



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

NELI PATRICIA PEREIRA FEITOSA

**IMUNOEXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO, CD44 E CD133, NO
CÂNCER GÁSTRICO PRIMÁRIO E METÁSTASES LINFONODAIS**

FORTALEZA

2015

NELI PATRICIA PEREIRA FEITOSA

IMUNOEXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO, CD44 E CD133, NO
CÂNCER GÁSTRICO PRIMÁRIO E METÁSTASES LINFONODAIS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de Concentração: Oncologia

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

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Leite Vieira da Costa (UFC)

FORTALEZA
2015

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

-
- F336i Feitosa, Neli Patricia Pereira.
Imunoexpressão de marcadores de células-tronco, CD44 e CD133, no câncer gástrico primário e metástases linfonodais / Neli Patricia Pereira Feitosa. – 2015.
67 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, 2015.
Área de Concentração: Oncologia.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida.
Coorientação: Prof. Dr. Marcelo Leite Vieira da Costa.
1. Neoplasias Gástricas. 2. Células-Tronco. 3. Antígenos CD44. I. Título.

CDD 616.99433

NELI PATRICIA PEREIRA FEITOSA

IMUNOEXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO, CD44 E CD133, NO
CÂNCER GÁSTRICO PRIMÁRIO E METÁSTASES LINFONODAIS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de Concentração: Oncologia

Aprovada em: 30 de junho de 2015

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Miguel Ângelo Nobre e Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Paulo Roberto Carvalho de Almeida**, pela paciência, sabedoria, generosidade, compreensão e compromisso.

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dra. Rosane Oliveira de Sant'Ana**, **Prof^a. Dr^a. Margarida Maria de Lima Pompeu**, **Prof. Dr. Miguel Ângelo Nobre e Souza** pela aceitação e disponibilidade de participar e contribuir para o melhoramento deste trabalho.

Aos servidores do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, que tanto colaboraram para a concretização deste projeto.

A três servidoras em especial, **Paula da Paz Palácio e Valéria Cordeiro**, que sempre me ajudaram da melhor forma possível nas mais diversas ocasiões e **Susana Moreira Souza**, pelo seu trabalho criterioso e competente na realização da imunohistoquímica.

Ao servidor **Alceu Machado de Sousa** pela sua valiosa contribuição na construção e microtomia do *tissue microarray*.

“O que as vitórias têm de mau
é que não são definitivas.
O que as derrotas têm de bom
é que também não são definitivas”.

José Saramago

RESUMO

O câncer gástrico é a quarta neoplasia mais comum em todo o mundo, representando a segunda causa de mortalidade por câncer. Apesar do tratamento com cirurgia e quimioterapia, a sobrevida global em cinco anos de pacientes com câncer gástrico permanece baixa. Uma possível explicação para ineficácia da terapia é a presença de células-tronco cancerosas, uma subpopulação de células tumorais que apresentam características de células-tronco. Estas células, assim como as células tronco embrionárias, são consideradas imortais, podem se auto-renovar e se transformar em qualquer célula do corpo. Vários marcadores, incluindo CD44 e CD133, têm sido relatados como marcadores de células-tronco, normais e cancerosas, e utilizados para isolar células cancerosas de tumores sólidos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de CD44 e de CD133, no câncer gástrico primário e metástases linfonodais, através de imunohistoquímica, e relacioná-la com as variáveis clínico-patológicas de tipo histológico, sexo, idade, localização anatômica, dimensão do tumor, invasão angiolinfática, infiltração perineural, classificação TNM (TN) e acometimento linfonodal. Este estudo foi desenvolvido a partir de um conjunto de 72 casos de adenocarcinoma gástrico, dos Arquivos do Serviço de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML-UFC). Utilizou-se a técnica de *tissue microarray* associada à imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti-CD44 e policlonal anti-CD133. Foram considerados positivos os casos que apresentaram uma ou mais células com imunomarcagem citoplasmática e/ou membranar. Foi observado que 30% das amostras foram positivas para o CD44. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as variáveis clínico-patológicas estudadas e a imunoexpressão de CD44. A imunoexpressão do CD133 foi positiva em 24% das amostras. O grau de invasão do tumor apresentou dados com tendência estatisticamente significativa ($p=0,0505$), de forma inversa. Nas demais variáveis, não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa. A imunoexpressão de CD133 na mucosa histologicamente normal foi maior do que no tumor primário e na metaplasia intestinal, com diferença estatística significativa ($p=0,0159$ e $p=0,0058$, respectivamente). A imunoexpressão de CD133 no adenocarcinoma gástrico tipo intestinal foi significativamente maior na mucosa histologicamente normal do que na metaplasia ($p=0,0260$). A frequência da expressão desses marcadores é muito variável, e mesmo nas amostras consideradas positivas, o percentual de células coradas também é variável, e em geral muito baixo.

Palavras-chave: Câncer gástrico. Células-tronco. CD44. CD133.

ABSTRACT

Gastric cancer is the fourth most common cancer worldwide, accounting for the second leading cause of cancer mortality. Despite treatment with surgery and chemotherapy, the overall five-year survival of patients with gastric cancer remains low. One possible explanation for the ineffectiveness of therapy is the presence of cancer stem cells, a subpopulation of tumor cells that have stem cell characteristics. It has been reported that these, as well as embryonic stem cells, are immortal, can self-renew and to differentiate to be transformed in any cell type in the body. Several markers, including CD44 and CD133, have been reported as stem cell markers in both normal and cancerous cells and have been used to isolate cancer cells from solid tumors. The aim of this study was to evaluate the expression of CD44 and CD133 in primary gastric cancer and lymph node metastases by immunohistochemical and to relate it to clinicopathologic variables as histological type, gender, age, anatomical site, tumor size, angiolymphatic invasion, infiltration perineural, TNM classification (TN) and lymph node involvement. This study was developed from a set of 72 cases of gastric adenocarcinoma, from the Archives of Pathology and Forensic Medicine of the Federal University of Ceará Service (DPML-UFC). Tissue microarray and immunohistochemistry were utilized, with anti-CD44 monoclonal antibody and polyclonal anti-CD133. The cases with one or more cells with cytoplasmic and / or membrane immunostaining were considered positives. It was observed that 30% of the samples were positive for CD44. No statistically significant differences were found between the clinical and pathological variables studied and the immunoreactivity of CD44. Regarding the immunoreactivity of CD133, the present study showed that 24% of samples were positive. The degree of tumor invasion presented data showing a statistically significant trend ($p = 0.0505$), in reverse. The other variables, we found no statistically significant difference. The immunoreactivity of CD133 in histologically normal mucosa was higher than in the primary tumor and intestinal metaplasia, with statistically significant difference ($p = 0.0159$ and $p = 0.0058$, respectively). The CD133 immunostaining in intestinal type gastric carcinoma was significantly higher than in the histologically normal mucosal metaplasia ($p = 0.0260$). The frequency of expression of these markers is highly variable, and even in the samples considered positive, the stained cells percentage is also variable, and very low overall.

Keywords: Gastric cancer. Stem cells. CD44. CD133.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| 1 | Imunoexpressão de CD44 e de CD133: controles negativo e positivo..... | 29 |
| 2 | Imunoexpressão de CD44 no tumor gástrico primário tipo difuso..... | 33 |
| 3 | Imunoexpressão de CD44 no tumor gástrico primário tipo intestinal..... | 33 |
| 4 | Imunoexpressão de CD44 em metástase linfonodal de carcinoma tipo intestinal..... | 34 |
| 5 | Imunoexpressão de CD44 em metástase linfonodal de carcinoma tipo difuso..... | 34 |
| 6 | Imunoexpressão de CD44 em mucosa gástrica normal e metaplasia intestinal..... | 35 |
| 7 | Imunomarcção de CD44 em mucosa gástrica normal..... | 36 |
| 8 | Imunomarcção de CD133 no tumor gástrico primário..... | 40 |
| 9 | Imunomarcção de CD133 em metástase linfonodal de carcinoma tipo intestinal..... | 41 |
| 10 | Expressão do CD133 no tumor primário e no tecido normal em pacientes com adenocarcinoma gástrico..... | 42 |
| 11 | Imunoexpressão de CD133 na mucosa gástrica normal..... | 43 |
| 12 | Expressão de CD133 na metaplasia intestinal e no tecido normal em pacientes com adenocarcinoma gástrico..... | 44 |
| 13 | Expressão de CD133 na metaplasia intestinal e no tecido normal em pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal..... | 44 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|---|---|----|
| 1 | CD144 - nº de células positivas em mil células..... | 45 |
| 2 | CD133 - nº de células positivas em mil células..... | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----|---|----|
| 1 | Imunoexpressão de CD44 no tumor primário e variáveis clínico-patológicas..... | 31 |
| 2 | Expressão de CD44 em mucosa histologicamente normal, metaplasia intestinal, tumor primário e metástase linfonodal, em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso | 32 |
| 3 | Expressão de CD44 em células neoplásicas do tumor primário e metástase linfonodal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso..... | 32 |
| 4 | Expressão de CD44 em células neoplásicas do tumor primário e metaplasia intestinal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso..... | 35 |
| 5 | Expressão de CD44 em células neoplásicas do tumor primário e tecido normal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso..... | 36 |
| 6 | Expressão de CD44 em metaplasia intestinal e tecido normal nos carcinomas gástricos dos tipos intestinal e difuso | 37 |
| 7 | Imunoexpressão de CD133 no tumor primário e variáveis clínico-patológicas..... | 38 |
| 8 | Expressão de CD133 em mucosa histologicamente normal, metaplasia intestinal, tumor primário e metástase linfonodal, em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso | 39 |
| 9 | Expressão de CD133 em células neoplásicas do tumor primário e metástase linfonodal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso..... | 40 |
| 10 | Expressão de CD133 em células neoplásicas do tumor primário e metaplasia intestinal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso..... | 41 |
| 11 | Expressão de CD133 em células neoplásicas do tumor primário e tecido normal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso..... | 42 |
| 12 | Expressão de CD133 em metaplasia intestinal e mucosa histologicamente normal nos carcinomas gástricos dos tipos intestinal e difuso..... | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| Aldh1 | Aldehyde dehydrogenase 1 |
| DPML | Departamento de Patologia e Medicina Legal |
| HE | Hematoxilina-Eosina |
| HHJ | Hospital Haroldo Juaçaba |
| HUWC | Hospital Universitário Walter Cantídio |
| HRP | <i>Horse Raddish Peroxidase</i> |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| Lgr5 | Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 |
| Sox2 | Sex determining region Y-box 2 |
| Sox9 | Sex determining region Y-box 9 |
| TMA | <i>Tissue Microarray</i> |
| TNM | Estadiamento tumoral: topografia; linfonodos; metástases |
| UFC | Universidade Federal do Ceará |
| WHO | World Health Organization |

ANEXOS

I - Quadro geral – Dados brutos Imunoexpressão de CD44 e CD133 em carcinomas gástricos primários e respectivas metástases linfonodais.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 1.1 | Câncer gástrico – Epidemiologia..... | 13 |
| 1.2 | Classificação..... | 13 |
| 1.3 | Carcinogênese..... | 14 |
| 1.4 | Diagnóstico, tratamento e prognóstico..... | 15 |
| 1.5 | Células-tronco cancerosas..... | 17 |
| 1.6 | Marcadores de células-tronco e câncer gástrico..... | 18 |
| | | |
| 2 | OBJETIVOS..... | 22 |
| | | |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 23 |
| 3.1 | Casos e material utilizado..... | 23 |
| 3.2 | <i>Tissue microarray</i> | 24 |
| 3.3 | Imunohistoquímica..... | 25 |
| 3.4 | Escores | 26 |
| 3.5 | Controles..... | 27 |
| 3.6 | Avaliação individual e inter-observadores..... | 27 |
| 3.7 | Análise estatística..... | 27 |
| 3.8 | Aprovação no comitê de ética e pesquisa com seres humanos..... | 28 |
| | | |
| 4 | RESULTADOS..... | 29 |
| 4.1 | Controles..... | 29 |
| 4.2 | Imunomarcção de CD44 e variáveis clínico-patológicas..... | 29 |
| 4.3 | Distribuição da imunoexpressão de CD44 em células tumorais, metaplásicas e epiteliais normais | 32 |
| 4.4 | Imunomarcção de CD133 e variáveis Clínico-Patológicas | 37 |
| 4.5 | Distribuição da imunoexpressão de CD133 em células tumorais, metaplásicas e epiteliais normais..... | 39 |

| | | |
|----------|-------------------------|-----------|
| 5 | DISCUSSÃO..... | 48 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 55 |
| | REFERÊNCIAS..... | 56 |
| | ANEXOS..... | 62 |

1 INTRODUÇÃO

1.1. Câncer Gástrico – Epidemiologia

O câncer gástrico é a quarta neoplasia mais comum e a segunda causa de mortalidade por câncer em todo o mundo. É precedido em homens por câncer de pulmão, próstata e câncer colorretal. Nas mulheres é o quinto mais comum, sucedendo câncer de mama, colorretal, colo do útero e pulmão. Estima-se que, em 2012, o câncer gástrico foi responsável pela morte de 464 mil homens e 273 mil mulheres. É responsável por 10% dos casos de morte por câncer, apesar de sua menor prevalência em relação aos tumores de mama e próstata e de vir apresentando declínio em suas taxas de incidência e mortalidade (DHINGRA, 2011; GLOBOCAN, 2012; GUGGENHEIM e SHAH, 2012).

A incidência do câncer gástrico varia em diferentes partes do mundo e em vários grupos étnicos. As maiores taxas são encontradas no Japão, China, América do Sul, Europa Oriental, e Oriente Médio (SAIKAWA *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2011; YAMASHITA *et al.*, 2011; NAGINI, 2012).

No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, aparece em quarto lugar na incidência entre homens, precedido por próstata, pulmão e câncer colorretal, e em sexto entre as mulheres, sucedendo mama, colo de útero, câncer colorretal, pulmão e tireóide. O pico de incidência se dá em sua maioria em homens, por volta dos 70 anos. Cerca de 65% dos pacientes diagnosticados com câncer de estômago têm mais de 50 anos. No Brasil, a estimativa de novos casos em 2014 foi de 20.390 casos, sendo 12.870 homens e 7.520 mulheres, sendo a razão M/I (mortalidade por incidência) de 0,7 (INCA, 2014).

No Ceará, a estimativa de incidência para 100 mil habitantes, em 2014, foi de 1.230 novos casos, sendo 750 no sexo masculino e 480 no sexo feminino, e 280 em Fortaleza, 150 em homens e 130 em mulheres (INCA, 2014).

1.2. Classificação

São três os tipos histológicos mais comuns de câncer gástrico: adenocarcinoma, linfoma e leiomiossarcoma. Aproximadamente 95% dos casos de câncer gástrico são adenocarcinomas (INCA, 2014).

Foram descritos cerca de 40 subtipos histológicos em mais de uma dezena de classificações de carcinoma gástrico, inclusive o sistema da OMS (CARNEIRO *et al.*, 1995; WHO, 2010).

A classificação de Lauren descreve os dois tipos principais de adenocarcinoma gástrico, intestinal e difuso, que compreendem cerca de 90% de sua casuística, e tem sido utilizada preferencialmente, de forma universal, por sua abordagem clínica, epidemiológica e histológica, além de grande simplicidade e reprodutibilidade, tendo sido por isso utilizada neste trabalho (LAUREN, 1965). O tipo intestinal, bem diferenciado, contém células neoplásicas coesas e forma estruturas tubulares tipo glândulas, bem definidas, que frequentemente ulceram. É mais prevalente em pessoas idosas do sexo masculino, em regiões de alto risco, e possui melhor prognóstico. Surge a partir de lesões pré-cancerosas e é influenciado por fatores ambientais. O tipo difuso, pouco diferenciado, é caracterizado pela infiltração e espessamento da parede do estômago. As células neoplásicas encontram-se dispersas ou formando pequenos cachos, os chamados “*clusters*”. É mais frequente em mulheres e em pacientes jovens, e é mais prevalente em indivíduos do tipo sanguíneo A, e parece ter uma associação com a susceptibilidade genética (NAGINI, 2012).

1.3. Carcinogênese

A carcinogênese gástrica é um processo multifatorial, de várias etapas, que leva ao acúmulo de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas (DHINGRA *et al.*, 2011; WAKAMATSU *et al.*, 2011). Além da aquisição dessas mutações, interações entre as células tumorais e o seu microambiente (estroma, vasculatura e células inflamatórias) desempenham uma profunda influência sobre o processo de tumorigênese (VISVADER e LINDEMAN, 2008).

O adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal é precedido por um longo processo pré-canceroso, que inclui, gastrite crônica atrófica multifocal, metaplasia intestinal, displasia de baixo grau, displasia de alto grau (carcinoma *in situ*), e finalmente o carcinoma invasivo, associado a degradação da matriz intercelular (CORREA; PIAZUELO, 2012). Surge muitas vezes no contexto da inflamação crônica pelo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (WANG *et al.*, 2011). Essa infecção é um forte fator de risco para o câncer gástrico, provavelmente devido à extensa inflamação causada por essa bactéria na mucosa gástrica. Entretanto, considerando que somente uma pequena porção de sujeitos infectados por *H. pylori* eventualmente

desenvolve câncer gástrico, admite-se que esse processo dependa de alguns fatores, como a variabilidade da cepa do *H. pylori* e outros relacionados ao hospedeiro (KIM *et al.*, 2012; CORREA; PIAZUELO, 2012).

Na carcinogênese do carcinoma gástrico tipo difuso, a infecção pelo *H. pylori* parece ter papel de menor relevância. Neste caso, fatores ambientais ou do estilo de vida dos pacientes (por exemplo, tabagismo, baixo consumo de frutas e vegetais, alta ingestão de sódio) são da maior importância, e sobretudo, fatores genéticos bem determinados, como as mutações do gene da caderina-E em carcinomas difusos esporádicos e hereditários (SHIMOYAMA; HIROHASHI, 1991; WHO, 2010).

