45 14(1):115-21.
- 46
- 47 18. Jacob CE, Gama-Rodrigues J, Bresciani CJ *et al* (2007) Trends in tumor
- 48 location in gastric carcinoma over a 28-year period. *Hepatogastroenterology*
- 49 54(76):1297-301.
- 50
- 51 19. Fenoglio-Preiser C, Carneiro F, Powell SM *et al* (2000). Tumours of the
- 52 Stomach. In: Hamilton LAA (ed). *Pathology and Genetics of Tumours of the*
- 53 *Digestive System.* IARC Press, Lyon, pp 37-66.
- 54
- 55 20. Lauren T (1962) The two histologic main types of gastric carcinoma. *Acta*
- 56 *Pathol Microbiol Scand.* 64:34.
- 57
- 58 21. Ming SC (1977) Gastric carcinoma. A pathobiological classification.
- 59 *Cancer* 39(6):2475-85.
- 60
22. AJCC Cancer Staging Manual. Sixth ed. Frederick L. Greene and others
- e, editor. Chicago, IL: American Joint Committee on Cancer; 2002.
23. Bormann R (1926) *Geshwulste des Magens und Duodenums* in Henke F
- (ed) *Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie,*
- Springer-Verlag, Berlin.

- 1
- 2
- 3 24. Das K, Mohd Omar MF, Ong CW et al (2008) TRARESA: a tissue
- 4 microarray-based hospital system for biomarker validation and discovery.
- 5 *Pathology* 40(5):441-9.
- 6
- 7 25. Hassan S, Ferrario C, Mamo A et al (2008) Tissue microarrays:
- 8 emerging standard for biomarker validation. *Curr Opin Biotechnol.* 19(1):19-25.
- 9
- 10 26. Cummings J, Ward TH, Greystoke A et al (2008) Biomarker method
- 11 validation in anticancer drug development. *Br J Pharmacol.* 153 (4):646-56.
- 12
- 13 27. Boone J, van Hillegersberg R, van Diest PJ et al (2008) Validation of
- 14 tissue microarray technology in squamous cell carcinoma of the esophagus.
- 15 *Virchows Arch.* 452(5):507-14.
- 16
- 17 28. Quraishi I, Rishi M, Feldman M et al (2007) Clinical validation of breast
- 18 cancer biomarkers using tissue microarray technology. *Appl Immunohistochem*
- 19 *Mol Morphol.* 15(1):45-9.
- 20
- 21 29. Jourdan F, Sebbagh N, Comperat E et al (2003) Tissue microarray
- 22 technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and
- 23 hMSH2 immunohistochemical expression. *Virchows Arch.* 443(2):115-21.
- 24
- 25 30. Kim KM, Kwon MS, Hong SJ et al (2003) Genetic classification of
- 26 intestinal-type and diffuse-type gastric cancers based on chromosomal loss and
- 27 microsatellite instability. *Virchows Arch.* 443(4):491-500.
- 28
- 29 31. Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M et al (2004) Chromosomal and
- 30 microsatellite instability in sporadic gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol.*
- 31 19(7):756-60.
- 32
- 33 32. Fang DC, Yang SM, Zhou XD et al (2001). Telomere erosion is
- 34 independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in
- 35 gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 7(4):522-6.
- 36
- 37 33. Musulen E, Moreno V, Reyes G et al (2004) Standardized approach for
- 38 microsatellite instability detection in gastric carcinomas. *Hum Pathol.* 35(3):335-
- 39 42.
- 40
- 41 34. Halling KC, Harper J, Moskaluk CA et al (1999) Origin of microsatellite
- 42 instability in gastric cancer. *Am J Pathol.* 155(1):205-11.
- 43
- 44 35. dos Santos NR, Seruca R, Constancia M et al (1996) Microsatellite
- 45 instability at multiple loci in gastric carcinoma: clinicopathologic implications and
- 46 prognosis. *Gastroenterology.* 110(1):38-44.
- 47
- 48 36. Lin JT, Wu MS, Shun CT et al (1995) Microsatellite instability in gastric
- 49 carcinoma with special references to histopathology and cancer stages. *Eur J*
- 50 *Cancer.* 31A(11):1879-82.
- 51
- 52 37. Ottini L, Palli D, Falchetti M et al (1997) Microsatellite instability in gastric
- 53 cancer is associated with tumor location and family history in a high-risk
- 54 population from Tuscany. *Cancer Res.*57(20):4523-9.
- 55
- 56 38. Wirtz HC, Muller W, Noguchi T et al (1998) Prognostic value and
- 57 clinicopathological profile of microsatellite instability in gastric cancer. *Clin*
- 58 *Cancer Res.* 4(7):1749-54.
- 59
- 60 39. Simpson AJ, Caballero OL, Pena SD (2001) Microsatellite instability as a
- tool for the classification of gastric cancer. *Trends Mol Med.* 7(2):76-80.
40. Kang YH, Bae SI, Kim WH (2002) Comprehensive analysis of promoter
- methylation and altered expression of hMLH1 in gastric cancer cell lines with
- microsatellite instability. *J Cancer Res Clin Oncol.* 128(3):119-24.
41. Fogt F, Zimmerman RL, Poremba C et al (2002) Immunohistochemical
- screening of mismatch repair genes hMLH1, hMSH2, and hMSH6 in dysplastic
- lesions of the colon. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 10(1):57-61.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
42. Valentini AM, Armentano R, Pirrelli M et al (2006) Immunohistochemical mismatch repair proteins expression in colorectal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 14(1):42-5.
43. Skarda J, Fridman E, Plevova P et al (2006) Prognostic value of hMLH1 and hMSH2 immunohistochemical expression in non-small cell lung cancer. A tissue microarray study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 150(2):255-9.
44. Kassem HS, Varley JM, Hamam SM et al (2001) Immunohistochemical analysis of expression and allelotype of mismatch repair genes (hMLH1 and hMSH2) in bladder cancer. *Br J Cancer*. 84(3):321-8.
45. Hameed F, Goldberg PA, Hall P et al (2006) Immunohistochemistry detects mismatch repair gene defects in colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 8(5):411-7.
46. Geisler JP, Geisler HE, Miller GA et al (2000) Immunohistochemical staining of the mismatch repair gene, hMSH2, and survival in patients with ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*. 21(3):237-40.
47. Truninger K, Menigatti M, Luz J et al (2005) Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 128(5):1160-71.
48. Manavis J, Gilham P, Davies R et al (2003) The immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins (MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2): practical aspects in antigen retrieval and biotin blocking protocols. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 11(1):73-7.
49. Perez RO, Jacob CE, D'Ottaviano FL et al (2004) Microsatellite instability in solitary and sporadic gastric cancer. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 59(5):279-85.
50. Theuer CP, Campbell BS, Peel DJ et al (2002) Microsatellite instability in Japanese vs European American patients with gastric cancer. *Arch Surg* 137(8):960-5.
51. de Jong AE, van Puijenbroek M, Hendriks Y et al (2004) Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10(3):972-80.
52. Lanza G, Gafa R, Santini A et al (2006) Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 24(15):2359-67.
53. Popat S, Hubner R, Houlston RS (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 23(3):609-18.
54. Benatti P, Gafa R, Barana D et al (2005) Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 11(23):8332-40.
55. Smyth EF, Sharma A, Sivarajasingham N et al (2004) Prognostic implications of hMLH1 and p53 immunohistochemical status in right-sided colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 47(12):2086-91.
56. Parc Y, Gueroult S, Mourra N et al (2004) Prognostic significance of microsatellite instability determined by immunohistochemical staining of MSH2 and MLH1 in sporadic T3N0M0 colon cancer. *Gut* 53(3):371-5.
57. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ et al (2009) CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 58(1): 90-6.

