



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

ADRIANA ESTELA FLORES VALIENTE

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSIONÃO DE LGR5 E LGR6 EM CÉLULAS-TRONCO
NO CÂNCER GÁSTRICO PRIMÁRIO, METÁSTASES LINFONODAIS E MUCOSA
GÁSTRICA HISTOLOGICAMENTE NORMAL**

FORTALEZA

2017

ADRIANA ESTELA FLORES VALIENTE

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE LGR5 E LGR6 EM CÉLULAS-TRONCO
NO CÂNCER GÁSTRICO PRIMÁRIO, METÁSTASES LINFONODAIS E MUCOSA
GÁSTRICA HISTOLOGICAMENTE NORMAL**

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Patologia 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)

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Via VALIENTE, ADRIANA ESTELA FLORES.
AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSION DE LGR5 E LGR6 EM CÉLULAS-TRONCO NO CÂNCER
GÁSTRICO PRIMÁRIO, METÁSTASES LINFONODAIS E MUCOSA GÁSTRICA
HISTOLOGICAMENTE NORMAL / ADRIANA ESTELA FLORES VALIENTE – 2017.
77 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Patologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida.

1. Câncer gástrico. 2. Células- tronco. 3. LGR5 , LGR6. I. Título.

CDD 571.9

ADRIANA ESTELA FLORES VALIENTE

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE LGR5 E LGR6 EM CÉLULAS TRONCO
NO CÂNCER GÁSTRICO PRIMÁRIO, METÁSTASES LINFONODAIS E MUCOSA
GÁSTRICA HISTOLOGICAMENTE NORMAL**

Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Oncologia.

Aprovada em: 16/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Prof. Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*A Deus por me dar saúde para a
batalha do dia a dia. Sem ele, nunca
conseguiria para finalizar este
mestrado.*

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial meus pais e irmãos, pelo apoio, incentivo, dedicação e por acreditarem na realização de minhas metas.

Ao meu filho, Felix Pedro Mendoza Flores por ser a luz que ilumina meu caminho e faz-me continuar na frente.

Ao prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida, pela oportunidade de me orientar, paciência, sabedoria, compreensão e compromisso.

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

Aos biólogos, Susana Moreira de Souza pela amizade, e seu trabalho criterioso e competente na realização da imuno-histoquímica e ao Alceu Machado de Souza, pela sua valiosa contribuição na construção e microtomia do *Tissue Microarray*.

Aos meus companheiros de turma: Pedro Delcy Torres Sindeaux Filho e Cassia Rodriguez Roque pelo grande apoio incondicional e amizade durante meu estudo.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da UFC: Valéria Cordeiro de Oliveira e Sebastião da Silva Lima pela contribuição importante para realização de meu trabalho.

*“O único meio de criar homens livres
é educá-los, outro modo ainda não se
inventou, e com certeza nunca se inventará”*

Olavo Bilac

AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSION DE LGR5 E LGR6 EM CÉLULAS-TRONCO NO CÂNCER GÁSTRICO PRIMÁRIO, METÁSTASES LINFONODAIS E MUCOSA GÁSTRICA HISTOLOGICAMENTE NORMAL . ADRIANA ESTELA FLORES VALIENTE. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Patologia. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida.

RESUMO

O câncer gástrico é a quarta neoplasia mais comum em todo o mundo e 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 menor eficácia da terapia é a presença de células tronco cancerosas. Vários marcadores, incluindo LGR5 e LGR6, têm sido relatados como marcadores de células-tronco, normais e cancerosas. LGR5 e LGR6 são proteínas transmembranas, do grupo da proteína G, ricas em resíduos leucina, que participam nas vias de sinalização das células e ativam fatores de transcrição relacionados com a formação de tumores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a imunopressão de LGR5 e LGR6 como possíveis marcadores de células-tronco no câncer gástrico primário, metástases linfonodais e mucosa gástrica histologicamente normal, através das técnicas de microarranjo tissular (*tissue microarray*) e imuno-histoquímica. O estudo, de caráter transversal e observacional realizou-se a partir de oitenta e oito (88) peças de gastrectomias devido a carcinomas gástricos, realizadas no Hospital Universitário Walter Cantídio, que fazem parte dos Arquivos do Serviço de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. As relações entre a expressão diferencial de LGR5 e LGR6 e características clinico-patológicas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Foram considerados positivos (a partir de relatos prévios) casos que apresentaram uma ou mais células com imunomarcção citoplasmática ou membranar. LGR5 mostrou-se, neste estudo, ser um potencial biomarcador, mais característico de células-tronco tumorais e não tumorais, do que LGR6. Ambos são expressos em tecido tumoral e não tumoral, com predomínio em mucosa histologicamente normal, em terço basal da espessura epitelial. LGR5 positivo predominou no histotipo difuso e LGR6 no tipo intestinal de carcinomas gástricos. Nos casos positivos dos dois biomarcadores, células marcadas são pouco frequentes ou raras, no total de células da massa tumoral e da mucosa gástrica normal. LGR6 esteve presente no tumor gástrico primário em número de células muito superior ao encontrado nas respectivas metástases linfonodais, diferença não observada em relação a LGR5. Com exceção da relação de cada biomarcador com um histotipo específico, já citada, não houve relação entre as demais variáveis clinico-patológicas e a expressão de LGR5 e LGR6

Palavras-chave: Câncer gástrico. Células- tronco. LGR5, LGR6.

EVALUATION OF IMMUNO EXPRESSION OF LGR5 AND LGR6 IN THE STEM CELLS IN PRIMARY GASTRIC CANCER, LYMPH NODE METASTASES AND HISTOLOGICALLY NORMAL GASTRIC MUCOSA. ADRIANA ESTELA FLORES VALIENTE. Dissertation of the Postgraduate Program in Pathology (Master of Science).Advisor: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida.

ABSTRACT

Gastric cancer is the fourth most common malignant neoplasm and the second leading cause of cancer mortality worldwide . Despite treatment with surgery and chemotherapy, the overall five-year survival of patients with gastric cancer remains low. A possible explanation for the ineffectiveness of therapy is the presence of cancer stem cells. Several markers, including LGR5 and LGR6, have been reported as markers of normal and cancerous stem cells. LGR5 and LGR6 are transmembrane proteins of the G protein group, rich in leucine residues, that participate in cell signaling pathways and activate transcription factors related to tumor formation. The present work aimed to evaluate the immunoeexpression of LGR5 and LGR6 as specific markers for stem cells in primary gastric cancer, lymph node metastases and histologically normal gastric mucosa through tissue microarray (TMA) and immunohistochemistry techniques. The cross-sectional and observational study was carried out from eighty-eight (88) pieces of gastrectomies due to gastric carcinomas performed at the Walter Cantídio University Hospital, which are part of the Archives of the Service of Pathology and Forensic Medicine of the Federal University of Ceará. The relationships between the differential expression of LGR5 and LGR6 and clinical-pathological characteristics were evaluated by the chi-square test or Fisher's exact test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. All cases that had one or more cells with cytoplasmic or membrane staining were considered positive, based on previous reports. In this study, LGR5 has been shown to be a more potential biomarker than LGR6, more characteristic of tumor and non-tumor stem cells. Both are expressed in tumoral and non-tumoral tissue, with predominance in histologically normal mucosa, in a basal third of epithelial thickness. Positive LGR5 predominated in the diffuse histotype and LGR6 in the intestinal type of gastric carcinomas. In the positive cases of the two biomarkers, marked cells are infrequent or rare, in the total cells of the tumor mass bulk and the normal gastric mucosa. LGR6 was present in the primary gastric tumor in cell numbers far superior to that found in the respective lymph node metastases, a difference not observed in relation to LGR5. Except for the relation of each biomarker with a specific histotype, already mentioned, there was no relation between the other clinical-pathological variables and the expression of LGR5 and LGR6.

Key words: Gastric cancer. Stem cells. LGR5. LGR6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	_ Processo de imuno-histoquímica.....	33
Figura 2	– Controles externos positivos e negativos da reação de LGR5 e LGR6	35
Figura 3	– Imunoexpressão citoplasmática de LGR5 em amostras de tumor primário tipo intestinal e difuso.....	38
Figura 7	– Imunoexpressão de LGR5 em metástase linfonodal de carcinoma tipo intestinal e difuso	39
Figura 8	– Imunoexpressão positiva e negativa de LGR5 em amostra de mucosa gástrica histologicamente normal	41
Figura 9	– Imunomarcção positiva de LGR5 na cripta da mucosa gástrica normal	42
Figura 10	– Imunomarcção citoplasmática de LGR6 no tumor gástrico primário tipo intestinal e difuso	46
Figura 11	– Imunomarcção citoplasmática de LGR6 em metástase linfonodal dos histotipos intestinal e difuso	47
Figura 12	– Imunoexpressão positiva e negativa de LGR6 em amostra de mucosa gástrica histologicamente normal	48
Figura 13	– Imunomarcção positiva de LGR6 nas criptas da mucosa gástrica normal.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Imunoexpressão de LGR5 em tumor primário vs mucosa gástrica normal ..	40
Gráfico 2	– Imunoexpressão de LGR6 no câncer gástrico primário e variáveis clinico patológicas- Histotipos	44
Gráfico 3	– Imunoexpressão de LGR6 no tumor gástrico primário vs mucosa histologicamente normal	48
Gráfico 4	– Expressão positiva por contagem de células para LGR5 em tumor primário vs mucosa gástrica normal	51
Gráfico 5	– Expressão positiva por contagem de células para LGR5 em tumor primário vs metástase linfonodal	51
Gráfico 6	– Expressão positiva por contagem de células para LGR6 em tumor primário vs mucosa gástrica normal	53
Gráfico 7	– Expressão positiva por contagem de células para LGR6 em tumor primário vs metástase linfonodal	53
Gráfico 8	– Expressão positiva por casos para LGR5 vs LGR6 em mucosa gástrica normal	54
Gráfico 9	– Expressão positiva por casos para LGR5 vs LGR6 em tumor primário	55
Gráfico 10	– Expressão positiva por contagem de células para LGR5 vs LGR6 em mucosa gástrica normal	56
Gráfico 11	– Expressão positiva por contagem de células para LGR5 vs LGR6 em tumor primário	56
Gráfico 12	– Expressão positiva por contagem de células para LGR5 vs LGR6 em metástase linfonodal	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Imunoexpressão de LGR5 no tumor primário e variáveis clínico patológicas	36
Tabela 2 – Expressão de LGR5 em mucosa histologicamente normal, tumor primário e metástase linfonodal, em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso	37
Tabela 3 – Distribuição da imunoexpressão de LGR5 em células tumorais, metastáticas e mucosa histologicamente normal por amostras.....	38
Tabela 4 – Imunoexpressão de LGR6 no tumor primário e variáveis clínico patológicas	43
Tabela 5 – Expressão de LGR6 em mucosa histologicamente normal, tumor primário e metástase linfonodal, em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso	44
Tabela 6 – Distribuição da imunoexpressão de LGR6 em células tumorais, metastáticas e mucosa histologicamente normal por amostras.....	45
Tabela 7 – Número de células positivas para LGR5 em tecido normal, tumor primário e metástase linfonodal em pacientes com carcinoma gástrico	50
Tabela 8 – Número de células positivas para LGR6 em tecido normal, tumor primário e metástase linfonodal em pacientes com carcinoma gástrico	52
Tabela 9 – Comparação de imunoexpressão entre LGR5 e LGR6 por casos	54
Tabela 10 – Comparação de imunoexpressão entre LGR5 e LGR6 por contagem de células	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGC	Anticodon (Triada de nucleotídeos complementares-AGC)
APC	Polipose adenomatosa colônica
CG	Câncer gástrico
CTC	Circulating tumor cells
CDH1	Gene que codifica a caderina E
CSC	Cancer stem cells
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
DNA	Acido desoxirribonucleico
EPCAM	Calcium-dependent adherence protein
EGD	Domínio grande N-terminal extracelular
FISH	Hibridação in situ por fluorescência
FOV	Precursor foveolin
GIST	Gastrointestinal stromal tumors
GPCR	Receptores órfãos acoplados a proteína G
HE	Hematoxilina & Eosina
<i>H. Pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HDgc	Câncer gástrico difuso hereditário
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (Receptor 5 acoplado a proteína G rico em repetição de leucina)
LGR6	Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 6 (Receptor 6 acoplado a proteína G rico em repetição de leucina)
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
OMS	Organização Mundial de Saúde
RSPOS	R- espondinas
RT-PCR	Reação de cadeia de polimerase em tempo real
TSG	Genes supressores de tumor
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNM	Estadiamento tumoral: Tumor; linfonodos; metástase
Wnt	Via Wingless.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Câncer gástrico –Epidemiologia	16
1.2	Classificação	16
1.3	Carcinogênese gástrica	17
1.4	Diagnostico, tratamento e prognóstico	19
1.5	Genética do carcinoma gástrico	20
1.6	Células – tronco cancerosas	22
1.6.1	Células – tronco multipotentes no estômago	23
1.7	Marcadores de células-tronco e câncer gástrico	23
1.7.1	LGR5 e LGR6	24
2	PERGUNTA DE PARTIDA	27
3	JUSTIFICATIVA	27
4	OBJETIVOS	28
5	MATERIAL E METODOS	29
5.1	Pacientes e amostras	29
5.2	Classificação histomorfológica	29
5.3	<i>Tissue Microarray</i>	30
5.4	Análise de imunohistoquímica	31
5.5	Avaliação de imunocoloração	33
5.6	Controles	33
5.7	Avaliação individual e entre observadores.....	34
5.8	Análise estatística	34
5.9	Aprovação no comitê de ética e pesquisa em seres humanos.....	34
6	RESULTADOS	35
6.1	Controles	35
6.2	Imunomarcção de LGR5 e variáveis clínico –patológicas	36
6.3	Distribuição da imunexpressão de LGR5 em células tumorais, metastáticas e histologicamente normais por amostras	37
6.4	Imunomarcção de LGR6 e variáveis clínico- patológicas	42

6.5	Distribuição da imunexpressão de LGR6 em células tumorais, metastáticas e histologicamente normais por amostras	45
6.6	Imunexpressão de LGR5 e LGR6 por contagem de células positivas	50
6.7	Comparação da expressão positiva celular entre LGR5 e LGR6	54
7	DISCUSSÃO	58
8	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICE A - NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA LGR5 EM MUCOSA NORMAL	71
	APÊNDICE B - NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA LGR5 EM TUMOR PRIMÁRIO	72
	APÊNDICE C - NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA LGR5 EM METÁSTASE LINFONODAL	73
	APÊNDICE D - NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA LGR6 EM MUCOSA NORMAL	74
	APÊNDICE E - NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA LGR6 EM TUMOR PRIMÁRIO	76
	APÊNDICE F- NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA LGR6 EM METÁSTASE LINFONODAL	78
	ANEXO A – QUADRO GERAL	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Gástrico – Epidemiologia

O câncer gástrico (CG) é a quarta neoplasia mais comum em todo o mundo (DHINGRA *et al*, 2011; GUGGENHEIM, D. E; SHAH, M., 2012), e o segundo câncer em mortalidade global com 1 milhão de pacientes recém-diagnosticados e 600.000 mortes cada ano. Aproximadamente 70% de todos os casos de CG ocorrem no Oriente da Ásia, Europa Central e Oriental, África do Sul, e América Central e do Sul (BU *et al*, 2013).

Os dados mais recentes nas estimativas da OMS (Organização Mundial de Saúde) de incidência de câncer gástrico foram de 951.594 casos, sendo 631.293 em homens e 320.301 em mulheres, e a mortalidade de 723.073, sendo 468.970 homens e 254.103 mulheres (GLOBOCAN 2012). 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. (INCA, 2016).

No Brasil, o número estimado para 2016 foi de aproximadamente 12.920 casos novos de câncer de estômago em homens e 7.600 em mulheres para o 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 e pulmão.

No Ceará, a taxa bruta de incidência, estimada em 2016, foi de 17,45 para 100 mil homens e 10,77 para 100 mil mulheres (INCA, 2016), sendo o segundo mais incidente no sexo masculino, e o quarto no sexo feminino.

1.2 Classificação

São três os tipos histológicos mais comuns de câncer gástrico: Adenocarcinoma, Linfoma e GIST. Aproximadamente 95% dos casos de câncer gástrico são adenocarcinomas. Foram descritos aproximadamente 40 subtipos histológicos em mais de uma dezena de classificações de carcinoma gástrico, inclusive o sistema da OMS (CARNEIRO, 1997).

Segundo a classificação de Lauren, também citada pela OMS (2012), existem dois tipos histológicos principais de adenocarcinoma gástrico, com características clínicas e epidemiológicas distintas: o intestinal (tubular ou células coesas) e o difuso (células não coesas).

O tipo intestinal contém células neoplásicas coesas e forma estruturas tubulares tipo glândulas, 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 como o *Helicobacter pylori*. O tipo difuso apresenta razão de casos entre homens e mulheres próxima a unidade, sendo mais frequente em pessoas abaixo do 50 anos, caracterizado pela infiltração e espessamento da parede do estômago, e é mais prevalente em indivíduos do tipo sanguíneo A, o que indica possível susceptibilidade genética. O tipo intestinal é mais frequente em localização proximal do que distal. O tipo difuso é pouco diferenciado, tem prognóstico ruim, apresenta-se em forma de tumores maiores e não está associado a lesões pré-cancerosas (LAUREN, 1965; CORREA; PLAZUELO, 2012; INCA, 2016).

1.3 Carcinogênese gástrica

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

A carcinogênese gástrica é um processo multifatorial. Estudos para elucidar os processos tumorigênicos subjacentes ao desenvolvimento de CG revelaram um processo sequencial de várias etapas envolvendo tecido gástrico normal, progressão de gastrite crônica, atrofia, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma. Este modelo suporta a possibilidade de uma acumulação gradual de alterações genéticas afetando expressão de moléculas-chave, possivelmente tendo efeitos diretos ou indiretos (vias de sinalização) sobre o crescimento e migração celular (ZHENG *et al* , 2013).

Notavelmente, infecção com a bactéria gram-negativa *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), um agente cancerígeno do tipo I segundo a Classificação da OMS, está fortemente associada com ambos subtipos de CG, principalmente o intestinal. (ZHAO; FENG; ZHOU, 2015). As possíveis explicações para a ligação entre o câncer e inflamação estão a se acumular incluindo mutações genéticas, inibição de apoptose, aumento da proliferação celular e liberação de citocinas pró-inflamatórias, o que cria um microambiente pró-carcinogênico. (ZHAO; FENG; ZHOU, 2015). Entretanto considerando, que somente, uma pequena porção de sujeitos infectados por *H. Pylori* desenvolve cancer gástrico, admite-se que esse processo dependa de

alguns fatores, como a variabilidade da cepa de *H. Pylori* e outros relacionados ao hospedeiro (KIM *et al*, 2012 ; CORREA ; PIAZUELO, 2012).

No carcinoma gástrico de tipo difuso, fatores ambientais ou do estilo de vida dos pacientes (tabagismo, baixo consumo de frutas e vegetais, alta ingestão de sódio) são de maior importância e sobretudo, fatores genéticos, bem determinados, como as mutações de gene da Caderina E, em carcinomas difusos esporádicos e hereditários. (SHYMOYAMA; HIROHASHI, 2008).