Dados disponíveis sugerem uma associação entre dieta à base de alimentos ricos em nitritos, nitrosaminas, carne, carne processada, alimentos em conserva e defumados, e um aumento no risco de desenvolvimento de câncer gástrico (JAKSZYN; GONZÁLEZ, 2006). A ingestão de carne vermelha, em relação à carne branca, contribui de forma significativa para a produção endógena de compostos nitrosos (BINGHAM *et al.*, 1996). Os alimentos asiáticos, em relação aos alimentos ocidentais, apresentam nitrosaminas em maior concentração e em maior frequência (HOTCHKISS, 1998). Agentes nitrosantes também são produzidos em condições inflamatórias crônicas (BARTSCH; SPIEGELHALDER, 1996).

Outro fator que indica a associação entre hábitos de vida e câncer gástrico é que a incidência da doença em determinados grupos étnicos varia de acordo com o local em que esses imigrantes vivem (TSUGANE; SASAZUKI, 2007).

Entretanto, apesar de convencionalmente aceito que dieta e nutrição desempenham um papel importante na carcinogênese gástrica, ainda não foram estabelecidos os mecanismos para os padrões de incidência e geográficos observados (VISVADER; LINDEMAN, 2008).

1.4 Diagnóstico, tratamento e fatores prognósticos

Apesar dos avanços no diagnóstico, a detecção da doença ocorre em geral mais tardiamente, após a invasão da muscular própria, mesmo em alguns países desenvolvidos. Nos estágios iniciais da doença, os pacientes apresentam sintomas vagos e inespecíficos. A tríade clássica anemia, perda ponderal e recusa de alimentos à base de carne só é observada nos estágios mais avançados da doença (NAGINI, 2012).

A despeito dos avanços nas abordagens terapêuticas, tratamento cirúrgico e terapias adjuvantes, o câncer gástrico continua a ser um problema de saúde pública global. A ressecção cirúrgica é o melhor tratamento curativo para os casos de diagnóstico precoce, com sobrevida global em cinco anos variando de 50% a 70%. Entretanto, a maior parte dos casos é diagnosticado no seu estado avançado, quando então a sobrevida cai para 4% a 10%. Para estes pacientes, a quimioterapia é a principal opção de tratamento (DURÃES *et al.*, 2014).

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). A cisplatina é um importante fármaco quimioterápico utilizado no tratamento para o câncer gástrico avançado, e combinado com S-1 (combinação de tegafur, gimeracil e oteracil), demonstrou aumento da sobrevida global mediana em 76%, com toxicidade tolerável (KOIZUMI *et al.*, 2003). O tratamento cirúrgico associado a quimioterapia com S-1 mostrou uma maior taxa de sobrevivência global em um ano do que o tratamento cirúrgico isolado, e a sobrevida em 3 anos foi de 80,1% em um grupo de pacientes tratados com S-1 e cirurgia, enquanto que a de pacientes tratados apenas com cirurgia a sobrevida foi de 70,1% (SAKURAMOTO *et al.*, 2007). A taxa de resposta ao tratamento com S-1 associado a cirurgia, nos casos de câncer gástrico avançado, foi superior a 40% (SAKATA *et al.*, 1998; KOIZUMI *et al.*, 2000). Em uma revisão sistemática, observou-se uma redução da mortalidade de câncer gástrico em mais de 40% em pacientes submetidos a QT tradicional (LACOVELLI *et al.*, 2014). Observou-se também elevação na sobrevida de pacientes com cancer gástrico avançado, através da utilização de trastuzumab (THIEL *et al.*, 2015). O Ramucirumab, outro anticorpo monoclonal, também mostrou resultados promissores (THIEL *et al.*, 2015; SHITARA *et al.*, 2015).

Os principais fatores prognósticos em pacientes com câncer gástrico, como nos demais tipos de câncer, dependem do estadiamento do tumor, através do sistema TNM (invasão local pelo tumor, *status* linfonodal e sobretudo metástases à distância, por via hematogênica (SOBIN *et al.*, 2009; WU *et al.*, 1997; WAKAMATSU *et al.*, 2011). A dissecação estendida de linfonodos melhora de forma significativa a sobrevida a longo prazo de pacientes com tumores estágio II, e não aumenta a taxa de morbidade ou mortalidade. O volume tumoral também é considerado outro fator prognóstico independente. A análise univariada de possíveis fatores relacionados ao prognóstico de 101 pacientes submetidos a ressecção curativa para câncer gástrico demonstrou diferenças significativas na sobrevida dos pacientes, com relação à profundidade de invasão do tumor, *status* linfonodal, diâmetro e volume do tumor (KIKUCHI, 2000).

A invasão direta e a carcinomatose peritoneal são os sítios mais comuns de metástases da doença. A disseminação hematogênica é menos frequente, ocorrendo para fígado (40%), pulmão (20%) e ossos (2%) (BRUCKNER *et al.*, 1997)

Muitos pacientes morrem em consequência de metástases ou recorrência, mesmo após rigorosa terapia. Até hoje, os mecanismos de controle da invasão e metástase continuam a ser estudados (YANG *et al.*, 2011).

Uma possível explicação para ineficácia da terapia é a presença de células-tronco cancerosas (SIMON *et al.*, 2012). Evidências sugerem que o tumor é um conglomerado de populações de células heterogêneas. Somente uma subpopulação desse conglomerado mantém a capacidade de formação de colônias, e daí a recorrência e metástase (SIMON *et al.*, 2012, NAGINI, 2012).

Em virtude da insuficiência dos tratamentos tradicionais, as células-tronco cancerosas vêm recebendo grande atenção na investigação oncológica, sendo descritas como potenciais alvos terapêuticos no tratamento do câncer gástrico (SINGH, 2013).

1.5. Células-tronco cancerosas

Células-tronco são células indiferenciadas, capazes de proliferação, auto-renovação, produção de descendentes com funções diferenciadas, regeneração de tecidos após uma lesão e flexibilidade na utilização dessas reações (ROEDER e LOEFFLER, 2002). Quando presentes no embrião, são designadas células-tronco embrionárias, podendo também ser encontradas em tecidos adultos, sendo então denominadas células-tronco adultas (VOGEL, 2000).

As células-tronco gástricas desempenham um papel essencial na auto-renovação e na homeostase da mucosa gástrica, sendo cruciais no reparo do epitélio após lesão. Essas células-tronco normais, indiferenciadas e multipotentes, foram caracterizadas na região do istmo e criptas profundas da mucosa, na região do antro ou fundo gástrico (MILLS *et al.*, 2011; HOFFMANN, 2011; HOFFMANN, 2012; ZHAO, Y. *et al.*, 2015).

Células-tronco cancerosas são uma subpopulação de células tumorais que apresentam características de células-tronco (LEE *et al.*, 2012). Tem sido relatado, à semelhança das células-tronco normais, que as células-tronco cancerosas, assim como as células-tronco embrionárias, são imortais, podem se auto-renovar e se transformar em qualquer célula do corpo (ISHIGAMI *et al.*, 2010). Teriam sua origem a partir de células-tronco específicas do tecido normal, com capacidade de iniciação tumoral, mas em contraste com as células-tronco

normais, exibem uma maneira desregulada de se auto-renovar e se diferenciar, resultando na produção de tumores sólidos (JIANG *et al.*, 2011).

Existem dois modelos para explicar a propagação e heterogeneidade tumoral: o modelo estocástico (ou probabilístico) e o modelo hierárquico (das células-tronco). No primeiro, todas as células possuem capacidade tumorigênica similar. Já no modelo hierárquico, apenas as células-tronco tem a capacidade de gerar um novo tumor, em virtude de suas propriedades de se auto-renovar e do seu enorme potencial proliferativo. Entretanto, as células-tronco cancerosas não surgem necessariamente a partir da transformação de células-tronco normais. Elas podem surgir de progenitores restritos ou de células mais diferenciadas que adquiriram a capacidade de se auto-renovar (VISVADER; LINDEMAN, 2008).

Recentemente, o interesse em células-tronco no câncer gástrico surgiu no contexto mais amplo da hipótese da presença dessas células em tumores sólidos (DHINGRA *et al.*, 2011). Essas células, inicialmente detectadas em leucemias e tumores cerebrais, foram posteriormente descritas em câncer de pâncreas, próstata, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal (ISHIGAMI *et al.*, 2010), além de câncer de mama e de cabeça e pescoço (WANG *et al.*, 2011).

1.6. Marcadores de células-tronco e câncer gástrico

Há uma expectativa de que moléculas expressas em células-tronco normais possam servir como marcadores de células-tronco cancerosas (WANG *et al.*, 2011). Vários possíveis marcadores já foram descritos. Estudos *in vitro* têm demonstrado o Lgr5 como um marcador de células-tronco em intestino, cólon e folículo capilar em camundongos (BARKER *et al.*, 2007). Foi mais recentemente relatado no antro gástrico, na base da glândula pilórica, sendo as células Lgr5 positivas identificadas como células estaminais multipotentes, responsáveis pela renovação a longo prazo do epitélio gástrico (BARKER *et al.*, 2010). No câncer gástrico, foi identificado na superfície luminal, no centro de tumor e nas células da frente da invasão tumoral (SIMON *et al.*, 2012). O Musashi-1, expresso na região do istmo do antro no estômago humano normal, mostrou-se fracamente expresso no câncer gástrico inicial, mas elevado no câncer gástrico invasivo (AKASAKA *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2010). O Sox2 teve sua expressão associada a invasão tumoral e metástase linfonodal (ARNOLD *et al.*, 2011), sendo por vezes fortemente expresso em amostras de câncer gástrico primário

(KIMURA *et al.*, 2011), enquanto que o Sox9, fracamente expresso na região do istmo do corpo gástrico normal, e moderadamente no antro, teve forte expressão identificada através de imunohistoquímica, em 46 amostras de mucosa gástrica neoplásica (KIMURA *et al.*, 2011). Outro candidato a biomarcador, o Aldh1, identificado no citoplasma de células parietais, teve alta expressão no câncer gástrico e em lesões metaplásicas (ZHI *et al.*, 2011; WAKAMATSU *et al.*, 2011; NISHIKAWA *et al.*, 2013). O Oct4, considerado um marcador de pluripotência, identificado na região do istmo do antro em estômago humano, através de imunocoloração, teve sua expressão aumentada nos casos de no câncer gástrico (AL-MARZOQEE, 2012).

Os marcadores CD44 e CD133 têm sido relatados como marcadores de células-tronco, normais e cancerosas, e utilizados para identificar e isolar células cancerosas de tumores sólidos (WAKAMATSU *et al.*, 2011). A alta expressão de CD44 e CD133 em amostras de câncer gástrico mostraram valor prognóstico de pior sobrevida do paciente ($p = 0,014$ e $P = 0,019$, respectivamente) (WANG *et al.*, 2011).

CD44 é uma glicoproteína transmembrana classe I, que pode atuar como um receptor para componentes das matrizes extracelulares, como o ácido hialurônico (YAMAGUCHI *et al.*, 2002; QIAO; GUMUCIO, 2011). Este marcador é expresso na superfície das células sanguíneas e no endotélio e participa de muitos processos celulares, incluindo crescimento, sobrevivência, diferenciação e mobilidade, apresentação de quimiocinas e fatores de crescimento, absorção e degradação celular de ácido hialurônico e transmissão de sinais de apoptose e que medeiam a hematopoiese (NAOR *et al.*, 1997; NORASTI *et al.*, 2014). É uma molécula de adesão que desempenha um papel na migração de células cancerosas e na adesão da matriz em resposta ao microambiente celular, aumentando assim a agregação celular e o crescimento da célula tumoral (DHINGRA *et al.*, 2011).

Diferentes isoformas do CD44 tem sido detectadas numa variedade de tumores humanos, como colorretal, mama, pulmão e estômago (YAMAGUCHI *et al.*, 2002). Estudo recente identificou o CD44 como um marcador de células-tronco em câncer gástrico. Células do câncer gástrico CD44 positivas demonstraram propriedades de quimio e radio-resistência, o que provavelmente é responsável pela refratariedade desse tipo de tumor aos protocolos de tratamento padrão (SUBRAMANIAM *et al.*, 2010). Essas células mostraram ter propriedades de células-tronco, incluindo a habilidade de iniciação tumoral, proporcionando um reservatório que pode causar recorrência tumoral após terapia (RYU *et al.*, 2012).

Estudo realizado por Norasti *et al.*, em 95 amostras de adenocarcinoma gástrico, demonstrou que a frequência de amostras de células tumorais positivas para CD44 foi de 60%, enquanto que todas as amostras de tecido não tumoral foram negativas para CD44.

CD133 é uma proteína transmembranar de cinco domínios, composta por uma cauda extracelular N-terminal, dois pequenos laços citoplasmáticos, dois laços extracelulares grandes contendo sete potenciais locais de glicosilação, e uma cauda C - terminal curta intracelular (CORBEIL *et al.*, 2001). Foi identificada pela primeira vez como um marcador de uma subpopulação de células hematopoiéticas e clonado em 1997 (MIRAGLIA *et al.*, 1997).

Apesar de sua função biológica permanecer desconhecida, a expressão de CD133 está associada com altas taxas de metabolismo da glicose celular (YANG *et al.*, 2007). Em nível molecular interage com o colesterol e pode ser localizada dentro de micro domínios lipídicos (ADIKIBI, 2011).

BOURSEAU-GUILMAIN *et al.*, 2011, estudando captação da transferrina em células neoplásicas de cólon humano, investigaram uma possível função do CD133 no processo de endocitose, através da observação da acumulação intracelular de compostos extracelulares marcados com fluorescência. Esse marcador, localizado nas saliências da membrana plasmática, mostrou ligar-se ao colesterol. A privação da expressão de CD133, através da utilização de anticorpo monoclonal, melhorou a absorção da transferrina nessas células. A não privação dessa expressão mostrou um papel de inibição da endocitose de transferrina, mas não estimulou a exocitose. Esse estudo também sugeriu um papel do colesterol no efeito inibitório do CD133 na endocitose. Estes dados estabeleceram pela primeira vez o CD133 como um modulador de acumulação intracelular de compostos exógenos, tendo em vista que esse marcador parecia ser um inibidor da captação da transferrina.

Tem sido demonstrado que o CD133 que é produzido e não é transportado até a membrana celular pode conduzir à degeneração da retina humana (MAW *et al.*, 2000).

Tem sido identificado como um marcador de células-tronco em diferentes tipos de tecidos (KEYSAR; JIMENO, 2010; SNIPPERT, 2009). A positividade do CD133 na membrana celular foi encontrada em cerca de 30% de amostras de câncer gástrico, e demonstrou relação com a profundidade do tumor, o envolvimento linfonodal, o estágio clínico e a invasão vascular (ISHIGAMI *et al.*, 2010). Pode ser um marcador útil de células-tronco cancerosas para predizer o risco de recorrência tumoral (a sobrevida de pacientes em 5 anos é significativamente pior no grupo de pacientes com expressão positiva para CD133-47,5% vs 74% $p=0,037$ (LEE *et al.*, 2012).

SING *et al.*, em 2004 demonstraram que apenas uma pequena quantidade de células CD133 positivas (100 células), implantadas em ratos diabéticos não obesos, imunodeficientes, são suficientes para iniciar um tumor semelhante ao tumor original.

A dificuldade na caracterização diferencial através de marcadores moleculares, entre células-tronco normais e tumorais, a importância das células-tronco na carcinogênese, a escassez de estudos com os marcadores CD44 e CD133 em tumores sólidos, sobretudo gástricos, a escassez de trabalhos que investigam a presença de células-tronco nas metástases linfonodais, e a alta incidência desse tipo de câncer em nosso meio, motivaram a realização desse estudo.

2 OBJETIVOS

Geral

- Avaliar a expressão de marcadores de células-tronco, CD44 e CD133, no câncer gástrico primário e metástases linfonodais, através de imunohistoquímica.

Específicos

- Determinar a prevalência da expressão destes marcadores nos tumores primários e nas respectivas metástases linfonodais;
- Correlacionar a expressão desses marcadores com os tipos histológicos intestinal e difuso (Lauren) de carcinoma gástrico;
- Relacionar a expressão desses marcadores no carcinoma gástrico primário e na mucosa não neoplásica distante do tumor;
- Avaliar a possível correlação anatomoclínica entre a expressão de células CD44 e/ ou CD133 positivas e variáveis como idade, sexo e estadiamento tumoral, entre outras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Casos e material utilizado

Este estudo, de caráter transversal, foi desenvolvido a partir de um conjunto de 72 casos de adenocarcinoma gástrico, utilizando material referente a peças de gastrectomia realizadas no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), no período de 2011 a 2014, registradas e integrantes dos Arquivos do Serviço de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML-UFC). Foram incluídas amostras dos tumores primários coletadas durante o ato cirúrgico, fixadas em formalina a 10%, processadas automaticamente e incluídas em parafina. Seleção de mucosa gástrica normal distante do tumor (margem cirúrgica) e de linfonodos com metástase foram feitas a partir dos arquivos do mesmo Serviço de Patologia. Foram excluídos todos os casos com amostras insuficientes, mal fixadas ou inadequadas, por exemplo com predomínio de áreas necróticas ou de muco.

Dos 72 casos, 55 apresentavam metástases em linfonodos.

Os casos foram reclassificados de acordo com a classificação de Lauren, nos tipos intestinal e difuso. O tipo intestinal apresenta lesão macroscopicamente bem delimitada, em geral localizada na incisura angular e à microscopia, tem aspecto bem diferenciado, contém células neoplásicas coesas e forma estruturas tubulares tipo glândulas, bem definidas, com ulceração frequente. O tipo difuso, pouco diferenciado, é caracterizado pela infiltração e espessamento de toda a parede do estômago. As células neoplásicas encontram-se dispersas ou formando pequenos cachos, os chamados “*clusters*” (LAUREN, 1965).

Os casos de metaplasia intestinal foram caracterizados em cortes corados por HE, pela presença de células calciformes, típicas destas lesões (AKIYAMA e UEMURA, 2009). A mucosa histologicamente normal foi assim caracterizada pela ausência de lesões neoplásicas, metaplásicas ou de qualquer outra natureza, obtidas preferencialmente das margens cirúrgicas livres de neoplasia. Os implantes metastáticos nos linfonodos foram caracterizados também a partir da HE, pela presença de células neoplásicas isoladas ou agrupadas, distorcendo a arquitetura linfonodal.

