

ANÁLISE DE FATORES MOLECULARES ENVOLVIDOS NA PROGRESSÃO DE CÂNCER GÁSTRICO

MARCELLO FERRETTI FANELLI

**Dissertação apresentada à Fundação Antonio
Prudente para obtenção do título de mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. André Luís Montagnini

**Co-Orientadora: Dra. Ludmilla T. Domingos
Chinen**

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Fanelli, Marcello Ferretti

**Análise de fatores moleculares envolvidos na progressão de
câncer gástrico** / Marcello Ferretti Fanelli - São Paulo, 2010.
69p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientador: André Luis Montagnini

Descritores: 1. CÂNCER GÁSTRICO. 2. PROGNÓSTICO. 3.
PROGRESSÃO DA DOENÇA.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Antônio Prudente, por ter proporcionado o aprendizado da oncologia em toda sua arte e ciência. A possibilidade do convívio com seu magnífico corpo clínico é, sem dúvida alguma, uma Escola inigualável.

Ao Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani, a quem guardo sob os mais sinceros votos de admiração e respeito, pelas memoráveis e prazerosas conversas, pelo forte e constante estímulo nesta caminhada.

Aos pacientes do Hospital A.C. Camargo e seus familiares que confiaram em nosso trabalho, entregando suas vidas para que pudéssemos nos oferecer em seu auxílio.

Ao Prof. Dr. André Luis Montagnini, meu orientador nesta tese, por me ter recebido nas reuniões do Departamento de Cirurgia Abdominal, despertando meu interesse no tratamento do câncer gástrico. Agradeço pela valiosa e precisa orientação neste trabalho.

À Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen, pela interminável paciência e dedicação na co-orientação desta tese. Saber de sua constante presença foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, pelo apoio do Departamento de Anatomia Patológica na execução deste trabalho e pelo exemplo que é a todos que ensina.

À Dra. Maria Dirlei Begnami, pela dedicação e esforço na análise imunoistoquímica de nossas lâminas.

Ao Dr. Wilson Luiz da Costa Júnior, por compartilhar o banco de dados clínicos dos pacientes.

Ao Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani, pela dedicação nesta dissertação e pelo exemplo pessoal e profissional que deu a todos que tiveram o privilégio de conhecê-lo.

À Sra. Ana Maria Kuninari, coordenadora da pós graduação de nossa Instituição pelo incansável e obstinado trabalho.

Ao Sr. José Ivanildo Neves, funcionário do Departamento de Anatomia Patológica, pela confecção das lâminas de imunoistoquímica.

À Sra. Suely Francisco, um reconhecimento especial pelo exaustivo trabalho na biblioteca da Fundação Antônio Prudente, ajudando certamente muitos dos que aqui passaram. Muito obrigado pela ajuda em todos esses anos.

Aos amigos do Departamento de Oncologia Clínica do Hospital A.C. Camargo, àqueles que passaram por aqui e aos que permanecem, pelos anos de convívio e sincera amizade que proporcionaram uma obra que guardarei, sempre, com todo carinho.

À minha esposa Adriana, aos meus filhos Rafael, Lucas e Felipe, pela enorme paciência e pela compreensão em todos esses anos. Vocês são a razão de tudo.

RESUMO

Fanelli MF. **Análise de fatores moleculares envolvidos na progressão de câncer gástrico**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O tratamento do adenocarcinoma gástrico é baseado em cirurgia para as lesões precoces, cirurgia seguida de quimioterapia e radioterapia adjuvante ou tratamento sistêmico perioperatório em tumores em estágio II e III. Para doença em estágio avançado a quimioterapia é preconizada. Entretanto, em qualquer uma dessas situações o sucesso terapêutico é limitado pela evolução metastática. Diante de tais resultados, a identificação de fatores moleculares capazes de indicar prognóstico ou até mesmo direcionar um tratamento mais específico e eficaz se faz necessária. **Objetivos:** Este trabalho teve como objetivos: avaliar a expressão das proteínas β -catenina, APC, MMP-7, MMP-9, CD44v6, TGF- α , COX-2 e CXCR4 nos diferentes estádios do adenocarcinoma gástrico e; identificar eventual relação do perfil de expressão destas proteínas com estágio da doença e sobrevida após tratamento oncológico. **Métodos:** Estudo retrospectivo, de pacientes operados por adenocarcinoma gástrico, no Hospital A C Camargo, entre 1998 e 2006. Todas as lâminas referentes às peças cirúrgicas foram revistas e analisadas quanto ao estadiamento e expressão das proteínas pesquisadas. **Resultados:** Foram incluídos 137 pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico. A análise da expressão protéica segundo a profundidade de invasão do tumor na parede do estômago (T) revelou significância estatística apenas para β -catenina de membrana ($p = 0,024$). Nos diferentes níveis de comprometimento linfonodal (N0, N1, N2 e N3) foi notada expressão diferencial estatisticamente significativa para COX-2 ($p = 0,017$), que encontrou-se mais expressa em N2 e N3. O mesmo se repetiu para expressão de COX-2 em relação à presença (M1) ou ausência de metástase (M0), sendo que houve maior expressão desta proteína em M1.

Os dados de expressão das proteínas por estágio clínico mantiveram significância para COX-2 ($p = 0,011$) e β -catenina de membrana ($p = 0,036$). Na análise de sobrevida global em 5 anos, de acordo com a expressão positiva ou negativa de proteínas, não foi notada diferença estatisticamente significativa para β -catenina de membrana, β -catenina citoplasmática, β -catenina nuclear, APC e CD44v6. Entretanto, quanto à expressão de TGF- α ($p = 0,017$), COX-2 ($p < 0,001$), CXCR4 ($p = 0,010$), MMP-7 ($p = 0,020$) e MMP-9 ($p = 0,015$), tal diferença foi constatada, sendo que a expressão positiva de todas essas proteínas acarretou em piores sobrevidas globais.

Conclusões: A maior expressão das proteínas COX-2 e de β -catenina em nossa amostra apresentou correlação estatisticamente significativa com estágios mais avançados de adenocarcinoma gástrico. A expressão de COX-2, TGF- α , MMP-7, MMP-9 e CXCR4 nos tumores relacionou-se a pior sobrevida global dos pacientes.

SUMMARY

Fanelli MF. **[Analysis of molecular factors involved in gastric cancer progression]**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Treatment of gastric adenocarcinoma is based on surgery for early lesions, surgery followed by adjuvant chemotherapy and radiotherapy, or perioperative systemic treatment of stage II and III tumors. For advanced stage disease, chemotherapy is recommended. However, in any of the above situations, therapeutic success is limited by metastatic evolution. Therefore, the identification of molecular factors capable of identifying prognosis or even to direct more efficacy and specific treatment, are necessary. **Objectives:** This study had the objective to verify the expression of β -catenin, APC, MMP-7, MMP-9, CD44v6, TGF- α , COX-2 and CXCR4 proteins on different stages of gastric adenocarcinoma and also to identify eventual relationships between the expression profile of these proteins with disease stage and survival after oncologic treatment. **Methods:** Retrospective study of patients who underwent surgery for gastric adenocarcinoma at Hospital A.C. Camargo, between 1998 and 2006. All slides from surgery biopsy pieces were revised and analysed for staging and expression of researched proteins. **Results:** One hundred thirty-seven patients with gastric adenocarcinoma were included. The analysis of protein expression by deepness of tumor invasion on stomach wall (T) revealed statistical significance only for membrane β -catenin ($p= 0.024$). On different levels of lymph node commitment (N0, N1, N2 and N3), differential expression with statistical significance for COX-2 ($p= 0.017$) was observed. COX-2 was more expressed on N2 and N3. The same was true for COX-2 expression in relation to presence (M1) or absence (M0) of metastasis, where COX-2 expression was more correlated to M1. The data from protein expression by clinical stage maintained statistical significance for COX-2 ($p = 0.011$) and membrane β -

catenin ($p = 0.036$). On analysis of overall survival in five years, according to positive or negative protein expression, there was no significant statistical difference for membrane β -catenin, cytoplasmatic β -catenin, nuclear β -catenin, APC and CD44v6. However, statistical difference was noted on protein expression of TGF- α ($p = 0.017$), COX-2 ($p < 0.001$), CXCR4 ($p = 0.010$), MMP-7 ($p = 0.020$) and MMP-9 ($p = 0.015$). The expression of all proteins were correlated to poor overall survival. **Conclusion:** Overexpression of COX-2 and β -catenin in our sample showed significant statistical correlation with more advanced stages of gastric carcinoma. The expression of COX-2, TGF- α , MMP-7, MMP-9 and CXCR4 on tumors was linked to poor patient overall survival.

LISTA DE FIGURA

Figura 1	Sobrevida global da população estudada.....	25
Figura 2	Sobrevida global segundo estadiamento.....	25
Figura 3	Distribuição da população de acordo com estadiamento.....	27
Figura 4	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína TGF- α em tumores gástricos.....	29
Figura 5	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína CD44v6 em tumores gástricos.....	30
Figura 6	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína APC em tumores gástricos.....	31
Figura 7	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína COX-2 em tumores gástricos.....	32
Figura 8	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína CXCR4 em tumores gástricos.....	33
Figura 9	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína MMP-7 em tumores gástricos.....	34

Figura 10	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína MMP-9 em tumores gástricos.....	35
Figura 11	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína β -catenina de membrana em tumor gástrico tipo intestinal.....	36
Figura 12	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína β -catenina citoplasmática em tumor gástrico tipo difuso.....	36
Figura 13	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína β -catenina nuclear em tumor gástrico tipo difuso.....	37
Figura 14	SG em 60 meses, segundo expressão de β -catenina de membrana.....	44
Figura 15	SG em 60 meses, segundo expressão de β -catenina citoplasmática.....	44
Figura 16	SG em 60 meses, segundo expressão de β -catenina nuclear.	45
Figura 17	SG em 60 meses, segundo expressão de APC.....	45
Figura 18	SG em 60 meses, segundo expressão de CD44v6.....	46
Figura 19	SG em 60 meses, segundo expressão de COX-2.....	46
Figura 20	SG em 60 meses, segundo expressão de TGF- α	47
Figura 21	SG em 60 meses, segundo expressão de CXCR4.....	47

Figura 22	SG em 60 meses, segundo expressão de MMP-7.....	48
Figura 23	SG em 60 meses, segundo expressão de MMP-9.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição da população segundo idade e gênero.....	24
Tabela 2	Achados Histopatológicos.....	26
Tabela 3	Expressão protéica segundo T.....	38
Tabela 4	Expressão protéica segundo comprometimento linfonodal (N).	39
Tabela 5	Expressão protéica segundo ausência (M0) ou presença (M1) de metástase.....	40
Tabela 6	Expressão protéica segundo estadiamento clínico.....	41
Tabela 7	Correlações não paramétricas (resumo).....	42
Tabela 8	Sobrevida global segundo expressão de proteína.....	43
Tabela 9	Expressão de CXCR4 por tipo de tumor.....	57

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Etiologia.....	2
1.3	Diagnóstico e estadiamento	2
1.4	Tratamento da doença localizada.....	3
2	ALVOS MOLECULARES.....	7
3	OBJETIVOS	17
4	PACIENTES E MÉTODOS.....	18
4.1	Comitê de Ética em Pesquisa.....	18
4.2	Pacientes.....	18
4.3	Construção do Tissue Microarray (TMA).....	19
4.4	Imunoistoquímica (IHC).....	20
4.5	Interpretações das reações de Imunoistoquímica	22
4.6	Análise Estatística	23
5	RESULTADOS	24
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÕES	59
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer gástrico (CG) é uma das neoplasias mais comuns, sendo a quarta mais freqüente, ficando atrás do câncer de mama, pulmão e intestino grosso. São estimados, no mundo, 870.000 casos novos de CG e 650.000 óbitos decorrentes desta neoplasia (FERLAY et al. 2001), representando 9,9% de todos os casos novos de câncer (PARKIN 1998).

Apesar dos dados estatísticos apontarem taxas expressivas (21.860 casos novos diagnosticados nos Estados Unidos em 2006 por JEMAL et al. a incidência mundial da doença tem declinado significativamente nas últimas décadas. Parte desse resultado deve-se ao reconhecimento de certos fatores de risco como o *H. pylori*, fatores ambientais e nutricionais (Haenszel et al. 1998). Medidas como melhor conservação de alimentos e o tratamento efetivo do *H. pylori* são fatores decisivos na diminuição da incidência do câncer gástrico em alguns países (PARKIN et al. 2005).

Mesmo considerando diminuição no número de casos em países desenvolvidos, a doença ainda é muito comum em regiões mais pobres como Ásia, leste da Europa, América Central e América do Sul (PARKIN et al. 2009). No Japão, devido aos programas de rastreamento a incidência vem diminuindo. INOUE e TSUGANE (2005) publicaram uma revisão mostrando uma incidência na população japonesa masculina de 62 casos

para 100.000 habitantes e na feminina de 26/100.000. Neste mesmo trabalho foi sugerido que os aspectos nutricionais têm influência direta na incidência da doença, uma vez que a população japonesa que migrou para os Estados Unidos apresentou taxas semelhantes à população norte americana. Por outro lado, os japoneses que imigraram para o Brasil tiveram incidência semelhante à da população de origem, pois mantiveram hábitos alimentares tradicionais.

1.2 ETIOLOGIA

A maioria dos tumores malignos do estômago constitui adenocarcinomas. Os subtipos histológicos são o intestinal e o difuso. O primeiro acomete preferencialmente o antro gástrico, estando associado com gastrite atrófica, infecção pelo *H. pylori* e metaplasia intestinal. O subtipo difuso, de forma geral, apresenta o pior prognóstico (MCDONALD et al. 1992).

1.3 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO

O câncer gástrico é uma neoplasia silenciosa quando está nos estádios iniciais, fato que justifica o grande número de diagnóstico da doença em estádios avançados. A sintomatologia é variável, podendo apresentar-se como perda de peso, epigastria, náuseas, vômitos, fadiga e saciedade precoce (HUNDAHL et al. 2006).

A avaliação inicial é feita por endoscopia digestiva alta (método que fornece material para exame anátomo-patológico e localiza a doença topograficamente), tomografia de abdômen e tórax. Apesar da alta acurácia em detectar lesões viscerais, a tomografia computadorizada é limitada na capacidade de detecção de lesões peritoneais menores que 5 mm. Cerca de 20 a 30% dos pacientes com tomografia negativa para comprometimento peritoneal têm achado positivo na exploração cirúrgica por laparoscopia ou laparotomia (LOWY et al. 1996). Além disso, a avaliação da penetração do tumor na parede do estômago também é limitada, com taxas de acerto de 50 a 70% dos casos (DAVIS et al. 1997).

1.4 TRATAMENTO DA DOENÇA LOCALIZADA

A cirurgia é a modalidade terapêutica capaz de proporcionar as melhores perspectivas de sobrevida a longo prazo e cura para o câncer gástrico. Entretanto, a doença é localizada e operável em apenas 20 a 30% dos pacientes ao diagnóstico.

