



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

BRUNO JUCÁ RODRIGUES

**IMUNOEXPRESSÃO DAS CADERINAS E E N EM CARCINOMAS
GÁSTRICOS PRIMÁRIOS E RESPECTIVAS METÁSTASES
LINFONODAIS**

FORTALEZA

2014

BRUNO JUCÁ RODRIGUES

IMUNOEXPRESSÃO DAS CADERINAS E E N EM CARCINOMAS
GÁSTRICOS PRIMÁRIOS E RESPECTIVAS METÁSTASES
LINFONODAIS

Dissertação submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Patologia, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho
de Almeida (UFC)

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- R611i Rodrigues, Bruno Jucá.
 Imunoexpressão das caderinas E e N em carcinomas gástricos primários e respectivas metástases linfonodais./ Bruno Jucá Rodrigues. – 2014.
 71 f.: il. color.
- Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2014.
 Área de Concentração: Patologia.
 Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida.
1. Neoplasias Gástricas. 2. Caderinas. 3. Metástase Neoplásica. I. Título.

CDD 616.99433

BRUNO JUCÁ RODRIGUES

IMUNOEXPRESSÃO DAS CADERINAS E E N EM CARCINOMAS GÁSTRICOS
PRIMÁRIOS E RESPECTIVAS METÁSTASES LINFONODAIS

Dissertação submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Patologia, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre.

Aprovada em 15/07/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida (Orientador)
Presidente
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcelo Leite Vieira Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rosane Oliveira de Sant'Ana
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof^a. Dr^a. Margarida Maria de Lima Pompeu
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus e a minha família.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eliney Aragão Jucá Rodrigues e Edvaldo de Paiva Rodrigues, pela ajuda e incentivo para meu sucesso nos estudos e na vida e que nunca deixaram de acreditar em meu potencial em qualquer atividade que possa desempenhar.

Aos meus irmãos, Laryssa Jucá Rodrigues e Brenno Jucá Rodrigues, que sempre estiveram do meu lado e que posso contar com o amor, carinho e amizade.

Aos meus avós, Lina Aragão Jucá (*in momoriam*) e Siegbert Cruz Jucá (*in momoriam*), pelo amor que sempre me ofereceram durante minha vida e que sempre os levarei em meu coração seus ensinamentos e princípios.

A minha esposa Iorana Pessoa Bezerra Jucá, pelo companheirismo, cumplicidade, incentivo e respeito, juntamente com o fruto de nosso amor, nossa filha Liz Pessoa Bezerra Jucá, que não tenho palavras para mensurar o amor que sinto por um ser humano tão especial que mora em nossos corações.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida, pela oportunidade de me orientar e a grande satisfação de convivência durante esse período, com seus conhecimentos e entusiasmo pela pesquisa, me mostrou o fascínio do estudo da oncologia e um pouco da história da música.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Marcelo Leite Vieira Costa, Prof^ª. Dr^ª. Rosane Oliveira de Sant'Ana e a Prof^ª. Dr^ª. Margarida Maria de Lima Pompeu por terem concordado em enriquecer este trabalho com seus conhecimentos e experiências.

Aos Biólogos Alceu Machado de Sousa pela amizade, perícia e precisão na microtomia e à Susana Moreira de Souza pela competente e criteriosa execução do procedimento imunohistoquímico.

Aos servidores do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Cássia Lilian Soares de Almeida, Francisco José Oliveira de Queiroz, Francisca Maria da Conceição Pereira, Igor Chalderst Gomes da Silva, José Saliésio de Moraes Freitas, Luiz Duarte de Menezes, Maria de Fátima Maia de Andrade Lima, Mila Maria Teixeira Aragão, Paula da Paz Palácio, Rejane Mary Sousa da Silva, Sandra Glícia Queiroz e Valéria Cordeiro de Oliveira que tanto colaboraram para a concretização deste projeto.

“A dúvida é a ante-sala do conhecimento”.

Provérbio Chinês

RESUMO

As caderinas E e N, moléculas de adesão celular dependentes de cálcio, com importantes funções na formação e manutenção da arquitetura tecidual normal se encontram alteradas em vários tipos de câncer, de acordo com a literatura biomédica. O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão das duas proteínas no carcinoma gástrico e respectivas metástases linfonodais, bem como as possíveis participações na progressão tumoral. Foram utilizados 51 casos de gastrectomia por carcinoma gástrico, 35 dos quais com linfonodos disponíveis, dos Arquivos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML/UFC). Os casos foram classificados nos tipos intestinal (26) e difuso (25) de acordo com a classificação de Lauren (1965). Utilizou-se técnica de *tissue microarray* associada com imunohistoquímica com anticorpos monoclonais anti-Caderina-E e anti-Caderina-N e sistema de detecção universal estreptavidina-biotina-peroxidase. A expressão de caderina-E foi avaliada de acordo com os seguintes escores: considerada preservada quando da presença da caderina-E membranar em 50% ou mais de células tumorais, e, reduzida, quando menos de 50% destas células apresentavam imunomarcação membranar. A marcação de caderina-N foi considerada positiva pela presença de 5% ou mais de células tumorais com membrana e/ou citoplasmas corados, por esta proteína e, negativa, quando menos de 5% destas células apresentavam marcação. Foram comparadas expressão preservada e reduzida para caderina-E, positiva e negativa para caderina-N em cada histotipo de carcinoma, na sede primária, linfonodo, metaplasia intestinal e tecido normal distante do tumor. Observou-se que a caderina-E em tumores maiores que 5 centímetros apresentaram significativa redução na expressão ($p = 0,0006$). Na comparação entre carcinomas difusos em relação à mucosa normal distante do tumor a expressão da caderina-E foi significativamente reduzida ($p = 0,0209$). Foram verificadas diferenças significantes na expressão da caderina-N entre células epiteliais normais e metaplasicas, no terço basal ($p < 0,0001$) e intermediário ($p = 0,0026$). No tecido normal, na comparação entre os terços observou-se que: basal vs superficial ($p < 0,0001$) e intermediário vs superficial ($p < 0,0001$), apresentaram aumento da negatividade no decorrer da diferenciação dos terços. Na distribuição da expressão da caderina-N em células tumorais e não tumorais, ficou evidente que no tumor primário (92%), linfonodo (100%) e metaplasia intestinal (100%) a negatividade foi predominante, enquanto no tecido normal ocorreu com 74% de expressão positiva para

caderina-N. A distribuição da expressão da caderina-N em mononucleares do estroma apresentou uma positividade semelhante entre tumor primário, linfonodo e metaplasia, enquanto nos linfonodos ocorreu acentuada falta de expressão, com 92% da expressão negativa. Os dados aqui observados de caderina-E e caderina-N sugerem um papel controverso destas moléculas de adesão na progressão tumoral-linfonodal no câncer gástrico.

Palavras-chave: Câncer Gástrico. Caderina-E. Caderina-N. Progressão tumoral.

ABSTRACT

E-Cadherin and N-cadherin are calcium-dependent adhesion molecules with important roles in the shaping and maintenance of normal tissue architecture and are altered in several types of cancer, according to the biomedical literature. The aim of this study is to evaluate the expression of both proteins in gastric carcinoma and their lymph node metastases as well as their possible participation in tumor progression. Fifty-one (51) cases of gastrectomy for gastric carcinoma were used, 35 of which with available lymph nodes, obtained from the files of the Department of Pathology and Forensic Medicine, Federal University of Ceará (DPML / UFC). The cases were classified into intestinal (26) and diffuse (25) types according to Lauren's classification (1965). Data associated with tissue microarray immunohistochemistry with monoclonal antibody anti-E-cadherin and N-cadherin, anti-universal detection and streptavidin-biotin-peroxidase system were used. The expression of E-cadherin was evaluated according to the following scores (based on previous reports): preserved when presence of E-cadherin membrane was found in 50% or more of tumor cells, and decreased when less than 50% of these cells showed immunostaining. Labeling of N-cadherin was considered positive when 5% or more of tumor cells presented with membrane and / or cytoplasm stained by this protein, and negative when less than 5% of cells were marked. Expression preserved and reduced to E-cadherin, positive and negative N-cadherin for each histotype carcinoma, primary seat, lymph node, intestinal metaplasia and normal tissue distant from the tumor were compared. It was found that E-cadherin in greater than 5 centimeters tumors showed a significant reduction in the expression ($p = 0.0006$). E-cadherin was significantly reduced ($p = 0.0209$) in diffuse carcinomas compared to normal mucosa distant from the tumor. There were significant differences in the N-cadherin expression between normal and metaplastic epithelial cells in the basal third ($p < 0.0001$) and intermediate ($p = 0.0026$). In normal tissue, there was an increased negativity from basal (less differentiated) to superficial (more differentiated) epithelial levels. It was evident that in the primary tumor (92%), lymph node (100%) and intestinal metaplasia (100%) the negativity is predominant, whereas in the normal tissue the positivity of N-cadherin occurred in 74% of cases. The distribution of N-cadherin expression in mononuclear stromal cells had a similar positivity between primary tumor and lymph node metaplasia, while in lymph nodes occurred marked lacking of expression, with 92% of negative expression.

These data suggests a controversial role of E-cadherin and N-cadherin in tumor progression of gastric carcinoma.

Key words: Gastric Cancer. E-cadherin. N-cadherin. Tumor progression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Kit Arraymold®.....	31
Figura 2 - Lâminas com seus respectivos blocos doadoras.....	31
Figura 3 - Puch de biopsia de 2 mm de diâmetro (Biopsy Punch – Miltex).....	32
Figura 4 - Bloco receptor de TMA - Produto final.....	32
Figura 5 - – Imunoexpressão de caderina-E no Fígado (Controle Interno).....	36
Figura 6 - – Imunoexpressão de caderina-E na Mucosa Gástrica não tumoral (Controle Externo).....	36
Figura 7 - Imunoexpressão de caderina-N no plexo nervoso da parede esofágica (Controle Externo).....	37
Figura 8 – Imunoexpressão de caderina-N no plexo nervoso da parede esofágica (Controle Externo).....	37
Figura 9 - Imunoexpressão de caderina-N no plexo nervoso da parede esofágica (Controle Interno).....	38
Figura 10 - Expressão de caderina-E em células tumorais de carcinoma gástrico em relação ao tamanho do tumor primário.....	39
Figura 11 - Expressão da caderina-E preservada em carcinoma gástrico do tipo difuso – 200x.....	41
Figura 12 - Expressão da caderina-E reduzida em carcinoma gástrico do tipo difuso – 200x.....	41
Figura 13 - Expressão reduzida de caderina-E em metástase linfonodal de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso - 200x.....	42
Figura 14 - Expressão preservada de caderina-E em metástase linfonodal de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso – 200x.....	42
Figura 15 - Expressão da caderina-E no tumor primário e no tecido normal em pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo difuso.....	45
Figura 16 - Expressão da caderina-E preservada em metaplasia intestinal de paciente com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal – 50x.....	46

Figura 17 - Expressão da caderina-E preservada em mucosa gástrica normal – 100x.....	47
Figura 18 - Expressão da caderina-N na camada da mucosa gástrica normal e metaplasia intestinal.....	48
Figura 19 - Expressão da caderina-N nas camadas da mucosa gástrica normal – 50x.....	49
Figura 20 - Expressão da caderina-N no terço basal e médio da mucosa gástrica normal – 100x.....	49
Figura 21 - Expressão da Caderina-N em células epiteliais tumorais e não tumorais.....	51
Figura 22 - Expressão da caderina-N positiva nas células tumorais do carcinoma difuso – 200x.....	51
Figura 23 - Expressão da caderina-N positiva na mucosa normal (terço basal e intermediário) – 200x.....	52
Figura 24 - Expressão da caderina-N positiva na mucosa normal e negativa na metaplasia intestinal – 50x.....	52
Figura 25 - Expressão da caderina-N nos mononucleares em lesões e locais estudados.....	53
Figura 26 - Expressão da caderina-N positiva nos mononucleares e células tumorais do subtipo difuso – 400x.....	54
Figura 27 - Expressão da caderina-N positiva nos mononucleares do subtipo difuso – 200x.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Predisposição de síndromes hereditárias para o câncer gástrico.....	22
Tabela 2 - Expressão da caderina-E em células neoplásicas no carcinoma gástrico primário em relação com as características clinico-patológica.....	40
Tabela 3 - Expressão da caderina-E em células neoplásicas do tumor primário e metástase linfonodal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal ou difuso.....	43
Tabela 4 - Expressão de caderina-E em células neoplásicas do tumor primário e células epiteliais de metaplasia intestinal em casos de carcinoma gástrico dos tipos intestinal ou difuso.....	44
Tabela 5 - Expressão da caderina-E em células neoplásicas do tumor primário e tecido normal distante no carcinoma gástrico dos tipos intestinal ou difuso.....	44
Tabela 6 - Expressão da caderina-E em metaplasia intestinal e tecido normal distante do carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso.....	45
Tabela 7 - Expressão da caderina-E em células epiteliais normais e células epiteliais metaplásicas nas diferentes camadas da mucosa gástrica.....	46
Tabela 8 - Expressão da caderina-N em células epiteliais normais e células epiteliais metaplásicas nas diferentes camadas da mucosa gástrica.....	47
Tabela 9 - Expressão da caderina-N em células epiteliais tumorais e células epiteliais não tumorais.....	50
Tabela 10 - Expressão da caderina-N em mononucleares do estroma peritumoral, mucosa normal e metaplasia intestinal.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Polipose Adenomatosa Colônia
AGC	Anticódon (tríade de nucleotídeos complementares)
Caderina	<i>Calcium-dependent adherence protein</i>
CDH1	Gene que codifica a caderina-E
CDH4	Gene que codifica a caderina-R
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
FISH	Hibridização in situ por fluorescência
HDgc	Câncer Gástrico Difuso Hereditário
HE	Hematoxilina/Eosina
IHC	Immunohistochemistry
HDAC	Acetiltransferases e histonas deacetilases
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
p53	Proteína 53 (proteína de peso molecular = 53 kDa)
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TME	Transição mesenquimal-epitelial
TNM	Estadiamento tumoral: topografia; linfonodos; metástases
TSGs	Silenciamento transcricional de genes supressores de tumor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Adenocarcinoma gástrico.....	17
1.2 Características morfológicas.....	20
1.3 Genética do carcinoma gástrico.....	21
1.4 Caderina-E.....	23
1.5 Caderina-N.....	25
2 OBJETIVOS.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Casuística e material utilizados.....	30
3.2 Classificação histológica.....	30
3.3 <i>Tissue microarray</i>	30
3.4 Imunohistoquímica.....	32
3.5 Avaliações da imunoexpressão da caderina-E e caderina-N.....	34
3.6 Avaliação intra e inter-observadores.....	35
3.7 Análises estatística.....	35
3.8 Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa com seres humanos.....	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Controles.....	36
4.2 Imunomarcção de caderina-E e variáveis clínico-patológicas.....	39
4.3 Distribuição da expressão da caderina-E em células tumorais, metaplasicas e epiteliais normais.....	41
4.4 Distribuição da expressão da caderina-N em células epiteliais normais e metaplasicas em relação à espessura da mucosa.....	47
4.5 Distribuição da expressão da caderina-N em células tumorais e não tumorais.....	50
4.6 Distribuição da expressão da caderina-N em mononucleares do estroma tumoral.....	53
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICE.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Adenocarcinoma gástrico

O adenocarcinoma de estômago possui destaque no cenário mundial, ocupa atualmente a quarta posição na incidência das neoplasias malignas e a segunda causa de mortalidade em ambos os sexos sendo responsável por cerca de 1.000.000 de novos casos por ano e 738 000 mortes. O índice de letalidade do câncer gástrico é maior do que para outros importantes tumores sólidos, como o de cólon, mama e câncer de próstata (JEMAL *et al.*, 2011; INCA, 2014).

A incidência de câncer gástrico varia em diferentes partes do mundo com maiores taxas de incidência documentada na Ásia Oriental, Europa Oriental e América do Sul, enquanto a América do Norte e África apresentam as taxas mais baixas registradas (GOLDSTEIN *et al.*, 2004; JAMEL *et al.*, 2007; JAMEL *et al.*, 20011). Estudos recentes apontam uma relação entre as condições socioeconômicas e alguns tipos de câncer. Países com condições socioeconômicas mais favoráveis apresentam maiores incidências de câncer de mama feminina, próstata e colorectal. Em contrapartida, nos países em condições mais desfavoráveis encontram-se as maiores incidências no câncer de colo de útero, pênis, cavidade oral e estômago (KOIFMAN e KOIFMAN, 2003).

O câncer de estômago é o quinto câncer mais comum na Europa, com 159 900 novos casos e 118 200 mortes registradas em 2006 (JACKSON *et al.*, 2009). A população de Linxian, China é conhecida por ter uma das maiores taxas de câncer na região gastroesofágico no mundo (QIAO *et al.*, 2009). Na Índia, a incidência de carcinoma gástrico é maior nos estados do sul e nordeste, em Mizoram registra uma taxa ajustada por idade de 50,6 e 23,3 para homens e mulheres respectivamente (DIKSHIT *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2011). Uma avaliação recente de 556 400 mortes por câncer na Índia em 2010, baseado em uma pesquisa nacional representativa descobriram que o câncer de estômago, com uma taxa de mortalidade de 12,6% é o segundo câncer letal mais comum (DIKSHIT *et al.*, 2012).

Foram observadas variações significativas na incidência de câncer gástrico entre os diferentes grupos étnicos que vivem na mesma região; afro-americanos, hispânicos e os nativos americanos são mais afetados do que os caucasianos nos Estados Unidos. Alta frequência de câncer gástrico tem sido documentada em Maoris na Nova Zelândia (PARKIN, 2004). No entanto, a distribuição geográfica do câncer gástrico não pode ser

atribuída a diferenças racial unicamente. Por exemplo, os nativos do Japão e da China vivendo em Cingapura possuem maiores taxas do que seus compatriotas no Havaí. Além disso, pessoas que migram de áreas de alta incidência, como Japão para regiões de baixa incidência como os Estados Unidos foram encontrados para ter um risco reduzido de câncer gástrico (PARKIN, 2004; HOWE *et al.*, 2006).

As áreas geográficas com maior incidência de câncer de estômago com a morfologia de adenocarcinoma do tipo intestinal estão localizadas no Leste Asiático, Europa Oriental, América do Sul e Central, enquanto o tipo difuso tem uma distribuição geográfica mais uniforme (MUÑOZ *et al.*, 1968; MUÑOZ, 1988). Acredita-se que a queda das taxas do câncer gástrico em alguns países pode ser atribuída ao declínio na incidência do adenocarcinoma do tipo intestinal. Em contrapartida observa-se um aumento na incidência do adenocarcinoma do tipo difuso (KANEKO; YOSHIMURA, 2001).

O Brasil apresenta taxa de incidência intermediária de câncer de estômago, quando comparado com outros países, para ambos os sexos, representando o 4º em incidência entre os homens e o 6º entre as mulheres. Esperam-se 12.870 casos novos de câncer de estômago em homens e 7.520 em mulheres para o Brasil, no ano de 2014. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13,19 casos novos a cada 100 mil homens e 7,41 a cada 100 mil mulheres. Estudo recente realizado pelo INCA também apontou uma alta razão mortalidade/incidência de cerca de 0,70 (INCA, 2014). No Ceará é o segundo no sexo masculino, com estimativa de 15 a 19 casos /100.000 habitantes e o quinto no sexo feminino, com 8 a 10 casos estimados/100.000 mulheres (INCA, 2014). A subnotificação é um ponto que surge nesse universo de projeções, onde esses dados que provavelmente estão abaixo da realidade, tendo em vista mau uso ou desuso das notificações nos diversos serviços de saúde.

O câncer de estômago se refere a qualquer neoplasia maligna que surge da região que se estende entre a junção gastroesofágica e o piloro. Aproximadamente 95% dos tumores do estômago são de origem epitelial e designada como adenocarcinomas. Os tipos: adenoescamoso, escamoso e indiferenciado são considerados raros (SARBIA *et al.*, 2004).