- 1
- 2
- 3
- 4 58. Rosen DG, Cai KQ, Luthra R et al (2006) Immunohistochemical staining
- 5 of hMLH1 and hMSH2 reflects microsatellite instability status in ovarian
- 6 carcinoma. *Mod Pathol* 19(11):1414-20.
- 7 59. Liengswangwong U, Karalak A, Morishita Y et al (2006)
- 8 Immunohistochemical expression of mismatch repair genes: a screening tool for
- 9 predicting mutator phenotype in liver fluke infection-associated intrahepatic
- 10 cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 12(23):3740-5.
- 11 60. Sinicrope FA, Rego RL, Foster N et al (2006) Microsatellite instability
- 12 accounts for tumor site-related differences in clinicopathologic variables and
- 13 prognosis in human colon cancers. *Am J Gastroenterol* 101(12):2818-25.
- 14 61. Jiricny J, Marra G (2003) DNA repair defects in colon cancer. *Curr Opin*
- 15 *Genet Dev* 13(1):61-9.
- 16 62. Kolodner RD, Marsischky GT (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair.
- 17 *Curr Opin Genet Dev* 9(1):89-96.
- 18 63. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E et al (2006) The added value of
- 19 PMS2 immunostaining in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal
- 20 cancer. *Fam Cancer* 5(4):353-8.
- 21 64. Choe WH, Lee SY, Lee JH et al (2005) High frequency of microsatellite
- 22 instability in intestinal-type gastric cancer in Korean patients. *Korean J Intern*
- 23 *Med* 20(2):116-22.
- 24 65. Sepulveda AR, Santos AC, Yamaoka Y et al (1999) Marked differences
- 25 in the frequency of microsatellite instability in gastric cancer from different
- 26 countries. *Am J Gastroenterol* 94(10):3034-8.
- 27 66. Liu P, Zhang XY, Shao Y et al (2005) Microsatellite instability in gastric
- 28 cancer and pre-cancerous lesions. *World J Gastroenterol* 11(31):4904-7.
- 29 67. Ling XL, Fang DC, Wang RQ et al (2004) Mitochondrial microsatellite
- 30 instability in gastric cancer and its precancerous lesions. *World J Gastroenterol*
- 31 *10(6):800-3.*
- 32 68. Leung WK, Kim JJ, Kim JG et al (2000) Microsatellite instability in gastric
- 33 intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol*
- 34 *156(2):537-43.*
- 35 69. Correa P (1982) Precursors of gastric and esophageal cancer. *Cancer*
- 36 *50 (11 Suppl):2554-65.*
- 37 70. Wu CW, Chen GD, Jiang KC et al (2001) A genome-wide study of
- 38 microsatellite instability in advanced gastric carcinoma. *Cancer* 92(1):92-101.
- 39 71. Leung SY, Yuen ST, Chung LP et al (1999) hMLH1 promoter methylation
- 40 and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-
- 41 frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 59(1):159-64.
- 42 72. Fleisher AS, Esteller M, Wang S et al (1999) Hypermethylation of the
- 43 hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability.
- 44 *Cancer Res* 59(5):1090-5.
- 45 73. Duval A, Hamelin R (2002) Mutations at coding repeat sequences in
- 46 mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target
- 47 genes for instability. *Cancer Res* 62(9):2447-54.
- 48 74. D'Errico M, de Rinaldis E, Blasi MF et al (2009) Genome-wide
- 49 expression profile of sporadic gastric cancers with microsatellite instability. *Eur*
- 50 *J Cancer* 45(3):461-9.
- 51 75. Duval A, Reperant M, Compoint A et al (2002) Target gene mutation
- 52 profile differs between gastrointestinal and endometrial tumors with mismatch
- 53 repair deficiency. *Cancer Res* 62(6):1609-12.
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