A despeito dos avanços nas técnicas cirúrgicas e suporte pós-operatório, os pacientes submetidos a ressecções completas curativas frequentemente apresentam recidiva da doença. As recorrências devem-se à presença de doença micrometastática à distância ou disseminação locorregional. De forma geral, sem tratamento adicional, pacientes com câncer gástrico ressecado apresentam sobrevida mediana de aproximadamente 25 meses e sobrevida global em 5 anos de apenas 20 a

30% (HUNDAHL et al. 2000). Os resultados inconsistentes com cirurgia isolada levaram ao desenvolvimento de estudos clínicos empregando tratamento adjuvante ou neoadjuvante à ressecção cirúrgica.

O papel da quimioterapia adjuvante para câncer gástrico foi avaliado por diversos estudos e meta-análises. Os resultados não demonstraram benefícios quando comparados com a cirurgia isolada (HERMANS et al. 1993; EARLE e MAROUN 1999; PANZINI et al. 2002).

Em 2001 foi publicado o estudo INT 0116, randomizado, fase III, com 603 pacientes, avaliando quimiorradioterapia no tratamento adjuvante do câncer gástrico. Pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico ou da transição gastro-esofágica foram randomizados para:

- 1) receberem quimioterapia com 5-fluorouracil (5FU) e leucovorin com radioterapia no contexto pós-operatório ou;
- 2) cirurgia isolada.

A sobrevida livre de doença e a sobrevida global foram significativamente melhores para o grupo que recebeu tratamento combinado. Com tempo de seguimento mediano superior a 6 anos, o benefício demonstrado inicialmente por este estudo persiste, como mostra a atualização publicada em 2004, com sobrevida mediana para quimiorradioterapia de 35 meses *versus* 26 meses para cirurgia isolada (Hazard Ratio (HR)=1,31(1,08-1,61); $p= 0,006$). Baseados nos dados do INT 0116, quimiorradioterapia adjuvante tem sido recomendada como padrão de tratamento para pacientes operados com câncer gástrico não metastático (MCDONALD et al. 2001).

No contexto do tratamento peri-operatório, o estudo MAGIC conduzido por CUNNIGHAM et al. (2006) randomizou 503 pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico ou gastroesofágico ressecável para receber quimioterapia neoadjuvante com esquema ECF (Epirrubicina 50 mg/m² D1; Cisplatina 60 mg/m² D1; 5-FU 200 mg/m² em infusão contínua por 21 dias, por 3 ciclos pré-operatórios seguidos de cirurgia e 3 ciclos de ECF pós-operatórios. A avaliação anatomo-patológica revelou redução tumoral significativamente maior no grupo que recebeu quimioterapia neoadjuvante, tanto na dimensão da lesão primária quanto na invasão linfonodal ($p<0,001$). Este estudo, de forma mais importante, foi capaz de demonstrar que o uso de ECF perioperatório aumentou a sobrevida global (*end-point* primário) com redução de 25% no risco de morte, o que corresponde à taxa de sobrevida em 5 anos de 36% para o grupo de quimioterapia e 23% para o grupo tratado com cirurgia exclusiva (HR= 0,75 (0,60-0,93); $p=0,009$). A sobrevida livre de progressão também foi significativamente maior para o grupo tratado com quimioterapia (HR= 0,66 (0,53-0,81); $p<0,001$). O benefício na sobrevida observado neste estudo foi similar ao demonstrado pelo estudo INT0116, embora os resultados destes dois estudos não possam ser diretamente comparados, pois os pacientes foram recrutados em diferentes fases do tratamento e receberam terapias muito distintas.

Atualmente, tanto a quimiorradioterapia pós-operatória como a quimioterapia perioperatória são estratégias de tratamento para câncer

gástrico sustentáveis e amplamente empregadas. A definição da melhor opção depende das características do serviço e condições do paciente.

Além de fatores prognósticos já consagrados como o tamanho do tumor, *status* linfonodal e presença de metástases ao diagnóstico, a identificação de fatores moleculares capazes de classificar a doença em relação ao prognóstico ou capazes de prever uma eventual evolução (recidiva local e à distância ou carcinomatose peritoneal), pode ser uma estratégia útil na definição do tratamento a ser empregado.

2 ALVOS MOLECULARES

Nos últimos anos temos assistido a um grande fluxo de informações que visam melhorar o entendimento evolutivo das neoplasias, buscando aumentar nossa capacidade de diagnóstico precoce, determinação de fatores prognósticos que realmente tenham impacto na prática diária e individualizar o tratamento oncológico.

No câncer gástrico, assim como na grande maioria dos carcinomas que acometem a espécie humana, a evolução para o estado metastático é o fator que causa óbito na maioria dos pacientes. O processo de metastatização é complexo, desenvolvido por meio de uma cascata de eventos que se iniciam com invasão local, seguido pela disseminação de células malignas e invasão de órgãos alvo. Durante esse processo, as células cancerígenas atravessam vários compartimentos anatômicos, levando à invasão da membrana basal pelo tumor nos tecidos adjacentes, invasão dos vasos sanguíneos ou linfáticos, transporte pela circulação e ocupação dos órgãos distantes, onde se estabelecerão como metástases. As funções de muitas das proteínas envolvidas nos processos descritos se sobrepõem e, mais importante, na ausência de uma delas pode haver perdas de processos fisiológicos fundamentais. Além disso, uma mesma proteína pode participar em diferentes vias e funções na mesma célula (MAREEL et al. 2009).

A habilidade de um tumor invadir localmente qualquer tecido é um requisito básico para o início da cascata de metastatização. A invasão das

células neoplásicas nas estruturas do tecido hospedeiro adjacente é um processo bastante dinâmico que envolve alterações nas interações célula-célula e célula-matriz, degradação e remodelagem da matriz extracelular (MEC) pela produção de proteases degradadoras de matriz, reorganização do citoesqueleto e ganho da capacidade migratória que proporcionarão a translocação das células tumorais (MEREEL et al. 2003).

Se for analisada a área de contato do tumor com o tecido hospedeiro, as células compactadas do epitélio desse último quebram as junções intracelulares do hospedeiro e adquirem um fenótipo migratório que favorece a separação de algumas dessas células da massa do tumor primário. O fronte invasivo de alguns tumores se mostra nitidamente diferente de sua porção central: o primeiro é menos diferenciado e tem uma estrutura arquitetural menos coesa, onde algumas células isoladas ou em pequenos agrupamentos aparecem sem contato com o estroma peri-tumoral. É nessa área de contato que as células do tumor estabelecem uma relação dinâmica e recíproca com o hospedeiro, mediada por fatores de crescimento, citocinas, componentes da matriz e proteases que a degradam (GUARINO et al. 2007).

O processo onde as células epiteliais modulam o seu próprio fenótipo e adquirem um fenótipo *mesenquimal-like*, com propriedades para romper a adesão celular ganhando mobilidade é chamado de transição epitélio-mesênquima (TEM, do inglês, *epithelial mesenchymal transition*). No processo de progressão tumoral, o TEM exerce papel crucial, dando às células tumorais mobilidade e habilidade para invasão dos tecidos, proporcionadas pela aquisição de uma característica mesenquimal

embrionária. A TEM também pode estar presente em outras etapas da cascata de metastatização (BOYER et al. 2000).

A desestabilização coordenada de interações célula-célula e a estimulação de associações matriz-célula necessárias para a mobilidade celular são eventos chave na TEM. Por sua vez, a TEM pode ser ativada ou estimulada por fatores efetores da adesão célula-célula ou citoesqueleto, mas em muitas situações, a ativação de fatores nucleares de transcrição também está envolvida (GUARINO et al. 2007).

A polaridade ápico-basal das células epiteliais é definida pela expressão de E-caderina, molécula localizada na porção basolateral das células, nas junções de aderência. A porção citoplasmática da E-caderina interage com outros componentes de junções de aderência, dentre elas a β -catenina.

Quando uma célula adere a estruturas adjacentes, moléculas de E-caderina são posicionadas entre as membranas, formando pontes pelo espaço intercelular. A porção citoplasmática da molécula de E-caderina liga-se a proteínas da família das cateninas. Forma-se então um complexo para ligar os filamentos de actina do citoesqueleto e as E-caderinas. Quando as pontes são desfeitas, causadas por situações de sofrimento mecânico ou sinalização intracelular, o complexo multiprotéico é quebrado e a E-caderina é internalizada e degradada.

Após tal quebra, a β -catenina é convertida em um estado de fosforilação. Nesta forma ela está apta a interagir com outras moléculas, podendo ser reorganizada e degradada por outros sistemas protéicos. O

controle da concentração intracelular de β -catenina é importante na preservação da arquitetura celular onde uma regulação positiva da β -catenina livre no citoplasma e núcleo está relacionada à migração celular e à transição epitélio-mesênquima. Concentrações em quantidades suficientes de β -catenina citoplasmática podem mover-se ao núcleo, interagindo com fatores de transcrição capazes de promover a proliferação celular (RAMIS-CONDE et al. 2008).

A integração entre os sinais de contato célula-célula e o núcleo celular ocorre pelo complexo Wnt/ β -catenina, que é um potente regulador da proliferação e diferenciação celular. Sua via de sinalização envolve proteínas que participam diretamente da transcrição gênica e da adesão celular. O papel principal é da β -catenina que, no núcleo, funciona como ativador do LEF/TCF (do inglês, *T cell factor/Lymphoid enhancing factor*) na via Wnt e no citoplasma, como proteína estrutural que liga E-caderina ao citoesqueleto na adesão célula-célula.

A sinalização Wnt convencional leva ao acúmulo de β -catenina em um complexo com LEF/TCF que regula a expressão de genes alvo. Na falta de sinalização Wnt, o nível de β -catenina permanece baixo por meio da degradação citoplasmática da β -catenina. A proteína degradada é a que está em excesso nos sítios de ligação, como as aderidas às caderinas da membrana plasmática. Por outro lado, a ativação da via Wnt resulta em aumento da β -catenina citoplasmática, tornando-a disponível para ligação com a família de fatores de transcrição TCF/LEF e indução de expressão de

genes alvo. Assim, os pontos fundamentais na sinalização da β -catenina são a sua estabilização e acúmulo no citoplasma.

A estrutura e integridade funcional do complexo caderina-catenina são controladas por fosforilação, resultando em estabilização deste complexo. A fosforilação por serina/treonina ou E-caderina resulta em aumento da estabilização. Por outro lado, a fosforilação via tirosina-quinases citoplasmáticas rompem a ligação de β -catenina à caderina. Em geral, a ativação via tirosino-quinases resulta em perda da adesão célula-célula e aumento no nível citoplasmático de β -catenina (NELSON e NUSSE 2004). Esta proteína, quando livre no citoplasma, estabiliza-se e é translocada ao núcleo, onde liga-se ao Tcf/LEF, ativando sua atividade transcricional. Disto resulta a expressão de alguns genes, como a ciclina D1, proteína de resistência multidrogas 1, matrilisina, metaloproteinase 7 (MMP-7), ciclooxigenase 2 (COX-2), fator de transcrição de imunoglobulinas e c-myc (CLAPPER et al. 2004; MARCHENKO et al. 2004; OLOUMI et al. 2004).

Na ausência de sinalização Wnt, um complexo de degradação composto por GSK-3 β , axina e APC (do inglês, *adenomatous polyposis coli*) fosforila a β -catenina em múltiplos sítios, promovendo sua ubiquitinação e subsequente degradação (MARCHENKO et al. 2004; OLOUMI et al. 2004).

O controle da β -catenina é um evento importante durante a formação do tumor. Mutações no gene supressor de tumor (APC) e da β -catenina frequentemente bloqueiam a degradação desta proteína nos tumores. Aumentos nos níveis de β -catenina foram relacionados ao aumento de proliferação celular e à transformação neoplásica (ZHURINSKY et al. 2000b).

Já a perda de expressão de cateninas tem sido associada com progressão metastática e sobrevida reduzida em câncer epitelial de ovário (FALEIRO-RODRIGUES et al. 2004).

Ainda sobre a capacidade de invasão do câncer gástrico, a explicação mais usada para o fenômeno da metástase peritoneal é a de que as células tumorais se destacam do sítio primário após extensão para a superfície peritoneal e são transportadas através desta cavidade pelo seu próprio fluido. Até o momento não se sabe se estas características metastáticas são inerentes ao tumor primário ou se estão presentes apenas em um subclone de células dentro da massa do tumor. É necessário saber se alguma “evolução biológica” ocorre após o desprendimento da célula da massa do tumor primário (TAN et al. 2006). Além disso, é fundamental conhecer as principais proteínas candidatas a este tipo de “evolução biológica”. Provavelmente, proteínas com mais de uma função dentro da célula sejam mais propensas a alterações.

É sabido que a expressão simultânea de fator de crescimento epitelial (EGF, do inglês, *epidermal growth factor*), do fator transformador de crescimento alfa (TGF- α , do inglês, *transforming growth factor*) e do receptor de EGF correlaciona-se com invasão profunda, estágio avançado e prognóstico ruim (YASUI et al. 2005). Pode-se dizer que o receptor de EGF interage com a β -catenina. A ligação do EGF ao seu receptor ativa a via Src, que faz com que a β -catenina se desligue da E-caderina, ficando livre no citoplasma. A ligação EGF/EGF-R pode também ativar a via Ras, que por uma cascata complexa leva à estimulação de fatores de transcrição no

núcleo, como por exemplo, a β -catenina. A via Ras pode se deslocar por outro caminho, ativando as PI3K/Akt, que por sua vez inibem GSK-3 β , bloqueando a ligação APC/ β -catenina, deixando a β -catenina livre no citoplasma para funcionar como fator de transcrição no núcleo (KALLURI e NEILSON 2003). Assim, essa relação entre TGF- α e β -catenina talvez explique o pior prognóstico de pacientes cujos tumores expressam TGF- α , uma vez que β -catenina estimula a transcrição de genes ligados à proliferação celular e metástase.

Células gástricas cancerosas produzem vários fatores angiogênicos e dentre eles encontra-se o fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFb, do inglês, *Basic Fibroblast Growth Factor*) e COX-2, que por sua vez, inibe apoptose, controla o sistema imune e correlaciona-se com metástases linfonodais (YASUI et al. 2005, DICKEN et al. 2006). Além disso, COX-2 estimula ativação de MMPs, como MMP-2 e MMP-9, o que facilita a invasão tumoral pela degradação da membrana basal, permitindo acesso aos espaços vasculares e linfáticos (KABASHIMA et al. 2000). Ainda sobre as MMPs, sabe-se que o gene da MMP-9, assim como o da MMP-7, está correlacionado com invasão tumoral e metástase (YAMASHITA et al. 1998; YASUI et al. 2005). MMP-7, MMP-9 e COX-2 têm a expressão de seus genes ativada pela β -catenina (CLAPPER et al. 2004; MARCHENKO et al. 2004; OLOUMI et al. 2004).

Voltando às moléculas de adesão, CD44 e suas variantes, geradas por *splicing* alternativo, modulam interação célula-célula e potencial metastático. Existe uma significativa vantagem em termos de sobrevida

global em pacientes com baixa expressão de CD44 com variante no exon 6 (CD44v6) comparado com a alta expressão (YAMAUCHI et al. 1998). Níveis séricos de CD44v6 constituem fator prognóstico em pacientes com câncer gástrico pobremente diferenciado (SAITO et al. 1998).