A quimioterapia tem sido utilizada no câncer gástrico avançado, com aumento da sobrevida, tendo por referenciais a cisplatina e a fluoropirimidina (GARRIDO *et al.*, 2014). Estudo recente de revisão sistemática e metanálise com mais de >1400 pacientes

mostrou uma redução na mortalidade em mais de 40% em pacientes submetidos a quimioterapia tradicional (LACOVELLI *et al.*, 2014). Resultados semelhantes podem ser obtidos com a quimioterapia neoadjuvante em tumores gástricos avançados além de um melhor controle local da doença (KIM *et al.*, 2015). O trastuzumab (Herceptin®), um anticorpo monoclonal humanizado que se liga à região extra-celular de ERBB2 e inibe o crescimento de células com sobreexpressão desta proteína tem elevado a sobrevida em pacientes com câncer gástrico avançado (THIEL *et al.*, 2015). Estudos com outro anticorpo monoclonal, o Ramucirumab, também têm mostrado resultados promissores (THIEL *et al.*, 2015; SHITARA *et al.*, 2015).

Desde que o câncer do estômago tem um prognóstico muito pobre e a taxa de sobrevida em 5 anos é de apenas cerca de 20%, um novo olhar sobre os resultados de estudos epidemiológicos e experimentais é importante para estabelecer estratégias de prevenção primária (JEMAL *et al.*, 2011).

Embora ainda represente a segunda causa de morte por câncer no mundo em ambos os sexos, a tendência temporal mostra um declínio em vários países. Fato esse explicado pelo aumento do uso de refrigeradores para uma melhor conservação dos alimentos, o que permitiu maior disponibilidade e consumo de alimentos frescos, reduzindo com isso a necessidade do uso de sal, particularmente de alimentos que necessitem desse tipo de conservação (JAKSZYN; GONZÁLES, 2006).

Evidências reportam que frutas, legumes e verduras são fatores de proteção contra o câncer gástrico. Por outro lado, a alta ingestão de sal, por meio de adição ou de alimentos nele conservados, é provável fator de risco desse tipo de câncer (TSUGANE; SASAZUKI, 2007). Já foi reportado que a ingestão diária de 50 gramas de hortaliças (verduras e legumes) e de frutas reduz em 25% e 17%, respectivamente, o risco de desenvolvimento de câncer gástrico. A alimentação saudável pode atuar como um fator protetor, porque frutas, legumes e verduras possuem vitaminas e fitoquímicos com propriedades antioxidantes, como as vitaminas C e E, os carotenóides e os flavonóides (GONZALEZ *et al.*, 2006).

Outro determinante para essa diminuição nas taxas é a redução na prevalência de infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). É uma das infecções mais comuns e pode ser responsável por cerca de 60% dos casos de câncer gástrico no mundo. Nos países em desenvolvimento, a prevalência dessa infecção chega a 90%, sendo, em geral, adquirida na infância, persistindo ao longo da vida (FOX; WANG;

2007). Estratégias para prevenção do câncer de estômago incluem melhorias no saneamento básico e mudanças no estilo de vida da população.

1.2 Características morfológicas

Os adenocarcinomas do estômago são subdivididos pela classificação de Lauren em dois principais tipos histológicos: o tipo bem diferenciado ou *intestinal* apresenta, em nível microscópico, estruturas tubulares, por vezes com arquitetura glandular, com células coesas, e parece evoluir a partir de áreas com gastrite crônica atrófica ou metaplasia intestinal; e o tipo pouco diferenciado ou *difuso* em que a coesão celular está ausente e se manifesta com infiltração e espessamento da parede do estômago sem a formação de uma massa localizada. O tipo intestinal, mais comum em homens idosos em regiões de alto risco, e em afro-americanos, tem um prognóstico melhor. Este histotipo surge a partir de lesões pré-cancerosas, tais como atrofia gástrica e metaplasia intestinal, e é influenciada por fatores ambientais, como a infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), obesidade e fatores da dieta. O tipo difuso é mais frequente em mulheres e pacientes mais jovens, e está associada com o grupo sanguíneo A, indicando susceptibilidade genética. Os carcinomas gástricos mistos, compostos de componentes intestinal e difuso também foram identificados (LAUREN, 1965; CORREA *et al.*, 1973; KELLEY e DUGGAN, 2003; CREW e NEUGUT, 2006; CATALANO *et al.*, 2009; CORSO *et al.*, 2012; INCA, 2014).

O desenvolvimento de carcinoma gástrico invasivo envolve uma evolução gradual através de uma cascata de lesões pré-cancerosas. Alterações histopatológicas sequenciais se desenvolvem na mucosa gástrica, incluindo a gastrite atrófica, redução numérica de células parietais, metaplasia intestinal, e displasia que, eventualmente, leva ao carcinoma. A sequência metaplasia / displasia / carcinoma é mais relevante para o câncer do tipo intestinal que no difuso. (CORREA *et al.*, 2012).

Apesar do fator ambiental/ comportamental ser considerado o principal para o seu desenvolvimento, algumas evidências demonstraram a influencia de fatores hereditários no câncer gástrico. O exemplo é a câncer gástrico familiar condicionado por mutações em um gene que codifica a proteína caderina-E (*CDH1*) (BROOKS-WILSON *et al.*, 2004).

1.3 Genética do carcinoma gástrico

Os avanços dos estudos da genômica permitiram a detecção bem sucedida das alterações moleculares que ocorrem durante a transformação neoplásica da mucosa gástrica. No Japão, um estudo de ligação entre genes, identificou que o cromossomo 2q33-35 possui um *locus* com susceptibilidade potencial para câncer gástrico proximal (AOKI *et al.*, 2005). A análise do *microarray* de dados de 54 pares de câncer gástrico e tecidos adjacentes não cancerosos da mucosa gástricas identificaram expressões gênicas de diferentes graus e estádios de câncer gástrico. Sun *et al.*, analisou vários padrões de expressão de genes e suas funções exatas na carcinogênese gástrica usando técnica de *tissue microarray* de alto rendimento . Os resultados mostraram que enquanto p53 foi útil para distinguir displasia de baixo grau de displasia de alto grau, a expressão de altos níveis da ciclina E pode ser um indicador de transformação maligna de displasia. Perfis de expressão gênica, reação em cadeia da polimerase quantitativa e FISH (*in situ* hybridization) em *microarrays* revelaram que as maiorias das alterações relacionadas com o câncer gástrico precoce são retidas no câncer gástrico avançado, com as alterações de expressão de genes adicionais em AGC compatíveis com um modelo de progressão da carcinogênese gástrica. A expressão protéica de espécies cirúrgica de adenocarcinomas gástrico primário e mucosa não tumoral de doentes japoneses por eletroforese em gel, cromatografia líquida de electrospray iônico e espectrometria de massa revelaram aumento de superóxido de manganês e a proteína HMG - 1 cromossômico com diminuições em anidrase carbônica I e II , glutathione-S-transferase e precursor foveolin (gastroke-1) (FOV) , uma proteína específica do estômago, 18 kDa, com suposta atividade supressora de tumor. A análise de RT-PCR revelou também a regulação negativa significativa da expressão do RNAm de FOV no tecidos tumorais, destacando o seu potencial como um biomarcador para o diagnóstico molecular e alvo terapêutico (MILNE *et al.*, 2007).

Os carcinomas gástricos esporádicos, que representam a maioria, e os hereditários, que não ultrapassam 8 a 10% (LA VECCHIA *et al.*, 1992) são o resultado de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas (LYNCH *et al.* , 2005). Embora se desconheça a natureza e sequência exata destas alterações, foram identificadas várias anomalias afetando a estrutura e/ou expressão de um número de genes cada vez maior. Vários oncogenes ou genes supressores tumorais, inclusive de “assinatura” metastática têm sido implicados na carcinogênese gástrica. O distinto padrão de alterações genéticas nos

dois principais tipos histológicos de câncer gástrico (intestinal e difuso) apoia a hipótese da existência de duas vias genéticas distintas subjacentes a estes dois histotipos (CARNEIRO, 1997).

Alguns autores apresentaram estimativa de que 1% a 3% do total de câncer gástrico é de resultado de uma predisposição de uma síndrome hereditária como Câncer Gástrico Difuso Hereditário (HDgc) (FITZGERALD *et al.* 2010). A identificação de uma inativação de mutação germinativa no gene que codifica a caderina-E (*CDH1*) em uma família da Nova Zelândia foi o ponto de partida para entender HDgc (GUILFORD *et al.* 1998). Nas famílias HDgc, a transmissão do gene da caderina-E anormal confere uma probabilidade de 80 % em desenvolver câncer gástrico, recomendando testes genéticos, rastreamento e até gastrectomia total muitas vezes profilática para portadores dessa anomalia genética (FITZGERALD *et al.* 2010). Além do HDgc e outras síndromes hereditárias com seus respectivos genes, sua frequência populacional e risco de desenvolvimento do câncer gástrico estão mostrado na Tabela 1 (CHUN *et al.*, 2012).

Tabela 1 – Predisposição de síndromes hereditárias para o câncer gástrico

PREDISPOSIÇÃO DE SÍNDROMES HEREDITÁRIA PARA O CÂNCER GÁSTRICO			
Síndrome do Câncer	Gene	Frequência Populacional	Risco de Câncer Gástrico
Câncer Gástrico Difuso Hereditário	<i>CDH1</i>	Muito Raro	>80%
Câncer hereditário de mama / ovário	<i>BRCA 1/2</i>	1/40 a 1/400	2.6–5.5%
Síndrome de Lynch	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, Epcam</i>	1/440	6–13%
Síndrome de Li-Fraumeni	<i>p53</i>	1/5000	2.8%
Polipose Adenomatosa Familiar	<i>APC</i>	1/10.000 a 1/15.000	0.5%–2%
Polipose Juvenil	<i>SMAD4, BMPRIA</i>	1/16.000 a 1/100.000	21%
Síndrome de Peutz-Jeghers	<i>STK11</i>	1/25.000 a 1/250.000	29%

Adaptado de CHUN *et al.* 2012

Embora o papel das alterações genéticas em câncer gástrico tenha sido reconhecido, mudanças gerais no perfil epigenético com referência a metilação do DNA, metilação e acetilação das histonas só foram recentemente documentadas. Enquanto hipometilação leva à ativação de oncogenes e a instabilidade genômica, promotores de hipermetilação estão associados com o silenciamento transcricional de genes supressores de tumor (TSGs) e genes de reparação do DNA (KANWAL *et al.*, 2012). Diversos fenótipos de ilha CpG (região promotora de genes) metiladas foram identificadas no câncer gástrico, que servem como um bom indicador de prognóstico

(PARK *et al.*, 2010). Estudo feito por uma meta-análise indicou que a metilação aberrante de 77 genes no câncer gástrico, sugere um valor clínico potencial de metilação do DNA como marcador de predisposição de risco e prognóstico (SAPARI *et al.*, 2012). A hipermetilação dos promotores de genes envolvidos no controle do ciclo celular, no metabolismo dos nutrientes essenciais, e na produção de mediadores inflamatórios, tem sido descrita na infecção por *H. pylori*, bem como no câncer gástrico (ZABALETA, 2012).

1.4 Caderina-E

A família das caderinas é um dos principais marcadores de células epiteliais. Essa grande família é constituída de moléculas de ancoragem do citoesqueleto que formam complexos entre as membranas celulares, chamadas junções aderentes, funcionando como moléculas-chaves na morfogênese de vários órgãos e uma das mais importantes estruturas de adesão.

Cada caderina é uma glicoproteína transmembranar de 720 a 750 aminoácidos, e se apresenta na forma de dímero. Ela é constituída por uma região extracelular de N-terminal e por uma camada citoplasmática de C-terminal. O domínio extracelular contém sequências repetidas às quais se liga o cálcio, essencial para a função adesiva das caderinas que na sua ausência sofrem uma enorme alteração conformacional, sendo degradadas por enzimas proteolíticas (WHELOCK; JOHNSON 2003). O domínio citoplasmático associa-se ao citoesqueleto da célula, o que não acontece com outras moléculas de adesão como as selectinas, integrinas e membros da superfamília das imunoglobulinas (IG). As caderinas foram nomeadas inicialmente de acordo com o tecido que as expressaram. A caderina-E é encontrada em vários tipos de células epiteliais, a caderina-P está presente em várias células placentárias e da epiderme e a caderina-N é expressa em células nervosas e nos músculos. Todas estas são classificadas como caderinas clássicas (CABRIJAN; LIPOZENCIC, 2011). Participam de forma decisiva na embriogênese, possuem função fisiológica na manutenção da estabilidade e integridade fenotípica-funcional dos epitélios e participam do processo inflamatório e de reparo, além do seu envolvimento nos processos neoplásicos.

A caderina-E é uma molécula dependente de cálcio, de 120 kD, codificada pelo gene *CDH1* localizado no cromossomo 16q21 (DINIZ-FREITAS *et al.* 2006) e está envolvida no processo de manutenção da arquitetura tecidual tanto no adulto como no embrião e na adesão celular. Essas moléculas são compostas por três domínios: um

citoplasmático que se liga à actina do citoesqueleto por meio de interações heterotípicas com proteínas chamadas cateninas, estabelecendo o complexo citoplasmático de adesão celular importante para a formação da adesão extracelular célula-célula; um transmembrânico; e um extracelular, que se liga por meio de ligações homofílicas dependentes de cálcio, ao domínio extracelular de caderina-E de uma célula vizinha, assumindo uma conformação “Zipper-Like” (BEAVON 2000; HAJRA ; FEARON 2002).

A expressão da caderina-E é necessária para a manutenção da integridade epitelial, e estudos indicam que a perda ou a expressão reduzida dessa molécula de adesão podem permitir ou aumentar o risco da progressão tumoral, além de provocar o aumento da invasão, e o desenvolvimento de metástase (PEINADO *et al.* 2004; ALBERTS *et al.* 2004; DERYCKE; BRACKE 2004).

Estudar o papel funcional da caderina-E pode fornecer informações sobre o mecanismo biológico da progressão tumoral e também possibilitar a identificação de novos alvos moleculares na terapia contra o câncer. (CAVALLARO *et al.* 2002).

As alterações na morfogênese e arquitetura do tecido epitelial; a perda da polaridade celular e inibição por contato; o crescimento desregulado e a invasão de tecidos adjacentes; e as mudanças nas propriedades de adesão das células tumorais, estão associadas com a progressão tumoral e formação de metástases e, frequentemente, coincidem com a perda da adesão celular mediada por caderina-E (HANDSCHUH *et al.* 1999; CAVALLARO; CHRISTOFORI 2001).

A diminuição da expressão das moléculas de caderina-E é o primeiro passo do fenômeno de TEM (Transição Epitelial Mesenquimal), portanto, uma etapa crítica na progressão do câncer já que favorece a disseminação hematogênica e linfогênica das células tumorais. Estas observações levaram à denominação de supressor tumoral para a caderina-E. Assim, atribui-se que a perda da caderina-E em tumores esteja associada com prognósticos clínicos pobres (THIERY, 2002; JODELE *et al.*, 2006; BAUM; SETTLEMAN; QUINLAN, 2008; KATTO; MAHLKNECHT, 2011).

Alterações na expressão de caderina-E tem sido relatado em diversos tipos de cânceres ao longo dos anos. No câncer gástrico os primeiros relatos surgiram no início da década de 90 com SHIOZAKI e colaboradores que descreveram a expressão e imunoreatividade da caderina-E em cânceres humanos. Em seguida, outros relatos

foram surgindo, associando expressão imunohistoquímica reduzida, anormal ou ausente de caderina-E, com carcinomas gástricos denominados indiferenciados ou principalmente, *difusos* (SHIOZAKI *et al.*, 1991; OKA *et al.*, 1992; SHINO *et al.*, 1995; MACHADO *et al.*, 1998; HUIPING *et al.*, 2001). Em geral, tem se observado expressão membranar significativa de caderina-E no histotipo intestinal, enquanto os outros histotipos (difuso e misto) apresentam ausência de expressão ou imunomarcção anômala, citoplasmática ou nuclear (MACHADO *et al.*, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2010).

Em tumores de mama, alterações do padrão de expressão de caderinas e cateninas parecem ser um bom indicador prognóstico (WHEELLOCK *et al.* 2001). Em uma metanálise com carcinoma ductal invasivo de mama, a perda de expressão de caderina-E foi considerada como indicador independente de pior prognóstico, apesar da heterogeneidade de critérios adotados nos trabalhos incluídos no estudo (GOULD ROTHBERG e BRACKEN 2006). No colo uterino observa-se uma perda progressiva da expressão de caderina E durante a carcinogênese cervical, das lesões intra-epiteliais atípicas ao carcinoma invasor (CAVALCANTE *et al.*, 2014). Em câncer de esôfago, a perda de expressão de caderina-E está associada com crescimento infiltrativo, estadiamento tumoral mais avançado e maior risco de metástase linfonodal (STREIT *et al.* 1996; NATSUGOE *et al.* 2007). Em meningiomas, a expressão de caderina-E diminui com a malignidade tumoral (ZHOU *et al.* 2010). Em carcinoma de pulmão de células não pequenas, a perda deste marcador foi associada ao estadiamento avançado e envolvimento pleural visceral, além de ser fator independente para óbito (LIN *et al.* 2010). Em carcinoma escamoso oral, esta perda também esteve associada à recorrência e morte (LIU *et al.* 2010). A relação contrária também já foi demonstrada em outros estudos. A superexpressão de caderina-E mostrou associação com tumorigênese e formação de embolo tumoral em tumores de ovário e mama, respectivamente (SUNDFELDT 2003; NAORA; MONTELL 2005; KLEER *et al.* 2001). Em gliomas, a expressão de caderina-E também se correlacionou com prognóstico desfavorável (LEWIS-TUFFIN *et al.* 2010).

1.5 Caderina-N

Entre todas as caderinas a “E” e “N” são as mais amplamente distribuídas nos tecidos humanos. A caderina-N é uma proteína pró-migratória normalmente restrita aos tecidos neurais e alguns não neurais como fibroblastos, osteoblastos e ainda células endoteliais, mesoteliais e retinais. Não são expressas em células epiteliais, mas são

detectadas em certos carcinomas onde, provavelmente, estão relacionadas com a promoção da angiogênese e adesão (HELLNER *et al.*, 2009; ZHAN *et al.*, 2012).

Ao contrário da caderina-E, tida como supressora da invasão, a caderina-N é responsabilizadas por desempenhar várias funções pró-tumorais. Sabe-se que ela promove a sobrevivência celular nos melanomas e nos carcinomas de próstata, mama e cabeça- pescoço. Sua introdução nas células do carcinoma de bexiga leva a uma aumentada capacidade de invasão (THIERY, 2002; BAUM; SETTLEMAN; QUINLAN, 2008; HELLNER *et al.*, 2009; ZHAN *et al.*, 2012).

Uma característica definidora da TEM é a redução dos níveis de caderina-E e concomitante produção de caderina-N (LEE *et al.*, 2006). Acredita-se que esta alternância de expressão possa contribuir para a TEM e para a TME. Estados patológicos da TEM e da TME parecem ser resultado de reativação inapropriada de programas embrionários, gerando tecidos anormais como tumores metastáticos que se mostram refratários a mecanismos de controle.

Mesmo não sendo ainda muito claro de que forma a expressão e atividade da caderina-N se relacionam com a TEM, atribui-se que ela pode dotar-se de um fenótipo dominante incrementando a mobilidade, invasão e progressão do tumor e sua super-expressão tem sido correlacionada com o aumento da migração, invasão e evolução tumoral (BAUM; SETTLEMAN; QUINLAN, 2008).

Experimentos biofísicos têm sugerido que a interface célula-célula da caderina-N possa ser significativamente menos estável do que a equivalente na caderina-E. No entanto, os fatores que contribuem para as diferenças essenciais entre as caderinas “E” e “N” e o que as habilita a desempenhar papéis distintos no epitélio e no mesênquima não são totalmente compreendidos. Além disso, estas diferenças são provavelmente muito sutis já que há casos nos quais a própria caderina-E torna-se mediadora da migração celular (processo usualmente associado à caderina-N) e outros em que a caderina-N participa na construção epitelial (BAUM; SETTLEMAN; QUINLAN, 2008).

Pesquisas recentes têm indicado que a caderina-N é reexpressada ou aumentada em vários tumores epiteliais humanos e que os oncogenes E6 e E7 do HPV16 podem desencadear sua reexpressão em células epiteliais primárias. A manifestação aberrante desta molécula relaciona-se com mudanças morfológicas na direção de um fenótipo fibroblástico dotando as células de maior mobilidade e capacidade de invasão e

metástase. A TEM associada ao câncer geralmente envolve o assim denominado, comutador de caderina, pois, enquanto há baixa expressão de caderina-E, aumenta a expressão da caderina-N. Estas trocas reversíveis no nível de expressão das diferentes caderinas são cada vez mais utilizadas para monitorar a TEM. Assim, a mudança de caderina-E, das células epiteliais, para caderina-N, encontrada tanto nas células mesenquimais como nos fibroblastos, células do câncer e tecido neural, tem sido frequentemente utilizada para acompanhar o progresso da TEM no desenvolvimento do embrião e na progressão do câncer (CHO *et al.*, 2008; HELLNER *et al.*, 2009; ZEISBERG; NEILSON, 2009).