ADNEXA**Tables**

	n	% (in relation to cases with at least one negative MMR, n=45)
one negative MMR	MLH1- MSH2+ MSH6+ PMS2+	5 11.1%
	MLH1+ MSH2+ MSH6- PMS2+	6 13.3%
	MLH1+ MSH2+ MSH6+ PMS2-	4 8.9%
two negative MMR	MLH1- MSH2+ MSH6- PMS2+	1 2.2%
	MLH1- MSH2+ MSH6+ PMS2-	5 11.1%
	MLH1+ MSH2- MSH6- PMS2+	2 4.5%
	MLH1+ MSH2- MSH6+ PMS2-	1 2.2%
	MLH1+ MSH2- MSH6- PMS2-	3 6.7%
three negative MMR	MLH1- MSH2+ MSH6- PMS2-	2 4.5%
	MLH1- MSH2- MSH6+ PMS2-	2 4.5%
	MLH1- MSH2- MSH6- PMS2+	7 15.5%
four negative MMR	MLH1- MSH2- MSH6- PMS2-	7 15.5%
Specific pairs of MMR	MLH1- and PMS2-	16 35.5%
	MSH2- and MSH6-	19 42.2%
TOTAL	45	100%

Table 1. Frequencies of all possible MMR expression profiles.

	MLH1, p	MSH2, p	MSH6, p	PMS2, p
Gender	0.872	0.730	0.907	0.504
Age	0.446	0.081	0.559	0.046
Primary tumor location	0.598	0.072	0.573	0.118
Tumor size	0.154	0.223	0.185	0.185
Borrmann type	<0.001	<0.001	<0.001	0.002
WHO histological type	0.009	0.008	0.001	0.063
Lauren histological type	0.005	0.001	<0.001	0.021
Ming histological type	0.027	0.001	<0.001	0.718
Deepest infiltrative level	0.011	0.025	0.427	0.169
Inflammatory infiltrate	0.064	0.191	0.079	0.121
Desmoplastic stromal reaction	0.409	0.021	0.076	0.802
Lymphatic invasion	0.393	0.955	0.757	0.426
Vascular invasion	0.315	0.651	0.478	0.347
Perineural infiltration	0.165	0.016	0.036	0.035
Lymph node status	0.186	0.426	0.662	0.413
Pathological TNM	0.254	0.190	0.645	0.357

Table 2. Summary of associations between clinico-pathological features and MMR status when analyses were performed for each individual enzyme.

		MMR status		p
		no MMR negativity n, (%)	MLH1 and PMS2 negative n, (%)	
Gender	Male	60 (68.2%)	11 (68.8%)	0.964
	Female	28 (31.8%)	5 (13%)	
Age	(mean ± S.D.)	59.1 ± 12.1	65.7 ± 13.8	0.050
Primary tumor location	Proximal (cardia and fundus)	27 (30.7%)	3 (15.8%)	0.190
	Distal (corpus and antrum)	61 (69.3%)	16 (84.2%)	
Tumor size	< 5,5 cm	44 (50%)	3 (18.8%)	0.021
	> or = 5,5 cm	44 (50%)	13 (81.3%)	
Borrmann type	I and II	12 (13.6%)	11 (68.8%)	<0.001
	III, IV and V	76 (86.4%)	5 (31.3%)	
WHO histological type	Tubular/Tubulo-papillary adenocarcinoma	38 (43.2%)	15 (93.8%)	0.005
	Mucinous adenocarcinoma	6 (6.8%)	1 (6.3%)	
	"signet-ring" cell carcinoma	42 (47.7%)	0	
	Other	1 (1.1%)	0	
	Undifferentiated	1 (1.1%)	0	
Lauren histological type	intestinal	42 (48.3%)	15 (93.8%)	0.001
	diffuse	45 (51.7%)	1 (6.3%)	
Ming histological type	Infiltrative	75 (85.2%)	10 (62.5)	0.030
	Expansile	13 (14.8%)	6 (37.5%)	
Deepest infiltrative level	muscularis propria	31 (35.2%)	11 (68.8%)	0.041
	subserosa	56 (63.6%)	5 (31.3%)	
	adjacent structures	1 (1.1%)	0	
Inflammatory infiltrate	absent	4 (4.5%)	1 (6.3%)	0.011
	mild to moderate	69 (78.4%)	7 (43.8%)	
	accentuated	15 (17%)	8 (50%)	
Desmoplastic stromal reaction	absent to mild	37 (42%)	5 (31.3%)	0.418
	moderate to heavy	51 (58%)	11 (68.8%)	
Lymphatic invasion	not detected	44 (50%)	6 (37.5%)	0.367
	present	44 (50%)	10 (62.5%)	
Vascular invasion	not detected	69 (78.4%)	13 (81.3%)	0.798
	present	19 (21.6%)	3 (18.7%)	
Perineural infiltration	not detected	35 (39.8%)	10 (62.5%)	0.091
	present	53 (60.2%)	6 (37.5%)	
Lymph node status	no lymph node metastasis	26 (29.5%)	6 (37.5%)	0.427
	metastases in 1 to 6 (pN1)	40 (45.5%)	9 (56.3%)	
	metastases in 7 to 15 (pN2)	21 (23.9%)	1 (6.3%)	
	metastases in more than 15 (pN3)	1 (1.1%)	0	
Pathological TNM	Stage IB	26 (29.5%)	5 (31.3%)	0.411
	Stage II	37 (42%)	10 (62.5%)	
	Stage IIIA	22 (25%)	1 (6.3%)	
	Stage IIIB	2 (2.3%)	0	
	Stage IV	1 (1.1%)	0	

Table 3. Distribution of clinico-pathological features according to MLH1/PMS2 status of primary tumors.

