

PAOLO RUGGERO ERRANTE

*Universidade de São Paulo, USP, São Paulo,
SP, Brasil; Universidade Federal de São
Paulo, UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil.*

**LARISSA COMPARINI DA SILVA
NASCIMENTO**

*Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP,
São Paulo, SP, Brasil.*

*Recebido em julho de 2018.
Aprovado em novembro de 2018.*

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE SMAC/DIABLO EM ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS E SUA CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS E MORFOLÓGICOS

RESUMO

Introdução: O câncer gástrico é segunda causa de morte associada ao câncer no mundo. **Objetivo:** Avaliar a imunexpressão de Smac/DIABLO em carcinomas gástricos. **Metodologia:** Imuno-histoquímica foi realizada a partir de amostras de carcinoma gástrico de 87 pacientes, e os achados de correlacionados com os parâmetros clínicos e histológicos. **Resultados:** A maioria dos pacientes eram do sexo masculino, com idade superior a 50 anos. Os linfonodos estiveram comprometidos em 72.4% dos casos com predomínio do carcinoma gástrico do tipo intestinal com mais de 3 cm de tamanho. Diferença estatística foi observada para a associação Smac/DIABLO e localização do tumor em antro. **Conclusão:** Foi observada uma associação entre a expressão de Smac/DIABLO com a localização do tumor no antro.

Palavras-Chave: câncer; apoptose; imuno-histoquímica; adenocarcinoma gástrico; smac/diablo.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF SMAC/DIABLO IN GASTRIC ADENOCARCINOMAS AND CLINICAL AND MORPHOLOGICAL CORRELATION

ABSTRACT

Introduction: Gastric cancer is the second leading cause of cancer-related deaths in world. **Objective:** To analyze the immunexpression of Smac/DIABLO in gastric cancer. **Methods:** Was realized immuno histochemical with gastric carcinoma tissue from 87 patients. These results are associated with clinical and histological parameters. **Results:** Fifty-six-point eight percent of patients in the study were male and older than 50 years. Lymph nodes were compromised in 72.4% of cases with predominant gastric carcinoma of intestinal type, and predominance of tumors larger than 3 cm in size. Statistically significant differences were observed for the association Smac/DIABLO and location of the tumor in antrum. **Conclusion:** Was observed an association between the expressions of Smac/DIABLO with tumor localization in antrum.

Keywords: cancer; apoptosis; immuno-histochemical; gastric adenocarcinoma; smac/diablo.

INTRODUÇÃO

O carcinoma gástrico é a segunda maior causa de óbitos relacionados ao câncer no mundo, com significado epidemiológico na Ásia, leste Europeu e América Latina (PADMAVATHY, SIDDARAJU, SISTLA, 2011; CORRAL et al., 2015; WU et al., 2015). Apesar das diferenças de incidência e dos programas de detecção precoce entre o Oriente e o Ocidente, a sobrevida em 5 anos é de 30% nos países desenvolvidos e de 20% nos países em desenvolvimento (RYUN PARK, 2015).

Histologicamente o carcinoma gástrico é dividido em duas variantes, do tipo intestinal e do tipo difuso. O carcinoma do tipo intestinal é acompanhado de formação papilar ou componente sólido (SUSMAN et al., 2015), ao passo que o carcinoma do tipo difuso é constituído por células em anel de sinete, caracterizadas por alteração da relação núcleo citoplasma, hipercromasia nuclear, muco intracitoplasmático e nucléolo evidente (ADITI et al., 2016).

A apoptose é um mecanismo fisiológico de morte celular que se encontra alterado no processo de tumorigênese, e três vias de sinalização estão correlacionadas com a apoptose; a via extrínseca, via intrínseca, e a via ativada pelo fator de indução de apoptose (AIF) (KONG et al., 2016). Na via ativada pelo AIF ocorre liberação de fatores apoptogênicos como o AIF, citocromo c e Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-Binding Protein with Low pI) (SEVRIOUKOVA, 2011). O AIF é uma proteína mitocondrial que se translocado para o núcleo e inicia a condensação da cromatina e fragmentação do DNA (KONG et al., 2016). O citocromo c é translocado da membrana mitocondrial para o citoplasma, liga-se à protease ativadora do fator 1 (APAF-1) formando um complexo citosólico que converte a pró-caspase 9 em caspase 9, que ativa as caspases efetoras 3 e 7 (ELEFThERiADiS et al., 2016).