Enquanto muito permanece a ser descoberto sobre os aspectos molecular, celular e mecânico das transições entre os estados, epitelial e mesenquimal, esforços continuados nesta área podem vir a elucidar maneiras através das quais este ciclo de eventos patológicos possa ser utilizado como base para a elaboração de uma futura estratégia terapêutica (BAUM; SETTLEMAN; QUINLAN, 2008).

A caderina-N foi identificada pela primeira vez nos cérebros de embriões de ratos, e depois em tecidos nervosos, da retina e do músculo cardíaco (HATTA *et al.*, 1985; NOLLET *et al.*, 2000) . Sua superexpressão tem sido observada em vários carcinomas. A alta expressão da caderina-N no carcinoma de mama induz invasão e metástase (HAZAN *et al.*, 2000; HULIT *et al.*, 2007) , enquanto reduzida inibe o crescimento de células tumorais, migração e invasão, resultando em um melhor prognóstico no modelo de adenocarcinoma pancreático ductal de rato (SU *et al.*, 2012) . Expressão de caderina-N também está relacionada com a metástase de câncer de próstata e aumentada em pacientes com metástases de tumores resistentes à castração (JENNBACHEN *et al.*, 2010). A expressão aberrante de caderina-N, fato este explicado e correlacionado com alteração morfológica em direção a um fenótipo fibroblástico, com células tornando-se mais móveis, invasivo, e metastáticas (HAZAN *et al.*, 2000; RIEGER-CHRIST *et al.*, 2004).

No entanto, em alguns tipos de tumores invasivos, verificou-se uma regulação negativa de caderina-N, evidenciando-se como um supressor tumoral (DARAI *et al.*, 1997; KASHIMA *et al.*, 1999). Em carcinoma hepatocelulares, poucos estudos sobre a expressão de caderina-N indicaram resultados conflitantes. A partir de um estudo utilizando imunohistoquímica (IHQ), Cho informou que descontínua coloração de caderina-N foi significativamente mais frequente em tecidos de carcinoma

hepatocelular, que no tecido circundante, e essa descontínua coloração de caderina-N foi correlacionada com o estágio da doença avançada e previu um alto risco de recorrência após a ressecção da mesma (CHO *et al.*, 2008). Outro estudo baseando-se também em IHQ indicou que a caderina-N foi superexpressa em tecidos de carcinoma hepatocelular comparado aos correspondentes tecidos do fígado adjacente, e essa superexpressão da caderina-N foi intimamente relacionada com as recorrências pós-operatórias de carcinoma hepatocelular (SEO *et al.*, 2008). Estes resultados conflitantes podem ser decorrentes de limitações metodológicas da IHQ e a falta de novas evidências experimentais nos estudos. No entanto, há muitas controvérsias sobre a expressão de ambas caderinas e sobre a função das mesmas no desenvolvimento do câncer de estômago e de outros órgãos. Há poucos relatos sobre a avaliação da expressão destas moléculas de adesão em carcinomas gástricos primários (KAMIKIHARA *et al.*, 2012). Além disso, não foram encontrados relatos, neste levantamento, sobre a expressão das duas moléculas de adesão em metástases linfonodais de carcinomas gástricos e sobre correlações clinico-patológicas com a imunoexpressão das mesmas. Essas observações motivaram a realização deste estudo.

2 OBJETIVOS

Geral

Avaliação da imunoexpressão das caderinas “E” e “N” em carcinomas gástricos primários e respectivas metástases linfonodais.

Específicos

1. Determinar a frequência e imunoexpressão da caderina-E em carcinomas gástricos primários;
2. Determinar a frequência e imunoexpressão da caderina-N em carcinomas gástricos primários;
3. Avaliar as possíveis associações de alterações entre a imunoexpressão das caderinas “E” e “N” em cada histotipo de carcinoma gástrico e na mucosa normal do estômago.
4. Avaliar as possíveis associações de alterações entre a imunoexpressão das caderinas “E” e “N” em relação a variáveis clínico-patológicas;
5. Avaliar a imunoexpressão das caderinas “E” e “N” nas respectivas metástases linfonodais;
6. Averiguar a expressão de Caderinas-E nas células epiteliais normais, metaplásicas e tumorais;
7. Averiguar a expressão de Caderinas-N nas células epiteliais normais, metaplásicas e tumorais;
8. Averiguar a expressão de Caderina-N nos mononucleares do estroma normal e tumoral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística e materiais utilizados

Este estudo, de caráter observacional, retrospectivo e transversal se desenvolveu a partir de peças de gastrectomia provenientes dos Arquivos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML/UFC) no período de 2011-2013. Da amostra inicial, foram excluídos todos os casos com extensas áreas hemorrágicas e de necrose ou fixadas inadequadamente permanecendo no final um total de 51 casos, os quais após fixação em formalina a 10% foram submetidos à realização de *tissue microarray*. Foram descartadas as amostras com menos de 100 células, bem como casos externos, provenientes de outros hospitais. O número final de casos e o resumo dos dados clínicos estão apresentados no quadro geral de dados brutos, em anexo.

Após revisão das lâminas, foi efetuada a separação dos blocos parafinados correspondentes, objetivando marcação do tumor primário, bem como seus respectivos linfonodos. Em seguida a microtomia habitual, cortes ao micrótomo (Leica Microsystems), com secções de 3 µm de espessura colocadas em lâminas silanizadas (Dako, S3003, Glostrup-Denmark), para serem submetidas ao procedimento imunohistoquímico. Também foram corados pela HE, classificados os tipos de carcinomas gástricos e pesquisado a invasão linfática e venosa.

3.2 Classificação histológica

Os casos foram classificados nos dois principais tipos histológicos de carcinoma gástrico, intestinal e difuso, segundo Lauren (LAUREN, 1965).

3.3 *Tissue microarray*

A construção do bloco de *Tissue microarray* (TMA) seguiu a técnica modificada preconizada por Kononen e colaboradores (1998) que utiliza um dispositivo de base fixa, com o uso de agulhas de 2 mm de diâmetro a partir de um kit comercial - Arraymold®. Foram confeccionados blocos com 18 amostras duplas de cada caso conforme a marcação em lâmina histológica do tumor primário de cada bloco doador, totalizando 36 cilindros no bloco receptor, com espaçamentos de 2,2 mm entre os centros dos cilindros.

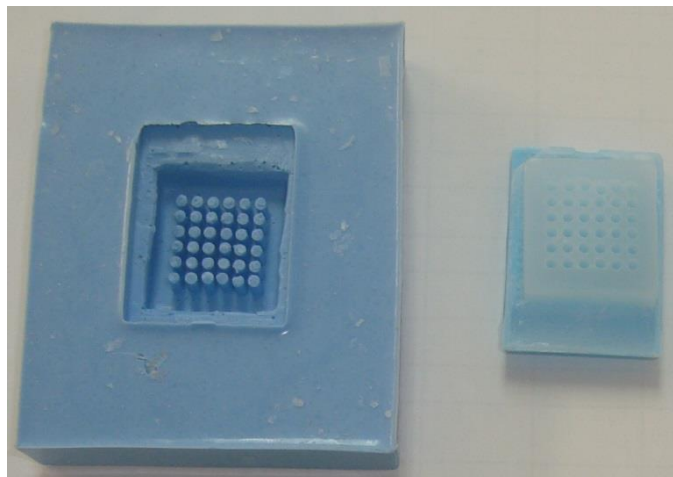


Figura 1 - Kit Arraymold®

Em seguida, foi selecionada e delimitada nas lâminas, com caneta permanente, a área representativa de cada caso para posterior marcação dos “blocos doadores”.

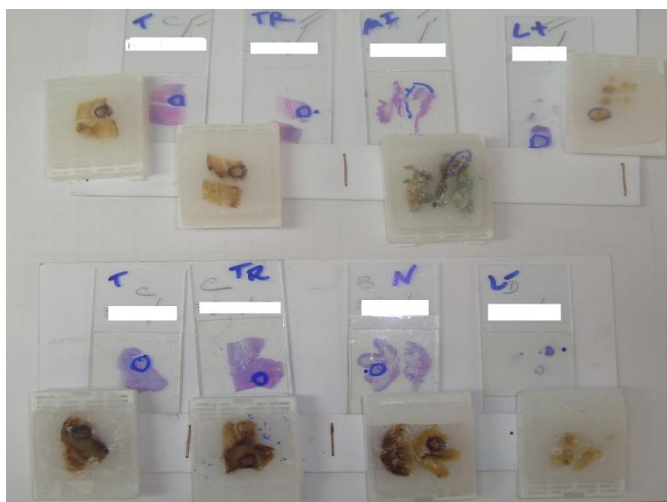


Figura 2 - Lâminas com seus respectivos blocos doadoras

O próximo passo foi a retirada de amostras tissulares parafinadas do “bloco doador” com a utilização de um *punch* de biopsia de 2 mm de diâmetro (*Biopsy Punch - Miltex*), o qual foi inserido de forma perpendicular ao “bloco doador” na área previamente selecionada. A profundidade da perfuração foi controlada pela régua milimetrada e mantida constante para todos os cilindros. Em seguida, o cilindro foi retirado da agulha com um bastão apropriado e encaixado no bloco receptor utilizando-se uma pinça. Após colocação de todos os cilindros, o “bloco receptor” foi recoberto com parafina quente (62°C) para melhor fixação dos cilindros ao bloco.



Figura 3 - *Punch* de biopsia de 2 mm de diâmetro (*Biopsy Punch – Miltex*)

Em um dos vértices do array, colocou-se secção histológica de fígado como referencial para a leitura dos casos e no vértice diametralmente oposto, foi inserido tecido nervoso com a mesma finalidade. Portanto, cada *array* contém 36 cilindros, sendo 17 representando o tumor primário em duplicata, dois tecidos diferentes como controles positivos para os anticorpos a serem testados, sendo um deste como marcador do início de leitura da lâmina.

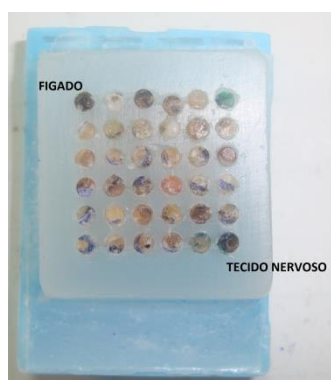


Figura 4 - Bloco receptor de TMA - Produto final

3.4 Imunohistoquímica

Após microtomia as lâminas histológicas obtidas foram levadas para uma estufa a 60°C por uma hora, com objetivo de eliminar o excesso de parafina.

Ao mesmo tempo iniciou-se o preparo do módulo de pré-tratamento *Dako PT Link*, (sistema de banho-maria fechado, com temperatura monitorizada e controlada por computador) utilizando-se solução tampão. Seu tanque foi preenchido com 1500 ml da solução tampão resultante da adição de 30 ml do tampão *Envision Flex Target Retrieval*

Solution - pH=9 (referencia K8000 – *Dako*) a 1470 ml de água destilada. O módulo foi pré-aquecido a 65°C para receber as lâminas.

Ao serem retiradas da estufa, as lâminas foram colocadas no módulo preparado e programado para estabilizar a temperatura em 97°C. Após 30 minutos, a temperatura declinou, de forma programada, até 65°C, realizando-se assim através do calor e da solução tampão, a quebra das ligações induzidas pela formalina recuperando-se, assim, os epítomos antigênicos e ao mesmo tempo realizando-se a reidratação dos cortes histológicos. Todo o material foi retirado dos tanques para lavagem por 3 minutos com a solução *Wash Buffer Envision Flex* – pH=6 – *Dako*.

Em seguida, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com o peróxido de hidrogênio a 5% durante 10 minutos, com finalidade de evitar a coloração de fundo (*background*). Depois, efetuou-se nova lavagem por 3 minutos. Neste momento, os cortes foram circundados com caneta hidrofóbica para receberem o anticorpo primário (*Monoclonal Mouse Anti-Human E-cadherin* – *Clone NCH-38* e *Monoclonal Mouse Anti-Human N-cadherin* – *Clone 6G11*). Efetuada a aplicação do anticorpo primário, lâmina por lâmina, todo o conjunto permaneceu em incubação por aproximadamente 45 minutos para favorecer a ligação do anticorpo com o antígeno.

Ao serem retiradas, duas lavagens foram realizadas com a solução *Wash Buffer Envision Flex* ; uma depois de 5 minutos e, outra, após mais 3 minutos.

Seguiu-se a incubação com o Linker (*EnVision Flex+, Mouse*) durante 15 minutos (para promover a amplificação da ligação do antígeno com o polímero na etapa a seguir). Depois, foram efetuadas duas lavagens com o tampão *Wash Buffer Envision Flex* a intervalos de 5 minutos.

Procedeu-se, em seguida, à incubação com o polímero *Dako EnVision* durante 40 minutos. Repetidas duas passagens na solução de lavagem, a intervalos de 5 minutos.

Na sequencia, efetuou-se a incubação do cromógeno *Dako DAB* por 10 minutos para, depois, realizar lavagem das lâminas em água corrente. Em seguida, foi feita a contracoloração com a hematoxilina (*EnVision Flex Hematoxylin*). Depois, realizado novo banho com água corrente para retirada de excesso do corante.

Nesta fase, foram executadas três passagens em álcool absoluto e três no xilol para obtenção de desidratação e diafanização. Finalmente foi realizada a montagem das

lamínulas utilizando-se o Bálsamo do Canadá deixando as lâminas prontas para posterior observação em microscópio óptico.

Todas as sessões do procedimento imunohistoquímico, possuíram controles internos e externos, sendo os controles internos a inclusão nas extremidades de cada TMN um tecido positivo para caderina-E (fígado) e para caderina-N (plexo nervoso de parede esofágica). Para o controle positivo externo, o tecido utilizado foi mucosa gástrica não tumoral para caderina-E, e plexo nervoso para caderina-N, utilizados previamente por outros autores (KAMIKIHARA *et al.*, 2012). O controle negativo da reação, com o mesmo material, foi obtido através da não aplicação do anticorpo primário na lâmina (XIANGMING *et al.*, 1999; ROSIVATZ *et al.*, 2004).

A imunohistoquímica realizada para detecção de macrófagos foi realizada em outro processo, seguindo os mesmos princípios dos anticorpos primários anteriormente citados. Os blocos foram submetidos à microtomia, em cortes de espessuras de 3 micrômetros em lâminas silanizadas. Em seguida, permaneceram em estufa a 60°C por 1 hora. As lâminas contendo os cortes histológicos foram incubadas no módulo de pré-tratamento *Dako PT Link*, sofrendo a variação de temperatura programada, em seguida foi lavada com solução *Wash Buffer Envision Flex – pH=6 – Dako* por 3 minutos, após ocorreu o bloqueio da peroxidase endógena com o peróxido de hidrogênio a 5% durante 10 minutos, logo ocorreu nova lavagem por 3 minutos. Neste momento, os cortes foram circundados com caneta hidrofóbica para receberem o anticorpo primário.

As lâminas foram incubadas, por 45 minutos, com o anticorpo primário (CD 68, clone KP1 - Dako™), diluído em um título de 1:100. Após a conclusão do processo, as lâminas foram desidratadas em etanol absoluto por três banhos de 30 segundos cada e, em seguida, três banhos de xilol por 30 segundos. Posteriormente, a montagem da lamínula foi feita com Bálsamo do Canadá. Estando pronta às lâminas para observação em microscópio óptico.

3.5 Avaliações da imunoexpressão da caderina-E e caderina-N

A imunomarcagem foi considerada preservada quando da presença da caderina-E membranar em 50% ou mais de células tumorais, e, reduzida, quando menos de 50% destas células apresentavam imunomarcagem membranar. A marcação de caderina-N foi considerada positiva pela presença de 5% ou mais de células tumorais com membrana e/ou citoplasmas corados, por esta proteína e, negativa, quando menos de 5% destas

células apresentavam marcação, baseado nos critérios de Kamikihara *et al.*, 2012. Estes mesmos critérios foram utilizados para avaliação de caderina-N nas células mononucleares do estroma.

3.6 Avaliação intra e inter-observadores

As preparações histológicas da caderina-E e caderina-N deste estudo foram analisadas pelo autor e por um patologista em microscópio Olympus BX41®.

3.7 Análises estatísticas

O aplicativo *GraphPad Prism 5* foi utilizado para os testes estatísticos e na elaboração dos gráficos. O teste exato de Fisher propiciou os cálculos para as tabelas de contingências e o valor de $p < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo.

3.8 Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa com seres humanos

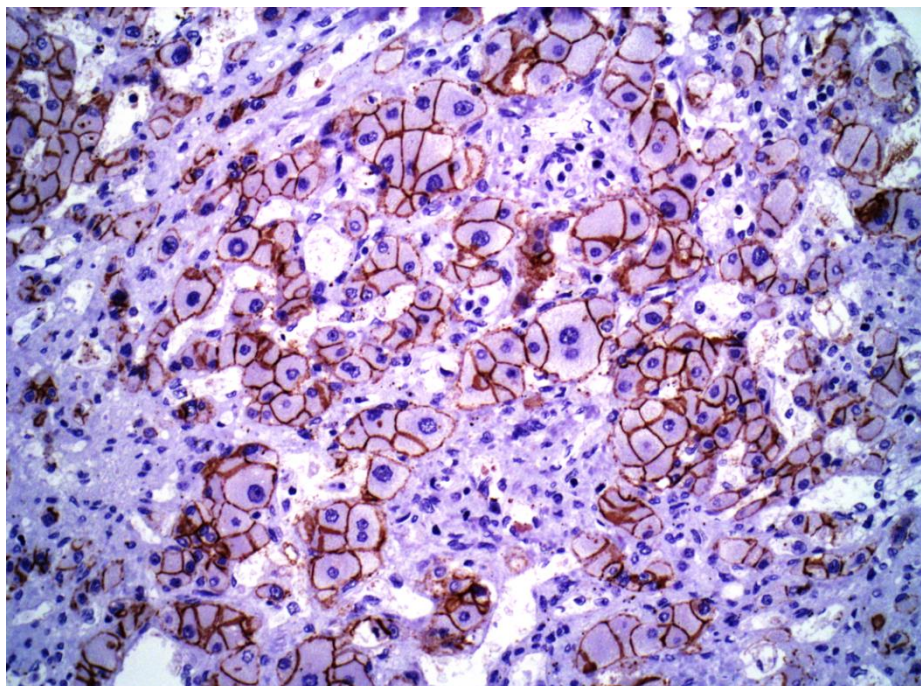
Este projeto foi submetido à Plataforma Brasil – UFC/PROPESQ - sob o número de protocolo 025631/2013, tendo obtido aprovação sob o número CAAE: 14173713.1.0000.5054.