		MMR status		
		no MMR negativity	MSH2 and MSH6 negative	
		n, (%)	n, (%)	p
Gender	Male	60 (68.2%)	13 (68.4%)	
	Female	28 (31.8%)	6 (31.6%)	0.984
Age	(mean + S.D.)	59.1 + 12.1	62.3 + 12.5	0.295
Primary tumor location	Proximal (cardia and fundus)	27 (30.7%)	4 (25%)	
	Distal (corpus and antrum)	61 (69.3%)	12 (75%)	0.648
Tumor size	< 5,5 cm	44 (50%)	5 (26.3%)	
	> or = 5,5 cm	44 (50%)	14 (73.7%)	0.060
Borrmann type	I and II	12 (13.6%)	19 (100%)	
	III, and IV	76 (86.4%)	0	<0.001
WHO histological type	Tubular/Tubulo-papillary adenocarcinoma	38 (43.2%)	19 (94.7%)	
	Mucinous adenocarcinoma	6 (6.8%)	0	
	"signet-ring" cell carcinoma	42 (47.7%)	1 (5.3%)	
	Other	1 (1.1%)	0	
	Undifferentiated	1 (1.1%)	0	0.002
Lauren histological type	intestinal	42 (48.3%)	18 (94.7%)	
	diffuse	45 (51.7%)	1 (5.3%)	<0.001
Ming histological type	Infiltrative	75 (85.2%)	8 (42.1%)	
	Expansile	13 (14.8%)	11 (57.9%)	<0.001
Deepest infiltrative level	muscularis propria	31 (35.2%)	13 (68.4%)	
	subserosa	56 (63.6%)	6 (31.6%)	
	adjacent structures	1 (1.1%)	0	0.028
Inflammatory infiltrate	absent	4 (4.5%)	0	
	mild to moderate	69 (78.4%)	10 (52.6%)	
	accentuated	15 (17%)	9 (47.4%)	0.013
Desmoplastic stromal reaction	absent to mild	37 (42%)	13 (68.4%)	
	moderate to heavy	51 (58%)	6 (31.6%)	0.037
Lymphatic invasion	not detected	44 (50%)	10 (52.6%)	
	present	44 (50%)	9 (47.4%)	0.835
Vascular invasion	not detected	69 (78.4%)	16 (84.2%)	
	present	19 (21.6%)	3 (15.8%)	0.570
Perineural infiltration	not detected	35 (39.8%)	12 (63.2%)	
	present	53 (60.2%)	7 (36.8%)	0.063
Lymph node status	no lymph node metastasis	26 (29.5%)	7 (36.8%)	
	metastases in 1 to 6 (pN1)	40 (45.5%)	11 (57.9%)	
	metastases in 7 to 15 (pN2)	21 (23.9%)	1 (5.3%)	
	metastases in more than 15 (pN3)	1 (1.1%)	0	0.305
Pathological TNM	Stage IB	26 (29.5%)	6 (31.6%)	
	Stage II	37 (42%)	12 (63.2%)	
	Stage IIIA	22 (25%)	1 (5.3%)	
	Stage IIIB	2 (2.3%)	0	
	Stage IV	1 (1.1%)	0	0.285

Table 4. Distribution of clinico-pathological features according to MSH2/MSH6 status of primary tumors.

	Log Rank chi-square	p	HR	CI 95%		p	
				Lower	Upper		
Gender	5.11	0.024	Male	1.00			
			Female	2.43	1.12	5.26	0.023
Age	0.57	0.450	< 61 y.o.	1.00			
			> or = 61 y.o.	0.778	0.43	1.41	0.408
Primary tumor location	0.12	0.728	Proximal (cardia and fundus)	1.00			
			Distal (corpus and antrum)	1.13	0.56	2.24	0.730
Tumor size	3.98	0.046	< 5,5 cm	1.00			
			> or = 5,5 cm	1.83	0.99	3.39	0.050
Borrmann type	4.75	0.029	I and II	1.00			
			III and IV	2.18	1.03	4.59	0.039
WHO histological type	8.61	0.003	Tubular/Tubulo-papillary adenocarcinoma	1.00			
			Mucinous adenocarcinoma	2.71	1.01	7.29	0.047
			"signet-ring" cell carcinoma	2.7	1.41	5.15	0.003
			Other	0	0	.	0.980
			Undifferentiated	3.26	0.43	24.46	0.250
Lauren histological type	11.62	0.003	intestinal	1.00			
			diffuse	2.41	1.32	4.39	0.004
Ming histological type	0.07	0.781	Expansile	1.00			
			Infiltrative	1.17	0.56	2.44	0.674
Deepest infiltrative level	0.01	0.925	muscularis propria	1.00			
			subserosa	0.91	0.5	1.67	0.782
Inflammatory infiltrate	4.25	0.119	adjacent structures	24559.00	2679.00	225.1	0.005
			absent	1.00			
			mild to moderate	0.578	0.22	1.5	0.261
Desmoplastic stromal reaction	0.02	0.882	accentuated	0.45	0.15	1.35	0.155
			absent to mild	1.00			
Lymphatic invasion	2.77	0.096	moderate to heavy	0.98	0.54	1.78	0.949
			not detected	1.00			
Vascular invasion	1.43	0.232	present	1.49	0.82	2.72	0.186
			not detected	1.00			
Perineural infiltration	12.62	<0.001	present	1.43	0.65	3.14	0.365
			not detected	1.00			
Lymph node status	23.25	<0.001	present	2.86	1.49	5.49	0.002
			no lymph node metastasis	1.00			
			metastases in 1 to 6 (pN1)	2.23	0.99	5.03	0.05
Pathological TNM	35.60	<0.001	metastases in 7 to 15 (pN2)	6.45	2.68	15.51	<0.001
			Stage IB	1.00			
			Stage II	2072.00	0.91	4.71	0.083
			Stage IIIA	5.09	2.14	12.08	<0.001
Stage IV	59.93	6.07	591.13	<0.001			

Table 5. Impact of clino-pathological features on survival on univariate analysis (respective Logrank and level of significance).

	Log Rank	p	HR	CI 95%		p
				Lower	Upper	
MLH1	5.46	0.019	Negative	1,00		
			Positive	2.82	1.17	6.77
MSH2	2.41	0.120	Negative	1,00		
			Positive	2.13	0.83	5.45
MSH6	6.08	0.014	Negative	1,00		
			Positive	3.54	1.24	10.04
PMS2	7.46	0.006	Negative	1,00		
			Positive	4.43	1.36	14.38
MLH1/PMS2	7.89	0.005	Negative	1,00		
			Positive	9.99	1.36	73.32
MSH2/MSH6	5.29	0.021	Negative	1,00		
			Positive	3.61	1.1	11.75

Table 6. Impact of MMR status on survival on univariate analysis (respective Logrank and level of significance).