A dieta à base de alimentos ricos em nitritos, nitrosaminas, carnes, carnes processadas, alimentos em conserva e defumados, aumento risco de desenvolvimento de câncer gástrico (JAKSZYN ; GONZALES, 2006). A ingestão de carne vermelha em relação a 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, 1989). Agentes nitrosantes também, são produzidos em condições inflamatórias crônicas (BARTSCH; ESPIEGELHALDER, 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).

Apesar do tratamento com cirurgia e quimioterapia, a sobrevida global em cinco anos de pacientes com câncer gástrico permanece em torno de 20 % (CHEN WU, 2013). Pacientes morrem em consequência de metástase ou recorrência, mesmo após rigorosa terapia. Até hoje, os mecanismos de controle da invasão e metástase continuam a ser estudados (YANG *et al*, 2013).

Um crescente corpo de evidências apóia a tese de que tipos de câncer, incluindo o câncer gástrico são doenças conduzidas por um pequeno conjunto de células que se autorenovam e são imortais, denominadas células- tronco cancerosas ou células iniciadoras de câncer, que se distinguem das demais células tumorais. Acredita-se que as CTCs surgem a partir de células-tronco normais ou de células progenitoras que sofreram mutações (LEVI *et al*, 2014).

Uma possível explicação para menor eficácia da terapia é a presença de células-tronco cancerosas (ZHAO; FENG; ZHOU, 2015). 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 (NAGINI, 2012; ZHAO; FENG; ZHOU, 2015).

1.4. Diagnóstico, tratamento e fatores prognósticos.

O prognóstico do câncer gástrico é determinado pelo estágio do tumor no momento do diagnóstico. Contudo que, no tumor restringido à mucosa, a cirurgia determina excelente resultados. No entanto, em muitos países, mesmo em países desenvolvidos, a maioria dos cânceres gástricos são diagnosticados em um estágio avançado, quando as células tumorais já alcançaram a muscular própria ou serosa, limitando a sobrevida (NAGINI, 2012). Nos estágios iniciais da doença os pacientes apresentam sintomas vagos e inespecíficos. A tríade clássica, anemia, perda ponderal, recusa de alimentos principalmente as carnes que só é observada nos estágios mais avançados da doença (NAGINI, 2012).

Apesar dos avanços, o tratamento de câncer gástrico continua a ser um problema de saúde pública global (DURAES *et al*, 2014) já que, nem todos os pacientes são responsivos às terapias direcionadas atualmente disponíveis ou quimioterapia perioperatória, porém, novos alvos de tratamento e biomarcadores preditivos ainda são urgentemente necessários (STEFFEN *et al*, 2012).

A ressecção cirúrgica é o melhor tratamento curativo para os casos de diagnóstico precoce, com sobrevida global em cinco anos variando entre 50% a 70%. Entretanto a maior parte dos casos, é diagnosticada em um estado avançado quando então a sobrevida cai para 4% a 10% (DURAES *et al*, 2014). A dissecação estendida de linfonodos melhora de forma significativa a sobrevida a longo prazo de pacientes com tumores de estágio avançado 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 à 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 *et al*, 2000).

Segue ao diagnóstico a quimioterapia que se tornou padrão perioperatório de cuidados terapêuticos (STEFFEN *et al*, 2012).

A quimioterapia tem sido utilizada no câncer gástrico avançado, com aumento da sobrevida, tendo como referenciais a cisplatina e a fluoropirimidina (GARRIDO *et al*, 2014) O tratamento cirúrgico associado à quimioterapia com S-1 (combinação de tegafur, gimeracil e oteracil) mostrou uma maior taxa de sobrevivência global em um ano do que o tratamento cirúrgico isolado, e a sobrevida em três 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

70.1 %.(SAKURAMOTO *et al*, 2007). Observou-se, também elevação na sobrevivência de pacientes com câncer gástrico metastático HER2 positivo, 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 gástricos, como nos demais tipos de câncer, dependem do estadiamento do tumor, através do sistema TNM (invasão local pelo tumor, *status* linfonodal e sobretudo metástase à distância, por via hematogênica (SOBIN *et al*, 2009; WU *et al*, 1997; WAKAMATSU *et al*, 2011)

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

1.5. Genética do carcinoma gástrico.

Os avanços dos estudos da genômica permitiram uma melhor compreensão de algumas alterações moleculares que ocorrem durante a transformação neoplásica da mucosa gástrica. No Japão, um estudo de ligação entre genes, identificou que o cromossomo 2q33-35 possui um *locus* com susceptibilidade potencial para câncer gástrico proximal (AOKI *et al.*, 2005).

A análise do microarray de dados de 54 pares de câncer gástrico e tecidos adjacentes não cancerosos da mucosa gástricas identificaram expressões gênicas de diferentes estádios de câncer gástrico. SUN, *et al.* analisaram vários padrões de expressão de genes e suas funções exatas na carcinogênese gástrica usando técnica de *tissue microarray* de alto rendimento. Os resultados mostraram que enquanto p53 foi útil para distinguir displasia de baixo grau de displasia de alto grau, a expressão de altos níveis da ciclina E pode ser um indicador de transformação maligna de displasia. Perfis de expressão gênica, reação em cadeia da polimerase quantitativa e FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) em *microarrays* revelaram que as maiorias das alterações relacionadas com o câncer gástrico precoce são encontradas no câncer gástrico avançado, com as alterações de expressão de genes adicionais em anticódon (triade de nucleotídeos complementares AGC) compatíveis com um modelo de progressão da carcinogênese gástrica. A expressão protéica em amostras cirúrgicas de adenocarcinomas gástrico primário e mucosa não tumoral de doentes japoneses por eletroforese em gel, cromatografia líquida de electrospray iônico e espectrometria de massa revelaram aumento de superóxido de manganês e a proteína HMG - 1 cromossômico com diminuições em anidrase carbônica I e II , glutathiona-S-transferase e precursor foveolin

(gastrokine-1) (FOV), uma proteína específica do estômago, 18 kDa, com suposta atividade supressora de tumor. A análise de RT-PCR revelou também a regulação negativa significativa da expressão do RNAm de FOV no tecidos tumorais, destacando o seu potencial como um biomarcador para o diagnóstico molecular e alvo terapêutico (MILNE et al., 2007).

Os carcinomas gástricos esporádicos, que representam a maioria, e os hereditários, que não ultrapassam 8 a 10% (LAVECCHIA et al., 1992) são o resultado de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas (LYNCH et al., 2005). Embora se desconheça a natureza e sequência exata destas alterações, foram identificadas várias anomalias afetando a estrutura e/ou expressão de um número de genes cada vez maior. Vários oncogenes ou genes supressores tumorais, inclusive de “assinatura” metastática têm sido implicados na progressão tumoral gástrica. O distinto padrão de alterações genéticas nos dois principais tipos histológicos de câncer gástrico (intestinal e difuso) apoia a hipótese da existência de duas vias genéticas distintas subjacentes a estes dois histotipos (CARNEIRO, 1997).

Alguns autores apresentaram estimativa de que 1% a 3% do total de câncer gástrico é resultado de uma predisposição de uma síndrome hereditária como Câncer Gástrico Difuso Hereditário (HDgc) (FITZGERALD et al. 2010). A identificação de mutação germinativa inativadora no gene que codifica a caderina-E (CDH1) em uma família da Nova Zelândia foi o ponto de partida para entender HDgc (GUILFORD et al. 1998). Nas famílias HDgc, a transmissão do gene da caderina-E anormal confere uma probabilidade de 80% em desenvolver câncer gástrico, recomendando testes genéticos, rastreamento e até gastrectomia total muitas vezes profilática para portadores dessa anomalia genética (FITZGERALD et al. 2010)(CHUN; FORD *et al*, 2012).

Embora o papel das alterações genéticas em câncer gástrico tenha sido reconhecido, mudanças gerais no perfil epigenético com referência a metilação do DNA, metilação e acetilação das histonas só foram recentemente documentadas. Enquanto hipometilação leva à ativação de oncogenes e a instabilidade genômica, promotores de hipermetilação estão associados com o silenciamento transcricional de genes supressores de tumor (TSGs) e genes de reparação do DNA (KANWAL et al., 2012). Diversos fenótipos de ilha CpG (região promotora de genes) metiladas foram identificadas no câncer gástrico, que servem como um bom indicador de prognóstico (PARK et al., 2010). Estudo feito através de meta-análise observou que a metilação aberrante de 77 genes no câncer gástrico, sugere um valor clínico potencial de metilação do DNA como marcador de predisposição de risco e prognóstico (SAPARI *et al.*, 2012). A hipermetilação dos promotores de genes envolvidos no controle do ciclo celular, no metabolismo dos nutrientes essenciais, e na produção de mediadores

inflamatórios, tem sido descrita na infecção por *H. pylori*, bem como no câncer gástrico (ZABALETA, 2012).

1.6. Células-tronco cancerosas

A hipótese da origem de carcinomas a partir de células tronco ganhou destaque na literatura sobre pesquisa na última década. Células-tronco cancerosas, que expressam um perfil distinto de marcadores de superfície celular, têm sido detectadas numa vasta gama de amostras clínicas de câncer, incluindo neoplasias hematológicas e tumores sólidos de mama, pulmão, ovário, fígado, próstata, pâncreas, pele, cérebro e cólon. No entanto, poucos estudos até esta data têm investigado a presença destas células no câncer gástrico, e seu papel na tumorigênese gástrica permanece desconhecido (WANG *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2013).

Tumores primários humanos muitas vezes apresentam heterogeneidade e há duas hipóteses para sua explicação: o modelo de evolução clonal probabilístico a partir de qualquer célula, e a hipótese de formação do tumor a partir de células-tronco (modelo hierárquico). Ambas propostas tentam explicar a heterogeneidade celular observada na iniciação, progressão e metástase dos tumores. Na hipótese celular clonal, a heterogeneidade é gerada pela instabilidade genética, tal como, mudanças no número de cromosomas ou mutações no genoma da célula tumoral. As células com composições genéticas que conferem as vantagens de crescimento, são clonadas expandidamente. Em contraste, a hipótese de CSC propõe que apenas uma pequena fração de células cancerosas, nomeadamente CSC reside no topo da hierarquia celular e governa a heterogeneidade do tumor; estas células se dividem e geram CSC idênticas (auto-renovação) e diferenciação fenotípica heterogênea, mas tipicamente menos células tumorais proliferativas (ZHAO, FENG, ZHOU 2015).

A presença de CSC foi demonstrada pela primeira vez em Leucemia mieloide aguda humana, como uma população CD34 e CD38 positiva. Curiosamente, células-tronco hematopoéticas normais também expressam idênticos marcadores de superfície celular, o que levou à hipótese de que CSC são células-tronco normais de tecidos específicos que são transformadas ou células progenitoras de amplificação desdiferenciadas. Experimentalmente, CSC são caracterizadas pela sua capacidade para a propagação de tumores, sendo responsáveis pela produção de cópias fenotípicas dos tumores primários, através de transplantes em série em ratos imunocomprometidos. A capacidade de propagação do tumor também podem ser avaliada por ensaios *in vitro* com células clonogênicas, tais como o

esferoide formadoras de colônias ou ensaios de cultura (ZHAO, FENG, ZHOU 2015). Células-tronco cancerosas são uma subpopulação de células tumorais que apresentam características de células-tronco normais (LEE *et al.*, 2012). Há relato 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).

As células-tronco cancerosas estão relacionadas à manutenção do crescimento tumoral, como parte integrante de seu desenvolvimento e perpetuação. São associadas não só com a iniciação e o desenvolvimento do tumor, mas desempenham um papel crucial nas metástases à distância (ISHIGAMI *et al.*, 2010). São mais resistentes à quimioterapia, liderando a recorrência do tumor, sua progressão e finalmente a morte do paciente (SIMON *et al.*, 2013).

1.6.1 Células-tronco multipotentes no estômago.

Os marcadores moleculares que definem células-tronco multipotentes só foram descobertos muito recentemente. O primeiro biomarcador é Vilina, uma molécula epitelial-específica, proteína regulada pelo cálcio que se liga à actina e que modula a reorganização dos filamentos de actina. QIAO *et al* descobriram que ratos transgênicos que expressam Vilina, apresentam uma população rara de células no antro gástrico que tem longa vida e são capazes de reposição de múltiplas linhagens (ZHAO; FENG;ZHOU; 2015).

Recentemente, CLEVERS e colaboradores identificaram uma outra população de GSCs que expressa um receptor de proteína G rico em resíduos leucina (também conhecido como GPR49) . O LGR5 é encontrado na base do corpo e glândulas no antro do estômago neonatal, mas torna-se restrito às glândulas anrais em adultos (ZHAO; FENG; ZHOU; 2015)

1.7. 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). Alguns estudos evidenciaram superexpressão destes marcadores em células-tronco cancerosas (XI *et al*, 2014).

Biomarcadores de células-tronco, tais como CD44, CD166 e LGR5, têm sido descritos como marcadores específicos de malignidade gastrintestinal. No entanto, a maioria dos estudos têm-se centrado sobre a relação destes biomarcadores com prognóstico do câncer.

Importante, estudos para avaliar a utilidade destes marcadores em lesões pré-cancerosas, particularmente no estômago, são ainda limitados (YANG, *et al.* 2013).

Novos marcadores de prognóstico no câncer e preditivos de invasão e metástase, são necessários para melhorar as terapias contra o câncer gástrico (XI *et al.*, 2014). Para este efeito GPCRs são candidatos promissores, eles representam o maior grupo de receptores da superfície celular e cerca de 40% de todas as drogas atualmente utilizadas em medicina como alvo. Também, estão envolvidos em uma ampla variedade de processos fisiológicos e sistemas de transdução de sinal, incluindo resposta imune, hormônio, liberação de enzimas, ou regulação da pressão arterial (STEFFEN *et al.*; 2012).

1.7.1 LGR5 e LGR6

Receptor 5 ou 6 acoplado a proteína G Rica em Leucina (LGR5 e LGR6 respectivamente) são membros de receptores órfãos acoplados à proteína G (GPCR), subfamília da classe A rodopsina – ligante, com domínio transmembranar de sete receptores (7TM). LGR5, LGR6 e LGR4 são homólogos, com 50% de identidade entre si na extremidade aminoácido. O trio de receptores (LGR4-6) é o único a ter um domínio grande N-terminal extracelular (ECD), contendo 17 repetições ricas em leucina, com sequências ricas em cisteína, tanto no N- e C- terminais. Outra característica comum dos três receptores é a sua expressão em diferentes tipos de células tronco adultas. (GONG *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013).

LGR5 assim como LGR6 são receptores, entre centenas de membros da família rodopsina, expressos especificamente em células-tronco adultas sendo essencial para sua sobrevivência (GONG *et al.*, 2012). A expressão de LGR5 foi predominantemente restrita à cripta de glândulas pilóricas contribuindo para a auto-renovação epitelial, e poderia servir como um marcador único de células-tronco no estômago (XI, HONG-QING *et al.* 2014).

LGR6 foi mostrado para marcar um grupo de células-tronco que podem dar origem a todas as linhagens de células da pele, incluindo aqueles do folículo piloso, glândulas sebáceas, e derme interfoliculares (GONG *et al.*, 2012). Ainda não foram feitos estudos da expressão de LGR6 em tecido gástrico, mas recentemente estudo demonstrou que LGR6 como co- receptor de Wnt-Respondina pode estimular a proliferação de células-tronco da cripta do epitélio intestinal tanto *in vivo* como *in vitro* (CARMON, *et al.*, 2011).

LGR6 foi encontrada como um dos novos genes mutados no câncer de cólon através de seqüenciamento total de éxon e sua região promotora é hipermetilada em 20-50% dos casos de câncer de cólon (GONG *et al*, 2012).

O sistema de sinalização de Wnt- β catenina desempenha um papel essencial no desenvolvimento embrionário e na auto-renovação e manutenção de células-tronco adulto.

R espondinas (RSPOs) são um grupo de proteínas segregadas que estimulam a via de sinalização Wnt- β catenina e têm funções pleiotrópicas em desenvolvimento e crescimento de células-tronco em muitos órgãos, incluindo tecidos do trato gastrointestinal (CARMON, *et al*, 2011).

Estudos anteriores indicaram que LGR5, uma parte do complexo de sinalização Wnt ao nível de membrana, pode aumentar a sinalização de Wnt- β catenina através dos seguintes mecanismos: LGR5 pode recrutar especificamente do receptor do complexo PRL – Frizzled e, eventualmente interferir com a degradação do molécula de sinalização fundamental β -catenina. Então, mais acumulada no citoplasma, a β catenina pode translocar para o núcleo e agir como fator de transcrição para expressão de uma vasta gama de genes ligados à proliferação celular e outras características de células cancerosas (XI *et al*.2014).

LGR5 junto com LGR4 ligados a R espondinas com alta afinidade potencializam a sinalização Wnt- β catenina e reforçando a via Wnt, induz à fosforilação de LRP6.

Embora tenha sido postulado que R-espondinas se ligam e ativam o co-receptor Wnt-LRP6, têm havido relatos contraditórios sobre a interação direta entre RSPOs e LRP6. (CARMON, *et al*, 2011). Em outro estudo foi descoberto que LGR6 também se liga e responde ao R- espondinas 1-3 com uma afinidade elevada o que estimula a sinalização Wnt- β catenina através do aumento da fosforilação de LRP6. No entanto, a afinidade de ligação e da resposta funcional de LGR6 às R-espondinas, e a atividade de mutantes de LGR6 no câncer do cólon não foram determinados. (GONG, KENDRA; CARMON, 2012)

LGR5 é superexpresso no carcinoma hepatocelular, câncer coloretal, câncer de ovário, carcinoma basocelular e adenocarcinoma esofágico (XI *e et*, 2014). Também constatou-se que a transformação de células tronco adultas LGR5 positivas pudesse conduzir à formação de tumores no estômago *in vivo*. No entanto, a expressão e a função de LGR5 no câncer gástrico ainda estão pouco investigadas. (XI, HONG-QING *et al*, 2014).

A expressão de LGR5 foi significativamente maior nos cânceres gástrico, como um marcador de células-tronco do câncer do que em nos tecidos normais adjacentes e mais frequentemente em pacientes com tumores do tipo intestinal (ZHENG *et al*, 2013; BU *et al*, 2013).

A expressão de LGR5 em tecidos relacionados com o CG durante a tumorigenese foi progredindo de epitélio não neoplásico para câncer gástrico e, finalmente, para a metástase, com uma tendência crescente para maior número e intensidade de células LGR5 positivo, o que sugere potencial para esta proteína servir como um biomarcador importante para a detecção precoce de pacientes com maior risco de tumorigênese gástrica e também como marcador de progressão tumoral (ZHENG, 2013).

LGR5 positiva foi correlacionada com invasão, metástases linfonodais e metástases distantes e com maior expressão de MMP2 (XI, HONG-QING *et al*, 2014). A expressão positiva foi também associada significativamente com a idade, a diferenciação do tumor (Lauren) e estágio (TNM) (ZHENG, 2013). Por outro lado, expressão negativa de LGR5 foi significativamente relacionado à sobrevida global favorável nos estágios I e II de pacientes com câncer gástrico (BU *et al*, 2014).

Em estudo experimental, observou-se que a superexpressão da LGR6 em Células HeLa pode aumentar a migração celular quando co-estimulada pela Wnt e RSPO1 (GONG, KENDRA; CARMON, 2012).

2 PERGUNTA DE PARTIDA

A imunoeexpressão de marcadores de células-tronco, LGR5 e LGR6, está aumentada em amostras de câncer gástrico em relação à amostras de mucosa gástrica normal?