Além da β -catenina e das moléculas ativadas por ela, pela via wnt ou por ligação a receptor e de CD44, quimiocinas também parecem exercer algum papel na progressão do câncer e /ou metástase órgão seletiva (MULLER et al. 2001; NAKAMURA et al. 2006; YASUMOTO et al. 2006). Quimiocinas constituem uma família composta por citocinas estruturalmente homólogas que induzem migração direta das células por meio de interações com receptores transmembrânicos acoplados à proteína G. Sabe-se que quimiocinas estão envolvidas no rápido recrutamento de leucócitos em respostas inflamatórias, na sua migração direcionada aos tecidos e que podem promover crescimento/sobrevida e metástases de diversos tumores (YOSHIE 2001). Assim, a expressão de receptores de quimiocinas, especialmente CXCR4 (receptor 4 de quimiocinas), por células cancerosas pode ser um importante fator de metástase órgão-específica. Por exemplo, células tumorais de mama expressam CXCR4, enquanto altas concentrações de CXCL12 (ligante de CXCR4) estão presentes em sítios de metástases comuns a este câncer (MULLER et al. 2001). A interação entre CXCR4 e CXCL12 também tem sido implicada em metástases ósseas provenientes de câncer de próstata (TAICHMAN et al. 2002).

YASUMOTO et al. (2006) por meio de cultura de sete linhagens celulares de câncer gástrico humano observou que todas expressavam

fortemente CXCR4, porém nenhuma expressava CXCL12. Pela análise do ensaio de quimiotaxia, CXCR4 foi altamente quimiotático para CXCL12. Para determinar a relevância clínica de CXCR4 no carcinoma gástrico, a expressão de CXCL12 foi examinada no peritônio, fígado, linfonodos e mucosa gástrica representando os principais sítios de metástase de tumor gástrico. CXCL12 teve sua expressão aumentada em 19 fluidos ascíticos de pacientes com carcinoma gástrico em relação a 6 exudatos fluidos peritoneais não malignos. Foi também observado que a expressão de CXCR4 nos tumores primários de pacientes que evoluíram com metástases peritoneais ou à distância (não peritoneal) correlacionou-se de forma significativa com o desenvolvimento de carcinomatose peritoneal.

HASHIMOTO et al. (2008) trabalhando com cultura de linhagem de células de câncer gástrico humano, observaram pelo tratamento com CXCL12 exógena, que esta molécula era capaz de induzir alta expressão de MMP-9, MMP-2 e MMP-7, já citadas anteriormente como relacionadas à invasão tumoral e metástase (YAMASHITA et al. 1998; YASUI et al. 2005). Ainda, esse grupo demonstrou que CXCR4 induz a carcinomatose peritoneal por meio da ativação da via Akt/mTOR, via esta também ativada por EGF/EGF-R.

Desta forma, diante do que foi exposto, pode ser que algumas dessas moléculas descritas possam estar envolvidas no processo de recorrência local, indução de carcinomatose peritoneal e metástases à distância em câncer gástrico. Sabe-se que a expressão de certos alvos moleculares em doenças que tenham perfil de evolução visceral pode impactar diretamente

no tratamento utilizado. Sob a análise proposta, a identificação de fatores moleculares capazes de prever o comportamento da doença poderia auxiliar na escolha da opção terapêutica ideal.

3 OBJETIVOS

- Avaliar a expressão das proteínas β -catenina, APC, MMP-7, MMP-9, CD44v6, TGF- α , COX-2 e CXCR4 nos diferentes estádios do adenocarcinoma gástrico;
- Identificar eventual relação do perfil de expressão destas proteínas com estágio da doença e sobrevida após tratamento cirúrgico.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital A.C. Camargo pelo número 1061/08.

4.2 PACIENTES

Foi realizado um estudo retrospectivo, por meio de levantamento de dados de prontuários do SAME no período compreendido entre 1998 e 2006. Foram considerados critérios de inclusão, pacientes com adenocarcinoma gástrico, que fizeram gastrectomia total ou subtotal pelo Departamento de Cirurgia Abdominal do Hospital A.C. Camargo e que se trataram ou não com quimioterapia e radioterapia no mesmo Hospital. Os critérios de exclusão foram pacientes que não realizaram gastrectomia ou que foram tratados em outro hospital.

Todas as peças cirúrgicas foram revistas no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo e o diagnóstico de adenocarcinoma gástrico foi confirmado em todos os casos.

Para o reestadiamento foram utilizados os critérios definidos pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (GREENE et al. 2006).

4.3- CONSTRUÇÃO DO *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

Para realização das análises imunoistoquímicas foram construídos dois *Tissue Microarrays* (TMA).

A organização dos blocos de TMA seguiu os passos tradicionalmente descritos na literatura. Brevemente, a partir do corte do bloco de parafina original corado por H&E (hematoxilina e eosina), as áreas de tumor viável foram selecionadas e marcadas com caneta. Estas áreas tinham equivalência no bloco de parafina original, identificado como bloco doador. A partir deste ponto, as áreas selecionadas foram transferidas para o bloco receptor através do uso do *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, MD, USA). Assim, foi confeccionado o bloco de TMA com cilindros de 1,0 mm (Figura 2). Em cada caso foram selecionadas duas regiões (chamadas de *core*) para serem montadas no TMA.

A partir destes blocos foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro, previamente tratadas com película aderente especial (Instrumedics Inc, Hackensack, NJ USA) (Figura 2), em duplicatas. Os blocos foram cortados por meio de micrótomo mecânico na espessura de 4µm. As lâminas contendo os cortes histológicos foram banhadas em parafina para evitar a oxidação e guardadas a -20°C. Para controle da representatividade do material, foram confeccionadas lâminas coradas por H&E em vários níveis de profundidade do bloco de TMA.

Em seguida, as lâminas obtidas foram submetidas à técnica de imuno histoquímica para cada marcador. A técnica utilizada seguiu os passos tradicionais e rotineiros do laboratório. Para cada marcador, foi usada a melhor técnica testada e estabelecida de diluição, recuperação antigênica, revelação e cromógeno. Todas as reações foram acompanhadas de um controle positivo, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado e de um controle negativo da reação (retirada do anticorpo primário e retirada do complexo secundário).

4.4 IMUNOISTOQUÍMICA (IHC)

Para a avaliar a expressão das proteínas β -catenina, APC, MMP-7, MMP-9, CD44v6, TGF- α , COX-2 e CXCR4, cortes histológicos de 4 μ m foram obtidos do bloco de TMA. Os cortes foram desparafinizados em estufa a 60 °C por 12 horas e em xilol, 3 banhos de 5 min cada e re-hidratados em álcool (100%, 95%, 70%) e posteriormente água corrente por 5 min. A recuperação antigênica foi realizada com tampão Citrato (pH 6,0) ou EDTA + TRIS (pH 9,0) e aquecidos em panela de pressão por 15 min ou banho-maria por 40 min de acordo com a necessidade de cada anticorpo. A Tabela 2 apresenta os tipos de recuperação antigênica e as soluções utilizadas. Depois da recuperação antigênica as lâminas histológicas foram resfriadas por 15 min em temperatura ambiente e lavadas com água corrente por 5 min.

As lâminas foram colocadas em peróxido de hidrogênio 3% (10V) 3 vezes por 5 minutos cada, para o bloqueio da peroxidase endógena e então

lavadas em água corrente por 5 minutos. Os cortes foram submetidos ao bloqueio de proteínas inespecíficas com caseína (Protein Block Serum-Free-DakoCytomation, Carpinteria, USA) por 20 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida.

Os anticorpos primários foram diluídos em diluente contendo 0,05 mol/L de tampão Tris-HCl e 0,1% de Tween 20 (*Antibody Diluent with Background Reducing Components*, DakoCytomation, Carpinteria, USA) e as lâminas foram então incubadas a 4 °C, *overnight* (12 a 14 horas) em câmara úmida. A diluição dos anticorpos está representada na Tabela 2. Após 3 lavagens com tampão PBS 1X por 5 minutos cada, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário, contendo *pool* de anticorpos anti-camundongo, anti-coelho ou anti-cabra, utilizando-se o *Kit Advance™ HRP* (DakoCytomation, Carpinteria, USA), ou o *kit LSAB+ System – HRP* (DakoCytomation, K0690, Carpinteria, CA, EUA), conforme as necessidades do anticorpo primário (Tabela 2), por 1 hora em câmara escura, e lavadas com PBS 3 vezes por 5 minutos cada. A coloração foi realizada utilizando-se 3,3' diaminobenzidine tetrachloride (DakoCytomation, Carpinteria, USA). Os espécimes foram contra-corados com hematoxilina, desidratadas com álcool e xilol e montadas com meio permanente e lamínula.

Os anticorpos pesquisados, suas origens e diluições foram os seguintes:

- β -catenina (clone 14), BD Transduction (San Jose /Califórnia, EUA), 1:800

- APC (c20) k (policlonal), Neomarkers (Fremont/Califórnia, EUA), 1:600
- MMP7 (clone 1D2), Neomarkers (Fremont/Califórnia, EUA), 1:50
- MMP9 (policlonal), Neomarkers (Fremont/Califórnia, EUA), 1:200
- CD44v6 (clone VFF-1), Novocastra (New Castle, Inglaterra), 1:100
- TGF- α (policlonal), Neomarkers (Fremont/Califórnia, EUA), 1:100
- COX-2 (clone 4H12), Novocastra (New Castle, Inglaterra), 1:6000
- CXCR4 (clone 44716.111), R & D Systems (Minneapolis, EUA), 1:100.

4.5- INTERPRETAÇÕES DAS REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA

As reações de imunoistoquímica foram analisadas conforme descrito por Harvey et al. (1999). A imuno-expressão de cada proteína foi classificada de acordo com dois critérios. O primeiro avaliava a intensidade da expressão: se nenhuma (0), fraca (1), moderada (2) ou forte (3). O segundo critério avaliava a porcentagem de células que expressavam as proteínas pesquisadas: de 1 a 9% (1), de 10 a 49% (2), 50 a 75% (3) e maior que 76% (4). Quanto à β -catenina, foi analisada a expressão diferencial na membrana, citoplasma e núcleo, apenas em relação à intensidade, e não à porcentagem de células. Para as demais proteínas, para cada lâmina analisada foram gerados dois números que foram somados, resultando num valor final que variou de 1 a 7.

Quando o valor da soma foi menor que 2, o resultado foi considerado negativo; entre 2 e 3, positivo fraco; entre 4 e 5, positivo moderado, e igual ou superior a 6, positivo forte. Para análise dos dados, os resultados negativos e fracamente positivos foram considerados negativos e os moderados ou fortemente positivos, como tais. Todas as lâminas foram analisadas por patologista treinado.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos prontuários médicos e os imunoistoquímicos foram armazenados em uma planilha (Excel ®, versão 2003, Microsoft) e analisados com o programa SPSS para Windows versão 15,0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Foi usada estatística descritiva para a caracterização da população do estudo, por meio de porcentagens. Para verificar se havia correlação entre as proteínas pesquisadas, foi feito o teste de correlação de Spearman. A comparação entre as diversas proteínas e os estádios foi realizada pelo teste de qui-quadrado. Na análise univariada, foi calculada a taxa de sobrevida global em 5 anos para as diversas variáveis, sendo a diferença entre as curvas comparada pelo teste de log-rank. Para tanto, considerou-se a data transcorrida entre a data da cirurgia e a data do óbito de qualquer natureza. Classificaram-se sob censura os casos que permaneceram vivos até o término do estudo. Para todas as análises estatísticas foi estabelecido o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Em nosso estudo, 137 pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico foram incluídos. Porém, na análise das proteínas, devido à insuficiência de material, nem todos os pacientes puderam ser avaliados.

A idade mediana da população geral foi de 65 anos (20 – 88 anos); nos homens a idade mediana foi de 66 anos (21 -86 anos) e nas mulheres de 65 anos (20 – 88 anos). Na amostra total, a proporção segundo gênero, foi de 1,4 mulheres para um homem (Tabela 1).

Tabela 1 - distribuição da população segundo idade e gênero

	N	Mediana	Idade (variação em anos)
Homens	57 (41,7%)	66	21 - 86
Mulheres	80 (58,3%)	65	20 – 88
População geral	137 (100%)	65	20 – 88

A sobrevida mediana em 5 anos da população geral foi de 36,9 meses (Figura 1). Dividindo-a de acordo com os estádios I, II, III e IV, as sobrevidas globais medianas não foram atingidas nos três primeiros estádios e foi de 12,7 meses no estágio IV ($p < 0,001$) (Figura 2).

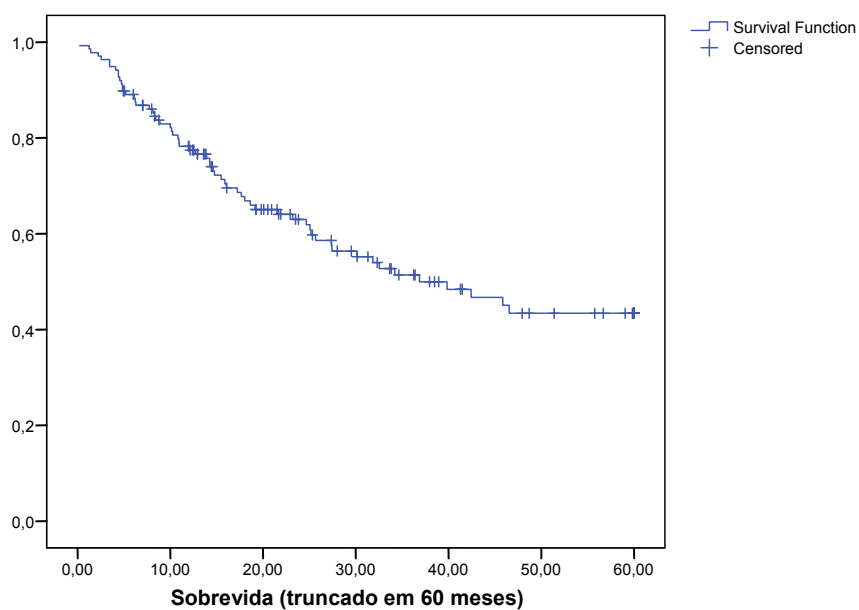


Figura 1 - Sobrevida global da população estudada

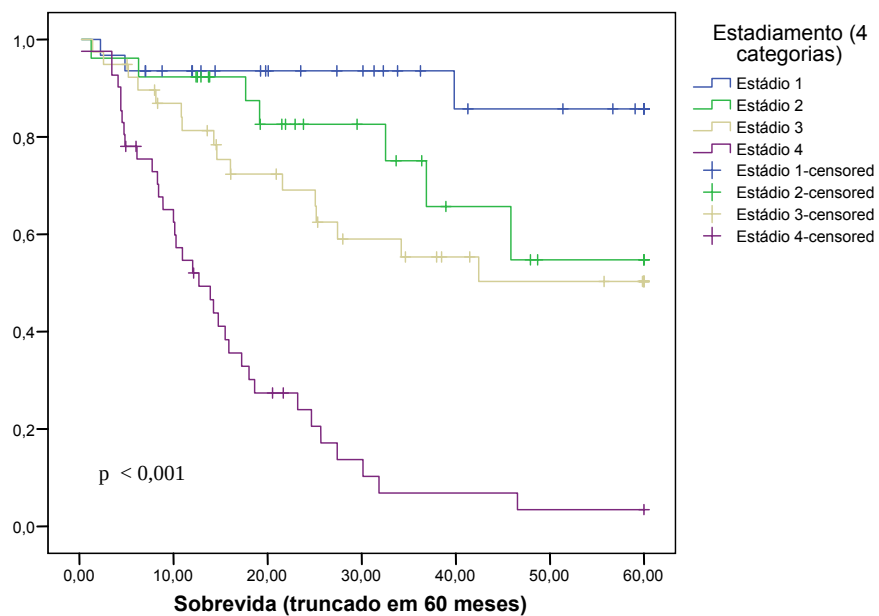


Figura 2 - Sobrevida global segundo estadiamento.