	MLH1				MSH6				PMS2				
	Hazard ratios (HR)	95% CI		p	Hazard ratios (HR)	95% CI		p	Hazard ratios (HR)	95% CI		p	
		lower	upper			lower	upper			lower	upper		
Gender													
	Female	1.00			1.00				1.00				
	Male	2.05	0.89	4.75	0.094	2.94	1.18	7.28	0.020	2.18	0.92	5.16	0.076
Lauren histological type													
	intestinal	1.00			1.00				1.00				
	diffuse	2.13	1.06	4.26	0.034	1.74	0.86	3.53	0.123	2.22	1.12	4.39	0.022
Perineural infiltration													
	not detected	1.00			1.00				1.00				
	present	1.69	0.76	3.74	0.195	1.16	0.50	2.66	0.729	1.23	0.57	2.65	0.589
Pathological TNM													
	Stage IB	1.00			1.00				1.00				
	Stage II	1.96	0.80	4.81	0.144	2.96	1.15	7.61	0.024	2.25	0.95	5.36	0.066
	Stage IIIA	3.08	1.15	8.24	0.025	4.41	1.58	12.31	0.005	4.12	1.60	10.56	0.003
	Stage IV	35.80	3.25	393.94	0.003	50.41	4.51	563.71	0.005	49.92	4.59	542.62	0.001
MMR status of primary tumor													
	negative	1.00			1.00				1.00				
	positive	2.34	0.96	5.71	0.062	3.03	0.95	9.68	0.061	3.84	1.14	12.86	0.029

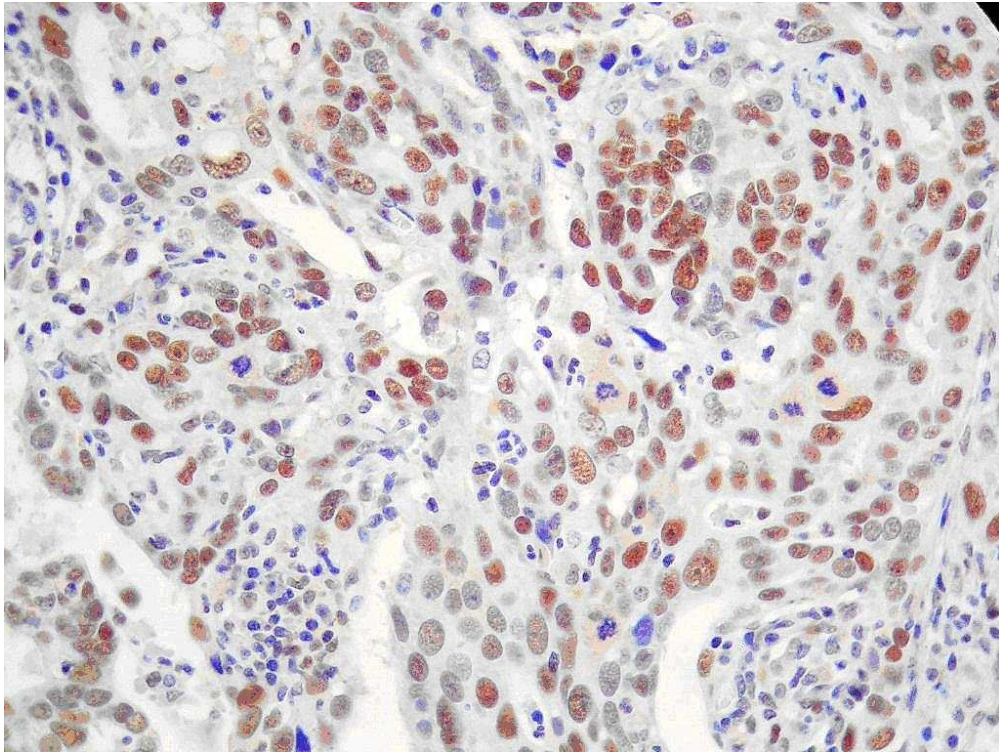
Table 7. Summary of multivariate Cox hazard proportion models including one MMR enzyme at each run with the other significant clinico-pathological features.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

	MLH1/PMS2				MSH2/MSH6				
	Hazard ratios (HR)	95% CI		p	Hazard ratios (HR)	95% CI		p	
		lower	upper			lower	upper		
Gender									
	Female	1.00			1.00				
	Male	1.94	0.85	4.44	0.117	1.94	0.86	4.35	0.108
Lauren histological type									
	intestinal	1.00			1.00				
	diffuse	1.70	0.84	3.44	0.142	1.89	0.93	3.84	0.080
Perineural infiltration									
	not detected	1.00			1.00				
	present	1.16	0.48	2.84	0.738	1.46	0.60	3.56	0.407
Pathological TNM									
	Stage IB	1.00			1.00				
	Stage II	2.59	1.00	6.76	0.051	2.39	0.93	6.12	0.070
	Stage IIIA	4.22	1.44	12.35	0.009	4.25	1.50	12.00	0.006
	Stage IV	58.56	4.79	715.35	0.001	60.74	5.04	732.48	0.001
MMR status of primary tumor									
	negative	1.00			1.00				
	positive	9.82	1.28	75.51	0.028	2.15	0.57	8.05	0.257

Table 8. Summary of multivariate Cox hazard proportion models including MLH1/PMS2 and MSH2/MSH6 pairs at each run with the most significant clinico-pathological features.