3 JUSTIFICATIVA

A alta incidência e mortalidade de câncer gástrico mundial, em nosso país e no Ceará, a importância de células tronco na carcinogênese e progressão tumoral, e a pouca especificidade de marcadores de células tronco descritos até o momento, nos estimularam a pesquisar a expressão de duas proteínas membranares recentemente descritas, LGR5 e LGR6, promissores biomarcadores de células tronco, no câncer gástrico e mucosa gástrica histologicamente normal, o que poderá contribuir no futuro para melhor avaliação prognóstica e de resposta terapêutica em pacientes com câncer de estômago.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a imunexpressão de LGR5 e LGR6 como marcadores característicos de células-tronco, no câncer gástrico, metástases linfonodais e mucosa gástrica histologicamente normal das margens cirúrgicas, através de imunohistoquímica.

4.2 Objetivos específicos

- Comparar a imunexpressão de LGR5 e LGR6 no câncer gástrico e na mucosa gástrica normal;
- Avaliar a possível associação da imunexpressão de LGR5 e LGR6 com tipos histológicos no carcinoma gástrico primário (intestinal e difuso);
- Investigar a expressão destes marcadores entre os tumores primários e nas metástases linfonodais;
- Averiguar possível associação entre a expressão de células LGR5 e LGR6 positivas e variáveis clínico-patológicas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Pacientes e amostras

Este estudo observacional de corte transversal se desenvolveu a partir de blocos de parafinas provenientes de 88 peças de gastrectomia dos Arquivos do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará (DPML/UFC) no período de 2011-2015.

Foram incluídas amostras dos tumores primários coletados durante o ato cirúrgico, fixadas em formalina a 10%, processadas automaticamente e incluídas em parafina. A seleção de mucosa gástrica normal distante do tumor (margem cirúrgica) e linfonodos com metástase foram feitas a partir dos arquivos do mesmo serviço de patologia. Foram excluídos todos os casos com material insuficiente, peças mal fixadas ou inadequadas (apresentaram autólise) casos de pacientes que foram submetidos a quimioterapia e também os que mostraram extensas áreas hemorrágicas, de necrose tumoral ou muco. Além disso os casos que correspondiam histologicamente a carcinoma misto e outros tipos de câncer gástrico (por exemplo, linfoma) foram também excluídos .

5.2 Classificação histomorfológica

Os casos foram reclassificados nos dois principais tipos histológicos de carcinoma gástrico, intestinal e difuso segundo Lauren. Estes compreendem cerca dos 90 % de sua casuística, e tem sido utilizada preferencialmente, de forma universal, por sua abordagem clínica, epidemiológica e histológica, além de sua grande simplicidade e reprodutibilidade, tendo sido por isso utilizada neste trabalho.

O tipo intestinal apresenta lesão macroscopicamente bem delimitada, em geral localizada na incisura angular e à microscopia, tem aspecto moderadamente 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 e as células neoplásicas encontram-se dispersas ou formando pequenos cachos, os chamados “*clusters*” (LAUREN, 1965).

A mucosa histologicamente normal foi assim caracterizada pela ausência de lesões neoplásicas, metaplásicas, ou de qualquer outra natureza obtidas das margens cirúrgicas livres de neoplasia (margem de segurança proximal de cinco a seis centímetros nos casos de neoplasia avançada e de dois nos de neoplasia precoce). Os implantes metastáticos nos

linfonodos foram caracterizados também a partir da hematoxilina-eosina, pela presença de células neoplásicas isoladas ou agrupadas distorcendo a arquitetura linfonodal.

Foi utilizada a técnica de *Tissue microarray* (TMA) para estudo dos casos. Durante a análise das lâminas foram excluídos os casos que apresentavam menos de 100 células tumorais, casos autolisados e com material insuficiente. Houve também perda de alguns cilindros e conseqüentemente de casos durante o corte de TMA e sua fixação na lâmina. Ademais, em alguns casos de carcinoma difuso as margens cirúrgicas estavam comprometidas. Por tudo isso a casuística para mucosa histologicamente normal e metástase linfonodal foi menor.

5.3 *Tissue microarray*

Foi realizada a análise do material a ser estudado (mucosa histologicamente normal, tecido tumoral, e linfonodos com metástase) através das lâminas coradas pelo método de 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 do bloco de *tissue microarray* seguiu a técnica modificada de Kononen e colaboradores (1998), utilizando uma base fixa a partir de um dispositivo comercial (Arraymold®). Foram confeccionados blocos com 18 amostras duplas de cada caso, com um total de 36 cilindros no bloco receptor, com espaçamentos de 2,2 mm de distância entre os centros dos cilindros.

Em seguida, foi selecionada e delimitada nas lâminas, com tinta permanente, a área representativa de cada caso para posterior marcação dos “blocos doadores”. As amostras tissulares parafinadas do “bloco doador” foram retiradas com o auxílio de um *punch* de biópsia de 2mm de diâmetro (*BiopsyPunch - Miltex®*), inserido numa área previamente selecionada do bloco. Essas amostras foram retiradas da agulha e inseridas no “bloco receptor” com auxílio de uma pinça. Após a colocação dos cilindros, o “bloco receptor” é coberto com parafina quente (62°C), a fim de fixar melhor os cilindros ao bloco. Em cada vértice dos *arrays* foi colocada secção histológica distinta das estudadas, como referencial (direcionamento) para a leitura dos casos. Para controle externo foram utilizadas amostras de tecido intestinal normal para LGR5 e tecido normal de rim para LGR6, de acordo com estudos prévios (KAZUHIRO; MARIKO, 2013; SIMON *et al*, 2013). Portanto cada *array* contém 36 cilindros, sendo 16 do material objeto da pesquisa (cada amostra dupla de mucosa histologicamene normal , tecido tumoral e linfonodos com metástase foi ordenada) e quatro

amostras de tecidos diferentes como controles positivos para os anticorpos a serem testados, sendo um deste como marcador do início de leitura da lâmina.

5.4 Análise imuno-histoquímica

Os doze blocos de *tissue microarray* parafinados contendo tecido tumoral de carcinoma gástrico, linfonodos com metástase e mucosa gástrica histologicamente normal, foram submetidos à microtomia, realizando-se secções com 4 µm de espessura. Realizou-se a aposição dos cortes histológicos em lâminas silanizadas, para um total de 26 lâminas que correspondem, 12 para LGR5 e 12 para LGR6, além de duas lâminas para controles negativos.

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

Ao mesmo tempo, iniciou-se a preparação do tampão de recuperação antigênica, utilizando-se o tampão *Envision Flex Target Retrieval Solution*, pH=6 (pH baixo, *Dako*®) que será conservado na 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*®.

Logo as lâminas foram colocadas em *PT Link*®, sistema que se encontra à temperatura ambiente (25°C) e mais tarde aquecido até 65°C. Após retiradas da estufa, as lâminas foram colocadas em prateleiras, as quais foram posicionadas no tanque do *Dako*® *PT Link*, a temperatura de 97°C, permanecendo nessa temperatura por 20 minutos, para recuperação antigênica. A seguir, o sistema foi novamente resfriado até 65°C, com o tempo total do processo de aproximadamente uma hora.

O material então foi retirado dos tanques, imediatamente colocadas em um borrel contendo tampão de lavagem para que não ressequem os cortes do tecido. Para a lavagem das lâminas foi utilizado o *Wash Buffer Envision Flex*, pH=7,6, *Dako*®, durante três minutos, duas lavagens.

Após três minutos, as lâminas foram retiradas do tampão de lavagem e submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena (reagente, *Dako Envision*®) com peróxido de hidrogênio a 5% durante 10 minutos.

Posteriormente, foi efetuada nova lavagem das lâminas com tampão de lavagem por três minutos duas vezes, e então as lâminas foram colocadas nas câmaras de incubação classificadas em linhas delimitadas para LGR5 e LGR6, para evitar reações cruzadas e

também marcadas com uma caneta especial hidrofóbica (*Dako*[®] *Pen* – referência S2002) para delimitar as áreas do tecido e evitar que reagente e anticorpo se espalhem pela lâmina, evitando que o tecido resseque e também reações cruzadas durante a incubação do anticorpo, com resultados falsos positivos. Em seguida foi realizada a incubação com o anticorpo primário.

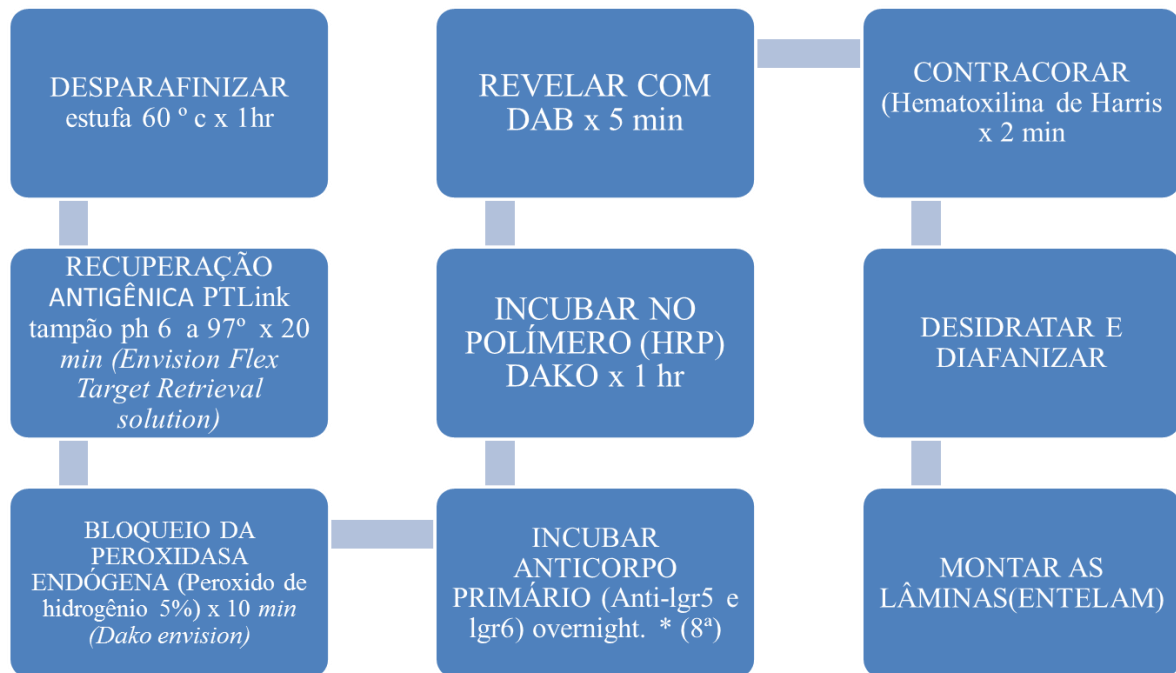
Foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-LGR5 (Anti-GPCR GPR49 antibody ab137484- Abcam[®]) e anti-LGR6 (Anti-GPCR LGR6 antibody [EPR6874] ab126747- Abcam[®]), de acordo com protocolos dos fabricantes, foram padronizadas as diluições dos anticorpos: 1/ 100 para LGR5 e 1/400 para LGR6. Foi realizada a aplicação do anticorpo primário, lâmina por lâmina, e o conjunto permaneceu em incubação *overnight*, por aproximadamente vinte e duas horas na geladeira, à temperatura de 8°C. No dia seguinte, as lâminas foram retiradas da geladeira, sendo realizadas duas lavagens seguidas com o *Wash Buffer Envision Flex* *Dako*[®].

As lâminas então foram colocadas na prateleira, e etapa seguinte se deu através da incubação com o polímero *Dako*[®] *Envision+ Dual Link System* – HRP durante 60 minutos. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com o tampão, durante três minutos em cada lavagem, e, logo após, foi feita a coloração com a incubação do cromógeno *Dako*[®] DAB (para revelar) durante cinco minutos e posterior lavagem das lâminas em água corrente.

A seguir, foi feita a contra coloração com hematoxilina de Harris por dois minutos, após prévia lavagem com água destilada duas vezes, se avaliou a contra coloração com controle negativo e se retirou o excesso de corante com duas lavagens em água destilada deixando-se em seguida em água destilada durante 3 minutos para azulecer a hematoxilina.

Foram realizadas duas passagens durante um minuto, das lâminas em álcool absoluto, para desidratação e duas passagens em xilol durante um minuto, para diafanização. Por último, foram realizadas as montagens das lâminas utilizando meio de montagem ENTELAM[®] para logo se fazer a leitura das lâminas ao microscópio. A figura 1 apresenta processo de imuno-histoquímica resumido.

Figura 1: Processo de imuno-histoquímica.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.5 Avaliação de imunocoloração

Considerou-se amostra positiva, aquela que apresenta ao menos uma célula com marcação membranar ou citoplasmática, baseado em estudos prévios (GHAFFARZADEHGAN *et al*, 2008; CHOI *et al*, 2009; ISHIGAMI *et al*, 2010). Foi realizada a contagem de células coradas (contagem visual direta por grupos de 5 em 5 células) a partir de 100 até 1000 células/caso, em sistema óptico apropriado (CarlZeiss®). Os campos foram contados em sequência, a partir de um ponto aleatório (HASHIMOTO *et al.*, 2013), em aumento de 400X, até atingir-se o número de células no último campo microscópico avaliado.

5.6 Controles

Os controles positivos externos para LGR5 foram obtidos a partir de secções de tecido normal do intestino (KAZUHIRO; MARIKO, 2013; YANG *et al*, 2013), e para LGR6 foram obtidos a partir de tecido normal do rim (SIMON, 2012) Os controles negativos foram obtidos a partir da supressão (retirada) do anticorpo primário durante a realização da imuno-histoquímica.

5.7 Avaliação individual e entre observadores

Os preparados histológicos para LRG5 e LRG6 foram estudados detalhadamente pelo autor deste trabalho e por um patologista experiente. Os casos que apresentaram resultados em discordância foram revistos em conjunto em microscópio para múltiplos observadores, da marca e modelo citados, e resolvidos por consenso.

5.8 Análise estatística

As relações entre a expressão diferencial de LGR5 e LGR6 e características clínico patológicas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O aplicativo GraphPad Prism 6® foi utilizado para os testes estatísticos e na elaboração dos gráficos.

5.9 Aprovação no Comitê de Ética

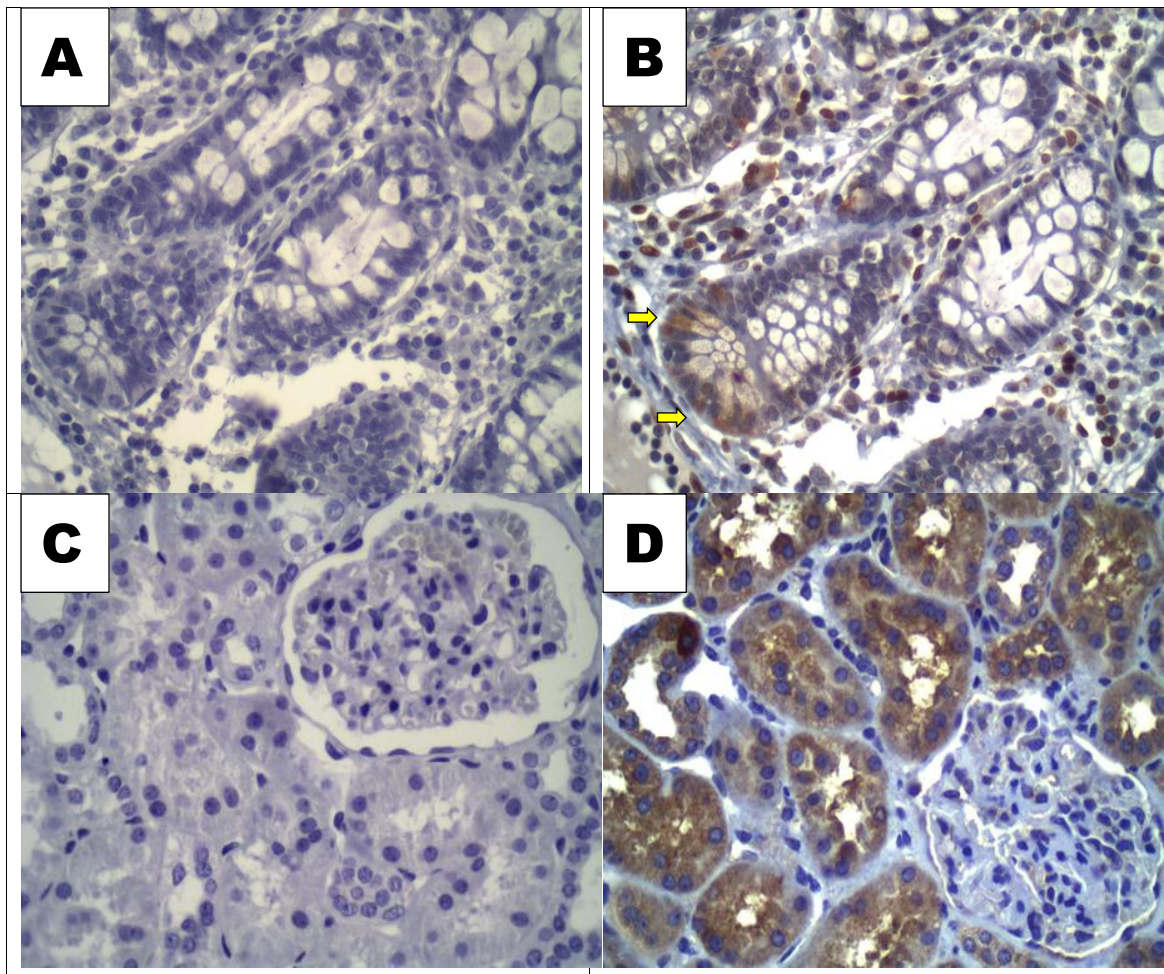
Este projeto foi submetido à Plataforma Brasil – UFC/PROPESQ sob o número do parecer 1.409.343, tendo obtido aprovação por Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, em 31/12/2015 com número CAAE: 52579015.8.0000.5054.

6 RESULTADOS

6.1 Controles

Foram utilizados o tecido intestinal normal como controle para LGR5, e o tecido renal normal para LGR6. A figura 2 representa os controles externos positivos e negativos da reação de LGR5 e LGR6.

Figura 2: A- LGR5 Controle negativo, ausência de marcação em tecido intestinal normal; B- LGR5 Controle positivo, imunomarcação citoplasmática em tecido intestinal normal, em células profundas das criptas (setas); C- LGR6 Controle negativo, ausência de marcação em células tubulares renais; D- LGR6 Controle positivo, imunomarcação citoplasmática em células tubulares renais. Ausência de marcação nos glomérulos (controle interno negativo) (A, B, C, D : 400x)



Fonte: Elaborado pelo autor

6.2 Imunomarcção de LGR5 e variáveis clínico-patológicas.

A tabela 1 mostra a imunopressão em células neoplásicas no tumor primário, em relação as variáveis clínico-patológicas citadas. Observa-se predomínio do tipo histológico difuso (50%), de pacientes do sexo masculino (38%) com idade superior ou igual a 50 anos (37%), tumor localizado principalmente em corpo e antro gástrico (98%) e dimensão maior ou igual a 5 cm (48%), com ausência de invasão angiolinfática (44%) e perineural (40%).