Smac/DIABLO tem um efeito pró-apoptótico no citoplasma mediado por sua interação com proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) e liberação de caspases (MARTINEZ-RUIZ et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar por imuno-histoquímica a expressão de Smac/DIABLO e correlacionar estes parâmetros com as variáveis clínicas dos pacientes e morfológicas dos tumores.

METODOLOGIA

Pacientes

As amostras de adenocarcinoma gástrico foram obtidas de 87 pacientes atendidos no ambulatório de Gastro-Oncologia da Disciplina de Gastroenterologia da UNIFESP/EPM, no período de janeiro/2000 a maio/2005 que não apresentavam história prévia de radioterapia ou quimioterapia. Como controle foram avaliadas 87 amostras de mucosas gástricas morfolologicamente normais, provenientes da margem adjacente dos adenocarcinomas dos mesmos pacientes. Os dados clínicos foram coletados dos prontuários dos pacientes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM.

Construção do Arranjo Tecidual em Matriz

Para a confecção do Arranjo Tecidual em Matriz (ATM) blocos com material embebido em parafina foram puncionados, sendo removidos fragmentos com 1.0 mm de diâmetro para a confecção de dois blocos receptores. No primeiro foram incluídos 49 cilindros (adenocarcinoma gástrico + mucosa normal) e no segundo bloco foram incluídos 38 cilindros (adenocarcinoma gástrico + mucosa normal). Os blocos foram colocados na estufa a 35°C por 15 minutos para permitir a aderência entre a parafina do bloco e os

cilindros. Após a aderência, os blocos receptores foram retirados da estufa e cortados com espessura de 4 micrometros. Para manter a aderência, as lâminas foram submetidas à luz ultravioleta por 15 minutos, colocadas em solução solvente TPC por 15 minutos e armazenadas a -20oC.

Imuno-histoquímica

As lâminas foram tratadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma, Co-USA-A3648) e mantidos em estufa a 60°C por 12 horas, e desparafinização das lâminas em xilol, hidratação com etanol 95% e lavadas em água corrente. A recuperação antigênica foi realizada em panela de vapor utilizando tampão citrato, pH 6.0, 95°C por 45 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da aplicação de peróxido de hidrogênio 3%, seguido de lavagem em água corrente e tampão PBS-BSA 1%, pH 7.4. O bloqueio de proteínas foi realizado através da aplicação de PBS-leite molico desnatado 3% durante 30 minutos.

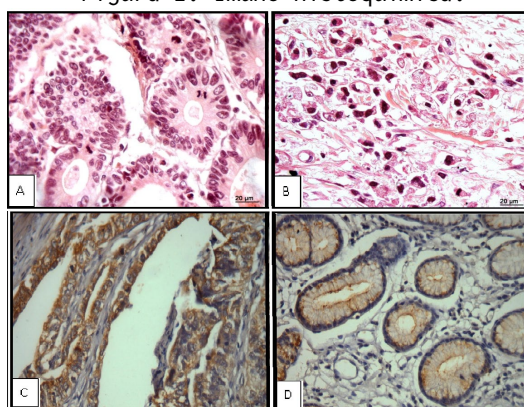
A incubação com o anticorpo primário (anti-Smac/Diablo diluição 1:200, Cell Signalling) foi realizada depois da diluição do anticorpo em tampão PBS-BSA 1%, em câmara úmida a 4°C por 18 horas.