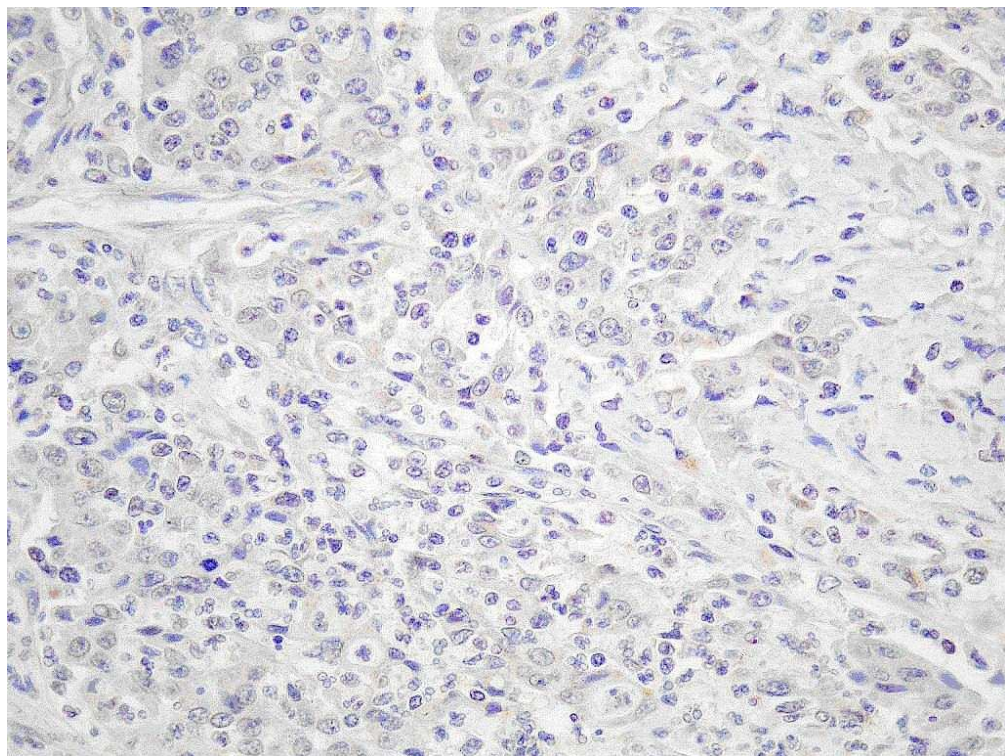
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



270x203mm (96 x 96 DPI)

Review

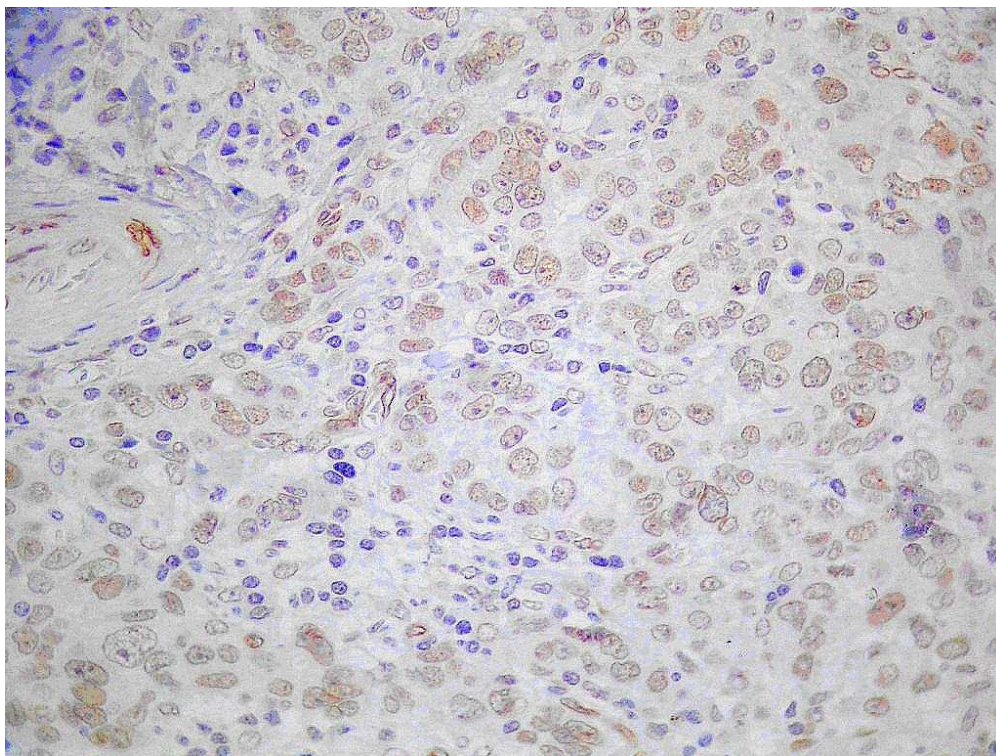
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



270x203mm (96 x 96 DPI)