Os dados histológicos mostraram que 52,6% das amostras eram do tipo intestinal e 47,4% do tipo difuso. Quanto à localização topográfica no estômago, 38% dos casos estavam em antro, 10,9% em cárdia, 40,1% no corpo gástrico, 4,4% apresentavam-se como linite plástica e 6,6% em região de boca anastomótica de gastrectomia prévia (Tabela 2).

Tabela 2 - Achados Histopatológicos.

		n	%
Tipo histológico	Difuso	65	47,4
	Intestinal	72	52,6
Localização	Antro	52	38
	Cárdia	15	10,9
	Corpo	55	40,1
	Linite Plástica	6	4,4
	Boca Anastomótica	9	6,6
Invasão Vásculo linfática	Positiva	67	48,9
	Negativa	69	50,4
Invasão Vásculo sanguínea	Positiva	11	8
	Negativa	125	92
Invasão perineural	Positiva	63	46
	Negativa	73	54
T	1	27	19,7
	2	17	12,4
	3	87	63,5
	4	6	4,4
N	0	49	35,8
	1	39	28,5
	2	30	21,9
	3	19	13,9
M	0	110	80,3
	1	27	19,7

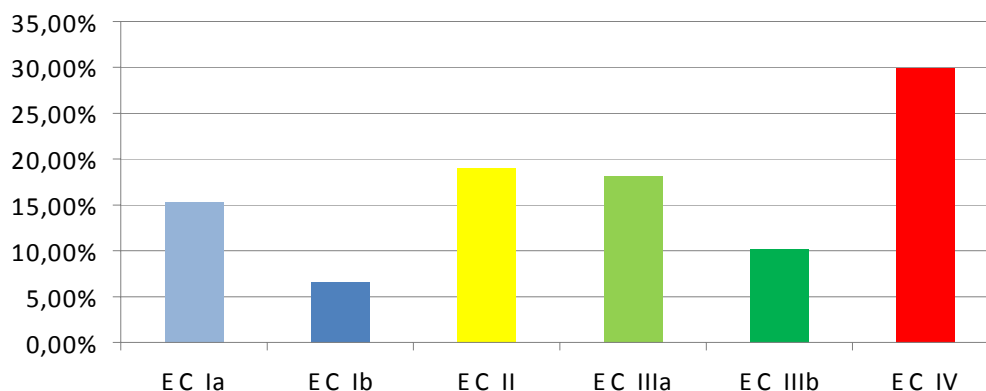


Figura 3 - Distribuição da população de acordo com estadiamento.

A distribuição dos casos, segundo estadiamento clínico, revelou que 21,9% (n=30) dos casos eram estágio I, 19,7% (n= 27) estágio II, 28,5% (n= 39) estágio III e 30% (n= 41) estágio IV (Figura 3). Também foram coletadas informações quanto à invasão vísculo-linfática, vísculo-sanguínea e perineural. Segundo critérios de positividade e negatividade, quanto à invasão vísculo-sanguínea, observou-se que 92% dos casos eram negativos e apenas 8% positivos, enquanto que nos dois outros tipos de invasão a análise revelou-se uniforme.

A análise da expressão protéica segundo a profundidade de invasão do tumor na parede do estômago (T) revelou significância estatística apenas para β -catenina de membrana ($p= 0,024$) (Tabela 3).

Nos diferentes níveis de comprometimento linfonodal (N0, N1, N2 e N3) foi notada expressão diferencial estatisticamente significativa para COX-

2 ($p = 0,017$) (Tabela 4). O mesmo se repetiu para expressão de COX-2 em relação à presença (M1) ou ausência de metástase (M0) (Tabela 5).

Os dados de expressão das proteínas por estágio clínico (Tabela 6) mantiveram significância para COX-2 ($p = 0,011$) e β -catenina ($p = 0,036$).

Na análise de sobrevida global em 5 anos, de acordo com a expressão positiva ou negativa de proteínas, não foi notada diferença estatisticamente significativa para β -catenina de membrana, β -catenina citoplasmática, β -catenina nuclear, APC e CD44v6. Entretanto, quanto à expressão de TGF- α ($p = 0,017$), COX-2 ($p < 0,001$), CXCR4 ($p = 0,010$), MMP-7 ($p = 0,020$) e MMP-9 ($p = 0,015$), tal diferença foi constatada (Tabela 6; Figuras 4 a 13).

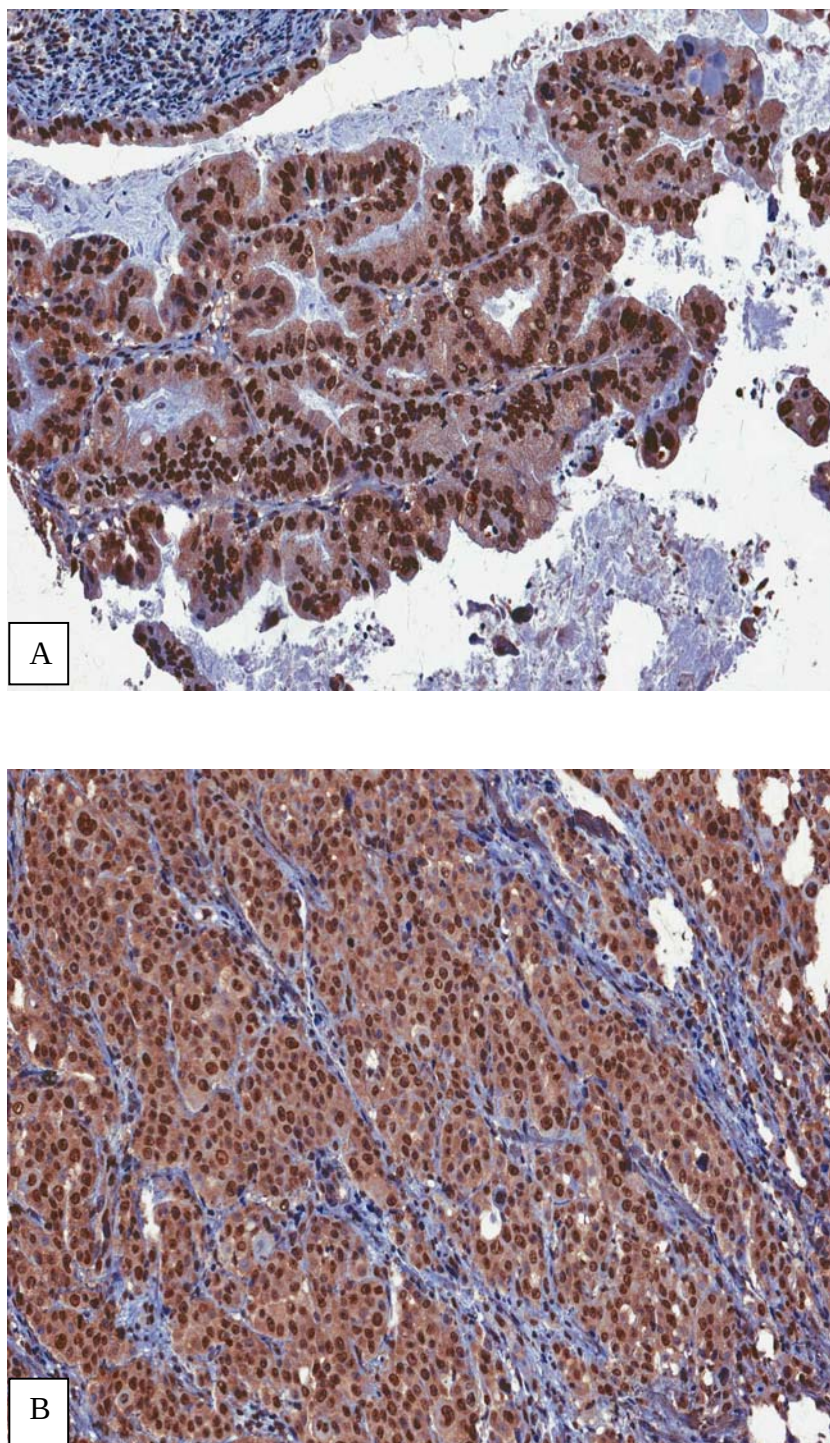


Figura 4 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína TGF- α em tumores gástricos. **A**, tumor gástrico tipo intestinal. **B**, tumor gástrico tipo difuso.

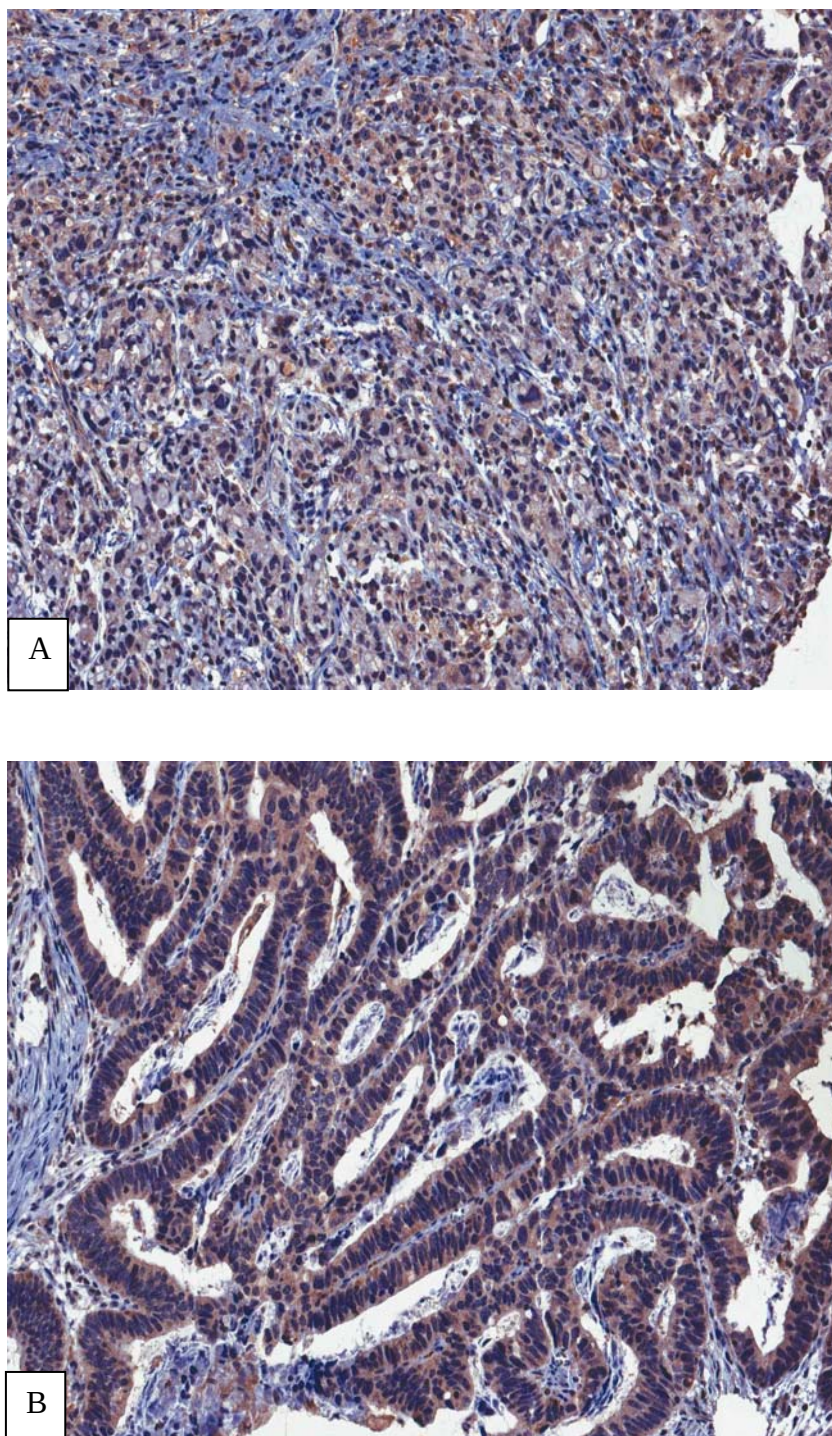


Figura 5 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína CD44v6 em tumores gástricos. **A**, tumor gástrico tipo difuso. **B**, tumor gástrico tipo intestinal.

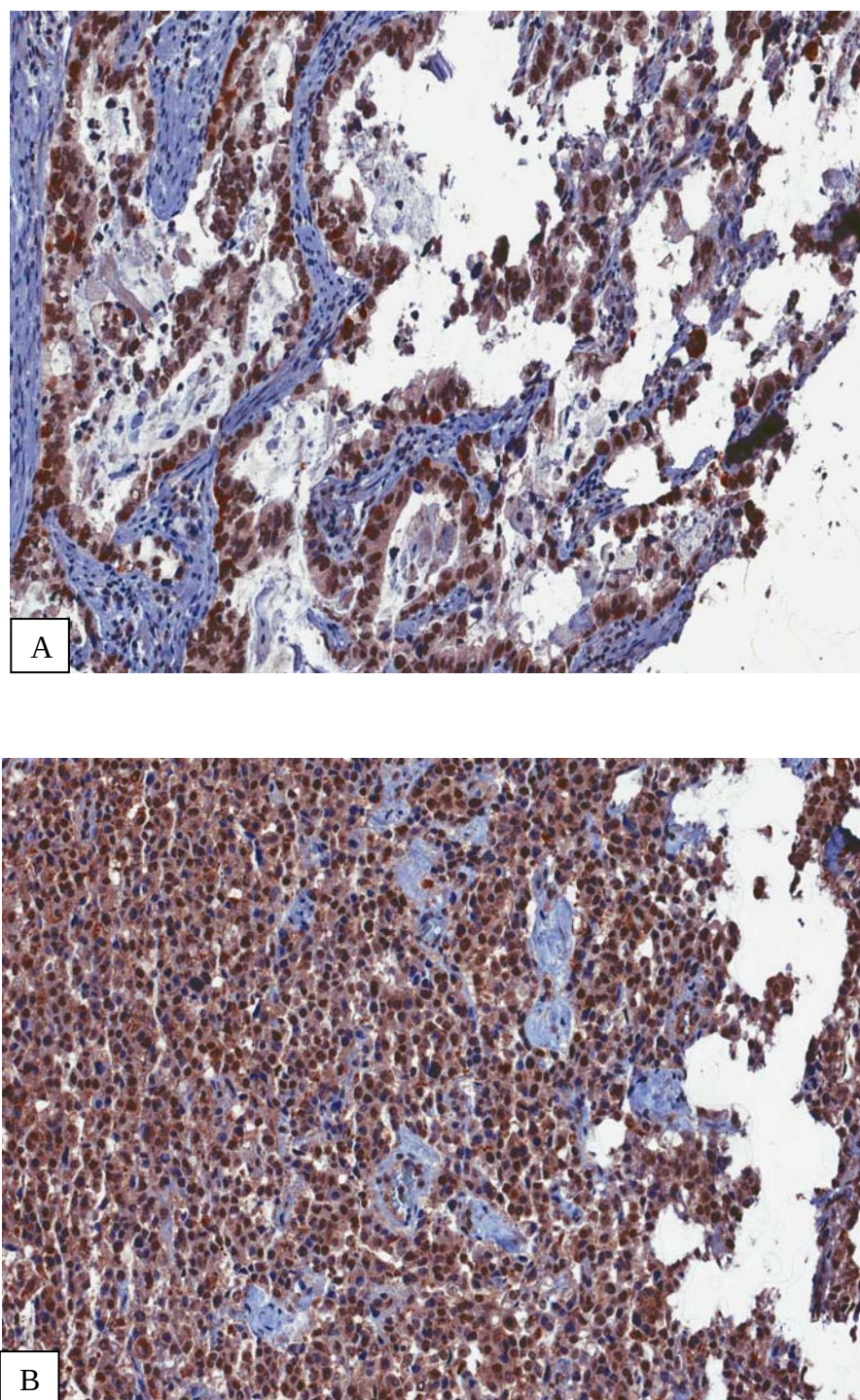


Figura 6 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína APC em tumores gástricos. A, tumor gástrico tipo intestinal. B tumor gástrico tipo difuso.