Foi utilizada a técnica de *tissue microarray* (TMA) para o estudo dos casos. Durante a análise das lâminas, foram excluídos os casos que apresentavam menos de cem células tumorais, casos autolisados e casos com material insuficiente. Houve também perda de alguns cilindros, e conseqüentemente de casos, durante o corte do TMA e sua fixação na lâmina, levando a casuística final de, para o CD44, 69 amostras de tumor primário, 17

amostras de metaplasia intestinal, 54 de mucosa normal e 25 amostras de linfonodos com metástase. Para o CD133, a casuística foi de 68 amostras de tumor primário, 15 de metaplasia intestinal, 48 amostras de mucosa normal e 30 de linfonodos.

3.2 – *Tissue Microarray*

Foi realizada a análise do material a ser estudado (mucosa normal, metaplasia intestinal, mucosa neoplásica e linfonodos), através das lâminas coradas pelo método HE, a fim de delimitar a área representativa do material em cada bloco doador, e dessa forma permitir a retirada dos cilindros no local exato onde se encontrava o tecido a ser analisado.

A construção dos blocos de *tissue microarray* (TMA) seguiu a técnica modificada de Kononen e colaboradores (1998), utilizando uma base fixa a partir de um kit comercial (Arraymold®). Foram confeccionados 8 blocos com 16 amostras do material a ser estudado, com um total de 36 cilindros no bloco receptor, com espaçamentos de 2,2 mm de distância entre os centros dos cilindros.

Durante a retirada dos tecidos dos blocos doadores, o *punch* era inserido de forma perpendicular a fim de proporcionar a adequada retirada do cilindro com a parte previamente selecionada e representativa da amostra.

As amostras tissulares parafinadas do “bloco doador” foram retiradas com o auxílio de um *punch* de biópsia de 2mm de diâmetro (*BiopsyPunch - Miltex*), inserido na área previamente selecionada do bloco. Essas amostras foram retiradas da agulha e inseridas no “bloco receptor” com auxílio de um bastão apropriado e encaixado no bloco receptor com auxílio de uma lâmina.

Em cada vértice dos *array* foi colocada secção histológica distinta das estudadas, para servir de controle interno dos casos. Foram inseridos controles internos de carcinoma colorretal e linfonodos normais, do CD133 e do CD44 respectivamente. Para controle externo, foram utilizadas amostras de tecido renal e linfonodo normal, para o CD133 e o CD44 respectivamente de acordo com estudos prévios (GHAFARZADEGAN, 2008; KIM *et al*, 2011; SCHWARTZ *et al*, 2013). Dessa forma, cada *array* construído contém 36 cilindros, sendo 16 do material objeto da pesquisa (cada tumor com duas amostras, mucosa normal e linfonodo com metástase), e quatro amostras de dois tecidos diferentes como controles internos positivos a serem testados.

Após o preenchimento do “bloco receptor” com todos os cilindros dos “blocos doadores”, foi despejada uma fina camada de parafina derretida sobre o bloco, que foi posteriormente aquecido em uma estufa a 60 °C durante 15 minutos, e depois resfriado a temperatura ambiente, a fim de se obter uma melhor aderência dos cilindros no bloco receptor.

Os cortes dos blocos de TMA foram realizados em micrótomo Leica RM2235, com 4 µm de espessura, colocados em lâminas silanizadas e encaminhados para realização de imunohistoquímica.

3.3 - Imunohistoquímica

As lâminas silanizadas foram colocadas em um suporte plano e levadas para a estufa, com temperatura estabilizada a 60°C, durante uma hora, a fim de derreter o excesso de parafina e melhorar a aderência dos tecidos à lâmina.

Ao mesmo tempo, iniciou-se a preparação do tampão de recuperação antigênica, utilizando-se o tampão *Envision Flex Target Retrieval Solution*, pH=9, código de referência K8000 – *Dako*[®], na diluição 1:50, que foi conservado em geladeira a 8°C. Em seguida, essa solução de 1500 ml (30 ml de tampão de recuperação antigênica + 1470 ml de água destilada) foi colocada em um tanque do módulo de pré-tratamento *Dako PT Link*[®], aparelho que proporciona um banho maria fechado, com temperatura monitorizada e controlada por computador. Foi realizado o pré-aquecimento do sistema até 65°C durante trinta minutos.

Após retiradas da estufa, as lâminas foram colocadas em prateleiras, as quais foram posicionadas no tanque do *Dako*[®] *PT Link*, e o sistema aquecido até a temperatura de 97°C, permanecendo nessa temperatura por trinta minutos. A seguir, o sistema foi novamente resfriado até 65°C, com o tempo total do processo de aproximadamente uma hora e meia. Dessa forma, há a recuperação dos epítomos antigênicos e a reidratação dos cortes histológicos, permitindo, assim, uma melhor ligação dos anticorpos aos epítomos (SHI; SHI; TAYLOR, 2011).

O material então foi retirado dos tanques, e as lâminas colocadas em um borrel contendo tampão de lavagem, durante três minutos, por três vezes. Para a lavagem das lâminas foi utilizado o *Wash Buffer Envision Flex*, pH=7,6, *Dako*[®], na diluição de 1:20.

Após essa etapa de lavagem, as lâminas foram retiradas do tampão de lavagem e marcadas com uma caneta especial hidrofóbica (*Dako*[®] *Pen* – referência S2002), que delimita a área em torno do corte histológico, impedindo o escoamento das soluções. Foram então

submetidas ao bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 5% durante dez minutos, com o objetivo de bloquear a peroxidase dos tecidos e evitar reação de fundo quando da etapa de coloração.

Posteriormente, foi efetuada nova lavagem das lâminas com tampão de lavagem por mais três minutos, e então as lâminas foram colocadas nas câmaras de incubação, onde foi realizada a incubação com o anticorpo primário.

Foram utilizados o anticorpo policlonal de coelho anti-CD133 da Biorbyt® (ORB99113), em diluição de 1:100, e anticorpo monoclonal de camundongo anti-Hu CD44 (Clone DF 1485) Dako®, em diluição de 1:50. Foi realizada a aplicação do anticorpo primário, lâmina por lâmina, e o conjunto permaneceu em incubação por uma hora, sendo realizadas três lavagens seguidas com o *Wash Buffer Envision Flex* Dako®, durante três minutos cada lavagem.

As lâminas então foram colocadas na prateleira e foi realizada a incubação com o *Linker Envision Flex Mouse*, código de referência K8012/K8022 - Dako®, durante trinta minutos.

A etapa seguinte se deu através da incubação com o polímero *Dako® Envision + Dual Link System – HRP*. A incubação do polímero foi realizada durante trinta minutos. Em seguida, foram realizadas mais três lavagens com o tampão de lavagem, durante três minutos cada lavagem, e, logo após, foi feita a coloração com a incubação do cromógeno *Dako® DAB* durante cinco minutos e posterior lavagem das lâminas em água corrente.

A seguir, foi feita a contracoloração com hematoxilina (*EnVision Flex Hematoxylin*) e realizadas três passagens das lâminas em álcool absoluto, para desidratação e três passagens em xilol, para diafanização ou clareamento. Por último, foram realizadas as montagens das lamínulas utilizando o Bálsamo do Canadá.

3.4 – Escores

A grande maioria dos trabalhos tem mostrado que as células-tronco são pouco frequentes em relação ao total de células da massa tumoral. Admite-se que novos clones vão surgindo durante a progressão tumoral, e que esses clones podem surgir de uma única célula neoplásica. Assim, neste modelo de progressão, a presença de uma única célula-tronco é capaz de gerar uma linhagem de células com potencial maior de sobrevivência ou metastização (VISVADER; LINDEMAN, 2008). Por isso achamos importante considerar a amostra positiva como aquela que apresentava ao menos uma célula com marcação

membranar ou citoplasmática, baseado em estudos prévios (CHOI *et al*, 2009; ISHIGAMI *et al*, 2010).

Foi realizada a contagem de células coradas em 1000 células. Os campos foram contados em sequência, a partir de um ponto aleatório (HASHIMOTO *et al.*, 2014), em aumento de 400X, até atingir-se um total em torno de mil células no último campo microscópico avaliado.

3.5 – Controles

Os controles positivos para CD133 foram obtidos a partir de secções de tecido renal normal (KIM *et al*, 2011; SCHWARTZ *et al*, 2013). Os controles positivos para CD44 foram obtidos a partir de secções de linfonodos (GHAFARZADEGAN, 2008). Os controles negativos foram obtidos a partir da supressão do anticorpo primário durante a realização da imunohistoquímica.

3.6 - Avaliação individual e entre observadores

Os preparados histológicos para CD44 e CD133 foram estudados detalhadamente pelo autor deste trabalho e analisados por um patologista experiente, sempre em microscópio Olympus BX41®.

3.7 - Análise Estatística

Utilizou-se o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, a depender do tamanho da amostra dos sub-grupos comparados, a partir das tabelas de contingência, na avaliação da imunexpressão dos diversos marcadores, e nas correlações clínico-patológicas. Também foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparar as medianas das amostras. O valor de $p < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 para realização dos testes estatísticos e confecção dos gráficos.

3.8 - Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa com seres humanos

O plano de pesquisa deste estudo foi submetido a Plataforma Brasil, e registrado sob o número CAAE 32108314.8.0000.5054, sendo avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em

Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, em 11/07/2014, número do parecer 727.346. Foram tomados os cuidados necessários para a preservação de condições de biossegurança, incluindo a prevenção de acidentes em laboratório, e o manejo e acondicionamento correto dos materiais utilizados. A utilização das amostras do arquivo foi feita após a assinatura do Termo de Fiel Depositário das amostras.

4 RESULTADOS

4.1 Controles

Foram utilizados o linfonodo como controle para o CD44, e o tecido renal para o CD133 (GHAFARZADEGAN *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2011; SCHWARTZ *et al.*, 2013). A figura 1 representa os controles externos positivos e negativos.

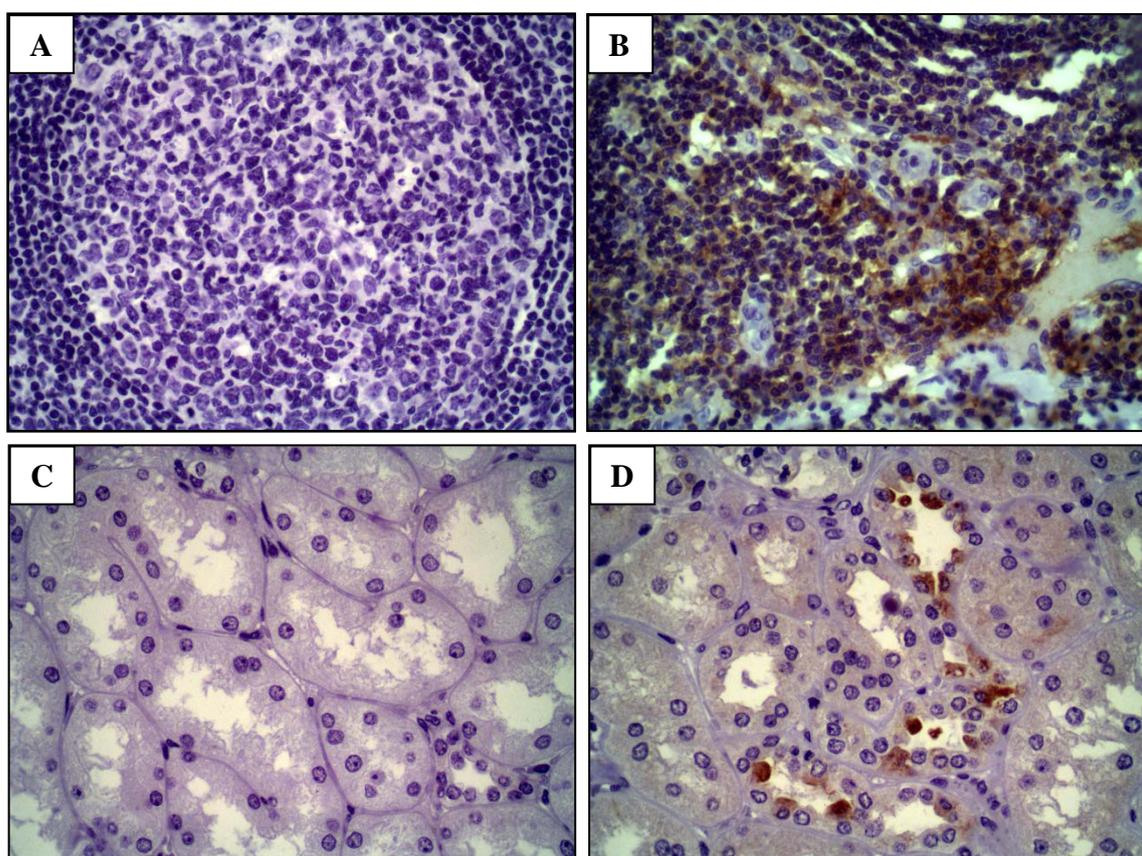


Figura 1. A-CD44 Controle negativo, ausência de marcação em linfócitos; B-CD44 Controle positivo, imunomarcção membranar e citoplasmática em linfócitos; C-CD133 Controle negativo, ausência de marcação em células tubulares renais; D-CD133 controle positivo, imunomarcção citoplasmática em células dos túbulos renais (A, B, C, D: 400X).

4.2 Imunomarcção de CD44 e Variáveis Clínico-Patológicas

A tabela 1 mostra a imunoeexpressão de CD44 em células neoplásicas no tumor primário, e as variáveis clínico-patológicas citadas. Observa-se o predomínio de pacientes do sexo masculino (58%), com idade superior ou igual a 50 anos (87%), tumor localizado

principalmente em corpo ou antro gástricos (81%) e dimensão maior ou igual a 5 cm (71%), com ausência de invasão angiolinfática (52,2%) e perineural (34,8%). A maioria é de tumores em estágio mais avançado, T2 a T4 (86%) e com presença de metástases linfonodais (74%). Com relação a estas variáveis, não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa (tabela 1).

Tabela 1 – Imunoexpressão de CD44 no tumor primário e variáveis clínico-patológicas

| Variáveis clínico-patológicas | Imunoexpressão de CD44 – tumor primário | | | |
|-------------------------------|---|-----------------|-----------------|--------|
| | n | POSITIVA | NEGATIVA | p |
| Tipo histológico (Lauren) | | | | |
| Intestinal | 36 | 9 (25%) | 27 (75%) | 0,4326 |
| Difuso | 33 | 12 (36%) | 21 (64%) | |
| Sexo | | | | |
| Masculino | 41 | 13 (32%) | 28 (68%) | 1,0000 |
| Feminino | 28 | 8 (29%) | 20 (71%) | |
| Idade | | | | |
| < 50 | 9 | 4 (44%) | 5 (56%) | 0,4392 |
| ≥ 50 | 60 | 17 (28%) | 43 (72%) | |
| Localização anatômica | | | | |
| Cárdia | 0 | 0 | 0 | 0,4470 |
| Fundo | 0 | 0 | 0 | |
| Corpo | 34 | 9 (26%) | 25 (74%) | |
| Antro | 19 | 5 (26%) | 14 (74%) | |
| Corpo+Antro | 3 | 2 (67%) | 1 (33%) | |
| # | 13 | 5 (38%) | 8 (62%) | |
| Dimensão do tumor | | | | |
| < 5cm | 20 | 3 (15%) | 17 (85%) | 0,0874 |
| ≥ 5cm | 48 | 18 (38%) | 30 (62%) | |
| # | 1 | 0 (0%) | 1 (100%) | |
| Invasão angiolinfática | | | | |
| Ausente | 36 | 12 (33%) | 24 (67%) | 0,7935 |
| Presente | 32 | 9 (28%) | 23 (72%) | |
| # | 1 | 0 (0%) | 1 (100%) | |
| Invasão perineural | | | | |
| Ausente | 24 | 6 (25%) | 18 (75%) | 0,3220 |
| Presente | 17 | 7 (41%) | 10 (59%) | |
| # | 28 | 8 (29%) | 20 (71%) | |
| Grau de invasão | | | | |
| T1 | 9 | 2 (22%) | 7 (78%) | 0,7102 |
| T2-T4 | 59 | 19 (32%) | 40 (68%) | |
| # | 1 | 0 (0%) | 1 (100%) | |
| Metástases linfonodais | | | | |
| N0 | 17 | 6 (35%) | 11 (65%) | 0,7635 |
| N1-N3 | 51 | 15 (29%) | 36 (71%) | |
| # | 1 | 0 (0%) | 1 (100%) | |
| Total | 69 | 21 (30%) | 48 (70%) | |

não avaliável

A tabela a seguir apresenta de forma sucinta a imunomarcção de CD44 nos quatro tipos de tecidos e locais estudados: mucosa histologicamente normal, metaplasia intestinal, tumor primário e metástase linfonodal:

Tabela 2 - Expressão de CD44 em mucosa histologicamente normal, metaplasia intestinal, tumor primário e metástase linfonodal, em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso.

| Lauren | Mucosa Histol.normal | Metaplasia Intestinal | Tumor primário | Metástase LN |
|------------|----------------------|-----------------------|----------------|--------------|
| | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) |
| Intestinal | 6 (19) | 1 (8) | 9 (25) | 3 (27) |
| Difuso | 6 (26) | 1 (25) | 12 (33) | 2 (14) |
| Total | 12 (22) | 2 (12) | 21 (30) | 5 (20) |

4.3 Distribuição da imunoexpressão de CD44 em células tumorais, metaplásicas e epiteliais histologicamente normais

A comparação da expressão de CD44 nas células tumorais, considerando o tipo histológico, demonstrou que o tipo difuso apresenta um maior número de amostras positivas (12/33=33%) do que o tipo intestinal (9/36=25%). Contudo essa diferença não foi significativa ($p=0,4326$, tabela 3).

