

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ESTUDO PRELIMINAR DA EXPRESSÃO DE
MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER DE
ESTÔMAGO**

Raquel Carvalho Montenegro

Fortaleza-CE

2003

Raquel Carvalho Montenegro

**ESTUDO PRELIMINAR DA EXPRESSÃO DE MARCADORES
MOLECULARES NO CÂNCER DE ESTÔMAGO**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador:

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Fortaleza

2003

Raquel Carvalho Montenegro

**ESTUDO PRELIMINAR DA EXPRESSÃO DE MARCADORES
MOLECULARES NO CÂNCER DE ESTÔMAGO**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Data de Aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Orientador

Prof^a Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst

Departamento de Patologia e Medicina Legal

Prof Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro

Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC

DEDICATÓRIA

*Dedico essa dissertação aos meus pais,
Ariane e Luis Alberto, por todo amor,
apoio, incentivo e dedicação em
todas as etapas importantes da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

*A todos que, de alguma
forma, contribuíram realização
deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Minha Família, pelo carinho, apoio em cada situação difícil da minha vida, e pelo entusiasmo em cada conquista.

Dr. Manoel Odorico de Moraes, meu orientador, por ter me acolhido no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) como bolsista e depois como aluna de pós-graduação, por sempre ter acreditado nos meus potenciais e estimulado em mim a paixão pela ciência.

Dra. Silvia Helena B. Rabenhorst, por colaborar diretamente com a realização deste trabalho e pelo incentivo à Biologia Molecular.

Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro, por ter aceitado participar da banca de mestrado e pela sua contribuição ao trabalho.

Dra. Márcia Valéria Pitombeira, por ter auxiliado várias vezes no esclarecimento de dúvidas sobre as biópsias estudadas neste trabalho.

Dr. Cássio C. Santos, chefe do serviço de Abdome do **Hospital do Câncer** por ceder as amostras tumorais, tanto do ICC como do **HUWC**.

Dra. Letícia Veras Costa Lotufo, amiga, conselheira e professora, por todos os momentos de dificuldades e por sempre me apoiar e incentivar na pesquisa.

Dra. Cláudia Pessoa, pela amizade, confiança, e por sempre acreditar no meu trabalho.

Professores do Curso de Pós-Graduação, por terem colaborado nessa caminhada infindável pela busca de conhecimentos.

Aos diretores do Hospital do Câncer do Ceará e do Hospital Universitário Walter Cantídeo.

Ao meu caça tumor, **Sérgio Costa Fortier**, meu amigo e bolsista, pela amizade e pelas coletas dos tumores.

Amigos que fazem parte do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), **Lícia, Marcelle, Rômulo, João Paulo, Fernando Meton, Denissa, Diego, Bruno, Dr. Ferdinando, Fátima, Silvana, Fábria, David, Evanir e os demais bolsistas** pelo companheirismo durante todos esses anos de convivência.

Amigos que fazem parte do Laboratório de Genética Molecular (LABGEM), **Eunice, Adriana, Glauber, Mario Henrique, Milena, Ary, Daniel, Bronner, Lia e os demais bolsistas** pelo companheirismo.

Aos meus amigos Christianne, Monique, Carol e Adriano pelos momentos ausentes.

Aos **amigos da Pós-Graduação** e a todos que fazem o Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC.

As amigas **Marne Vasconcellos e Paula Christine** pelo carinho especial que sempre tiveram comigo e pela ajuda e incentivo na minha dissertação.

A todos os pacientes que contribuíram para esse estudo.

Ao **CNPq**, por terem colaborado financeiramente no desenvolvimento da pesquisa.

ESTUDO PRELIMINAR DA EXPRESSÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER DE ESTÔMAGO. Raquel Carvalho Montenegro. Orientador: Manoel Odorico de Moraes Filho. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2003.

Na busca de um melhor entendimento da biologia dos tumores, marcadores moleculares relacionados à proliferação, resistência e apoptose têm sido intensamente pesquisados nos diferentes tipos de câncer. Estes marcadores podem auxiliar no estudo de alvos terapêuticos mais específicos para cada tipo de tumor. O câncer de estômago é a segunda causa de óbito mais observado no mundo. No Brasil, este tumor está entre as cinco localizações primárias mais comuns de óbitos por câncer, sendo os adenocarcinomas responsáveis por 95% dos casos. Dessa forma, foi avaliada a expressão dos marcadores KI-67, PCNA, p53, bcl-2 e c-myc de forma independente e combinada em adenocarcinomas gástricos. Também foi avaliado qual dos marcadores, KI-67 ou PCNA, era mais indicado para acessar a proliferação celular. Além disso, foi implantada a técnica de extração de DNA de tecido tumoral com CTAB e análise molecular pelo SSCP do gene p53, sendo os resultados positivos comparados com os resultados da imunohistoquímica. Os tumores foram coletados em cirurgia, processados e classificados histopatologicamente. Os marcadores foram detectados pelo método de imunohistoquímica SABP. Foi realizada a extração de DNA pelo método do CTAB, sendo os éxons 5, 7 e 8/9 do gene p53 analisados por SSCP. Algumas amostras foram obtidas de arquivo de biopsia. A faixa etária dos pacientes encontrava-se entre 61 e 70 anos de idade, com 48,1% dos tumores do tipo intestinal, 40,7% difusos e 11,2% mistos e com 50% localizados no sítio proximal. Em relação ao estadiamento, 41,4% dos tumores apresentavam-se no grau baixo (I – IIIA), 44,8% no alto risco (IIIB – IV) e 13,8% sem estadiamento. De acordo com os achados imunohistoquímicos, os resultados sugerem que o marcador mais indicado para estimar a proliferação celular nos adenocarcinomas gástricos é o KI-67. De forma independente os tumores apresentaram positividade em 89,3% para KI-67, 62,5% para PCNA, 50% para p53, 60,7% para bcl-2 e 66,7% e para c-myc. De acordo com o estadiamento, a diferença foi significativa apenas para p53 ($p = 0,02$), com positividade de 66,7% nos tumores de baixo risco (I – IIIA) e 16,7% nos de alto risco. Quando avaliadas de forma combinada, as associações significativas foram entre KI-67+/p53- ($p=0,012$) nos tumores de alto risco (66,67%) e c-myc+/p53- ($p=0,02$) também nos tumores de alto risco (63,64%). A técnica aplicada para a extração do DNA do tecido tumoral foi satisfatória. Para o SSCP, cinco pacientes apresentaram mutação para o éxon 5 (3) e éxon 7 (2). Com isso, concluímos que o marcador mais indicado para acessar a proliferação é o KI-67 e que existem duas vias de ativação da proliferação nos adenocarcinomas gástricos: uma dependente de p53 e outra independente de p53.

ESTUDO PRELIMINAR DA EXPRESSÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER DE ESTÔMAGO. Raquel Carvalho Montenegro. Supervisor: Manoel Odorico de Moraes Filho. Master's Dissertation. Post-Graduate program in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2003.

In search for a better understanding of the biology of tumors, molecular markers related to proliferation, resistance and apoptosis have been intensively studied in the different types of cancer. These markers can help on the elucidation of more specific therapeutic targets for the treatment of various tumors. It was observed that stomach cancer is the second most frequent cause of death in the world. In Brazil, this tumor is among the five major causes of death by cancer and the adenocarcinomas are held responsible for about 95% of all cases. For that matter, the expression of KI-67, PCNA, p53, bcl-2 and c-myc were evaluated independently and in a combined form in stomach adenocarcinomas. Thus, KI-67 and PCNA were confronted in order to determine which one would pose as a better cellular proliferation marker. Finally, a DNA extraction technique using CTAB was implemented on tumor tissue as well as the molecular analysis of the p53 gene by SSCP. The positive results were compared with those obtained by the immunohistochemistry analysis. The tumors were collected in surgical procedure, processed and classified histopathologically. The markers were detected by the immunohistochemical method SABP. The DNA was extracted by the CTAB method and the exons 5, 7 and 8/9 of the p53 gene analyzed by SABP. Some of the samples were obtained from biopsy archives. The age range of the patients was between 61 and 70 years, with 48,1% of the tumors presenting an intestinal origin, 40,7% were diffuse and the other 11,2% were mixed. According to the location, 50% of the tumors were found to be proximal. 41,1% of the tumors were found to be in a low stage (I – IIIA), 44,8% in a high stage (IIIB – IV) and 13,8% were not staged. The immunohistochemical results indicated that KI-67 is the best marker to estimate cellular proliferation in stomach adenocarcinomas. In an independent manner, the tumors showed an 89,3% positivity for KI-67, 62,5% for PCNA, 50% for p53, 60,7% for bcl-2 e 66,7% for c-myc. According to the staging, the difference was significant only to p53 ($p = 0,02$), with a 66,7% positivity to the tumors in low stage and 16,7% for the ones on a high stage. When evaluated in a combined form, the associations of KI-67+/p53- ($p=0,012$) (66,67%) and c-myc+/p53- ($p=0,02$) (63,64%) both for the high stage tumors, were found to be significant. The DNA extraction technique applied to the tumor tissue was found to be satisfactory. For the SSCP analyses, five patients had mutation on the exon 5 (3) and on the exon 7 (2). Based on that, we may conclude that KI-67 is the best marker to assess the proliferation of the stomach adenocarcinomas and that there are two proliferation activation pathways: one being dependent and the other independent of the p53 gene.

SUMÁRIO

RESUMO	xxx
ABSTRACT	xxxii
ABREVIACÕES	xxviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CÂNCER	2
1.1.1 Histórico	2
1.1.2 Incidência do Câncer	3
1.2 CÂNCER GÁSTRICO	4
1.3 MARCADORES MOLECULARES	10
1.3.1 Proliferação Celular	11
1.3.2 p53	13
1.3.3 A Família Bcl-2	18
1.3.4 c-myc	22
1.4 A BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA NA FARMACOLOGIA	27
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 MATERIAIS E SOLUÇÕES	33
3.1.1 Coleta das amostras no centro cirúrgico	33
3.1.2 Imunohistoquímica	33
3.1.3 Extração de DNA	34
3.1.4 Eletroforese em gel de agarose	35
3.1.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida:	35
3.2 AMOSTRA SELECIONADA	36
3.3 COLETA DOS TUMORES	36
3.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO MATERIAL	37

3.4.1 Estadiamento de acordo com o Instituto Nacional do Câncer	37
3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA	38
3.5.1 Preparação das lâminas para imunohistoquímica	38
3.5.2 Protocolo	39
3.6 ANÁLISE DA MARCAÇÃO CELULAR PELA IMUNOHISTOQUÍMICA	40
3.6.1 Contagem de Ki-67 e PCNA	40
3.6.2 Análise do padrão e intensidade de marcação	41
3.6.3 Análise dos dados	41
3.7 EXTRAÇÃO DE DNA DOS TECIDOS	41
3.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	43
3.9 SSCP – SINGLE-STRANDED CONFORMATIONAL POLYMORPHISM	43
3.9.1 Condições do PCR	43
4 RESULTADOS	45
4.1 PACIENTES E SUAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	46
4.2 DETECÇÃO DOS MARCADORES POR IMUNOHISTOQUÍMICA	51
4.2.1 ASPECTOS GERAIS	51
4.2.2 MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67 E PCNA	53
4.2.2.1 Comparação da positividade na amostra total	53
4.2.2.2 Contagem das células	54
4.2.2.3 Detecção dos marcadores nos diferentes riscos histopatológicos	56
4.2.2.4 Padrão e intensidade de marcação	58
4.2.3 DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS p53, bcl-2 e c-myc NOS DIFERENTES ESTÁGIOS TUMORAIS	61
4.2.3.1 Proteína p53	61
4.2.3.2 Proteína bcl-2	62
4.2.3.3 c-myc	63
4.2.4 ANÁLISE COMBINATÓRIA DO p53 COM OS DEMAIS MARCADORES	64
4.2.4.1 KI-67 e p53	64
4.2.4.2 PCNA e p53	65

4.2.4.3 bcl-2 e p53	66
4.2.4.4 c-myc e p53	67
4.2.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE p53, bcl-2 e c-myc NOS TUMORES DE ALTO E BAIXO RISCO	68
4.3 ANÁLISE MOLECULAR	69
4.3.1 Extração de DNA e PCR	69
4.3.2 SSCP do gene p53	70
4.3.3. COMPARAÇÃO ENTRE A IMUNOHISTOQUÍMICA E OS TUMORES MUTADOS NO SSCP	72
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE ABREVIATURAS

cm	Centímetro
L	Litro
μL	Microlitro
mg	Miligramma
mL	Militros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molar
pb	Pares de base
%	Porcentagem
q.s.p	Quantidade de suficiente para
rpm	Rotações por minutos
V	Volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Localização do Estômago	4
Figura 02	Seqüência de Eventos no desenvolvimento do Adenocarcinoma gástrico	8
Figura 03	Cortes histológicos representados pelo padrão intestinal (a) e pelo padrão difuso (b).	10
Figura 04	Expressão do Ki-67 e PCNA na progressão do ciclo celular	12
Figura 05	Estrutura do p53	14
Figura 06	Resposta ao dano no DNA via <i>p53</i>	16
Figura 07	Estrutura do Bcl-2 e Bax	19
Figura 08	Estrutura do <i>c-myc</i>	22
Figura 09	Funções do <i>c-myc</i>	25
Figura 10	Ativação da Apoptose via <i>c-myc</i>	26
Figura 11	Painel dos marcadores KI-67 1:60 (a), PCNA 1:20 (b), p53 1:80 (c), bcl-2 1:80 (d) e <i>c-myc</i> 1:100 (e) por imunohistoquímica.	51
Figura 12	Painel com os padrões de marcação homogêneo, granular e nucleolar, por IHC, do KI-67 e PCNA nos adenocarcinomas gástricos.	58
Figura 13	Gel de agarose com DNA genômico tumoral	69
Figura 14	Gel de agarose do PCR do gene p53	69
Figura 15	GeneGel para análise do SSCP do éxon 5 do gene p53.	70
Figura 16	GeneGel para análise do éxon 7 (a) e 8 (b).	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Localização da marcação da imunohistoquímica dos diferentes marcadores	40
Tabela 02	Padrão de marcação nuclear por IHC dos anticorpos KI-67 e PCNA em adenocarcinomas gástricos de baixo risco (I-III A)	59
Tabela 03	Padrão de marcação nuclear por IHC dos anticorpos KI-67 e PCNA em adenocarcinomas gástricos de alto risco (IIIB – IV).	59
Tabela 04	Intensidade de marcação dos anticorpos KI-67 e PCNA em adenocarcinomas gástricos de baixo risco (I – III A).	60
Tabela 05	Intensidade de marcação dos anticorpos KI-67 e PCNA em adenocarcinomas gástricos de alto risco (IIIB – IV).	60
Tabela 06	Comparação entre as mutações encontradas no SSCP e os achados imunohistoquímicos	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição das amostras de acordo com a faixa etária	46
Gráfico 2	Distribuição das amostras de tumores de acordo com o tipo histológico	47
Gráfico 3	Distribuição dos tumores de acordo com o sítio da doença.	48
Gráfico 4	Distribuição dos tumores de acordo com o comprometimento dos linfonodos regionais.	49
Gráfico 5	Distribuição dos tumores de acordo com metástase à distância	49
Gráfico 6	Distribuição dos tumores de acordo com o estadiamento	50
Gráfico 7	Distribuição dos marcadores nos tumores estudados	52
Gráfico 8	Comparação entre a positividade dos marcadores KI-67 e PCNA nos adenocarcinomas gástricos estudados	53
Gráfico 9	Avaliação do número de células marcadas para o antígeno KI-67.	54
Gráfico 10	Avaliação do número de células marcadas para proteína PCNA.	55
Gráfico 11	Detecção do antígeno KI-67 nos adenocarcinomas gástricos de alto e baixo risco	56
Gráfico 12	Detecção da proteína PCNA nos adenocarcinomas gástricos de alto e baixo risco	57
Gráfico 13	Detecção da proteína p53 nos adenocarcinomas gástricos de alto e baixo risco	61
Gráfico 14	Detecção da proteína bcl-2 nos adenocarcinomas gástricos de alto e baixo risco	62
Gráfico 15	Detecção da proteína c-myc nos adenocarcinomas gástricos de alto e baixo risco	63
Gráfico 16	Associação entre KI-67 e p53 em adenocarcinomas gástricos de alto e baixo risco	64
Gráfico 17	Associação entre PCNA e p53 em adenocarcinomas gástricos de alto e baixo risco	65
Gráfico 18	Associação entre bcl-2 e p53 em adenocarcinomas gástricos de alto e baixo risco	66

- Gráfico 19** Comparação entre p53 e c-myc em adenocarcinomas gástricos de alto e baixo risco 67
- Gráfico 20** Associação do p53, bcl-2 e c-myc em em adenocarcinomas gástricos de alto e baixo risco 68

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

1.1.1 Histórico

Durante a vida do indivíduo, as células normais dividem-se rapidamente até atingir a fase adulta do indivíduo. Passando desta, fase elas só se dividem quando necessitam regenerar algum órgão. Já as células cancerosas diferem das células normais, pelo fato de continuarem a crescer e se dividir, não obedecendo ao controle biológico natural, podendo migrar para outras partes do organismo. Essas células se acumulam e formam o tumor primário que pode comprimir, invadir e até mesmo destruir o tecido normal. Se essas células do tumor se soltarem, elas podem cair na corrente sanguínea ou no sistema linfático chegando a outras áreas do organismo. Nestas áreas, estas podem aportar e formar colônias tumorais, nas quais continuarão a se dividir, levando à metástase (Rabenhorst *et al.*, 1994).

O câncer tem aflingido o homem durante grande parte da sua história. As evidências mais antigas referentes ao câncer foram encontradas em tumores ósseos fossilizados de múmias humanas do antigo Egito. Os restos ósseos revelaram um sugestivo crescimento tumoral ósseo ou destruição craniana óssea vistos nos cânceres de cabeça e pescoço. Já a descrição mais antiga para o câncer foi encontrada no Egito por volta de 1600 a.C.. O papiro de Edwin Smith descrevia oito casos de tumores ou ulcerações da mama as quais eram tratadas com cauterização e relatadas como não tendo tratamento.

A palavra câncer foi inicialmente proposta por um médico grego Hipócrates (460 – 370 a.C.), considerado pai da medicina. Esse usou o termo “carcinos” e “carcinoma” para descrever uma formação não ulcerativa e ulcerativa tumoral. Em grego, esses termos referem-se a caranguejo, parecendo-se bastante com a forma na qual alguns cânceres se apresentam, tendo sua massa tumoral semelhante ao corpo e sua vascularização com as patas (Kardinal & Yabro, 1979).

Atualmente, já se sabe que muitos cânceres resultam de interações entre fatores ambientais e genéticos. Os fatores ambientais podem ser atribuídos a: hidrocarbonetos policíclicos, poluentes (no ar, na água, no trabalho), dieta alimentar, agentes infecciosos, radiações ionizantes, entre outros. Já os fatores genéticos tais como: mutações espontâneas, diferenças herdadas de genes envolvidos com a proliferação celular, apoptose e/ou sistema de reparo do material genético, ou ainda, alterações somáticas na expressão destes genes, entre outros, agem em conjunto com os fatores ambientais e com a susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer (Perera, 1997).

1.1.2 Incidência do Câncer

O Brasil continua a apresentar um quadro sanitário em que se combinam doenças ligadas à pobreza, típicas dos países em desenvolvimento, e doenças crônico-degenerativas, característica de países desenvolvidos.

Na população brasileira, o câncer se apresenta como a terceira causa de morte, precedido apenas pelas mortes ocasionadas por acidentes e pelas doenças cardiovasculares. Para 2003, o Ministério da Saúde, juntamente com o Instituto Nacional de Câncer, estima que, em todo o Brasil, serão registrados 402.190 casos novos e 126.960 óbitos por câncer (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2003).

1.2 CÂNCER GÁSTRICO

O estômago é parte essencial do aparelho digestivo. Está localizado no abdômen e conecta a parte inferior do esôfago à parte mais proximal do intestino delgado (figura 1). Anatomicamente o estômago divide-se em três partes. São elas: o fundo gástrico, que é a porção mais proximal; o corpo, que é a porção intermediária e o antro que é a porção mais distal (Hospital AC Camargo, 2001).

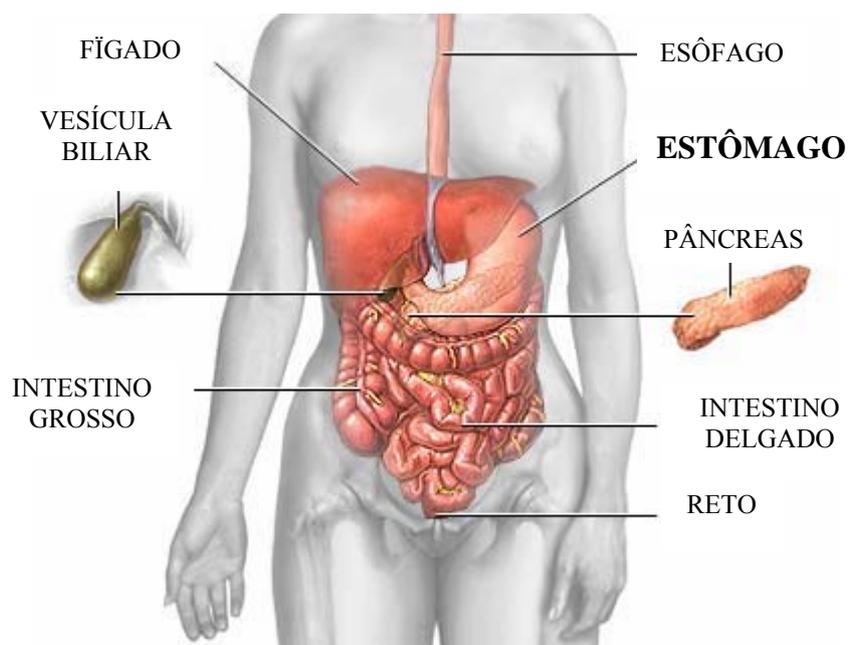


Figura 1 - Localização do Estômago: o estômago se encontra no abdômen e conecta o esôfago ao intestino delgado. Além destes, podemos observar a porção terminal do sistema digestivo, reto, além do fígado, pâncreas e vesícula biliar.