Tabela 1- Imunopressão de LGR5 no tumor primário e variáveis clínico-patológicas

Variáveis clínico-patológicas	Imunopressão de LGR5-Tumor primário				
	n	POSITIVA	NEGATIVA	#	P
Tipo histológico (Lauren)					
Intestinal	45	14 (31%)	31 (69%)	5	0,1105
Difuso	36	18 (50%)	18 (50%)	2	
Sexo					
Masculino	50	19 (38%)	31 (62%)	4	0,8164
Feminino	31	13 (42 %)	18 (58%)	3	
Idade					
< 50 anos	11	6 (55%)	5 (45%)	1	0,3285
≥ 50 anos	70	26 (37%)	44(63%)	6	
Localização anatômica					
Cárdia	0	0	0	0	1,0000
Fundo	0	0	0	0	
Corpo	48	19 (40%)	29 (60%)	4	
Antro	20	7 (35%)	13 (65%)	3	
Corpo e antro	11	5 (45%)	6 (55%)	0	
Todo	2	1 (50%)	1 (50%)	0	
Dimensão do tumor					
< 5 cm	19	7 (37%)	12 (63%)	3	1,0000
≥ 5 cm	62	25 (40%)	37 (60%)	4	
Invasão angiolinfática					
Ausente	39	17 (44%)	22 (56%)	4	0,5026
Presente	42	15 (36%)	27 (64%)	3	
Invasão perineural					
Ausente	60	24 (40 %)	36 (60%)	4	1,0000
Presente	21	8 (38 %)	13 (62%)	3	
Grau de invasão					
T1	11	4 (36%)	7 (64%)	1	1,0000
T2-T4	70	28 (40%)	42 (60%)	6	
Metástases linfonodais					
N0	24	12 (50%)	12 (50%)	1	0,2248
N1-N3	57	20 (35%)	37(65%)	6	
Total	81	32 (40%)	49 (60%)	7	

Não avaliáveis

Fonte: Elaborado pelo autor

A maioria dos tumores estava em estágio mais avançado T2-T4 (40%) e com presença de metástase linfonodais (35%). Com relação a estas variáveis, não se encontrou nenhuma associação estatisticamente significativa com imunomarcção para LGR5 (tabela 1).

A tabela 2 a seguir apresenta de forma sucinta a imunomarcção de LGR5 nos três tipos de tecidos e locais estudados: mucosa histologicamente normal, tumor primário e metástases linfonodais.

Observa-se uma casuística final de 67 amostras para mucosa histologicamente normal, 81 amostras para tumor primário e 36 amostras para metástases linfonodais avaliados com LGR5.

Tabela 2- Expressão de LGR5 em mucosa histologicamente normal, tumor primário e metástase linfonodal, em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso.

Lauren	Mucosa histologicamente normal		Tumor primário		Metástase linfonodal	
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Intestinal	27 (69)	12 (31)	14 (31)	31 (69)	8 (38)	13(62)
Difuso	13 (46)	15 (54)	18 (50)	18 (50)	8 (53))	7 (47)
Total	40 (60)	27 (40)	32 (40)	49 (60)	16(44)	20(56)

Fonte: Elaborado pelo autor

6.3. Distribuição da imunoexpressão de LGR5 em células tumorais, metastáticas e mucosa histologicamente normal por amostras.

A comparação da expressão de LGR5 nas células tumorais, considerando o tipo histológico, demonstrou que o tipo difuso apresenta mais amostras positivas (18/36 = 50%) do que o tipo intestinal (14/45 = 31%). Contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa (P = 0,1105) Tabela 3 e figura 3 A e B.

Das 36 amostras de linfonodos analisados, 16 (44%) foram positivas, e 20 (56%) foram negativas. Não houve predominância significativa de positividade no adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (8/21 = 38%), em relação ao difuso (8/15 = 53%). Observa-se, que a expressão de LGR5 foi frequente nas metástases linfonodais (16/36 = 44%) do que no tumor primário (32/81 = 40%), mas também sem significância estatística (P = 0,6855) Tabela 3 e figura 4 (A e B).

A expressão de LGR5 no tecido normal, sem considerar o tipo histológico, foi mais frequente do que no tumor primário, com significância estatística (40/67 = 60% vs (32/81 = 40%, p = 0,0205). Observa-se que em tecido normal na margem de casos do tipo intestinal ocorre maior expressão de positividade (27/39 = 69%) do que na margem normal do tipo difuso (13/28 = 46%), mas sem diferença estatística significativa (p = 0,0792) Tabela 3, gráfico 1 e figura 5 (A e B).

Tabela 3- Distribuição da imunoposição de LGR5 em células tumorais, metastáticas e mucosa histologicamente normal por amostras.

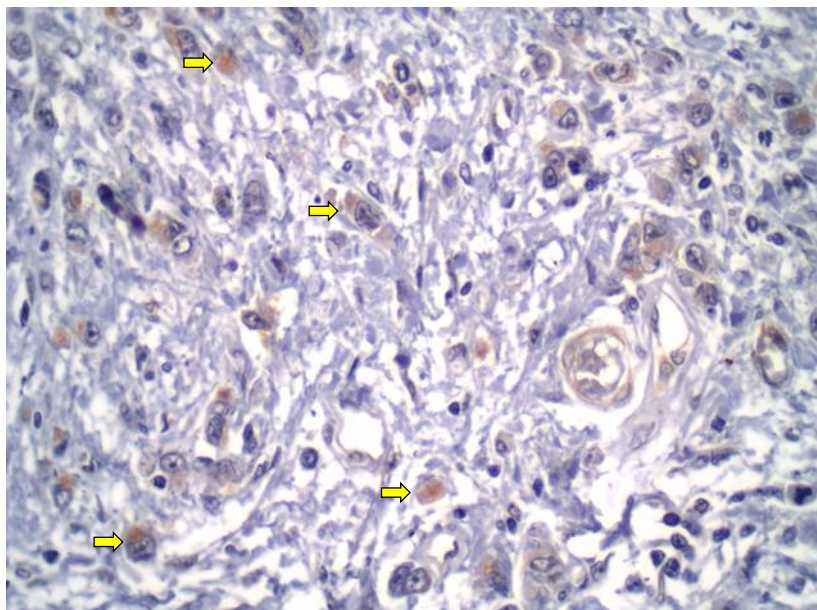
Carcinomas gástricos (Células neoplásicas)	n	Imunoposição de LGR5		
		POSITIVA	NEGATIVA	P
Tumor primário				
Intestinal	45	14 (31%)	31 (69%)	0,1105
Difuso	36	18 (50%)	18 (50%)	
Total	81	32 (40%)	49 (60%)	
Metástase linfonodal				
Intestinal	21	8 (38%)	13 (62%)	0,4996
Difuso	15	8 (53%)	7 (47%)	
Total	36	16 (44%)	20 (56%)	
Mucosa histologicamente normal na margem cirúrgica de:				
Tumor tipo intestinal	39	27 (69%)	12 (31%)	0,0792
Tumor tipo difuso	28	13 (46%)	15 (54%)	
Total	67	40 (60%)	27 (40%)	*0,0205

*Positividade total em células da mucosa histologicamente normal, comparada com a positividade total em células tumorais.

Fonte: Elaborado pelo autor

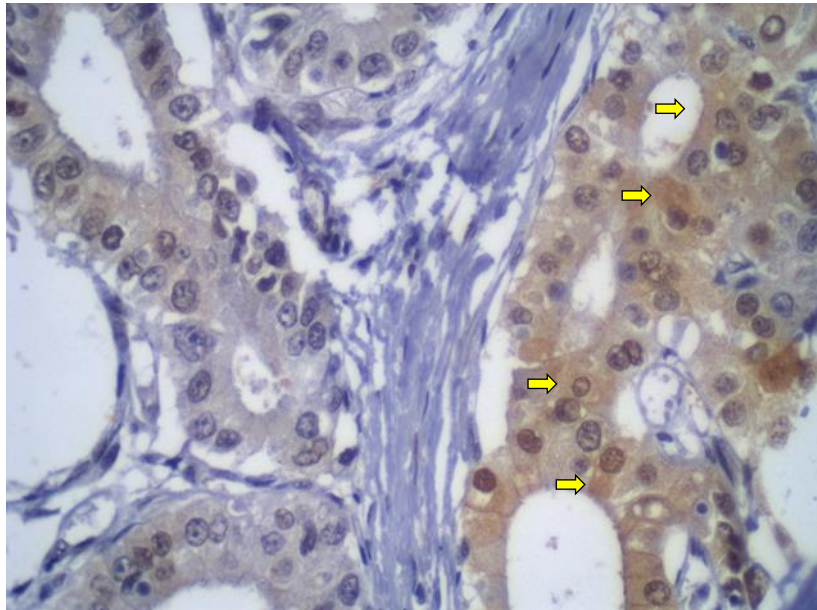
A figura 3 apresenta imunoposição citoplasmática de LGR5 em amostras de tumor primário difuso e intestinal.

Figura 3 - A: LGR5-Tumor primário difuso positivo citoplasmático moderado(→)400x



Fonte: Elaborado pelo autor

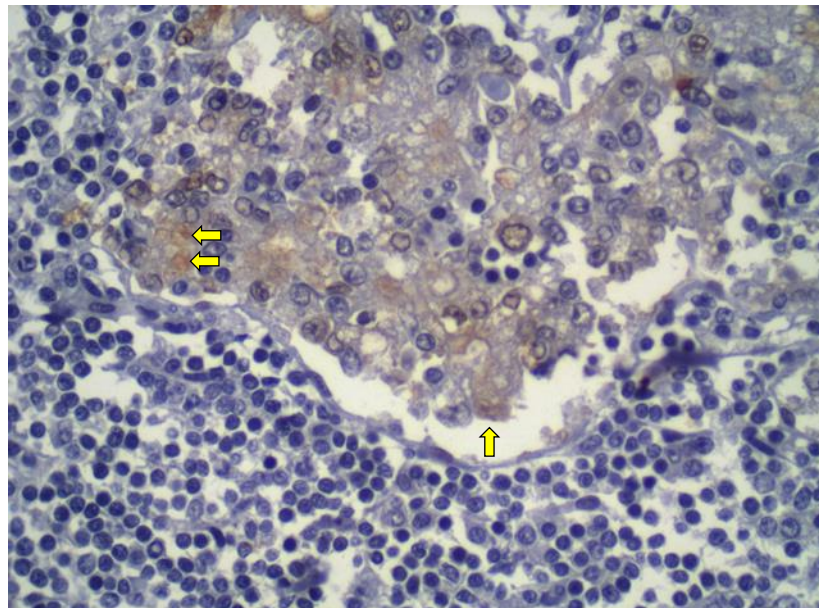
Figura 3 - B: LGR5-Tumor primário intestinal positivo citoplasmático moderado(→)-
400x



Fonte: Elaborado pelo autor

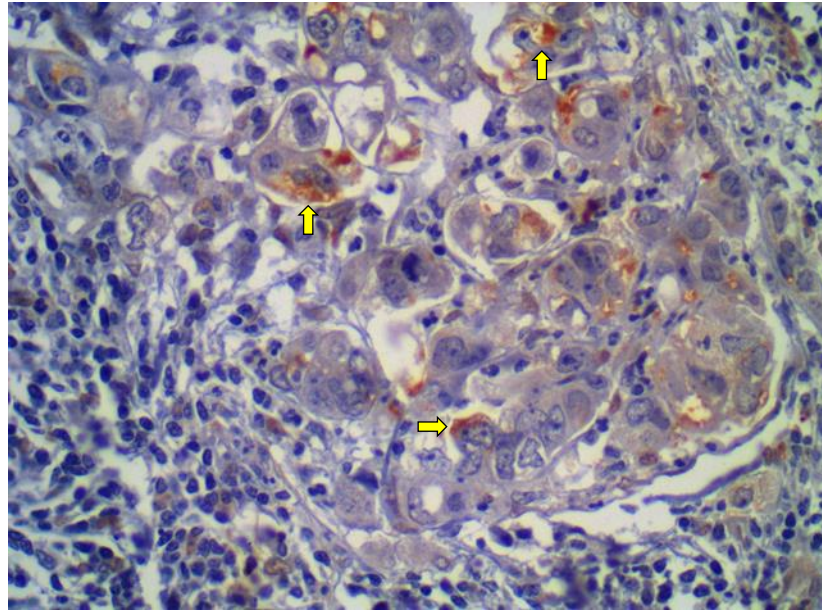
A figura 4 amostra expressão de LGR5 em metástase linfonodal de adenocarcinoma gástrico intestinal e difuso

Figura 4 A: LGR5- Metástase linfonodal tipo difuso positivo citoplasmático moderado (→) 400x



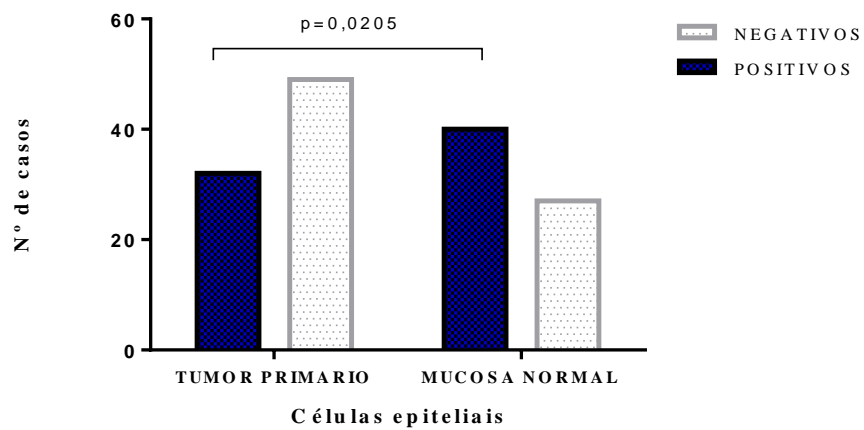
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4 B: LGR5- Metastase linfonodal tipo intestinal positivo citoplasmático intenso (→) 400x



Fonte: Elaborado pelo autor

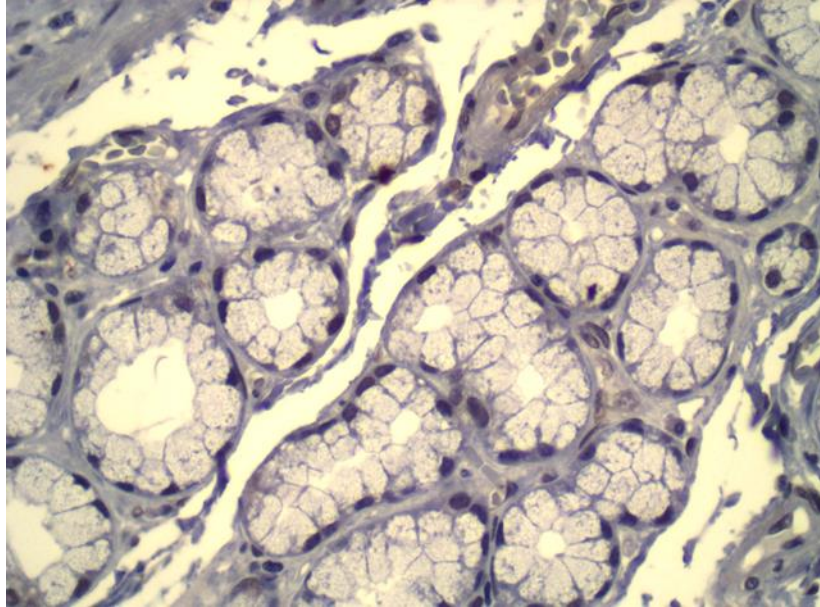
Gráfico 1-Imunoexpressão de LGR5 em tumor primário vs mucosa gástrica normal P= 0,0205



Fonte: Elaborado pelo autor

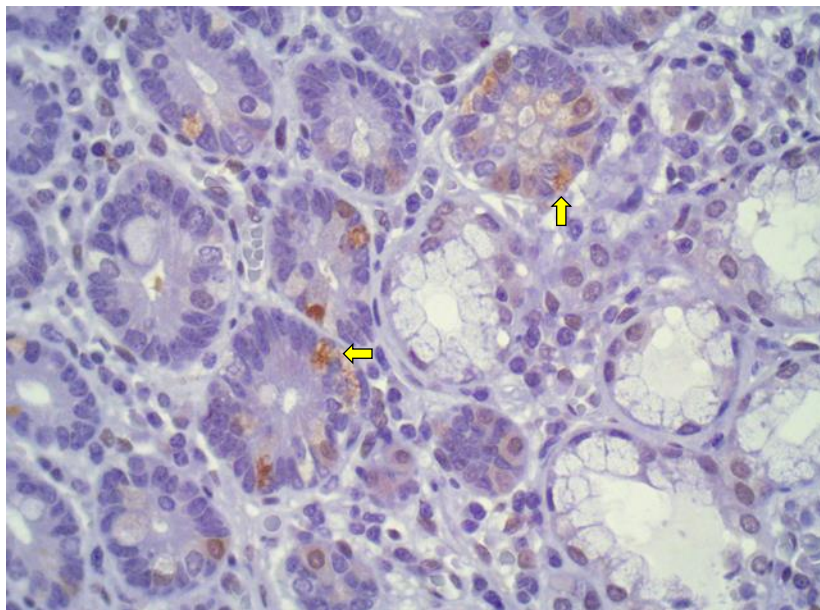
Na figura 5 (A e B) pode-se observar expressão positiva e negativa de LGR5 em amostra de mucosa gástrica histologicamente normal.

Figura 5 - A: LGR5-Mucosa normal negativa- 400x



Fonte: Elaborado pelo autor

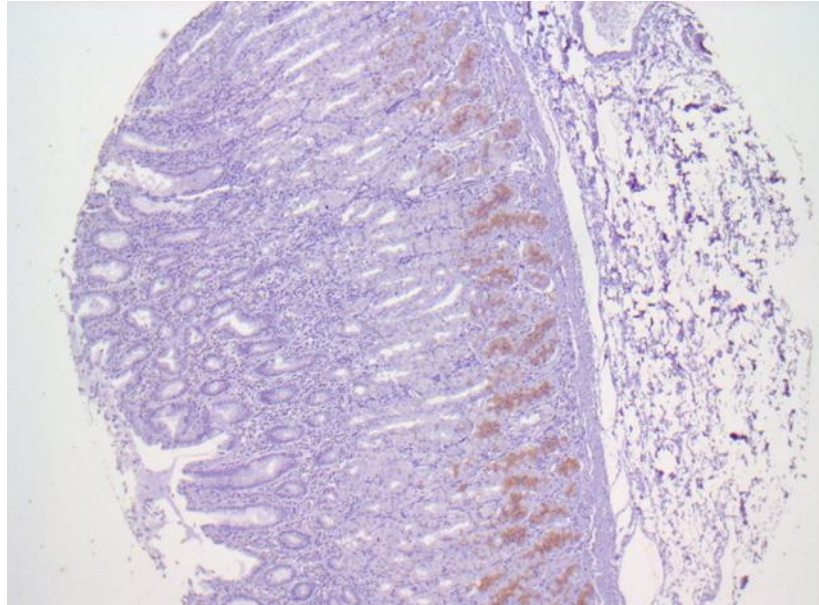
Figura 5 - B: LGR5- Mucosa normal positiva citoplasmática intensa(→)- 400x



Fonte: Elaborado pelo autor

A figura 6 representa a imunoposição de LGR5 restrita ao terço profundo da mucosa gástrica histologicamente normal, enquanto o terço médio e superficial é negativo.

Figura 6: Imunomarcção positiva de LGR5 na mucosa gástrica normal. 100x



Fonte: Elaborado pelo autor

6.4 Imunomarcção de LGR6 e variáveis clínico-patológicas

A tabela 4 mostra a expressão de LGR6 em células neoplásicas no tumor primário e as variáveis clínico-patológicas citadas.