Tabela 3 – Expressão de CD44 em células neoplásicas do tumor primário e metástase linfonodal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso.

| Carcinomas gástricos (células neoplásicas) | Imunoexpressão de CD44 | | | |
|--|------------------------|-----------------|-----------------|--------|
| | n | POSITIVA | NEGATIVA | P |
| Tumor primário | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 36 | 9 (25%) | 27 (75%) | 0,4326 |
| <i>Difuso</i> | 33 | 12 (33%) | 21 (67%) | |
| Total | 69 | 21 (30%) | 48 (70%) | |
| Metástase linfonodal | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 11 | 3 (27%) | 8 (73%) | 0,6232 |
| <i>Difuso</i> | 14 | 2 (14%) | 12 (86%) | |
| Total | 25 | 5 (20%) | 20 (80%) | |

As figuras 2 e 3 representam a imunoexpressão citoplasmática e membranar de CD44 em amostras de tumor primário difuso e intestinal.

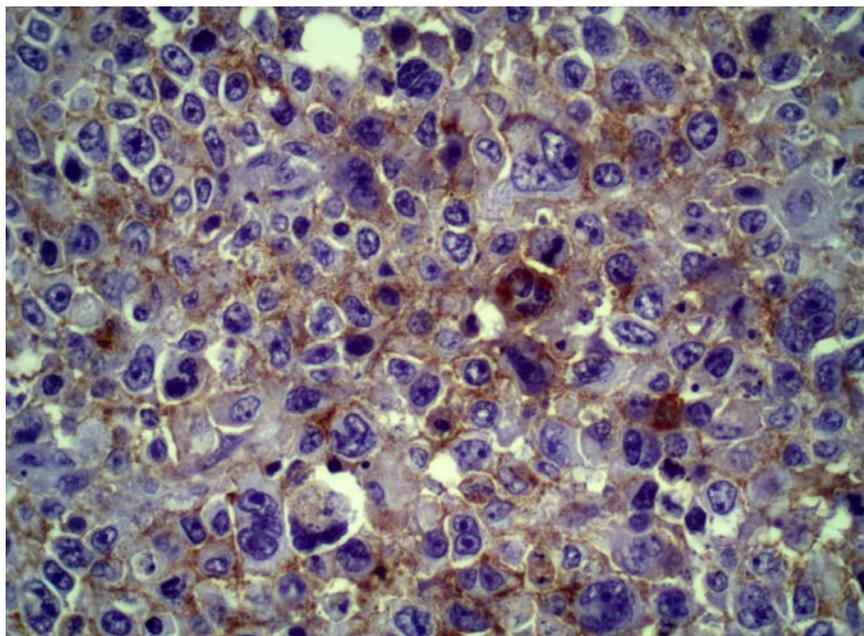


Figura 2 – Imunoexpressão citoplasmática e membranar de CD44 em tumor gástrico primário do tipo difuso. 400X.

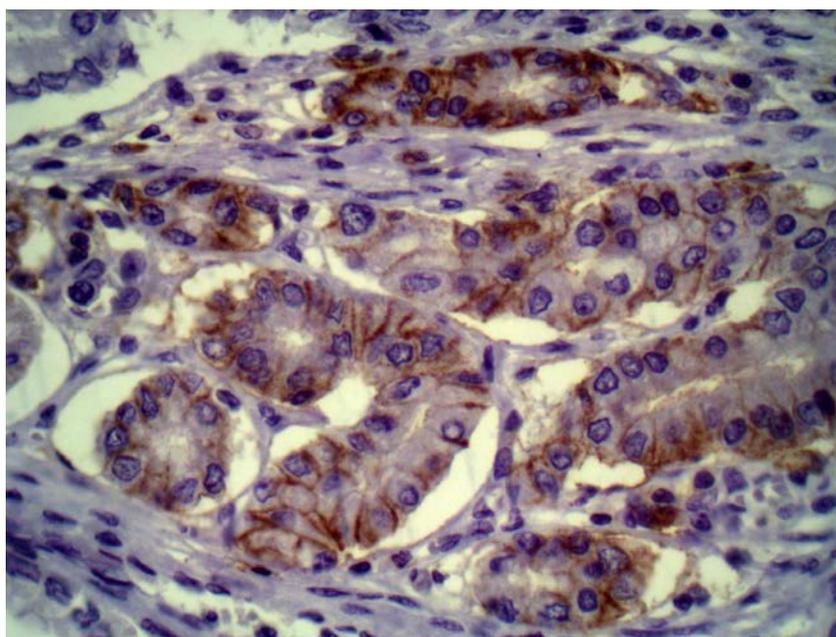


Figura 3 – Imunoexpressão de CD44 em tumor primário tipo intestinal. 400X

Das 25 amostras de linfonodos analisados, 5 (20%) foram positivas, e 20 (80%) foram negativas. Houve predominância de positividade no adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (3/11=27%) em relação ao tipo difuso (2/14=14%), sem diferença estatística significativa ($p=0,6232$).

As figuras 4 e 5 representam a expressão de CD44 em metástases linfonodais de adenocarcinoma intestinal e difuso, respectivamente.

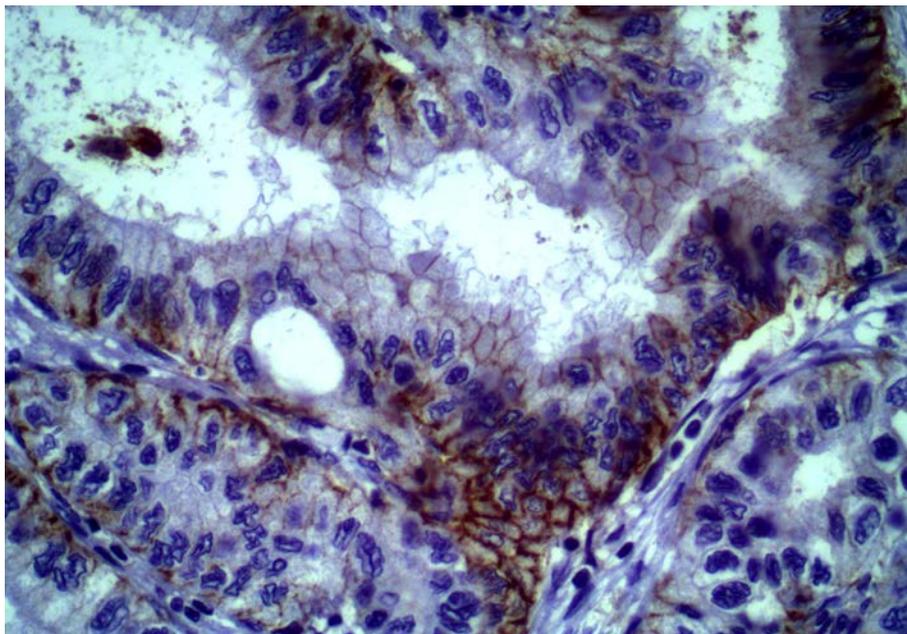


Figura 4- Imunoexpressão membranar e citoplasmática de CD44 em metástase linfonodal de um caso de adenocarcinoma do tipo intestinal. 400X

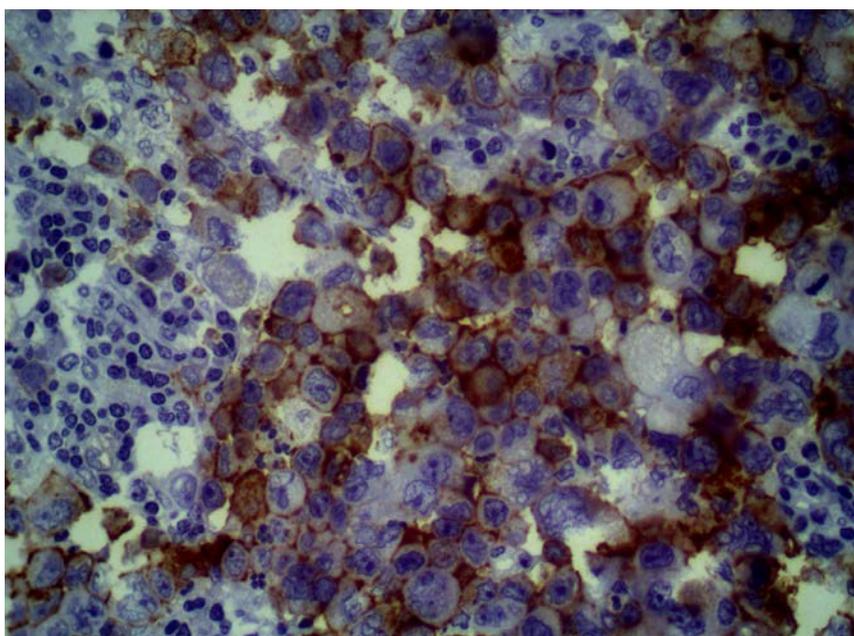


Figura 5- Imunoexpressão membranar e citoplasmática de CD44 em metástase linfonodal de um caso de adenocarcinoma do tipo difuso. 400X.

Quando se compara a expressão de CD44 no tumor primário, independentemente do tipo histológico, com a imunomarcção das metástases linfonodais, observa-se que a expressão é maior no tumor primário ($21/69=30\%$) do que nas metástases linfonodais ($5/25=20\%$), também sem valor estatístico ($p=0,4357$).

Não houve diferença estatística significativa na expressão de CD44 dos tumores primários gástricos (21/69=30%) e na metaplasia intestinal (2/17=12%, $p=0,1403$, tabela 4). A comparação entre a imunoposição nas lesões gástricas e metaplásicas, nos tipos intestinal (9/36=25% vs 1/13=8%, $p=0,2528$) e difuso (12/33=33% vs 1/4=25%, $p=1,0000$) também não mostrou diferença significativa.

Tabela 4 - Expressão de CD44 em células neoplásicas do tumor primário e metaplasia intestinal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso

| Células epiteliais | Imunoposição de CD44 | | | |
|-------------------------------|----------------------|-----------------|-----------------|--------|
| | n | POSITIVA | NEGATIVA | P |
| Tumor primário | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 36 | 9 (25%) | 27 (75%) | 0,2528 |
| <i>Difuso</i> | 33 | 12 (33%) | 21 (67%) | |
| Total | 69 | 21 (30%) | 48 (70%) | |
| Metaplasia intestinal* | | | | |
| <i>Tumor tipo intestinal</i> | 13 | 1 (8%) | 12 (92%) | 1,0000 |
| <i>Tumor tipo difuso</i> | 4 | 1 (25%) | 3 (75%) | |
| Total | 17 | 2 (12%) | 15 (88%) | |

*Presente associada ao tumor

Na figura seguinte pode-se observar a ausência de imunoposição de CD44 na metaplasia intestinal, contrastando com a positividade na mucosa normal adjacente.

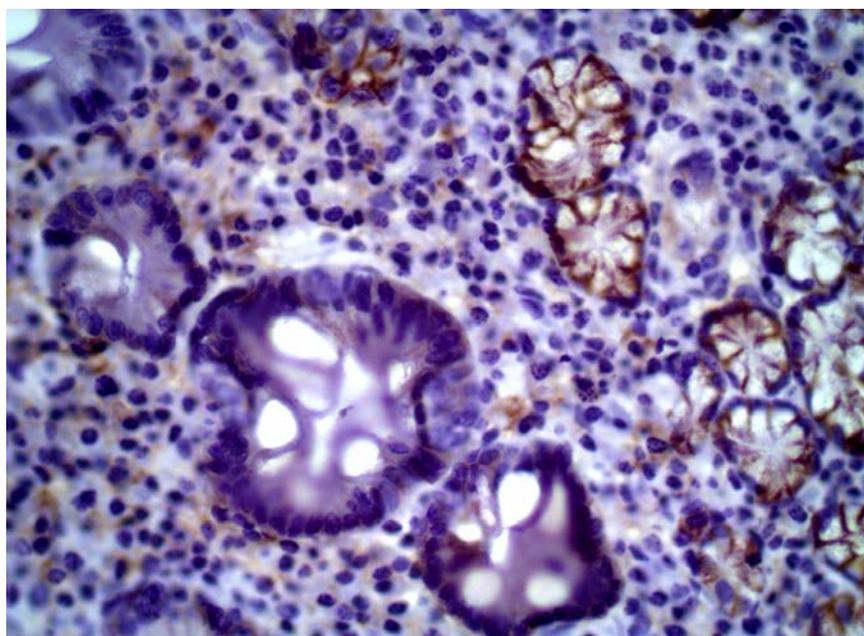


Figura 6- Imunoposição membranar de CD44 em mucosa gástrica normal (glândulas menores, acima, à direita), em contraste com a negatividade de expressão na metaplasia intestinal (glândulas maiores, centrais, à esquerda). 400X.

A expressão de CD44 no tumor primário, sem considerar o tipo histológico, foi maior do que no tecido normal, mas sem significância estatística (21/69=30% vs 12/54=22%, $p=0,4124$). A tabela 5 mostra que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de CD44 entre o tumor primário e o tecido normal, no carcinoma do tipo intestinal (9/36=25% vs 6/31=19%, $p=0,7699$) e no difuso (12/33=33% vs 6/23=26%, $p=0,5628$).

Tabela 5 - Expressão de CD44 em células neoplásicas do tumor primário e tecido histologicamente normal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso

| Células epiteliais | Imunoexpressão de CD44 | | | |
|--|------------------------|-----------------|-----------------|--------|
| | n | POSITIVA | NEGATIVA | P |
| Tumor primário | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 36 | 9 (25%) | 27 (75%) | 0,7699 |
| <i>Difuso</i> | 33 | 12 (33%) | 21 (67%) | |
| Total | 69 | 21 (30%) | 48 (70%) | |
| Mucosa histologicamente normal* | | | | |
| <i>Tumor tipo intestinal</i> | 31 | 6 (19%) | 25 (81%) | 0,5628 |
| <i>Tumor tipo difuso</i> | 23 | 6 (26%) | 17 (74%) | |
| Total | 54 | 12 (22%) | 42 (78%) | |

*Presente associada ao tumor

Na figura 7 pode-se observar expressão positiva e negativa de CD44 em amostra de mucosa gástrica histologicamente normal.

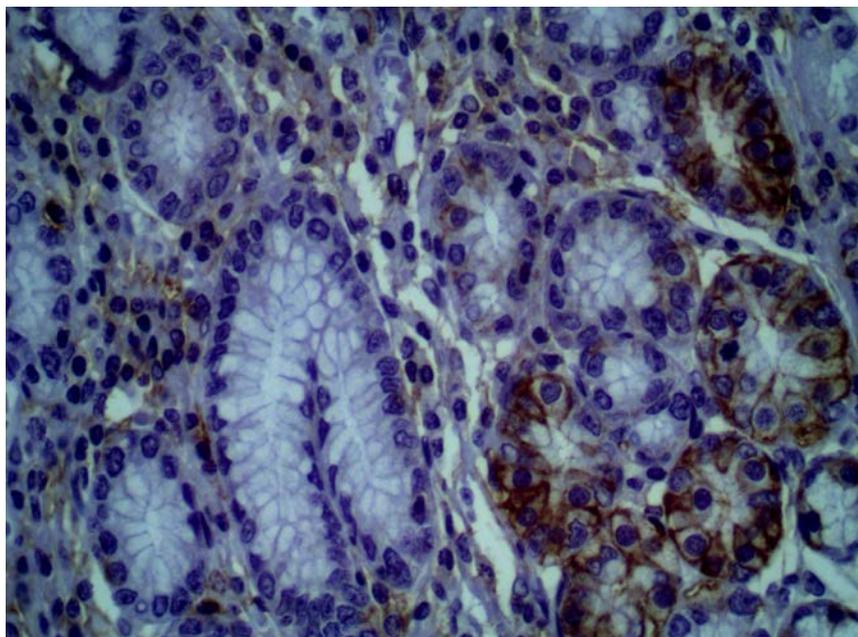


Figura 7 – Imunomarcção membranar e citoplasmática de CD44 em mucosa gástrica histologicamente normal, à direita. 400X

A expressão de CD44 no tecido histologicamente normal foi maior do que na metaplasia intestinal (12/54=22% vs 2/17=12%, $p=0,4930$), mas estatisticamente

insignificante. Comparando a imunoexpressão de CD44 na metaplasia e no tecido normal, os resultados foram: intestinal (1/13=8% vs 6/31=19%, $p=0,6542$) e difuso (1/4=25% vs 6/23=26%, $p=1,0000$), também sem significância estatística (tabela 6).

Tabela 6 – Expressão de CD44 em metaplasia intestinal e mucosa histologicamente normal nos carcinomas gástricos dos tipos intestinal e difuso

| Células epiteliais | Imunoexpressão de CD44 | | | |
|--|------------------------|-----------------|-----------------|--------|
| | n | POSITIVA | NEGATIVA | P |
| Metaplasia intestinal* | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 13 | 1 (8%) | 12 (92%) | 0,6542 |
| <i>Difuso</i> | 4 | 1 (25%) | 3 (75%) | |
| Total | 17 | 2 (12%) | 15 (88%) | |
| Mucosa histologicamente normal* | | | | |
| <i>Tumor tipo intestinal</i> | 31 | 6 (19%) | 25 (81%) | 1,0000 |
| <i>Tumor tipo difuso</i> | 23 | 6 (26%) | 17 (74%) | |
| Total | 54 | 12 (22%) | 42 (78%) | |

*Presente associada ao tumor

4.4 Imunomarcção de CD133 e Variáveis Clínico-Patológicas

A tabela 7 mostra a expressão de CD133 em células neoplásicas no tumor primário, e as variáveis clínico-patológicas citadas.