4 RESULTADOS

4.1 Controles

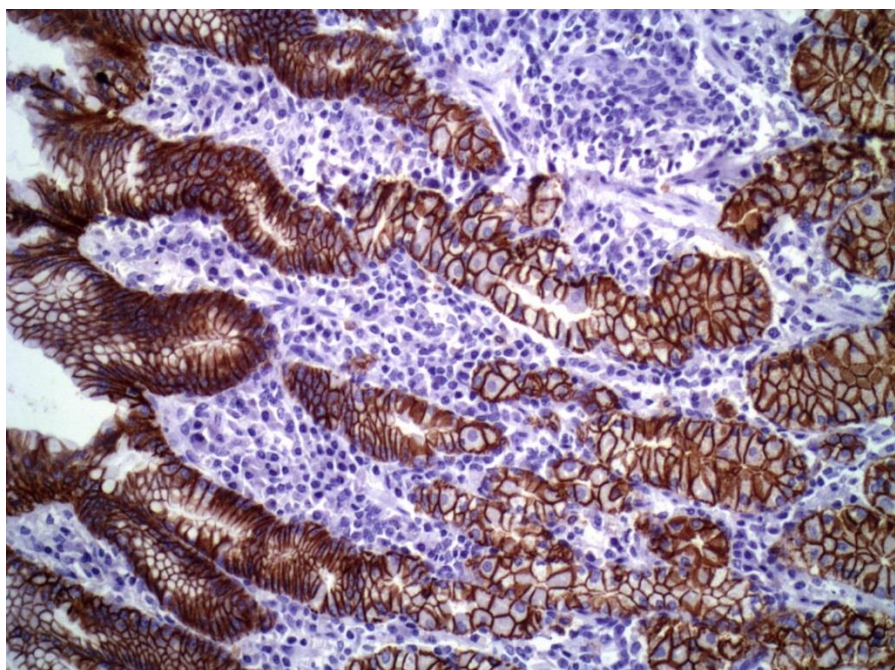
Para facilitar a avaliação dos resultados da amostra, inicialmente são apresentados, nas figuras seguintes, os controles positivo e negativo da reação:

Figura 5 – Imunoexpressão de Caderina-E no fígado (controle interno)



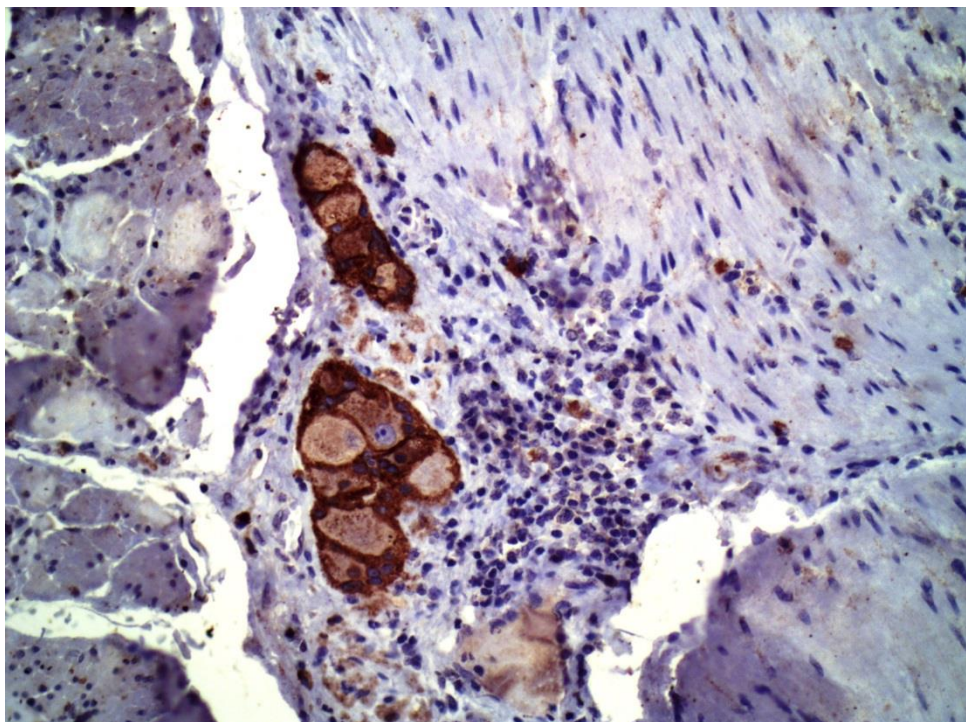
Controle positivo (presença de expressão membranar) – 200X

Figura 6 – Imunoexpressão de Caderina-E na mucosa gástrica não tumoral (controle externo)



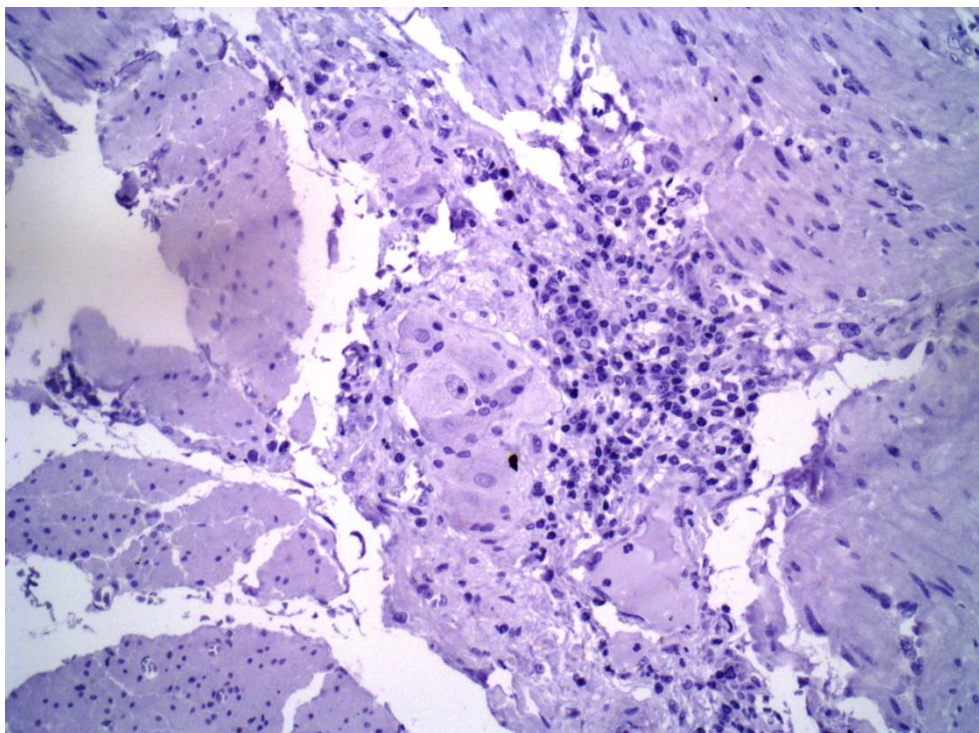
Controle positivo (presença de expressão membranar) – 200X

Figura 7 – Imunoexpressão de Caderina-N no plexo nervoso da parede esofágica (controle externo)



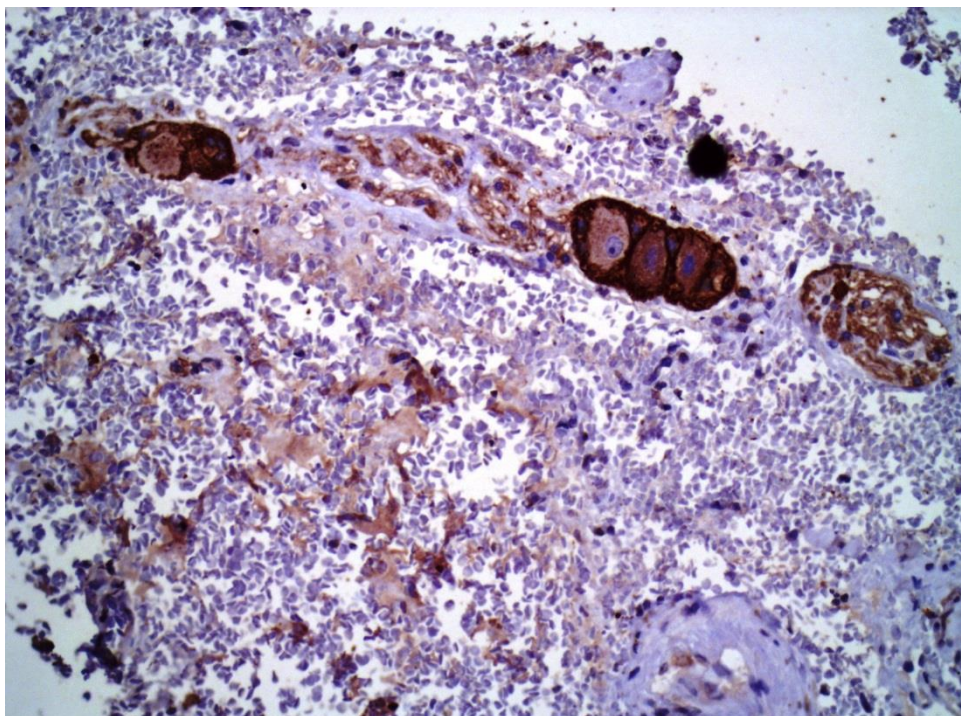
Controle positivo (presença de expressão membranar e citoplasmática) – 200X

Figura 8 – Imunoexpressão de Caderina-N no plexo nervoso da parede esofágica (controle externo)



Controle negativo (ausência de expressão membranar e citoplasmática) – 200X

Figura 9 – Imunoexpressão de Caderina-N no plexo nervoso da parede esofágica (controle interno)



Controle positivo (presença de expressão membranar e citoplasmática) – 200X

4.2 Imunomarcacão de Caderina-E e variáveis clínico-patológicas

A tabela 2 mostra a expressão de caderina-E em células neoplásicas no tumor primário, e as variáveis clínico-patológicas de sexo, idade, localização anatômica, dimensão do tumor, invasão angiolinfática, infiltração perineural e TNM (T e N) no câncer gástrico dos tipos difuso e intestinal. Pode-se observar o predomínio de pacientes do sexo masculino, com faixa etária acima de 50 anos de idade, com lesões predominantes no antro ou corpo gástricos e tumores que, em sua maioria, se encontravam em estagio mais avançados. Invasão angiolinfática e infiltração perineural estiveram presentes na maioria das amostras. Não houve correlação entre as variáveis clínico-patológicas e a expressão de caderina-E, exceto no tamanho do tumor.

Tumores com diâmetro maior que 5 centímetros apresentaram significativa redução na expressão da caderina-E em relação aos tumores menores ($p = 0,0006$). Esta relação inversa entre o tamanho do tumor e a expressão de caderina-E está ilustrada na figura seguinte.

Figura 10 – Expressão de caderina-E em células tumorais de carcinoma gástrico em relação ao tamanho do tumor primário

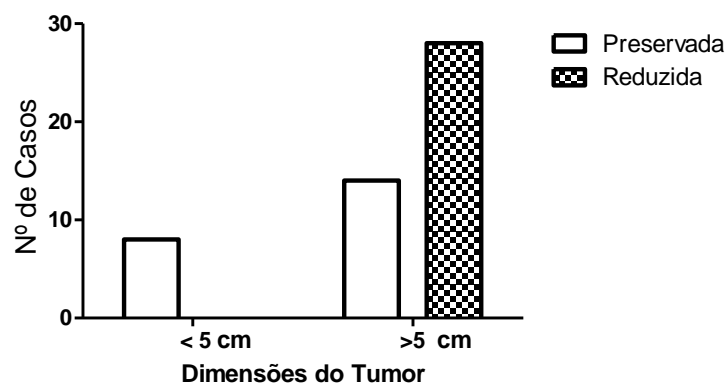


Tabela 2 – Expressão da caderina-E em células neoplásicas no carcinoma gástrico primário em relação com as características clínico-patológicas

Variáveis clínico-patológicas	Expressão de caderina-E - Tumor Primário				
	n	Preservada	Reduzida	#	P
Tipo histológico (Lauren)					<i>0,1137</i>
Intestinal	26	21	4	1	
Difuso	25	15	10	0	
Sexo					<i>0,3533</i>
Masculino	30	20	10	0	
Feminino	21	16	4	1	
Idade					<i>1,000</i>
< 50	9	6	3	0	
≥ 50	42	28	13	1	
Localização anatômica					<i>0,6155</i>
Cárdia	1	1	0	0	
Fundo	0	0	0	0	
Corpo	31	20	11	0	
Antro	15	11	3	1	
Corpo + Antro	1	1	0	0	
#	3	2	1	0	
Dimensão do tumor					<i>0,0006*</i>
< 5	8	8	0	0	
≥ 5	43	14	28	1	
Invasão angiolinfática					<i>0,2130</i>
Ausente	22	13	8	1	
Presente	29	23	6	0	
#	0	0	0	0	
Invasão perineural					<i>1,0000</i>
Ausente	20	14	5	1	
Presente	15	9	6	0	
#	16	12	4	0	
Grau de invasão					<i>0,6546</i>
T1	6	4	1	1	
T2-T4	49	32	17	0	
Metástases linfonodais					<i>0,7214</i>
N0	13	8	4	1	
N1-N3	37	27	10	0	
#	1	1	0	0	
Total	51				

p = Teste exato de Fisher. # Não avaliáveis. * $p < 0,05$

4.3 Distribuição da expressão da caderina-E em células tumorais, metaplasicas e epiteliais normais

Quando se compara a expressão de caderina-E, nas células tumorais, levando-se em conta o tipo histológico do tumor, observou-se que no tipo difuso houve uma redução de caderina-E ($10/25 = 40\%$), em relação ao do tipo intestinal ($4/26 = 15\%$), no entanto essa diferença não foi significativa ($p = 0,1137$) (Tabela 2).

Figura 11 - Expressão da caderina-E preservada em carcinoma gástrico do tipo difuso – 200x

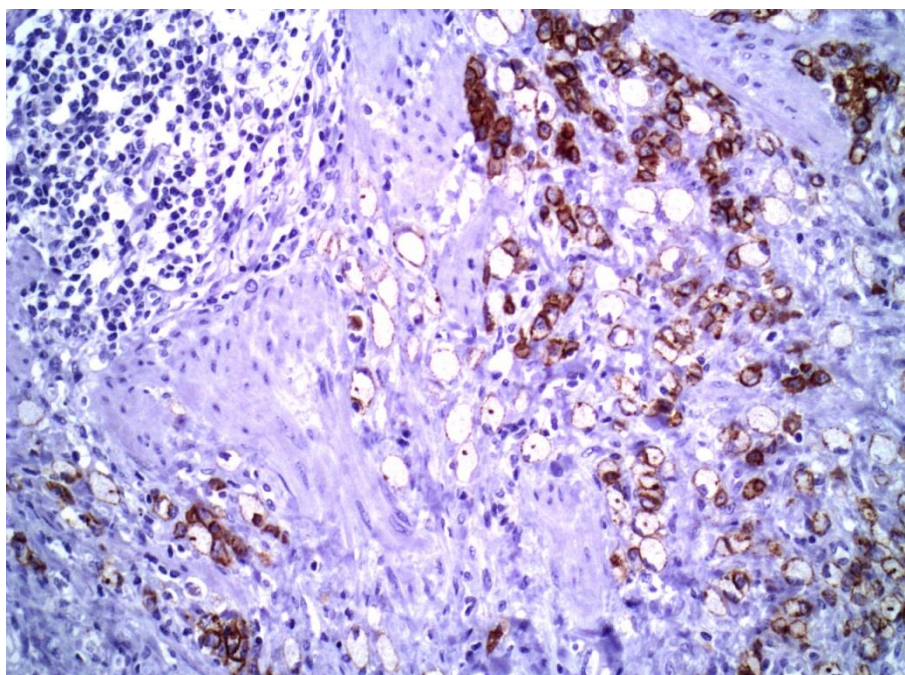
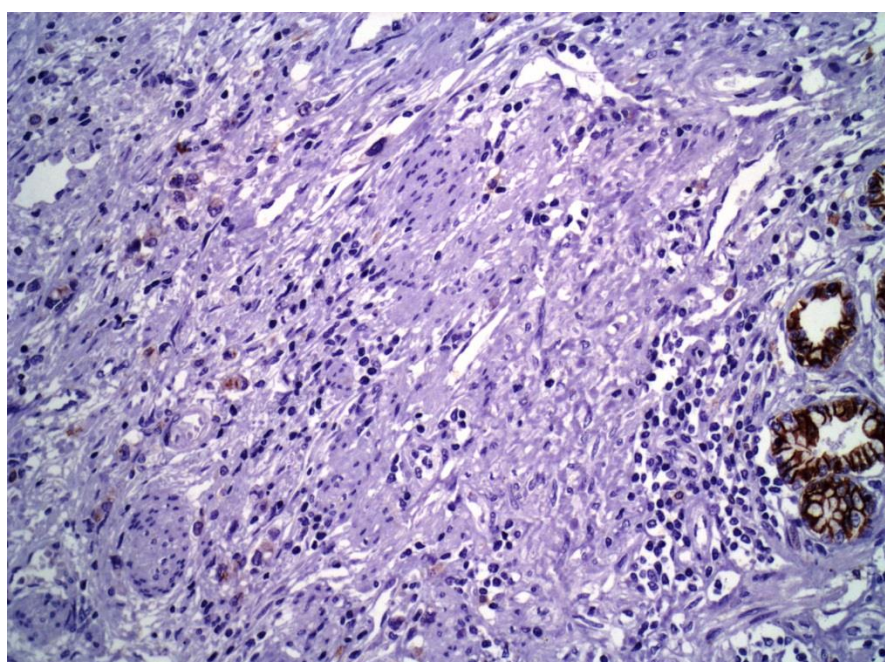


Figura 12 - Expressão da caderina-E reduzida em carcinoma gástrico do tipo difuso – 200x



Nos linfonodos, a expressão preservada predominou nos dois histotipos, mas sem diferença significativa entre eles ($11/12 = 92\%$ vs $15/19 = 79\%$; $p = 0,7937$).

Figura 13 - Expressão reduzida de caderina-E em metástase linfonodal de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso – 200x

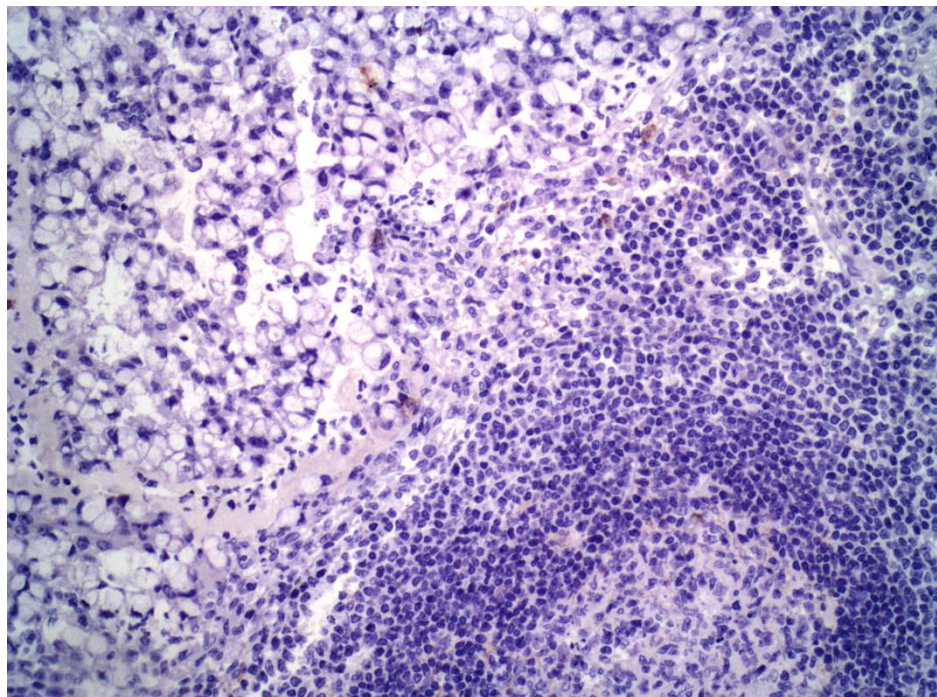
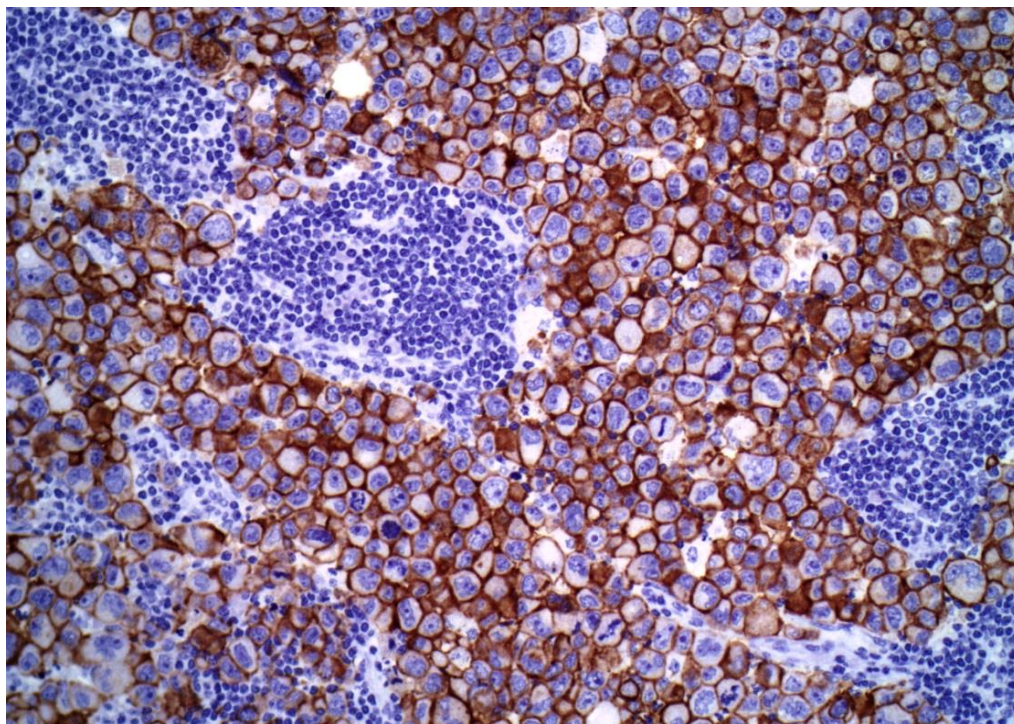


Figura 14 - Expressão preservada de caderina-E em metástase linfonodal de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso – 200x



Quando se compara a expressão de caderina-E, considerando o tumor, independentemente do subtipo, com a imunomarcagem das metástases linfonodais, aparentemente não houve diferença entre elas (Tabela 3). O mesmo acontece quando se leva em conta os subtipos (Tabela 2).