Observa-se predomínio do tipo histológico intestinal (57%) no total de amostras (37/47 = 79%) em relação ao tipo difuso (18/35 = 52%) com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0167$), gráfico 2. Pacientes do sexo masculino (62%) com idade superior ou igual a 50 anos (88%), tumor localizado principalmente em corpo e antro gástrico (98%) e dimensão maior ou igual a 5cm (68%), também predominaram mas sem diferença significativa. Observa-se maior expressão positiva das amostras quando não havia invasão angiolinfática (77% vs 58%) e na ausência de invasão perineural (70% vs 59%), a maioria do tumores estavam em estágio mais avançado T2-T4 (87%) e com presença de metástase linfonodais (71%). Com exceção do tipo histológico, não houve diferença estatisticamente significante das demais variáveis através da imunomarcção para LGR6.

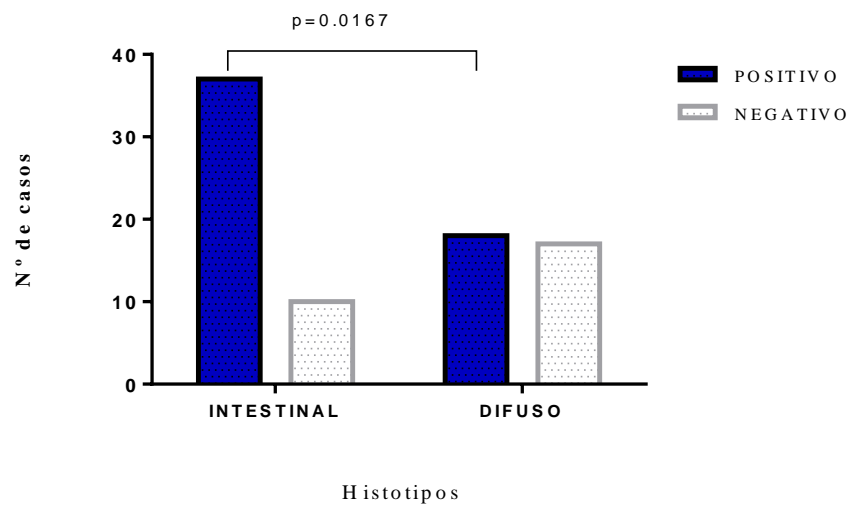
Tabela 4- Imunoexpressão de LGR6 no tumor primário e variáveis clínico-patológicas

Variáveis clínico-patológicas	Imunoexpressão de LGR6-Tumor primário				
	n	POSITIVA	NEGATIVA	#	P
Tipo histológico (Lauren)					
Intestinal	47	37 (79%)	10 (21%)	3	0,0167
Difuso	35	18 (52%)	17 (48%)	3	
Sexo					
Masculino	51	33 (65%)	18 (35%)	3	0,6328
Feminino	31	22 (71%)	9 (29%)	3	
Idade					
< 50 anos	10	6 (60%)	4 (40%)	2	0,7181
≥ 50 anos	72	50 (70%)	22 (30%)	4	
Localização anatômica					
Cárdia	0	0	0	0	1,0000
Fundo	0	0	0	0	
Corpo	48	30 (63%)	18 (37%)	3	
Antro	20	16(80%)	4 (20%)	3	
Corpo e antro	12	7 (58%)	5 (42%)	0	
Todo	2	2 (100%)	0 (0%)	0	
Dimensão do tumor					
< 5 cm	19	12 (63%)	7 (37%)	2	0,7821
≥ 5 cm	63	43 (68%)	20 (32%)	4	
Invasão angiolinfática					
Ausente	39	30 (77%)	9 (23%)	3	0,0997
Presente	43	25 (58%)	18 (42%)	3	
Invasão perineural					
Ausente	60	42 (70%)	18 (30%)	4	0,4287
Presente	22	13 (59%)	9 (41%)	2	
Grau de invasão					
T1	11	8 (73%)	3 (27%)	2	1,0000
T2-T4	71	47 (66%)	24 (34%)	4	
Metástase linfonodal					
N0	24	19 (79%)	5 (21%)	1	0,1968
N1-N3	58	36 (62%)	22 (38%)	5	
Total	82	55 (67%)	27 (33%)	6	

Não avaliáveis

Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico 2 – Imunoexpressão de LGR6 no câncer gástrico primário e variáveis clínico-patológicas- histotipos. P = 0,0167.



Fonte: Elaborado pelo autor

A tabela 5 apresenta de forma sucinta a imunomarcção de LGR6 nos três tipos de tecidos e locais estudados: mucosa histologicamente normal, tumor primário e metástase linfonodal.

Observa-se uma casuística final de 65 amostras para mucosa histologicamente normal, 82 amostras para tumor primário e 35 amostras para metástases linfonodais avaliados com LGR6.

Tabela 5- Expressão de LGR6 em mucosa histologicamente normal, tumor primário e metástase linfonodal, em pacientes com carcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso.

Lauren	Mucosa histologicamente normal		Tumor primário		Metástase linfonodal	
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Intestinal	35 (88)	5 (12)	37 (79)	10 (21)	13 (62)	8 (38)
Difuso	22 (88)	3 (12)	18 (52)	17 (49)	7 (50)	7 (50)
Total	57 (88)	8 (12)	55 (67)	27 (33)	20 (57)	15 (43)

Fonte: Elaborado pelo autor

6.5 Distribuição da imunexpressão de LGR6 em células do tumor primário, metastáticas e mucosa histologicamente normal por amostras.

A comparação da expressão de LGR6 nas células tumorais, considerando o tipo histológico, demonstrou que o tipo intestinal apresenta um maior número de amostras positivas ($37/47 = 79\%$) do que o tipo difuso ($18/35 = 52\%$), diferença estatisticamente significativa ($P = 0.0167$). Comparando a marcação de positividade sem considerar subtipo histológico, tumor primário teve maior expressão ($55/82 = 67\%$) em relação às metástases linfonodais ($20/35 = 57\%$) contudo, sem significância estatística ($P = 0.4001$). Tabela 6, gráfico 3 e figura 7 (A e B).

Das 35 amostras de linfonodos analisados, 20 (57%) foram positivos, e 15 (43%) foram negativos. Houve predominância de positividade entre adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal ($13/21 = 62\%$) em relação ao tipo difuso ($7/14 = 50\%$), sem diferença estatística significativa ($P = 0,5108$). Tabela 6. As figuras 8 (A e B) mostram a imunexpressão de LGR6 em metástase linfonodais, de carcinomas gástricos do tipo intestinal e difuso, respectivamente.

A expressão de LGR6 no tecido normal, sem considerar o tipo histológico, foi mais frequente do que no tumor primário, com significância estatística ($57/65 = 88\%$ vs $55/82 = 67\%$; $p = 0,0036$; tabela 6 e figura 9 A e B).

Tabela 6- Distribuição da imunexpressão de LGR6 em células tumorais, metastáticas e mucosa histologicamente normal por amostras.

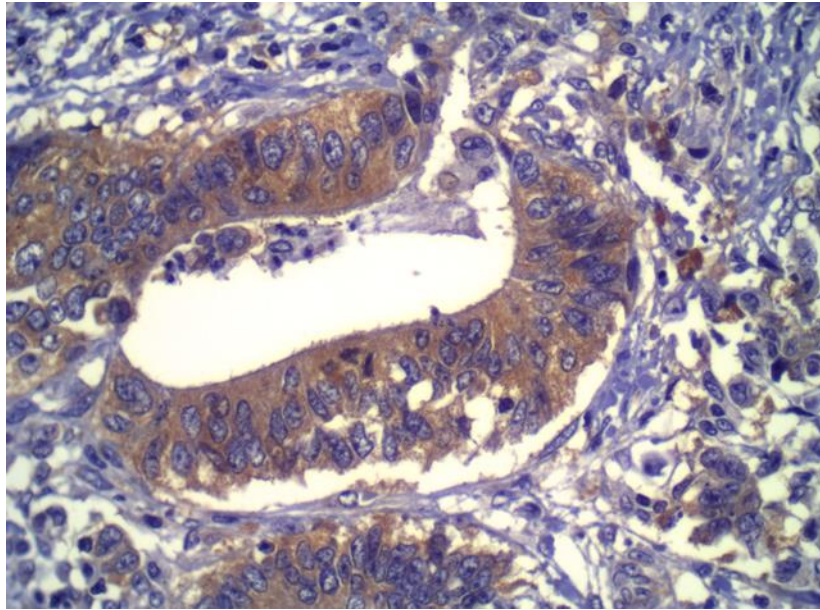
Carcinomas gástricos (Células neoplásicas)	n	Imunexpressão de LGR6		
		POSITIVA	NEGATIVA	P
Tumor primário				
Intestinal	47	37 (79%)	10 (21%)	0,0167
Difuso	35	18 (52%)	17 (49%)	
Total	82	55 (67%)	27 (33%)	
Metástase linfonodal				
Intestinal	21	13 (62%)	8 (38%)	0,5108
Difuso	14	7 (50%)	7 (50%)	
Total	35	20 (57%)	15 (43%)	
Mucosa histologicamente normal				
Tumor tipo intestinal	40	35 (88%)	5 (12%)	1,0000
Tumor tipo difuso	25	22 (88%)	3 (12%)	
Total	65	57 (88%)	8 (12%)	*0,0036

*Positividade total em células da mucosa histologicamente normal, comparada com a positividade total em células tumorais.

Fonte:Elaborado pelo autor

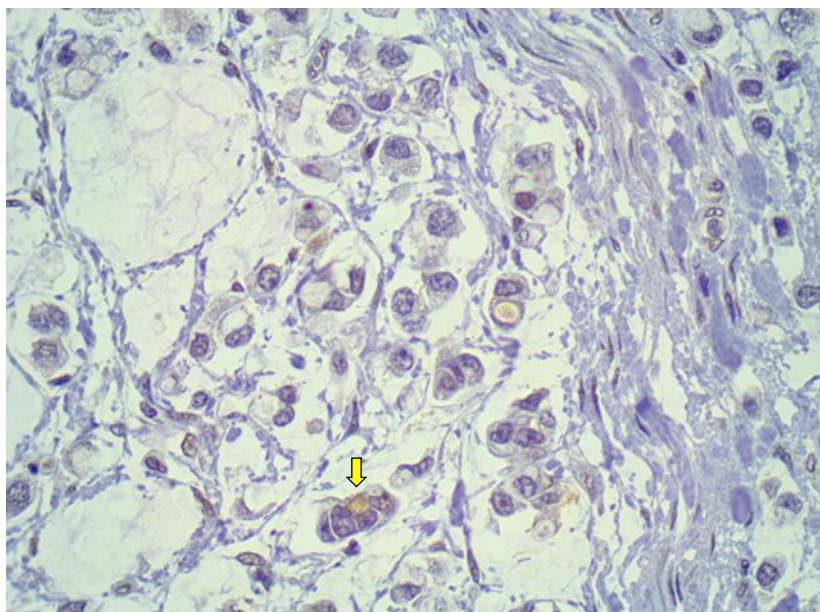
A figura 7 (A e B) mostra a imunomarcação citoplasmática de LGR6 no tumor gástrico primário intestinal e difuso.

Figura 7 - A: LGR6- Tumor primário intestinal positivo citoplasmático intenso- 400x



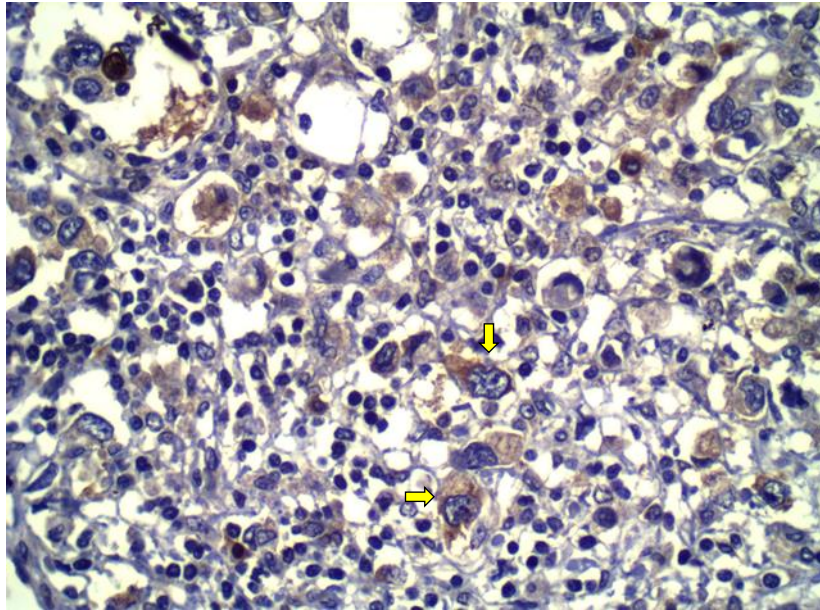
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 7 - B: LGR6- Tumor primário difuso positivo citoplasmático moderado- 400x



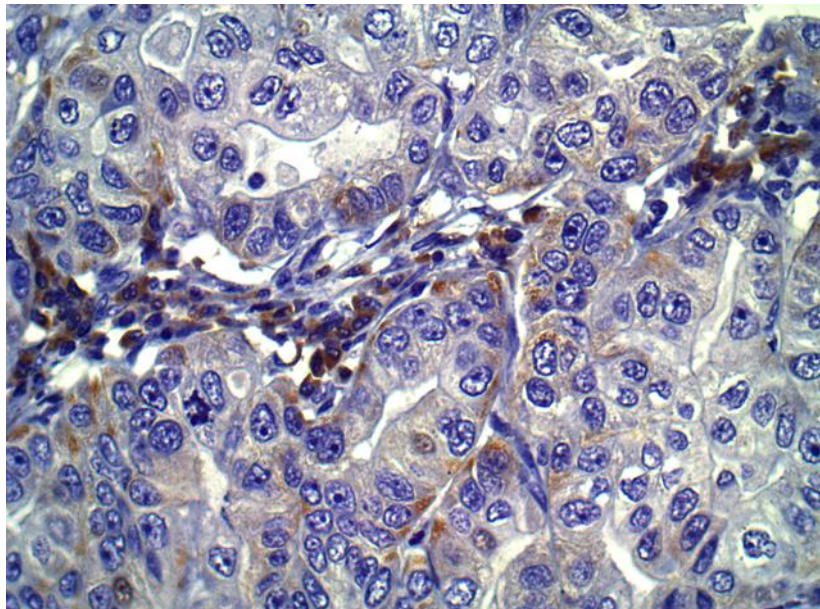
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 8 - A: LGR6- Metástase linfonodal tipo difuso positivo citoplasmático moderado (→) 400x



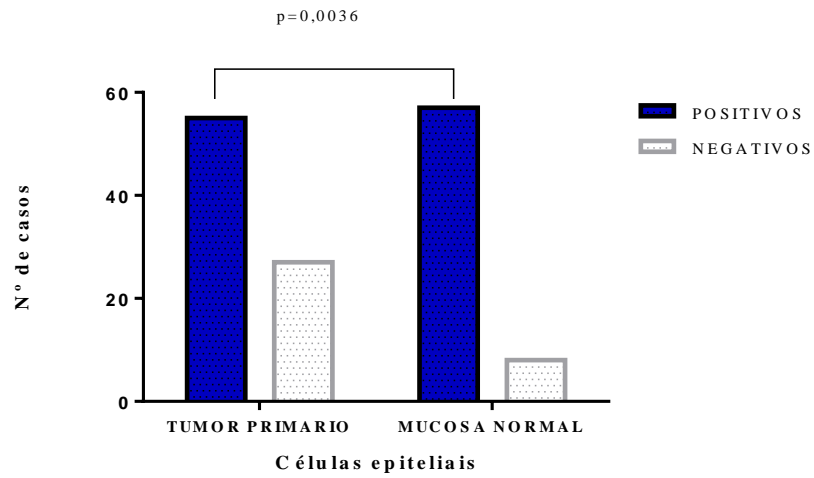
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 8 - B: LGR6- Metástase linfonodal tipo intestinal positivo citoplasmático moderado- 400x



Fonte: Elaborado pelo autor

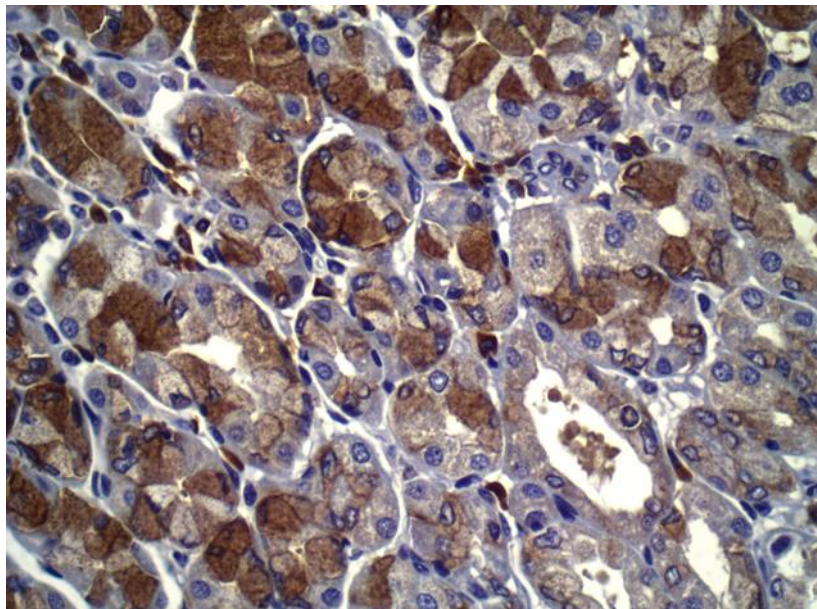
Gráfico 3 –Imunoexpressão de LGR6 no tumor gástrico primário vs mucosa histologicamente normal. P = 0,0036.



Fonte: Elaborado pelo autor

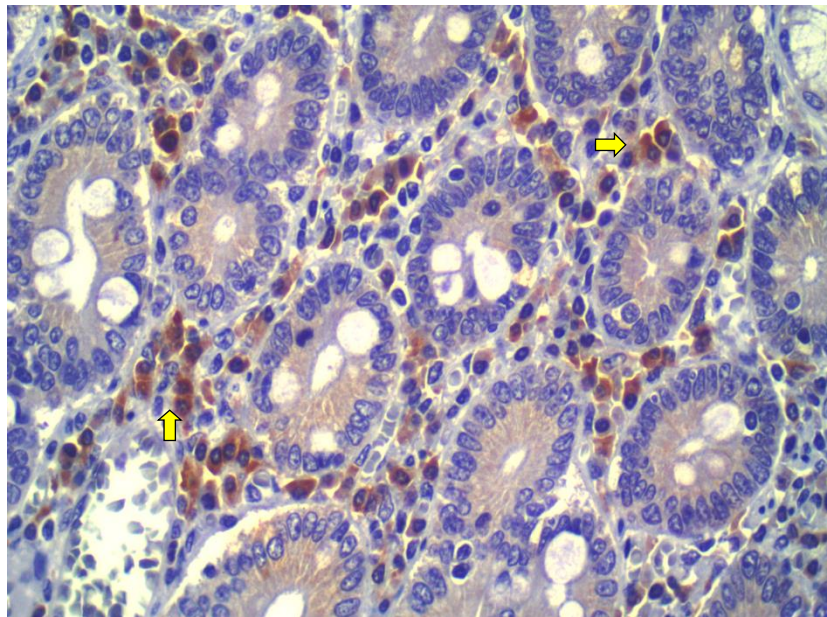
Na figura 9 (A e B) pode-se observar expressão positiva e negativa de LGR6 em amostra de mucosa gástrica histologicamente normal.