Tabela 7 – Imunoexpressão de CD133 no tumor primário e variáveis clínico-patológicas

| Variáveis clínico-patológicas | Imunoexpressão de CD133 – tumor primário | | | |
|-------------------------------|--|-----------------|-----------------|---------|
| | n | POSITIVA | NEGATIVA | P |
| Tipo histológico (Lauren) | | | | |
| Intestinal | 35 | 9 (26%) | 26 (74%) | 0,7776 |
| Difuso | 33 | 7 (21%) | 26 (79%) | |
| Sexo | | | | |
| Masculino | 40 | 8 (20%) | 32 (80%) | 0,5624 |
| Feminino | 28 | 8 (29%) | 20 (71%) | |
| Idade | | | | |
| < 50 | 9 | 4 (44%) | 5 (56%) | 0,1985 |
| ≥ 50 | 59 | 12 (20%) | 47 (80%) | |
| Localização anatômica | | | | |
| Cárdia | 0 | 0 | 0 | 0,3163 |
| Fundo | 0 | 0 | 0 | |
| Corpo | 32 | 6 (19%) | 26 (81%) | |
| Antro | 20 | 5 (25%) | 15 (75%) | |
| Corpo+Antro | 3 | 2 (67%) | 1 (23%) | |
| # | 13 | 3 (23%) | 10 (77%) | |
| Dimensão do tumor | | | | |
| < 5cm | 21 | 3 (14%) | 18 (86%) | 0,3544 |
| ≥ 5cm | 46 | 13 (28%) | 33 (72%) | |
| # | 1 | 0 (0%) | 1 (100%) | |
| Invasão angiolinfática | | | | |
| Ausente | 37 | 8 (22%) | 29 (78%) | 0,7746 |
| Presente | 30 | 8 (27%) | 22 (73%) | |
| # | 1 | 0 (0%) | 1 (100%) | |
| Invasão perineural | | | | |
| Ausente | 24 | 4 (17%) | 20 (83%) | 0,6905 |
| Presente | 16 | 4 (25%) | 12 (75%) | |
| # | 28 | 8 (29%) | 20 (71%) | |
| Grau de invasão | | | | |
| T1 | 10 | 5 (50%) | 5 (50%) | 0,0505* |
| T2-T4 | 57 | 11 (19%) | 46 (81%) | |
| # | 1 | 0 (0%) | 1 (100%) | |
| Metástases linfonodais | | | | |
| N0 | 18 | 4 (22%) | 14 (78%) | 1,0000 |
| N1-N3 | 49 | 12 (24%) | 37 (76%) | |
| # | 1 | 0 (0%) | 1 (100%) | |
| Total | 68 | 16 (24%) | 52 (76%) | |

*diferença marginalmente significante # não avaliável

Observa-se o predomínio de pacientes do sexo masculino (57%), com idade superior ou igual a 50 anos (87%), com tumor localizado principalmente em corpo ou antro gástricos (81%) e maior ou igual a 5 cm (68%), com ausência de invasão angiolinfática (54%) e perineural (35%). A maioria é de tumores em estágio mais avançado, T2 a T4 (84%) e com presença de metástases linfonodais (72%).

Com relação a estas variáveis, o grau de invasão do tumor apresentou diferença marginalmente significativa ($p=0,0505$), com maior expressão proporcional nos tumores T1 do que no grupo de tumores T2-T4. Dos 10 casos de tumor em estágio T1, 5 (50%) apresentaram expressão positiva, enquanto que dos 57 casos classificados como T2 a T4, apenas 11 (19%) foram positivos. Nas demais variáveis, não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa (tabela 7).

A tabela seguinte mostra de forma sucinta a imunomarcagem de CD133 nos quatro tipos de tecidos e locais estudados: mucosa histologicamente normal, metaplasia intestinal, tumor primário e metástase linfonodal:

Tabela 8 - Expressão de CD133 em mucosa histologicamente normal, metaplasia intestinal, tumor primário e metástase linfonodal, em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso.

| Lauren | Mucosa Histol.normal | Metaplasia Intestinal | Tumor primário | Metástase LN |
|------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|--------------|
| | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) |
| Intestinal | 14 (52) | 1 (9) | 9 (26) | 4 (31) |
| Difuso | 8 (38) | 0 (0) | 7 (21) | 3 (18) |
| Total | 22 (46) | 1 (7) | 16 (24) | 7 (23) |

4.5 Distribuição da imunoexpressão de CD133 em células tumorais, metaplásicas e epiteliais histologicamente normais

A comparação da expressão de CD133 nas células tumorais, considerando o tipo histológico, demonstrou que o tipo intestinal apresenta um maior número de amostras positivas ($9/35=26\%$) do que o tipo difuso ($7/33=21\%$). Contudo, essa diferença não foi significativa ($p=0,7776$, tabela 9).

Tabela 9 – Expressão de CD133 em células neoplásicas do tumor primário e metástase linfonodal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso

| Carcinomas gástricos (células neoplásicas) | Imunoexpressão de CD133 | | | |
|---|-------------------------|-----------------|-----------------|--------|
| | n | POSITIVA | NEGATIVA | P |
| Tumor primário | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 35 | 9 (26%) | 26 (74%) | 0,7776 |
| <i>Difuso</i> | 33 | 7 (21%) | 26 (79%) | |
| Total | 68 | 16 (24%) | 52 (76%) | |
| Metástase linfonodal* | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 13 | 4 (31%) | 9 (69%) | 0,6656 |
| <i>Difuso</i> | 17 | 3 (18%) | 14 (82%) | |
| Total | 30 | 7 (23%) | 23 (77%) | |

A figura 8 mostra a imunomarcção membranar e citoplasmática de CD133 nos tumores gástricos primários intestinal e difuso.

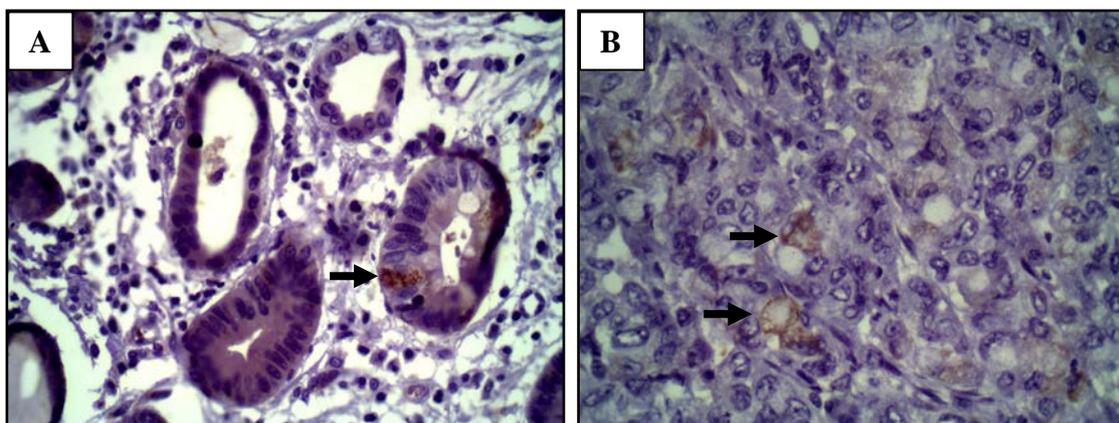


Figura 8-A- Imunoexpressão citoplasmática de CD133 em adenocarcinoma gástrico primário tipo intestinal (seta); B- Imunomarcção membranar de CD133 em adenocarcinoma gástrico primário difuso. (setas). A e B : 400X.

Das 30 amostras de linfonodos analisados, 7 (20%) foram positivas, e 23 (80%) foram negativas. Houve predominância de positividade no adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal ($4/13=31\%$) em relação ao difuso ($3/17=18\%$), sem significância estatística.

As figuras 9 mostram a imunoexpressão de CD133 em metástases linfonodais, de carcinomas gástricos do tipo intestinal e difuso, respectivamente.

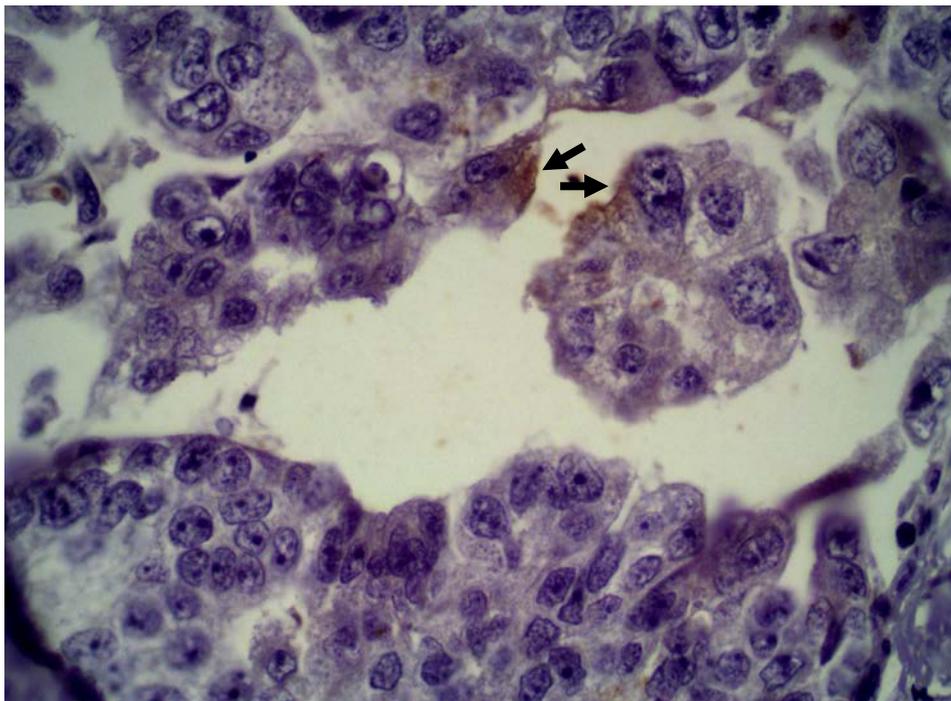


Figura 9 – Imunomarcção citoplasmática e membranar de CD133 em metástase linfonodal de um adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (setas). 400X.

Quando se compara a expressão de CD133 no tumor primário, independentemente do tipo histológico, com a imunomarcção das metástases linfonodais, observa-se que não há diferença estatisticamente significativa entre a expressão no tumor primário (16/68=24%) e nas metástases linfonodais (7/30=23%), $p=1,0000$.

A expressão de CD133 foi maior no tumor primário (16/68=24%) do que na metaplasia intestinal (1/15=7%), mas sem diferença estatística significativa ($p=0,2861$). Também não houve diferença significativa na comparação da imunoexpressão de CD133 das lesões gástricas e metaplásicas, nos carcinomas do tipo intestinal (9/35=26% vs 1/11=9%, $p=0,4103$) e difuso (7/33=21% vs 0/4=0%, $p=0,5697$) (tabela 10).

Tabela 10 - Expressão de CD133 em células neoplásicas do tumor primário e metaplasia intestinal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso

| Células epiteliais | Imunoexpressão de CD133 | | | |
|------------------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|--------|
| | n | POSITIVA | NEGATIVA | P |
| Tumor primário | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 35 | 9 (26%) | 26 (74%) | 0,4103 |
| <i>Difuso</i> | 33 | 7 (21%) | 26 (79%) | |
| Total | 68 | 16 (24%) | 52 (76%) | |
| Metaplasia intestinal | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 11 | 1 (9%) | 10 (91%) | 0,5697 |
| <i>Difuso</i> | 4 | 0 (0%) | 4 (100%) | |
| Total | 15 | 1 (7%) | 14 (93%) | |

A imunexpressão de CD133 na mucosa normal foi maior do que no tumor primário, com diferença estatística significativa (22/48=46% vs 16/68=24%, respectivamente, $p=0,0159$, tabela 11).

Tabela 11 - Expressão de CD133 em células neoplásicas do tumor primário e mucosa histologicamente normal em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso

| Células epiteliais | Imunexpressão de CD133 | | | |
|--|------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| | n | POSITIVA | NEGATIVA | P |
| Tumor primário | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 35 | 9 (26%) | 26 (74%) | 0,7776 |
| <i>Difuso</i> | 33 | 7 (21%) | 26 (79%) | |
| Total | 68 | 16 (24%) | 52 (76%) | |
| Mucosa histologicamente normal* | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 27 | 14 (52%) | 13 (48%) | 0,2201 |
| <i>Difuso</i> | 21 | 8 (38%) | 13 (62%) | |
| Total | 48 | 22 (46%) | 26 (54%) | 0,0159* |

* positividade em células da mucosa histologicamente normal (46%) comparada com a positividade total em células tumorais (24%); $p=0,0159$, teste exato de Fisher

A figura 10 ilustra de forma evidente esta diferença significativa entre a expressão do CD133 na mucosa histologicamente normal e a mucosa tumoral, em pacientes com adenocarcinoma gástrico.

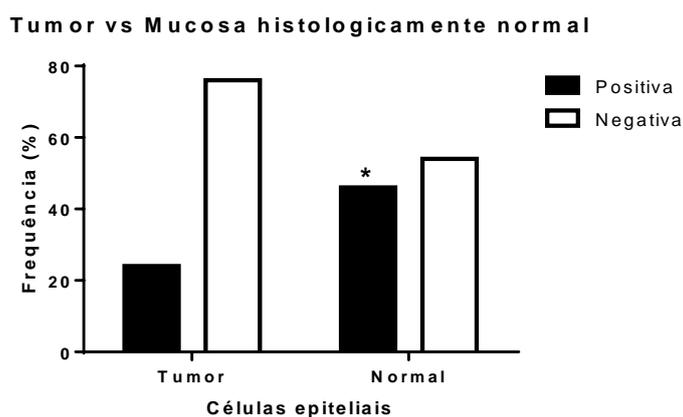


Figura 10 - Expressão do CD133 no tumor primário e no tecido normal em pacientes com adenocarcinoma gástrico. * comparar com os casos positivos tumorais (teste exato de Fisher, $p=0,0159$).

A tabela 11 mostra que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de CD133 entre o tumor primário e o tecido normal no carcinoma do tipo intestinal ($9/35=26\%$ vs $14/27=52\%$, $p=0,0623$) e no difuso ($7/33=21\%$ vs $8/21=38\%$, $p=0,2201$).

A figura 11 representa a imunoposição de CD133 restrita aos terços profundo e médio, na mucosa gástrica histologicamente normal.

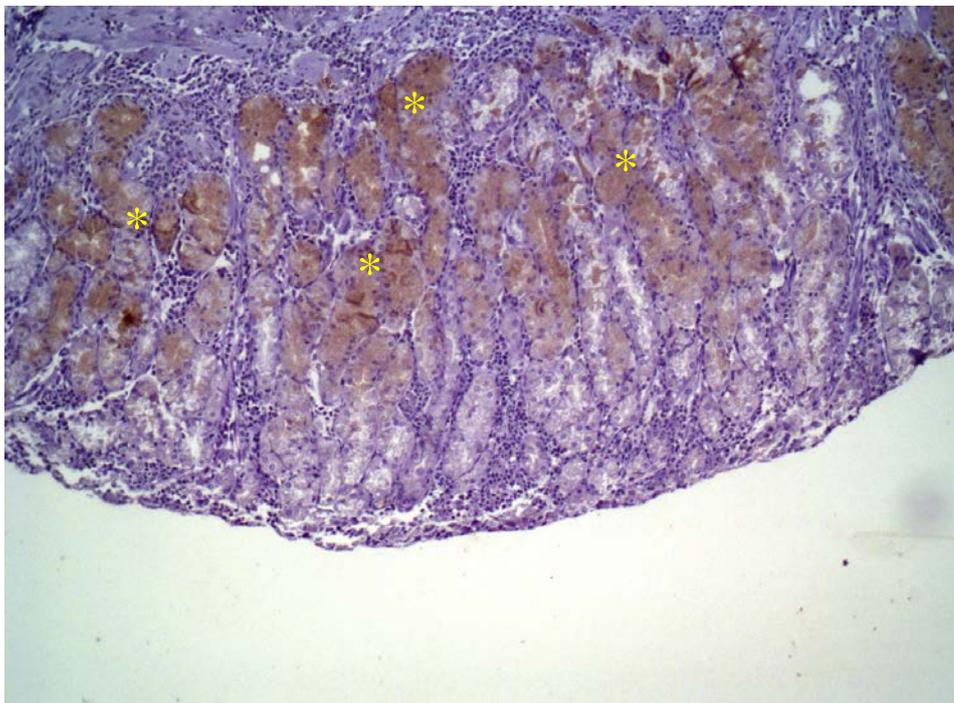


Figura 11- Imunomarcção citoplasmática de CD133 na mucosa gástrica histologicamente normal. Observar que a marcação está restrita aos terços profundo e médio (asteriscos), enquanto o terço superficial é negativo.

A expressão de CD133 no tecido normal foi maior do que na metaplasia intestinal, com diferença estatisticamente significativa ($22/48=46\%$ vs $1/15=7\%$, respectivamente, $p=0,0058$, tabela 12).

Tabela 12 – Expressão de CD133 em metaplasia intestinal e mucosa histologicamente normal nos carcinomas gástricos dos tipos intestinal e difuso

| Células epiteliais | Imunoposição de CD133 | | | |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|----------|
| | N | POSITIVA | NEGATIVA | P |
| Metaplasia intestinal | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 11 | 1 (9%) | 10 (91%) | |
| <i>Difuso</i> | 4 | 0 (0%) | 4 (100%) | |
| Total | 15 | 1 (7%) | 14 (93%) | |
| Mucosa histologicamente normal | | | | |
| <i>Intestinal</i> | 27 | 14 (52%) | 13 (48%) | 0,0260* |
| <i>Difuso</i> | 21 | 8 (38%) | 13 (62%) | |
| Total | 48 | 22 (46%) | 26 (54%) | 0,0058** |

* positividade em células da mucosa histologicamente normal (52%) comparada com a positividade em células metaplásicas em casos de carcinoma intestinal (9%)

** positividade em células da mucosa normal (46%) comparada com a positividade total em células metaplásicas (7%)

A figura 12 mostra de forma conspícua esta diferença.

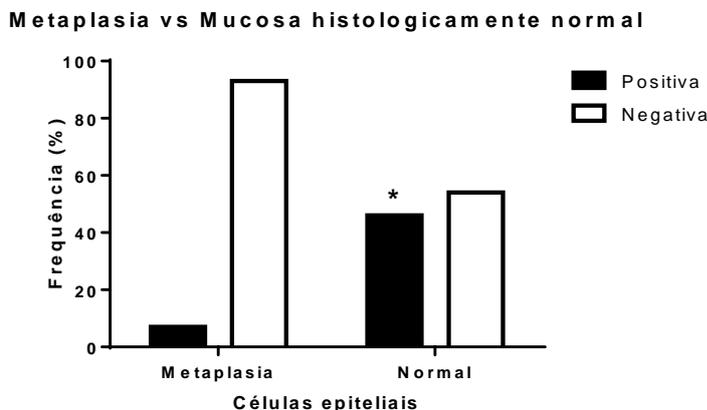


Figura 12 - Expressão do CD133 na metaplasia intestinal e na mucosa histologicamente normal em pacientes com adenocarcinoma gástrico. * comparar com os casos positivos metaplásicos (teste exato de Fisher, $p=0,0058$).