Existem vários tipos de câncer do estômago. Porém, na maioria das vezes (mais de 95%) o tumor se origina na mucosa que é a camada de células que reveste internamente o órgão. Neste caso o tumor é denominado adenocarcinoma. Outros tipos também encontrados são os linfomas gástricos (3%) e os leiomiossarcomas que são

neoplasias que se originam na parede do órgão (Hospital AC Camargo, 2001; INCA, 2002).

Os tumores gástricos tendem a crescer e podem acometer, por continuidade o esôfago ou o intestino delgado. Eles podem também crescer infiltrando progressivamente a parede do órgão até atingir sua camada mais externa (serosa) tendendo a estender-se por contigüidade a órgãos vizinhos como pâncreas e cólon. Células tumorais podem também desprender-se da serosa e, através da cavidade abdominal, envolver o peritônio ou implantar-se em órgãos intra-abdominais como o ovário (tumor de Krukenberg). Metástases do tumor gástrico freqüentemente desenvolvem-se em gânglios linfáticos regionais, através da circulação linfática, ou em órgãos à distância como o fígado e os pulmões, através da circulação sangüínea. Ao tumor que acomete apenas as camadas mucosa e submucosa da parede gástrica dá-se o nome de tumor precoce ou inicial e está associado a um excelente prognóstico (Hospital AC Camargo, 2001).

O câncer do estômago é a segunda causa de óbito mais observado no mundo (Parkin *et al.*, 2001, Pisani, 1999 e Ferlay, 1998). Dados estatísticos revelam um declínio da incidência do câncer gástrico especificamente nos Estados Unidos, Inglaterra e em outros países mais desenvolvidos. A alta mortalidade é registrada atualmente na América Latina, principalmente nos países como o Brasil, Costa Rica, Chile e Colômbia. Porém, o maior número de casos de câncer de estômago ocorre no Japão, onde encontramos 780 casos por 100.000 habitantes. Nessas regiões existe grande consumo de alimentos preservados no sal ou defumados (contendo substâncias como nitrosaminas) que desempenham papel na gênese do câncer gástrico (Hospital AC Camargo, 2001).

No Brasil, este tumor está entre as cinco localizações primárias mais comuns de óbitos por câncer em ambos os sexos. Segundo as estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil, publicadas pelo INCA, para 2003, estão previstos 20.640 novos casos de câncer gástrico. No Ceará, a estimativa do número de novos casos com localização primária no estômago, em homens é de 410 e em mulheres de 230, sendo o número de óbito de 290 e 170 para cada 100.000 habitante, respectivamente. Em ambos os sexos, o câncer de estômago apresenta-se como quarto mais freqüente, mas, quando comparamos o número de óbito este passa para terceiro, ficando atrás apenas do câncer de pulmão, mama e próstata (INCA, 2003).

Cerca de 65% dos pacientes diagnosticados com câncer de estômago têm mais de 50 anos. O pico de incidência se dá em indivíduos, em sua maioria homens, por volta dos 70 anos de idade. Um dos maiores problemas para diagnosticar precocemente o câncer gástrico reside no fato de que no início, a doença é silenciosa e praticamente não leva ao aparecimento de sintomas. Em alguns casos, a dor na região superior do abdômen (epigástrico) pode estar presente mas estes sintomas podem muitas vezes ser confundidos com os de gastrite ou úlcera péptica (American Cancer Society - ACS, 2001; Hospital AC Camargo, 2001; INCA, 2003).

Com a evolução da doença, podem aparecer a perda de apetite e o emagrecimento. Nos estágios mais avançados podem-se encontrar dificuldade na deglutição (disfagia) e vômitos pós-alimentares, sintomas resultantes da obstrução, pelo tumor, da junção esôfago - gástrica e do esvaziamento gástrico, respectivamente. O sangramento do tumor exterioriza-se pelo tubo digestivo. Sangramentos pequenos podem passar despercebidos gerando perda sangüínea crônica nas fezes e freqüentemente causando anemia por deficiência de ferro. Os sangramentos digestivos mais volumosos podem manifestar-se através de vômitos com sangue (hematêmese) ou

sangue digerido presente nas fezes (melena) que se apresenta de coloração escura com aspecto de borra de café (Hospital AC Camargo, 2001).

Vários estudos têm demonstrado que a dieta é um fator preponderante no aparecimento do câncer de estômago. Uma alimentação pobre em vitamina A e C, carnes e peixes, ou ainda com um alto consumo de nitrato, alimentos defumados, enlatados, com corantes ou conservados no sal são fatores de risco para o aparecimento deste tipo de câncer. Outros fatores ambientais como a má conservação dos alimentos e a ingestão de água proveniente de poços que contém uma alta concentração de nitrato também estão relacionados com a incidência do câncer de estômago (ACS, 2001; Hospital AC Camargo, 2001).

Há também fatores de risco de origem patológica. A anemia perniciosa, as lesões pré-cancerosas como a gastrite atrófica e metaplasia intestinal e as infecções gástricas pela bactéria *Helicobacter pylori* podem ter fortes relações com o aparecimento desta neoplasia. No entanto, uma lesão pré-cancerosa leva aproximadamente 20 anos para evoluir para a forma grave. Portadores de anemia perniciosa que se associa a um tipo de gastrite denominada gastrite atrófica apresentam incidência de câncer gástrico de cerca de 10% durante a evolução (Kubba & MacIntyre, 1997; ACS, 2001; Hospital AC Camargo, 2001).

Indivíduos fumantes, que ingerem bebidas alcoólicas ou que já tenham sido submetidos a operações no estômago, também têm maior probabilidade de desenvolver este tipo de câncer. Alguns estudos demonstram que pacientes que se submeteram a cirurgias gástricas prévias principalmente ressecções parciais do órgão apresentam um maior risco de desenvolver neoplasia no coto gástrico remanescente 15 a 20 anos após a

operação (ACS, 2001). A seqüência de eventos ambientais e genéticos estão mostrados na figura 2.

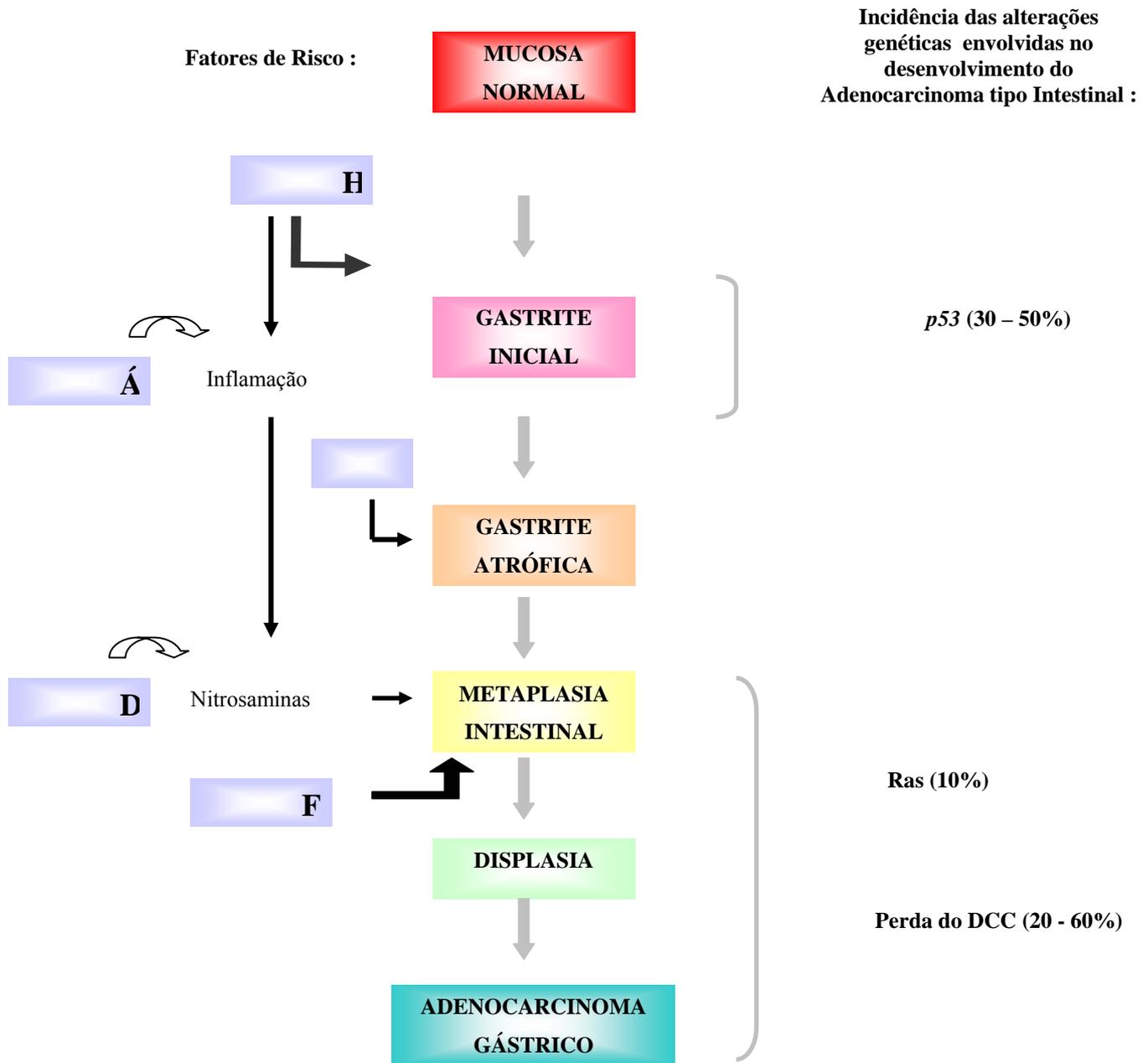


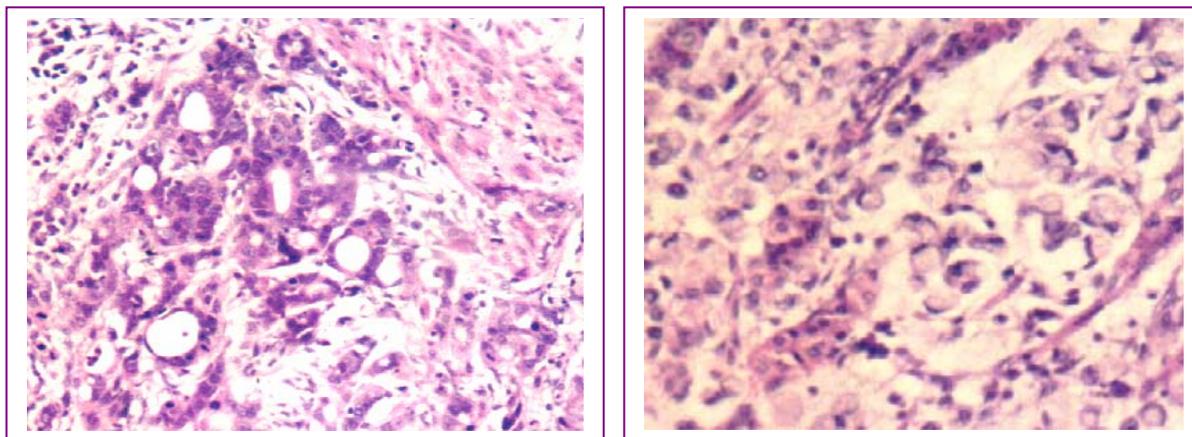
Figura 2 -Seqüência de Eventos no desenvolvimento do Adenocarcinoma Gástrico: a infecção por H. pylori associada a mutação do p53 levam ao desenvolvimento de gastrite atrófica, metaplasia intestinal. Somando-se estes eventos a outras mutações e a outros fatores de risco, surge o adenocarcinoma gástrico.

Além destes fatores, pacientes que apresentam forte história familiar para câncer gástrico apresentam risco de 2 a 4 vezes maior que a população geral de ser acometido pela doença. (Kubba & MacIntyre, 1997; ACS, 2001; Hospital AC Camargo, 2001). Sendo assim, a medida mais eficaz para diminuir os riscos é iniciar uma dieta balanceada precocemente, ainda na infância.

A seqüência de eventos para explicar o desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico foi proposta inicialmente por Pelayo Correa em 1983. A gastrite crônica ativa causada por algum fator ambiental inexplicável progrediria para gastrite atrófica multifocal com perda das células principais e células parietais e o surgimento de uma metaplasia intestinal. O aumento do *turnover* de células no estômago atrófico junto com a hipocloridria resultaria, a partir da perda das células parietais, numa condição gástrica suscetível ao efeito de possíveis carcinógenos gerados pelo alto crescimento de bactérias nitrificantes. Fatores dietéticos, como mencionado anteriormente, também estariam envolvidos no desenvolvimento do adenocarcinoma (Oliveira, 1999).

O prognóstico para este tipo de neoplasia está relacionado com as características do tumor primário, mas a classificação histológica é difícil, visto que este tumor apresenta estruturas variáveis. Conseqüentemente, diferentes classificações baseadas em morfologia foram propostas para os tumores gástricos (Espinoza et al, 1999). Uma das classificações histológicas foi proposta por Lauren (1965) onde o tumor pode ser do tipo Intestinal ou Difuso (Figura 3a e 3b). Já a Organização Mundial de Saúde (WHO) propõe cinco categorias: Tubular, Papilar, Mucinoso, Anel de Signet e Indiferenciado. Já o sítio da doença é classificado como Proximal ou Distal. O prognóstico para pacientes com estágio inicial da doença é importante, mas depende da localização do tumor. De acordo com a classificação de Lauren (1965), a sobrevivência de 5 anos para pacientes diagnosticados com câncer gástrico proximal, em estágio inicial, é em torno

de 10 - 15%. Já os diagnosticados com câncer gástrico na porção distal, a sobrevida de 5 anos é em torno de 50% dos casos (ACS, 2001).



(a)

(b)

Figura 3 – Cortes histológico representados pelo padrão intestinal (a) e pelo padrão difuso (b).

1.3 MARCADORES MOLECULARES

Na busca de um melhor entendimento da biologia molecular dos tumores, marcadores moleculares relacionados com a proliferação, resistência e apoptose têm sido intensamente pesquisados. A observação destes marcadores nos diferentes tipos de câncer pode auxiliar no estudo de alvos terapêuticos mais específicos.

A detecção de genes que estão desregulados por ampliações, deleções cromossômicas ou mutações gênicas, serve como uma importante ferramenta no entendimento da gênese tumoral assim como fatores de prognóstico e tratamento. Um bom exemplo são os tumores de mama, onde a pesquisa de marcadores possibilitou o desenvolvimento de tratamentos específicos como o anticorpo anti-Her 2(Herceptin®) desenvolvido para bloquear os receptores de estrógeno c-erb-b₂, presentes em alguns tecidos neoplásicos mamário.

No câncer gástrico, pouco se sabe sobre os marcadores moleculares envolvidos. A maioria dos estudos limita-se a marcadores de proliferação celular e p53. Neste contexto, marcadores envolvidos na indução da parada da proliferação celular (Ki-67, p53, c-myc, ras) e apoptose (Bax, Bcl-2, p53, c-myc) são relevantes, pois, além das informações sobre a biologia desses tumores pode servir como preditivo de resistência como por exemplo a superexpressão de c-myc e resistência a cisplatina.

1.3.1 Proliferação Celular

A atividade proliferativa de um tumor, ou de um tecido, é determinada pela fração de crescimento (por exemplo, número de células que estão ciclando) e pelo tempo levado por estas células para completar seu ciclo celular. Existe uma forte correlação entre a taxa de proliferação tumoral e achados clínicos, principalmente em tumores sólidos (Brown & Gatter, 1990). O atual conhecimento dos mecanismos reguladores do ciclo celular tem levado à descoberta de alguns antígenos celulares expressos em células proliferantes, que podem ser identificados por métodos imunohistoquímicos. Desta forma, existem dois marcadores moleculares utilizados para determinação da atividade proliferativa da célula: o PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen) e Ki-67.

O PCNA é uma proteína de 36kDa expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto G0. Seu pico de expressão ocorre em G1 tardio e S precoce (figura 3). O PCNA foi identificado como um cofator auxiliar da polimerase δ (delta), sendo essencial no metabolismo dos ácidos nucléicos e na maquinaria de reparo de replicação (Rabenhorst *et al.*, 1993; Schipper *et al.*, 1998; Konno *et al.*, 2001; Sugimachi *et al.*, 2002). Por estar envolvido no sistema de reparo, em alguns tumores, a sua escolha como marcador de atividade proliferativa ainda é, muitas vezes, questionada.

O anticorpo monoclonal Ki-67 foi descrito por Gerdes *et al.* em 1983. Esta molécula identifica um antígeno nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular (figura 4), exceto G₀ e início de G₁(Flenghi *et al.*, 1988).

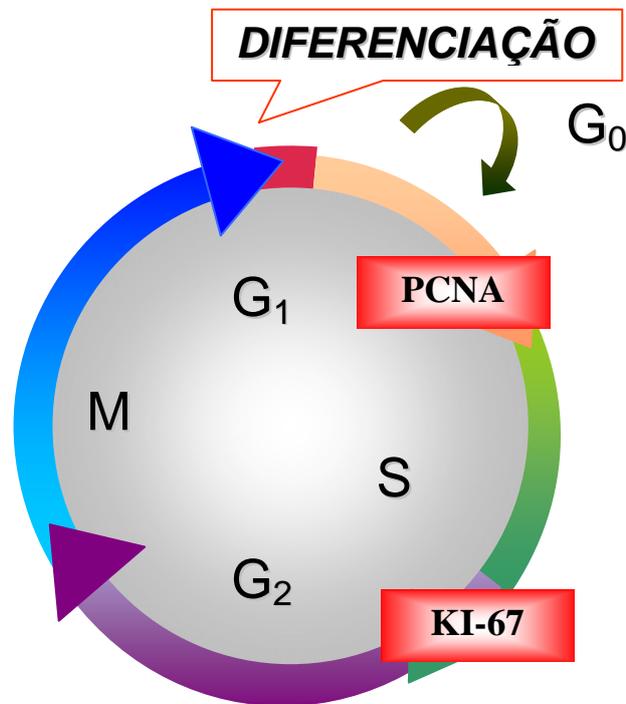


Figura 4 - Expressão do Ki-67 e PCNA na progressão do ciclo celular: o ciclo celular possui 4 fases (G₁-S-G₂-M) onde o PCNA é mais expresso no final de G₁ e início de S e o Ki-67 mais no final da fase S, não sendo expresso em G₀ e início de G₁.

A expressão do PCNA e KI-67 vêm sendo investigados como marcador em diferentes tipos de tumores sólidos, sendo esta abordagem ainda muito controversa, principalmente nos tumores gástricos (Konno *et al.*, 2001). Alguns autores (Sundblad & Tamayo, 1995; Muller *et al.*, 1996; Broll *et al.*, 1998; Setela *et al.*, 1998; Elpek *et al.*, 2000) afirmam que os antígenos Ki-67 e PCNA não se apresentam como relevante fator prognóstico no câncer de estômago. Já Xu *et al.*, 1999 afirma que é um fator relevante. Existem ainda, trabalhos (Xu *et al.*, 1999; Inadomi *et al.*, 1999; Mita & Shimoda, 2001)

que relatam uma correlação entre metástases a distância e comprometimento de linfonodos com a atividade proliferativa marcada pelo Ki-67 e PCNA.

1.3.2 p53

O gene p53 foi descoberto em 1979. Está localizado no braço curto do cromossoma 17 na região 13.3, apresenta 11 exons, sendo considerado um gene supressor tumoral devido à sua função reguladora da proliferação celular (Lane, 1992; Kaufmann, 1989). O produto protéico do p53 é uma fosfoproteína nuclear de 53Kd, dividida em 3 regiões: a extremidade NH₂ (N-terminal), similar aos fatores de transcrição, importante para a regulação da transcrição; a região central, sitio de ligação ao DNA e a extremidade carboxil (C-terminal) (figura4), necessária para a oligomerização, desde que, a proteína p53 se liga ao DNA como um tetrâmero (Velculescu & El-Deiry, 1996; Roberts *et al.*, 1996).

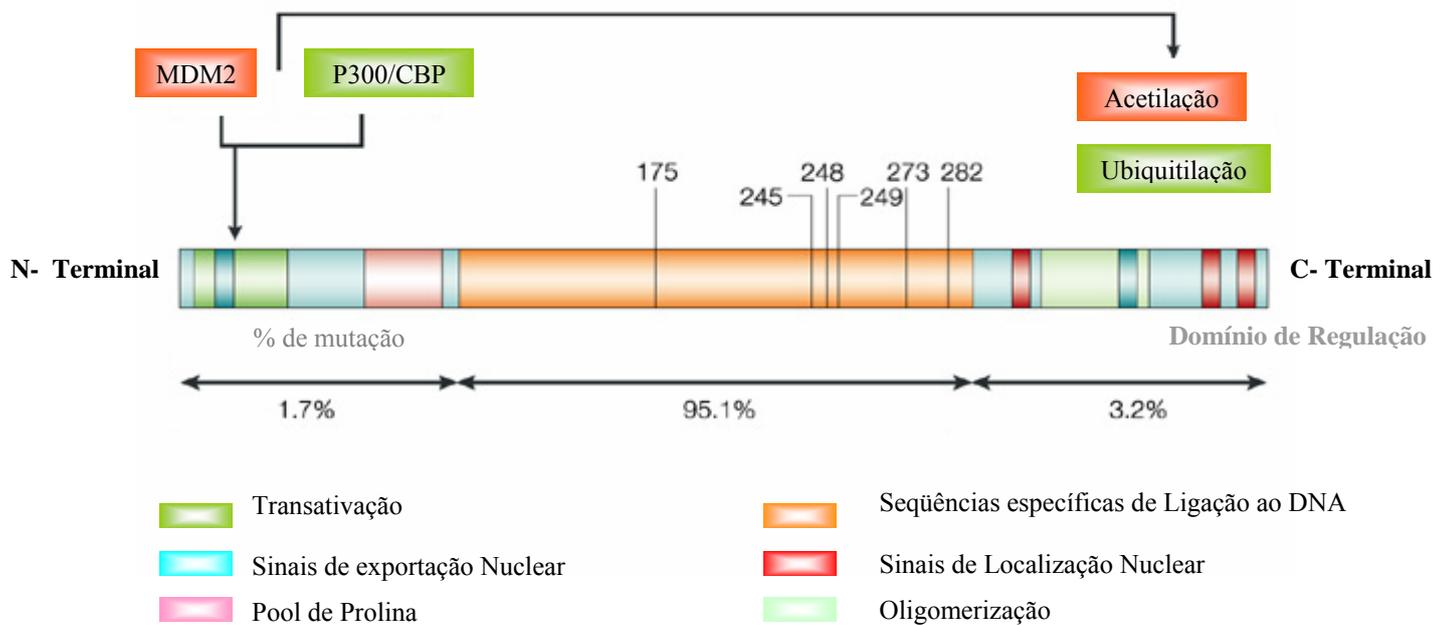


Figura 5 - Estrutura do p53: o p53 é um fator de transcrição com domínios bem definidos, apresenta um domínio de transativação na porção amino-terminal, uma sequência central específica de ligação com o DNA, uma região carboxi-terminal que contém uma sequência de oligomerização e de sinais de localização nuclear. A exportação nuclear do p53 é regulada por sinais na porção amino e carboxi-terminal. A interação com proteínas tais como MDM2 ou p300/CBP com a porção amino-terminal do p53 pode levar a modificações tais como acetilação ou ubiquitilação na porção carboxi-terminal. Quase todas as mutações encontradas no câncer localizam-se na região central do p53; a percentagem de mutação em cada região está indicada abaixo de cada região.