Tabela 3 – Expressão da caderina-E em células neoplásicas do tumor primário e metástase linfonodal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos *intestinal* ou *difuso*

Carcinomas gástricos (Células neoplásicas)	Expressão de caderina-E				
	N	Preservada	Reduzida	#	<i>p</i>
Tumor primário*					<i>0,1137</i>
<i>Intestinal</i>	26	21 (84%)	4 (16%)	1	
<i>Difuso</i>	25	15 (60%)	10 (40%)	0	
Total	51	36 (72%)	14 (28%)	1	
Metástase Linfonodal					<i>0,6236</i>
<i>Intestinal</i>	16	11 (92%)	1 (8%)	4	
<i>Difuso</i>	19	15 (79%)	4 (21%)	0	
Total	35	26 (84%)	5 (16%)	4	

*Tipo histológico de Lauren. # Não avaliáveis. *p* = Teste exato de Fisher.

Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão da caderina-E entre os histotipos nas sedes primárias e de metaplasia (Tabela 4), bem como não houve diferença na comparação da redução da caderina-E das lesões gástricas e metaplasicas, nos carcinomas do tipo *intestinal* (4/25 vs 1/8, respectivamente; *p* = 1,0000) e difuso (10/25 vs 0/3, respectivamente; *p* = 0,5519).

Tabela 4 – Expressão de caderina-E em células neoplásicas do tumor primário e células epiteliais de metaplasia intestinal em casos de carcinoma gástrico dos tipos *intestinal* ou *difuso*

Células epiteliais	Expressão de caderina-E				
	N	Preservada	Reduzida	#	p
Tumor primário*					<i>0,1137</i>
<i>Intestinal</i>	26	21 (84%)	4 (16%)	1	
<i>Difuso</i>	25	15 (60%)	10 (40%)	0	
Total	51	36 (72%)	14 (28%)	1	
Metaplasia Intestinal					<i>1,0000</i>
<i>Intestinal</i>	9	7 (88%)	1 (12%)	1	
<i>Difuso</i>	4	3 (100%)	0	1	
Total	13	10 (91%)	1 (9%)	2	

*Tipo histológico de Lauren. # Não avaliáveis. p = Teste exato de Fisher.

Evidenciou-se na Tabela 5 que não houve diferença estatisticamente significativa da expressão de caderina-E entre o tumor primário e o tecido normal no carcinoma intestinal ($4/25 = 16\%$ vs $1/22 = 5\%$, $p = 0,3676$). No entanto, a expressão da caderina-E foi significativamente reduzida nos carcinomas difusos em relação à mucosa normal distante do tumor ($10/25 = 40\%$ vs $0/16 = 0\%$, $p = 0,0209$).

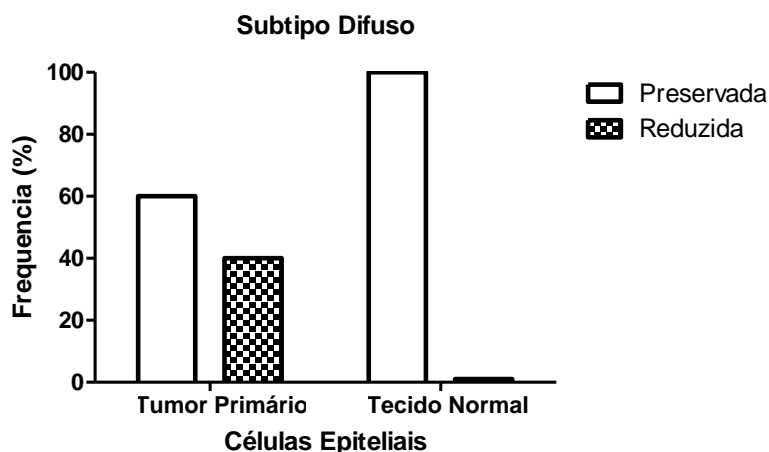
Tabela 5 – Expressão da caderina-E em células neoplásicas do tumor primário e tecido normal distante no carcinoma gástrico dos tipos *intestinal* ou *difuso*

Células epiteliais	Expressão de caderina-E				
	N	Preservada	Reduzida	#	p
Tumor primário*					<i>0,1137</i>
<i>Intestinal</i>	26	21 (84%)	4 (16%)	1	
<i>Difuso</i>	25	15 (60%)	10 (40%)	0	<i>0,0209**</i>
Total	51	36 (72%)	14 (28%)	1	
Tecido Normal					<i>1,0000</i>
<i>Intestinal</i>	23	21 (95%)	1 (5%)	1	
<i>Difuso</i>	18	16 (100%)	0	2	
Total	41	37 (97%)	1 (3%)	3	

*Tipo histológico de Lauren. # Não avaliáveis. p = Teste exato de Fisher. **Tumor primário Difuso x Tecido normal distante do tumor.

O gráfico a seguir evidencia este último achado:

Figura 15 – Expressão da caderina-E no tumor primário e no tecido normal em pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo difuso



Expressão da caderina-E foi significativamente reduzida nos carcinomas difusos em relação à mucosa normal distante do tumor ($10/25 = 40\%$ vs $0/16 = 0\%$, $p = 0,0209$).

Não foram evidenciadas diferenças estatísticas significantes da expressão da caderina-E entre a metaplasia e o tecido normal (Tabela 6). Comparando a redução da caderina-E na metaplasia com seu tecido normal obtivemos os seguintes resultados: *intestinal* ($1/8 = 13\%$ vs $1/22 = 5\%$, $p = 0,4899$) e *difuso* ($0/3 = 0\%$ vs $0/16 = 0\%$).

Tabela 6 – Expressão da caderina-E em metaplasia intestinal e tecido normal distante do carcinoma gástrico dos tipos *intestinal* e *difuso*

Células epiteliais	Expressão de caderina-E				
	N	Preservada	Reduzida	#	p
Metaplasia Intestinal					<i>1,0000</i>
<i>Intestinal</i>	9	7 (88%)	1 (12%)	1	
<i>Difuso</i>	4	3 (100%)	0	1	
Total	13	10 (91%)	1 (9%)	2	
Tecido Normal					<i>1,0000</i>
<i>Intestinal</i>	23	21 (95%)	1 (5%)	1	
<i>Difuso</i>	18	16 (100%)	0	2	
Total	41	37 (97%)	1 (3%)	3	

*Tipo histológico de Lauren. # Não avaliáveis. p = Teste exato de Fisher.

Tabela 7 – Expressão da caderina-E em células epiteliais normais e células epiteliais metaplásicas nas diferentes camadas da mucosa gástrica

EXPRESSÃO DE CADERINA-E NAS CAMADAS DA MUCOSA GÁSTRICA						
	BASAL		INTERMEDIARIA		SUPERFICIAL	
	NEGATIVA	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVA
NORMAL	0	27 (100%)	0	27 (100%)	0	27 (100%)
METAPLASIA INTESTINAL	1 (9%)	10 (91%)	1 (9%)	10 (91%)	1 (9%)	10 (91%)

A expressão da caderina-E foi absoluta nas três camadas da mucosa gástrica normal (100%), enquanto na metaplasia intestinal foi quase total (91%). Não foram encontradas diferenças significantes na comparação entre os terços em relação à expressão de caderina-E (Tabela 7).

Figura 16 - Expressão da caderina-E preservada em metaplasia intestinal de paciente com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal – 50x

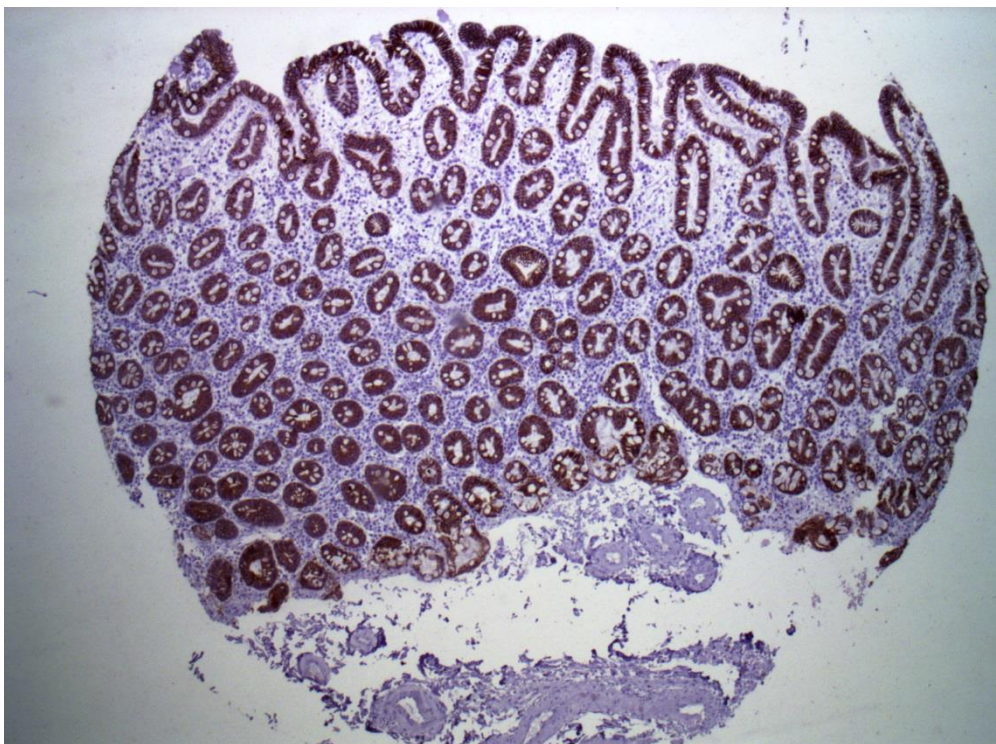
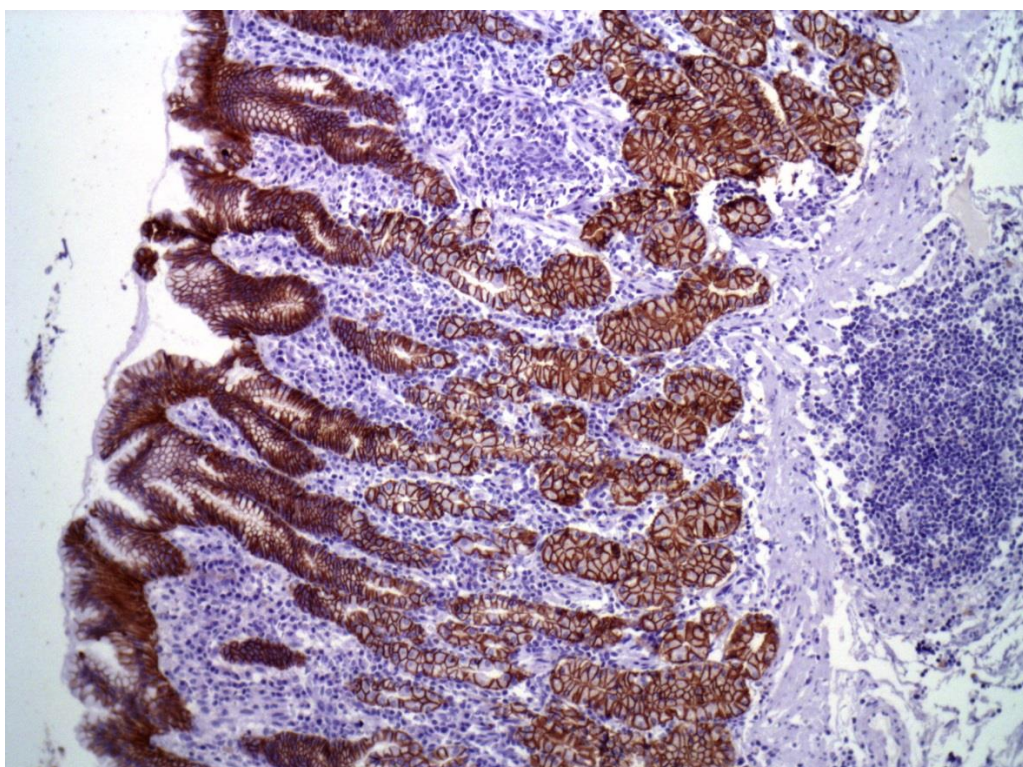


Figura 17 - Expressão da caderina-E preservada em mucosa gástrica normal – 100x



4.4 Distribuição da expressão da caderina-N em células epiteliais normais e metaplasicas em relação à espessura da mucosa

No tecido normal, a expressão da caderina-N ocorreu de forma diferenciada nas três camadas da mucosa gástrica.

Tabela 8 – Expressão da caderina-N em células epiteliais normais e células epiteliais metaplásicas nas diferentes camadas da mucosa gástrica

EXPRESSÃO DE CADERINA-N NAS CAMADAS DA MUCOSA GÁSTRICA						
	BASAL		INTERMEDIARIA		SUPERFICIAL	
	NEGATIVA	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVA
NORMAL	7 (26%)	20 (74%)	13 (48%)	14 (52%)	27 (100%)	0
METAPLASIA INTESTINAL	11 (100%)	0	11 (100%)	0	11 (100%)	0

Sua frequência foi mais evidenciada na camada basal (74%) e intermediaria (52%), não ocorrendo expressão na camada superficial. Já na mucosa com metaplasia intestinal, não houve expressão dessa molécula em nenhuma de suas camadas (Tabela 8; Figura 18).

Em relação ao terço basal comparando a positividade na expressão de caderina-N verificou-se que no normal foi de 74% (20/27) enquanto na metaplasia foi de 0% (0/11), obtendo-se uma diferença significativa ($p < 0,0001$).

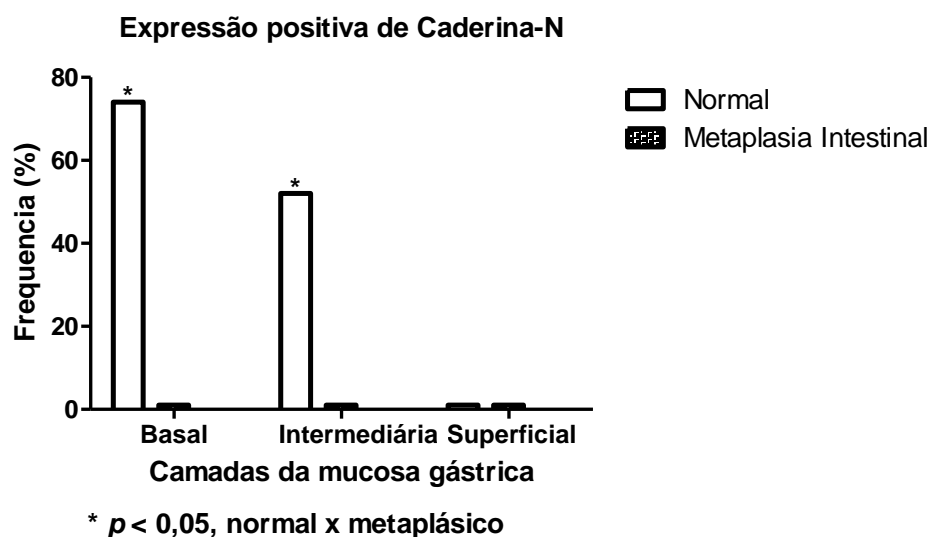
No terço intermediário a negatividade foi total na metaplasia (0/11= 0%), enquanto que no tecido normal foi de 48% (13/27), obtendo-se um $p = 0,0026$. Já no terço superficial observou-se uma total falta de positividade em ambos os terços.

Na comparação da expressão da caderina-N no tecido normal, distante do tumor, entre os terços estudados foram observados os seguintes dados: entre o basal (7/27) vs intermediário (13/27) ocorre um aumento da negatividade, com $p = 0,1581$. Na relação entre o basal (7/27) e o superficial (27/27), a negatividade é mais evidente, $p < 0,0001$.

Comparando o terço intermediário (13/27) vs superficial (27/27), a progressão da negatividade continua evidenciada, $p < 0,0001$. No tocante à metaplasia intestinal foi observada negatividade total em todos os terços.

Os principais dados obtidos da tabela 8 estão representados nas figuras seguintes:

Figura 18 - Expressão da caderina-N na camada da mucosa gástrica normal e metaplasia intestinal



(*) Alta expressão positiva de caderina-N nos terços basal e intermediário da mucosa normal, ao contrario do terço superficial que apresentou uma falta de expressão, tanto na mucosa gástrica normal, quanto na mucosa com metaplasia intestinal.