A imunoexpressão de CD133 no adenocarcinoma gástrico tipo intestinal foi significativamente maior na mucosa histologicamente normal do que na metaplasia (1/11=9% vs 14/27=52%, $p=0,0260$), representado na figura 13. Contudo, o difuso não apresentou diferença estatística significativa (0/4=0% vs 8/21=38%, $p=0,2689$) (tabela 12).

Metaplasia vs Mucosa histologicamente normal (casos do tipo intestinal)

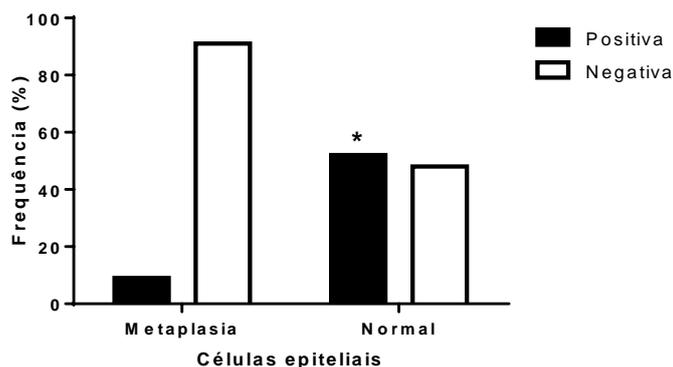


Figura 13 - Expressão do CD133 na metaplasia intestinal e na mucosa histologicamente normal em pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal. * comparar com os casos positivos metaplásicos (teste exato de Fisher, $p=0,0260$).

Foi realizada a contagem de células imunomarcadas com CD44 e CD133, nos casos positivos, numa amostragem aleatória de cerca de mil células (quadros 1 e 2).

A percentagem de células com imunomarcagem de CD44 variou de 0% a 41% nos tumores primários, e de 0% a 85% nas metástases linfonodais, como ilustrado no quadro 1.

Quadro 1- número de células positivas para o CD44, por grupo de mil células

| CD44 - N° DE CÉLULAS POSITIVAS EM 1000 CÉLULAS | | | | | | | | |
|---|-------------|-------------|--------------|---------------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|
| Ordem | CASO | SEXO | IDADE | LAUREN | ESTÔMAGO | | LINFONODO | |
| | | | | | CÉLULAS POSITIVAS | % | CÉLULAS POSITIVAS | % |
| 1 | 9 | M | 86 | INT | 8 | 0,8% | - | # |
| 2 | 10 | M | 73 | INT | - | NEGATIVA | 4 | 0,4% |
| 3 | 12 | F | 62 | INT | 15 | 1,5% | - | # |
| 4 | 24 | F | 50 | INT | 21 | 1,7% | - | # |
| 5 | 27 | M | 65 | INT | 340 | 30,9% | - | # |
| 6 | 29 | M | 72 | INT | 36 | 3,6% | - | # |
| 7 | 31 | M | 81 | INT | 10 | 0,9% | - | # |
| 8 | 32 | M | 61 | INT | 73 | 7,2% | 3 | 0,4% |
| 9 | 34 | F | 68 | INT | 36 | 1,9% | 178 | 17,8% |
| 10 | 36 | M | 68 | INT | 1 | 0,1% | - | # |
| 11 | 39 | M | 40 | DIF | 80 | 11,8% | - | NEGATIVA |
| 12 | 40 | M | 50 | DIF | 30 | 2,8% | - | NEGATIVA |
| 13 | 42 | F | 42 | DIF | 16 | 1,6% | - | # |
| 14 | 43 | F | 42 | DIF | 30 | 2,8% | - | # |
| 15 | 44 | M | 45 | DIF | 7 | 0,6% | - | # |
| 16 | 49 | M | 68 | DIF | - | # | 870 | 84,5% |
| 17 | 50 | M | 74 | DIF | 420 | 41,2% | - | # |
| 18 | 51 | M | 55 | DIF | 5 | 1,3% | - | # |
| 19 | 52 | F | 63 | DIF | 166 | 16,1% | - | # |
| 20 | 53 | M | 69 | DIF | 46 | 11,4% | - | # |
| 21 | 55 | M | 51 | DIF | 33 | 3,1% | - | NEGATIVA |
| 22 | 69 | F | 60 | DIF | 1 | 0,1% | - | # |
| 23 | 71 | F | 55 | DIF | 25 | 2,5% | 68 | 13,4% |

A maioria dos casos de tumor primário positivos para CD44 (15/21=71%) incluíam menos de 3% de células marcadas. A percentagem de células positivas no tipo intestinal variou de 0,1% a 30,9%, enquanto que a variação nos casos do tipo difuso foi de 0,6% a 41%. O total de células positivas do histotipo difuso foi de 728/9340=7,8%, enquanto o total de células positivas dos carcinomas intestinais foi de 540/9965=5,4%, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Ao se excluir os valores extremos referentes à quantidade de células marcadas, em cada histotipo separadamente, e realizando novo cálculo estatístico, essa diferença se mantém (intestinal 199/7815=2,5% ; difuso 438/8902=5,2% ; $p < 0,0001$).

Em relação aos linfonodos, o total de células positivas do histotipo difuso foi de 938/1540=60,9%, enquanto o total de células positivas dos carcinomas intestinais foi de 185/2755=6,7%, diferença também estatisticamente significativa ($p<0,0001$).

Utilizando-se o teste de Mann-Whitney para comparar a quantidade de células imunomarcadas para o CD44, não foi observada diferença estatisticamente significativa na quantidade de células marcadas entre os dois histotipos ($p=0,7761$), nem mesmo quando se retiram os valores extremos ($p= 0,7325$).

No caso do CD133, a percentagem de células com imunomarcção variou de 0% a 64% no tumor primário e de 0% a 39% nas metástases linfonodais, como ilustrado no quadro 2.

Quadro 2- número de células positivas para o CD133, por grupo de mil células

| CD133 - Nº DE CÉLULAS POSITIVAS EM 1000 CÉLULAS | | | | | | | | |
|--|-------------|-------------|--------------|---------------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|
| | | | | | ESTÔMAGO | | LINFONODO | |
| Ordem | CASO | SEXO | IDADE | LAUREN | CÉLULAS POSITIVAS | % | CÉLULAS POSITIVAS | % |
| 1 | 2 | F | 72 | INT | 9 | 0,9% | - | # |
| 2 | 7 | F | 69 | INT | 30 | 14,6% | - | # |
| 3 | 10 | M | 73 | INT | 28 | 2,7% | - | NEGATIVA |
| 4 | 11 | F | 70 | INT | 15 | 1,5% | - | # |
| 5 | 14 | F | 68 | INT | 3 | 0,3% | - | # |
| 6 | 16 | F | 81 | INT | 3 | 0,3% | - | # |
| 7 | 21 | F | 63 | INT | - | NEGATIVA | 15 | 1,3% |
| 8 | 23 | M | 75 | INT | - | NEGATIVA | 2 | 0,2% |
| 9 | 24 | F | 50 | INT | 1 | 0,1% | - | # |
| 10 | 34 | F | 68 | INT | 730 | 64% | - | NEGATIVA |
| 11 | 35 | M | 78 | INT | - | NEGATIVA | 6 | 0,6% |
| 12 | 36 | M | 68 | INT | 9 | 1% | - | # |
| 13 | 38 | M | 54 | DIF | - | NEGATIVA | 1 | 0,3% |
| 14 | 39 | M | 40 | DIF | 34 | 5,9% | - | # |
| 15 | 40 | M | 50 | DIF | 26 | 2,4% | - | NEGATIVA |
| 16 | 42 | F | 42 | DIF | 4 | 0,4% | - | # |
| 17 | 44 | M | 45 | DIF | 1 | 0,1% | - | NEGATIVA |
| 18 | 49 | M | 68 | DIF | - | # | 4 | 0,4% |
| 19 | 54 | M | 59 | DIF | 11 | 1,1% | 86 | 38,4% |
| 20 | 59 | M | 41 | DIF | 5 | 0,4% | - | # |
| 21 | 65 | M | 66 | DIF | 23 | 2% | - | # |

A maioria dos casos de tumor primário positivos para CD133 (13/16=81%) incluíam menos de 3% de células marcadas. A percentagem de células positivas no tipo

intestinal variou de 0,1% a 64%, enquanto que a variação nos casos do tipo difuso foi de 0,1% a 5,9%. O total de células positivas do histotipo difuso foi de $70/6575=1,1\%$, enquanto o total de células positivas dos carcinomas intestinais foi de $797/8389=9,5\%$, diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$). Entretanto, ao se excluir os valores extremos referente a quantidade de células marcadas, em cada histotipo separadamente, e realizando novo cálculo estatístico, essa diferença não se mantém (intestinal $97/6265=1,5\%$; Difuso $69/5545=1,3\%$; $p=0,1862$).

Da mesma forma que foi realizado para o CD44, utilizando-se o teste de Mann-Whitney para comparar a quantidade de células imunomarcadas para o CD133, não foi observada diferença estatisticamente significativa na quantidade de células marcadas entre os dois histotipos ($p=0,9577$), nem mesmo quando se retira os valores extremos ($p= 1,0000$).

Em relação aos linfonodos, o total de células positivas para CD133 do histotipo difuso foi de $91/1624=5,6\%$, enquanto o total de células positivas dos carcinomas intestinais foi de $23/3242=0,7\%$, diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$).

Foi aplicado o teste de Mann-Whitney para realizar comparação entre: a quantidade total de células marcadas (histotipos intestinal + difuso) para o CD44 vs CD133; intestinal (CD44 + CD133) vs difuso (CD44 + CD133); CD44 (intestinal vs difuso); CD133 (intestinal vs difuso); intestinal (CD44 vs CD133); difuso (CD44 vs CD133), não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, considerou-se como amostra positiva aquela com presença de ao menos uma célula com imunomarcção membranar e/ou citoplasmática para ambos os marcadores. Apesar de parecer permissivo considerar a positividade da amostra com apenas uma célula marcada, resolveu-se adotar esse critério, considerando a raridade de células-tronco descritas nas neoplasias, e também baseado em estudos que utilizaram previamente esses critérios (CHOI *et al.*, 2009; ISHIGAMI *et al.*, 2010). Foi observado que 30% das amostras foram positivas para o CD44, resultado semelhante ao de Kurozumi *et al.*, 1998, que estudando amostras de câncer gástrico, encontraram positividade em 38% dos casos.

Nesse aspecto, a literatura apresenta dados muito variados, com positividade de 11% a 77% (KIM *et al.*, 2009; YAMAGUCHI *et al.*, 2002; DHINGRA *et al.*, 2011; NORASTI *et al.*, 2014; WAKAMATSU *et al.*, 2011; GHAFARZADEGAN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2011).

Essa ampla gama de frequências indicadas na expressão positiva do CD44 pode ser explicada em parte pelos diferentes critérios utilizados para considerar a amostra como negativa ou positiva, como também pode ser reflexo de variação geográfica e das diferentes sensibilidades dos anticorpos utilizados, tendo em vista as diferentes isoformas de CD44 e a existência de variados protocolos (GHAFARZADEHGAN *et al.*, 2008).

Mesmo nas amostras consideradas positivas, o percentual de células coradas também foi muito variável. A percentagem de células com imunomarcção variou de 0% a 41% nos tumores primários, e de 0% a 85% nas metástases linfonodais, como ilustrado no quadro 1. A maioria dos casos de tumor primário (71%) incluíam menos de 3% de células positivas.

Visvader e Lindeman, em 2008, realizaram uma revisão sistemática que resume e avalia evidências para a existência de células-tronco cancerosas em tumores sólidos. A frequência destas células nesses tumores parece ser mais elevada do que em leucemias, classicamente tumores em que as células-tronco foram inicialmente identificadas. Contudo, dentro de um mesmo tipo de tumor, essa frequência apresenta variação. A percentagem de células imunomarcadas para CD133 variou de 1,8% a 25%, em casos de câncer de colon e de 0,32% a 42% nos casos de câncer de pulmão (O'Brien *et al.*, 2007; ERAMO *et al.*, 2008), enquanto que a porcentagem de células imunomarcadas para CD44 variou de 0,1% a 42%, em amostras de tumores do tipo carcinoma de cabeça e pescoço (PRINCE *et al.*, 2007). Em se tratando de casos de câncer gástrico, a porcentagem de células positivas para o CD133 variou de 0% a 18,3% e de 0% a 40% (HASHIMOTO *et al.*, 2014; WAKAMATSU *et al.*, 2012), e

para o CD44, a variação observada foi de 0% a 90% de células coradas (WAKAMATSU *et al.*, 2012).

Wakamatsu *et al.*, em 2011, encontraram percentagem de células tumorais positivas para o CD44 variando de 0% a 90%, com a maioria dos casos apresentando mais de 50% de células positivas. Considerando os casos positivos aqueles com >10% de células marcadas, obteve 62% das amostras positivas. Estudo realizado por Cao *et al.*, em 2014 observou que dos 58 casos positivos, em 98% a percentagem de células positivas foi menor que 15%, e em 62%, a percentagem de células com imunoexpressão foi menor do que 5%. Kurozumi *et al.*, em 1998, considerou como positivas as amostras com mais de 80% de células imunocoradas.

A expressão de CD44 foi detectada em 22% das amostras de mucosa gástrica normal e em algumas células do estroma tumoral. Han *et al.*, 2011, também evidenciou imunomarcagem no estroma, entretanto dificilmente identificou expressão no epitélio gástrico normal. Dhingra *et al.*, em 2011, evidenciou que a positividade do CD44 é maior nas amostras de tecido tumoral do que nas de mucosa gástrica normal (51% vs 31%), com diferença estatística significativa, dados diferentes dos evidenciados nesse estudo. Ao contrário dos dados encontrados em nosso trabalho, a expressão de CD44 não foi detectada no epitélio gástrico normal em alguns estudos (WAKAMATSU *et al.*, 2011; NORASTI *et al.*, 2014).

Este trabalho não evidenciou dados estatisticamente significantes entre as variáveis clínico-patológicas estudadas e a imunoexpressão de CD44. Dhingra *et al.*, em 2011, encontrou dados semelhantes, exceto pela frequência de positividade maior no tipo intestinal do que no difuso, dados não encontrados em nossa casuística.

Neste estudo, quando analisados a quantidade de casos positivos de tumores primários, não houve diferença significativa na imunoexpressão de CD44 entre os tipos histológicos de Lauren, achados consistentes com Wakamatsu *et al.*, 2012. Nesse ponto, a literatura é controversa, apresentando trabalhos que evidenciam expressão aumentada nos adenocarcinomas gástricos tipo intestinal (NORASTI *et al.*, 2014) ou nos difusos (YAMAGUCHI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2011).

Ao ser avaliado o número de células positivas para o CD44, no conjunto de casos de cada tipo histológico, encontrou-se um número maior de células marcadas no tipo difuso do que no intestinal, com diferença altamente significativa. Estes dados estão de acordo com o papel atribuído às células-tronco tumorais, de conferir maior agressividade à neoplasia, tendo-se em vista que o tipo difuso é mais indiferenciado e de pior prognóstico do que o intestinal. Não foram encontrados relatos de avaliação do número de células positivas por caso, para esse marcador de células-tronco, no levantamento bibliográfico realizado neste estudo.

Wakamatsu *et al.*, em 2011, estudando 190 amostras de tumor primário, coletadas de pacientes diagnosticados com câncer gástrico, observaram que a expressão do CD44 nas metástases linfonodais tende a ser a mesma encontrada no tumor primário, achados semelhantes aos do presente estudo. Dos 190 casos, 117 (62%) foram positivos para o CD44, com expressão membranar principalmente. Essa positividade esteve relacionada ao estágio N mais avançado e ao TNM, mas não ao estágio T isolado.

Cao *et al.*, em 2014, estudando uma série de 203 pacientes submetidos a gastrectomia por câncer gástrico evidenciaram relação direta entre a imunoexpressão de CD44 e o tamanho do tumor maior ou igual a 5 cm, presença de metástase linfonodal e tipo histológico pouco diferenciado. Não houve relação da imunoexpressão com a idade, o sexo, a localização e nem com a profundidade da invasão, esses últimos achados semelhantes aos de nosso estudo.

Kurozumi *et al.*, em 1998 estudando imunoexpressão de CD44v6 em 98 pacientes com câncer gástrico, submetidos a gastrectomia, observou que não houve relação dessa expressão com idade, sexo, tipo histológico, profundidade da invasão, envolvimento vascular ou invasão linfática, dados semelhantes ao nosso estudo. Dos casos negativos para CD44v6, uma das isoformas do CD44, apenas 13% apresentavam metástase linfonodal, enquanto que dos casos onde a imunoexpressão foi positiva, 88% apresentavam acometimento dos linfonodos, sugerindo que a expressão de CD44v6 é um importante fator para a presença de metástase linfonodal.

Yamaguchi *et al.*, em 2002, também estudando a expressão de CD44v6, em 201 casos de câncer gástrico avançado, encontrou imunoexpressão positiva em 47,3% dos casos. Assim como em nosso estudo, não evidenciou relação significativa entre a essa expressão e a profundidade do tumor, a invasão linfática, e nem com a presença de metástase em linfonodos.

Norasti *et al.*, em 2014, estudando amostras de 95 pacientes submetidos a gastrectomia entre os anos de 2006 a 2012, obtiveram positividade de 60% para imunoexpressão de CD44. Esta expressão também foi associada ao tipo intestinal, ao tamanho do tumor entre 4-8 cm, e à invasão da serosa sem invasão linfática ou vascular, resultados diferentes dos encontrados em nosso trabalho.

Quanto à imunomarcagem nas amostras de metástases linfonodais de nosso estudo, assim como no tumor primário, não houve diferença significativa nos casos positivos dos dois histotipos. No entanto, quando realizada a contagem de células positivas, foi observada novamente uma grande diferença, com maior positividade nas metástases de carcinomas

difusos. Não foram encontrados novamente dados na literatura para comparação com estes resultados.