A proteína p53 nas células normais tem a função de bloquear a divisão celular quando há injúrias no genoma, fazendo com que o dano seja reparado; se o dano persistir, este atua como mediador da apoptose (figura 5) (Montenarh, 1992). Quando a proteína perde a sua função (mutada) ocorrerá perda do controle do ciclo celular das vias p53 dependente (Victorzon *et al.*, 1996), levando a progressão tumoral.

Todas as células normais apresentam baixos níveis da proteína p53, tendo meia vida curta de aproximadamente 20 minutos (Bertram JS, 2001; Lewin, 2000; Lohrum & Vousden, 2000). Esta é devido a sua associação com a proteína Mdm-2 (Murine Double Minute Clone 2) (Dasgupta *et al.*, 2000; Piette *et al.*, 2001), que se liga a sua porção N-terminal, fazendo com que o domínio de transativação do p53 fique bloqueado, inibindo

sua habilidade de funcionar como fator de transcrição e tornando-o um alvo para degradação proteolítica (Lohrum & Vousden, 2000). Para este processo ocorrer é necessário que um coativador denominado p300/CBP se ligue a porção N-terminal do p53. Em resposta ao estresse causado por dano no DNA, hipóxia, ativação oncogênica, o p53 sofre inicialmente uma fosforilação e depois uma acetilação, liberando ou impossibilitando a ligação com Mdm-2 o que eleva os níveis e a meia vida da proteína p53 (Bertram JS, 2001).

O caminho a ser percorrido depende da fase em que ocorreu a ativação do p53 no ciclo celular, como por exemplo, se o dano ocorrer no início de G1, o p53 leva a célula ao próximo checkpoint fazendo com que a progressão do ciclo seja bloqueada e o dano reparado para que a célula entre na fase S. Esse mecanismo envolve o aumento da transcrição da proteína p21 que ativada (inibidora do ciclo celular) inibe a fosforilação do RB (retinoblastoma), inibindo assim a passagem G1-S (Bertram JS, 2001; Gamallo *et al.*, 2001). Mas se o dano ocorrer na fase de divisão celular, o p53 leva a célula à apoptose. Nem sempre esses caminhos são fase-dependente, visto que algumas células são mais propícias a apoptose do que outras (Lewin, 2000).

O p53 funciona como fator de transcrição, o qual modula a expressão de genes importantes no reparo do DNA, na parada em G1 e apoptose (Carson, 1995). As duas primeiras funções são mais compreendidas. A transcrição do gene de reparo GADD45 (Growth Arrest on DNA Damage) pelo p53 produz uma proteína que reconhece um estágio alterado da cromatina e causa desestabilização das interações Histona-DNA, resultando em uma maior acessabilidade ao DNA lesado por proteínas envolvidas no reparo (Bertram, 2001). Além disso, a proteína GADD45 está envolvida na manutenção da estabilidade genômica e no bloqueio do ciclo em G2, provavelmente pela associação com o complexo Cdc-2-Ciclina B1 (Bertram, 2001). Além disso, o GADD45 se

complexa com o PCNA, impedindo a replicação. Na apoptose, o p53 atua diminuindo a transcrição de Bcl-2 e aumentando a de Bax.

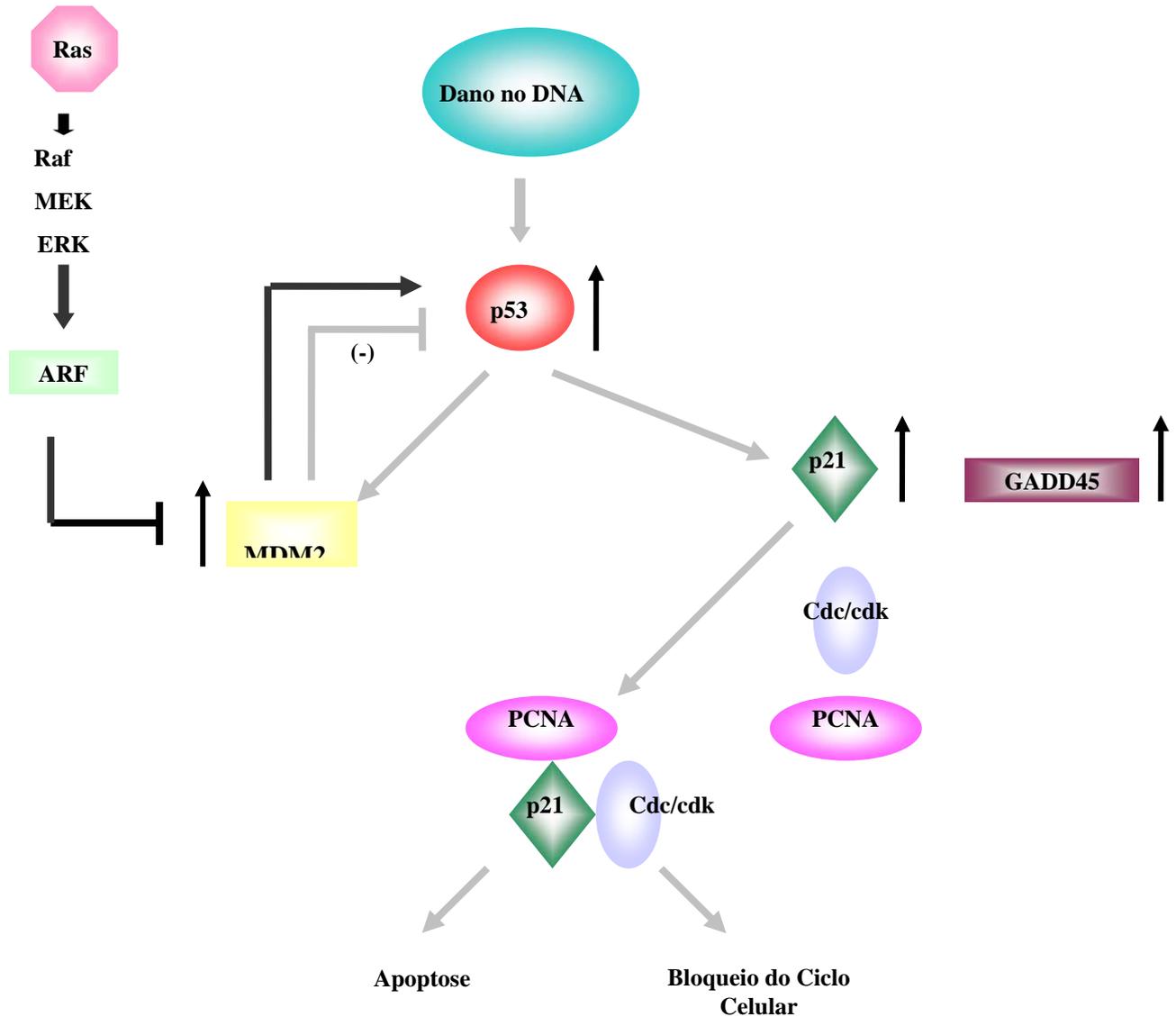


Figura 6 - Resposta ao dano no DNA via p53: Dano no DNA leva a um aumento dos níveis de p53, conseqüentemente de p21 e GADD45. A associação do p21 com PCNA e cdc/cdk induz a parada do crescimento celular e conseqüente reparo do DNA. Quando o dano se torna irreparável a célula entra em apoptose. O Ras também pode ativar o p53, via ARF, onde este sequestra a proteína mdm2 levando a um aumento de p53, levando a célula a parada do ciclo celular ou senescência.

A mutação ou deleção do gene p53 é freqüente em diferentes tipos câncer (Tarapore & Fukasawa, 2000). Dentre eles podemos citar: pulmão (Gamallo *et al.*, 2001), estômago (Roberts *et al.*, 1996), mama, entre outros. Análise das mutações no p53, revelam “hotspots” (éxons 5 - 9) localizados em regiões conservadas, evolucionariamente, indicando que estas regiões são fundamentais para função normal do p53. Essas mutações agem, preferencialmente, eliminando regiões críticas de contato com o DNA ou desestabilizando a estrutura protéica chave requerida para ligação ao DNA (Bertram, 2001).

O acúmulo da proteína p53 mutada tem sido reportada como um pior prognóstico em alguns tipos de carcinomas como o de cólon e pulmão. Já no carcinoma gástrico, os resultados não são conclusivos (Victorzon *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2001). A literatura acerca do papel do p53 no câncer gástrico ainda é muito controversa. De acordo com Victorzon *et al.* (1996) o acúmulo de p53 está relacionado ao estadiamento da doença, presença de metástases a distância e ao tipo intestinal, não sendo considerado fator prognóstico de forma independente. A associação entre p53 e o tipo histológico intestinal é compartilhada por diversos autores (Fedriga *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001) sendo este relacionado a fase inicial da tumorigênese gástrica. A fase tardia esta mais relacionado ao tipo histológico difuso (Sugai *et al.*, 1999). Inadomi *et al.* (1999) associa o p53 com metástases a distancia e Kunisaki *et al.* (2001) associa como indicador de recidiva em pacientes com comprometimento de linfonodos (n2 ou mais). Diez *et al.* (2000) mostrou uma maior sobrevida para pacientes p53 (-) quando era administrada terapia adjuvante. Sanz-Ortega *et al.* (2000) associou a expressão de p53 a localização tumoral (cárdia), envolvimento de linfonodos e estágio tumoral. Já Setela *et al.* (1998) afirma que o p53 seria um fator prognóstico significante para o câncer gástrico.

1.3.3 A Família Bcl-2

A família Bcl-2 é funcional e estruturalmente bem conservada na evolução do reino *Metazoa*. Muitos de seus membros possuem 4 domínios conservados (BH1 - BH4), onde BH1, BH2 e BH4, juntos com uma região transmembranica, hidrofóbica, carboxi-terminal, formam o sítio funcional da maioria das molécula desta família (Evan, 2001). Uren & Vaux (1996) relatam que as duas primeiras regiões (BH1 e BH2) são importantes para a atividade anti-apoptótica do bcl-2. Em contrapartida, Reed (1997) afirma ser o domínio BH4 o envolvido nos mecanismos das proteínas anti-apoptóticas. A remoção desse domínio, no gene Bcl-2, interrompe o efeito antiapoptótico desta molécula (Kaufmann, 1997).

A família Bcl-2 pode ser dividida em duas classes: inibidoras da apoptose (anti-apoptóticas), tais como: Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1, A1, E1B19K, LMW5-HL e EBV BHRF1; e promotoras da apoptose (pró-apoptóticas): Bax, Bak, Bcl-xs, Bad, Bid, Bik, Hrk, Bim e Bok (Evan, 2001). Esta família forma homodímeros e heterodímeros, levando ao desencadeamento de diferentes vias.

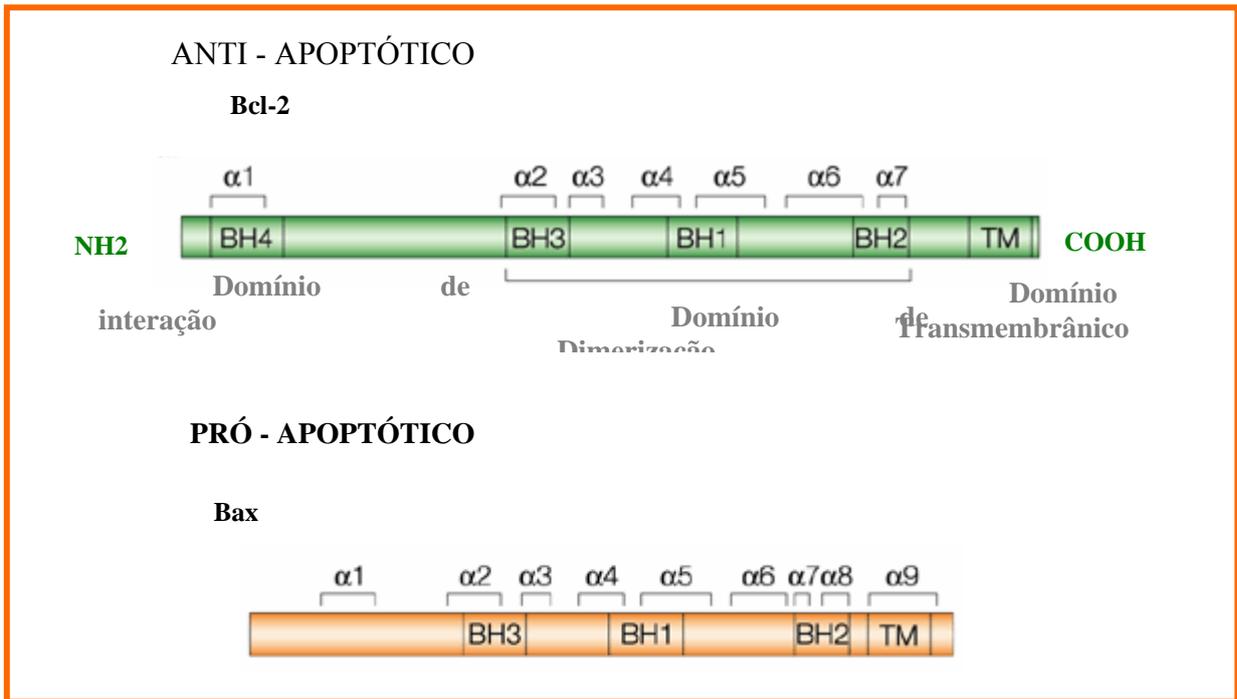


Figura 7 - Estrutura do Bcl-2 e Bax: as regiões da α -hélice estão indicadas (BH1-4), sendo estas as mais conservadas e responsáveis pela dimerização das proteínas da família Bcl-2. A maioria dos membros desta família apresentam um domínio hidrofóbico na porção amino-terminal.

O bloqueio da morte celular é desencadeado por uma variedade de sinais, tais como tratamentos com glicocorticóides, choque térmico, etanol, metotrexato, ausência de soro, fatores de crescimento, agentes que lesão o DNA, superexpressão do p53, TNF, ligação com CD95 e superexpressão de proteases tipo cisteína (Uren & Vaux, 1996).

A proteína bcl-2, a mais conhecida desta família, pode ser encontrado na porção externa da membrana da mitocôndria, na membrana nuclear e no retículo endoplasmático. A sua localização foi alvo de diversos estudos onde estes tinham como objetivo encontrar os possíveis mecanismos deste oncogene (Evan, 2001).

O gene Bcl-x_L é classificado como anti-apoptótico. Sua proteína tem 44% de suas seqüências idênticas ao Bcl-2, sendo formado por dois polipeptídeos provindos de

dois splicing alternativos. Este oncogene pode ser encontrado em diversos tecidos, sendo principalmente expresso no cérebro, rim e timo (Evan, 2001).

Um dos possíveis mecanismos para ação da molécula bcl-2 é o seu envolvimento na regulação da fosforilação oxidativa. Essa observação é sustentada pela habilidade desta molécula em suprimir a indução de morte celular por estresse oxidativo, possivelmente por seqüestro de radical livre do oxigênio. Esse mecanismo ainda apresenta controvérsias (Evan, 2001).

O mecanismo que desencadeia a apoptose até agora elucidado é através da liberação do citocromo c. Este normalmente reside nas membranas internas e externas da mitocôndria. Quando há um estímulo apoptótico, o citocromo c é liberado para citossol onde se apresenta como um dos principais ativadores da atividade proteolítica da caspase 3 por ativação da caspase 9. Neste mecanismo, o citocromo c forma um complexo com duas proteínas citossólicas, Apaf-1 e Apaf-3 (apoptotic protease-activating factor), e o complexo formado ativa a caspase 3, que ao final, leva à apoptose (Evan, 2001). O oncogene Bcl-2 e Bcl-xL encontram-se na membrana externa da mitocôndria para suprimir a apoptose bloqueando a liberação do citocromo c e ligando-se a Apaf-1 para prevenir a ativação da caspase 9 (Evan, 2001).

Outro mecanismo provável no qual o Bcl-2 possa estar suprimindo a apoptose advém da observação de que sua expressão afeta o balanço de cálcio intracelular (Homeostase). A alteração na concentração de cálcio possui influencia no processo de morte celular programada (apoptose). É possível que o Bcl-2 atue diretamente modulando os canais de cálcio ou atue protegendo as membranas lipídicas da ação danosa de radicais peróxidos os quais são conhecidos como deturpadores da homeostase do cálcio (Evan, 2001).

O gene Bax é classificado como pró-apoptótico, tendo na sua estrutura os quatros domínios sendo BH4 pouco preservado e a região BH3 é responsável pela sua dimerização com Bax/Bak e Bax/Bcl-2. Esta molécula parece estar relacionada com a formação de um poro por onde o *citocromo c* sairia da mitocôndria e desencadearia uma cascata de eventos que levaria a morte celular. Este gene é freqüentemente encontrado em uma variedade de tecidos, dentre ele órgãos linfóides, pulmão, estômago e rins (Evan, 2001).

Alguns trabalhos (Reed, 1997) correlacionam a relação entre o Bcl-2/p53, Bcl-2/Bax e Bcl-2/Bcl-x_L com importância prognóstica. O balanço entre Bcl-2 (anti-apoptótico) e Bax (pró-apoptótico) é que irá definir a sensibilidade ou a resistência de células tumorais ao estímulo apoptótico. Conseqüentemente, será este balanço que irá conduzir a uma melhor ou pior resposta a tratamentos como a radio e a quimioterapia, sendo resistentes as células que apresentem uma redução na expressão de Bax e um aumento na expressão de Bcl-2 (Kaufmann, 1997).

Como dito anteriormente, o balanço entre esses dímeros é que dita qual o destino da célula em questão; morrer ou sobreviver. A propensão da célula entrar em apoptose depende dos níveis entre a interação homodímera Bax/Bax, interação heterodímera Bax/Bcl-2 e homodímera Bcl-2/Bcl-2: um excesso do homodímero Bax promove a morte celular, já o complexo Bax/Bcl-2 favorece a sobrevivência celular (Evan, 2001).

A superexpressão do Bcl-2 já foi relatada em alguns tumores dentre eles o adenocarcinoma de próstata, adenocarcinoma colorretal, pulmão, outros tipos de tumores sólidos e leucemias. Em alguns casos, as mudanças na sua expressão ocorrem nos estágios iniciais da progressão tumoral (carcinoma colorretal). Já em outros tumores parece estar relacionado a eventos tardios (próstata) (Kaufmann, 1997).

A associação paradoxal de Bcl-2 com um melhor resultado para alguns tipos de câncer pode ser explicado por um aumento compensatório de Bcl-x_L. Esse fenômeno pode ser observado em cânceres do estômago e colorretal. Em câncer colorretal bem diferenciado o Bcl-2, em estágios iniciais, apresenta-se em alta concentração, já nos indiferenciados o seu nível decresce durante a progressão maligna. Já em carcinomas de próstata e carcinomas de próstata metastático foram relatadas altas concentrações de Bcl-x_L.(Kaufmann, 1997).

1.3.4 c-myc

A proteína c-myc (ou Myc) é um fator de transcrição da família bHLH-LZ (basic-helix-loop-helix-leucine zipper) o qual regula positiva ou negativamente a expressão de diferentes genes. A ativação transcricional pelo Myc é realizada através da dimerização, mediada pela porção c-terminal, com a proteína Max, ligando-se, assim, a regiões específicas no DNA (E-box) (Taubert *et al*, 2001).

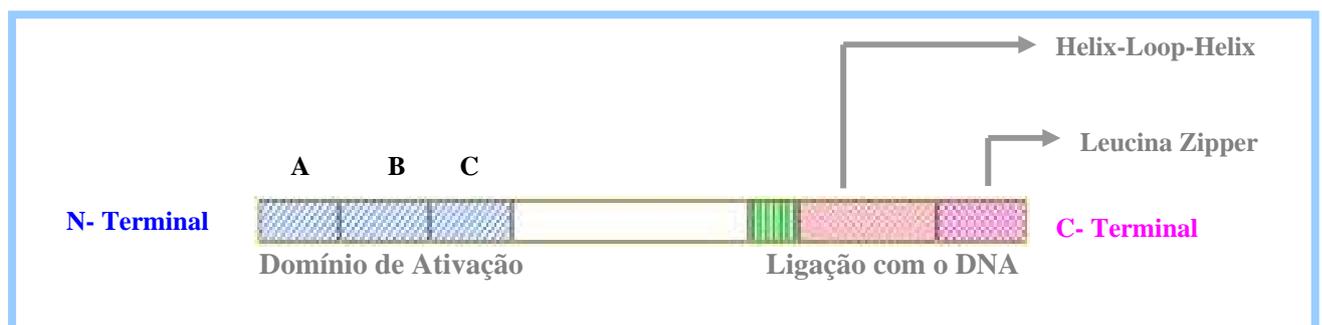


Figura 8 - Estrutura do c-myc: a proteína c-myc é um fator de transcrição da família bHLH-LZ, onde a ligação ao DNA encontra-se na porção carboxi- terminal e o domínio de ativação na porção amino- terminal.