As lâminas foram lavadas em tampão PBS e incubadas com o anticorpo secundário biotilado (Kit Advance-DAKO, Denmark) em câmara úmida a temperatura ambiente por 15 minutos, e depois lavadas duas vezes com tampão PBS. A seguir foi realizada a incubação com o complexo streptavidina-biotina (Kit Advance- DAKO, Denmark) em câmara úmida a temperatura ambiente por 15 minutos e lavagem em tampão PBS.

As lâminas foram reveladas com substrato cromógeno (3´3 - diaminobenzidina - Sigma Co-USA- DS637) e água oxigenada 1% em tampão PBS pH 7.4 por 5 minutos a 37°C, e depois lavadas em água destilada. A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por 30 segundos, seguida de lavagem em água destilada. As lâminas foram submetidas a desidratação em 3 banhos com etanol 95% e depois submetidas a 2 banhos de xilol para diafanização. As lâminas foram montadas com lamínula utilizando resina Entellan (Sigma Co-USA), identificadas e visualizadas em microscópio óptico (Zeiss).

A positividade foi considerada pela formação de cor marrom-acastanhada na área citoplasmática (Figura 1). Como controle negativo foi omitido o anticorpo primário.

Figura 1. Imuno-histoquímica.



Fotomicrografia de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (A) e do tipo difuso (B) corados por Hematoxilina-Eosina (H/E). Imunohistoquímica de Smac/DIABLO em adenocarcinoma gástrico (C); Smac/DIABLO em mucosa gástrica não tumoral (D). Aumento de 400x.

Smac/DIABLO foi analisado semiquantitativamente utilizando o sistema de escore, baseado na intensidade da reação e extensão da coloração. A intensidade da

reação foi classificada em escala de 0 a 3 (0=negativo; 1=fraco; 2=moderado; 3=forte). A extensão da área positiva foi classificada em escala de 0 a 3 (0=0 a 10% das células neoplásicas coradas; 1=11 até 25%; 2=26 até 50%; e 3 acima de 51% das células neoplásicas coradas). O escore para cada reação foi realizado multiplicando-se a intensidade da coloração pela extensão da coloração. As reações com escore maior ou igual a 4 foram consideradas positivas, e com escore menor que 4 negativas.

Análise estatística

As comparações entre o tecido tumoral e normal, número de células positivas e negativas para as variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste T-Student pareado e para as comparações qualitativas, foi utilizado o teste de McNemar. A associação entre os achados imuno-histoquímicos tumoral e de mucosa gástrica não tumoral foi avaliada pela correlação de Pearson. Os achados imuno-histoquímicos foram associados às variáveis clínicas dos pacientes e morfológicas do tumor pela Análise de Variância (ANOVA) considerando a idade como covariável. A curva de sobrevivência e os achados imuno-histoquímicos foram calculados pelo método de Kaplan-Meier. As diferenças foram consideradas positivas quando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Neste estudo, 59.6% dos pacientes eram do sexo masculino e 78.1% apresentaram idade superior a 50 anos. Margem cirúrgica comprometida foi encontrada em 10.3% das amostras tumorais e linfonodos infiltrados por células tumorais em 72.4% das amostras. Oitenta e cinco por cento dos pacientes apresentou doença avançada e 13 pacientes estavam vivos durante o período de estudo. A maior parte dos pacientes do sexo masculino apresentou idade entre 50 e 69 anos, e as mulheres idade entre 60 e 79 anos (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis clínicas dos pacientes com adenocarcinoma gástrico.

	Parâmetros Clínicos	n (%)
Sexo	Masculino	51 (58.6%)
	Feminino	36 (41.4%)
Idade	≤50 anos	19 (21.8%)
	>50 anos	68 (78.1%)
Margem Cirúrgica	Livre	78 (89.7%)
	Comprometida	9 (10.3%)
Linfonodos Comprometidos	Metástase	63 (72.4%)
	Livre	24 (27.6%)
Estadiamento clínico	I	13 (14.9%)
	II	15 (17.2%)
	III	58 (66.7%)
	IV	1 (1.1%)
Seguimento	Vivo com doença	13 (14.9%)
	Morte por câncer	64 (73.6%)
	Perdido seguimento	10 (11.5%)

n=número de casos.