Review

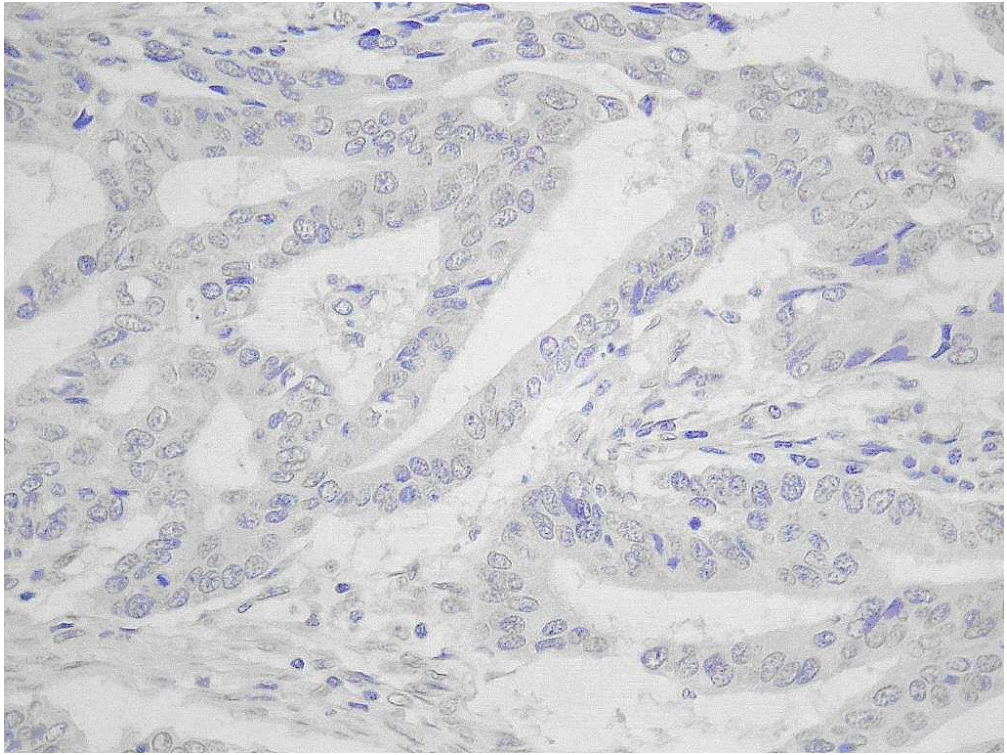
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



270x203mm (96 x 96 DPI)

review

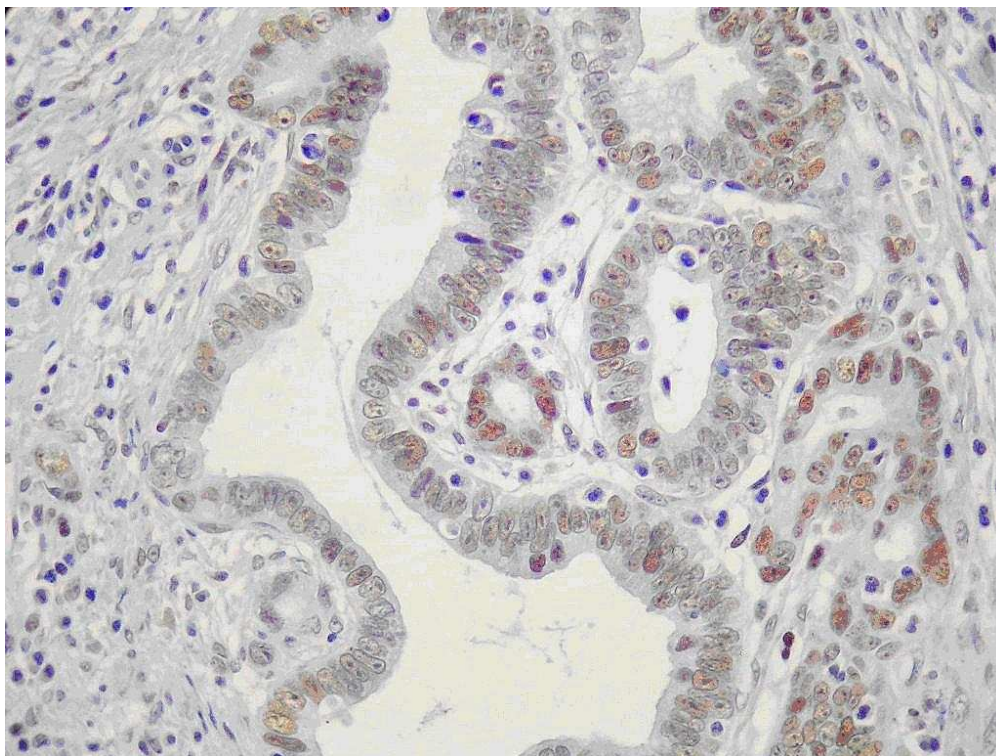
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



270x203mm (96 x 96 DPI)

review

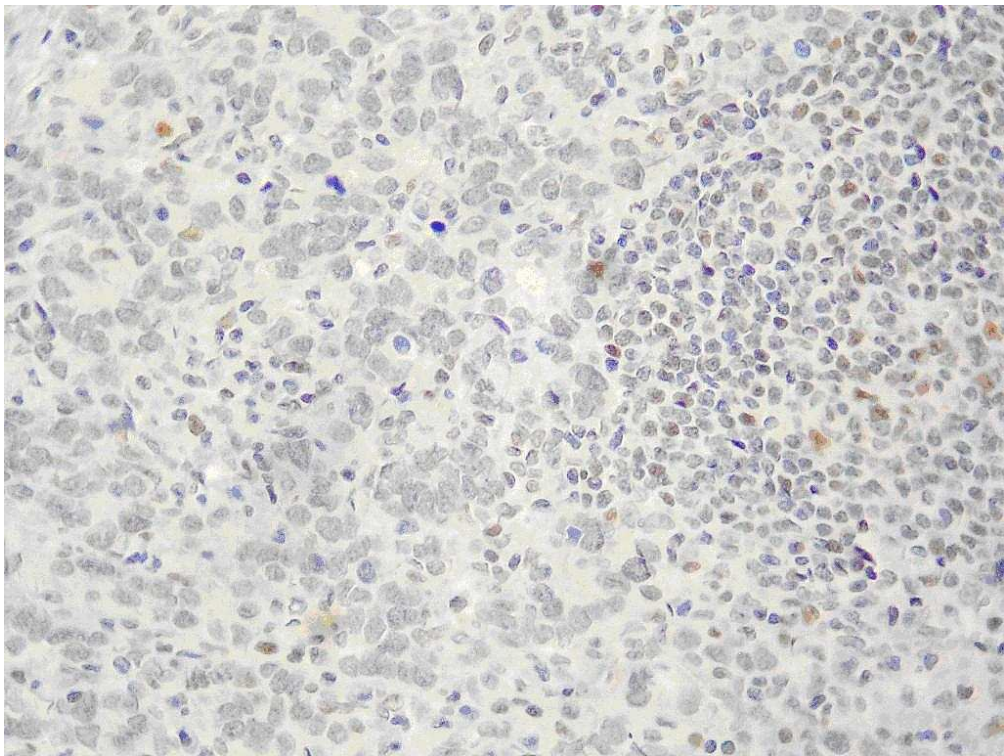
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