O c-myc possui diferentes funções. É altamente regulado em tecidos normais, tendo sido relacionado com a progressão do ciclo celular, diferenciação e apoptose (Eisenman & Grandori, 1997). Em células normais, a expressão do c-myc é induzida por mitógenos ou suprimidas por sinais inibitórios de crescimento. Além dessas funções, o c-myc parece regular uma variedade de processos biológicos tais como biossíntese protéica, biogenesis ribossômica, controle do ciclo celular, metabolismo do DNA e outras vias metabólicas, agindo direta ou indiretamente sobre outros genes. (Taubert *et al*, 2001).

Pelo menos dois alvos do c-myc já foram identificados: ODC (ornitina descarboxilase), enzima necessária para a síntese de DNA, e cdc25A (Eisenman & Grandori, 1997). A superexpressão do c-myc leva a indução de apoptose, aparentemente pelo aumento da transcrição da cdc25A em células com ausência de fatores de crescimento (Bertram, 2001). Em condições favoráveis de fatores de crescimento esses alvos induzem a proliferação celular. Já na ausência de soro, levam a apoptose (Krupitza *et al.*, 1999; El-Deiry *et al.*, 2000). Todas essas funções do myc dependem do alvo celular e do microambiente tumoral.

Além de promover a proliferação celular e cooperar com a transformação maligna, o c-myc inibe a diferenciação e promove a apoptose. A indução da apoptose pelo c-myc parece envolver a liberação do citocromo c, ativando, assim, a via APAF-1/caspase 9. A liberação do citocromo c, como já descrita anteriormente, é regulada pela ligação da família das proteínas bcl-2 à membrana mitocôndrial. A superexpressão da proteína antiapoptótica bcl-2 bloqueia a liberação do citocromo c, sendo hábil na prevenção da apoptose induzida pelo c-myc em células com privação de soro ou glicose. Já a superexpressão da proteína pro-apoptótica Bax parece contribuir na indução da apoptose via c-myc (El-Deiry *et al.*, 2000)

O oncogene c-myc tem sido considerado a chave de um melhor entendimento para os múltiplos passos da carcinogênese, pois parece estar correlacionado com a imortalização celular, além de estar correlacionado com a ativação do ras e perda da instabilidade genômica associada com a perda do p53. Existem evidências que a expressão deste gene permite que células em repouso entrem no ciclo (G1, S, G2) e que acelere a passagem das células pela fase G1 (Krupitza *et al.*, 1999). Isto pode ser observado em tumores sólidos com fatores de crescimento limitados, onde as células em G0 podem ser re-introduzidas no ciclo pelo c-myc (Krupitza *et al.*, 1999).

A desregulação da expressão do c-myc tem sido associada a um grande número de neoplasias (Sobrinho-Simões *et al.*, 1995; Eisenman & Grandori, 1997; Taubert *et al.*, 2001). A ativação oncogênica do c-myc é geralmente causada por ampliações ou translocações, além de mutações em genes envolvidos na via de sinalização da expressão do c-myc, tais como a perda de um supressor tumoral (APC – *Adenomatous Polyposis Coli*) ou ativação da β -catenina, como no carcinoma de cólon (Taubert *et al.*, 2001). A superexpressão do c-myc foi detectada em leucemias, glioblastomas, carcinoma de cólon, adenocarcinomas, carcinoma pulmonar e carcinoma de mama (Krupitza *et al.*, 1999). Além disso, em alguns tumores como o da mama, a superexpressão do c-myc pode facilitar a indução de proliferação via erb-b2 (Bertram, 2001).

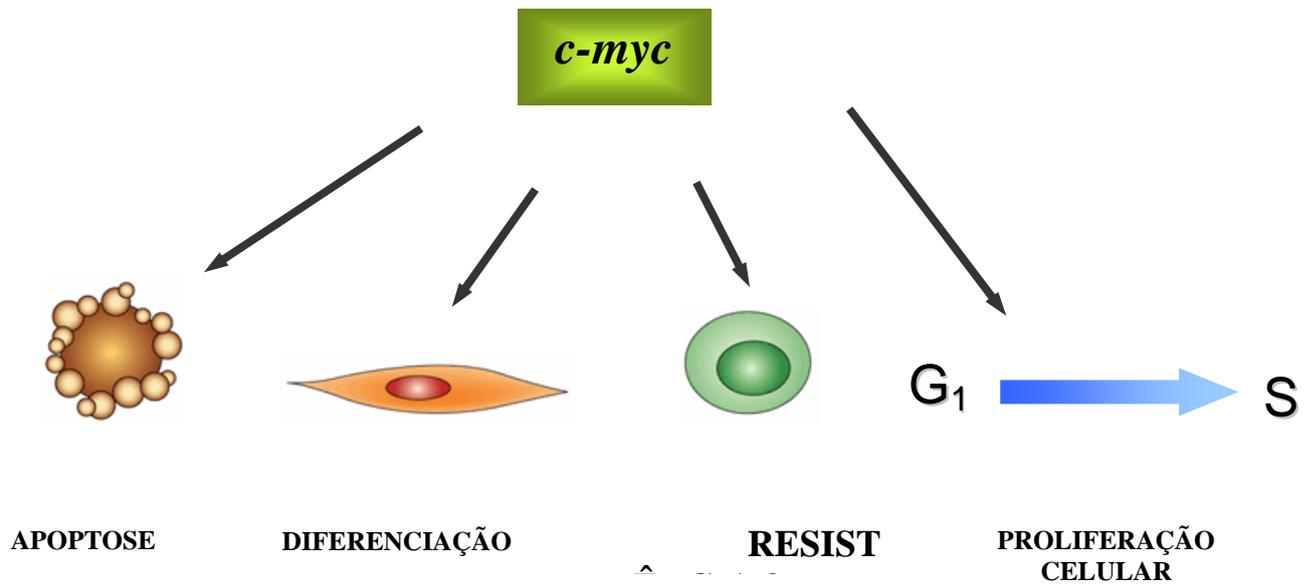


Figura 9 - Funções do *c-myc*: a proteína *c-myc* possui diferentes funções dentre elas a proliferação celular o que coopera com a transformação maligna, inibindo a diferenciação e promovendo a apoptose. Além dessas atribuições, o *c-myc* parece estar envolvido no processo de resistência à cisplatina.

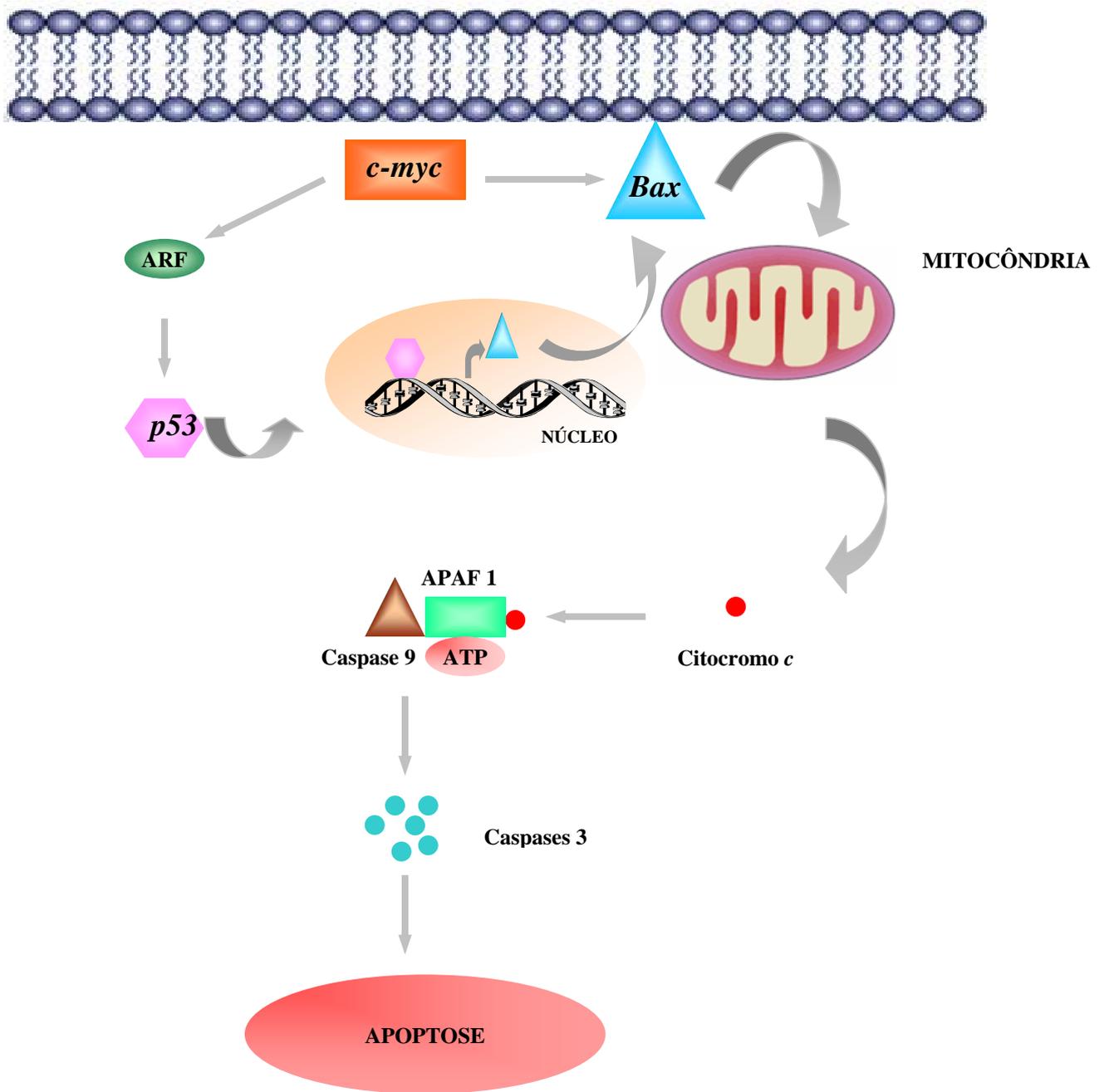


Figura 10 - Ativação da Apoptose via c-myc: o c-myc sensibiliza as células a uma série de estímulos pró-apoptóticos. Durante a apoptose, o c-myc faz com que o citocromo *c* seja liberado da mitocôndria via Bax. Uma vez liberado, o citocromo *c* se associa com a proteína APAF 1 (apoptotic protease-activating factor 1) e a procaspase-9 para formar o apoptosomo. Na presença de ATP, a caspase 9 é ativada, ativando outros efetores, incluindo a caspase 3, que finalmente leva a apoptose. Outra via envolvendo o c-myc seria via ARF/p53 levando a transcrição do Bax e conseqüente apoptose. Proteínas antiapoptóticas tais com Bcl-2 residem na mitocôndria e bloqueiam a liberação do citocromo *c*, possivelmente pelo sequestro de Bax.

1.4 A BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA NA FARMACOLOGIA

As células neoplásicas acumulam diversas alterações genéticas que contribuem para tumorigênese, progressão tumoral e resistência a drogas quimioterápicas. Com base no conhecimento de alguns genes envolvidos nestes processos, novas abordagens terapêuticas vêm sendo desenvolvidas.

Nos últimos anos, a biologia molecular vem tentando desenvolver métodos para introduzir diferentes tipos de gene em células neoplásicas. Um desses genes seria o p53 (gene supressor) com o objetivo de inibir o crescimento tumoral e ressensibilizar as células tumorais a quimioterapia e radioterapia. Isso exclui estratégias para reintroduzir o gene selvagem (p53-wt) e, com isso, restabelecer a função normal do p53 (Bouker *et al.*, 2000).

Para reintroduzir um gene tem sido usado vetores virais (retrovírus, adenovírus, entre outros) e não virais. Essas técnicas de inserção de genes por vetores pode ser realizada com supressores tumorais (p53, p21 e p16), genes suicidas (HSV-TK) e genes envolvidos no controle da apoptose (Bcl-2 e Bcl-xL) (Moolten, 1986; Moolten & Wells, 1990; Uren & Vaux, 1996).

A reintrodução do gene p53-selvagem por sistemas virais tem demonstrado, *in vitro* e *in vivo*, suprimir o crescimento de alguns tumores como próstata, cabeça e pescoço, cólon, glioblastoma, mama, ovário, fígado, rim e pulmão (Bouker *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 1993; Fujiwara *et al.*, 1994; Pirollo *et al.*, 1997; Spitz *et al.*, 1996; Roth *et al.*, 1996). Essa redução do crescimento tumoral é mais significativa quando associada a outras terapias (Gurnani *et al.*, 1999).

Os sistemas não virais também podem ser utilizados na terapia gênica como alternativa para evitar problemas, como por exemplo, complicações imunológicas, proporcionadas pelos sistemas virais (Chang & Seymour, 2000). O sistema mais utilizado para transferência de genes é o lisossomo catiônico, o qual possui um plasmídio contendo o gene a ser trasfectado. Esse método também vem sendo utilizado para transferência do gene p53 selvagem em tumores xenográficos, sendo observado uma regressão tumoral (Coll *et al.*, 1998). A associação deste método com outras terapias como radioterapia, pode levar a uma maior eficácia do tratamento. Tumores xenográficos de cabeça e pescoço tratados em combinação com radioterapia e lisossomas-p53 normal, resultou em regressão total do tumor em 18 meses. Isso fez com que a resposta a radioterapia aumentasse correlacionado a um aumento da apoptose p53 dependente (Xu *et al.*, 1999).

A terapia gênica já vem sendo desenvolvida utilizando p53. O ONIX-015 é um fármaco promissor que está na fase I/II de estudos clínicos. Este possui um adenovírus modificado com uma deleção na proteína E1B, requerida para replicação viral em células com p53 normal. Deste modo, o adenovírus é capaz de se replicar e lisar células com p53 mutante (Gallagher & Brown, 1999; Khun *et al.*, 2000). Modelos *in vivo* de carcinoma cervical e de cólon, demonstraram que a combinação entre ONYX-015 com cisplatina ou 5-FU, por via intra-tumoral ou endovenosa, foi mais efetiva do que o tratamento com um desses agentes sozinhos (Heise *et al.*, 1997).

Outra alternativa terapêutica é a inibição molecular para reduzir alguns efeitos da quimioterapia. Um exemplo seria Pifithrin- α (PFT – p-fifty-three inhibitor) composto sintético que, *in vitro*, protegeu fibroblastos murino transformados da apoptose induzida por radiações (UV e gama) e diferentes quimioterápicos. Já *in vivo*, o PFT demonstrou proteger 60% dos animais (Balb/c e C57BL/6) após a administração de uma dose letal

de radiação gama. Foi demonstrado que apesar o PFT ser um potente inibidor da apoptose mediada pelo p53, seus efeitos são revertidos quando este é suspenso. Por outro lado, também vem sendo testado agentes facilitadores da apoptose, seja aumentando a expressão do Bax (pró-apoptótico) ou inibindo a atividade do Bcl-2 (anti-apoptótico) como por exemplo a droga HA14-1 que mostrou induzir apoptose, *in vitro*, em células com superexpressão de Bcl-2 (Bertram, 2000).

Além dessas ferramentas moleculares existem outras que estão sendo testadas. Uma delas é a terapia com uma seqüência de oligonucleotídeos antisense (ODN – antisense oligodeoxynucleotides). Esta tem como mecanismo bloquear a tradução do RNAm. Estudos com células tumorais humanas resistentes a cisplatina, a administração de ODNs para os genes c-myc, c-myb, c-jun e bcl-2 restaurou a sensibilidades destas células à cisplatina, sugerindo que a combinação de tratamentos pode ser uma alternativa para pacientes com tumores resistentes a esse quimioterápico. Outra alternativa é o uso de ribozimas. Estas são seqüências de RNAs que possuem um sítio específico de clivagem no RNA, e também podem ser usadas como ferramenta no tratamento do câncer.

Atualmente, uso da biologia molecular se faz necessário para o conhecimento dos diferentes tumores. A identificação de oncogenes e genes supressores tumorais nos diferentes cânceres é importante para que novos esquemas terapêuticos possam ser desenvolvidos aumentando, assim, a sobrevida dos pacientes. As perspectivas são boas, as possibilidades são muitas, mas ainda há muito a ser descoberto e aperfeiçoado.

OBJETIVO

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Correlacionar um painel de marcadores permitindo uma visão mais abrangente da desregulação da proliferação celular e apoptose presentes nos adenocarcinomas gástricos, que futuramente possibilitem predição de resposta terapêutica e sobrevida, colaborando para a qualidade de vida dos pacientes.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o índice de proliferação de adenocarcinomas gástricos utilizando os marcadores moleculares Ki-67 e PCNA e, se possível, determinar qual dos dois marcadores moleculares, Ki-67 ou PCNA, é o mais indicado para avaliação da proliferação celular em adenocarcinomas gástricos;
- Correlacionar a detecção dos marcadores independentes ou em combinação com os achados histopatológicos e resposta terapêutica;
- Padronizar a técnica de extração de DNA de tumores;
- Avaliar a mutação do p53 por SSCP (Single-stranded Conformational Polymorphism) e compará-la aos achados imunohistoquímicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS E SOLUÇÕES

3.1.1 Coleta das amostras no centro cirúrgico:

Solução de HANK'S: CaCl₂ (0,14g), KCl (0,40g), KH₂PO₄ (0,06g), MgCl₂ . 6H₂O (0,10g), MgSO₄. 7H₂O (0,10g), NaHCO₃, NaCl, Na₂HPO₄.7H₂O, glicose e H₂O.

Materiais utilizados: Tubos falcon de 50mL, luvas, material cirúrgico, placas de petri e eppendorfs autoclavados. Procedimento realizado em fluxo laminar.

3.1.2 Imunohistoquímica:

Xilol

Etanol 100%

Etanol 80%

Tampão Citrato 10mM pH 6.0

Albumina do Soro Bovino (BSA) 5% - Acondicionar a 4° C.

Tampão Fosfato (PBS) 6mM pH 7.4 1L: NaCl (8g), KCl (0.2g), KH₂PO₄ (0.2g), NaHPO₄. 7H₂O (1.15g), H₂O (qsp). Acondicionar a 4° C.

Água Oxigenada a 3%: Acondicionar a 4° C.

Kit LSAB + (DAKO): Kit contendo o anticorpo secundário e o complexo streptavidina-peroxidase.

DAB+ (DAKO): Kit revelador contendo diaminobenzidina (DAB).

Hematoxilina de Harris

Bálsamo do Canadá

Anticorpos:

Ki-67 (IMMUNOTECH): marcação nuclear. Diluição utilizada: 1:60.

PCNA (DAKO, PC10): marcação nuclear. Diluição utilizada: 1:20.

p53 (DAKO, DO-7): marcação nuclear. Diluição utilizada: 1:80.

Bcl2 (DAKO): marcação citoplasmática. Diluição utilizada: 1:80.

c-myc (DAKO): marcação nuclear e citoplasmática. Diluição utilizada: 1:100.

Materiais utilizados: suporte de para lâminas, cubas de vidro, berçinho para lâminas, pinça, câmara úmida, geladeira, eppendorfs de 2mL, pipeta automática, papel de filtro, lâminas, lamínulas, microscópio e contador de célula manual.

3.1.3 Extração de DNA:

OBS: Todo os materiais e todas as soluções foram autoclavadas

Tampão de Extração – CTAB (Cetyltrimetilammonium Bromide – USB)

pH 8.0 – 500mL: NaCl 5M (140mL), EDTA 0.2M (50mL), Tris-HCl 1M (50mL) e acrescentar 10g de CTAB.

OBS: na hora do experimento: foi adicionado 2-mercaptoetanol ao tampão para concentração de 0.2%

Álcool isoamílico:clorofórmio (24:1): Acondicionar a 4° C.

NaCl 1M

Álcool isopropílico 100%

Etanol 100% e 70%

Água estéril

Materiais utilizados: tubos falcon de 15mL, pipetas automáticas, eppendorfs de 2mL.

3.1.4 Eletroforese em gel de agarose:

Gel de Agarose 1%: pesar 1g de agarose, diluir em 100ml de tampão TAE 0.5x.

TBE 10X: Tris (27g), ácido bórico (13,75g) e 25mL de solução de EDTA 2M, acertar o pH em 8.0 e completar o volume para 250mL. Armazenar a 4°C.

Bluejuice gel loading buffer (5x) – GIBCO

100pb DNA ladder Ready-load – GIBCO

Brometo de Etídio 0.8% 1mL: Brometo de Etídio (8mg). Armazenar a 4°C.

Materiais utilizados: Cuba 11 x 14cm, fonte da Pharmacia, pipetas automáticas, balança, geladeira, transluminador de U.V, câmera digital e computador.

3.1.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida:

PCR: Polimerase Chain Reaction

dNTP - deoxinucleotídeo

MgCl₂

Taq Polimerase

Primers

Materiais utilizados: termociclador, aparelho GenePhor e Kit GeneGel da Amersham.

3.2 AMOSTRA SELECIONADA

Para o desenvolvimento do trabalho, foram coletadas 26 amostras de tumores e tecido normal gástrico de 26 pacientes submetidos a gastrectomia parcial ou total no Hospital do Câncer do Ceará e Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC), sendo aproveitada apenas 19 amostras. As coletas só eram realizadas quando o tumor primário era gástrico, nunca quando dois órgãos (esôfago-gastrectomia) eram acometidos para minimizar o risco do tumor primário não ser do estômago. Além disso, não participaram no estudo os casos onde a peça não foi retirada. Para completar a amostra foram selecionados 10 casos do arquivo de biópsia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos (COMEPE) e todos os voluntários assinaram termo de consentimento.