Dessa forma, ao comparar os nossos resultados para o CD44 com a literatura, observa-se que há grande variabilidade nos critérios de positividade, uma grande variação no número de células marcadas em cada amostra, assim como nas correlações anatomo-clínicas.

Em relação à imunexpressão do CD133, o presente estudo evidenciou que 24% das amostras foram positivas. Estes achados estão de acordo com os estudos de Lee *et al.* (2012), Ishigami *et al.* (2010) e Hashimoto *et al.* (2012), que evidenciaram tanto expressão membranar quanto citoplasmática nas células neoplásicas, em 23%, 28% e 30% dos casos, respectivamente. Achados diferentes são evidenciados na literatura, com expressão variando de 18% a 57% (WAKAMATSU *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; NORASTI *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2010).

Essa variação na percentagem de amostras positivas também pode ser explicada em parte pelos diferentes critérios utilizados para considerar a amostra como negativa ou positiva ou as demais argumentações utilizadas para o CD44.

Assim como para o CD44, mesmo nas amostras consideradas positivas, o percentual de células coradas para o CD133 foi muito variável. A percentagem de células com imunomarcção variou de 0% a 64% no tumor primário e de 0% a 39% nas metástases linfonodais, como ilustrado no quadro 2. A maioria dos casos de tumor primário (13/16=81%) incluíam menos de 3% de células positivas.

Wakamatsu *et al.*, em 2011, encontraram percentagem de células tumorais positivas para o CD133 variando de 0% a 40%, com a maioria dos casos apresentando menos de 20% de células positivas. Considerando os casos positivos aqueles com >10% de células marcadas, obteve 18% das amostras positivas. Hashimoto *et al.*, em 2012, encontrou variação de células neoplásicas positivas de 0% a 18,3%, com expressão observada em 67,7% dos casos. Considerando como amostra positiva a presença de imunexpressão em mais de 5% das células neoplásicas, observou positividade em 29,6% dos casos.

No presente estudo, comparou-se o grau de invasão tumoral com a imunexpressão de CD133 e foram encontrados resultados marginalmente significantes ($p=0,0505$). Dos 10 casos de tumor em estágio T1, 5 (50%) apresentaram expressão positiva, enquanto que dos 57 casos classificados como T2 a T4, apenas 11 (19%) foram positivos. No entanto, ao se comparar T1-T2 com T3-T4, não se identifica diferença estatisticamente significativa ($p=0,5056$). Dos 16 casos de tumor em estágio T1-T2, 5 (31%) apresentaram expressão positiva, enquanto que dos 51 casos classificados como T3-T4, apenas 11 (22%) foram positivos.

Neste ponto, a literatura apresenta dados controversos. Uma série de estudos não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre a imunexpressão de CD133 e o estágio T tumoral (YU *et al.*, 2010; WAKAMATSU *et al.*, WANG *et al.*, 2011; LEE *et al.*, HASHIMOTO *et al.*, 2012), entretanto, Ishigami *et al.*, em 2010, estudando uma série consecutiva de 97 pacientes submetidos a gastrectomia curativa, observaram relação direta entre o grau de invasão tumoral e a positividade do CD133. Dados compatíveis com os achados de Zhao *et al.*, em 2010.

Neste estudo, não houve diferença significativa na imunexpressão de CD133 entre os tipos histológicos de Lauren, achados consistentes com Ishigami *et al.*, em 2010 e Wang *et al.*, 2011. Nesse ponto, a literatura também é controversa, apresentando trabalhos que evidenciam expressão aumentada nos adenocarcinomas gástricos intestinais (LEE *et al.*, 2012; WAKAMATSU *et al.*, 2012; NORASTI *et al.*, 2014) e nos difusos (JIANG *et al.*, 2011).

A contagem do número de células positivas para o CD133, no conjunto dos casos de cada tipo histológico, revelou um número maior de células marcadas no tipo intestinal do que no difuso, com diferença altamente significativa, o contrário do que foi observado para o CD44. Houve um dos casos com elevado número de células que modificou substancialmente a média e mediana do grupo, se excluído este caso aberrante, não haveria essa diferença significativa. Não foram encontrados relatos de avaliação do número de células positivas para esse marcador de células-tronco, no levantamento bibliográfico realizado neste estudo.

Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de CD133 entre os sexos, em acordo com os dados de Ishigami *et al.*, 2010, Jiang *et al.*, 2011 e Wang *et al.*, 2011.

Nosso trabalho também não evidenciou diferença significativa na expressão de CD133 relacionada a idade dos pacientes, de forma similar aos achados de Wang *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2012 e Hashimoto *et al.*, 2014. Todavia, Norasti *et al.*, em 2014, encontrou relação significativa entre a imunexpressão de CD133 e a idade. Na casuística daqueles autores, dos pacientes com idade menor do que 65 anos, 29% foram positivos, enquanto que essa expressão foi de 71% nas amostras de pacientes com idade maior ou igual a 65 anos ($p < 0,001$).

Em se tratando da relação entre a presença de metástase linfonodal e a imunexpressão de CD133, este trabalho não evidenciou dados significantes. Esse achado está de acordo com Wang *et al.*, 2011 e Lee *et al.*, 2012, contudo alguns trabalhos obtiveram dados que relacionam de forma direta o acometimento linfonodal e expressão aumentada de CD133 (WAKAMATSU *et al.*; ISHIGAMI *et al.*; ZHAO *et al.*, 2010).

Não foi observada relação entre invasão angiolinfática e imunoposição de CD133, da mesma maneira do que foi encontrado por Wang *et al.*, 2011 e Norasti *et al.*, em 2014. Alguns estudos, entretanto, observaram relação entre a presença de invasão angiolinfática e aumento da expressão de CD133 (ISHIGAMI *et al.*, YU *et al.*, 2010; HASHIMOTO *et al.*, LEE *et al.*, 2012).

O presente estudo não encontrou diferença estatisticamente significativa entre a imunoposição de CD133 e as variáveis clínico patológicas de localização anatômica, dimensão do tumor e invasão perineural.

A expressão de CD133 também foi encontrada em amostras de mucosa gástrica não-neoplásica histologicamente normal, assim como identificado por Norasti *et al.*, 2012, ao contrário de alguns estudos em que não foi detectada essa expressão (WAKAMATSU *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012; HASHIMOTO *et al.*, 2012).

Em nosso estudo, a imunoposição de CD133 na mucosa não-neoplásica histologicamente normal, foi maior do que no tumor primário e do que na metaplasia intestinal, com diferença estatisticamente significativa, assim como foi maior também na mucosa normal de casos de adenocarcinoma do tipo intestinal, em relação à metaplasia intestinal desse mesmo tipo, achados não encontrados na literatura.

A imunoposição na mucosa não-neoplásica histologicamente normal, esteve presente na maioria dos casos nas células da camada basal, de forma similar aos achados de Pan *et al.*, 2013. Em apenas 2 casos estudados houve expressão na superfície. Este achado está de acordo com a localização habitual de células tronco normais e células progenitoras nas regiões mais profundas das criptas gástricas. Além disso, a mucosa não-neoplásica, apesar de histologicamente normal, pertence a um paciente com câncer e pode representar campo potencial neoplásico, sujeito a transformações a nível molecular que nem sempre são detectadas pelas colorações habituais, ao microscópio. Avaliação da expressão de CD44 e CD133 em amostras de mucosa normal (em pacientes sem câncer ou outra patologia gástrica) seria importante para comparação com os casos deste estudo.

Em relação à imunomarcção de CD133 nas amostras de metástases linfonodais de nosso estudo, não houve diferença significativa nos casos positivos dos dois histotipos. Contudo, ao ser realizada a contagem de células positivas, no conjunto de casos, foi observada novamente uma grande diferença, com maior positividade nas metástases de carcinomas difusos, comparados aos intestinais, de forma similar ao encontrado para o CD44. Isso pode indicar o papel das células-tronco na progressão tumoral, favorecendo um crescimento mais agressivo do tumor, tendo em vista que os carcinomas gástricos do tipo difuso possuem pior

prognóstico do que os do tipo intestinal. Não foram encontrados relatos na literatura para comparação com estes resultados.

Na pesquisa bibliográfica realizada neste estudo, não foram encontradas descrições de marcadores específicos para células-tronco tumorais. Os marcadores CD44 e CD133, isolados, parecem ser bons marcadores de células-tronco normais e tumorais, sem contudo distingui-las entre si. Apesar disso, têm sua utilidade no estudo da carcinogênese e da progressão tumoral, já que é muito fácil distinguir células tumorais de células normais em colorações de H&E em secções histológicas de carcinomas gástricos, ou seja, o encontro destes biomarcadores em células que fazem parte da massa tumoral, só podem representar células tronco-cancerosas. Contudo, é necessário que se busquem novos biomarcadores, mais específicos de células tronco tumorais e que não estejam presentes nas células tronco normais.

6 CONCLUSÕES

- Os marcadores CD44 e CD133 foram detectados em uma minoria dos casos de câncer gástrico primário e respectivas metástases linfonodais e o percentual de células-tronco positivas é variável, em geral muito baixo;
- A imunexpressão de CD44 e de CD133 é semelhante no tumor primário e nas metástases linfonodais;
- Não houve diferença na imunomarcagem de CD44, no conjunto de casos positivos, entre os dois histotipos, contudo, o número total de células marcadas do tipo difuso foi muito superior ao total de células positivas dos carcinomas intestinais, nos tumores gástricos primários e metástases linfonodais;
- Não houve diferença na imunomarcagem de CD133, no conjunto de casos positivos, entre os dois tipos histológicos, porém, o número total de células marcadas do tipo intestinal foi superior ao total de células positivas dos carcinomas difusos, nos tumores gástricos primários; nas metástases linfonodais houve maior número de células positivas nos tumores difusos;
- A expressão de CD44 na amostra tumoral foi mais frequente do que na mucosa não-neoplásica histologicamente normal, mas sem diferença significativa; a positividade do CD133 foi significativamente superior na amostra de mucosa não-neoplásica histologicamente normal, em relação à tumoral e à metaplásica, nesta apenas nos casos de carcinomas do tipo intestinal;
- Não houve correlação entre a expressão de CD44 no adenocarcinoma gástrico primário e as variáveis clínico-patológicas estudadas (sexo, idade, localização anatômica, tamanho do tumor, invasão angiolinfática, invasão perineural e profundidade do tumor);
- Das variáveis clínico-patológicas estudadas, em relação ao CD133, apenas o grau de profundidade do tumor apresentou diferença marginalmente significativa, com relação inversa entre o grau de invasividade local e a expressão deste biomarcador;

REFERÊNCIAS

- ADIKIBI, Tonye T. **Investigation into the functional role of the stem cell marker CD133**. 2011. Tese de Doutorado. Kingston University
- AKASAKA, Y. *et al.* Expression of a candidate marker for progenitor cells, Musashi-1, in the proliferative regions of human antrum and its decreased expression in intestinal metaplasia. **Histopathology**, v. 47, n. 4, p. 348-356, 2005
- AKIYAMA, J.; UEMURA, A. Intestinal metaplasia subtype and gastric cancer risk. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 24, n. 2, p. 4-6, 2009
- AL-MARZOQEE, F. *et al.* Upregulation and inhibition of the nuclear translocation of Oct4 during multistep gastric carcinogenesis. **Int J Oncol.**, v. 41, n. 5, p. 1733-1743, 2012
- ARNOLD, K., SARKAR, A., YRAM, M.A., POLO, J.M., *et al.*, Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice, **Cell Stem Cell**, v. 9, p. 317-329, 2011
- BOSMAN, F. T., *et al.* WHO Classification of tumours of the digestive System, **International Agency for Research on Cancer (IARC)**, v. 4, p. 45-74, 2010
- BARKER, N., VAN ES, J.H., KUIPERS, J., KUJALA, P., VAN DEN BORN, M., COZIJNSEN, M., HAEGEBARTH, A., KORVING, J., BEGTHEL, H., PETERS, P.J., CLEVERS, H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5, **Nature**, v. 449, p. 1003-1007, 2007
- BARKER, N., HUCH, M., KUJALA P., VAN DE WETERING, M., SNIPPERT, H.J., VAN ES, J.H., *et al.*, Lgr5+ve stem cells drive self-renewal in the stomach and build longlived gastric units in vitro, **Cell Stem Cell**, v. 6, p. 25-36, 2010
- BARTSCH, H.; SPIEGELHALDER, B. Environmental exposure to N-nitroso compounds (NNOC) and precursors: an overview. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 5, p. 11-17, 1996
- BINGHAM, S. *et al.* Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the Human colon explain the association between red meat and colon cancer? **Carcinogenesis**, v. 17, n. 3, p. 515-23, 1996
- BOURSEAU-GUILMAIN, Erika *et al.* The importance of the stem cell marker prominin-1/CD133 in the uptake of transferrin and in iron metabolism in human colon cancer Caco-2 cells. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25515, 2011
- BRUCKNER, H.W.; KONDO, K. Neoplasms of the stomach. In: Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E III, Kufe DW, Weichselbaum RR, eds. **Cancer medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 1879-22, 1997
- CARNEIRO F. Classification of gastric carcinomas. **Cur. Diag. Pathol.** v. 4, p. 51-59, 1997.

CHOI, D., et al. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. **World J Gastroenterol.**, v. 15, n. 18, p. 2258-2264, 2009.

CORBEIL, D.; FARGEAS, C.; HUTTNER, W. Rat prominin, like its mouse and human orthologues, is a pentaspan membrane glycoprotein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 285, n. 4, p. 939-944, 2001.

CORREA, Pelayo; PIAZUELO, M. Blanca. The gastric precancerous cascade. **Journal of digestive diseases**, v. 13, n. 1, p. 2-9, 2012.

DHINGRA, Sadhna et al. Clinicopathologic significance of putative stem cell markers, CD44 and nestin, in gastric adenocarcinoma. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 4, n. 8, p. 733, 2011.

DURÃES, C., *et al.* Biomarkers for gastric cancer: prognostic, predictive or targets of therapy? **Virchows Arch.**, n. 464, v. 3, p. 367-378, 2014

ERAMO, A. et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. **Cell Death Differ**, v. 15, p. 504–514, 2008

GHAFFARZADEHGAN, Kamran et al. Expression of cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma and its prognostic importance. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 14, n. 41, p. 6376, 2008.

GUGGENHEIM, Douglas E.; SHAH, Manish A. Gastric cancer epidemiology and risk factors. **Journal of surgical oncology**, v. 107, n. 3, p. 230-236, 2013.

HAN, M-E., et al. Cancer spheres from gastric cancer patients provide an ideal model system for cancer stem cell research. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 3589-3605, 2011

HOFFMANN, W. Stem cells, self-renewal and cancer of the gastric epithelium, **Curr. Med. Chem**, v. 19, p. 5975-5983, 2012.

HOFFMANN, W. Regeneration of the gastric mucosa and its glands from stem cells. **Curr. Med. Chem**, v. 15, p. 3133–3144, 2008.

HOTCHKISS, J. H. Preformed N-nitroso compounds in foods and beverages. **Cancer surveys**, v.8, n. 2, p. 295-321, 1988.

INCA

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/definicao>

IACOVELLI, R., Pietrantonio F, Farcomeni A, Maggi C, Palazzo A, et al. 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. , 2014

ISHIGAMI, Sumiya et al. Prognostic impact of CD133 expression in gastric carcinoma. **Anticancer research**, v. 30, n. 6, p. 2453-2457, 2010.

JAKSZYN, Paula; GONZÁLEZ, Carlos Alberto. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. **World journal of gastroenterology**, v. 12, n. 27, p. 4296, 2006

JIANG, Yang et al. Expressions of putative cancer stem cell markers ABCB1, ABCG2, and CD133 are correlated with the degree of differentiation of gastric cancer. **Gastric cancer**, v. 15, n. 4, p. 440-450, 2012.

KEYSAR, Stephen B.; JIMENO, Antonio. More than markers: biological significance of cancer stem cell-defining molecules. **Molecular cancer therapeutics**, v. 9, n. 9, p. 2450-2457, 2010.

KIKUCHI, S. et al. Tumor volume: a novel prognostic factor in patients who undergo curative resection for gastric cancer. **Langenbeck's Arch Surg**, v. 385, p. 225-228, 2000.

KIM, Jung Yeon et al. Osteopontin, CD44, and NFκB Expression in Gastric Adenocarcinoma. **Cancer Research and Treatment**, v. 41, n. 1, p. 29-35, 2009.

KIM, Jeongseon et al. Effects of interleukin-10 polymorphisms, Helicobacter pylori infection, and smoking on the risk of noncardia gastric cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29643, 2012.

KIM, Kyungeun et al. High-level expression of stem cell marker CD133 in clear cell renal cell carcinoma with favorable prognosis. **Oncology letters**, v. 2, n. 6, p. 1095-1100, 2011.

KIMURA, M. S., MUTOH, H., SUGANO, K., SOX9 is expressed in normal stomach, intestinal metaplasia, and gastric carcinoma in humans, **J Gastroenterol**, v. 46, p. 1292-1299, 2011.

KOIZUMI, W., et al. Phase II study of S-1, a novel oral derivative of 5-fluorouracil, in advanced gastric cancer. **Oncology**, v. 58, p. 191-197, 2000

KOIZUMI, W., Tanabe S, Saigenji K, et al. Phase I/II study of S-1 combined with cisplatin in patients with advanced gastric cancer. **Br J Cancer**, v. 89, p. 2207-2212, 2003.

KOJIMA, M. et al. Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. **Cancer science**, v. 99, n. 8, p. 1578-1583, 2008.

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.

LAUREN, Pekka. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 64, p. 31-49, 1965.

LEE, Han Hong et al. CD133 expression is correlated with chemoresistance and early recurrence of gastric cancer. **Journal of surgical oncology**, v. 106, n. 8, p. 999-1004, 2012.

LIN, Yingsong et al. Comparative epidemiology of gastric cancer between Japan and China. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 39, p. 4421, 2011.