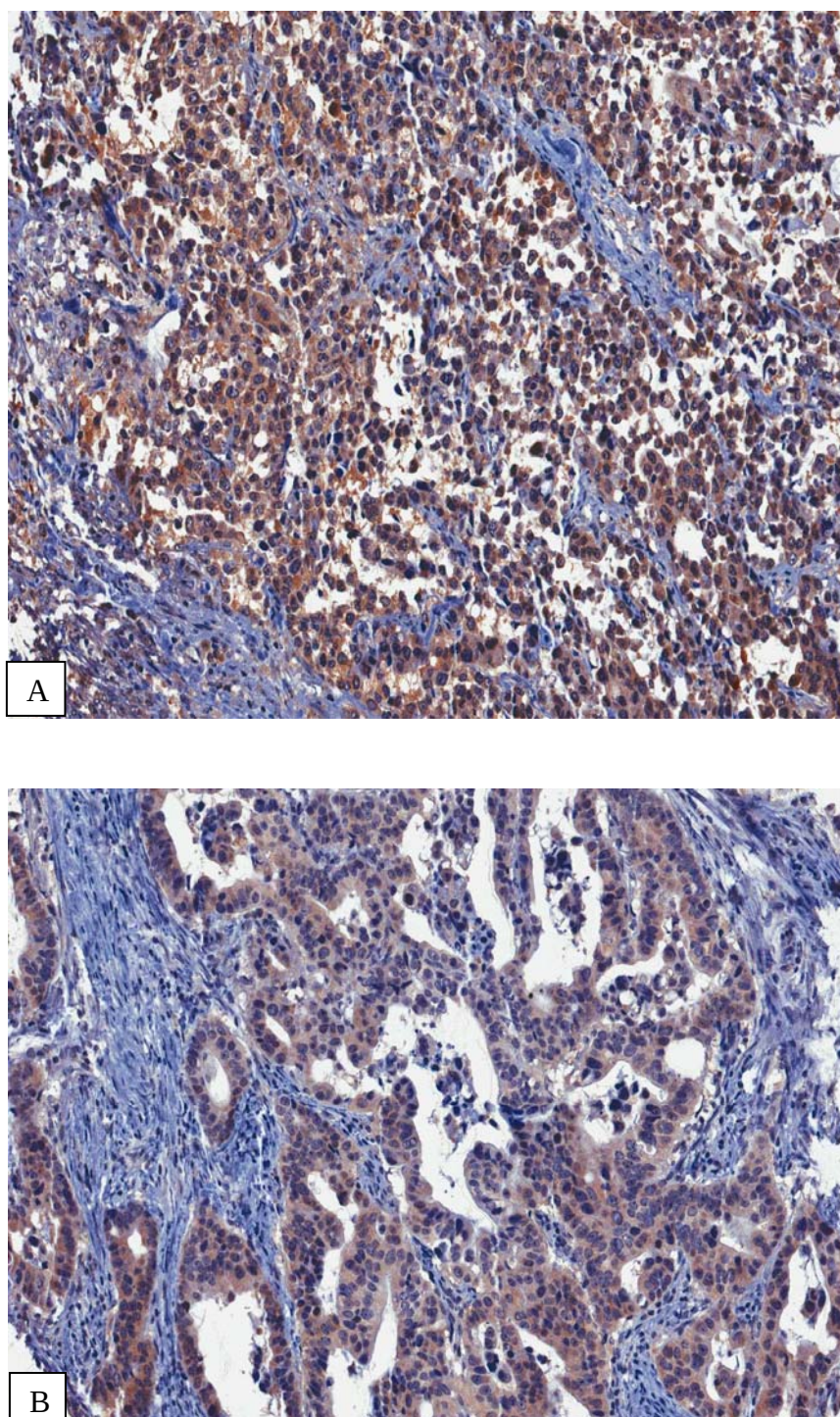


Figura 7 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína COX-2 em tumores gástricos. **A**, tumor gástrico tipo difuso. **B** tumor gástrico tipo intestinal.

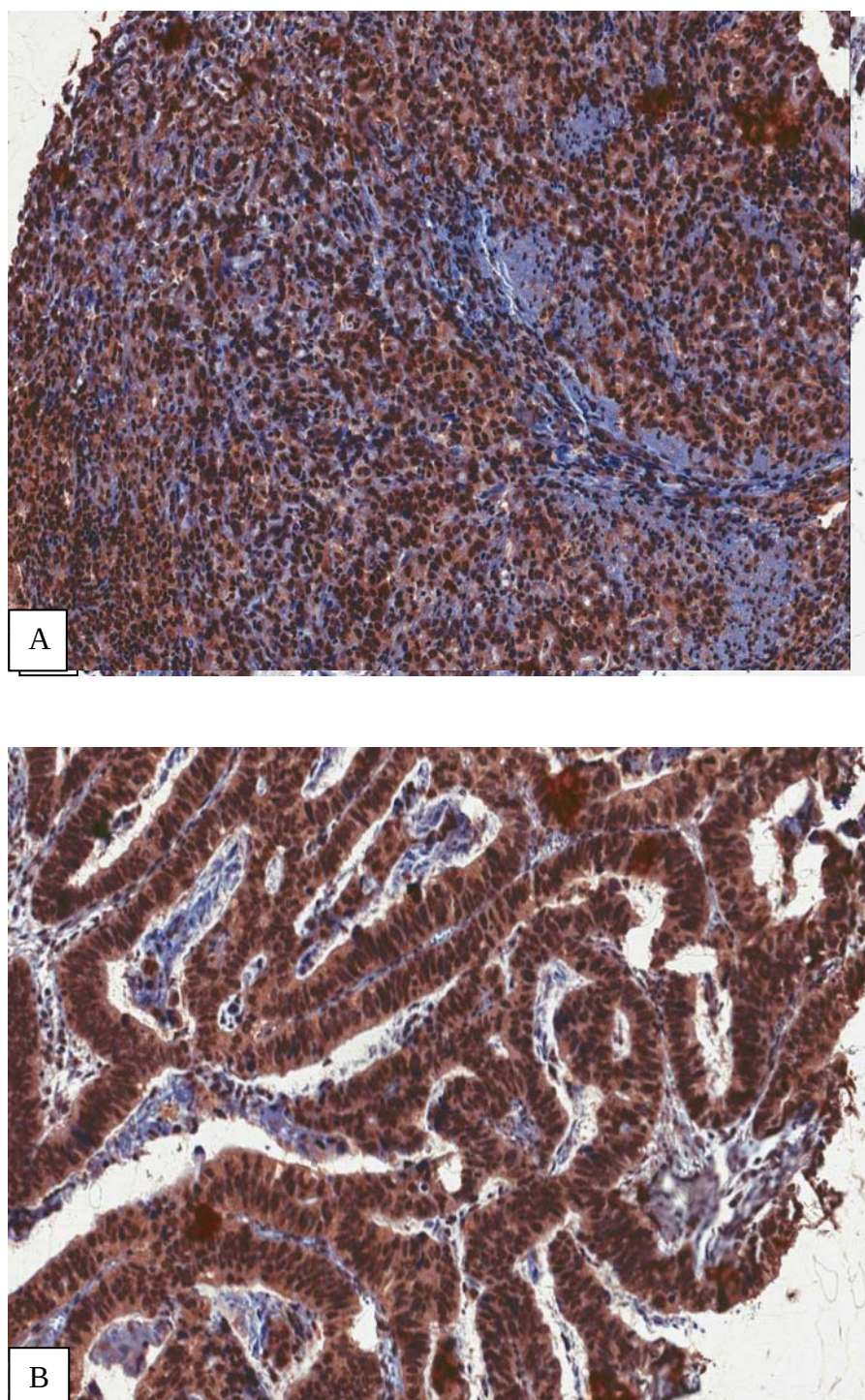


Figura 8 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína CXCR4 em tumores gástricos. **A**, tumor gástrico tipo difuso. **B** tumor gástrico tipo intestinal.

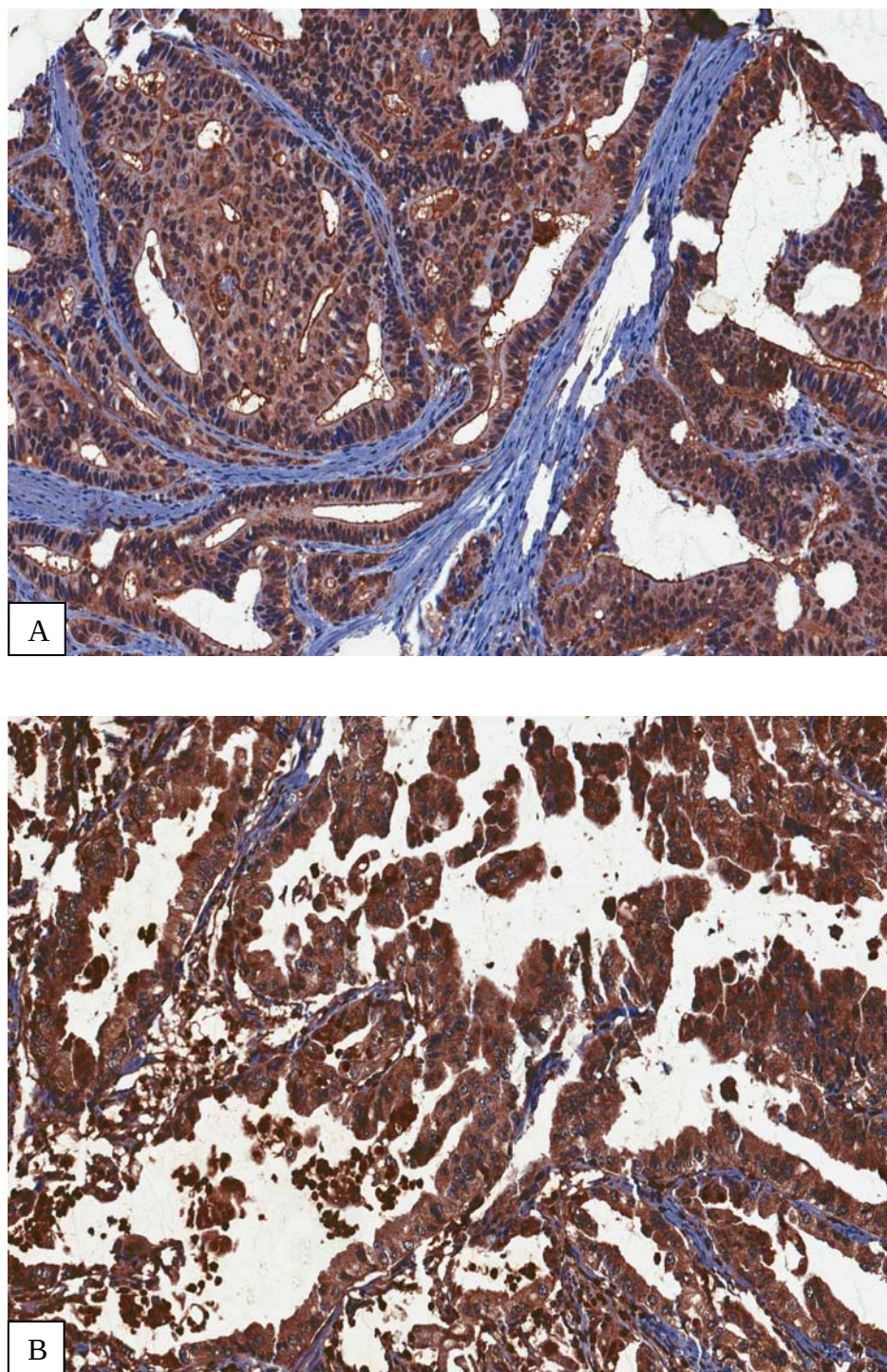


Figura 9 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína MMP-7 em tumores gástricos. **A**, tumor gástrico tipo intestinal. **B** tumor gástrico tipo difuso.