Em relação ao tipo histológico, o adenocarcinoma do tipo intestinal foi mais freqüente entre os homens com idade entre 50 e 69 anos, e o tipo difuso em mulheres entre 40 e 49 anos.

Adenocarcinoma do tipo intestinal foi observado em 67.8% dos casos, com 43.7% localizados no antro de. Houve predomínio de tumores com tamanho maior que 3 centímetros (75.9%), e mais de 70% dos pacientes morreu após 24 meses do diagnóstico (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis morfológicas do adenocarcinoma gástrico e tempo de seguimento dos pacientes.

Adenocarcinoma gástrico	Parâmetros Morfológicos	n (%)
	Intestinal	59 (67.8%)
	Difuso	28 (32.2%)
Localização	Cárdia	29 (33.3%)
	Antro	38 (43.7%)
	Corpo	20 (23%)
Tamanho	≤3 cm	21 (24.1%)
	>3 cm	66 (75.9%)
Tempo de Seguimento		n (%)
	0,1 – 6 meses	21 (26.9%)
	6,1 – 12 meses	10 (12.8 %)
	12,1 – 24 meses	22 (28.2%)
	24,1 – 48 meses	12 (15.4%)
	> 48 meses	13 (16.7%)
	Sem seguimento	9 (10.34%)

n=número de casos.

A Tabela 3 apresenta a freqüência de marcação de Smac/DIABLO nos ATM de adenocarcinoma gástrico (45,6%) e mucosa gástrica não tumoral (46,8%).

Tabela 3. Freqüência de expressão de Smac/DIABLO, AIF, citocromo c, e caspase-3 clivada em amostras teciduais de adenocarcinoma gástrica e mucosa gástrica não tumoral.

	n	Negativo n (%)	Positivo n (%)
Adenocarcinoma gástrico			
Smac/DIABLO	81	44 (54.4%)	37 (45.6%)
Mucosa não tumoral			
Smac/DIABLO	79	42 (53.2%)	37 (46.8%)

A expressão de Smac/DIABLO foi associada a tumores localizados no antro (p=0.049) (Tabela 4).

Tabela 4. Expressão de Smac/DIABLO em amostras teciduais de adenocarcinomas gástrica e mucosa gástrica não tumoral associada aos dados clínicos dos pacientes e morfológicos do tumor.

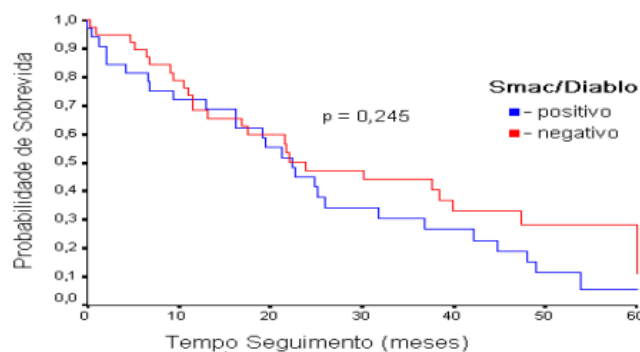
	Adenocarcinoma gástrico			Mucosa gástrica não tumoral		
	Média (dp)	n	p	Média (dp)	n	p
Sexo						
Masculino	4.2 (3.02)	48	0.676	3.7 (3.30)	47	0.959
Feminino	4.0 (3.41)	33		3.8 (3.58)	32	
Estágio clínico						
I	4.4 (3.73)	12	0.740	5.1 (3.65)	12	0.162
II	4.3 (3.67)	14		3.7 (3.47)	14	
III	4.0 (2.96)	55		3.5 (3.30)	52	
IV		6			9	
Adenocarcinoma						
Difuso	3.6 (3.55)	24	0.234	4.3 (3.55)	25	0.432
Intestinal	4.4 (3.00)	57		3.5 (3.32)	54	
Localização						
Cárdia	4.0 (3.19)	25	0.049*	3.7 (3.37)	27	0.777
Antro	3.4 (2.79)	36		3.6 (3.45)	36	
Corpo	5.7 (3.36)	20		4.3 (3.46)	16	
Tamanho do Tumor						
≤3 cm	3.5 (3.09)	20	0.592	3.0 (2.57)	19	0.153
>3 cm	4.3 (3.19)	61		4.0 (3.60)	60	
Cirurgia						
Total	4.4 (3.09)	39	0.963	3.4 (3.60)	36	0.449
Parcial	3.9 (3.25)	42		4.0 (3.23)	43	
Margem Cirúrgica						
Livre	4.3 (3.20)	73	0.592	3.9 (3.39)	70	0.321
Comprometida	3.0 (2.78)	8		2.3 (3.28)	9	
Linfonodos						
Metástase	4.1 (3.01)	58	0.753	3.9 (3.46)	57	0.209
Comprometidos	4.1 (3.60)	23		3.4 (3.26)	22	