Figura 9 - A: LGR6- Mucosa normal positiva citoplasmática intensa- 400x



Fonte: Elaborado pelo autor

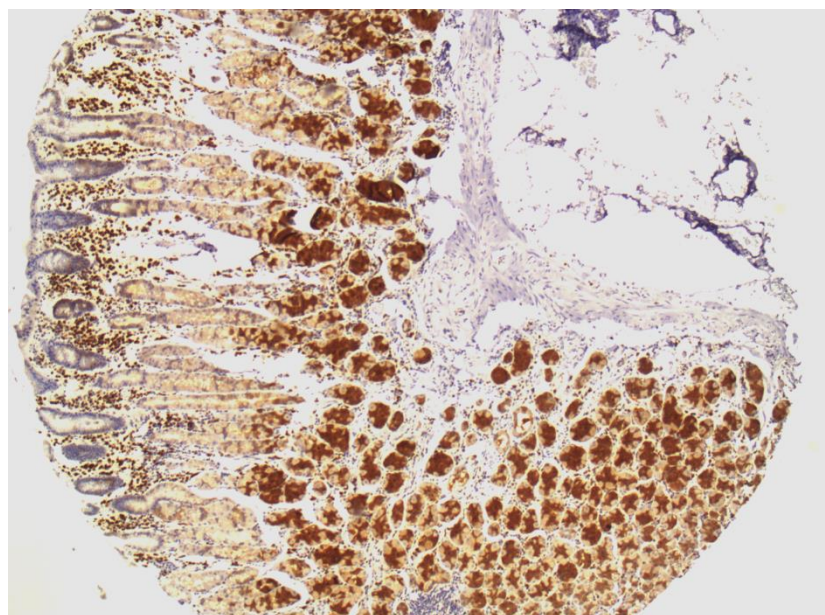
Figura 9 - B: LGR6- Mucosa normal negativa (epitélio glandular). Observar a positividade moderada a acentuada em células do estroma-(➡) 400x



Fonte: Elaborado pelo autor

A figura 10 representa a imunoexpressão positiva de LGR6 nas criptas da mucosa gástrica histologicamente normal, restrita ao terço profundo, enquanto o terço médio e superficial é negativo.

Figura 10: Imunomarcção citoplasmática de LGR6 na mucosa gástrica normal. 100 X



Fonte: Elaborado pelo autor

6.6. Imunoexpressão de LGR5 e LGR6 por contagem de células positivas.

A imunoexpressão para LGR5 no tumor primário, considerando histotipos, foi maior no difuso (454/31558 = 1.4%) do que no intestinal (324/44049 = 0.7%) com significância estatística ($p < 0,0001$). Na mucosa histologicamente normal, nas margens do subtipo intestinal ocorre menor expressão positiva (2194/38501 = 5.6%) em relação ao subtipo difuso (1703/27263 = 6.2%), estatisticamente significativo ($p = 0,0036$). Comparando-se a expressão positiva total na mucosa normal foi maior (3897/65764 = 6%) do que no tumor primário (778/75594 = 1%), com valor de $P < 0,0001$ (tabela 7 e gráfico 4).

Na tabela 7, observa-se imunoexpressão positiva maior no tipo difuso do tumor primário (454/31558 = 1.4%) e histotipo difuso da metástase linfonodal (134/12056 = 1%) em relação ao tipo intestinal, respectivamente nos dois sítios, com significância estatística ($p < 0.0001$) em ambas localizações. Comparou-se positividade total em células de tumor primário e metástase linfonodal e a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$; tabela 7, gráfico 5).

Tabela 7- Imunoexpressão de LGR5 em tumor primário, tecido histologicamente normal nas margens cirúrgicas e metástase linfonodal dos casos de carcinomas gástricos dos tipos intestinal e difuso por contagens de células.

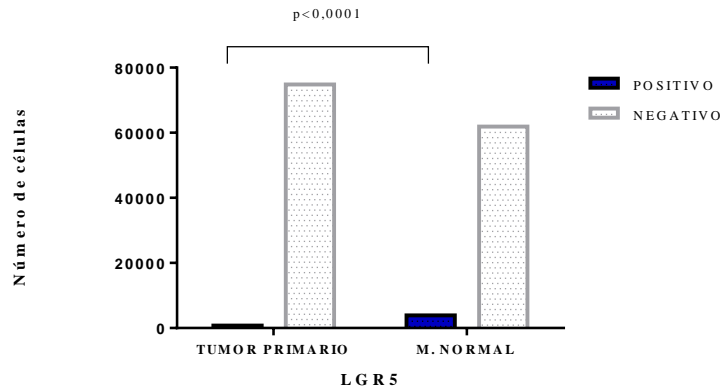
Células epiteliais	Imunoexpressão de LGR5			P
	n	POSITIVA	NEGATIVA	
Tumor primário				
Intestinal	44049	324 (0,7%)	43725 (99,3%)	< 0,0001
Difuso	31558	454 (1,4%)	31091 (98,6%)	
Total	75594	778 (1%)	74816 (99%)	
Mucosa histologicamente normal				
Tumor tipo intestinal	38501	2194 (5,6%)	36307 (94,4%)	0,0036
Tumor tipo difuso	27263	1703 (6,2%)	25560 (94,8%)	
Total	65764	3897 (6%)	61867(94%)	*p<0,0001
Metastase linfonodal				
Tumor tipo intestinal	18013	73 (0,4%)	18004 (99,6%)	<0,0001
Tumor tipo difuso	12056	134 (1%)	11922 (99%)	
Total	30069	207 (0,6%)	29862 (99,4%)	**p<0,0001

*Positividade total de células da mucosa histologicamente normal, comparada com a positividade total em células tumorais.

**Positividade total de células do tumor primário, comparada com a positividade total em células das metástases linfonodais.

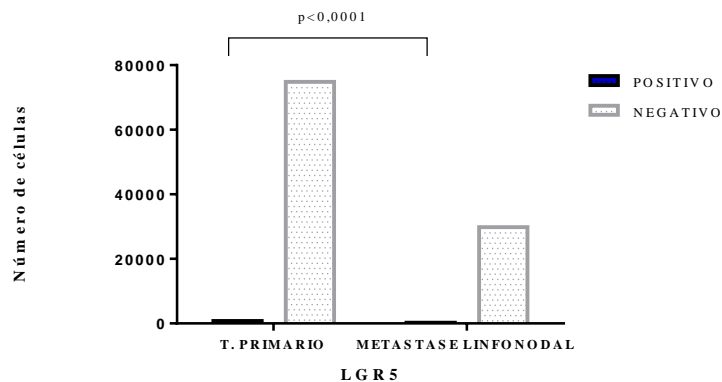
Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico 4 - Expressão positiva por contagem de células para LGR5 em tumor primário vs mucosa gástrica normal. $P < 0,0001$



Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico 5- Expressão positiva por contagem de células para LGR5 em tumor primário vs metástase linfonodal $P < 0,0001$



Fonte: Elaborado pelo autor

A imunoexpressão para LGR6 no tumor primário, considerando histotipos, foi maior no intestinal ($16887/44654 = 38\%$) do que no difuso ($2062/29836 = 7\%$) com significância estatística ($P < 0,0001$). De forma igual, na mucosa histologicamente normal das margens do subtipo intestinal tem maior expressão positiva ($14768/37140 = 40\%$) em relação ao subtipo difuso ($8366/23803 = 35\%$), estatisticamente significativo ($P = 0,0001$). Comparando-se, a expressão positiva na mucosa normal foi maior do que no tumor primário ($23134/60943 = 38\%$ vs $18949/73490 = 25\%$), com valor de $P < 0,0001$ (tabela 8, gráfico 6).

Na tabela 8 e gráfico 7, observa-se imunoposição positiva maior no tipo intestinal da metástase linfonodal (3985/17432 = 23%) em relação com histotipo difuso (2128/10458 = 20%), com significância estatística na diferença (P = 0,0001). Comparando-se, a expressão positiva no tumor primário foi mais frequente (18949/73490 = 26%) do que metástases linfonodais (6113/27890 = 22%), com diferença estatística significativa (P < 0,0001).

Tabela 8- Imunoposição de LGR6 em tumor primário, tecido histologicamente normal nas margens cirúrgicas e metástase linfonodal dos casos de carcinomas gástricos dos tipos intestinal e difuso por contagens de células.

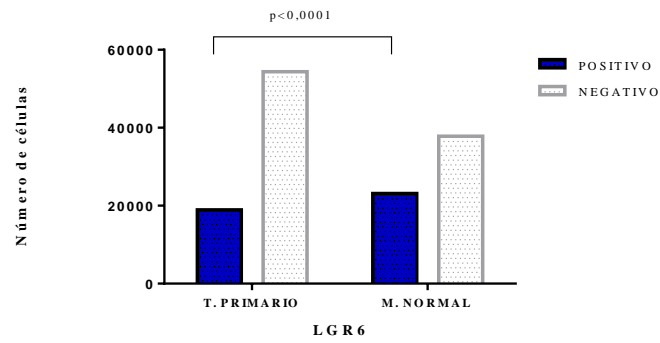
Células epiteliais	Imunoposição de LGR6			
	n	Nº de células positivas		P
POSITIVA		NEGATIVA		
Tumor primário				
Intestinal	44654	16887 (38%)	27772 (62%)	< 0,0001
Difuso	28836	2062 (7%)	26614 (93%)	
Total	73490	18949 (26%)	54386 (74%)	
Mucosa histologicamente normal				
Tumor tipo intestinal	37140	14768 (40%)	22372 (60%)	< 0,0001
Tumor tipo difuso	23803	8366 (35%)	15437 (65%)	
Total	60943	23134 (38%)	37809 (62%)	* < 0,0001
Metástase linfonodal				
Tumor tipo intestinal	17432	3985 (23%)	13497 (77%)	< 0,0001
Tumor tipo difuso	10458	2128 (20%)	8330 (80%)	
Total	27890	6113 (22%)	21827 (78%)	** < 0,0001

*Positividade total de células da mucosa histologicamente normal, comparada com a positividade total em células tumorais.

**Positividade total de células do tumor primário, comparada com a positividade total em células das metástases linfonodais.

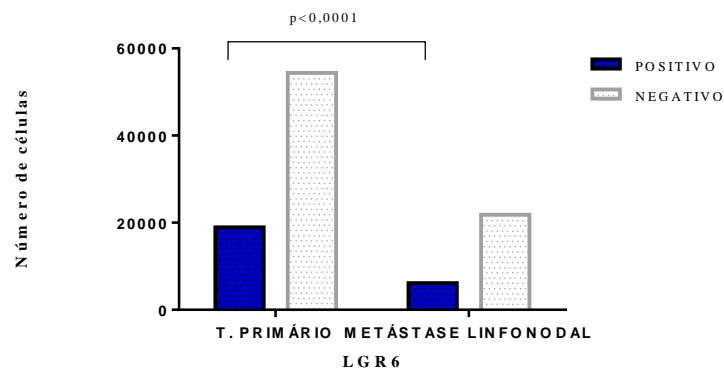
Elaborado pelo autor

Gráfico 6 - Expressão positiva por contagem de células para LGR6 em tumor primário vs mucosa gástrica normal $P < 0,0001$.



Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico 7- Expressão positiva por contagem de células para LGR6 em tumor primário vs metástase linfonodal $P < 0,0001$



Fonte: elaborado pelo autor

6.7. Comparação da expressão positiva entre os imunomarcadores LGR5 e LGR6

Na tabela a seguir (9), observa-se no total de casos, maior expressão positiva em tecido normal para LGR5 e LGR6, em relação ao tumor primário e metástase linfonodal. Além disso, LGR6 tem maior imunomarcação positiva ($57/65 = 88\%$) do que LGR5 ($40/67 = 60\%$; $P = 0,0003$).

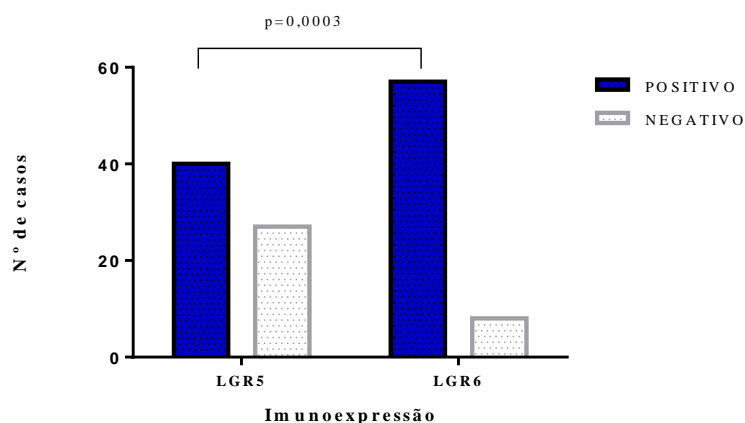
Imunoexpressão positiva em tumor primário, para LGR6 ($55/82 = 67\%$) foi mais frequente do que para LGR5 ($32/81 = 40\%$; $P = 0,0005$). Comparando-se imunoexpressão dos dois marcadores nas metástases linfonodais, não houve diferença estatística significativa ($P = 0,3457$; tabela 9, gráficos 8 e 9).

Tabela 9 - Comparação de imunoexpressão entre LGR5 e LGR6 por casos.

Imunomarcador	Mucosa histologicamente normal		Tumor primário		Metástase linfonodal	
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
LGR5	40 (60)	27 (40)	32 (40)	49(60)	16 (38)	20 (62)
LGR6	57 (88)	8(12)	55 (67)	27 (33)	20 (57)	15 (43)
P	0,0003		0,0005		0,3457	

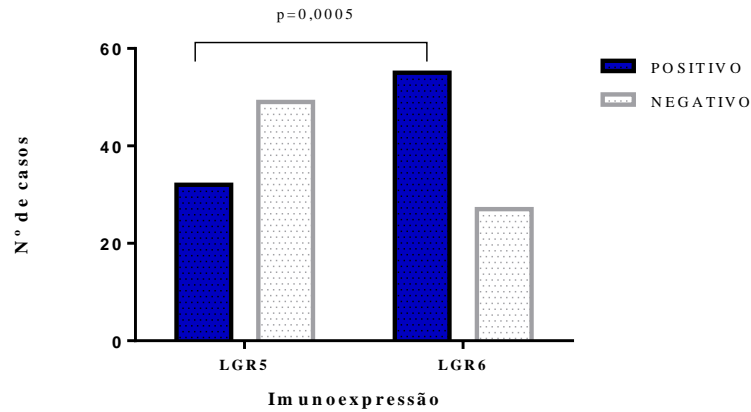
Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico 8 - Expressão positiva por casos para LGR5 vs LGR6 em mucosa gástrica normal. $P = 0,0003$.



Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico 9 - Expressão positiva por casos para LGR5 vs LGR6 em tumor primário. P =0,0005.



Fonte: Elaborado pelo autor

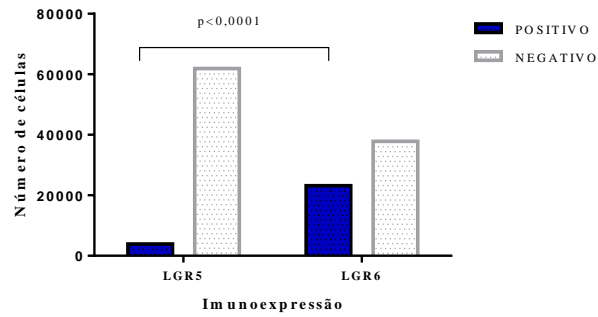
Comparando-se imunoposição por número de células pode-se observar, de igual forma que na tabela anterior, que houve maior expressão positiva para ambos marcadores em mucosa histologicamente normal (3897 = 6% para LGR5; 23134 = 33% para LGR6) em comparação com tumor primário (778 = 1% LGR5; 18949 = 26% LGR6, respectivamente), e metástase linfonodal (207/ 0,6%, LGR5 e 6113/22%, LGR6). Também, encontrou-se maior imunoposição positiva para LGR6 nos três tipos de tecidos (23134 = 33% mucosa normal; 18949 = 26% tumor primário e 6113 = 22% em metástase linfonodal) com diferença estatística $P < 0,0001$ para os três tipos de tecido em relação com LGR5 (tabela 10 e gráficos 10, 11 e 12).

Tabela 10 - Comparação de imunoposição entre LGR5 e LGR6 por contagem de células.

Imunomarcador	Mucosa histologicamente normal		Tumor primário		Metástase linfonodal	
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
LGR5	3897 (6)	61867 (94)	778 (1)	74816 (99)	207 (0.6)	29862 (99.4)
LGR6	23134 (33)	37809 (67)	18949 (26)	54386 (74)	6113 (22)	21827 (78)
P	< 0,0001		<0,0001		< 0,0001	

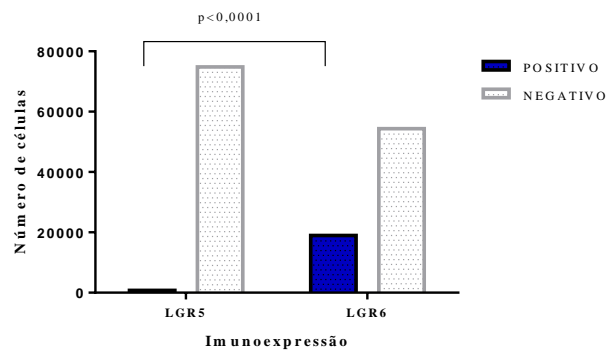
Fonte. Elaborado pelo autor

Gráfico 10 - Expressão positiva por contagem de células para LGR5 vs LGR6 em mucosa gástrica normal $P < 0,0001$



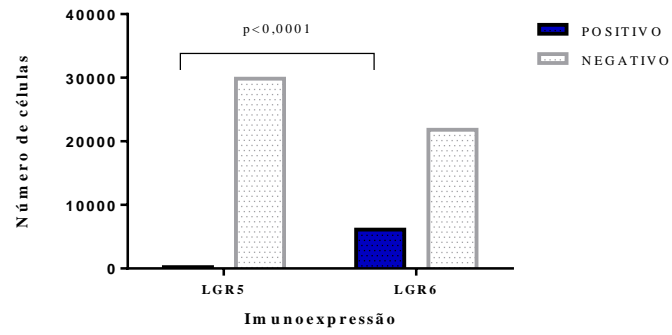
Fonte. Elaborado pelo autor

Gráfico 11 - Expressão positiva por contagem de células para LGR5 vs LGR6 em tumor primário $P < 0,0001$.



Fonte. Elaborado pelo autor

Gráfico 12 - Expressão positiva por contagem de células para LGR5 vs LGR6 em metástase linfonodal $P < 0,0001$.



Fonte. Elaborado pelo autor

7 DISCUSSÃO

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 derivar de uma única célula neoplásica (VISVADER, LINDEMAN, 2008). Em outro estudo afirma-se que identificar células-tronco, que podem representar apenas 1% do repertório celular total de um tecido, é desafiador (LEUSHACKE; BARKER, 2011).