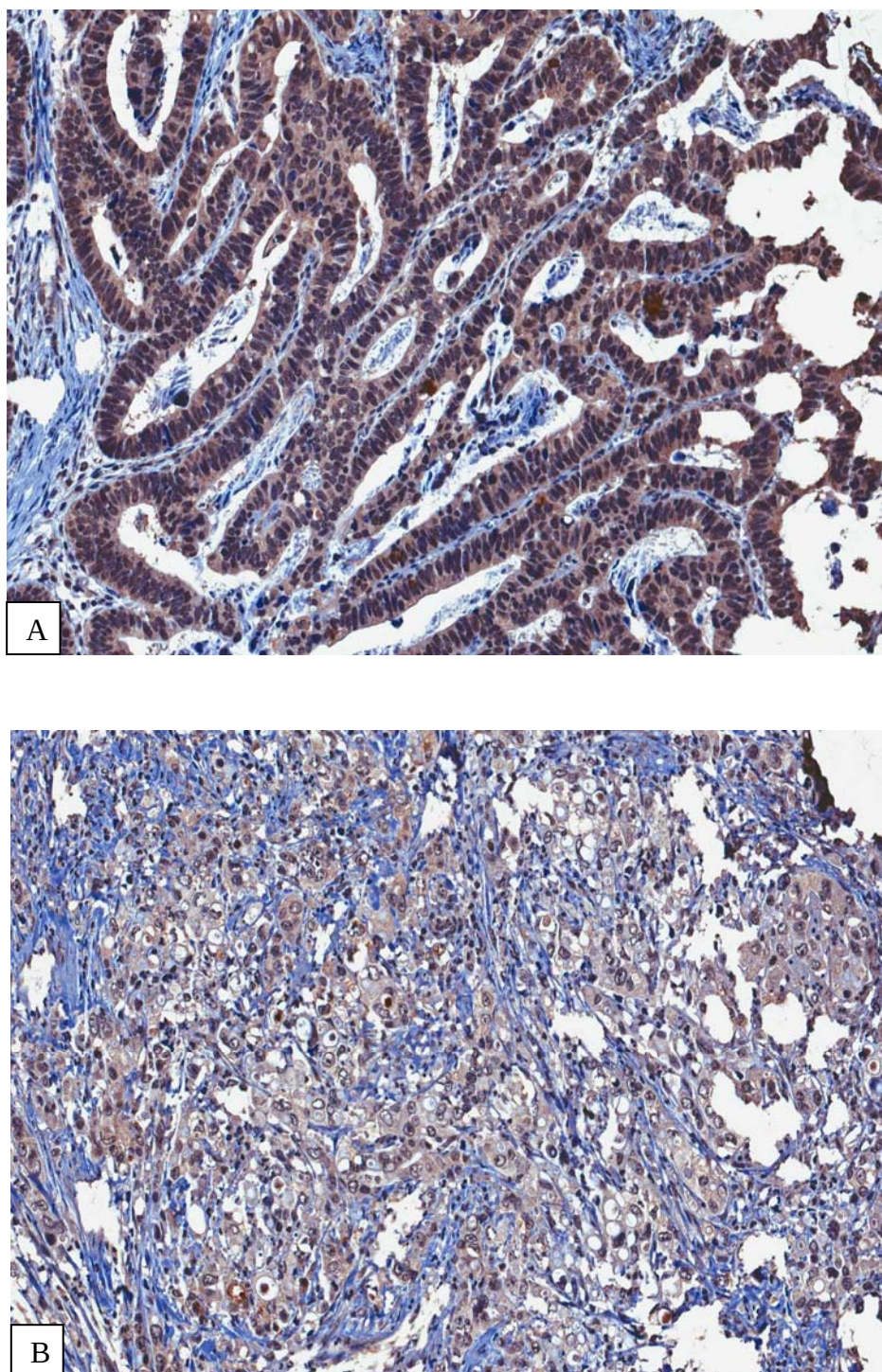


Figura 10 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína MMP-9 em tumores gástricos. **A**, tumor gástrico tipo intestinal. **B** tumor gástrico tipo difuso.

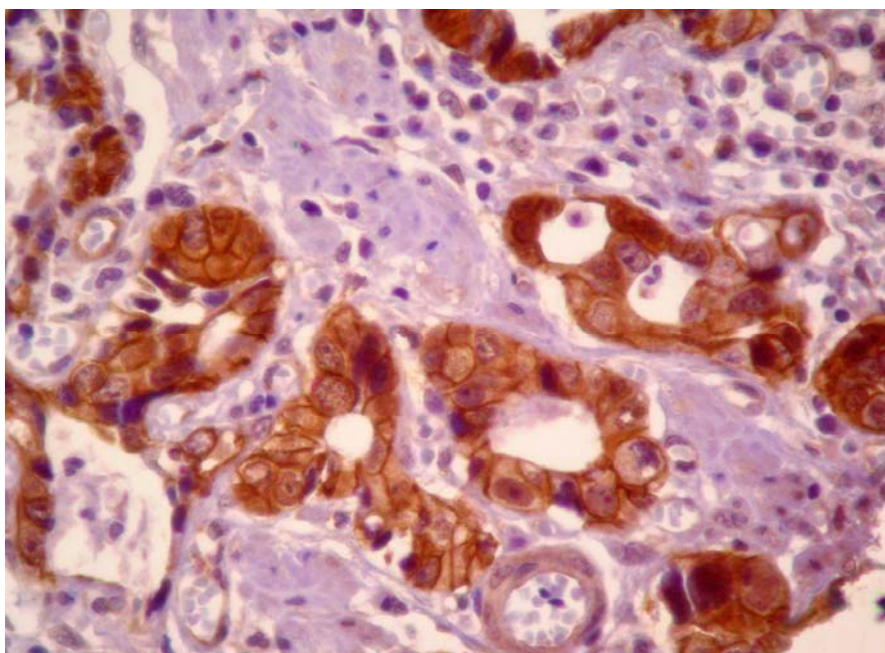


Figura 11 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína β - catenina de membrana em tumor gástrico tipo intestinal.

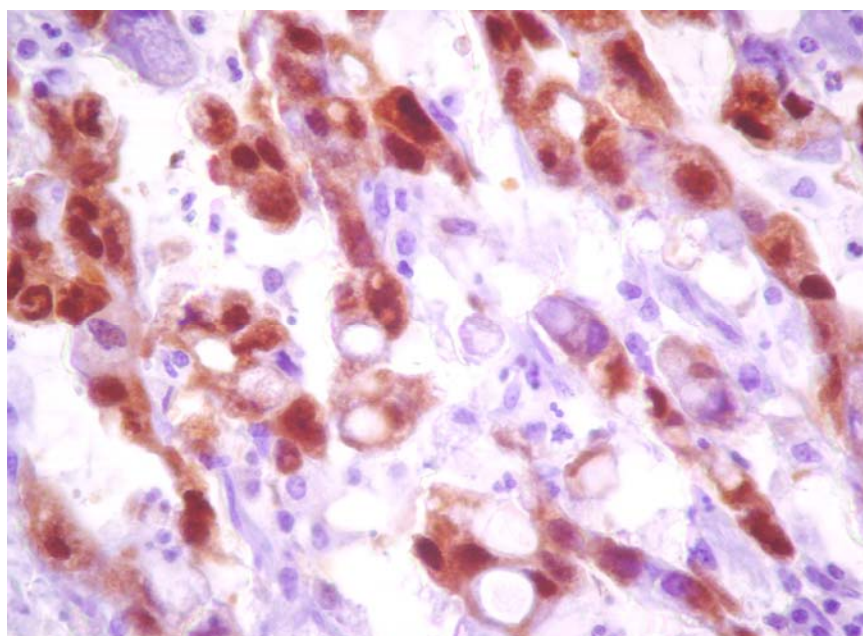


Figura 12 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína β - catenina citoplasmática em tumor gástrico tipo difuso.

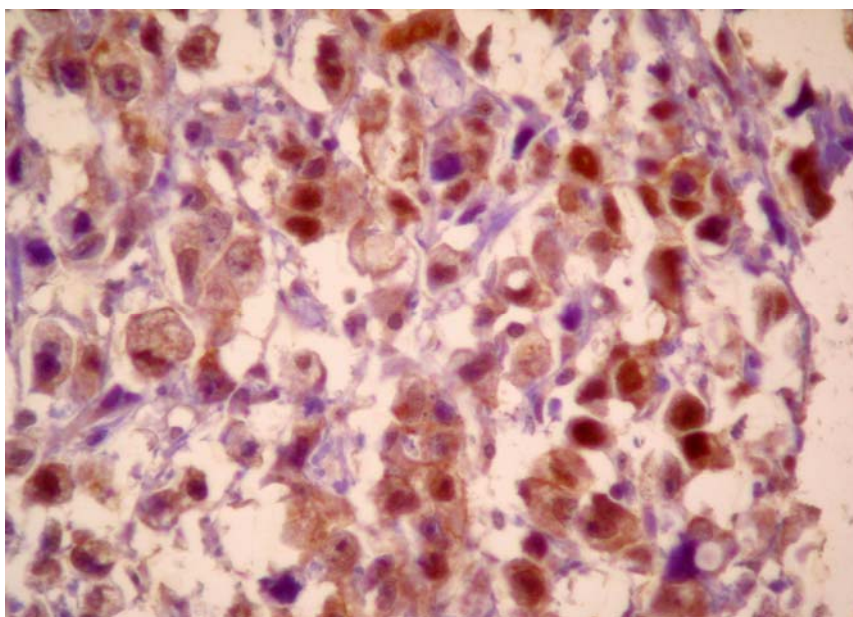


Figura 13 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína β - catenina nuclear em tumor gástrico tipo difuso.

Tabela 3 - Expressão protéica segundo T.

proteína		T1	T2	T3	T4	p
TGFα	positivo	16 (84,2%)	11 (84,6%)	68 (90,7%)	6 (100%)	0,639
	negativo	3 (15,8%)	2 (15,4%)	7 (9,3%)	0 (0%)	
CD44	positivo	7 (38,2%)	6 (46,2%)	40 (51,9%)	3 (50%)	0,790
	negativo	11 (61,1%)	7 (53,8%)	37 (48,1%)	3 (50%)	
APC	positivo	15 (71,4%)	13 (86,7%)	69 (87,3%)	6 (100%)	0,213
	negativo	6 (28,6%)	2 (13,3%)	10 (12,7%)	0 (0%)	
COX-2	positivo	4 (22,2%)	1 (7,7%)	14 (19,2%)	3 (60%)	0,099
	negativo	14 (77,8%)	12 (92,3%)	59 (80,8%)	2 (40%)	
CXCR4	positivo	13 (68,4%)	8 (66,7%)	63 (85,1%)	6 (100%)	0,122
	negativo	6 (31,6%)	4 (33,3%)	11 (14,9%)	0 (0%)	
MMP7	positivo	8 (42,1%)	6 (46,2%)	48 (67,6%)	5 (83,3%)	0,084
	negativo	11 (57,9%)	7 (53,8%)	23 (32,4%)	1 (16,7%)	
MMP9	positivo	11 (68,8%)	8 (66,7%)	54 (78,3%)	5 (83,3%)	0,708
	negativo	5 (31,3%)	4 (33,3%)	15 (21,7%)	1 (16,7%)	
B-catenina membrana	positivo	15 (75%)	13 (81,3%)	59 (71,1%)	1 (16,7%)	0,024
	negativo	5 (25%)	3 (18,8%)	24 (28,9%)	5 (83,3%)	
B-catenina citoplasmática	positivo	4 (20%)	6 (37,5%)	23 (28%)	2 (33,3%)	0,699
	negativo	16 (80%)	10 (62,5%)	59 (72%)	4 (66,7%)	
B-catenina nuclear	positivo	8 (40%)	6 (37,5%)	29 (34,9%)	2 (33,3%)	0,975
	negativo	12 (60%)	10 (62,5%)	54 (65,1%)	4 (66,7%)	

Tabela 4 - Expressão protéica segundo comprometimento linfonodal (N).

proteína		N 0	N 1	N 2	N 3	p
TGFα	positivo	37 (88,1%)	23 (82,1%)	24 (96%)	17 (94,4%)	0,353
	negativo	5 (11,9%)	5 (17,9%)	1 (4%)	1 (5,6%)	
CD44	positivo	21 (51,2%)	11 (35,5%)	15 (62,5%)	9 (50%)	0,251
	negativo	20 (48,8%)	20 (64,5%)	9 (37,5%)	9 (50%)	
APC	positivo	34 (81%)	27 (81,8%)	25 (92,6%)	17 (89,5%)	0,506
	negativo	8 (19%)	6 (18,2%)	2 (7,4%)	2 (10,5%)	
COX-2	positivo	4 (10,3%)	3 (11,1%)	8 (30,8%)	7 (41,2%)	0,017
	negativo	35 (89,7%)	24 (88,9%)	18 (69,2%)	10 (58,8%)	
CXCR4	positivo	32 (82,1%)	22 (73,3%)	22 (91,7%)	14 (77,8%)	0,38
	negativo	7 (17,9%)	8 (26,7%)	2 (8,3%)	4 (22,2%)	
MMP7	positivo	22 (55%)	18 (64,3%)	14 (58,3%)	13 (76,5%)	0,473
	negativo	18 (45%)	10 (35,7%)	10 (41,7%)	4 (23,5%)	
MMP9	positivo	26 (70,3%)	20 (76,9%)	18 (75%)	14 (87,5%)	0,608
	negativo	11 (29,7%)	6 (23,1%)	6 (25%)	2 (12,5%)	
B-catenina membrana	positivo	32 (76,2%)	23 (67,6%)	17 (56,7%)	16 (84,2%)	0,154
	negativo	10 (23,8%)	11 (32,4%)	13 (43,3%)	3 (15,8%)	
B-catenina citoplasmática	positivo	11 (26,8%)	12 (35,3%)	9 (30%)	3 (15,8%)	0,498
	negativo	30 (73,2%)	22 (64,7%)	21 (70%)	16 (84,2%)	
B-catenina nuclear	positivo	15 (35,7%)	15 (44,1%)	11 (36,7%)	4 (21,1%)	0,420
	negativo	27 (64,3%)	19 (55,9%)	19 (63,3%)	15 (78,9%)	

Tabela 5 - Expressão protéica segundo ausência (M0) ou presença (M1) de metástase.

proteína		M0	M1	p
TGFα	positivo	78 (86,7%)	23 (100%)	0,055
	negativo	12 (13,3%)	0 (0%)	
CD44	positivo	42 (46,7%)	14 (58,3%)	0,216
	negativo	48 (53,3%)	10 (41,7%)	
APC	positivo	81 (84,4%)	22 (88%)	0,463
	negativo	15 (15,6%)	3 (12%)	
COX-2	positivo	13 (14,9%)	9 (40,9%)	0,011
	negativo	74 (85,1%)	13 (59,1%)	
CXCR4	positivo	69 (78,4%)	21 (91,3%)	0,132
	negativo	19 (21,6%)	2 (8,7%)	
MMP7	positivo	50 (57,5%)	17 (77,3%)	0,070
	negativo	37 (42,5%)	5 (22,7%)	
MMP9	positivo	58 (72,5%)	20 (87%)	0,123
	negativo	22 (27,5%)	3 (13%)	
B-catenina membrana	positivo	70 (70,7%)	18 (69,2%)	0,530
	negativo	29 (29,3%)	8 (30,8%)	
B-catenina citoplasmática	positivo	27 (27,6%)	8 (30,8%)	0,460
	negativo	71 (72,4%)	18 (69,2%)	
B-catenina nuclear	positivo	35 (35,4%)	10 (38,5%)	0,469
	negativo	64 (64,5%)	16 (61,5%)	

Tabela 6 - Expressão protéica segundo estadiamento clínico.

proteína		EC I	EC II	EC III	EC IV	p
TGFα	positivo	21 (87,5%)	18 (85,7%)	27 (84,4%)	35 (97,2%)	0,313
	negativo	3 (12,5%)	3 (14,3%)	5 (15,6%)	1 (2,8%)	
CD44	positivo	8 (34,8%)	13 (61,9%)	13 (39,4%)	22 (59,5%)	0,107
	negativo	15 (65,2%)	8 (38,1%)	20 (60,6%)	15 (40,5%)	
APC	positivo	18 (72%)	19 (86,4%)	31 (88,6%)	35 (89,7%)	0,220
	negativo	7 (28%)	3 (13,6%)	4 (11,4%)	4 (10,3%)	
COX-2	positivo	4 (18,2%)	1 (4,8%)	4 (12,5%)	13 (38,2%)	0,011
	negativo	18 (81,8%)	20 (95,2%)	28 (87,5%)	21 (61,8%)	
CXCR4	positivo	16 (69,6%)	17 (89,5%)	26 (78,8%)	31 (86,1%)	0,312
	negativo	7 (30,4%)	2 (10,5%)	7 (21,1%)	5 (13,9%)	
MMP7	positivo	10 (43,5%)	13 (61,9%)	18 (58,1%)	26 (76,5%)	0,089
	negativo	13 (56,5%)	8 (38,1%)	13 (41,9%)	8 (23,5%)	
MMP9	positivo	14 (70%)	14 (73,7%)	21 (70%)	29 (85,3%)	0,453
	negativo	6 (30%)	5 (26,3%)	9 (30%)	5 (14,7%)	
B-catenina membrana	positivo	17 (70,8%)	22 (91,7%)	21 (56,8%)	28 (70%)	0,036
	negativo	7 (29,2%)	2 (8,3%)	16 (43,2%)	12 (30%)	
B-catenina citoplasmática	positivo	7 (29,2%)	5 (21,7%)	13 (35,1%)	10 (25%)	0,667
	negativo	17 (70,8%)	18 (78,3%)	24 (64,9%)	30 (75%)	
B-catenina nuclear	positivo	9 (37,5%)	8 (33,3%)	15 (40,5%)	13 (32,5%)	0,887
	negativo	15 (62,5%)	16 (66,7%)	22 (59,5%)	27 (67,5%)	

Tabela 7 - Correlações não paramétricas (resumo).