3.3 COLETA DOS TUMORES

Após a peça cirúrgica ser retirada, coletamos um fragmento do tumor e do estômago normal em um tubo falcon de 50mL contendo solução de HANK's para evitar deterioração do material. Em fluxo laminar, este tumor é fragmentado (aproximadamente 1-2cm x 1-2cm), armazenado em tubos eppendorfs, etiquetados e acondicionado em freezer -70°C . Um desses fragmentos é fixado em formol 10% para análise histopatológica.

3.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO MATERIAL

Os tumores foram processados e então emblocados e corados para análise histopatológica pela patologista responsável, do Departamento de Patologia e Medicina Legal. Os prontuários de todos os pacientes foram checados para confirmação dos dados histopatológicos.

3.4.1 Estadiamento de acordo com o Instituto Nacional do Câncer

TNM - Classificação Clínica

T - Tumor Primário

TX O tumor primário não pode ser avaliado

T0 Não há evidência de tumor primário

Tis Carcinoma *in situ*: tumor intra-epitelial sem invasão da lâmina própria

T1 Tumor que invade a lâmina própria ou a submucosa

T2 Tumor que invade a muscular própria ou a subserosa¹

T3 Tumor que penetra a serosa (peritônio visceral) sem invadir as estruturas adjacentes^{1,2,3}

T4 Tumor que invade as estruturas adjacentes^{1,2,3}

Notas: 1. O tumor pode penetrar a muscular própria com extensão para os ligamentos gastro-cólico ou gastro-hepático ou para o omento maior ou menor, sem perfuração do peritônio visceral que cobre estas estruturas. Nesse caso, o tumor é classificado como T2. Se existe perfuração do peritônio visceral que reveste os ligamentos gástricos ou os omentos, o tumor é classificado como T3.
2. As estruturas adjacentes do estômago são o baço, cólon transversal, fígado, diafragma, pâncreas, parede abdominal, supra-renal, rim, intestino delgado e retroperitônio.
3. A extensão intramural para o duodeno ou esôfago é classificada pela profundidade da maior invasão em qualquer desses locais, inclusive o estômago.

N- Linfonodos Regionais

NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais

N1 Metástase em 1 a 6 linfonodos regionais

N2 Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais

N3 Metástase em mais de 15 linfonodos regionais

M - Metástase à Distância

MX A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

M0 Ausência de metástase à distância

M1 Metástase à distância

3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

3.5.1 Preparação das lâminas para imunohistoquímica

Cortes de 5 micras de espessura foram colocados em lâminas previamente lavadas com detergente e depois enxaguadas em água corrente, sendo mergulhadas em álcool:éter (3:1). No dia seguinte, as lâminas foram secas e mergulhadas em cola diluída (3água:1cola) sendo colocadas para secar.

3.5.2 Protocolo

O método imunohistoquímico usado foi da estrepto-avidina-biotina–peroxidase, usando a técnica descrita por Hsu *et al.* (1981) com modificação. Os anticorpos primários utilizados e as diluições são as seguintes: Ki-67 (1:60), PCNA(1:20), p53 (1:80), Bcl-2 (1:80) e c-myc (1:100).

Procedimento:

1. Incubação das lâminas em estufa a 70°C por 3 horas.
2. Desparafinação e desidratação em xilol e gradiente de álcool
3. Incubação das lâminas com peróxido de hidrogênio a 3%;
4. Pré-tratamento para recuperação antigênica em forno de micro-ondas em tampão citrato pH 6.0;
5. Incubação das lâminas com o anticorpo (Ac) monoclonal específico, em diluição apropriada, overnight a 4°C;

Deteção utilizando o kit LSAB plus (DAKO), seguindo as especificações do fabricante.

6. Incubação das lâminas com o anticorpo (Ac) monoclonal secundário biotilado;
7. Incubação do complexo strepto-avidina-biotina-peroxidase;
8. Incubação com substrato (peróxido de hidrogênio) e solução de diaminobenzidina (DAB) como cromógeno;
9. Contracoloração com hematoxilina de Harrys e análise das lâminas.

Todas as lâminas foram avaliadas em conjunto com a patologista responsável.

3.6 ANÁLISE DA MARCAÇÃO CELULAR PELA IMUNOHISTOQUÍMICA

Para as análises de todos os marcadores, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram mais de 5% de marcação, independente da intensidade de marcação. Os anticorpos primários apresentam marcação de acordo com a tabela abaixo (tabela 1).

Tabela 1. Localização da marcação da imunohistoquímica dos diferentes marcadores

MARCAÇÃO	TIPO DE MARCAÇÃO
KI-67	Nuclear
PCNA	Nuclear
p53	Nuclear
Bcl-2	Citoplasmático
c-myc	Nuclear e Citoplasmático

3.6.1 Contagem de Ki-67 e PCNA

Em cada lâmina analisada, foram contadas 300 células tumorais em três campos diferentes, perfazendo um total de 900 células. Foi então calculado uma média e os valores analisados.

3.6.2 Análise do padrão e intensidade de marcação

Para cada tumor positivo foi observado o padrão de marcação sendo classificado como homogêneo, nucleolar e granular. Já a intensidade de marcação foi classificada como + (fraca), ++ (moderada) e +++ (forte).

3.6.4 Análise dos dados

Os achados imunohistoquímicos foram tabulados e posteriormente analisados pela estatística responsável, sendo utilizado os testes de ANOVA e Kappa, e o programa EPINFO para cálculo do qui-quadrado.

3.7 EXTRAÇÃO DE DNA DOS TECIDOS

Inicialmente, as 20 amostras de tumores foram cortadas em criostato, coradas e analisadas pela patologista para confirmação da presença de células tumorais. Em seguida, as peças foram pesadas, maceradas e transferidas para um tubo falcon de 15mL. O método utilizado foi baseado na extração por CTAB.

1. Cálculo (0,5g-6mL de tampão CTAB). Incubação overnight com agitação orbital;
2. Acrescentar igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e misturar por inversão; Repetir o procedimento mais uma vez;

3. Centrifugação a 2000 - 2500 rpm por 15 min TA;
4. Transferir a fase aquosa (superior) para outro tubo e repetir a centrifugação com clorofórmio: álcool isoamílico;
5. Acrescentar igual volume de álcool isopropílico 100%, inverter e incubar overnight no freezer; Se formar uma nuvem de DNA, pescar!!!
6. Centrifugação a 2500 rpm por 15 min;
7. Retirar sobrenadante;
8. Acrescentar 1 mL de NaCl 1M;
9. Adicionar 2,5V de etanol 100% gelado;
10. Centrifugação a 1000 rpm por 5 min T.A;
11. Lavar o pellet com etanol 70%;
12. Centrifugação a 1000 rpm por 5 min;
13. Retirar o sobrenadante;
14. Secar o pellet;
15. Ressuspender o pellet em água estéril e acondicionar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

OBS: O 6-mercaptoetanol utilizado na preparação do tampão só é adicionado na hora do experimento.

3.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 1% em brometo de etídio para assegurar que estes não estavam degradados. Foi aplicado 1 μL de amostra de DNA contendo 2 μL Blue Juice juntamente com o padrão de peso molecular 100pb DNA ladder (GIBCO) sendo aplicado no gel, na quantidade de 1 μL por mm de largura do

poço. As amostras foram submetidas a separação eletroforética em tampão TBE por 30 – 45 minutos a 200V e observado.

3.9 SSCP – SINGLE-STRANDED CONFORMATIONAL POLYMORPHISM

A técnica de SSPC detecta mutação através de mobilidade eletroforética alterada da seqüência de DNA contendo mutação pontual a 400pB, possuindo uma sensibilidade e especificidade de aproximadamente 90% (Orita *et al*, 1989).

Com os DNAs extraídos, foram realizados, inicialmente, ampliações por PCR (Polimerase Chain Reaction) dos éxons 5, 7 e 8 de 13 amostras tumorais. Em seguida, as amostras de PCR foram submetidas a desnaturação e submetidas a corrida eletroforética com o aparelho GENFOR da Amersham utilizando o Kit GeneGel Excel 12,5/24, desenvolvido no Departamento de Medicina Nuclear da USP (Universidade de São Paulo).

Condições do PCR: 25 µl de reação

dNTP 0,2 mM

MgCl₂ 1,5mM

Taq 0,6U

Primers 1mM

Número de Ciclos: 35

Temperatura inicial 95°C 5 min

Temperatura de desnaturação 95°C 1 min

Temperatura de anelamento 55-63°C – 1 min

Extensão 72°C 1 min

Extensão final de 10min

Seqüência dos Primers:

EXON 5 temperatura de anelamento 55°C - produto 196 pb

Forward -5' - TAC TCCCCTGCCCTCAACAA-3'

Reverse – 5' - CACCATCGCTATCTGAGCA-3'

EXON 7 temperatura de anelamento 63°C produto 159 pb

Forward -5' - TCTGACTGTACCACCATCC-3'

Reverse – 5' -GAGGCTGGGGCACAGCAGGCCAGTG-3'

EXON8/9 temperatura de anelamento 55°C produto 290 pb

Forward -5' - AGTGGTAATCTACTGGGACGG-3'

Reverse – 5' - TATCTCCATCCAGTGGTTTC-3'

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 PACIENTES E SUAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Foram coletados 26 peças cirúrgicas, onde destas 7 foram descartadas pois não eram adenocarcinoma gástrico. Completamos as amostras com blocos do Departamento de Patologia e Medicina Legal, perfazendo 29 amostras. Destas, 6 (20,7%) são do sexo feminino e 23 (79,3 %) do sexo masculino.

De acordo com a idade, a média dos pacientes ficou em 60,06 anos de idade e a moda encontra-se na faixa etária de 61 a 70 anos (gráfico 1). Observa-se pelo gráfico 2 que esses tumores começam a surgir a partir do 40 anos de idade.

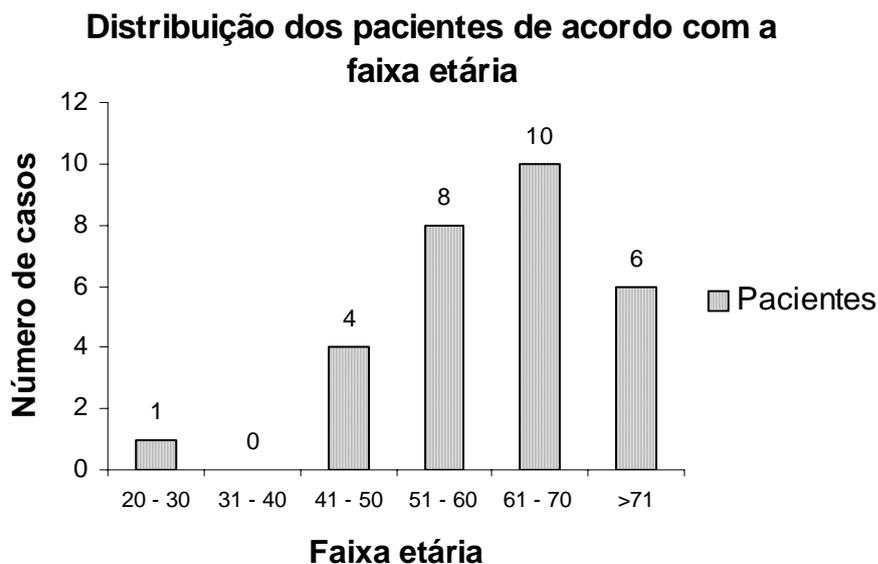


Gráfico 1- Distribuição dos 29 pacientes com adenocarcinoma gástrico de acordo com a faixa etária.

Em relação a classificação histológica, 48,1% foram tumores do tipo intestinal, 40,7% difuso e 11,2% misto (gráfico 2). Quando separamos os tumores em diferentes graus, há uma tendência do tipo intestinal (58,3 %) em relação ao difuso (33,3%) nos tumores de baixo risco. Nos tumores de alto risco, não há uma diferença expressiva (40% intestinal e 46,6% difuso).

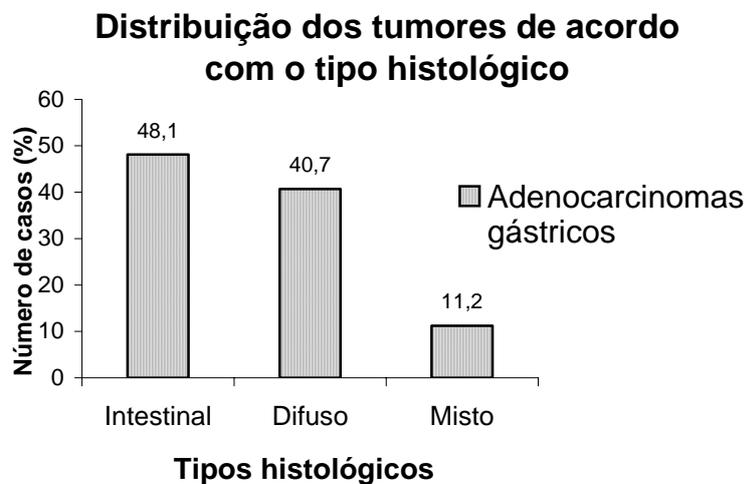


Gráfico 2- Classificação e distribuição (%) dos 29 casos tumorais de acordo com o padrão histológico de Lauren para os adenocarcinomas gástricos.

De acordo com o sítio da doença, 50% foram proximais, 44,8% foram distais e 4,2% mistos (gráfico 3). Praticamente, não há diferença quanto ao sítio da doença nos tumores de baixo risco (45,5% proximal e 54,5% distal). Já nos tumores de alto risco existiu uma prevalência do sítio proximal.

Distribuição dos tumores de acordo com o sítio da doença

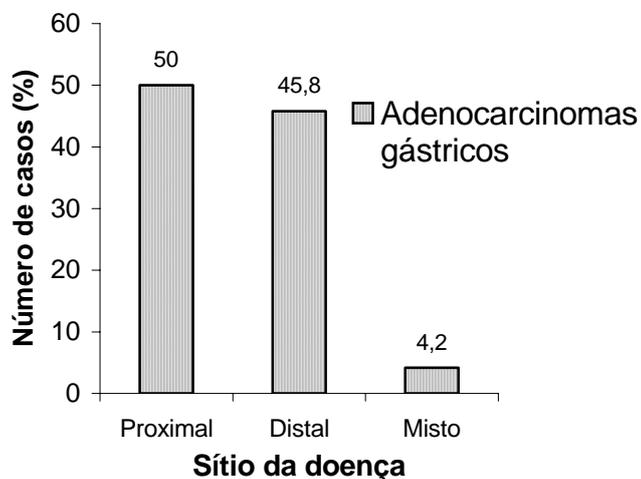


Gráfico 3 – Distribuição (%) dos 29 casos de tumores de acordo com o sítio da doença: proximal e/ou distal à cardia.

O comprometimento de linfonodos regionais foi observado em 78,3% de todos os casos. Pelo gráfico 4 observa-se a distribuição do número de linfonodos comprometidos. Observa-se no gráfico 5 que 25% dos casos apresentavam metástase à distância, 12,5% com ausência de metástase e 62,5% dos casos não foram avaliadas (Gráfico 4 e 5).

Distribuição dos tumores de acordo com o comprometimento de linfonodos regionais

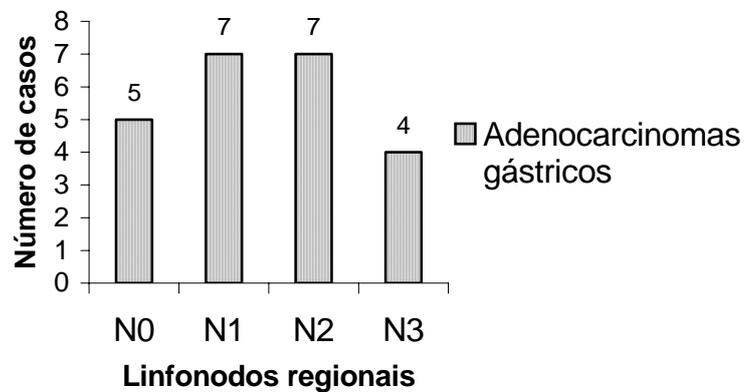


Gráfico 4 – Distribuição das amostra (n=23) de acordo com o número de linfonodos .

Distribuição dos tumores de acordo com metástases à distância

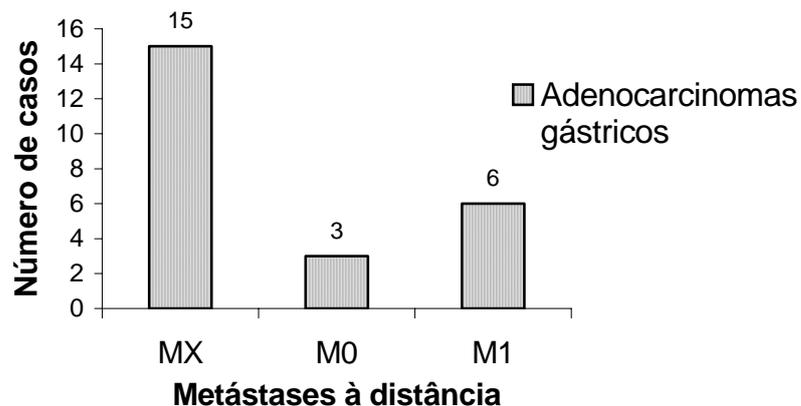


Gráfico 5 - Avaliação de 24 pacientes quanto a presença de metástases à distância.

Em relação ao estadiamento histopatológico, 41,4% dos tumores foram classificados como baixo risco (I – IIIA) e 44,8, alto risco (IIIB – IV), 13,8% não foram possíveis determinar (Gráfico 6).

Distribuição dos tumores de acordo com o estadiamento

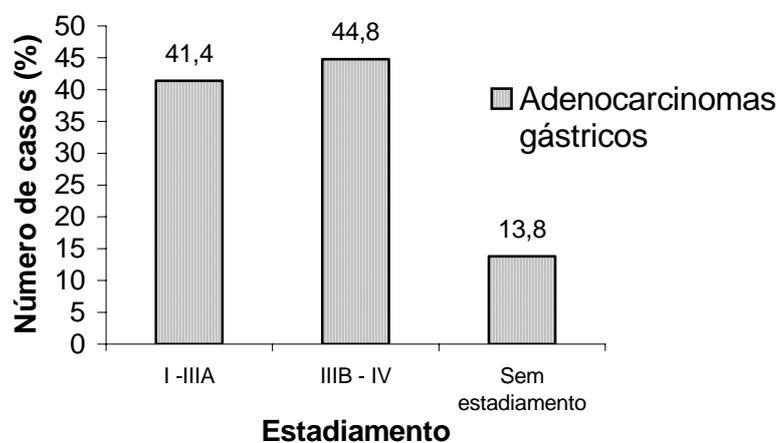
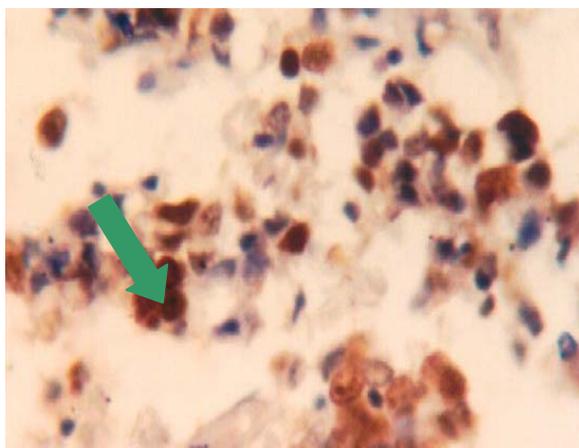


Gráfico 6 – Classificação e distribuição (%) de 29 pacientes com adenocarcinomas de acordo com o estadiamento.

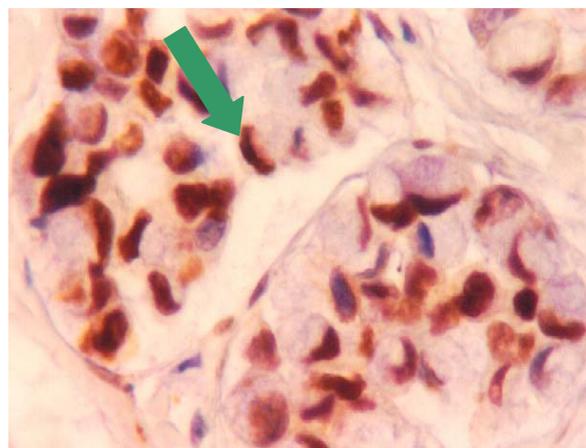
4.2 DETECÇÃO DOS MARCADORES POR IMUNOHISTOQUÍMICA

4.2.1 ASPECTOS GERAIS

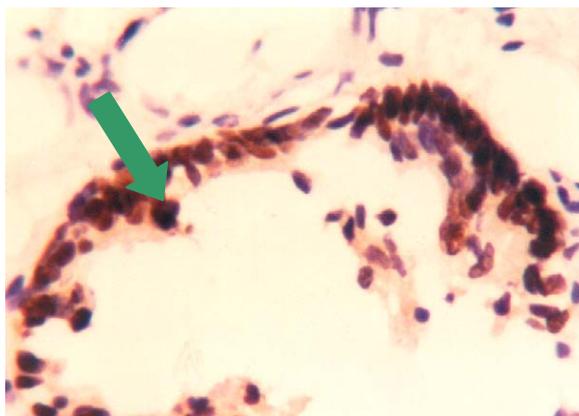
Inicialmente, foi observado o comportamento dos marcadores KI-67, PCNA, p53, bcl-2 e c-myc na amostra total de adenocarcinomas gástricos (figura 11).