* p<0.05 teste de McNemar.

Algumas amostras sofreram perda tecidual após o processo de recuperação antigênica, por isso em algumas lâminas houve discrepância do número de casos analisados (Tabela 4) em relação ao número total de pacientes (n=87).

A figura 2 apresenta a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes com adenocarcinoma gástrico, onde não foi verificada nenhuma associação entre a sobrevivência dos pacientes e a expressão de Smac/DIABLO.

Figura 2. Curva de sobrevivência de pacientes com adenocarcinoma gástrico.



Curva de Sobrevivência Global de Kaplan-Meier dos pacientes com adenocarcinomas gástrico em relação a Smac/DIABLO.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi observada uma associação entre a expressão de Smac/DIABLO com a localização do câncer gástrico no antro e não foi verificada nenhuma associação entre Smac/DIABLO a sobrevivência dos pacientes.

O carcinoma gástrico é a segunda maior causa de óbitos relacionados ao câncer no mundo (PADMAVATHY, SIDDARAJU, SISTLA, 2011; CORRAL et al., 2015; WU, LIN, 2015) e no Brasil é o quarto câncer mais prevalente no sexo masculino e o sexto no sexo feminino. O prognóstico e tratamento do carcinoma gástrico normalmente é definido pela sua localização, estadiamento e linfonodos acometidos (MA et al., 2016).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico incluem a infecção pelo *Helicobacter pylori* (WESSLER et al., 2017), idade avançada, em especial em pacientes do sexo masculino (PĂDURARU et al., 2016), dieta rica em sal e pobre em fibras vegetais (ZHAO, Yin, ZHAO, 2017), tabagismo (LI et al., 2014), gastrite crônica atrófica (NA et al., 2017), metaplasia intestinal da mucosa gástrica (MALIK et al., 2017), pólipos adenomatosos gástricos (BROSENS et al., 2016), gastrite hipertrófica gigante (AL-TAIE, et al., 2005), e polipose adenomatosa familiar (BOLAND, YURGELUN, 2017).

Até o momento não existem marcadores tumorais de prognóstico e/ou conduta terapêutica bem estabelecidos para o tratamento do câncer gástrico. A única possibilidade de melhora significativa na sobrevida dos pacientes ocorre quando o câncer é diagnosticado em fases iniciais (TAHARA et al., 2017). Uma vez que pacientes com câncer gástrico em estágios iniciais são assintomáticos, o diagnóstico é realizado tardiamente na grande maioria dos casos (PERNOT et al., 2017). Assim, a maior possibilidade de cura destes pacientes reside na ressecção tumoral em casos onde não ocorre disseminação para órgãos distantes (LIU et al., 2016).