Relação	Coefficiente de Correlação (Intervalo)	Proteínas relacionadas
Fraca	0 a 0,25	
Positiva Moderada	0,26 a 0,50	TFG- α e CD44 TGF- α e COX2 CD44 e APC CD44 e CXCR4 CD44 e MMP7 APC e COX2 APC e MMP7 APC e MMP9 COX2 e CXCR4 COX2 e MMP7
Positiva Forte	0,51 a 0,75	TFG- α e APC TFG- α e CXCR4 TFG- α e MMP7 TFG- α e MMP9 CD44 e MMP9 APC e CXCR4 CXCR4 e MMP7 CXCR4 e MMP9 β -catenina nuclear e β -catenina citoplasmática.
Positiva muito Forte	0,76 a 1	MMP7 e MMP9
Negativa Fraca	- 0,01 a - 0,25	CD44 e β -catenina citoplasmática COX- 2 e β -catenina citoplasmática.
Negativa Moderada	- 0,26 a - 0,50	TFG- α e β -catenina citoplasmática TFG- α e β -catenina nuclear CXCR4 e β -catenina citoplasmática MMP-7 e β -catenina nuclear
Negativa Forte	- 0,51 a - 0,75	MMP-9 e β -catenina citoplasmática
Muito forte negativa	- 0,76 a - 1	

Aplicando-se o teste de correlação não-paramétrica para determinar a relação entre as proteínas estudadas, onde considera-se intervalos matemáticos (coeficiente de correlação) associados ao valor de p , foram encontradas algumas associações com $p < 0,001$, conforme resumo na Tabela 7.

Tabela 8 - Sobrevida global segundo expressão de proteína.

Proteína	Expressão	Sobrevida global	P
TGFα	Negativo	91,7%	0,017
	Positivo	49,5%	
CD44	Negativo	58,6%	0,052
	Positivo	46,4%	
APC	Negativo	72,2%	0,117
	Positivo	51,5%	
COX-2	Negativo	59,8%	0,000
	Positivo	36,4%	
CXCR4	Negativo	76,2%	0,010
	Positivo	47,8%	
MMP-7	Negativo	64,3%	0,020
	Positivo	46,3%	
MMP-9	Negativo	72%	0,015
	Positivo	47,4%	
β-catenina (membrana)	Negativo	56,8%	0,79
	Positivo	54,5%	
β-catenina (citoplasma)	Negativo	56,2%	0,762
	Positivo	51,4%	
β-catenina (núcleo)	Negativo	53,8%	0,488
	Positivo	57,8%	

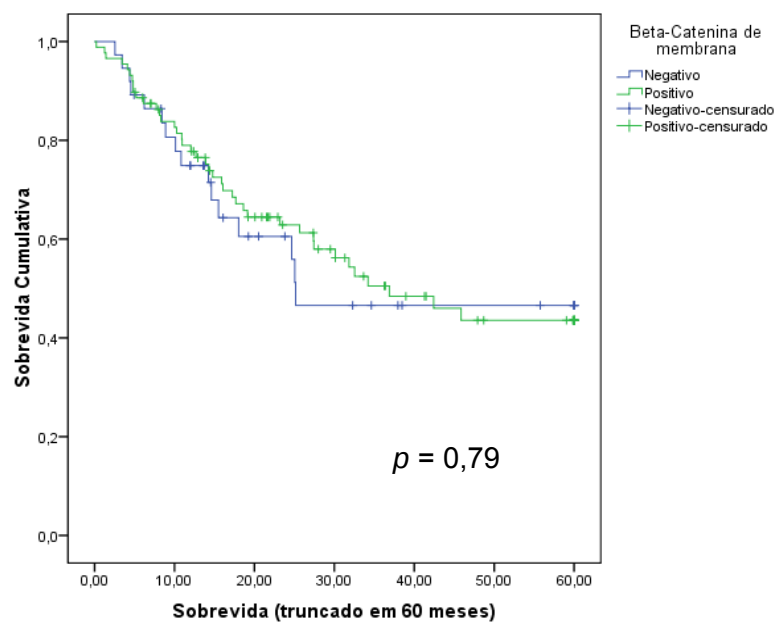


Figura 14 - SG em 60 meses, segundo expressão de β -catenina de membrana.

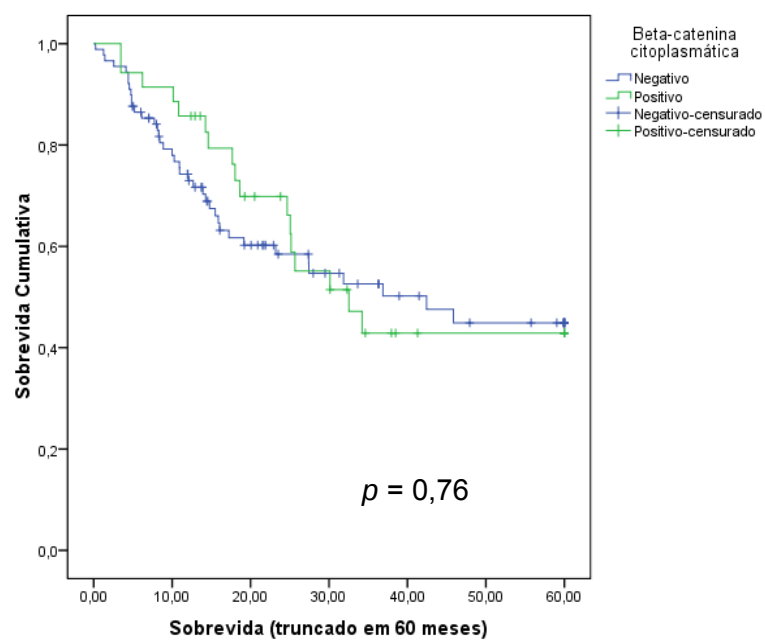


Figura 15 - SG em 60 meses, segundo expressão de β -catenina citoplasmática.

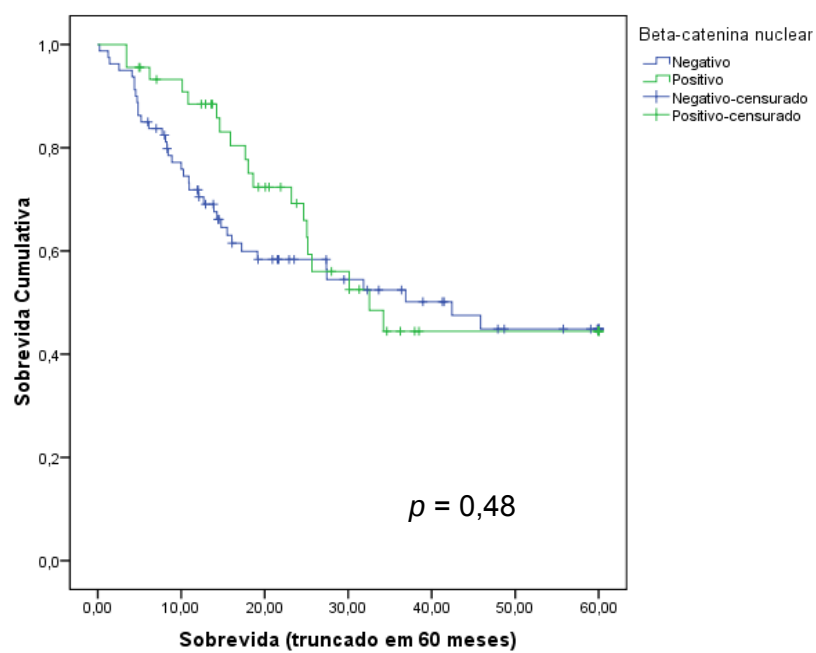


Figura 16 - SG em 60 meses, segundo expressão de β -catenina nuclear.

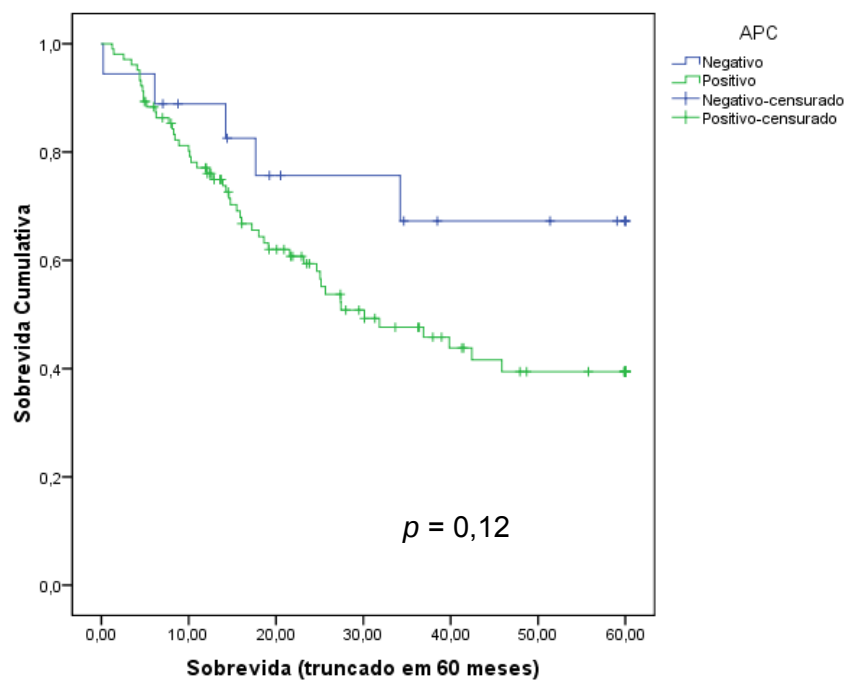


Figura 17 - SG em 60 meses, segundo expressão de APC.

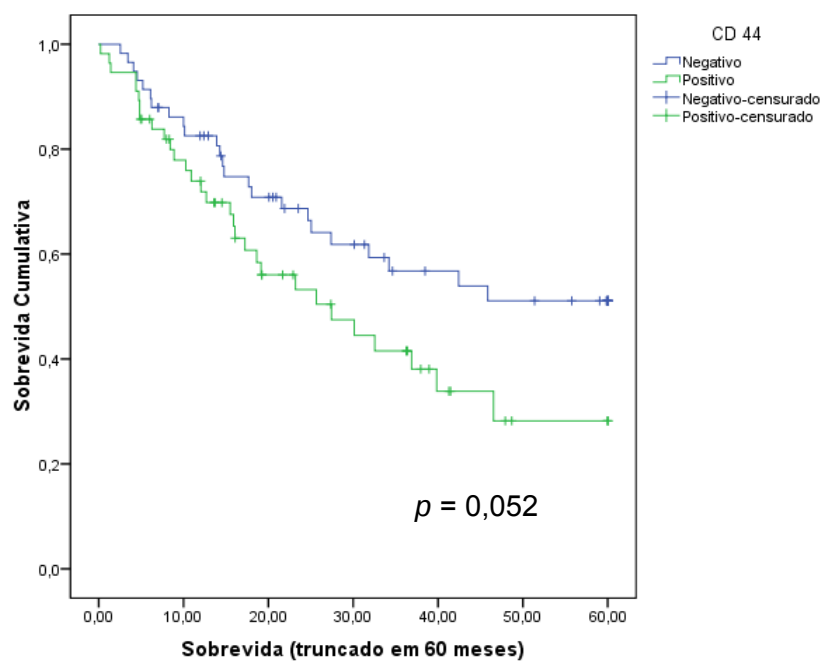


Figura 18 - SG em 60 meses, segundo expressão de CD44v6.

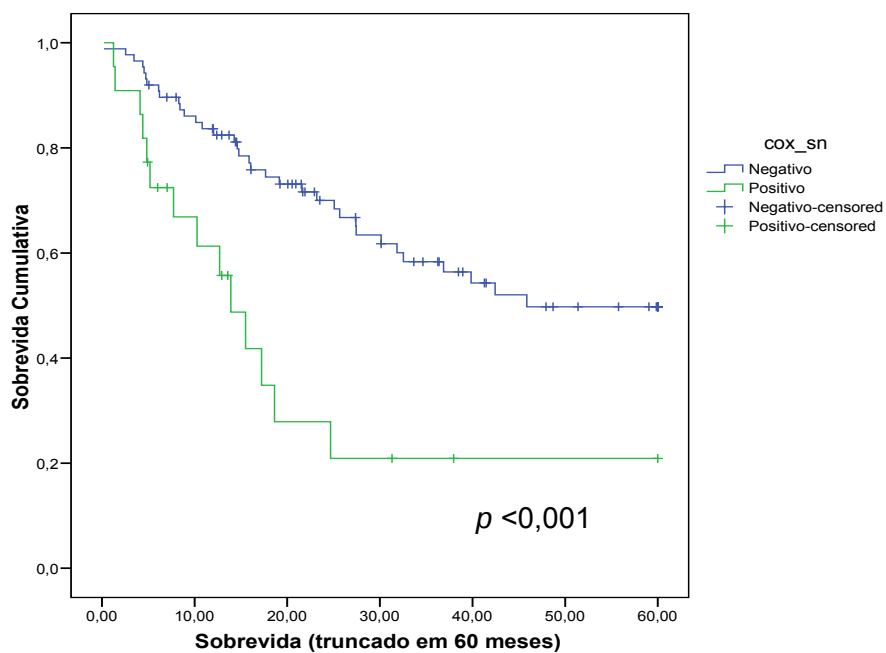


Figura 19 - SG em 60 meses, segundo expressão de COX-2.

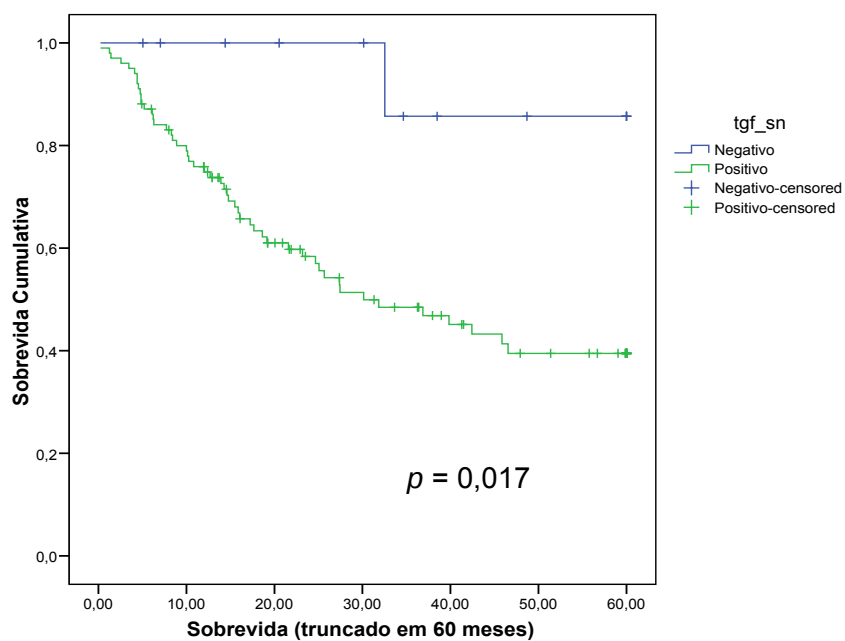


Figura 20 - SG em 60 meses, segundo expressão de TGF- α .