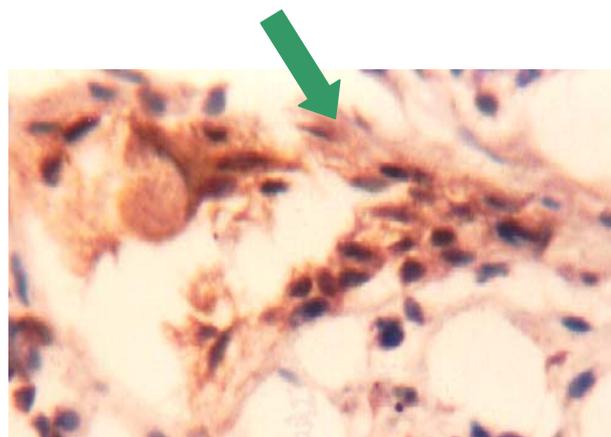
(a)



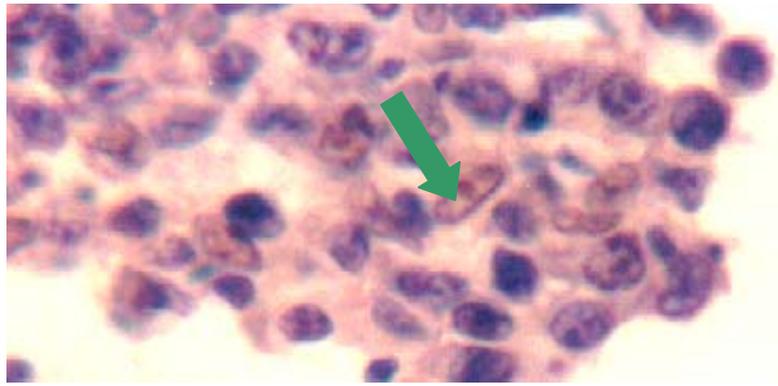
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 11 – Painel dos marcadores KI-67 1:60 (a), PCNA 1:20 (b), p53 1:80 (c), bcl-2 1:80(d) e c-myc 1:100 (e) por imunohistoquímica (IHC).

Foi encontrado 89,3% dos tumores positivos para KI-67, 62,5% para PCNA, 50% para p53, 60,7% para bcl-2 e 66,7% para c-myc (gráfico 7).

Distribuição dos marcadores nos adenocarcinomas gástricos estudados

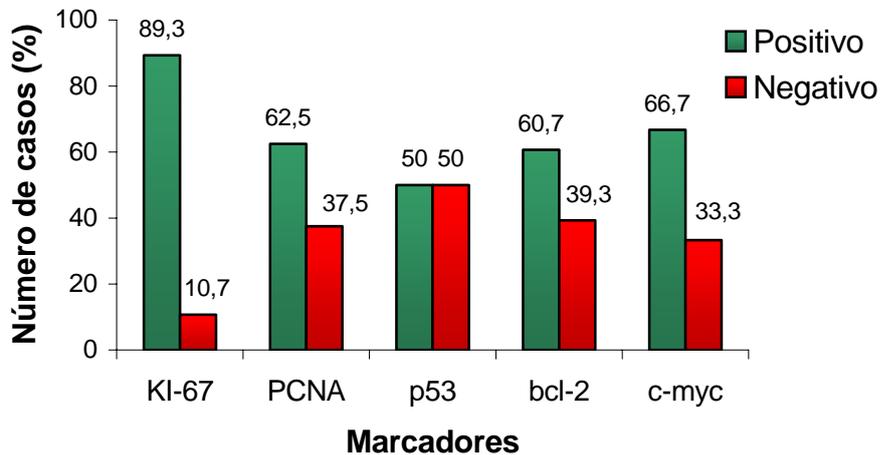


Gráfico 7 - Distribuição (%) da positividade por IHC dos marcadores KI-67, PCNA, p53, bcl-2 e c-myc nas 29 amostras tumorais estudadas.

4.2.2 MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67 E PCNA

4.2.2.1 Comparação da positividade na amostra total

Foi comparado a porcentagem de células marcadas pelo KI-67 e PCNA independente do estadiamento dos tumores. Com isso, observamos que o KI-67 (89,3%) marcou mais tumores que o PCNA (62,5%) e essa diferença teve significado estatístico com $p=0,02$ (gráfico 8).

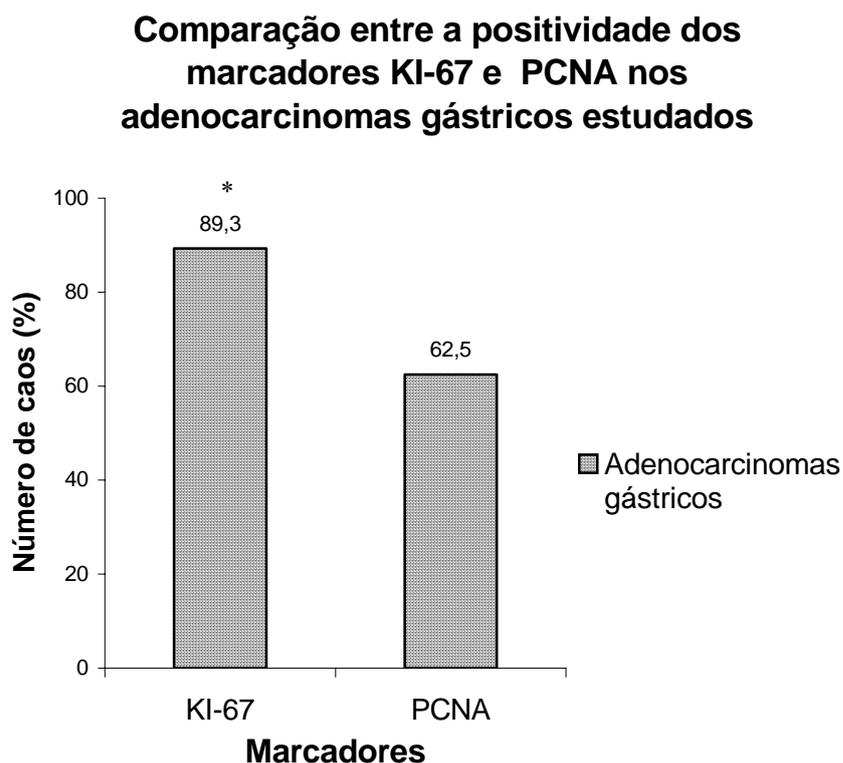


Gráfico 8 - Comparação entre o número de casos marcados positivamente (%) para KI-67 (n=28) e para o PCNA (n=24), por IHC, nos adenocarcinomas gástricos estudados. * $p=0,02$.

4.2.2.2 Contagem das células

Para se ter uma avaliação fidedigna da proliferação celular, é necessário que se tenha uma representatividade boa do tumor, não sendo viável a utilização de biópsia. Com isso, foram contadas 900 células, em três campos diferentes para comparação entre os marcadores KI-67 e PCNA. De acordo com o gráfico 9, não há diferença de número de células marcadas para o antígeno KI-67 nos diferentes graus histopatológicos, sendo o mesmo observado para a proteína PCNA (gráfico 10).

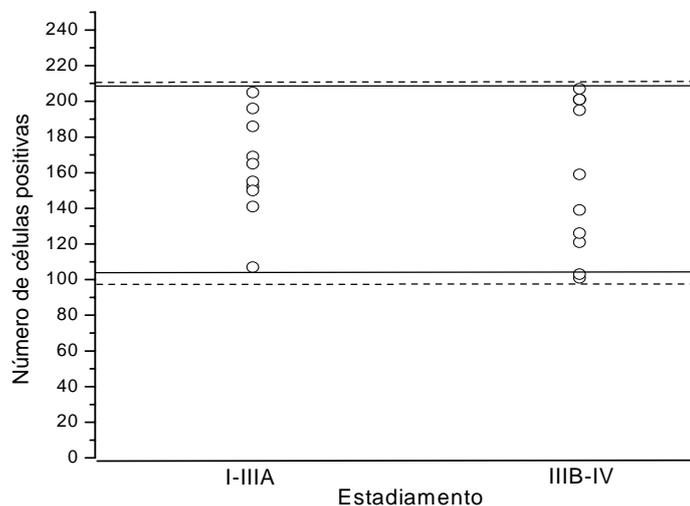


Gráfico 9 - Avaliação do número de células marcadas para o antígeno KI-67. Foram contados 3 campos com 300 células totalizando 900 células marcadas positivamente por IHC em 18 casos de adenocarcinomas gástricos. Em seguida, as amostras foram distribuídas em alto e baixo risco.

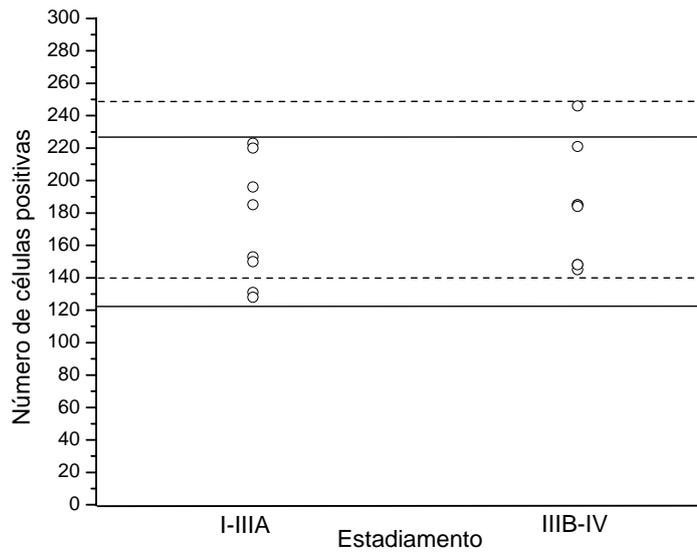


Gráfico 10 - Avaliação do número de células marcadas por IHC para proteína PCNA. Foram contados 3 campos com 300 células totalizando 900 células marcadas positivamente em 14 casos de adenocarcinomas gástricos. Em seguida, as amostras foram distribuídas em alto e baixo risco.

4.2.2.3 Detecção dos marcadores nos diferentes graus histopatológicos

Os marcadores KI-67 e PCNA foram avaliados por imunohistoquímica quanto a marcação positiva nos tumores de alto e baixo risco. Para KI-67, a positividade foi observada em 91,6% dos tumores de baixo risco, enquanto que para os de alto risco foram encontrados 84,6% (gráfico 11). Para o PCNA, 63,7% dos tumores de baixo risco e 61,5% dos tumores de alto risco apresentaram marcação positiva (gráfico 12). Estes resultados mostram que não há diferença estatística de marcação entre os diferentes graus histopatológicos.

Detecção do antígeno KI-67 nos adenocarcinomas gástricos de alto de baixo risco

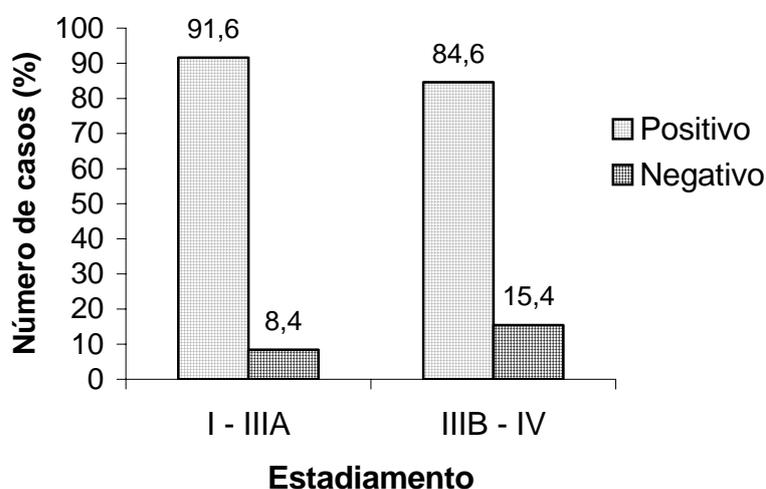


Gráfico 11 – Avaliação e distribuição (%) da positividade do antígeno KI-67, por IHC, em 26 casos de adenocarcinomas gástricos de graus I – IIIA e IIIB – IV.

Detecção da proteína PCNA nos adenocarcinomas gástricos de alto e baixo risco

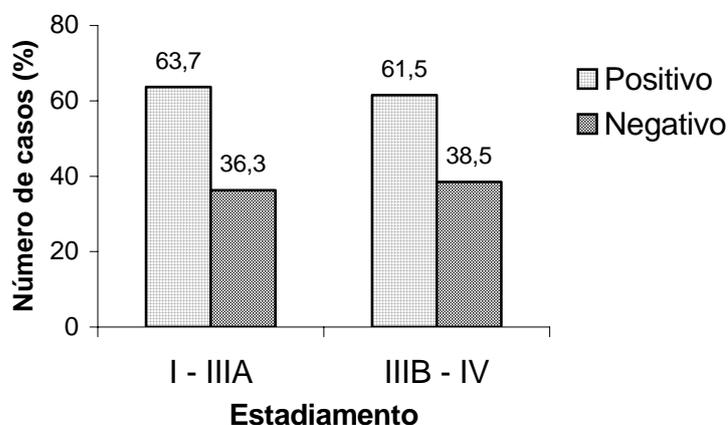


Gráfico 12 - Avaliação e distribuição (%) da positividade da proteína PCNA, por IHC, em 24 casos de adenocarcinomas gástricos de graus I – IIIA e IIIB – IV.

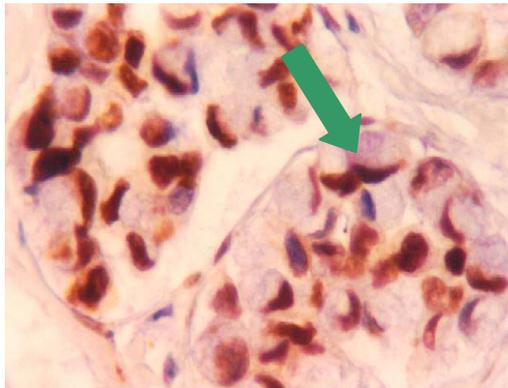
As contagens de células para os dois marcadores foram tabuladas e analisadas para comparação dos dois marcadores entre si e entre os diferentes graus histopatológicos. Para isso foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas (marcadores) nos tumores de alto e baixo risco. Foi observado que os marcadores não diferem entre si ($p=0,302$) e nem diferem nos graus analisados I – IIIA e IIIB – IV ($p=0,762$).

O teste Kappa foi realizado para verificar se há concordância entre os marcadores na proporção de células marcadas positiva e negativamente (positivo, positivo e negativo, negativo). Nos tumores de baixo risco, o índice de concordância foi de $k=0,298$ com $p=0,165$, o que mostrou baixa concordância entre os marcadores. Nos tumores de alto risco, o índice de concordância foi de $k=0,451$, $p=0,052$, o que mostrou concordância regular entre os marcadores, indicando uma possível concordância destes

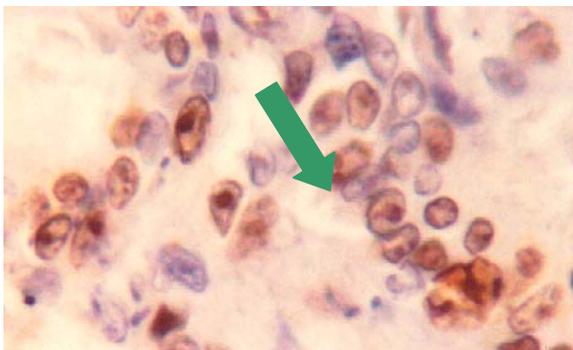
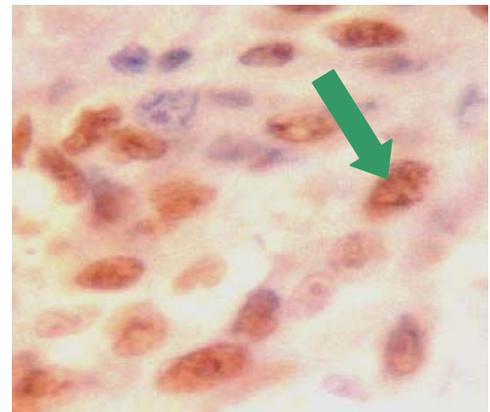
marcadores nestes tumores. Provavelmente este dado apareceria se a amostra fosse aumentada.

4.2.2.4 Padrão e intensidade de marcação

Além da contagem de células marcadas, foi observado os diferentes padrões de marcação tanto para KI-67 como para o PCNA. Três padrões foram encontrados: homogêneo, granular e nucleolar (figura 12). Os dados foram tabulados (tabelas 2 e 3) para ser avaliado se esses padrões de marcação tinham relação com a gravidade da lesão. Nos tumores de baixo risco existe uma tendência do padrão homogêneo para o KI-67 (50%). Para os de alto risco, esse padrão parece ser predominante tanto para KI-67 como para PCNA (54,6% e 55,6%, respectivamente).



a) Homogêneo



c) Nucleolar

Figura 12 – Painel com os padrões de marcação homogêneo, granular e nucleolar por IHC do KI-67 e do PCNA nos adenocarcinomas gástricos.

Tabela 2 - Padrão de marcação nuclear por IHC dos anticorpos KI-67 e PCNA em adenocarcinomas gástricos de baixo risco (I – IIIA).

MARCAÇÃO	KI-67(%)	PCNA(%)
HOMOGÊNEO	50	36.4
NUCLEOLAR	25	27.7
GRANULAR	25	27.2

Tabela 3 - Padrão de marcação nuclear por IHC dos anticorpos KI-67 e PCNA em adenocarcinomas gástricos de alto risco (IIIB – IV).

MARCAÇÃO	KI-67(%)	PCNA(%)
HOMOGÊNEO	54.6	55.6
NUCLEOLAR	36.4	33.3
GRANULAR	0.0	11.1

Em relação a intensidade de marcação, nos tumores de baixo risco, não foi observado marcação forte para ambos os marcadores, já nos de alto risco foi observado uma pequena porção de tumores com marcação forte, 18,5 e 12,5 % para KI-67 e PCNA, respectivamente (tabelas 4 e 5), indicando que não há diferença entre os dois marcadores em relação a intensidade de marcação.

Tabela 4 - Intensidade de marcação nuclear por IHC dos anticorpos KI-67 e PCNA em adenocarcinomas gástricos de baixo risco (I – IIIA).

INTENSIDADE DE MARCAÇÃO	KI-67(%)	PCNA(%)
+	60	62.5
++	40	37.2
+++	0	0

Tabela 5 - Intensidade de marcação nuclear por IHC dos anticorpos KI-67 e PCNA em adenocarcinomas gástricos de alto risco (IIIB – IV).

INTENSIDADE DE MARCAÇÃO	KI-67(%)	PCNA(%)
+ (fraco)	45.4	0
++ (médio)	36.4	87.5
+++ (forte)	18.2	12.5

4.2.3 DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS p53, bcl-2 e c-myc NOS DIFERENTES ESTÁGIOS TUMORAIS

4.2.3.1 Proteína p53

A presença da proteína p53 foi encontrada em 50% dos tumores estudados. Levando em consideração o estadiamento destas amostras, 66,7% foram positivos nos tumores de baixo risco (I – IIIA) e, apenas 16,7% dos casos foram positivos para os tumores de alto risco (Gráfico 13). Este resultado apresentou significância estatística com $p=0.012$.

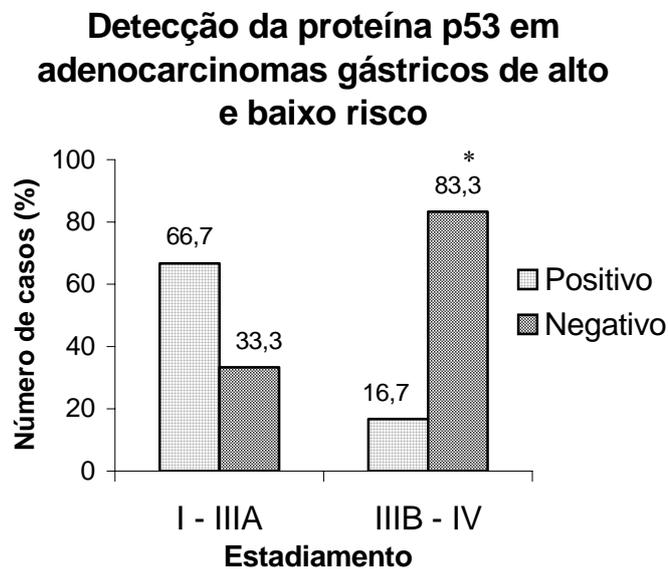


Gráfico 13 - Avaliação da marcação nuclear positiva da proteína p53, por imunohistoquímica, em 25 adenocarcinomas gástricos de graus I – IIIA e IIIB – IV. * $p = 0,02$.

4.2.3.2 Proteína bcl-2

A proteína bcl-2 foi observada em 60,7% das amostras estudadas. A expressão do bcl-2 encontrada em 63,6% e 50% dos tumores de baixo e alto risco, respectivamente, não sendo observado diferença estatística entre os diferentes graus (Gráfico 14).

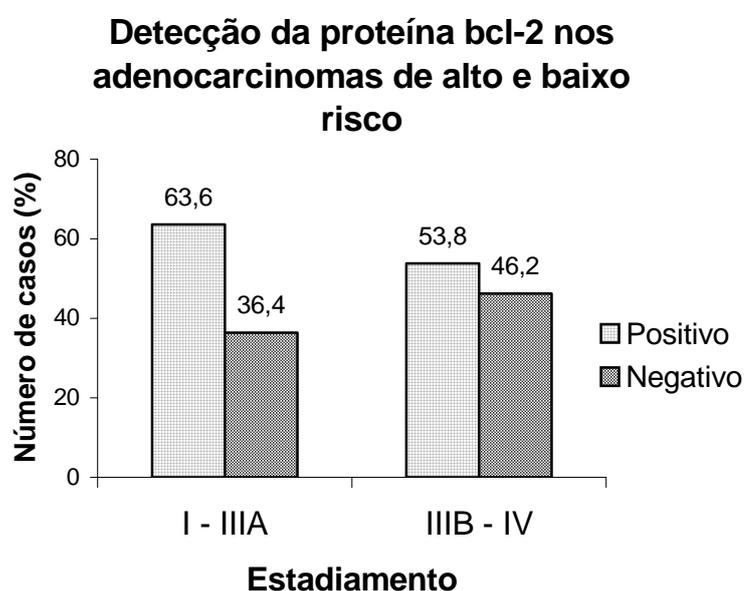


Gráfico 14 - Avaliação da marcação citoplasmática por IHC da proteína bcl-2 em 24 adenocarcinomas gástricos de graus I – IIIA e IIIB – IV

4.2.3.3 c-myc

A proteína c-myc apresentou superexpressão em 66.7% dos tumores estudados. Levando em consideração o estadiamento, 33% dos tumores de baixo risco e 66.7% dos tumores de alto risco apresentaram positividade para a proteína c-myc (gráfico 15). Não foi observada diferença estatística entre os dois graus.