Figura 19 - Expressão da caderina-N nas camadas da mucosa gástrica normal – 50x

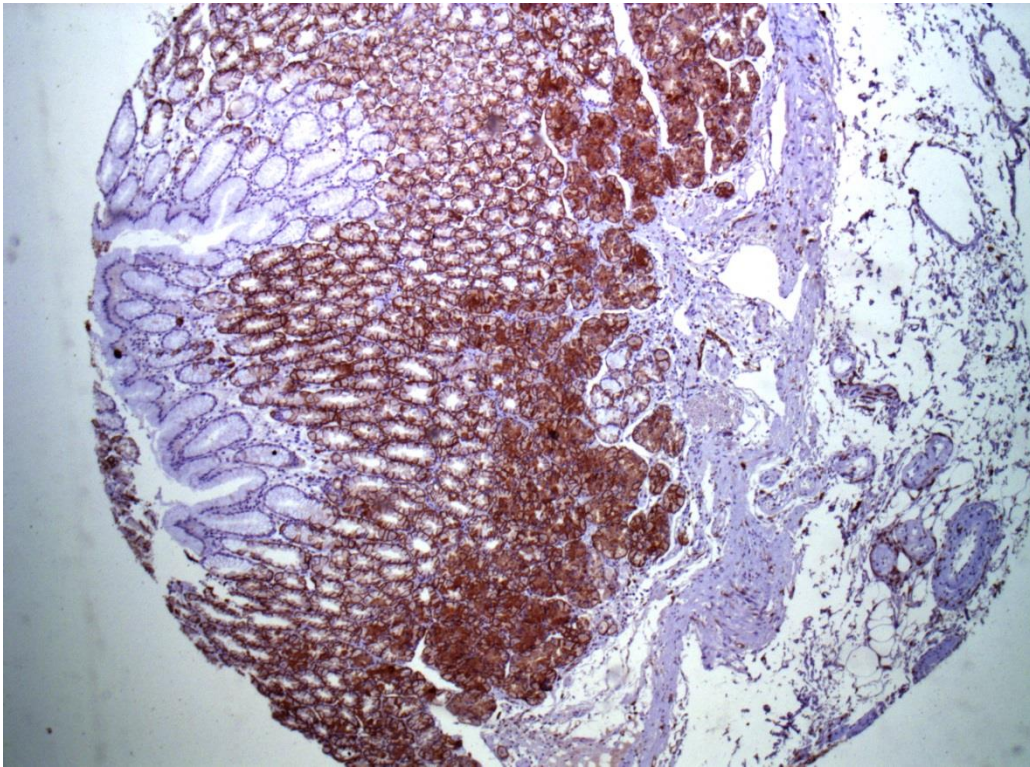
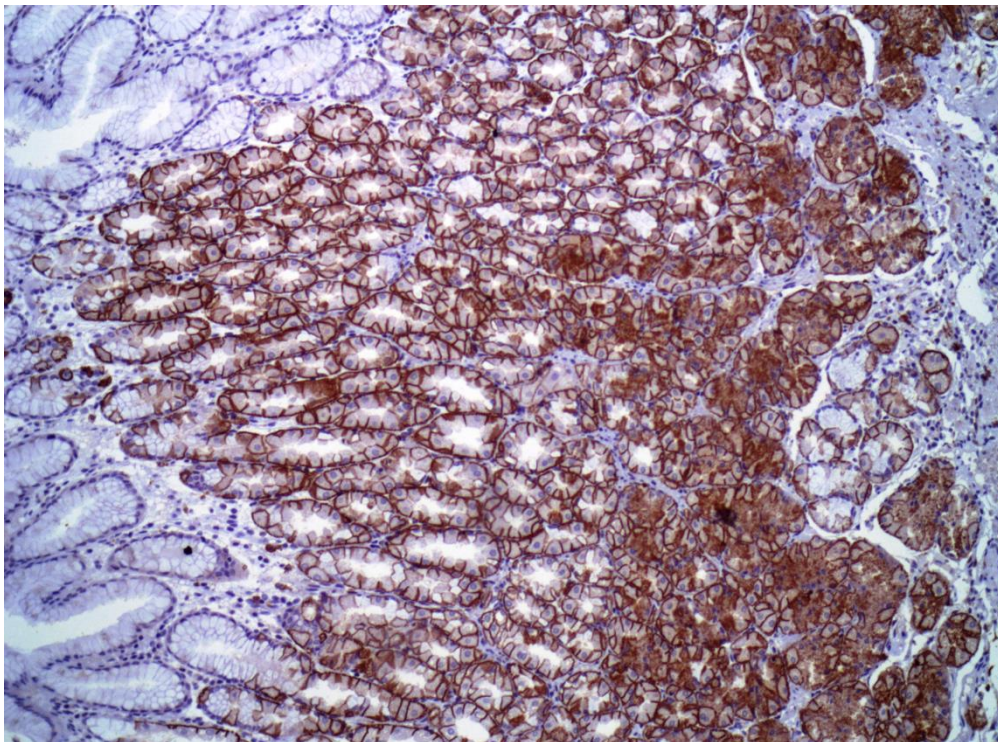


Figura 20 - Expressão da caderina-N no terço basal e médio da mucosa gástrica normal – 100x



4.5 Distribuição da expressão da caderina-N em células tumorais e não tumorais

A expressão da caderina-N nas células tumorais foi comparada com a imunocoloração nas células epiteliais normais e metaplasicas. E está representada na tabela a seguir:

Tabela 9 – Expressão da caderina-N em células epiteliais tumorais e células epiteliais não tumorais

CÉLULAS EPITELIAIS TUMORAIS e CÉLULAS EPITELIAIS NÃO TUMORAIS				
	TUMOR PRIMÁRIO	METASTASE LINFONODAL	MUCOSA NORMAL	MUCOSA COM METAPLASIA INTESTINAL
NEGATIVA	46 (92%)	28 (100%)	7 (26%)	11 (100%)
POSITIVA	4 (8%)	0	20 (74%)	0

A negatividade foi predominante no tumor primário (46/50) e na metástase linfonodal (28/28), sem diferença significativa ($p = 0,2906$). Entre o tumor primário (46/50 = 92%) vs mucosa normal (7/27 = 26%), ocorreu uma inversão da expressão, onde no tumor primário a expressão negativa é mais evidente enquanto na mucosa normal a positividade se sobressai, com $p < 0,0001$.

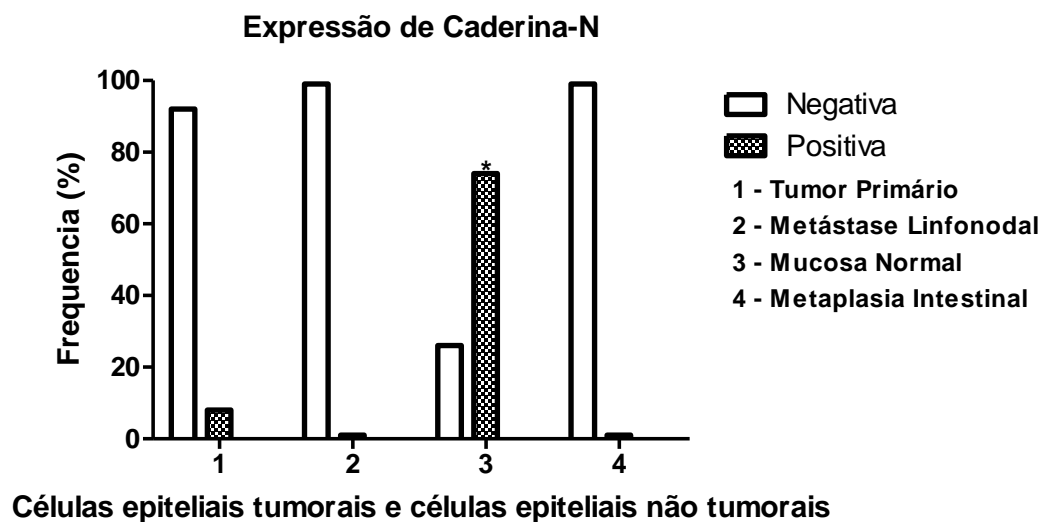
Na metaplasia a expressão negativa ocorreu em sua totalidade (11/11), enquanto no tumor primário foi observada em quase todos os casos (46/50) ($p = 1,0000$).

Na relação entre o linfonodo (28/28) vs normal (7/27), ocorreu falta de expressão total nos linfonodos (100%) e de apenas 26% na mucosa normal, com uma diferença significativa, $p < 0,0001$.

Agora na comparação entre linfonodo (28/28) vs metaplasia (11/11), se obteve um $p = 1,0000$. Em relação ao normal (7/27) vs metaplasia (11/11), obtivemos um $p < 0,0001$.

A interpretação da tabela acima fica mais evidente com as figuras abaixo:

Figura 21 – Expressão da Caderina-N em células epiteliais tumorais e não tumorais



(*) Como pode se verificar na figura acima, a alta expressão positiva de caderina-N nas células epiteliais da mucosa normal se sobressai em comparação às outras células epiteliais tumorais e metaplasicas.

Figura 22 - Expressão da caderina-N positiva nas células tumorais do carcinoma difuso – 200x

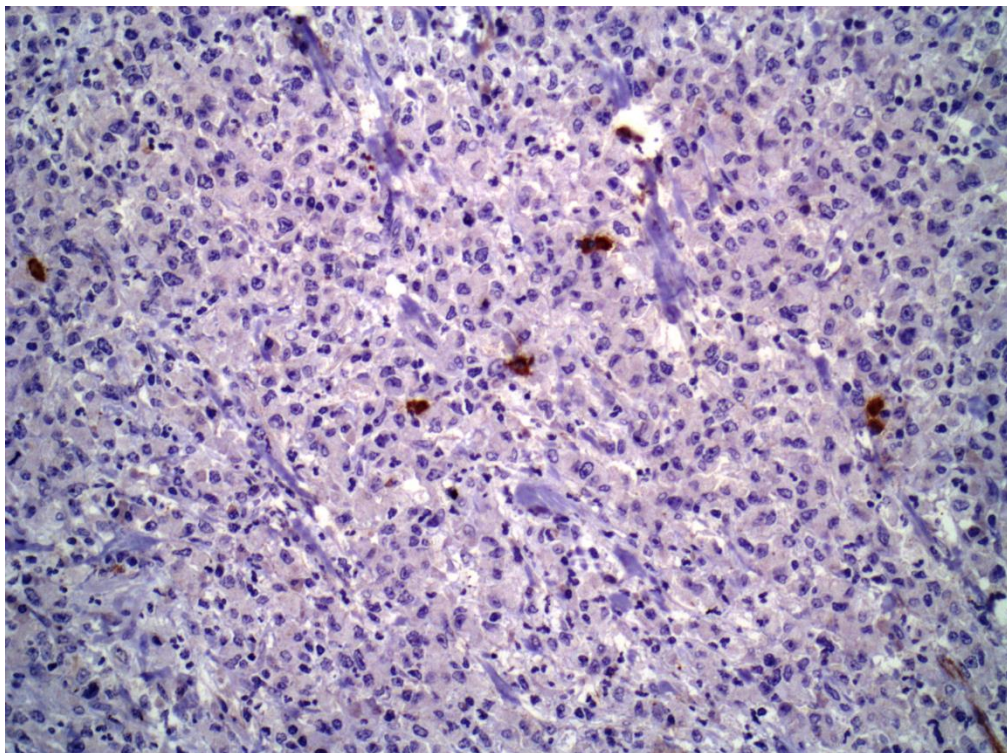


Figura 23 - Expressão da caderina-N positiva na mucosa normal (terço basal e intermediário) – 200x

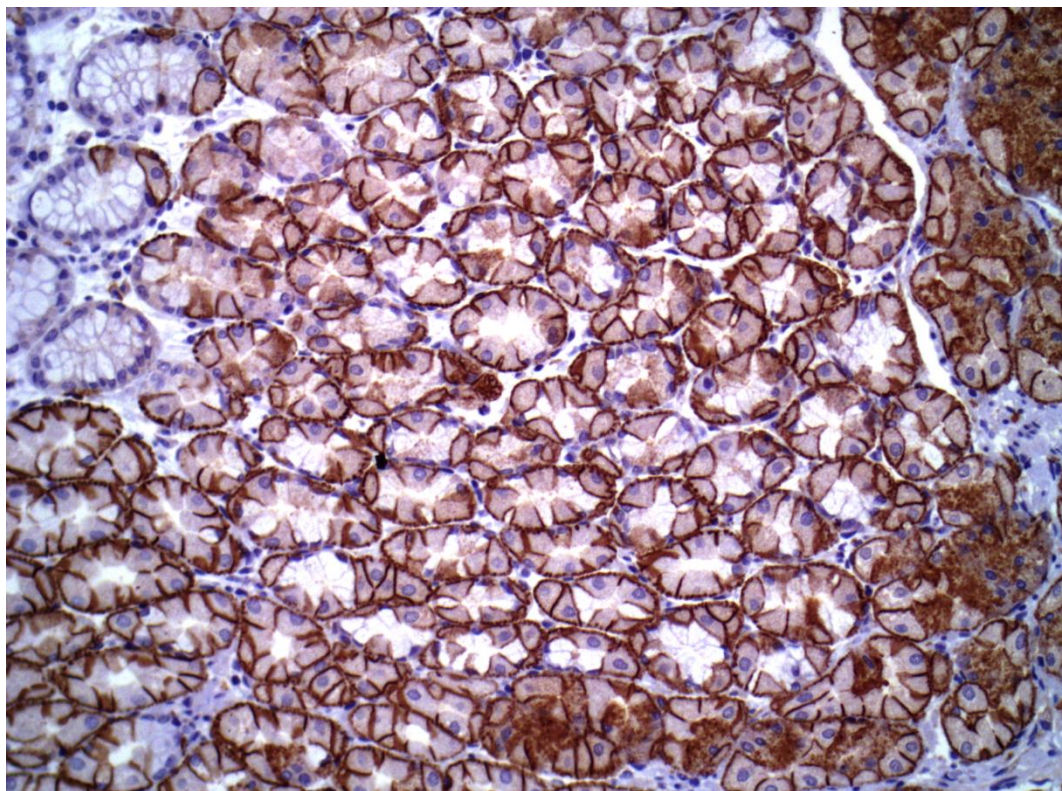
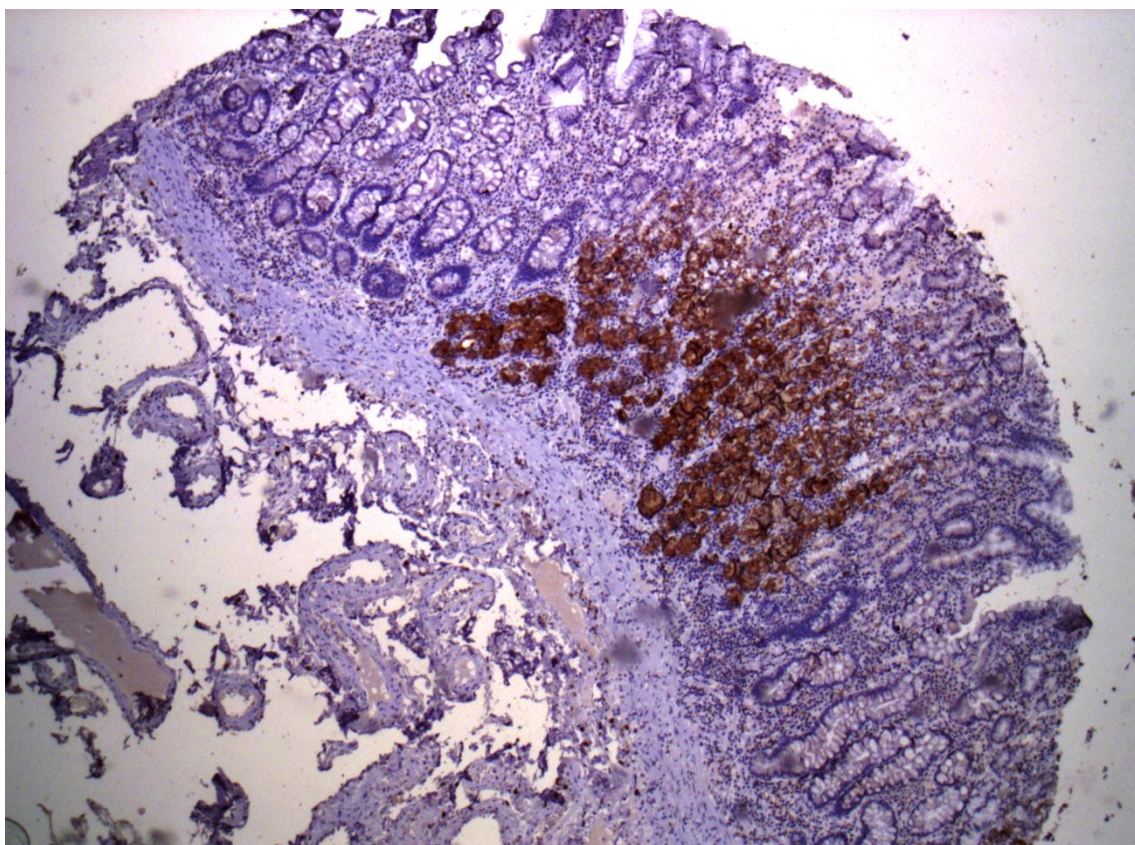


Figura 24 - Expressão da caderina-N positiva na mucosa normal e negativa na metaplasia intestinal – 50x



4.6 Distribuição da expressão da caderina-N em mononucleares do estroma tumoral

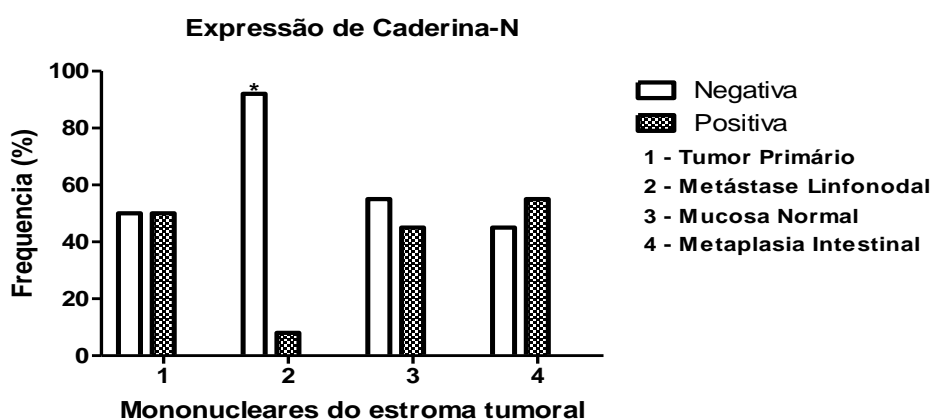
A ausência de expressão da caderina-N no estroma de tumores primários (24/48 = 50%), metaplasia intestinal (5/11 = 45%) e mucosa normal (15/27 = 55%) assemelha-se com a frequência de positividade da expressão da mesma. Entretanto, na metástase linfonodal foi verificada uma acentuada predominância da expressão negativa (23/25 = 92%) (Figura 32).

Tabela 10 – Expressão da caderina-N em mononucleares do estroma peritumoral, mucosa normal e metaplasia intestinal

LESÕES E LOCAIS				
EXPRESSÃO	TUMOR PRIMÁRIO	METASTASE LINFONODAL	MUCOSA NORMAL	MUCOSA COM METAPLASIA INTESTINAL
NEGATIVA	24 (50%)	23 (92%)	15 (55%)	5 (45%)
POSITIVA	24 (50%)	2 (8%)	12 (45%)	6 (55%)

A diferença observada na tabela que mais chama atenção é a predominância da expressão negativa no linfonodo em comparação ao tumor e aos demais grupos, com os seguintes valores, todos significantes: tumor primário (24/48) vs linfonodos (23/25), $p = 0,0003$; linfonodos (23/25) vs normal (15/27), $p = 0,0044$; e linfonodos (23/25) vs metaplasia (5/11), com $p = 0,0049$. Não foram observadas diferenças significativas entre a não expressão e expressão da caderina-N nos demais grupos: tumor primário vs normal vs metaplasia.

Figura 25 – Expressão da caderina-N nos mononucleares em lesões e locais estudados



(*) Nas metástases linfonodais, os mononucleares apresentaram frequentemente uma expressão negativa de caderina-N, ao contrário dos outros locais que apresentaram uma positividade semelhante à negatividade.