270x203mm (96 x 96 DPI)

review

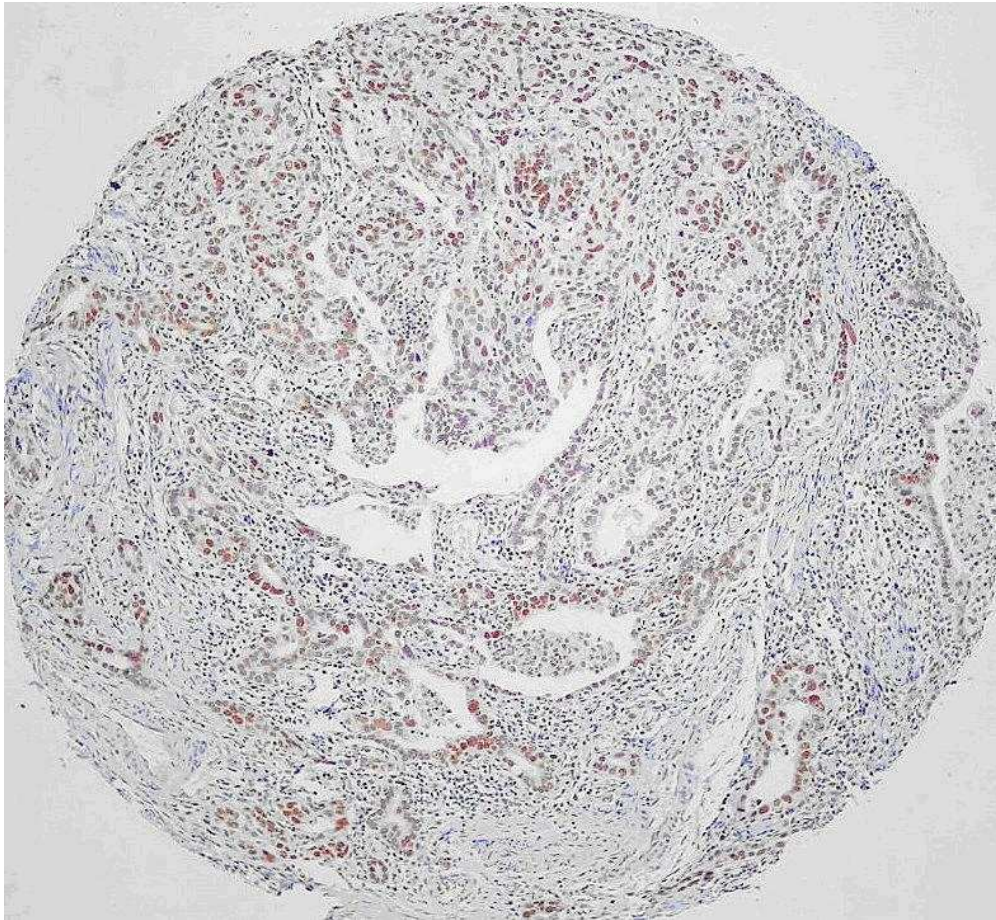
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



270x203mm (96 x 96 DPI)

review

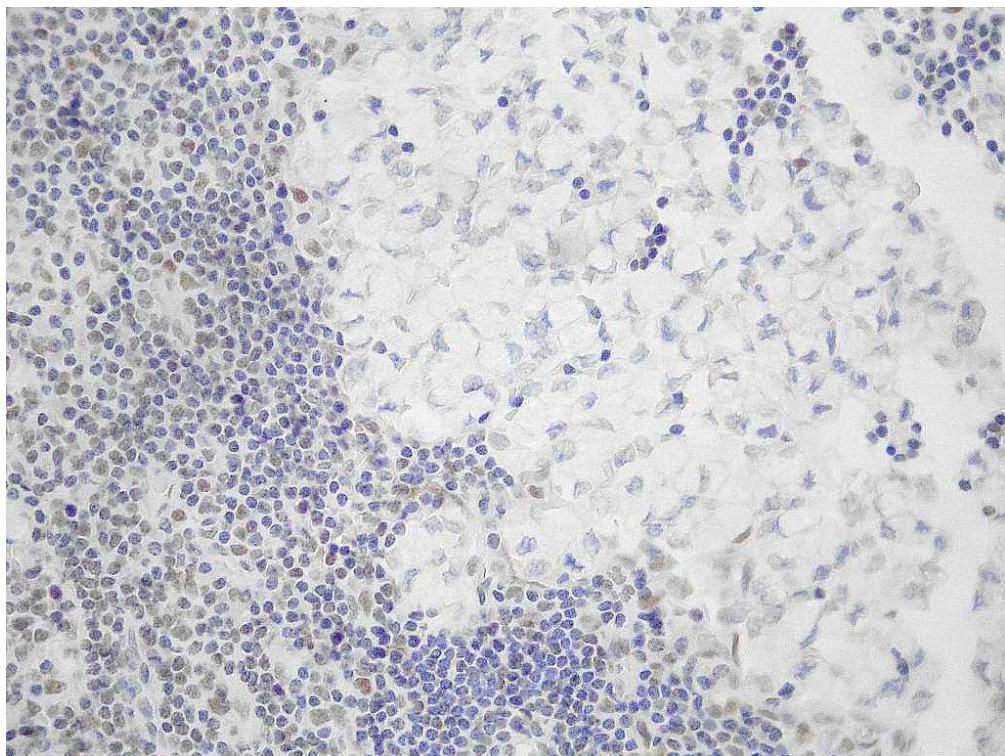
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



208x191mm (96 x 96 DPI)



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



270x203mm (96 x 96 DPI)

review

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)