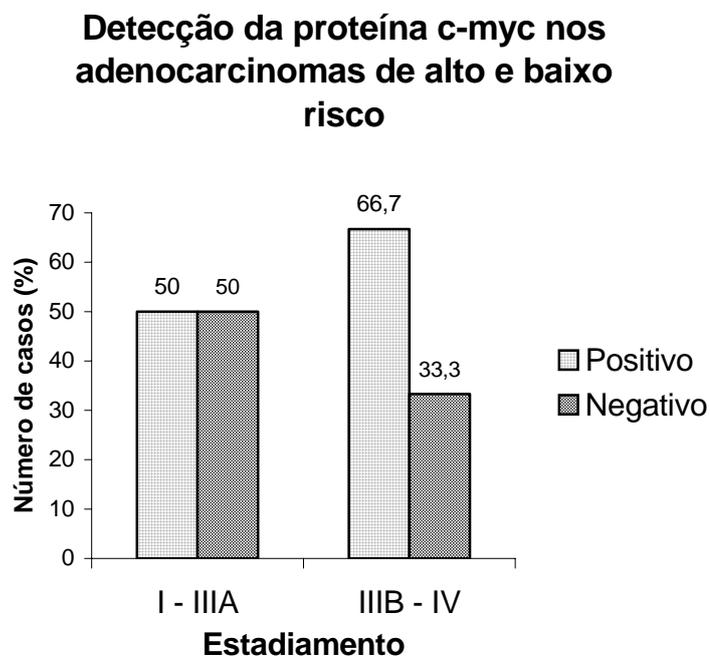


Gráfico 15 - Avaliação da marcação nuclear por IHC do marcador c-myc em 26 adenocarcinomas gástricos de graus I – IIIA e IIIB – IV

4.2.4 ANÁLISE COMBINATÓRIA DO p53 COM OS DEMAIS MARCADORES

Foi realizado uma comparação entre o p53 e os demais marcadores para avaliação das vias dependentes e independentes do p53 nos diferentes graus tumorais.

4.2.4.1 KI-67 e p53

De acordo com o gráfico, podemos observar que a concordância de positividade entre KI-67 e p53 é predominante nos tumores de baixo risco (58,33%) enquanto que nos de alto risco a positividade do KI-67 é discordante de p53 (gráfico 16). A diferença entre os dois padrões de associação foi significativa nos tumores de alto risco, apresentando um $p = 0,012$, indicando que a proliferação celular nestes tumores independe da mutação do p53.

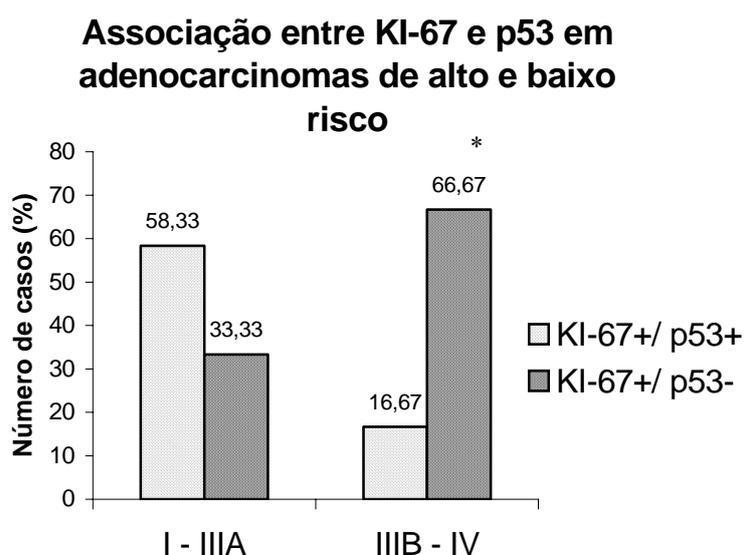


Gráfico 16 – Estadiamento e a positividade por IHC do antígeno KI-67 e a positividade e negatividade da proteína p53, em 24 adenocarcinomas gástricos. * $p = 0,012$.

4.2.4.2 PCNA e p53

De acordo com o gráfico foi observado que nos tumores de baixo risco há mais casos positivos para ambos os marcadores (54,54%). Já nos tumores de alto risco, o gráfico sugere que há mais casos com PCNA+/p53 – (41,67%) (gráfico 17). Não foi observado diferença estatística entre as combinações dos marcadores e nem entre os graus.

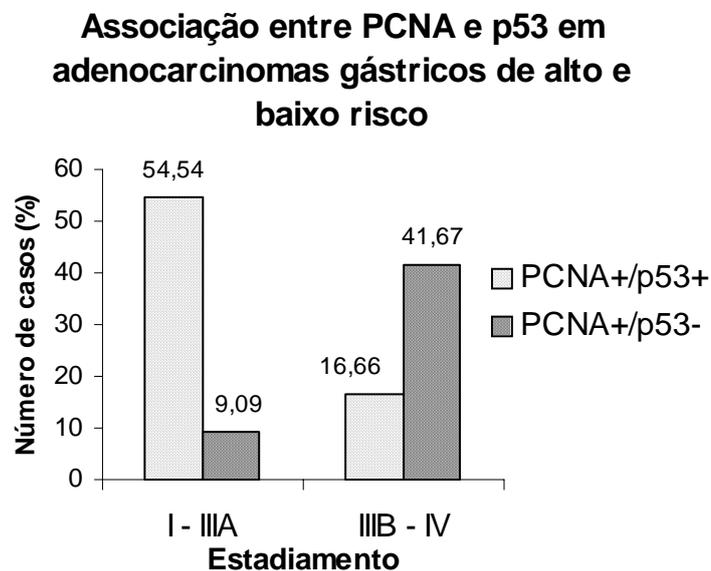


Gráfico 17 - A associação entre a positividade por IHC da proteína PCNA e a positividade e negatividade da proteína p53, em 23 adenocarcinomas gástricos

4.2.4.3 bcl-2 e p53

Na associação entre p53 e bcl-2 nos tumores de baixo risco, aproximadamente metade dos casos (54.54%) apresentaram positividade para os dois marcadores. O oposto ocorre nos tumores de alto risco, onde 50% dos tumores apresentam negatividade para os dois marcadores. Há uma discreta presença da associação bcl2+/p53- nos tumores de alto risco (33.33%) (gráfico 18). Não foi observado diferença estatística entre as associações dos marcadores e nem em relação aos graus histopatológicos.

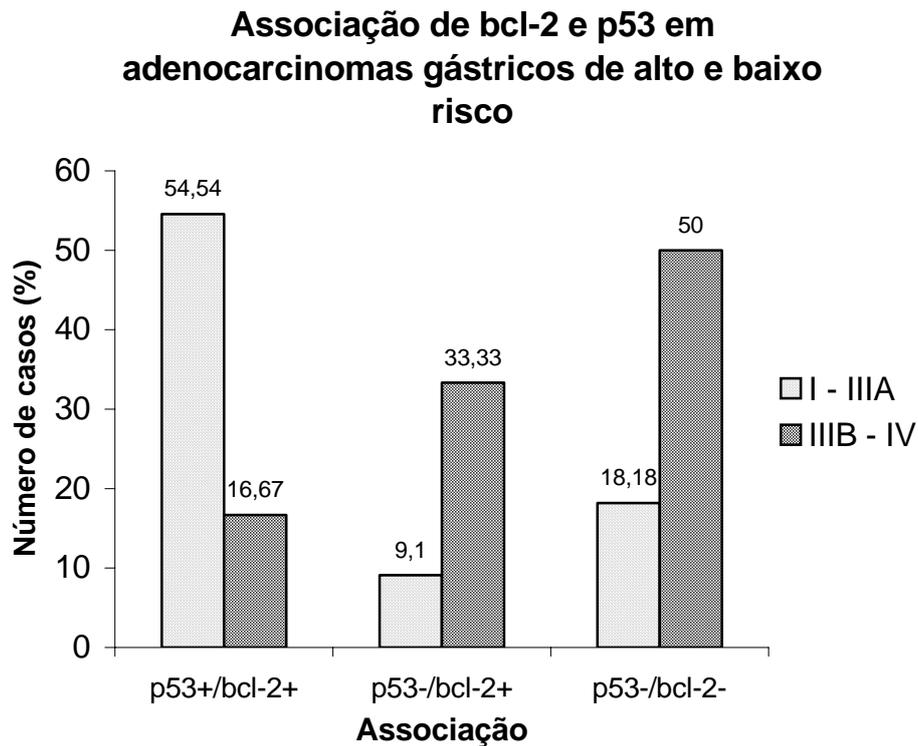


Gráfico 18 - A comparação (%) entre a positividade e a negatividade do p53 e do bcl-2 por IHC em 23 adenocarcinomas gástricos.

4.2.4.4 c-myc e p53

Para a associação entre p53 e c-myc, foram considerados negativos os tumores com marcação citoplasmática. Nos tumores de baixo risco, 25% dos casos foram positivos para ambos os marcadores. Para os tumores de alto risco 63,64% marcou para p53-/c-myc+ (gráfico 19). Foi observada diferença estatística nos tumores de alto risco quando comparamos c-myc+/p53+ e c-myc+/p53-, com $p = 0,02$.

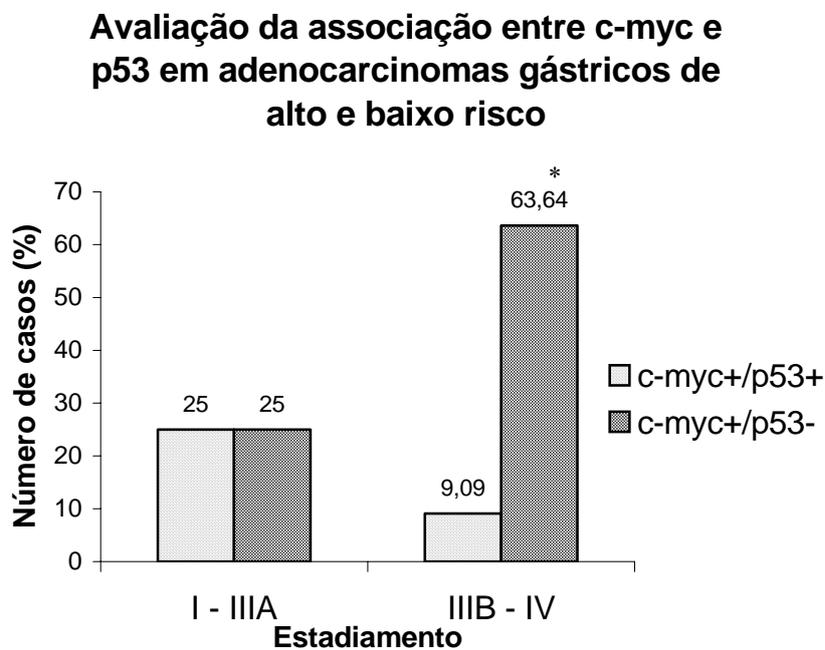


Gráfico 19 - A associação entre a positividade por IHC da proteína c-myc e a positividade e negatividade da proteína p53 em 19 adenocarcinomas gástricos. * $p = 0,02$.

4.2.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE p53, bcl-2 e c-myc NOS TUMORES DE ALTO E BAIXO RISCO

Com relação a associação entre os três marcadores, foi observado que nos tumores de baixo risco, há uma discreta tendência à positividade dos três marcadores (28,57%). Para os tumores de alto risco, há uma tendência da associação p53-/bcl-2-/c-myc+ (45,45%) (gráfico 20).

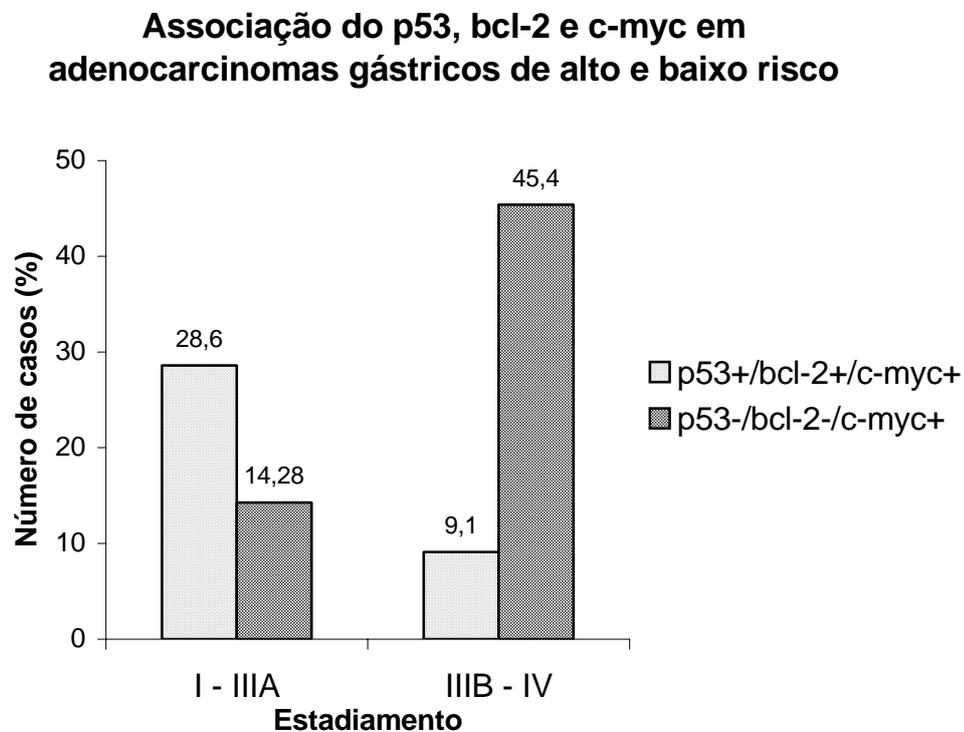


Gráfico 20 – A associação entre a positividade por IHC da proteína c-myc e a positividade e negatividade da proteína p53 e bcl-2. em 18 adenocarcinomas gástricos.

4.3 ANÁLISE MOLECULAR

4.3.1 Extração de DNA e PCR

A extração de DNA pelo método do CTAB foi satisfatória. O gel abaixo mostra que bastante material foi extraído, sendo este de boa qualidade (figura 13). Para confirmação de que as ampliações foram satisfatórias, estas foram submetidas a corrida eletroforética, sendo observado que estas haviam sido bem sucedidas (figura 14).

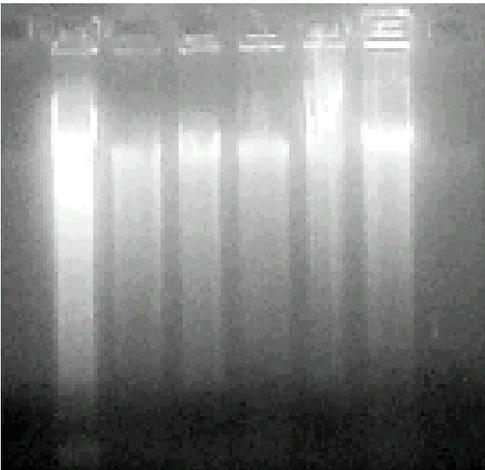


Figura 13 – Gel de agarose com DNA genômico tumoral

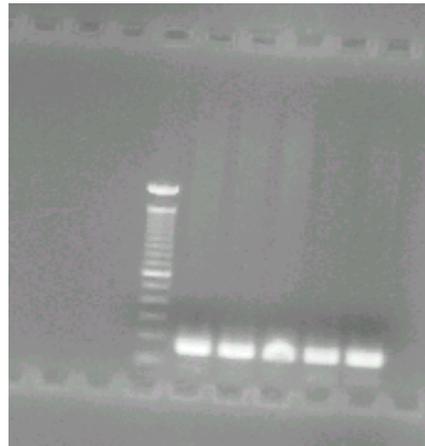


Figura 14– Produto amplificado do gene p53

4.3.2 SSCP do gene p53

As amostras analisadas demonstraram que 4 tumores (1, 4, 9 e 10) apresentaram mutação para o éxon 5 (figura 15), 2 tumores (12 e 25) para o éxon 7 e nenhuma para o éxon 8 (figura 16). Os outros não apresentaram mutação para proteína p53 nos éxons analisados.

1 2 4 7 8 9 10 11 12 14 13 15 16 20 22 23 24 25 26

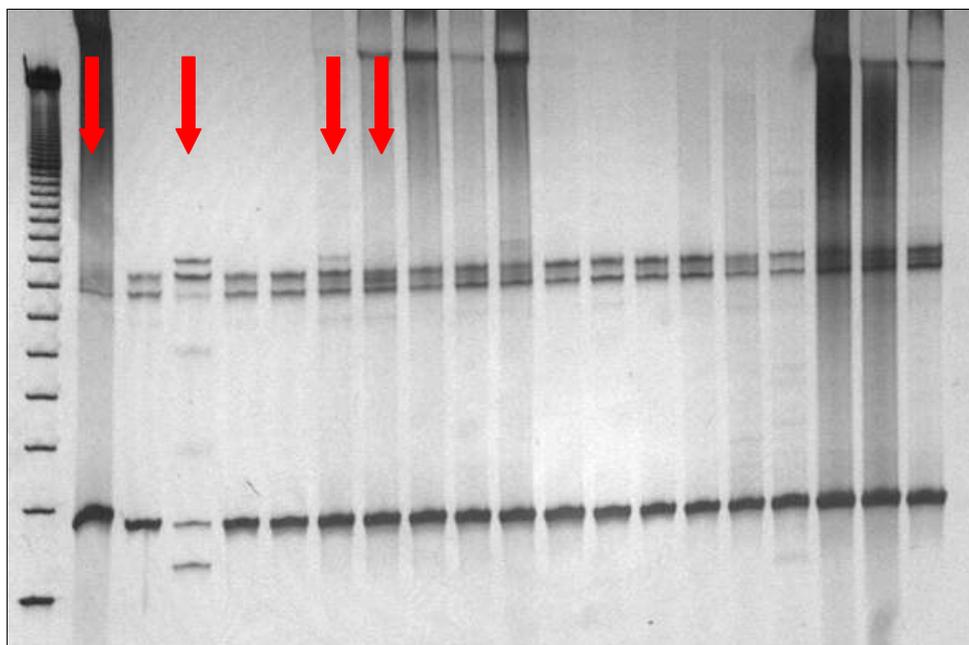
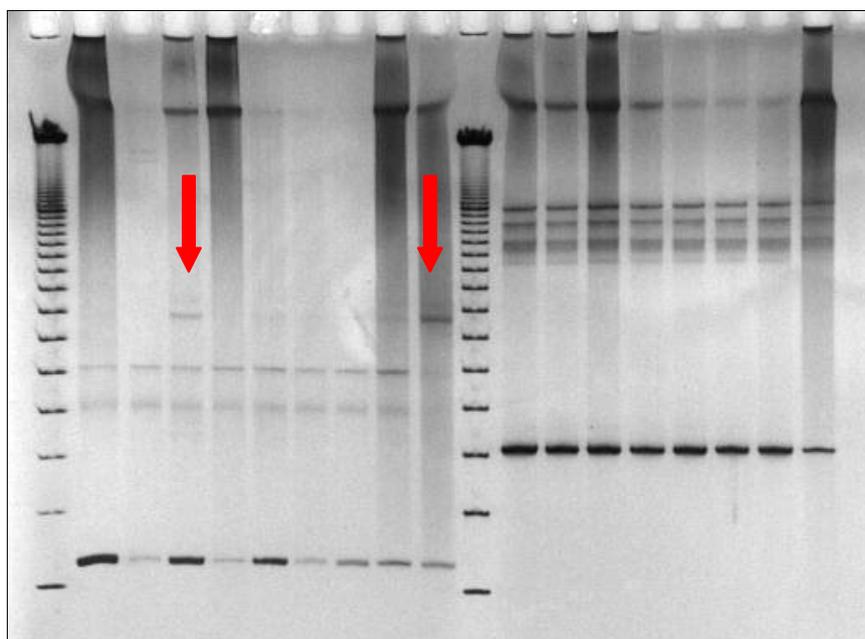


Figura 15 - GeneGel para análise do SSCP do éxon 5 do gene p53. No primeiro poço com o marcador de peso molecular e os demais com as amostras dos pacientes

1 9 12 14 20 22 23 24 25 1 10 11 12 14 16 20 24



(a)

(b)

Figura 16 - GeneGel para análise de mutações do éxon 7 (a) e 8 (b).

4.3.4. COMPARAÇÃO ENTRE A IMUNOHISTOQUÍMICA E OS TUMORES MUTADOS NO SSCP

Quando comparamos as duas técnicas, observamos que há concordância entre a técnica em um tumor (paciente 1) e discordância nos tumores dos pacientes 4, 10, 12 e 25.

Tabela 6 – Comparação entre as mutações encontradas no SSCP e os achados imunohistoquímicos

Paciente	SSCP	IHC
1	+	+
4	+	-
10	+	-
12	+	-
25	+	-

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A progressão de uma lesão pré-neoplásica para uma lesão cancerosa é acompanhada por um acúmulo de mudanças genéticas, levando a alterações de expressão e modificações na estrutura e função de diferentes proteínas. No câncer, um dos fatores preponderantes é a desregulação do ciclo celular e/ou o desarranjo no balanço apoptótico. A diferença entre os tipos de cânceres reside não apenas a nível tecidual, mas também a nível molecular.

As alterações que ocorrerem exclusivamente ou mais comumente nas células neoplásicas podem ser detectadas e usadas como marcadores moleculares do câncer. Esses marcadores são úteis em determinar o câncer em estágios precoces, em acessar tumores *in situ*, monitorar a progressão e ainda, determinar respostas à terapia (Sidransky, 2002). Para isso, os marcadores devem ser utilizados de forma conjunta entre si para que diferentes vias de ativação possam ser acessadas, sendo descoberto novos alvos que irão auxiliar no prognóstico e desenvolvimento de novos tratamentos e novas drogas anti-câncer.