O tipo histológico mais comum observado em pacientes com câncer gástrico é o adenocarcinoma (mais de 90% dos casos), seguido do linfoma, sarcomas, tumores estromais gastrointestinais e tumores neuroendócrinos (MEHMEDAGIC et al., 2016). O adenocarcinoma gástrico apresenta dois tipos morfológicos, denominados intestinal e difuso. O tipo intestinal normalmente surge a partir de células mucosas gástricas que sofreram metaplasia intestinal (LANGNER, 2017), ao passo que o tipo difuso tem origem a partir de células mucosas gástricas nativas (CHANG et al., 2016). Em nosso estudo o adenocarcinoma gástrico esteve presente em 58.6% dos pacientes do sexo masculino, e a idade de acometimento foi de 29 a 85 anos, com média de 62 anos, cuja prevalência é descrita com maior frequência em pacientes do sexo masculino e com idade mais avançada (CORRAL et al., 2015; PĂDURARU et al., 2016).

O câncer gástrico tem seu prognóstico e tratamento definidos pela localização, estadiamento e número de linfonodos acometidos. Sua localização envolve ou não a junção esofagogástrica, que em alguns casos pode invadir o duodeno. Mais de 50% dos pacientes com câncer gástrico inicial podem ser curados quando o câncer é totalmente removido cirurgicamente (WANG et al., 2010). Verificamos que 46% dos pacientes foram submetidos a gastrectomia total, 54% a gastrectomia parcial e 90% apresentaram margem livre de células cancerosas. Setenta e dois, ponto quatro por cento (72.4%) dos pacientes apresentaram linfonodos comprometidos, o que dificulta o sucesso terapêutico e aumenta a chance de recidiva pós-tratamento. Uma parcela significativa de pacientes com linfonodos comprometidos por células cancerosas e que sofreram gastrectomia total (MA et al., 2016), apresentam sobrevida reduzida (XIAO et al., 2011), fato verificado nos pacientes em nosso estudo, onde 85% deles apresentaram estágio clínico avançado, e no final do estudo três quartos dos pacientes morreu pela evolução da doença.

Conforme a classificação histológica de Lauren (MA et al., 2016), verificamos em nossos pacientes que 32.2% apresentaram adenocarcinoma tipo difuso e 67.8% do tipo intestinal. LAZAR e colaboradores descreveram uma maior porcentagem de pacientes acometidos pelo tipo intestinal (62.3%) (LAZAR et al., 2009), embora outros autores descrevam uma menor prevalência deste tipo histológico (ZHENG et al., 2016). O adenocarcinoma gástrico do tipo difuso é mais frequente em mulheres e jovens,

apresentando pior prognóstico. Já o tipo intestinal acomete com maior frequência indivíduos do sexo masculino e é menos agressivo que o tipo difuso (HASS et al., 2011; CHEN et al., 2013).

Investigamos potenciais marcadores de prognóstico e alvos terapêuticos através da avaliação imuno-histoquímica de moléculas envolvidas com o processo de apoptose. Constatamos que a marcação para Smac/DIABLO esteve presente em 45.6% dos adenocarcinomas gástricos e 46.8% dos tecidos não tumorais adjacentes. Smac/DIABLO não esteve associada as variáveis clínicas e mucosa gástrica não tumoral, porém esteve associada em tumores com localização no antro. Segundo a curva de sobrevida Kaplan-Meier e expressão de Smac/DIABLO, 50% dos pacientes foram a óbito em 25 meses.

Smac/DIABLO é uma proteína pró-apoptótica liberada juntamente com o citocromo c da mitocôndria para o citosol ativando a caspase 3, que atua como um inibidor da proteína inibidora de apoptose (IAP). Alta expressão de Smac/DIABLO foi observada em até 70% das amostras de adenocarcinoma gástrico (ZHAO et al., 2009), e diferentes tipos de câncer humanos não expressam Smac/DIABLO, sugerindo que a falta da expressão desta proteína nas células cancerosas possa inibir a apoptose (YOO et al., 2003).

Os carcinomas gástricos apresentam uma expressão maior de Smac/DIABLO em comparação com a mucosa gástrica não-neoplásica sem apresentarem correlação clínica estatisticamente significativa (DA SILVA et al., 2013), e a expressão de Smac/DIABLO avaliada por Real-Time PCR esteve correlacionada com estágios avançados e achados clínico patológicos de carcinoma gástrico (ZHAO, DENG, WANG, 2009).