Figura 26 - Expressão da caderina-N positiva nos mononucleares e células tumorais do subtipo difuso – 400x

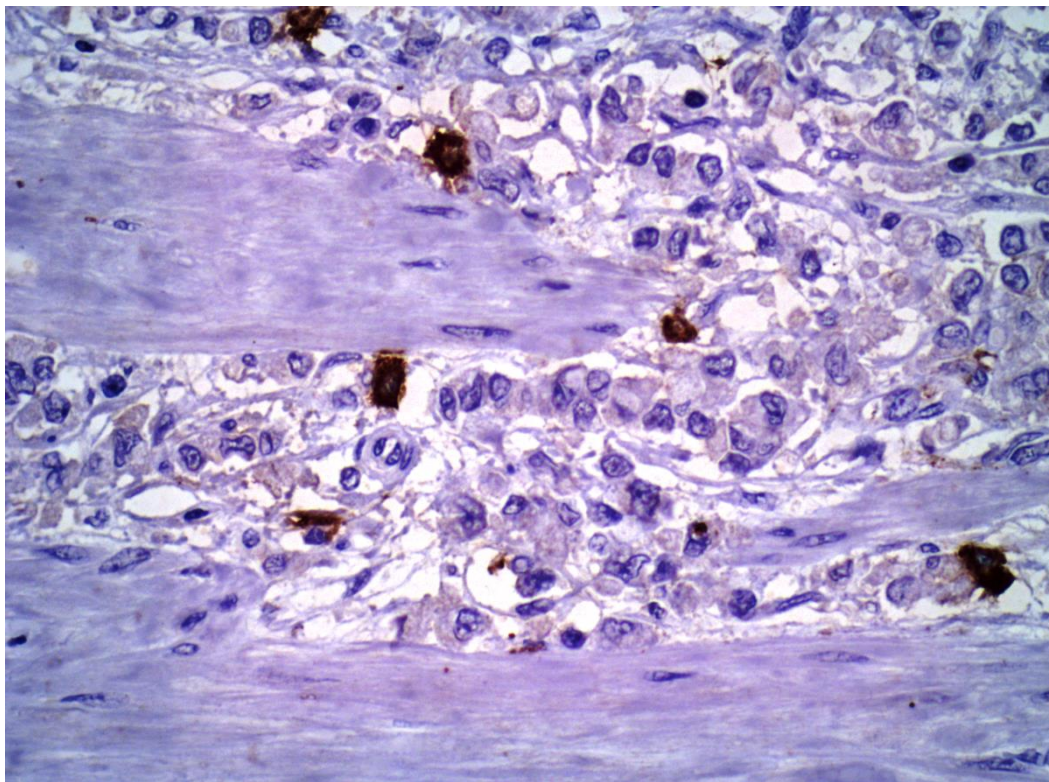
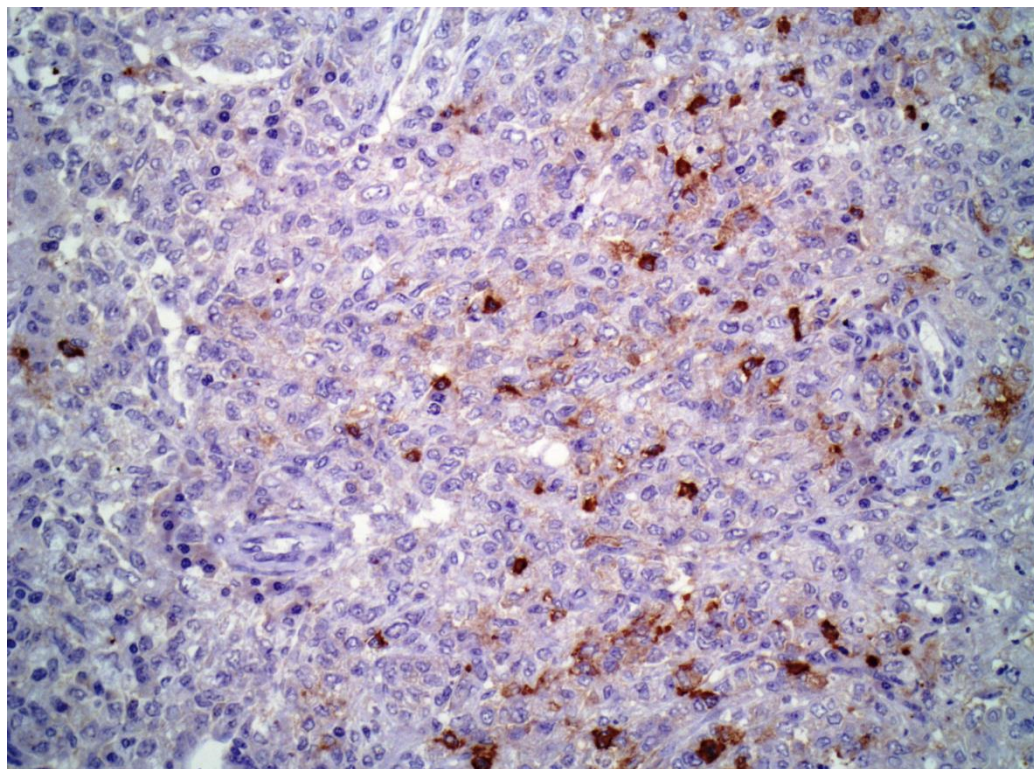


Figura 27 - Expressão da caderina-N positiva nos mononucleares do subtipo difuso – 200x



5 DISCUSSÃO

Neste estudo, optou-se pela utilização da técnica de *tissue microarray* (TMA) para obtenção dos blocos da amostra. Foi utilizada a partir de um kit comercial - Arraymold®. O TMA oferece resultados bastante confiáveis e reprodutíveis e as adaptações utilizadas possibilitaram cortes histológicos representativos das amostras. A imunohistoquímica, por outro lado, apresentou dificuldades, notadamente pela preservação irregular (período de fixação em formalina a 10%) dos espécimes cirúrgicos, bem como seu armazenamento, dificultando o estabelecimento da amostragem final, ocorrendo repetições de procedimentos técnicos. A utilização do sistema PT Link™-Dako na recuperação antigênica foi vital para a imunomarcagem e foi utilizada a concentração recomendada pelos fabricantes, dos anticorpos, para a marcação dos controles positivos e dos casos. A expressão da caderina-E e -N no tecido normal, metaplasia intestinal e linfonodos, se fez necessária para verificar o significado e a validade dos achados no tumor primário. Sendo assim foram obtidos os seguintes dados:

Expressão da caderina-N e caderina-E em tecido de câncer gástrico

A expressão positiva da caderina-E foi observada nas membranas de células com câncer gástrico, mas também em condições de mucosa gástrica normal e infiltrados de células tumorais. A expressão da caderina-N foi identificada na membrana celular e citoplasmas das células de câncer gástrico e mononucleares do estroma. Além disso, a positividade da caderina-N foi encontrada em tecidos nervosos perto de tumores gástricos.

Caderina-E

Expressão reduzida da caderina-E foi encontrada em 28% de nossos casos, resultado aproximado ao de Jawhari *et al.* (1997^a), 24%. Outros autores observaram anormalidades na expressão de caderina-E em 74% (MACHADO *et al.*, 1998), 69% (TANAKA *et al.*, 2002), 46% (ZHOU *et al.*, 2002) e 57% (CAI *et al.*, 2001) dos casos, valores superiores aos citados anteriormente. Muitas variáveis influenciam no resultado final em imunohistoquímica, o que dificulta a comparação entre estudos que envolvem diferentes amostras, submetidas a procedimentos técnicos diversos. Simplificação de escores, sem perda da abrangência, tendem a minimizar os erros e aumentar a

reprodutibilidade, como realizada por Jawhari *et al.* (1997^a) ao compararem normal/preservada e anormal/reduzida.

Em relação aos tipos histológicos, os resultados foram semelhantes aos de diversos autores que relatam um maior número de casos com ausência/ ou redução da expressão de caderina-E no histotipo *difuso* em relação ao *intestinal* (BLOK *et al.*, 1999; JOO *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2005; GUZMAN *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006). Nos resultados do presente estudo observou-se uma redução na expressão de caderina-E em 16% dos casos intestinais e 40% nos tumores *difusos*. Outro achado de relevância em relação à caderina-E foi a redução muito maior de caderina-E membranar nas células epiteliais do tumor primário em relação ao tecido normal distante do tumor, do histotipo *difuso*, ($p = 0,0209$).

Em nossos resultados, não foi observada nenhuma correlação entre expressão de caderina-E e as variáveis de idade e sexo dos pacientes, achados semelhantes aos de outros autores (MACHADO *et al.*, 1998; CAI *et al.*, 2001; TANAKA *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2005). Nossos dados estão de acordo com os da literatura consultada, quanto à ausência de correlação de caderina-E e localização anatômica (JOO *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2005).

Observou-se que no presente estudo quanto maior o tamanho do tumor, menor foi a expressão de caderina-E, o que é compatível com o processo de progressão tumoral que leva a TEM (Transição Epitelial Mesenquimal), portanto, uma etapa crítica na progressão do câncer já que favorece a disseminação hematogênica e linfогênica das células tumorais de acordo com as descrições de Thiery, 2002; Jodele *et al.*, 2006; Baum; Settleman; Quinlan, 2008; Katto; Mahlknecht, 2011.

Assim como nesse estudo, a grande maioria dos autores não encontrou associação significativa entre expressão reduzida de caderina-E e grau de invasão tumoral local (SHINO *et al.*, 1995; MACHADO *et al.*, 1998; JOO *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2003; GUZMAN *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006).

Correlação da expressão de caderina-E com invasão linfática foi descrita por alguns autores (CAI *et al.*, 2001; TANAKA *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2005b), dos quais apenas Cai *et al.* (2001) relataram associação também com invasão venosa. Nossos dados foram de acordo com os de outros autores, ou seja, ausência de correlação com

invasão linfática (MAYER *et al.*, 1993; SHINO *et al.*, 1995) ou venosa (SHINO *et al.*, 1995; MACHADO *et al.*, 1998; TANAKA *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003).

Neste estudo, o tipo de expressão de caderina-E não se relacionou significativamente com a presença ou a ausência de metástases linfonodais, corroborando com os resultados de outros autores (MAYER *et al.*, 1993; BLOK *et al.*, 1999; JOO *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2002; TANAKA *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003). Há controvérsia em relação a este assunto, pois vários relatos são favoráveis a uma correlação entre menor expressão de caderina-E e metastização mais frequentes para linfonodos (MACHADO *et al.*, 1998; CAI *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2005b; SILVA *et al.*, 2006; AOKI *et al.*, 2007).

Em nossa casuística, a expressão reduzida de caderina-E não foi predominante no sítio primário ($14/51 = 28\%$) e metastático ($5/35 = 16\%$). Como os números indicam a expressão normal foi maior nos linfonodos do que no estômago (84% e 72%, respectivamente), resultado este que se assemelha com os poucos relatos encontrados sobre esse assunto como em Jawhari *et al.* (1997^a), que encontraram expressão normal em 91% das metástases linfonodais, mas em apenas 76% dos carcinomas gástricos primários. Chan e colaboradores (2003), observaram aumento da expressão de caderina-E em 13% dos carcinomas gástricos metastáticos quando comparado aos respectivos tumores no estômago. Para Shino *et al.* (1995), no entanto, a expressão positiva (membranar) da caderina-E no carcinoma gástrico foi maior no estômago (82%) do que nos linfonodos (62%).

Caderina-N

Os achados obtidos na avaliação da expressão da caderina-N foram: a positividade da caderina-N foi identificado em 4 de 51 casos (8%), mais baixa que as encontradas por Kamikihara *et al.* (2012), que foi de 21,2%, e foi mais baixa ainda do que com outros tipos de cânceres, 45% em mama (HAN *et al.*, 1999) e 44% em cânceres colorretais (ROSIVATZ *et al.*, 2004). Uma possível explicação para esse fato, conforme descrito na metodologia, é a presença de variáveis que influenciam no resultado final em imunohistoquímica, dificultando a comparação entre estudos que envolvem diferentes amostras, submetidas a procedimentos técnicos diversos.

Tran *et al.* (1999), mostraram uma clara associação entre o ganho de caderina-N e aumento dos escores de Gleason no câncer próstata. No presente estudo, não foi

possível demonstrar uma correlação entre positividade vs grau de diferenciação (carcinoma intestinal: bem diferenciado vs carcinoma difuso: pouco diferenciado), pois obteve-se escassa positividade no conjunto da amostra. Isto pode depender do grau de invasão do tumor, já que todos os casos do presente estudo eram de câncer avançado. Koshikawa *et al.*(2008) mostraram que a primeira fase de invasão estromal no adenocarcinoma bem diferenciado do estômago destruiu a membrana basal através do mecanismo de TME (Transição Epitelial Mesenquimal), ocorrendo na margem avançada em um tumor histológico bem diferenciado.

Gravdal *et al.*(2007), mostraram que o câncer de próstata para caderina-N positiva tinha um número significativamente maior de metástases linfáticas e invasão de órgãos vizinhos; no entanto, Nakajima *et al.*(2004), demonstraram que a positividade da caderina-N está correlacionada apenas com invasão neural no câncer pancreático. No presente estudo, foi observada ausência total de expressão nos linfonodos. Portanto, a positividade da caderina-N nem sempre se correlaciona com a agressividade do tumor. Existe a possibilidade de que alguma propriedade específica do órgão possa influenciar na expressão da caderina-N, já que se trata de microambiente tumoral diferente.

Foram obtidos resultados inesperados sobre a caderina-N, principalmente presente na mucosa normal em comparação ao tumor, o contrario do que tem sido geralmente referido na literatura. Na comparação entre a mucosa normal e metaplasica, levando-se em conta os terços basal, intermediário e superficial da espessura da mucosa, foram observados os seguintes dados: na mucosa normal a expressão foi total no terço basal, e ocorrendo uma perda progressiva nos terços intermediário e, sobretudo superficial, sugerindo que o amadurecimento dos terços está inversamente relacionado com a expressão da caderina-N. No epitélio metaplasico, no entanto não houve a marcação de caderina-N em nenhum dos terços, resultado semelhante ao do tumor. Não foi possível explicar estes achados e não há dados na literatura para comparar, contudo devem ser levados em conta, já que os controles positivos internos e externos para caderina-N mostram de forma inequívoca a sensibilidade ao anticorpo, descartando a possibilidade de resultados falsos negativo na amostra.

Em relação à expressão da caderina-N nos mononucleares foi observado: uma semelhança na expressão positiva no tumor primário, mucosa normal e na metaplasia (em aproximadamente metade dos casos de cada grupo). Estes achados parecem indicar que a expressão da caderina-N nos mononucleares não é determinante no processo de

carcinogêneses. Em contrapartida, a positividade dos linfonodos foi muito menos frequente em relação aos outros grupos, inclusive aos carcinomas gástricos primários, observando uma relação inversa entre a expressão da caderina-N e a progressão tumoral. Este achado é diferente do que se refere na literatura e não temos explicações adequadas para ele. Até o presente momento, no levantamento bibliográfico, aqui realizado, não foram encontrados artigos que avaliam a expressão de caderina-N nos mononucleares do estroma tumoral e da mucosa normal.

6 CONCLUSÃO

1. Heterogeneidade de resultados na expressão da caderina-E dos carcinomas primários: ora preservada, ora reduzida;
2. Heterogeneidade de resultados na expressão da caderina-N dos carcinomas primários: positiva ou negativa;
3. O carcinoma difuso apresentou uma menor expressão da caderina-E em relação ao tecido normal;
4. A expressão de caderina-E em tumores maiores se apresentou bastante reduzida;
5. Não houve diferença significativa na expressão da caderina “E” e “N” entre as lesões primárias e metastáticas nos dois histotípos;
6. A caderina-E foi expressa de maneira uniforme em todas as camadas do tecido normal e metaplasico (terço basal, intermediário e superficial);
7. A caderina-N foi expressa de maneira heterogenea nas camadas da mucosa normal, com relação inversa entre a expressão da caderina-N e a diferenciação das camadas desta mucosa; e não se expressou na metaplasia intestinal, semelhante ao observado nas células neoplásicas. Isso sugere que este tipo de caderina não participa de todas as etapas da carcinogênese e progressão tumoral.
8. A expressão da caderina-N nos mononucleares foi mais evidente que nas células tumorais e metaplasicas;

REFERÊNCIAS

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P., Biologia molecular da célula. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, Estrutura da membrana: organização interna da célula; p.583-614,2004.

ALMEIDA P.R.; FERREIRA V.A.; SANTOS C.C.; ROCHA-FILHO F.D.; FEITOSA R.R.; FALCÃO E.A.; CAVADA B.K.; RIBEIRO R.A. E-cadherin immunoexpression patterns in the characterisation of gastric carcinoma histotypes. **J. Clin. Pathol.** v.63, p. 635-639, 2010.

ANDO T.; YOSHIDA T.; ENOMOTO S.; ASADA K.; TATEMATSU M.; ICHINOSE M.; SUGIYAMA T.; USHIJIMA T. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. **Int. J. Cancer**, v. 124, p. 2367-2374, 2009.

AOKI M.; YAMAMOTO K.; NOSHIRO H.; SAKAI K.; YOKOTA J.; KOHNO T.; TOKINO T.; ISHIDA S.; OHYAMA S.; NINOMIYA I.; UESAKA K.; KITAJIMA M.; SHIMADA S.; MATSUNO S.; YANO M.; HIRATSUKA M.; SUGIMURA H.; ITOH F.; MINAMOTO T.; MAEHARA Y.; TAKENOSHITA S.; AIKOU T.; KATAI H.; YOSHIMURA K.; TAKAHASHI T.; AKAGI K.; SAIRENJI M.; YAMAMURA Y.; SASAZUKI T. A full genome scan for gastric cancer. **J. Med. Genet.**, v. 42, p. 83-87, 2005.

BAUM, B.; SETTEMAN, J.; QUINLAN, M. P. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. **Seminars in Cell & Development Biology**, v. 19, p. 294-308, 2008.

BARCINSKI, M. A. Morte Celular. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C..**Oncologia Molecular**. 1^a ed. Atheneu, Cap. 5, p. 57-63, 2004.

BASELGA J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. **Science**, v.312, p. 1175-1178, 2006.

BEAVON I.R., The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 1607-1620, 2000.

CABRIJAN, L.; LIPOZENCIC, J. Adhesion molecules in keratinocytes. **Clinics in Dermatology**, v. 29, p. 427-431, 2011.

CARNEIRO F. Classification of gastric carcinomas. **Cur. Diag. Pathol.** v. 4, p. 51-59, 1997.

CAVALCANTE J.R.; SAMPAIO J.P.; MAIA FILHO J.T.; VIEIRA R.B.; ELEUTÉRIO J. JR.; LIMA RC JR.; RIBEIRO R.A.; ALMEIDA P.R. Progressive loss of E-cadherin immunoexpression during cervical carcinogenesis. **Acta. Cir. Bras.**, v. 29(10), p. 667-74, 2014.

CAVALLARO U.; CHRISTOFORI G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. **Biochim. Biophys Acta.**, v. 1552, p.39-45, 2001.

CAVALLARO U.; SCHAFFHAUSER B.; CRISTOFORI G. Cadherins and the tumor progression: is it all a swith? **Cancer Lett.**, v. 176, p. 123-128, 2002.

CORREA P.; SASANO N.; STEMMERMANN G.N.; HAENSZEL W. Pathology of gastric carcinoma in Japanese populations: comparisons between Miyagi prefecture, Japan, and Hawaii. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 51, p.1449-1459, 1973.

CORREA P.; PIAZUELO M.B. The gastric precancerous cascade. **J. Dig. Dis.** v. 13, p. 2-9, 2012.

CATALANO V.; LABIANCA R.; BERETTA G.D; GATTA G.; DE BRAUD F.; CUTSEM E.V. Gastric cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology.** v. 71, p. 127-164, 2009.

CREW K.D.; NEUGUT A. I. Epidemiology of gastric cancer. **World J. Gastroenterol**, v.12(3), p.354-362, 2006.

CHO S.B.; LEE K.H.; LEE J.H. Expression of E- and N-cadherin and clinicopathology in hepatocellular carcinoma. **Pathol. Int.**, v. 58, p. 635–642, 2008.

CHUN N.; FORD J.M. Genetic testing by cancer site: stomach. **Cancer J.** v. 18, p. 355-363, 2012.

CORSO G.; SERUCA R.; ROVIELLO F. Gastric cancer carcinogenesis and tumor progression. **Ann. Ital. Chir.** v. 83, p, 172-176, 2012.

DARAI E.; SCOAZEC J.Y.; WALKER-COMBROUZE F. Expression of cadherins in benign, borderline, and malignant ovarian epithelial tumors: a clinicopathologic study of 60 cases. **Hum. Pathol.** v. 28, p. 922–928,1997.

DERYCKE L.D.; BRACKE M.E. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 48, p. 463-476, 2004.

DINIZ-FREITAS M.; GARCIA-CABALLERO T.; ANTUNEZ-LOPEZ J.; GANDARA-REY J.M.; GARCIA- GARCIA A. Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.** v. 42, p.190-200, 2006.

DIKSHIT R.P.; MATHUR G.; MHATRE S.; YEOLE B.B. Epidemiological review of gastric cancer in India. **Indian J. Med. Paediatr. Oncol.** v. 32, p. 3-11, 2011.

DIKSHIT R.; GUPTA P.C.; RAMASUNDARAHETTIGE C.; GAJALAKSHMI V.; ALEKSANDROWICZ L.; BADWE R.; KUMAR R.; ROY S.; SURaweera W.; BRAY F.; MALLATH M.; SINGH P.K.; SINHA D.N.; SHET A.S.; GELBAND H.; JHA P. Cancer mortality in India: a nationally representative survey. **Lancet**, v. 379, p. 1807-1816, 2012.

FITZGERALD R.C.; HARDWICK R.; HUNTSMAN D. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. **J. Med. Genet.** v. 47, p.436–44, 2010.

FOX J. G.; WANG T. C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. **J. Clin. Invest.** v. 117, p. 60-69, 2007.

FUCHS C.S; MAYER R.J. Gastric carcinoma. **N. Engl. J. Med.** v. 333, p. 32-41,1995.

GARRIDO M.; FONSECA P.J.; VIEITEZ J.M.; FRUNZA M.; LACAVE A.J. Challenges in first line chemotherapy and targeted therapy in advanced gastric cancer. **Expert. Rev. Anticancer Ther.** v. 14(8), p. 887-900, 2014.

GOLDSTEIN D.B.; HIRSCHHORN J.N. In genetic control of disease, does ‘race’ matter? **Nat. Genet.** v. 36, p. 1243-1244, 2004.

GONZALEZ C.A.; PERA G.; AGUDO A. Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). **Int. J. Cancer**, v.118, p. 2559-2566, 2006.

GUILFORD P.; HOPKINS J.; HARRAWAY J. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. **Nature**, v. 392, p. 402–405, 1998.

HAJRA K.M.; FEARON E.R. Cadherin and catenin alterations in human cancer. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 34, p. 255-268, 2002.

HANDSCHUH G.; CANDIDUS S.; LUBER B. Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. **Oncogene**, v. 18, p. 4301-4312, 1999.

HATTA K.; OKADA T. S.; TAKEICHI M. A monoclonal antibody disrupting calcium-dependent cell-cell adhesion of brain tissues: Possible role of its target antigen in animal pattern formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 2789-2793, 1985.