Muitas das novas terapias utilizando alvos moleculares não atuam por mecanismos citotóxicos convencionais (fuso mitótico, intercalando DNA, entre outros). Ao invés disto, elas atuam em alvos específicos no crescimento tumoral. Como exemplo podemos citar: o Mesilato de Imatinib (Gleevec[®])- inibidor da proteína tirosina-quinase que inibe a Bcr-Abl tirosina-quinase, a proteína constitutiva anormal criada pelo cromossoma Filadélfia na Leucemia Mielóide Crônica (LMC), ZD-1839 (Iressa[®]) - bloqueia o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) sendo pesquisado para o tratamento de câncer de pulmão, trastuzumab (Herceptin[®])- bloqueia uma proteína transmembrânica HER 2 (erb-b₂) para tratar mulheres com câncer de mama, entre

outros utilizados na prática clínica. Muitos destes medicamentos estão em ensaios clínicos, como por exemplo o Erlotinib (fase III) que bloqueia o EGFR.

Para muitos tumores não existem, ainda, marcadores moleculares disponíveis. Novos marcadores poderiam auxiliar o clínico a identificar pacientes que possuíssem tumores mais agressivos e requisitassem tratamentos específicos e imediatos, diminuindo os riscos de resistência à terapia e até mesmo aumentando a sobrevida. Baseado neste fato foi desenvolvido um modelo de estudo com marcadores moleculares que estão envolvidos no câncer gástrico. Isso por que, dentro dos variados tipos de câncer, no Ceará, o câncer de estômago apresenta-se como a segunda causa de morte entre mulheres e homens (INCA, 2003). A literatura acerca dos marcadores moleculares no câncer de estômago não é vasta. O número de amostras diretamente da cirurgia foi pequeno por se tratar de um câncer com sintomas inespecíficos, semelhantes aos da gastrite, os pacientes que chegam à cirurgia muitas vezes já apresentam tumores em estágios bastante avançados não sendo possível a coleta de amostras.

A distribuição de acordo com o sexo (20,7% do sexo feminino e 79,3% do sexo masculino), está de acordo com os índices encontrados na literatura para o câncer de gástrico. A faixa etária predominante destes pacientes (61 – 70 anos de idade) também está de acordo com o INCA (2003), onde 65% dos pacientes com câncer de estômago tem mais de 50 anos de idade e o pico de incidência se dá por volta dos 70 anos. A literatura acerca da classificação histopatológica de Lauren (1965) não relata qual tipo histológico predomina, se o intestinal ou o difuso. Nas amostras analisadas tivemos porcentagens semelhantes (48,1% intestinal, 40,7% difuso e 11,2% misto). Em relação ao sítio do tumor, proximal e/ ou distal, está sendo observado que, atualmente, há mais casos proximais do que distais (Corella & Guillén, 2001). Nesse estudo observa-se uma tendência para localização proximal (50%).

A proliferação celular é um parâmetro importante no estudo dos tumores, sendo os marcadores mais utilizados o KI-67 e o PCNA. A literatura a respeito destes marcadores é controversa ao que se refere ao câncer de estômago. Diferentes associações tentam correlacionar estes marcadores com prognóstico, sobrevida, tipo histológico, comprometimento linfonodal e metástase (Sundblad & Tamayo, 1995; Muller *et al.*, 1996; Broll *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999; Elpek *et al.*, 2000; Terada *et al.*, 2001). A comparação da positividade do KI-67 e do PCNA observada em nossos estudos, revelou que o KI-67 marca um maior número de tumores que o PCNA e essa diferença é significativa ($p = 0,02$). Como a proliferação celular é importante para o crescimento e disseminação tumoral, o KI-67 seria o marcador mais indicado para estudar nos adenocarcinomas gástricos. Quando avaliamos os dois marcadores nos tumores de alto e baixo risco, observamos que não há diferença de expressão destas proteínas. Isso significa que estes tumores estão proliferando e que a associação com outros marcadores pode indicar qual a via envolvida na ativação da proliferação, sendo esta discutida posteriormente.

O papel do supressor tumoral p53 com suas funções de reparo do dano ao DNA e apoptose é bastante discutida nos diferentes tumores. A literatura sobre o papel do p53 no câncer de estômago ainda é controversa. A positividade do p53 parece estar relacionada às metástases linfonodais e à distância, prognóstico ruim, diminuição da sobrevida e sensibilidade à quimioterapia (Setela L *et al.*, 1998; Sanz-Ortega *et al.*, 2000; Terada *et al.*, 2001; Liu XP *et al.*, 2001; Hosaka N *et al.*, 2001). No estudo proposto, o p53 foi superexpresso em 50% dos casos, sendo este dado semelhante (43%) ao observado por Liu *et al.* (2001). Já Lee JW (1998) observou positividade do p53 em apenas 20,2% dos tumores estudados.

Em relação a detecção do p53 e o grau histopatológico, a amostra estudada a positividade do p53 (66,7%) dos adenocarcinomas gástricos de baixo risco e apenas 15,4% nos de alto risco ($p=0,012$), concorda com Ikeguchi et al (1999) e discorda de Lee *et al.* (1998) e Liu et al (2001) que afirmam não existir diferença de expressão nos tumores de alto e baixo risco. Essa observação pode sugerir que os tumores de alto risco apresentam uma via de ativação independente de p53 e os de baixo risco dependente de p53.

As vias tumorigênicas envolvem diferentes genes. A associação entre os marcadores é importante na determinação das vias de ativação envolvidas nos diferentes tumores.

A associação entre KI-67 e p53 os nossos resultados mostram que apesar do p53 não estar mutado nos tumores de alto risco, estes continuam proliferando, reforçando a hipótese de que realmente existe uma via alternativa de proliferação nestes tumores. O mesmo foi observado por Ikeguchi *et al.* (1999). O mesmo não foi observado quando utilizado o PCNA, o que permite escolher o KI-67 como mais indicado para acessar a proliferação celular nos adenocarcinomas gástricos.

O papel da proteína antiapoptótica Bcl-2 não está elucidado no câncer de estômago. Nas amostras estudadas, 60,7% apresentam superexpressão de Bcl-2. Em estudos anteriores, Lauwers *et al.* (1995) e Muller *et al.* (1998) afirmam que 72% e 11,4% de suas amostras estudadas apresentavam superexpressão de Bcl-2. Os nossos resultados sugerem que há um discreto aumento de bcl-2 nos tumores de baixo risco (63,6%). Esse dado está de acordo com Sundblad & Tamayo (1995) que afirma que há um aumento de Bcl-2 nos estágios iniciais da carcinogênese gástrica, sendo esta expressão mantida por apenas uma pequena porção de células. Além disso, Muller et al

(1998) afirma que há uma maior expressão de bcl-2 nos adenocarcinomas bem e moderadamente diferenciados.

A associação do bcl-2 com o p53 revelou indícios da via nos tumores de baixo risco, onde 54,54% versus 16,67% destes tumores apresentaram positividade para os dois marcadores. O mesmo não foi observado nos tumores de alto risco. A superexpressão da proteína antiapoptótica pode ser associada à perda da supressão do p53 que inibe a expressão dessa proteína permitindo a proliferação celular. Esta observação abre novos horizontes para o entendimento das vias de ativação nos tumores de baixo risco, onde a via da apoptose parece estar envolvida. Esta via também pode sugerir que apesar de ser tumores ditos de baixo risco, estes podem ser mais resistentes à drogas quimioterápicas que levem à apoptose.

O fator de transcrição c-myc vem sendo bastante estudado nos diferentes tipos de tumores. A superexpressão de c-myc foi observada em 66,7% das amostras estudadas. Apenas dois trabalhos se referem aos tumores gástricos e a expressão de c-myc na literatura. Nos estudos realizados por Spandidos *et al.*(1991) e Han *et al.* (1999) foi observado que 55,4% e 42,4% de suas amostras eram positivas para c-myc e esta positividade foi correlacionada a invasão e a proliferação celular, respectivamente.

O comportamento do c-myc quando associado ao p53 levou a determinação de uma segunda via de ativação envolvida nos adenocarcinomas gástricos. Foi observado que os tumores de alto risco apresentam superexpressão do c-myc independente da mutação do p53, sendo esta estatisticamente significativa ($p = 0,02$). Como nos tumores de alto risco a via parece ser independente de p53, e a proliferação está ativa, o c-myc parece ter papel importante nesta via, contribuindo para o avanço da progressão tumoral.

Quando combinado os três marcadores, p53, bcl-2 e c-myc, esta associação revelou uma tendência da negatividade dos marcadores p53 e bcl-2 com a positividade do c-myc (45,4%) nos tumores de alto risco, confirmando a hipótese das vias alternativas.

No presente estudo, foi observado que quatro tumores apresentaram mutação pela técnica do SSCP, sendo o resultado contrário na técnica de imunohistoquímica. A diferença na positividade encontrada nos marcadores estudados, especialmente o p53, pode ser devido a diferenças de protocolos e presença de mutações não detectadas no tecido estudado. Além disso, nos casos inversos, deve-se levar em consideração que existem outros éxons considerados “hotspots” para mutações no gene p53, sendo necessário a análise de todos eles (éxons 5, 6, 7, 8 e 9). Isso reforça o uso de técnicas com base no DNA, como SSCP, para confirmar os resultados da imunohistoquímica.

Outros estudos serão desenvolvidos para confirmar as observações deste trabalho. O aumento do número de análise pelo SSCP e o sequenciamento do p53 revelará se esta proteína está realmente inalterada nos tumores de alto risco. Além disso, outros marcadores como EGFr (receptor do fator de crescimento epidermal) e p21ras (GTPase) serão utilizados para identificar se estes estão envolvidos na sinalização dos adenocarcinomas gástricos.

A literatura acerca destes marcadores é escassa e a maioria dos estudos com câncer de estômago mencionados neste trabalho é de origem Oriental. Como esse tipo de câncer está bastante correlacionado a fatores ambientais, provavelmente as substâncias envolvidas na tumorigênese gástrica seja diferente nos diferentes continentes, sendo necessário mais estudos sobre o assunto no nosso país.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

As observações nos levaram a sugerir que o marcador mais indicado para acessar a proliferação celular é o KI-67. Além disso, pode-se sugerir a existência de duas vias de ativação da proliferação envolvidas no câncer de estômago. Uma nos tumores de baixo risco, onde a via é dependente de p53, independente de c-myc e apresenta superexpressão de bcl-2 e outra independente de p53 nos tumores de alto risco, onde se observa superexpressão de c-myc. O estudo destes marcadores revelou diferentes vias onde estas podem ser importantes para o clínico, auxiliando no prognóstico e na terapêutica, podendo identificar tumores mais resistentes à quimioterapia e à radioterapia. Os estudos moleculares devem ser completados para que conclusões sobre a correlação entre a imunohistoquímica e SSCP sejam mais fidedignas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Cancer Society - ACS. Stomach cancer. Enviado por e-mail e capturado em 03/03/2001 no site: www.cancer.org
- BERTRAM, J S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p.167-223, 2001.
- BOUKER *et al.* Tp53 gene therapy: a key to modulating resistance to anticancer therapies? **Molecular Medicine Today**, v.6, p. 358-64, 2000.
- BROLL *et al.* Assesment of the proliferation index in gastric carcinomas with the monoclonal antibody MIB-1. **J Cancer Res Clin Oncol**, v124(1), p.49-54, 1998.
- BROWN & GATTER. Monoclonal antibody Ki-67:its use in histopathology. **Histopathology**, v.17, p.489-503, 1990.
- CAI *et al.* Stable expression of wild-type p53 gene in human lung cancer cells after retrovirus-mediated gene transfer. **Hum. Gene Ther**, v. 4, p.617-624, 1993.
- CARSON & LOIS. Cancer progression and p53. **Lancet**. 14;346(8981), p.1009-11.1995.
- CHANG & SEYMOUR. Non-viral methods for gene transfer. **In. Curr. Opin. Mol.Ther**, v. 2, p.113 –220. 2000.
- COLL *et al.* Antitumor activity of bax and p53 naked gene transfer in lung cancer: in vitro and in vivo analysis. **Hum. Gene Ther**, v. 9, p. 2063 –2074, 1998.
- CORELLA & GUILLÉN. Dietary habits and epidemiology of gastric carcinoma. **Hepatogastroenterology**, v.48(42), p.1537-43, 2001.
- DASGUPTA *et al.* MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein. **Gene**. v.242, p.15-29, 2000.

- DIEZ *et al.* P53 protein expresión in gastric adenocarcinoma. Negative predictor of survival after postoperative adjuvant chemotherapy. **Anticancer Res**, v.20(5C), p.3929-33, 2000.
- EL-DEIRY *et al.* Bax is a transcriptionas target and mediator of c-myc-induced apoptosis. **Cancer Res**, v.60, p.6318-25, 2000.
- ELPEK *et al.* Microvessel count, proliferating cell nuclear antigen and KI-67 indices in gastric adenocarcinoma. **Pathol Oncol Res**, v.6(1), p.59-64, 2000.
- ESPINOZA, L.A. *et al.* Pathological and karyotypic abnormalities in advanced gastric carcinomas. **Cancer Genet. Cytogenet**, v.109, p.45-50, 1999.
- EVAN *et al.* Apoptosis regulators and theirs role in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1551, p. F1 –F37, 2001.
- FEDRIGA *et al.* Relation between food habits and p53 mutational spectrum in gastric cancer. **International Jornal of Oncology**, v.17 (1), p.127-133, 2000.
- FLENGHI *et al.* Immunohistochemical evaluation of percentage of proliferating cells in pathological bone marrow and peripheral blood samples with the Ki-67 and anti-bromo-deoxiuridine monoclonal antibodies. **British Journal of Haematology**, v.69, p.311-320, 1988.
- FUJIWARA *et al.* Induction of Chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild type p53 gene. **Cancer Res**, v.54, p.2287-2291, 1994.
- GALLAGHER & BROWN. p53-oriented cancer therapies: current progress. **Ann. Oncol**, v.10, p.139 –150, 1999.
- GAMALLO *et al.* Correlation of p53 oncoprotein expression with chemotherapy response in small cell lung carcinomas. **Lung cancer**, v.34, p.67-74, 2001.

- GERDES *et al.* Production of monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Inter. J. Cancer**, v.31, p.13-20, 1983.
- GURNANI *et al.* Adenovirus mediated p53 gene therapy has greater efficacy when combined with chemotherapy against human head and neck, ovarian, prostate, and breast cancer. **Cancer Chemother. Pharmacol**, v.44, p.143 –151, 1999.
- HAN *et al.* c-myc expression is related with cell proliferation and associated with poor clinical outcome in human gastric cancer. **J Korean Med Sci**, v.14(5), p.526-30, 1999.
- HEISE *et al.* ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific histolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. **Nat. Med**, v.3, p.639 –645, 1997.
- HOSPITAL AC CAMARGO Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer - Departamento de Cirurgia. Captura em: 25/11/2001 no site: www.hcanc.org.br
- HOSAKA *et al.* Correlation of immunohistochemical p53 labeling index with inhibition rate in chemosensitivity test in gastric and colon câncer. **Anticancer Res**, v.21, p.229-36, 2001.
- INADOMI *et al.* Immunohistochemical evaluation of the probability of skin metastasis in gastric cancer. **Eur J Dermatol**, v.9(3), p.214-7, 1999.
- Instituto Nacional do Câncer - INCA. Câncer de estômago. Capturado em 10/01/2003 no site: www.inca.org.br.
- INCA. Estatísticas. Instituto Nacional do Câncer. Capturado em: /05/2003 no site: www.inca.gov.br.
- KARDINAL & YABRO. A conceptual history of cancer. **Semin Oncol**, v.6(4), p.396-408,1979.

- KAUFMANN SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. **Cancer Res**, v.49, p.5870-8, 1989.
- KHUN *et al.* A control trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. **Nat. Med**, v.6, p.879–885, 2000.
- KONNO *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of thymidine phosphorylase and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. **Cancer Letters**, v.166, p.103-111, 2001.
- KUBBA & MACLINTYRE. Gastric cancer distal to the cardia – prevention or cure? **Surgical Oncology**, v.6 (2), p.111-124, 1997.
- KUNISAKI *et al.* Prognostic factors in early gastric cancer. *Hepato-Gastroenterology*. 48 (37): 294-98.2001.
- KUPITZA *et al.* The myc dualism in growth and death. **Mutation Res**, v.437, p.205-17, 1999.
- LANE DP. p53 guardian of the genome. **Nature**, v.358, p.15-6, 1992.
- LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at histoclinical classification. **Acta Pathol. Microbiol. Scand**, v.64, p.31-49, 1965.
- LAUWERS *et al.* Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. **Cancer**, v.75(9), p.2209-13, 1995.
- LEWIN, B. Genes VII. New York: **Oxford Press**, p.892-3, 2000.
- LIU *et al.* Expression of p21^{WAF1/CIP1} and p53 proteins in gastric carcinoma: its relationships with cell proliferation activity and prognosis. **Cancer Lett**, v.170, p.183-189, 2001.

- LOHRUM & VOUSDEN. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. **Trens in Cell Biology**, v.10, p.197-202, 2000.
- MITA & SHIMODA. Risk factors for lymph node metastasis of submucosal invasive differentiated type gastric carcinoma:clinical significance of histological heterogeneity. **J Gastroenterol**, v.36(10), p.661-8, 2001.
- MONTENARH M. Functional implications of the growth-supressor/oncoprotein p53. **Int J Oncol**, v.1, p.37-45, 1992.
- MOOLTEN, F L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. **Cancer Res**, v.46, p.5276-5281, 1986.
- MOOLTEN & WELLS. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. **J. Natl. Cancer. Inst**, v.82, p.297-300, 1990.
- MULLER *et al.* Immunohistochemical study on the prognostic value of MIB-1 in gastric carcinoma. **Br J Cancer**, v.74(5), p.759-65, 1996.
- OLIVEIRA, PF Avaliação dos efeitos da Hipertermia associada à quimioterapia em tumores experimentais implantados no estômago de ratos. Fortaleza-CE, 1997. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-Graduação.
- ORIETA *et al.* Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase Chain reaction. **Genomics**, v.5, p.874-879, 1989.
- PERERA, F.P. Environment and Cancer: Who Are Susceptible? *Science*. Vol.278.1997.
- PIETTE *et al.* MDM2:life without p53. **Trends in Genetics**, v.17(8), p.459-64, 2001.
- PIROLLO *et al.* p53 mediated sensitization of squamous cell carcinoma of the head and neck to radiotherapy. **Oncogene**, v.14, p.1735-1746, 1997.

- RABENHORST *et al.* Marcadores de proliferação celular. **Rev. Bras. Pat. Clin**, v.29(1), p.24-29, 1993.
- RABENHORST, S. H. B *et al.* Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Rev. Bras. Cancerol**, v.40 (3), p.141-147, 1994.
- ROBERTS *et al.* Expression of p53 protein as a prognostic factor in patients with gastric cancer. **European J Cancer**, v.32 (2), p.215-20, 1996.
- ROTH *et al.* Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors in patients with lung cancer. **Nat. Med**, v.2, p.985 –991, 1996.
- SANZ-ORTEGA *et al.* Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-erb-B2, c-myc and EGFr as prognostic factors in gastric cancer. **Histol Histopathol**, v.15(2), p.445-62, 2000.
- SCHIPPER *et al.* Significance of cell proliferation measurement in gastric cancer. **European J Cancer**, v.34(6), p.781-90, 1998.
- SETELA *et al.* Clinical relevance of p53 index and expression of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in gastric cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.124(9), p.497-502, 1998.
- SIDRANSKY, D. Emerging molecular markers of cancer. **Nature Reviews**, v.2, p.210-219, 2002.
- SOBRINHO-SIMÕES *et al.* Increasing level of myc and met co-amplification during tumor progression of case of gastric cancer. **Cancer Genet. Cytogenet**, v.82, p.140-45, 1995.
- SPANDIDOS *et al.* Immunohistochemical analysis of the expression of the c-myc oncoprotein in human stomach cancers. **Digestion**, v.50(3-4), p.127-34, 1991.
- SPITZ *et al.* Adenoviral-mediated wild-type p53 gene expression sensitizes colorectal cancer cell to ionizing radiation. **Clin. Cancer Res**, v.2, p.1665 –1671, 1996.

- SUGAI *et al.* Role of DNA aneuploidy, overexpression of p53 gene product, and cellular proliferation in the progresión of gastric cancer. **Cytometry**, v.38(3), p.111-7, 1999.
- SUGIMACHI *et al.* Increased proliferative activity caused by loss of p21waf1/cip1 expression and its clinical significance in patients with early-stage gastric carcinoma. **Cancer**, v.94(7), p.2107-12, 2002.
- SUNDBLAD AS & TAMAYO R. Expression of MIB/KI-67 and bcl-2 in gastric carcinoma. Relationship with clinico-pathological factors. **Acta Gastroenterol Latinoam**, v.25(2), p. 67-72, 1995.
- TANAPORE & FUKASAWA. P53 mutation and mitotic infidelity. **Cancer Invest**, v.8(2), p.148-155, 2000.
- TAUBERT *et al.* Function of the c-myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1471, p.135-45, 2001.
- TERADA *et al.* Evaluation of Metastatic Potential of Gastric Tumors by Staining for Proliferating Cell Nuclear Antigen and Chromosome 17 Numerical Aberrations. **Ann. Surg. Oncol**, v.8, p.525 – 532, 2001.
- UREN & VAUX. Molecular and clinical Aspects of Apoptosis. **Pharmacol. Ther**, v.72 (1), p.37-50, 1996.
- VELCULESCU & EL-DEIRY. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. **Clin Chem**, v.42(6 Pt 1), p.858-68, 1996.
- VICTORZON *et al.* KI-67 immunoreactivity, ploidy and S-phase fraction as prognostic factors in patients with gastric carcinoma. **Oncology**, v.53(3), p.182-91, 1996.
- XU *et al.* Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and c-myc in the development of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v.7(3), p.403-406, 2001.

XU *et al.* Relationship between DNA ploidy, expression of ki-67 antigen and gastric cancer metastasis. **World J Gastroenterol**, v.5(1), p.10-11, 1999.