Expressão de LGR5

Na população estudada com a expressão de LGR5, foi encontrado neste estudo predomínio de tipo intestinal, sexo masculino, idade superior ou igual a 50 anos, tumor localizado em corpo e antro gástrico, dimensão do tumor maior de 5 cm, com ausência de invasão angiolinfática e perineural. A maioria dos tumores estava em estágio mais avançado, com presença de metástase linfonodal, contudo, em nenhuma das variáveis em nosso estudo houve diferença estatística significativa para LGR5. Será que este perfil de pacientes em nosso trabalho influenciou nos resultados da expressão de LGR5? Neste contexto a bibliografia é muito variável; ZHENG *et al*, 2013 encontraram associação da expressão positiva de LGR5 com maior idade e diferenciação tumoral e pacientes com tumores em estádios iniciais apresentaram maior expressão positiva. De forma semelhante, foi observado em outro estudo que a expressão positiva foi maior em tumores de baixo grau e não houve associação com outras variáveis (JANG; LEE; KIM, 2013). BU *et al* (2012) verificaram significância estatística de expressão positiva com LGR5 no sexo masculino, maior idade, tipo intestinal e também em estádios iniciais do tumor. Por outro lado, em outro relato, a expressão de LGR5 foi mais frequente em carcinomas avançados (XI *et al*, 2014).

Em nosso estudo, a expressão positiva em tumor primário foi de 40% (32/81), o histotipo difuso apresentou maior número de amostras positivas (50%) do que o tipo intestinal (31%) mas a diferença não foi significativa. A porcentagem da expressão positiva em tumor primário varia com os estudos, sendo de 40% em nossos casos, havendo resultados variáveis de 43% a 73.3% (JANG; LEE; KIM, *et al*, 2013; ZHENG *et al*, 2013).

Neste trabalho a relação da expressão positiva total das amostras do tumor primário comparada com a expressão positiva total da metástase linfonodal foi menor mas não houve significância estatística na diferença entre ambos. Um estudo de associação da expressão de

LGR5 e a invasão e metástase no câncer gástrico mostrou que o número de amostras positivas foi significativamente maior quando ocorrem metástases e encontrou-se relação da expressão positiva de LGR5 e mais avançada fase tumoral (XI *et al*, 2014). Em discordância com nosso achado ZHENG *et al*, (2013) encontraram uma correlação entre imunopositividade de LGR5 e a presença de metástases regionais e distantes, a partir de dados do estadiamento. Em nosso estudo não houve correlação de positividade em relação ao estadiamento linfonodal (N0 vs N1-3) e não foram avaliadas metástases à distância. Na análise histológica do linfonodos neste estudo, não houve relação entre a positividade de LGR5 e os histotipos nas metástases linfonodais, não se encontrando relatos anteriores para efeito comparativo deste resultado.

Em nossa casuística a imunopositividade de LGR5 nas amostras foi mais frequência em mucosa normal distante do tumor (60%) do que no tumor primário (40%) com significância estatística na diferença destes resultados, o que é consistente com a observação de outro trabalho em que as células LGR5 positivas estavam presentes em todos os tecidos gástricos normais e eram mais escassas em adenocarcinomas (CHEN *et al* 2013). Os resultados são controversos. Em outro relato, maior número de amostras positivas para LGR5 ocorreu em adenocarcinomas (73.3%), com uma tendência crescente em número e intensidade de células positivas de tecidos não neoplásicos a neoplásicos (ZHENG, 2013). Outro estudo mostrou que imunopositividade para LGR5 foi maior em adenocarcinomas (50%) do que em tecidos normais (37.3%), (BU *et al*, 2012). A maior positividade de LGR5 no tecido normal em relação ao tumoral, encontrado neste estudo e por outros autores (CHEN *et al* 2013) sugere que este marcador não é específico para as células neoplásicas malignas. A baixa frequência deste marcador no total de células tumorais pode ser reflexo da heterogeneidade das células cancerosas.

Ao se avaliar o número de células positivas para LGR5 no conjunto de casos, pode-se observar um maior número de células marcadas no tecido normal (6%) em comparação com tumor primário (1%) e metástase linfonodal (0.6%). Este achado é similar ao encontrado quando avaliou-se imunopositividade de LGR5 por número de amostras e concorda também com estudo anteriormente citado (XI *et al*, 2014). Em outro estudo confirmou-se que LGR5 não marca só células tronco normais, também células tronco cancerígenas (JANG; LEE; KIM, 2013).

Quais são os motivos das discordâncias? Podem ser explicadas em parte pelos diferentes critérios utilizados para considerar a amostra como positiva ou negativa, como também como foi dito, LGR5 pode ser um marcador tanto de células tronco normais quanto tumorais. As amostras também podem ter características diferentes como, estadiamento

tumoral, fatores genéticos e variações geográficas. Além disso devem ser consideradas as diferentes sensibilidades dos anticorpos utilizados nos diferentes estudos, já que vários epitopos são investigados.

A expressão positiva de LGR5 na contagem de células apresentou relação entre tumor primário ($778/75574 = 1\%$) e metástase linfonodal ($207/30069 = 0.6\%$) com diferença estatística significativa ($p < 0.0001$). Não se encontraram estudos com dados comparativos para avaliar marcação por número de células/caso, somente escassos relatos com marcação por número de amostras (XI *et al*, 2014 ; KAZUHIRO; YAMANOI, 2013). Observou-se expressão positiva maior na mucosa histologicamente normal ($3897/65764 = 6\%$) do que no tumor primário, com diferença estatística ($p < 0.0001$) dado não concordante com ZHENG *et al*, 2013. Outro achado em nosso estudo foi maior expressão positiva na mucosa normal distante de tumor do que na metástase linfonodal ($p < 0.0001$).

Encontrou-se maior número de células imunocoradas para LGR5 no histotipo difuso do que no tipo intestinal em tumor primário e na metástase linfonodal com diferença estatística significativa em ambos ($p < 0.0001$). Estes dados estão de acordo com o papel atribuído às células-tronco tumorais de conferir maior agressividade à neoplasia, tendo em conta que o tipo difuso é menos diferenciado, agressivo e de pior prognóstico do que o tipo intestinal. CHEN *et al*, 2013, também interpretam que a expressão de LGR5 no tipo difuso pode estar relacionado com estado de diferenciação do tumor.

Embora a porcentagem de células marcadas positivamente seja menor do que a porcentagem de amostras marcadas, estes dados indicam a presença de células-tronco tanto em tecido normal como neoplásico. É importante enfatizar que a maior porcentagem de negatividade do que positividade na contagem de células/caso para LGR5, neste estudo, reforça a afirmação de que as células-tronco são pouco frequentes ou raras nas neoplasias, o que está de acordo com a maioria dos relatos. Por outro lado, expressão negativa de LGR5 foi significativamente relacionada à sobrevida global mais favorável nos estágios I e II de pacientes com câncer gástrico (ZHENG *et al*, 2013; BU *et al*, 2014).

Expressão de LGR6

Neste estudo do total de amostras de tumor primário avaliadas para LGR6, a expressão positiva foi de 67%, maior do que em metástase linfonodal (57%), mas sem diferença estatística significativa. Estes dados estão de acordo com estudo feito com mRNA, avaliando a expressão positiva do LGR6 entre tumor primário e metástase em linfonodo (STEFFEN, *et al*. 2012).

Neste trabalho encontrou-se que o histotipo intestinal teve maior marcação positiva ($37/47 = 79\%$) do que o difuso ($18/35 = 51\%$), no tumor primário, com diferença significativa ($p = 0.0167$), resultado que tem correspondência com os dados de STEFFEN e colaboradores (2012) embora estes autores não tenham encontrado diferença estatística significativa. Observou-se também que na mucosa normal das margens do tipo intestinal a expressão foi maior ($35/40 = 88\%$) do que no próprio tumor ($37/47 = 79\%$) mas sem diferença significativa. Comparou-se a expressão positiva dos tipos intestinal e difuso da mucosa gástrica normal e não houve diferença estatisticamente válida.

A imunexpressão positiva foi maior na mucosa normal ($57/65 = 88\%$) do que no tumor primário ($55/82 = 67\%$) e metástase linfonodal ($20/35 = 57\%$) com significância estatística na diferença dos resultados entre mucosa histologicamente normal e tumor primário ($p = 0.0036$) dados que não têm correspondência com estudo mencionado anteriormente (STEFFEN, *et al.* 2012) onde a expressão foi maior no tumor do que mucosa normal. Expressão positiva de LGR6 foi maior no tumor primário ($55/82 = 67\%$) do que na metástase linfonodal ($20/35 = 57\%$) sem diferença estatística significativa, dados consistentes com STEFFEN, *et al.* (2012), que não encontraram relação entre tumor primário e tumor metastático.

Assim como para o LGR5, mesmo nas amostras consideradas positivas, o percentual de células coradas para LGR6 foi variável: 38% para mucosa normal, 26% para tumor primário e 22% para metástase linfonodal, dados que não correspondem aos achados de (STEFFEN, *et al.* 2012) onde a expressão positiva foi maior no tumor.

Ao se considerar o número de células/ caso, neste estudo encontrou-se maior expressão positiva no tumor primário ($18949 = 26\%$) do que na metástase linfonodal ($6113 = 22\%$) com diferença estatística $p < 0,0001$. A expressão positiva na contagem de células considerando os tipos foi maior no histotipo intestinal do que no difuso, tanto para tumor primário ($18867/44654 = 38\%$) como para mucosa normal da margem cirúrgica de tumores intestinais ($14678/37140 = 40\%$) e metástase linfonodal ($3985/17432 = 23\%$) e nos três houve significância estatística na diferença dos resultados com $p < 0,0001$. Assim, sugere-se que LGR6 pode estar preferencialmente envolvido na biologia do câncer gástrico do tipo intestinal do que no tipo difuso.

Assim como observado na expressão positiva para LGR5, na contagem de células encontrou-se maior número de células negativas do que positivas para LGR6, tanto em tumor primário quanto em metástase linfonodal. Este achado se deve a que os GPCRs são pouco expressos em células-tronco cancerígenas (SIMON, 2012). Não foram encontrados relatos

sobre contagem de células positivas para esse marcador (LGR6) no levantamento bibliográfico realizado neste estudo.

Em relação às variáveis clínico-patológicas e a expressão positiva de LGR6, encontrou-se que há maior expressão positiva no histotipo intestinal ($37/47 = 79\%$) do que no difuso, em tumor primário ($18/35 = 52\%$), diferença significativa ($p = 0.0167$). Outro achado do presente estudo foi maior expressão positiva das amostras quando não havia invasão angiolinfática ($30/39 = 77\%$) sem diferença estatística. Não foram encontradas correlações entre outras variáveis clínico-patológicas e a expressão de LGR6.

Há escassos relatos na literatura especializada sobre a expressão de LGR6. STEFFEN, *et al.* 2012 encontraram expressão positiva para LGR6 em tumor primário em 153 de 481 (32%) pacientes, cerca da metade do encontrado no presente estudo. Segundo os autores citados, na correlação entre a expressão de LGR6 e variáveis clínico-patológicas, a expressão de LGR6 em células tumorais correlacionou-se com o crescimento local do tumor ($P = 0,0040$) e foi mais frequentemente observada em fase inicial dos carcinomas ($P = 0,0006$). Curiosamente, LGR6 foi superexpresso no câncer gástrico tipo intestinal, dado semelhante ao de nosso estudo. Entre os casos do histotipo intestinal, células tumorais positivas foram mais prevalentes em pacientes do sexo masculino. No entanto, essa diferença não atingiu significância estatística ($P = 0,092$). A expressão de LGR6 se correlacionou inversamente com o crescimento local do tumor, no entanto a propagação nodal não mostrou diferença entre casos positivos e negativos (STEFFEN, *et al.* 2012). Estes últimos achados não correspondem aos encontrados em nosso estudo.

Os estudos para avaliar a expressão de LGR6 em tecido não neoplásico e neoplásicos no estômago são raros. Por enquanto, não temos dados na literatura para comparação com estes resultados, nos aspectos que foram analisados neste projeto.

Do total de casos estudados, a marcação para os dois marcadores (LGR5 e LGR6) para as amostras de tumor primário, metástase linfonodal e mucosa gástrica histologicamente normal foi citoplasmática em sua totalidade, achados consistentes com a bibliografia revisada (ZHENG; FENG, 2012; BU *et al.*, 2012; STEFFEN, *et al.* 2012). Em relação à intensidade de marcação, foi predominantemente moderada para ambos marcadores, LGR5 (mucosa normal $19/67 = 28\%$; tumor primário $13/81 = 16\%$ e metástase linfonodal $8/37 = 22\%$) e LGR6 (mucosa normal $32/65 = 49\%$; tumor primário $33/82 = 40\%$) neste estudo. Observou-se uma forte imunomarcção citoplasmática em $10/35 = 29\%$ nos casos avaliados para LGR6 na metástase linfonodal. Verificou-se maior número de amostras com marcação moderada em mucosa gástrica normal do que em tumor e metástase linfonodal para ambos marcadores.

Estes dados diferem com os de relato anterior onde a marcação foi maior e mais intensa em tecido tumoral do que na mucosa normal (KAZUHIRO; MARIKO, 2013). Na presente casuística, LGR6 teve marcação mais frequente que LGR5 em todos os tecidos.

Na mucosa gástrica normal, a marcação em nosso estudo foi predominantemente no terço basal para ambos marcadores, membrana e citoplasmática, mas também foi encontrada marcação no terço médio da espessura da mucosa, embora menos intensa, menos frequente que na base e restrita à membrana das células. Este achado está em parcial concordância com estudos anteriores que descreveram a localização basal das células-tronco em mucosa gástrica normal através de imunomarcação. Existe a hipótese de que células progenitoras, diretamente derivadas das células-tronco e responsáveis pela zona de amplificação celular que pode atingir o terço médio, encontram-se no mesmo nicho e compartilham muitas características de células-tronco como autorenovação e diferenciação (YANG, 2013; MILLS; SHIVDASAN, 2011) e assim pode-se admitir que as células desta região possam co-expressar os mesmos marcadores.

Em nosso estudo houve marcação das células do estroma do tecido tumoral primário e metástase com forte intensidade no citoplasma, com ambos imunomarcadores mas não foi encontrada em mucosa gástrica histologicamente normal para LGR5, sendo vista somente em LGR6. Em estudo que avaliou a superexpressão de LGR5 em câncer gástrico encontrou-se que LGR5 foi positivo em citoplasma das células cancerígenas mas não no estroma (KAZUHIRO; MARIKO, 2013). Em raro relato sobre o tema, observou-se marcação da expressão para LGR6 no estroma tanto em tumor primário como na mucosa normal distante de tumor (STEFFEN, *et al.* 2012) achados concordantes com os deste estudo.

Qual o significado da presença de células tronco estromais positivas para LGR5 e LGR6 no microambiente do câncer gástrico? Por que apenas LGR6 teve imunomarcação em células de estroma de mucosa histologicamente normal? Qual é a importância de células estromais positivas para estes marcadores na carcinogênese gástrica? São questões que apenas um estudo com outro desenho metodológico poderá se propor a responder.

A frequente imunomarcação em mononucleares do estroma possivelmente reforça a importância do microambiente tumoral e mecanismos da inflamação no desenvolvimento das neoplasias, porém estes marcadores não são específicos para células tronco.

Comparação de imunomarcação entre LGR5 e LGR6

Em nosso estudo observou-se no total de amostras, maior expressão positiva em tecido normal para LGR5 e LGR6 do que no tumor primário e metástase linfonodal. Igualmente que

no total de amostras a imunoposição positiva na contagem de células foi maior no tecido normal para LGR5 e LGR6 do que nas amostras tumorais. Estes achados são consistentes com a afirmação de que estes biomarcadores não são específicos de células troncos tumorais. Além disso, LGR6 tem maior imunomarcção positiva do que LGR5 nos três locais avaliados. Isso pode ser explicado por maior sensibilidade e/ou menor especificidade do anticorpo utilizado contra LGR6 nesta amostra. Não foram encontrados relatos anteriores para serem comparados, entre os dois marcadores aqui estudados, nem estudos sobre a expressão comparativa dos mesmos em uma mesma amostra, em carcinomas gástricos, metastases linfonodais e mucosa gástrica histologicamente normal. Assim como não foram encontrados relatos sobre avaliação quantitativa destes dois potenciais biomarcadores de células-tronco nos locais e lesões aqui estudados.

Enquanto LGR5 pode ser um marcador de células-tronco, normais e cancerosas, confirmando raros relatos anteriores, as funções de LGR6 são ainda desconhecidas. Coletivamente, os nossos resultados atuais e anteriores, de outros autores, dão suporte para a hipótese de que os membros da família GPCRs, nomeadamente LGR5, e LGR6 são diferencialmente expressos em carcinomas gástricos.

Ambos LGR5 e LGR6 têm potencial como biomarcadores tumorais ou normais, mas eles precisam ser objeto de novas investigações, sendo necessários mais estudos referentes a este importante tema tão relevante em oncologia.

8 CONCLUSÕES

1. LGR5 mostrou-se, neste estudo, ser um potencial biomarcador, mais característico de células-tronco tumorais e não tumorais, do que LGR6
2. Os marcadores de células-tronco LGR5 e LGR6 são expressos tanto em tecido tumoral como não tumoral, com predomínio em mucosa histologicamente normal, em terço basal da espessura epitelial.
3. Observou-se predominância de imunomarcação positiva de LGR5 no histotipo difuso e de LGR6 no tipo intestinal de carcinomas gástricos
4. LGR6 esteve presente no tumor gástrico primário em número de células muito superior ao encontrado nas respectivas metástases linfonodais, diferença não observada em relação a LGR5
5. Com exceção da relação de cada biomarcador com um histotipo específico, já citada, não houve correlação entre as demais variáveis clinico-patológicas e a expressão de LGR5 e LGR6

REFERÊNCIAS

AOKI, M. A full genome scan for gastric cancer. **Journal Of Medical Genetics**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.83-87, 1 jan. 2005.

BARTSCH, H; SPIEGELHALDER, B. Environmental exposure to N-nitroso compounds (NNOC) and precursors: and 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**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.515-523, 1996.

BU, Z. *et al.* LGR5 is a promising biomarker for patients with stage I and II gastric cancer. **Chinese Journal of Cancer Research**.v. 25, n. 1, p.79-89, 2013.

BRUCKNER, H.W; KONDO, K. Neoplasms of the stomach. In: Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E III, Kufe TW, Weichselbaum RR,eds. **Cancer medicine**.p 1879-22, 1997.

CARMON, K. S. *et al.* R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ -catenin signaling. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 108, n. 28, p.11452-11457, 21 jun. 2011.

CARNEIRO, F. Clasification of gastric carcinomas, **Cur .Diag. Pathol**, vol. 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.

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

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

DHINGRA, S. *et al.* Clinicopathologic significance of putative stem cell markers, CD44 and nestin, in gastric adenocarcinoma.**Int J ClinExpPathol**. 4 (8):733-741, 2011.

Disponível

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

Disponível

<http://gco.iarc.fr>. (GLOBOCAN 2012)

DURÃES, C. *et al.* Biomarkers for gastric cancer: prognostic, predictive or targets of therapy?. **Virchows Archiv**, [s.l.], v. 464, n. 3, p.367-378, 1 fev. 2014.

FITZGERALD, R. C. *et al.* Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. **Journal Of Medical Genetics**, [s.l.], v. 47, n. 7, p.436-444, 30 jun. 2010.

GARRIDO, M *et al.* Challenges in first line chemotherapy and targeted therapy in advanced gastric cancer. **Expert Review Of Anticancer Therapy**, [s.l.], v. 14, n. 8, p.887-900, 23 jun. 2014.