O aumento da expressão de Smac/DIABLO por imuno-histoquímica em adenocarcinomas gástricos e colorretais não apresenta correlação com parâmetros clínicos dos pacientes ou morfológicos do câncer (SHINTANI et al., 2014).

A survivina é um membro da família de proteínas inibidoras da apoptose antagonizada por Smac/DIABLO. O aumento da expressão de Smac/DIABLO, survivina e da proteína 1 de cadeia leve associada a microtúbulos (LC3), um marcador de autofagia, está correlacionada com o surgimento do carcinoma colorretal, mas não do carcinoma gástrico (SHINTANI et al., 2014). Outro trabalho relata a importância da proteína Smac/DIABLO e da proteína inibidora da apoptose Livin/BIRC7 no controle da progressão do carcinoma gástrico, onde a expressão e a correlação de Livin/BIRC7 e Smac/DIABLO variam conforme o tipo histológico e estágio do câncer. O aumento da expressão de Livin/BIRC7 está correlacionada com um maior grau de indiferenciação celular e surgimento de metástases (ZHAO, DENG, WANG, 2009).

CONCLUSÃO

Foi verificada uma associação entre a expressão de Smac/DIABLO com a localização do adenocarcinoma gástrico tipo difuso no antro, sugerimos que a expressão desta proteína e sua localização no antro pode ser utilizado como fator prognóstico.

REFERÊNCIAS

- ADITI R, et al. HER2 expression in gastric adenocarcinoma. A study in a tertiary care center in South India. *Indian J Surg Oncol*. v. 7, n. 1, p. 18-24, 2016.
- AL-TAIE OH, et al. Giant fold gastritis with consecutive gastric carcinoma in a patient with peutz-jeghers syndrome. *Z Gastroenterol*. v.43, n.7, p.653-656, 2005.
- BOLAND CR, YURGELUN MB. Historical perspective on familial gastric cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. v.3, n.2, p.192-200, 2017.
- BROSENS LA, et al. Syndromic gastric polyps: At the crossroads of genetic and environmental cancer predisposition. *Adv Exp Med Biol*. v.908, 2016; p.347-369, 2016.

- CHANG KK, et al. Increased RhoA activity predicts worse overall survival in patients undergoing surgical resection for Lauren diffuse-type gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. v.23, n.13, p.4238-4246, 2016.
- CHEN WY, et al. Factors that affect life expectancy of patients with gastric adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. v.11, n.12, p.1595-600, 2013.
- CORRAL JE, et al. The descriptive epidemiology of gastric cancer in Central America and comparison with United States Hispanic populations. *J Gastrointest Cancer*. v. 46, n. 1, p. 21-28, 2015.
- DA SILVA LC, et al. Immunoexpression of DIABLO, AIF and cytochrome c in gastric adenocarcinoma assessed by tissue microarray. *Anticancer Res*. v.33, n.2, p.647-653, 2013.
- ELEFTHERIADIS T, et al. Cytochrome c as a potentially clinical useful marker of mitochondrial and cellular damage. *Front Immunol.*, v. 7, p. 279, 2016.
- HASS HG, et al. Signet ring cell carcinoma of the stomach is significantly associated with poor prognosis and diffuse gastric cancer (Lauren's): single-center experience of 160 cases. *Onkologie*. v.34, n.12, p.682-686, 2011.
- KONG GM, et al. Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway. *World J Gastroenterol*. v. 22, n. 11, p. 3186-3195, 2016.
- LANGNER C. Precursors of gastric cancer: Dysplasia and adenoma. *Pathologe*. v.38, n.2, p.67-74, 2017.
- LAZAR D, et al. Gastric cancer: correlation between clinic pathological factors and survival of patients. *Rom J Morphol Embryol*. v.50, n.2, p.185-194, 2009.
- LI LF, et al. Cigarette smoking and gastrointestinal diseases: the causal relationship and underlying molecular mechanisms (review). *Int J Mol Med*. v.34, n.2, p.372-380, 2014.
- LIU D, et al. The patterns and timing of recurrence after curative resection for gastric cancer in China. *World J Surg Oncol*. v.14, n.1, p.305, 2016.
- MA J, et al. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. *Oncol Lett*. v.11, n.5, p.2959-2964, 2016.
- MALIK TH, et al. Gastric intestinal metaplasia: An intermediate precancerous lesion in the cascade of gastric carcinogenesis. *J Coll Physicians Surg Pak*. v.27, n.3, p.166-172, 2017.
- MARTINEZ-RUIZ G, et al. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res*. v. 27, n. 48, 2008. doi:10.1186/1756-9966-27-48.
- MEHMEDAGIC I, et al. Influence of prognostic factors for recurrence of adenocarcinoma of the stomach. *Med Arch*. v.70, n.6, p.441-444, 2016.
- NA HK, et al. Atrophic and metaplastic progression in the background mucosa of patients with gastric adenoma. *PLoS One*. v.12, n.1, p.e0169456, 2017.
- PADMAVATHY F, SIDDARAJU N, SISTLA SC. Distinction of intestinal and diffuse types of gastric adenocarcinoma on brush cytology. *Acta Cytol*. v. 55, n. 2, p. 187-192, 2011.
- PĂDURARU DN, et al. Considerations on risk factors correlated to the occurrence of gastric stump cancer. *J Med Life*. v.9, n.2, p.130-136, 2016.