HAZAN R. B.; PHILLIPS G. R.; QIAO R. F. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. **J. Cell. Biol.**, v. 148, p. 779-790, 2000.

HELLNER, K.; MAR, J.; FANG, F.; QUACKENBUSH, J.; MÜNGER, K. HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. **Virology**, v. 391, p. 57-63, 2009.

HOWE H.L.; WU X.; RIES L.A.; COKKINIDES V.; AHMED F.; JEMAL A.; MILLER B.; WILLIAMS M.; WARD E.; WINGO P.A.; RAMIREZ A.; EDWARDS B.K. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations. **Cancer**, v. 107, p. 1711-1742, 2006.

HULIT J.; SUYAMA K.; CHUNG S. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. **Cancer Res.**, v. 67, p. 3106-3116, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (RJ), 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa24012014.pdf>>. Acesso em: 16 fev. 2014.

JACKSON C.; CUNNINGHAM D.; OLIVEIRA J. Gastric cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol.** v. 20 p. 34-36, 2009.

JAKSZYN, P.; GONZÁLEZ, C. A. Nitrosamine and related foods intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic cancer review of the epidemiological evidence. **World J. Gastroenterol**, v. 12, p. 4296-4303, 2006.

JEMAL A.; SIEGEL R.; WARD E.; MURRAY T.; XU J.; THUN M.J. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J. Clin.**, v. 57, p. 43-66, 2007.

JEMAL A.; BRAY F.; CENTER M.M; FERLAY J.; WARD E.; FORMAN D. Global cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.**, v. 61, p. 69-90, 2011.

JENNBACHEN K.; TESAN T.; WANG W. N-cadherin increases after androgen deprivation and is associated with metastasis in prostate cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, v.17, p. 469-479, 2010.

JODELE, S.; BLAVIER, L.; YOON, J. M.; DeCLERC, Y. A. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, p. 35-43, 2006.

KANEKO S.; YOSHIMURA T. Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989. **Br. J. Cancer** v. 84, p.400-405, 2001.

KANDULSKI, A.; SELGRAND, M.; MALFERTHEINER, P. *Helicobacter pylori* infection: a clinical overview. **Digest. Liver Dis.**, v. 40, p.619-626, 2008.

KANWAL R.; GUPTA S. Epigenetic modifications in cancer. **Clin. Genet.** v. 81, p. 303-311, 2012.

KASHIMA T.; KAWAGUCHI J.; TAKESHITA S. Anomalous cadherin expression in osteosarcoma. Possible relationships to metastasis and morphogenesis. **Am. J. Pathol.** v. 155, p. 1549-55, 1999.

KATTO, J.; MAHLKNECHT, U. Epigenetic regulation of cellular adhesion in cancer. **Carcinogenesis**, v. 32, p. 1414-1418, 2011.

KELLEY J.R.; DUGGAN J.M. Gastric cancer epidemiology and risk factors. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 56, p.1-9, 2003.

KIM M. S.; LIM J. S.; HYUNG J. W.; LEE Y. C.; RHA S. Y.; KEUM K. C.; KOOM W. S. Neoadjuvant chemoradiotherapy followed by D2 gastrectomy in locally advanced gastric cancer. *World J. Gastroenterol.*,v. 21, p. 2711-2718, 2015.

KOIFMAN S & KOIFMAN RJ. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutat Res.* 544(2-3):305-311,2003.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIMENI, A.; BÄRLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.;

KALLIONIMENI, O. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**, v.4, n.7, p.844-7, 1998.

LACOVELLI R.; PIETRANTONIO F.; ALESSIO FARCOMENI A.; MAGGI C.; PALAZZO A.; RICCHINI F.; DE BRAUD F.; DI BARTOLOMEO M. Chemotherapy or Targeted Therapy as Second-Line Treatment of Advanced Gastric Cancer. A Systematic Review and Meta-Analysis of Published Studies. **PLOS ONE**, v. 9, p 1-7, 2014.

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

LA VECCHIA C., NEGRI E., FRANCESCHI GENTILE A., Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. **Cancer** v.70, p.50-55, 1992.

LEE, J. M.; DEDHAR, S.; KALLURI, R.; THOMPSON, E. W. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development and disease. **The Journal of Cell Biology**, v. 172, p. 973-981, 2006.

LEWIS-TUFFIN L.J.; RODRIGUEZ F.; GIANNINI C. Misregulated E-cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. **PLoS One**, v. 5, e13665, 2010.

LIN Q.; LI M.; SHEN Z.Y., *et al.* Prognostic impact of vascular endothelial growth factor-A and E-cadherin expression in completely resected pathologic stage I nonsmall cell lung cancer. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v. 40, p. 670-676, 2010.

LIU L.K.; JIANG X.Y.; ZHOU X.X.; WANG D.M.; SONG X.L.; JIANG H.B.; Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. **Mod. Pathol.**, v. 23, p. 213-224, 2010.

LYNCH H. T.; GRADY W.; SURIANO G.; HUNTSMAN D. Gastric cancer: new genetic developments. **J. Surg. Oncol.** v. 90, p. 114-133, 2005.

MAY, P.; MAY, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7621-7636, 1999.

MILNE A.N.; SITARZ R.; CARVALHO R.; CARNEIRO F.; OFFERHAUS G.J. Early onset gastric cancer: on the road to unraveling gastric carcinogenesis. **Curr. Mol. Med.** v.7, p. 15-28, 2007.

MIOTTO E.; SABBIONI S.; VERONESE A.; CALIN G.A.; GULLINI S.; LIBONI A.; GRAMANTIERI L.; BOLONDI L.; FERRAZZI E.; GAFÀ R.; LANZA G.; NEGRINI M. Frequent aberrant methylation of the CDH4 gene promoter in human colorectal and gastric cancer. **Cancer Res.** v.64, p. 8156-8159, 2004.

MITANI Y.; OUE N.; HAMAI Y.; AUNG P.P.; MATSUMURA S.; NAKAYAMA H.; KAMATA N.; YASUI W. Histone H3 acetylation is associated with reduced p21(WAF1/CIP1) expression by gastric carcinoma. **J. Pathol.** v. 205, p. 65-73, 2005.

MUNOZ N.; CORREA P.; CUELLO C.; DUQUE E. Histologic types of gastric carcinoma in high and low-risk areas. **Int. J. Cancer**, v. 3, p. 809-818, 1968.

MUÑOZ N., Gastric Carcinogenesis. In: Reed PI, Hill MJ, eds. Gastric carcinogenesis: proceedings of the 6th Annual **Symposium of** the European Organization for 83 Cooperation in Cancer Prevention Studies (ECP). **Amsterdam: Elsevier Science**, p. 51-69, 1988.

NISHIGAKI M.; AOYAGI K.; DANJOH I.; FUKAYA M.; YANAGIHARA K.; SAKAMOTO H.; YOSHIDA T.; SASAKI H. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. **Cancer Res.** v. 65, p. 2115-2124, 2005.

NOLLET F.; KOOLS P.; VAN ROY F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. **J. Mol. Biol.**, v.299, p. 551–572, 2000.

PARK S.Y.; KOOK M.C.; KIM Y.W.; CHO N.Y.; JUNG N.; KWON H.J.; KIM T.Y.; KANG G.H. CpG island hypermethylator phenotype in gastric carcinoma and its clinicopathological features. **Virchows Arch.** v. 457, p. 415-422, 2010.

PARKIN D.M. International variation. **Oncogene**, v. 23, p. 6329-6340, 2004.

PEINADO H.; PORTILLO F.; CANO A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 48, p. 365-375, 2004.

QIAO Y.L.; DAWSEY S.M.; KAMANGAR F.; FAN J.H.; ABNET C.C.; SUN X.D.; JOHNSON L.L.; GAIL M.H.; DONG Z.W.; YU B.; MARK S.D.; TAYLOR P.R. Total

and cancer mortality after supplementation with vitamins and minerals: follow-up of the Linxian General Population Nutrition Intervention Trial. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 101, p. 507-518, 2009.

RIEGER-CHRIST K.M.; LEE P.; ZAGHA R. Novel expression of N-cadherin elicits in vitro bladder cell invasion via the Akt signaling pathway. **Oncogene**, v. 23, p. 4745–47, 2004.

ROSIVATZ E.; BECKER I.; BAMBA M.; SCHOTT C.; DIEBOLD J.; MAYR D.; HÖFLER H.; BECKER K.F. Neoexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. **Int. J. Cancer**, v. 111, p. 711–719, 2004.

SAPARI N.S.; LOH M.; VAITHILINGAM A.; SOONG R. Clinical potential of DNA methylation in gastric cancer: a meta-analysis. **PLoS One**, v.7, p. e36275, 2012.

SARBIA M.; BECKER K.F.; HOFER H. Pathology of upper gastrointestinal malignancies. **Semin. Oncol.** v. 31, p. 465-475, 2004.

SEO D.D.; LEE H.C.; KIM H.J. Neural cadherin overexpression is a predictive marker for early postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 23, p. 1112–1118, 2008.

SHARMA A.; RADHAKRISHNAN V. Gastric cancer in India. **Indian J. Med. Paediatr. Oncol.** v. 32, p. 12-16, 2011.

SHITARA K.; OHTSU A. Ramucirumab for gastric cancer. **Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.** v.9, p.133-139, 2015.

SILVA, R.L.A. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: Oncologia Molecular, FERREIRA, C.G. e ROCHA, J.C.. 1ª. Ed. Atheneu, 2004, cap. 3, p. 29-42.

SU Y.; LI J.; WITKIEWICZ A. K. N-cadherin haploinsufficiency increases survival in a mouse model of pancreatic cancer. **Oncogene**, v.31, p. 4484–4489, 2012.

SUN Y.; LI J.Y.; HE J.S.; ZHOU L.X.; CHEN K. Tissue microarray analysis of multiple gene expression in intestinal metaplasia, dysplasia and carcinoma of the stomach. **Histopathology**, v. 46, p. 505-514, 2005.

TAHARA E.; SEMBA S.; TAHARA H. Molecular biological observations in gastric cancer. **Semin. Oncol.** v.23, p. 307-315, 1996.

THIERY J.P. Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 442-454, 2002.

THIEL A.; RISTIMAKI A. Targeted therapy in gastric cancer. **APMIS**. v. 123, p. 365-372, 2015.

TSUGANE, S.; SASAZUKI, S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. **Gastric Cancer**, v.10, p.75-83, 2007.

XIANGMING C.; HOKITA S.; NATSUGOE S.; TANABE G.; BABA M.; TAKAO S.; KUROSHIMA K.; AIKOU T. Co-occurrence of reduced expression of alpha-catenin and overexpression of p53 is a predictor of lymph node metastasis in early gastric cancer. **Oncology**, v. 57, p. 131–137, 1999.

ZABALETA J. Multifactorial etiology of gastric cancer. **Methods Mol. Biol.**, v.863, p. 411-435, 2012.

ZHAN, D.,Q.; WEI, S.; LIU, C.; LIANG, B. Y.; JI, G. B.; CHEN, X. P.; XIONG, M.;

HUANG, Z. Y. Reduced N-cadherin expression is associated with metastatic potential and poor surgical outcomes of hepatocellular carcinoma. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 27, p. 173-180, 2012.

WHEELOCK M. J.; JOHNSON K. R. Cadherins as modulators of cellular phenotype. **Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.** v. 19, p.207-35, 2003.

WISEMAN M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. **Proc. Nutr. Soc.** v. 67, p.253–6, 2008.

IMUNOEXPRESSÃO DAS CADERINAS E e N EM CARCINOMAS GÁSTRICOS PRIMÁRIOS E RESPECTIVAS METÁSTASES LINFONODAIS - QUADRO GERAL – DADOS BRUTOS																					
				Imunoexpressão de Caderina-E				Imunoexpressão de Caderina-N													
				Tumor: sítios anatômicos		Mucosa não tumoral		Tumor: sítios anatômicos				Mucosa não tumoral									
				Células tumorais		Células epiteliais		EST		LN		MI		N							
Nº CASOS	SEXO	IDADE	CLASS. LAUREN	EST	LN	MI	N	C.N	Mono	C.N	Mono	C.N	Mono	C.N	Mono	pTN(M)		Local Tumor	Tumor (cm)	Inv. Ang	Inv. Peri
1	M	54	DIF	Rdz	Rdz	...	Prsv	-	+	-	-	+	-	T3	N2	ANTRO	≥ 5	A	P
2	M	40	DIF	Prsv	Prsv	...	Prsv	-	-	-	+	T3	N1	CORPO	≥ 5	P	P
3	F	72	INT	Prsv	Prsv	-	+	+	-	T3	N2	CORPO	≥ 5	A	A
4	M	50	DIF	Prsv	Prsv	+	-	-	+	T3	N3b	COR+ANT	≥ 5	P	P
5	M	65	DIF	Rdz	Rdz	+	Aus.	-	Aus.	T3	N2	CORPO	≥ 5	P	P
6	F	72	INT	Prsv	Prsv	-	-	-	-	T1b	N2	CORPO	≥ 5	P	#
7	F	42	DIF	Prsv	*	...	Prsv	-	+	*	*	+	-	T3	N0	ANTRO	≥ 5	A	#
8	F	48	INT	Rdz	Prsv	-	+	-	+	T3	N2	CORPO	≥ 5	A	A
9	F	42	DIF	Prsv	Prsv	-	+	-	-	T3	N3a	CORPO	≥ 5	P	P
10	M	48	INT	Prsv	*	...	Prsv	-	-	*	*	+	-	T3	N0	ANTRO	≥ 5	A	A
11	M	45	DIF	Rdz	Prsv	-	-	-	Aus.	T3	N2	CORPO	≥ 5	P	#
12	M	58	DIF	Rdz	Rdz	-	-	-	-	T3	N3a	CORPO	≥ 5	P	P
13	M	61	DIF	Rdz	*	-	-	*	*	T3	N0	CORPO	≥ 5	P	#
14	M	39	DIF	Prsv	Prsv	-	-	-	-	T3	N3	CORPO	≥ 5	P	#
15	M	71	INT	Rdz	Prsv	Prsv	...	-	-	-	-	-	-	T3	N3a	CORPO	≥ 5	A	P
16	F	54	DIF	Prsv	*	Prsv	Prsv	-	+	*	*	T2a	N0	CORPO	< 5	A	A
17	M	65	INT	Prsv	Prsv	Prsv	Prsv	-	+	+	-	+	-	T3	N1	ANTRO	< 5	A	A
18	M	68	DIF	Prsv	Prsv	T3	N3	ANTRO	≥ 5	P	P
19	M	74	DIF	Prsv	Prsv	-	+	-	-	T3	N2	CORPO	≥ 5	P	P
20	M	55	DIF	Prsv	Prsv	Prsv	Prsv	+	-	-	-	+	+	+	+	T3	N3a	ANTRO	≥ 5	A	A
21	F	69	INT	...	*	-	+	*	*	T1b	N0	ANTRO	< 5	A	A
22	M	66	INT	Prsv	-	-	T2	N2	CORPO	≥ 5	P	A
23	M	86	INT	Prsv	*	...	Prsv	-	-	*	*	+	+	T3	N0	CORPO	≥ 5	A	#
24	M	73	INT	Prsv	Prsv	Prsv	Prsv	-	+	-	-	+	-	T3	N2	ANTRO	≥ 5	P	#
25	F	70	INT	Prsv	*	...	Prsv	-	-	*	*	T1b	N0	ANTRO	< 5	A	A

APÊNDICE – Quadro Geral da Expressão de Caderina-E e Caderina-N no Câncer Gástrico

IMUNOEXPRESSÃO DAS CADERINAS E e N EM CARCINOMAS GÁSTRICOS PRIMÁRIOS E RESPECTIVAS METÁSTASES LINFONODAIS - QUADRO GERAL – DADOS BRUTOS																					71	
				Imunoexpressão de Caderina-E				Imunoexpressão de Caderina-N														
				Tumor: sítios anatômicos		Mucosa não tumoral		Tumor: sítios anatômicos				Mucosa não tumoral										
				Células tumorais		Células epiteliais		EST		LN		MI		N								
Nº CASOS	SEXO	IDADE	CLASS. LAUREN	EST	LN	MI	N	C.N	Mono	C.N	Mono	C.N	Mono	C.N	Mono	pTN(M)		Local Tumor	Tumor (cm)	Inv. Ang	Inv. Peri	
26	F	67	DIF	Rdz	*	Prsv	Prsv	-	Aus.	*	*		...	+	-	T4	N0	ANTRO	≥ 5	A	A	
27	F	62	INT	Prsv	*	...	Prsv	-	-	*	*	T3	N0	CORPO	≥ 5	P	A	
28	M	57	INT	Rdz	Rdz	Prsv	Prsv	-	+	-	-	+	-	+	+	T2	N2	CORPO	≥ 5	A	A	
29	F	68	INT	Prsv	Prsv	...	Prsv	-	-	-	-	+	-	T3	N2	COR+ANT	≥ 5	P	#	
30	M	69	DIF	Prsv	Prsv	-	+	-	-	T3	N1	CORPO	≥ 5	P	P	
31	M	59	DIF	Prsv	Prsv	...	Prsv	-	-	-	-	+	-	T3	N2	CORPO	≥ 5	P	P	
32	F	68	INT	Rdz	...	Rdz	Prsv	-	-	-	-	T3	N1	ANTRO	≥ 5	A	#	
33	F	81	INT	Prsv	*	...	Prsv	-	+	*	*	-	-	T1	N0	CORPO	≥ 5	A	#	
34	F	73	INT	Prsv	Prsv	...	Prsv	+	+	-	-	-	-	T3	N1	CORPO	≥ 5	P	#	
35	M	51	DIF	Rdz	Prsv	...	Prsv	-	-	-	-	+	-	T3	N1	ANTRO	≥ 5	A	P	
36	F	70	INT	Prsv	...	Prsv	Rdz	-	+	-	+	T2	N1	CORPO	≥ 5	P	A	
37	M	72	INT	Prsv	Prsv	...	Prsv	-	+	-	Aus.	-	+	T3	N2	CORPO	≥ 5	P	A	
38	M	64	DIF	Rdz	Rdz	...	Prsv	-	+	-	-	-	+	T3	N2	CORPO	≥ 5	P	P	
39	F	57	DIF	Rdz	*	...	Prsv	-	+	*	*	+	+	T1	N0	CORPO	≥ 5	P	A	
40	M	66	INT	Rdz	*	Prsv	Prsv	-	+	*	*	-	+	+	-	T3	N0	CORPO	≥ 5	A	A	
41	F	59	DIF	Prsv	Prsv	...	Prsv	-	+	-	-	-	+	T3	N1	CORPO	< 5	A	#	
42	M	41	DIF	Rdz	Prsv	...	Prsv	-	+	-	-	+	+	T3	N2	ANTRO	< 5	A	#	
43	M	59	DIF	Prsv	Prsv	...	Prsv	-	-	-	-	+	+	T3	N1	ANTRO	≥ 5	P	#	
44	M	61	DIF	Prsv	Prsv	Prsv	Prsv	-	+	-	+	-	+	T3	N1	CORPO	≥ 5	P	#	
45	F	63	INT	Prsv	Prsv	-	-	-	-	T2	N3	ANTRO	≥ 5	A	A	
46	M	63	INT	Prsv	Prsv	...	Prsv	-	-	-	-	T3	N3a	ANTRO	< 5	A	A	
47	M	75	INT	Prsv	Prsv	Prsv	Prsv	-	+	-	-	-	-	T3	N3a	CORPO	≥ 5	P	P	
48	F	50	INT	Prsv	Prsv	-	-	+	-	T1b	NX	CORPO	≥ 5	A	A	
49	F	39	DIF	Prsv	Prsv	-	-	T3	N2	ANTRO	≥ 5	P	P	
50	F	72	INT	Prsv	*	Prsv	Prsv	-	+	*	*	-	+	+	+	T2	N0	ANTRO	< 5	A	A	
51	M	75	INT	Prsv	Prsv	-	-	-	-	+	+	T2	N1	CORPO	≥ 5	P	#	

Siglas: EST=Estômago LN=Linfonodo MI=Metaplasia Intestinal N= Normal CN= Células neoplásicas Mono=mononucleares
Inv.Ang= Invasão angiolinfática Inv. Per= Invasão perineural Rdz=expressão reduzida Prsv=expressão preservada INT= Intestinal DIF= Difuso
*= NO Aus.=Ausente ... = Amostra Insuficiente #= Não Avaliável A= Ausência P= Presença