GHAFFARZADEHGAN, K. *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.

GONG, X. *et al.* LGR6 Is a High Affinity Receptor of R-Spondins and Potentially Functions as a Tumor Suppressor. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 5, p.37-137, 17 maio 2012.

GUGGENHEIM, D. E; SHAH, M. A. Gastric cancer epidemiology and risk factors. **Journal Of Surgical Oncology**, [s.l.], v. 107, n. 3, p.230-236, 5 nov. 2012.

GUILFORD, P. *et al.* E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. **Nature**, [s.l.], v. 392, n. 6674, p.402-405, 26 mar. 1998.

HASHIMOTO, Kousuke *et al.* Expression of CD133 in the cytoplasm is associated with cancer progression and poor prognosis in gastric cancer. **Gastric Cancer**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.97-106, 5 abr. 2013.

HOTCHKISS, J. H. Preformed N- nitroso compounds in foods beverages. **Cancer surveys**. V. 8, n 2, p. 295- 321, 1989.

ISHIGAMI, S. *et al.* Prognostic Impact of CD133 Expression in Gastric Carcinoma. **Anticancer Research**, n. 30, p.2453-2458, 2010.

JAKSZYN, Paula. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 12, n. 27, p.4296-4303, 2006.

JANG, B. G. *et al.* Distribution of LGR5+ Cells and Associated Implications during the Early Stage of Gastric Tumorigenesis. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.8-12, 10 dez. 2013.

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

KAZUHIRO Y; MARIKO F. Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in gastric cancer. **Pathology International**,63: 13–19 ,2013.

- KIM, J. *et al* . Effects of interleukin-10 polymorphisms, Helicobacter pylori infection and smoking on the risk of noncardis gastric cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. 29643, 2012.
- KONONEN, J. *et al*. Tissue microarray for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature medicina**, v. 4, n. 7, p. 844-7, 1998.
- LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. **Acta Pathol Microbiol Scand**, vol.64, p 31-49, 1965.
- LAVECCHIA, Carlo *et al*. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. **Cancer**, [s.l.], v. 70, n. 1, p.50-55, 1 jul. 1992.
- LEE, H. H *et al*. CD133 expression is correlated with chemoresistance and early recurrence of gastric cancer. **Journal Of Surgical Oncology**, [s.l.], v. 106, n. 8, p.999-1004, 4 jun. 2012.
- LEVI, E *et al*. Cancer stem cells in Helicobacter pylori infection and aging: Implications for gastric carcinogenesis. **World J Gastrointest Pathophysiol**. v.5 (3) p.366-372, 2014.
- LEUSHACKE, M; BARKER, N. Lgr5 and Lgr6 as markers to study adult stem cell roles in self-renewal and cancer. **Oncogene**, [s.l.], v. 31, n. 25, p.3009-3022, 17 out. 2011
- LYNCH, H. T. *et al*. Gastric cancer: New genetic developments. **Journal Of Surgical Oncology**, [s.l.], v. 90, n. 3, p.114-133, 2005.
- MILLS, J. C; SHIVDASANI, R. A.. Gastric Epithelial Stem Cells. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 140, n. 2, p.412-424, fev. 2011.
- MILNE A. N. *et al*. Early onset gastric cancer: on the road to unraveling gastric carcinogenesis. **Curr.Mol. Med**. v.7, p. 15-28, 2007.
- NAGINI, S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World Journal Of Gastrointestinal Oncology**, [s.l.], v. 4, n. 7, p.156-169, 2012.
- NOSRATI, A. *et al*. Cancer Stem Cell Markers CD44, CD133 in Primary Gastric Adenocarcinoma . **Int J Mol Cell Med**.; 3 (4): 279–286, 2014
- PARK S. Y. *et al*. CpG island hypermethylator phenotype in gastric carcinoma and its clinicopathological features. **Virchows Arch**. v. 457, p. 415-422, 2010.
- SAPARI N. S. *et al*. Clinical potential of DNA methylation in gastric cancer: a meta-analysis. **PLoS One**, v.7, p. 36275, 2012.
- SARBIA M.; BECKERK.F.; HOFLEH H. Pathology of upper gastrointestinal malignancies. **Semin. Oncol**. v. 31, p. 465-475, 2004.
- SAKURAMOTO, S. *et al*. Adjuvant Chemotherapy for Gastric Cancer with S-1, an Oral Fluoropyrimidine. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 357, n. 18, p.1810-1820, nov. 2007.

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

SHYMOYAMA, Y; HIROHASHI, S. Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. **Nature Review cancer**.V.8, n. 10, p 755-768, 2008.

SIMON, E. *et al.* The Spatial Distribution of LGR5+ Cells Correlates With Gastric Cancer Progression. **PLoSOne**, v. 7, n. 4, p.1-16, 2013.

SOBIN, L.; GOSPODAROWICZ, M.; WITTEKIND, C.TNM classification of malignant tumours. **International Union Against Cancer**, v. 7, 2009.

STEFFEN, J. S. *et al.* LGR4 and LGR6 are differentially expressed and of putative tumor biological significance in gastric carcinoma. **Virchows Archiv**, [s.l.], v. 461, n. 4, p.355-365, 2 ago. 2012.

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

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

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 8, n. 10, p.755-768, 11 set. 2008.

WANG, T *et al.* Sequential expression of putative stem cell markers in gastric carcinogenesis. **British Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 105, n. 5, p.658-665, 9 ago. 2011

WAKAMATSU, Y. *et al.* Expression of cancer stem cell markers ALDH 1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. **Pathology international**, v. 62, n.2, p. 112-119, 2012.

WU, C. *et al.* Lgr5 expression as stem cell marker in human gastric gland and its relatedness with other putative cancer stem cell markers. **Gene**, [s.l.], v. 525, n. 1, p.18-25, ago. 2013

XI, H Q *et al.* Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 is associated with invasion, metastasis, and could be a potential therapeutic target in human gastric cancer. **British Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 110, n. 8, p.2011-2020, 4 mar. 2014.

XI, H.Q. *et al.* Increased expression of Lgr5 is associated with chemotherapy resistance in human gastric cancer. **Oncology Reports**, [s.l.], p.181-188, 22 maio 2014.

YANG, L. *et al.* Cancer Stem Cells Biomarkers in Gastric Carcinogenesis. **Journal Of Gastrointestinal Cancer**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.428-435, 16 ago. 2013.

YANG, L. *et al.* Gastric cancer stem-like cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype. **Elsevier: Cancer Letter**, n. 310, p.46-52, 2013.

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

ZHAO, Y.; FENG, F.; ZHOU, YN. Stem cells in gastric cancer. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.112-123, 2015.

ZHENG, Z.X. *et al.* Intestinal stem cell marker LGR5 expression during gastric carcinogenesis. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 19, n. 46, p.8714-8721, 2013.

APÊNDICES

Apêndice A – Número de células positivas para LGR5 em mucosa normal.

NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS EM MUCOSA NORMAL PARA LGR5(GERAL)						
ORDEM	CASO	SEXO	IDADE	LAUREN	TECIDO NORMAL	
					CÉL (+) / TOTAL	%
1	5	M	63	INT	285/1000	28.5
2	6	M	75	INT	33/1000	3.3
3	7	F	50	INT	2/1000	0.2
4	8	F	72	INT	37/1000	3.7
5	10	M	71	INT	19/1000	1.9
6	11	M	65	INT	22/1000	2.2
7	13	M	66	INT	7/1000	0.7
8	15	M	73	INT	16/1000	1.6
9	18	M	57	INT	16/1000	1.6
10	19	F	68	INT	205/1000	20.5
11	22	F	73	INT	52/1000	5.2
12	23	M	54	INT	155/501	31
13	24	F	72	INT	37/1000	3.7
14	28	M	48	INT	6/1000	0.6
15	32	M	58	INT	3/1000	0.3
16	33	M	72	INT	81/1000	8.1
17	34	F	64	INT	70/1000	7.0
18	35	M	65	INT	15/1000	1.5
19	37	M	61	INT	12/1000	1.2
20	38	F	67	INT	49/1000	4.9
21	40	M	78	INT	115/1000	11.5
22	41	M	68	INT	5/1000	0.5
23	42	M	62	INT	247/1000	24.7
24	43	M	63	INT	2/1000	0.2
25	44	F	71	INT	259/1000	25.9
26	46	F	61	INT	422/1000	42.2
27	50	M	79	INT	22/1000	2.2
28	54	M	41	DIF	3/1000	0.3
29	58	M	65	DIF	9/1000	0.9
30	61	M	74	DIF	182/1000	18.2
31	63	F	63	DIF	97/1000	9.7
32	67	M	40	DIF	35/1000	3.5
33	69	F	42	DIF	19/1000	1.9
34	71	M	45	DIF	53/263	20
35	73	F	54	DIF	112/1000	11.2
36	76	F	48	DIF	485/1000	48.5
37	78	M	57	DIF	14/1000	1.4
38	84	M	66	DIF	240/1000	24
39	85	M	66	DIF	23/1000	2.3
40	86	M	50	DIF	431/1000	43.1
TOTAL					3,897/61,577	6.3%

Apêndice B- Número de células positivas para LGR5 em tumor primário.

NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS EM TUMOR PRIMÁRIO PARA LGR5(GERAL)						
ORDEM	CASO	SEXO	IDADE	LAUREN	TUMOR PRIMÁRIO	
					CÉL(+) / TOTAL	%
1	7	F	50	INT	13/1000	1.3
2	8	F	72	INT	1/1000	0.1
3	13	M	66	INT	3/1000	0.3
4	20	F	68	INT	3/1000	0.3
5	21	F	81	INT	3/1000	0.3
6	23	M	54	INT	47/1000	4.7
7	27	F	48	INT	4/1000	0.4
8	30	M	39	INT	2/1000	0.2
9	36	M	81	INT	1/1000	0.1
10	38	F	67	INT	2/1000	0.2
11	40	M	78	INT	1/1000	0.1
12	45	M	68	INT	4/1000	0.4
13	46	F	61	INT	4/1000	0.4
14	50	M	79	INT	236/1000	23.6
15	51	M	64	DIF	47/525	9
16	53	M	59	DIF	1/261	0.3
17	58	M	65	DIF	238/1000	23.8
18	59	F	54	DIF	13/543	2.4
19	62	M	55	DIF	2/1000	0.2
20	64	M	69	DIF	4/1000	0.4
21	65	M	58	DIF	2/1000	0.2
22	70	F	42	DIF	8/1000	0.8
23	71	M	45	DIF	2/474	0.4
24	72	M	61	DIF	1/1000	0.1
25	74	M	66	DIF	3/1000	0.3
26	75	M	55	DIF	9/1000	0.9
27	76	F	48	DIF	2/502	0.4
28	82	F	65	DIF	2/627	0.3
29	85	M	66	DIF	22/1000	2.2
30	86	M	50	DIF	3/1000	0.3
31	87	F	69	DIF	94/1000	9.4
32	88	F	32	DIF	1/1000	0.1
TOTAL					778 / 75,594	1 %

Apêndice C- Número de células positivas para LGR5 em Metástase linfonodal.

NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS EM METÁSTASE LINFONODAIS PARA LGR5 (GERAL)						
ORDEM	CASO	SEXO	IDADE	LAUREN	METASTASE LINFONODAIS	
					CÉL (+) / TOTAL	%
1	4	F	63	INT	6/1000	0.6
2	5	M	63	INT	6/1000	0.6
3	22	F	73	INT	45/1000	4.5
4	25	M	50	INT	6/1000	0.6
5	26	M	65	INT	2/933	0.2
6	35	M	65	INT	4/1000	0.4
7	40	M	78	INT	3/1000	0.3
8	48	M	65	INT	1/1000	0.1
9	55	M	59	DIF	4/1000	0.4
10	60	M	68	DIF	5/1000	0.5
11	62	M	55	DIF	38/888	4.2
12	65	M	58	DIF	29/308	9.4
13	67	M	40	DIF	3/1000	0.3
14	69	F	42	DIF	6/855	0.7
15	71	M	45	DIF	38/888	4.3
16	83	M	50	DIF	11/1000	1.1
TOTAL					207/ 30,069	0.6 %

Apêndice D- Número de células positivas para LGR6 em mucosa normal

NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS EM MUCOSA NORMAL PARA LGR5 (GERAL)						
ORDEM	CASO	SEXO	IDADE	LAUREN	TECIDO NORMAL	
					CÉL (+) / TOTAL	%
1	1	F	70	INT	1000/1000	100
2	2	M	72	INT	295/370	80
3	3	M	66	INT	970/1000	97
4	5	M	63	INT	446/1000	45
5	6	M	75	INT	1000/1000	100
6	7	F	50	INT	282/1000	28
7	8	F	72	INT	1000/1000	100
8	10	M	71	INT	1000/1000	100
9	11	M	65	INT	61/921	6.6
10	13	M	66	INT	145/455	38
11	15	M	73	INT	245/1000	25
12	16	F	70	INT	571/1000	57
13	17	F	72	INT	480/1000	48
14	18	M	57	INT	271/903	30
15	19	F	68	INT	555/781	71
16	20	F	68	INT	1000/1000	100
17	21	F	81	INT	8/1000	0.8
18	22	F	73	INT	734/1000	73
19	23	M	54	INT	353/1000	35
20	24	F	72	INT	329/847	39
21	28	M	48	INT	188/631	30
22	31	M	65	INT	181/232	78
23	33	M	72	INT	480/1000	48
24	34	F	64	INT	685/1000	68
25	35	M	65	INT	91/1000	91
26	36	M	81	INT	4/1000	0.4
27	39	F	68	INT	87/1000	8.7
28	40	M	78	INT	191/1000	19
29	42	M	62	INT	260/1000	26
30	44	F	71	INT	733/1000	73
31	45	M	68	INT	96/1000	9.6
32	46	F	61	INT	469/1000	47
33	47	M	69	INT	61/1000	6.1
34	49	F	47	INT	87/1000	8.7
35	50	M	79	INT	410/1000	41
36	51	M	64	DIF	56/786	7
37	52	F	57	DIF	459/675	68
38	54	M	41	DIF	549/1000	0.3
39	55	M	59	DIF	351/1000	35
40	56	M	61	DIF	10/1000	1
41	61	M	74	DIF	206/1000	20
42	62	M	55	DIF	760/1000	76
43	63	F	63	DIF	570/1000	57

(continuação do Apêndice D)						
NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS EM MUCOSA NORMAL PARA LGR5 (GERAL)						
ORDEM	CASO	SEXO	IDADE	LAUREN	TECIDO NORMAL	
					CÉL(+) / TOTAL	%
44	65	M	58	DIF	452/680	66
45	67	M	40	DIF	170/662	26
46	71	M	45	DIF	372/1000	37
47	73	F	54	DIF	430/1000	43
48	74	M	66	DIF	120/1000	12
49	76	F	48	DIF	229/1000	22
50	77	F	60	DIF	494/1000	49
51	78	M	57	DIF	49/1000	4.9
52	79	F	55	DIF	70/1000	7
53	80	F	54	DIF	850/1000	85
54	83	M	50	DIF	707/1000	70
55	84	M	66	DIF	567/1000	56
56	85	M	66	DIF	358/1000	35
57	86	M	50	DIF	537/1000	53
TOTAL					23,134 / 60,943	38 %

Apêndice E- Número de células para LGR6 em tumor primário.

NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS EM TUMOR PRIMÁRIO PARA LGR6 (GERAL)						
ORDEM	CASO	SEXO	IDADE	LAUREN	TUMOR PRIMÁRIO	
					CÉL(+)/ TOTAL	%
1	1	F	70	INT	20/1000	2
2	2	M	72	INT	11/1000	1.1
3	3	M	66	INT	1000/1000	100
4	4	F	63	INT	880/1000	88
5	5	M	63	INT	632/871	63
6	6	M	75	INT	855/1000	86
7	7	F	50	INT	3/1000	0.3
8	8	F	72	INT	1000/1000	100
9	9	M	79	INT	1000/1000	100
10	11	M	65	INT	479/919	52
11	13	M	66	INT	690/1000	69
12	14	M	86	INT	810/1000	81
13	17	F	72	INT	975/1000	97
14	20	F	68	INT	910/1000	91
15	21	F	81	INT	145/1000	14
16	27	F	48	INT	848/1000	85
17	28	M	48	INT	620/930	67
18	29	M	58	INT	1/51	2
19	31	M	65	INT	3/1000	0.3
20	32	M	58	INT	38/1000	3.8
21	33	M	72	INT	1000/1000	100
22	34	F	64	INT	785/1000	78
23	35	M	65	INT	566/731	77
24	36	M	81	INT	985/1000	98
25	37	M	61	INT	27/1000	2.7
26	38	F	67	INT	460/1000	46
27	39	F	68	INT	40/1000	4
28	40	M	78	INT	23/1000	2.3
29	41	M	68	INT	14/1000	1.4
30	43	M	63	INT	10/1000	1
31	44	F	71	INT	566/1000	57
32	45	M	68	INT	20/1000	2
33	46	F	61	INT	455/1000	45
34	47	M	69	INT	338/1000	34
35	48	M	65	INT	143/1000	14
36	49	F	47	INT	130/1000	13
37	50	M	79	INT	205/1000	20
38	52	F	57	DIF	46/1000	4.6
39	53	M	59	DIF	104/229	45
40	58	M	65	DIF	136/1000	13.6
41	62	M	55	DIF	680/1000	68
42	63	F	63	DIF	87/1000	8.7
43	64	M	69	DIF	181/236	77
44	65	M	58	DIF	204/829	25

(continuação do Apêndice E)						
NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS EM TUMOR PRIMÁRIO PARA LGR6 (GERAL)						
ORDEM	CASO	SEXO	IDADE	LAUREN	CÉL (+) / TOTAL	%
45	66	M	51	DIF	1/1000	0.1
46	69	F	42	DIF	17/737	2.3
47	70	F	42	DIF	1/931	0.1
48	76	F	48	DIF	16/766	2
49	79	F	55	DIF	260/1000	26
50	80	F	54	DIF	31/500	6
51	81	M	64	DIF	81/1000	8.1
52	83	M	50	DIF	67/694	10
53	84	M	66	DIF	19/1000	1.9
54	86	M	50	DIF	97/500	19
55	87	F	69	DIF	34/1000	3.4
TOTAL					18,949 / 54,386	26 %

Apêndice F - Número de células para LGR6 em Metástase linfonodal.

NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS EM METÁSTASE LINFONODAIS PARA LGR5 (GERAL)						
ORDEM	CASO	SEXO	IDADE	LAUREN	METÁSTASE LINFONODAL	
					CÉL (+) / TOTAL	%
1	2	M	72	INT	610/613	61
2	4	F	63	INT	665/1000	67
3	5	M	63	INT	490/690	49
4	22	F	73	INT	82/1000	82
5	27	F	48	INT	985/1000	98
6	29	M	58	INT	11/361	3
7	35	M	65	INT	67/600	11
8	39	F	68	INT	2/1000	0.2
9	42	M	62	INT	340/340	100
10	44	F	71	INT	402/857	47
11	46	F	61	INT	106/921	12
12	47	M	69	INT	93/1000	9.3
13	48	M	65	INT	132/1000	13
14	53	M	59	DIF	124/226	55
15	55	M	59	DIF	470/9200	47
16	60	M	68	DIF	985/1000	98
17	69	F	42	DIF	220/510	43
18	71	M	45	DIF	230/880	26
19	77	F	60	DIF	56/571	9
20	81	M	64	DIF	43/398	11
TOTAL					6113 / 27,890	22 %