- PERNOT S, et al. Dynamic evaluation of circulating tumor cells in patients with advanced gastric and oesogastric junction adenocarcinoma: Prognostic value and early assessment of therapeutic effects. *Eur J Cancer*. v.79, p.15-22, 2017.
- RYUN PARK S. Management of gastric cancer: East vs West. *Curr Probl Cancer*. v. 39, n. 6, p. 315-341, 2015.
- SHINTANI M, et al. Smac/DIABLO expression in human gastrointestinal carcinoma: Association with clinicopathological parameters and survivin expression. *Oncol Lett*. v.8, n.6, p.2581-2586, 2014.
- SUSMAN S, et al. The Lauren classification highlights the role of epithelial to mesenchymal transition in gastric carcinogenesis: an immunohistochemistry study of the STAT3 and adhesion molecules expression. *J Gastrointestin Liver Dis*. v. 24, n. 1, p. 77-83, 2015.
- TAHARA T, et al. Evaluations of primary lesions by endoscopy clearly distinguishes prognosis in patients with gastric cancer who receive chemotherapy. *PLoS One*. v.12, n.3, p.e0173663, 2017.
- WANG W, et al. Prognosis of 980 patients with gastric cancer after surgical resection. *Chin J Cancer*. v.29, n.11, p.923-930, 2010.
- WESSLER S, et al. From inflammation to gastric cancer the importance of Hedgehog/GLI signaling in *Helicobacter pylori*-induced chronic inflammatory and neoplastic diseases. *Cell Commun Signal*. v.15, n.1, p.15, 2017.
- WU CY, LIN JT. The changing epidemiology of Asian digestive cancers: from etiologies and incidences to preventive strategies. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. v. 29, n. 6, p. 843-853, 2015.
- XIAO LB, et al. Superiority of metastatic lymph node ratio to the 7th edition UICC N staging in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. v.17, n.46, p.5123-5130, 2011.
- YOO NJ, et al. Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. *APMIS*. v.111, n.3, p.382-388, 2003.
- ZHAO Y, DENG X, WANG Q. Expression and clinical significance of apoptosis associated genes Livin and Smac/DIABLO in human gastric carcinoma. *Ai Zheng*. v.28, n.6, p.593-601, 2009.
- ZHAO Z, YIN Z, ZHAO Q. Red and processed meat consumption and gastric cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. v.8, n.18, p.30563-30575, 2017.
- ZHENG R, et al. National estimates of cancer prevalence in China, 2011. *Cancer Lett*. v.370, n.1, p.33-38, 2016.