LOEFFLER M., ROEDER, I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models--a conceptual approach. **Cells Tissues Organs**, v. 171, p. 8-26, 2002

MAW, M., et al. A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. **Hum Mol Genet.**, v. 9, p. 27 a 34, 2000

MILLS, J. C.; SHIVDASANI, R. A., Gastric Epithelial Stem Cells. **Gastroenterology**, v. 140, p. 412-424, 2011

MIRAGLIA, Sheri et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 5013-5021, 1997.

NAGINI, Siddavaram. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World journal of gastrointestinal oncology**, v. 4, n. 7, p. 156, 2012.

NAOR, David; SIONOV, Ronit Vogt; ISH-SHALOM, Dvorah. CD44: structure, function and association with the malignant process. **Advances in cancer research**, v. 71, p. 241-319, 1997.

NISHIKAWA, S., et al. Aldehyde dehydrogenase high gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy. **Int J Oncol.**, v. 42, n. 4, p. 1437-1442, 2013

NOSRATI, Anahita; NAGHSHVAR, Farshad; KHANARI, Somaieh. Cancer Stem Cell Markers CD44, CD133 in Primary Gastric Adenocarcinoma. **Int J Mol Cell Med Autumn**, v. 3, n. 4, p. 280, 2014.

O'BRIEN, C., POLLETT A., GALLINGER S., DICK, J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. **Nature**, v. 445, p. 106-110, 2007

PAN, Q. et al. Identification of Lineage-Uncommitted, Long-Lived, Label-Retaining Cells in Healthy Human Esophagus and Stomach, and in Metaplastic Esophagus. **Gastroenterology**, v. 144, p. 761–770, 2013

PRINCE, M. E. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proc. Natl Acad. Sci**, v. 104, n. 973–978, 2007

QIAO, Xiaotan T.; GUMUCIO, Deborah L. Current molecular markers for gastric progenitor cells and gastric cancer stem cells. **Journal of gastroenterology**, v. 46, n. 7, p. 855-865, 2011.

ROCCO, Alba et al. CD133 and CD44 cell surface markers do not identify cancer stem cells in primary human gastric tumors. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 6, p. 2686-2693, 2012.

RODRIGUES, Bruno. Imunoexpressão das caderinas E e N em Carcinomas Gástricos Primários e Respectivas Metástases Lifonodais. **2014. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Patologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.**

RYU, Han Suk *et al.* Combination of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes has independent prognostic value in gastric cancer. **Human pathology**, v. 43, n. 4, p. 520-528, 2012

SAIKAWA, Y *et al.* Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis. **Gastric cancer**, n. 13, p. 11-24, 2010.

SAKATA, Y., *et al.* Late phase II study of novel oral fluoropyrimidine anticancer drug S-1 (1 M tegafur-0.4 M gimestat-1 M otastat potassium) in advanced gastric cancer patients. **Eur J Cancer**, v. 34, p. 1715-1720, 1998

SAKURAMOTO, S., *et al.* Adjuvant Chemotherapy for Gastric Cancer with S-1, an Oral Fluoropyrimidine. **N Engl J Med**, v. 357, p 1810-1820, 2007

SCHWARTZ, John D. *et al.* CD133 staining detects acute kidney injury and differentiates clear cell papillary renal cell carcinoma from other renal tumors. **ISRN Biomarkers**, v. 2013, 2013.

SHI, Shan-Rong; SHI, Yan; TAYLOR, Clive R. Antigen retrieval immunohistochemistry review and future prospects in research and diagnosis over two decades. **Journal of histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, n. 1, p. 13-32, 2011.

SHIMOYAMA, Y.; HIROHASHI, S. Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. **Cancer Res.**, v, 51, n. 8, p. 2185-2192, 1991.

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

SIMON, Eva *et al.* The spatial distribution of LGR5+ cells correlates with gastric cancer progression. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35486, 2012.

SINGH, Sheila K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. **nature**, v. 432, n. 7015, p. 396-401, 2004.

SINGH, S. Gastric cancer stem cells: a novel therapeutic target. **Cancer Letters**, v. 338, n. 1, p. 110-119, 2013

SNIPPERT, Hugo J. *et al.* Prominin-1/CD133 marks stem cells and early progenitors in mouse small intestine. **Gastroenterology**, v. 136, n. 7, p. 2187-2194. e1, 2009.

SOBIN, L., GOSPODAROWICZ, M., WITTEKIND, C. TNM Classification of Malignant Tumours. **International Union Against Cancer**, v. 7, 2009.

SUBRAMANIAM, Dharmalingam *et al.* Cancer stem cells: a novel paradigm for cancer prevention and treatment. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 10, n. 5, p. 359, 2010.

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

TSUGANE, Shoichiro; SASAZUKI, Shizuka. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. **Gastric cancer**, v. 10, n. 2, p. 75-83, 2007.

VISVADER, Jane E.; LINDEMAN, Geoffrey J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 10, p. 755-768, 2008.

WAKAMATSU, Yuta et al. Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. **Pathology international**, v. 62, n. 2, p. 112-119, 2012.

WANG, T et al. Sequential expression of putative stem cell markers in gastric carcinogenesis. **British Journal of Cancer, Singapore**, p. 658-665. 09 ago. 2011. Disponível em: <www.bjcancer.com>. Acesso em: 04 ago. 2013.

WANG, Wei et al. Role of cancer stem cell marker CD44 in gastric cancer: a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med**, v. 7, n. 12, p. 5059-5066, 2014.

WEN, Lei et al. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in gastric cancer: a systematic review. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59154, 2013.

WU, Chew-Wun et al. Prognostic indicators for survival after curative resection for patients with carcinoma of the stomach. **Digestive diseases and sciences**, v. 42, n. 6, p. 1265-1269, 1997.

YAMASHITA, Keishi et al. Trend in gastric cancer: 35 years of surgical experience in Japan. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 29, p. 3390, 2011.

YANG, Chang et al. Pentaspan membrane glycoprotein, prominin-1, is involved in glucose metabolism and cytoskeleton alteration. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 8, p. 854-862, 2007.

YANG, Lang et al. Gastric cancer stem-like cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype. **Cancer letters**, v. 310, n. 1, p. 46-52, 2011.

YU, JW., *et al.* Expressions and clinical significances of CD133 protein and CD133 mRNA in primary lesion of gastric adenocarcinoma. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 29, p. 141–150, 2011

ZHI, Q., et al. Salinomycin can effectively kill ALDH(high) stem-like cells on gastric cancer. **Biomed Pharmacother**, v. 65, n 7, p 509-515, 2011

IMUNOEXPRESSÃO DE CD44 E CD133 EM CARCINOMAS GÁSTRICOS PRIMÁRIOS E RESPECTIVAS METÁSTASES LINFONODAIS – QUADRO GERAL – DADOS BRUTOS

| CASO | SEXO | IDADE | LAUREN | IMUNOEXPRESSÃO DE CD44 | | | | IMUNOEXPRESSÃO DE CD133 | | | | PTN (M) | LOCAL | TUMOR | I.ANG. | I.PER. | |
|------|------|-------|--------|------------------------|----------|----------|----------|-------------------------|----------|----------|----------|---------|-------|-----------|--------|--------|---|
| | | | | M.N. | M.I. | EST | LINF | M.N. | M.I. | EST. | LINF. | | | | | | |
| 1 | F | 72 | INT | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N2 | CORPO | ≥5cm | A | A |
| 2 | F | 72 | INT | # | # | NEGATIVA | # | # | # | POSITIVA | # | T1b | N2 | CORPO | ≥5cm | P | # |
| 3 | F | 48 | INT | # | # | NEGATIVA | NEGATIVA | # | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N2 | CORPO | ≥5cm | A | A |
| 4 | M | 48 | INT | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | # | NEGATIVA | NEGATIVA | # | T3 | N0 | ANTRO | ≥5cm | A | A |
| 5 | M | 71 | INT | # | NEGATIVA | NEGATIVA | # | # | NEGATIVA | NEGATIVA | # | T3 | N3a | CORPO | ≥5cm | A | P |
| 6 | M | 65 | INT | POSITIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | POSITIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | T3 | N1 | ANTRO | <5cm | A | A |
| 7 | F | 69 | INT | NEGATIVA | # | # | # | POSITIVA | # | POSITIVA | # | T1b | N0 | ANTRO | <5cm | A | A |
| 8 | M | 66 | INT | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | # | NEGATIVA | NEGATIVA | # | T2 | N2 | CORPO | ≥5cm | P | A |
| 9 | M | 86 | INT | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | POSITIVA | # | NEGATIVA | # | T3 | N0 | CORPO | ≥5cm | A | # |
| 10 | M | 73 | INT | POSITIVA | # | NEGATIVA | POSITIVA | POSITIVA | # | POSITIVA | NEGATIVA | T3 | N2 | ANTRO | ≥5cm | P | # |
| 11 | F | 70 | INT | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | T1b | N0 | ANTRO | <5cm | A | A |
| 12 | F | 62 | INT | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | T3 | N0 | CORPO | ≥5cm | P | A |
| 13 | M | 57 | INT | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | POSITIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T2 | N2 | CORPO | ≥5cm | A | A |
| 14 | F | 68 | INT | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | POSITIVA | # | T3 | N2 | CORP+ANTR | ≥5cm | P | # |
| 15 | F | 68 | INT | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | POSITIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | T3 | N1 | ANTRO | ≥5cm | A | # |
| 16 | F | 81 | INT | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | T1 | N0 | CORPO | ≥5cm | A | # |
| 17 | F | 73 | INT | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | POSITIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N1 | CORPO | ≥5cm | P | # |
| 18 | F | 70 | INT | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | # | POSITIVA | # | # | T2 | N1 | CORPO | ≥5cm | P | A |
| 19 | M | 72 | INT | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N2 | CORPO | ≥5cm | P | A |
| 20 | M | 66 | INT | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | NEGATIVA | # | T3 | N0 | CORPO | ≥5cm | A | A |
| 21 | F | 63 | INT | # | # | NEGATIVA | NEGATIVA | # | # | NEGATIVA | POSITIVA | T2 | N3 | ANTRO | ≥5cm | A | A |
| 22 | M | 63 | INT | POSITIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | POSITIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N3a | ANTRO | <5cm | A | A |
| 23 | M | 75 | INT | # | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | POSITIVA | T3 | N3a | CORPO | ≥5cm | P | P |
| 24 | F | 50 | INT | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | T1b | NX | CORPO | ≥5cm | A | A |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|----|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----|-----|----------|------|---|---|
| 25 | F | 72 | INT | POSITIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | POSITIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | T2 | N0 | ANTRO | <5cm | A | A |
| 26 | M | 75 | INT | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | T2 | N1 | CORPO | ≥5cm | P | # |
| 27 | M | 65 | INT | POSITIVA | # | POSITIVA | # | POSITIVA | # | NEGATIVA | # | T1b | N0 | ANTRO | <5cm | A | A |
| 28 | M | 58 | INT | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | T3 | N1 | ANTRO | <5cm | A | A |
| 29 | M | 72 | INT | NEGATIVA | NEGATIVA | POSITIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | T4 | N1 | # | <5cm | A | # |
| 30 | F | 64 | INT | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | NEGATIVA | # | T3 | N0 | ANTRO | ≥5cm | A | A |
| 31 | M | 81 | INT | POSITIVA | POSITIVA | POSITIVA | # | # | NEGATIVA | NEGATIVA | # | T3 | N0 | # | ≥5cm | A | # |
| 32 | M | 61 | INT | NEGATIVA | # | POSITIVA | POSITIVA | NEGATIVA | # | # | NEGATIVA | T3 | N2 | CORPO | ≥5cm | P | # |
| 33 | F | 67 | INT | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | T1b | N0 | # | <5cm | A | # |
| 34 | F | 68 | INT | NEGATIVA | # | POSITIVA | POSITIVA | POSITIVA | # | POSITIVA | NEGATIVA | T4 | N3a | # | ≥5cm | A | # |
| 35 | M | 78 | INT | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | POSITIVA | T3 | N1 | # | <5cm | P | # |
| 36 | M | 68 | INT | # | NEGATIVA | POSITIVA | # | # | NEGATIVA | POSITIVA | # | T3 | N1 | # | ≥5cm | A | A |
| 37 | M | 62 | INT | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N1 | # | <5cm | A | # |
| 38 | M | 54 | DIF | POSITIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | POSITIVA | # | NEGATIVA | POSITIVA | T3 | N2 | ANTRO | ≥5cm | A | P |
| 39 | M | 40 | DIF | NEGATIVA | # | POSITIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | T3 | N1 | CORPO | ≥5cm | P | P |
| 40 | M | 50 | DIF | # | # | POSITIVA | NEGATIVA | # | # | POSITIVA | NEGATIVA | T3 | N3b | COR+ANTR | ≥5cm | P | P |
| 41 | M | 65 | DIF | # | # | NEGATIVA | # | # | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N2 | CORPO | ≥5cm | P | P |
| 42 | F | 42 | DIF | POSITIVA | # | POSITIVA | # | POSITIVA | # | POSITIVA | # | T3 | N0 | ANTRO | ≥5cm | A | # |
| 43 | F | 42 | DIF | # | # | POSITIVA | # | # | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N3a | CORPO | ≥5cm | P | P |
| 44 | M | 45 | DIF | POSITIVA | # | POSITIVA | # | POSITIVA | # | POSITIVA | NEGATIVA | T3 | N2 | CORPO | ≥5cm | P | # |
| 45 | M | 58 | DIF | # | # | NEGATIVA | NEGATIVA | # | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N3a | CORPO | ≥5cm | P | P |
| 46 | M | 61 | DIF | # | # | NEGATIVA | # | # | # | NEGATIVA | # | T3 | N0 | CORPO | ≥5cm | P | # |
| 47 | M | 39 | DIF | # | # | # | NEGATIVA | # | # | # | NEGATIVA | T3 | N3 | CORPO | ≥5cm | P | # |
| 48 | F | 54 | DIF | # | # | NEGATIVA | # | # | # | NEGATIVA | # | T2a | N0 | CORPO | <5cm | A | A |
| 49 | M | 68 | DIF | # | # | # | POSITIVA | # | # | # | POSITIVA | T3 | N3 | ANTRO | ≥5cm | P | P |
| 50 | M | 74 | DIF | # | # | POSITIVA | # | # | # | NEGATIVA | # | T3 | N2 | CORPO | ≥5cm | P | P |
| 51 | M | 55 | DIF | NEGATIVA | NEGATIVA | POSITIVA | # | POSITIVA | # | NEGATIVA | # | T3 | N3a | ANTRO | ≥5cm | A | A |
| 52 | F | 63 | DIF | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | POSITIVA | # | NEGATIVA | # | T4 | N0 | ANTRO | ≥5cm | A | A |
| 53 | M | 69 | DIF | # | # | POSITIVA | # | # | # | NEGATIVA | # | T3 | N1 | CORPO | ≥5cm | P | P |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|--------------|----|------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|--|---------------------------|---------------------|----------------------|
| 54 | M | 59 | DIF | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | POSITIVA | POSITIVA | T3 | N2 | CORPO | ≥5cm | P | P |
| 55 | M | 51 | DIF | NEGATIVA | # | POSITIVA | NEGATIVA | POSITIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N1 | ANTRO | ≥5cm | A | P |
| 56 | M | 64 | DIF | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N2 | CORPO | ≥5cm | P | P |
| 57 | F | 57 | DIF | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | T1 | N0 | CORPO | ≥5cm | P | A |
| 58 | F | 59 | DIF | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | POSITIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N1 | CORPO | <5cm | A | # |
| 59 | M | 41 | DIF | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | T3 | N2 | ANTRO | <5cm | A | # |
| 60 | M | 59 | DIF | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | POSITIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N1 | ANTRO | ≥5cm | P | # |
| 61 | M | 61 | DIF | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | T3 | N1 | CORPO | ≥5cm | P | # |
| 62 | F | 39 | DIF | # | # | NEGATIVA | # | # | # | NEGATIVA | # | T3 | N2 | ANTRO | ≥5cm | P | P |
| 63 | M | 65 | DIF | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | # | # | # | # | # | # |
| 64 | F | 54 | DIF | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | T1b | N1 | # | <5cm | A | # |
| 65 | M | 66 | DIF | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | T3 | N2 | # | ≥5cm | P | P |
| 66 | M | 55 | DIF | POSITIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | T1 | N0 | # | <5cm | A | # |
| 67 | M | 65 | DIF | # | POSITIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N3a | CORPO | <5cm | P | P |
| 68 | F | 48 | DIF | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | NEGATIVA | # | T3 | N1 | CORPO | <5cm | A | # |
| 69 | F | 60 | DIF | NEGATIVA | # | POSITIVA | # | POSITIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N2 | # | <5cm | A | # |
| 70 | M | 57 | DIF | POSITIVA | # | NEGATIVA | # | # | NEGATIVA | NEGATIVA | # | T3 | N2 | CORPO | <5cm | P | # |
| 71 | F | 55 | DIF | NEGATIVA | # | POSITIVA | POSITIVA | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N2 | COR+ANTR | ≥5cm | P | P |
| 72 | F | 54 | DIF | POSITIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | NEGATIVA | # | NEGATIVA | NEGATIVA | T3 | N3 | # | <5cm | P | A |
| Total | M=43 F=29 | | INT=37 DIF=35 | POS=12 NEG=42 #=18 | POS=2 NEG=15 #=55 | POS=21 NEG=48 #=3 | POS=5 NEG=20 #=47 | POS=23 NEG=25 #=24 | POS=1 NEG=14 #=57 | POS=16 NEG=52 #=4 | POS=7 NEG=23 #=42 | T1=10 T2- T4=61 #=1 | N0=17 N1- N3=54 #=1 | CORPO=35 ANTRO=21 COR+ANTR=3 #=13 | <5cm=21 ≥5cm=50 #=1 | A=37 P=34 #=1 | A=25 P=18 #=29 |

DIF= Difuso INT= Intestinal M.N.= Mucosa normal M.I.= Metaplasia intestinal EST.= Estômago LINF.= Linfonodo I.ANG.= Invasão angiolinfática I.PER= Invasão perineural POS= Positiva NEG= Negativa CORP=Corpo ANTR=Antro A= Ausente P=Presente # = Não avaliável