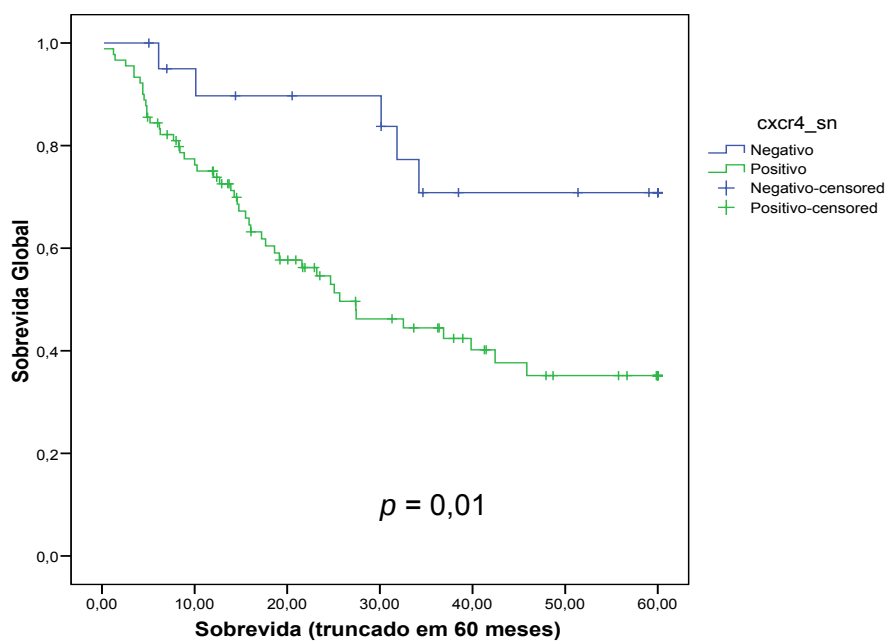


Figura 21 - SG em 60 meses, segundo expressão de CXCR4.

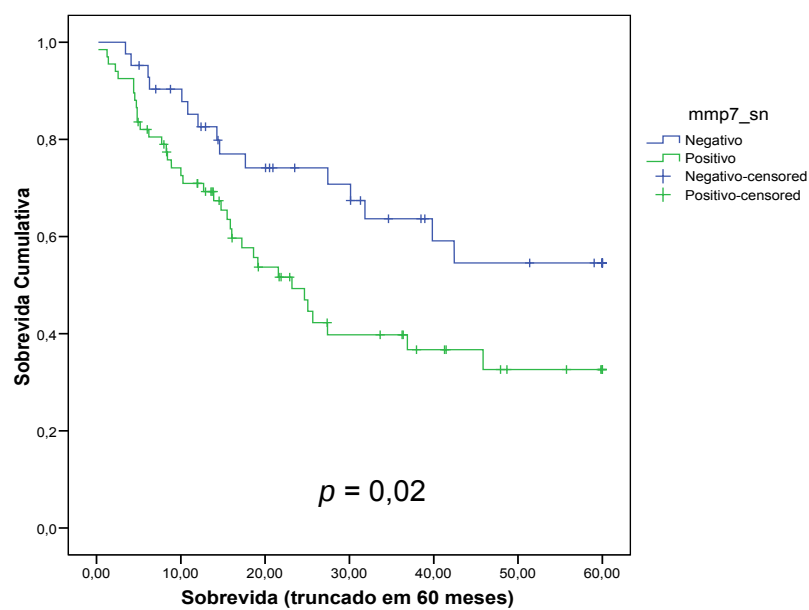


Figura 22 - SG em 60 meses, segundo expressão de MMP-7.

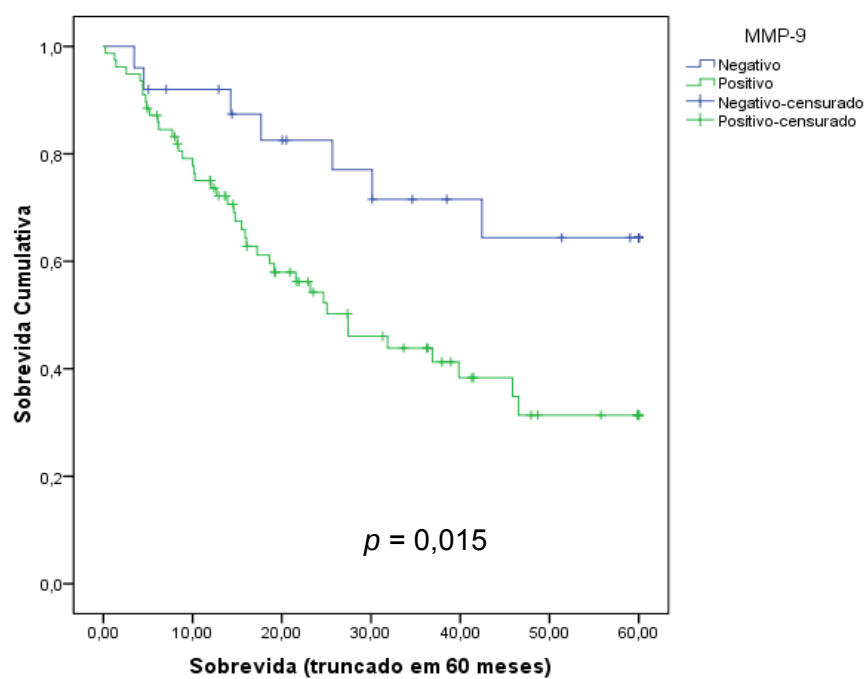


Figura 23 - SG em 60 meses, segundo expressão de MMP-9.

6 DISCUSSÃO

Considerando que nossos objetivos eram caracterizar os diferentes níveis de expressão das proteínas β -catenina, APC, MMP-7, MMP-9, CD44v6, TGF- α , COX-2 e CXCR4 nos diferentes estádios, observou-se uma queda na expressão de β -catenina de membrana conforme o aumento do comprometimento linfonodal, embora sem significância estatística. Em relação à análise de sobrevida do grupo como um todo, não foi notada influência direta de qualquer uma das frações da β -catenina na sobrevida global.

Em relação aos sinais de transcrição envolvidos na proliferação celular, os fatores de crescimento exercem papel importante nesse controle, na diferenciação, apoptose, transformação celular e neovascularização. O TGF- α é um importante ativador de proliferação em vários tipos de tecidos epiteliais. A mucosa gástrica normal apresenta níveis significativamente menores de TGF- α que a mucosa gástrica tumoral, particularmente no tipo intestinal. Carcinomas gástricos avançados expressam níveis maiores de TGF- α e EGF-R, moléculas essas associadas ao pior prognóstico. D'Errico *et al.* (2000) analisaram amostras de 87 pacientes submetidos à ressecção de adenocarcinoma de junção esôfago gástrica, quanto à expressão protéica e de RNA mensageiro (RNA m) de TGF- α . Tanto a proteína quanto o RNAm foram detectados no tecido tumoral e no infiltrado inflamatório adjacente, indicando que TGF- α é diretamente sintetizada pelos dois compartimentos

celulares. Ainda, estes autores demonstraram que expressão protéica de TGF- α foi associada à progressão tumoral ($p= 0,025$) e com comprometimento linfonodal ($p< 0,05$).

Nossos achados não mostraram diferença na expressão de TGF- α em relação ao estadiamento. Entretanto, a sobrevida para aqueles que eram TGF- α negativos foi de 91,7%, enquanto nos TGF- α positivos foi de apenas 49,5% ($p= 0,017$), corroborando com os dados da literatura em termos de agressividade. Os achados de correlação positiva forte entre TGF- α e MMP7, MMP9 e CXCR4 (Tabela 7) são congruentes com o maior potencial metastático e menor sobrevida dos pacientes que expressavam essas proteínas.

O gene APC foi primeiramente identificado em indivíduos portadores de polipose adenomatosa familiar e tem um papel central na gênese dos tumores colorretais. Alguns autores caracterizaram mutação nesse gene em tumores de estômago esporádicos e familiares, demonstrando que a inativação dessa via tem participação na carcinogênese, particularmente nos tumores bem diferenciados e em anel de sinete (HORII et al. 1992; KUSANO et al. 2001).

Já foi relatado que a β -catenina é parte central na via de sinalização Wnt, envolvendo o gene APC e fatores de transcrição como o TCF/LEF. Desta forma, os níveis de β -catenina podem ser regulados pela interação de APC e outras proteínas. Portanto, aumento nos níveis intracelulares de β -catenina estão relacionados à inativação do gene APC. Em 2002, EBERT et al. publicaram estudo onde analisaram tecido gástrico tumoral e normal de

20 pacientes; foram analisados níveis de RNAm de β -catenina e mutações no gene APC. A expressão de β -catenina foi maior nos tecidos tumorais se comparado aos tecidos normais ($p < 0,05$) e mais frequente no tipo intestinal ($p < 0,01$) que no tipo difuso; mutações no gene APC e de β -catenina foram encontradas principalmente no tipo intestinal. Estes resultados sustentam a hipótese de que tumores gástricos intestinais que acumulam a proteína β -catenina podem resultar de uma alteração nos genes da β -catenina e APC. Em nossa amostra, buscamos por interferência no estadiamento e sobrevida. Não foi encontrada influência direta da expressão de APC na sobrevida global e nem no estadiamento.

Como descrito anteriormente, na ausência de sinalização por Wnt, o complexo de degradação GSK/axina/APC fosforila a β -catenina em múltiplos sítios, promovendo sua degradação. A β -catenina por sua vez, tem sua transcrição nuclear ativada pela ligação do TGF- α ao EGF-R. Em nosso estudo, ao contrário do que se esperava, foi encontrada uma correlação positiva entre TGF- α e APC, e não entre TGF- α e β -catenina, resultado que não pode ser sustentado por dados da literatura. Pode ser que na população estudada haja mutação em APC, o que justifica a relação positiva encontrada entre essa proteína e TGF- α . Ainda, foi observada uma relação positiva entre APC e CXCR4, molécula esta envolvida no processo de metastatização direcionada. Esta relação também não tem embasamento científico, porém se observarmos as curvas de sobrevida global dos pacientes que expressavam positivamente CXCR4, notamos uma nítida

desvantagem, traduzindo um fenótipo mais agressivo destes tumores. Esses resultados podem ser explorados em estudos posteriores.

CD44, uma glicoproteína de membrana, originalmente descrita como um receptor de linfócitos em linfonodos específicos está envolvida na ativação de células T e adesão a matriz extracelular. Também é sabido que participa da ativação de migração de células tumorais pela matriz extracelular, evento necessário para invasão e metastatização. CD44 é responsável por iniciar rearranjos do citoesqueleto e outras mudanças morfológicas necessárias para este processo.

CD44 tem várias variantes descritas e a “v6” está ligada à estimulação de genes anti-apoptóticos, já descritos em muitos tumores humanos. A hiperexpressão de CD44v6 em carcinomas gástricos, já estudada em estudos prévios (MULLER et al. 1997; CASTELLA et al. 1998; CHEN et al. 2004; POLKOWSKI et al. 2004), está relacionada com progressão, invasão e metástases. XIN et al. (2001) demonstraram que pacientes com expressão positiva de CD44v6 têm menor sobrevida em 3 e 5 anos do que aqueles com expressão negativa. Nossos resultados mostraram a mesma relação, embora sem significância estatística (46,4% de sobrevida nos positivos e 58,6% nos negativos, $p = 0,052$). Referente ao potencial de metastatização, nossos resultados estão de acordo com o que está descrito na literatura, pois houve uma correlação positiva forte entre CD44v6 e MMP-9 (Tabela 7).

Outra proteína envolvida na gênese do câncer de estômago é a COX-2. As ciclooxigenases representam enzimas fundamentais com atividade bifuncional (peroxidásica e ciclooxigenásica), envolvidas na formação de

prostaglandinas a partir do ácido aracdônico. Duas isoformas são descritas: a COX-1, presente em células normais e a COX-2, indetectável na maioria dos tecidos normais, mas facilmente estimulada por citocinas, fatores de crescimento e agentes carcinógenos. Os mecanismos pelos quais a COX-2 contribui para a carcinogênese não são completamente entendidos. Contudo, alguns autores (SUN et al. 2005; LAZAR et al. 2008) apontam para proliferação celular, inibição de apoptose, aumento da capacidade de invasão e indução de angiogênese como possíveis mecanismos carcinogênicos. Sugere-se que o mecanismo pelo qual as prostaglandinas inflamatórias desencadeariam o processo de carcinogênese seria por meio da ativação da via Wnt, com estabilização da β -catenina, que migraria ao núcleo da célula, interagiria com fatores nucleares de transcrição que determinam a ativação de genes que levam à proliferação celular, dentre eles a MMP-9 (SUN et al. 2005).

COX-2 ativa as metaloproteinases (MMP1 e MMP2), associadas com maior expressão de CD44, que promove a invasão celular. Em algumas linhagens celulares de câncer de cólon, a expressão de COX e de prostaglandina E2 leva a uma maior adesão entre a célula tumoral e célula endotelial, favorecendo metástases.

Na gastrite crônica atrófica, principalmente onde existe infecção crônica por *Helicobacter pylori*, há progressão para metaplasia intestinal, displasia e carcinoma; nessas lesões precursoras, o aumento de COX-2 já foi documentado (PEEK e BLASER 2002). No câncer gástrico, a expressão e correlação de COX-2 com fatores clínico-patológicos, apesar de já

demonstrada, é ainda alvo de discussão. Alguns autores relacionam a expressão de COX-2 com grau de invasão, tamanho do tumor, comprometimento linfonodal e tipo histológico (UEFUJI et al. 1998; LEE et al. 2001; OHNO et al. 2001; RAJNAKOVA et al. 2001; SAUKKONEN et al. 2001; SHI et al. 2003). Outros já não mostram relação com tamanho, estágio, linfonodos ou tipo histológico (RISTIMAKI et al. 1997; LIM et al. 2000; OHNO et al. 2001; SON et al. 2001; KAWABE et al. 2002; CHEN et al. 2001; JOO et al. 2003).

Em nossa amostra foi demonstrado aumento na expressão de COX-2 de acordo com o nível do comprometimento linfonodal ($p = 0,017$), o que se explica pela relação direta desta proteína com a linfangiogênese (IWATA et al. 2007). Observou-se elevada expressão de COX-2 (38,2%) nos pacientes em estágio IV, enquanto pacientes em estádios I, II e III revelaram expressão em menor intensidade. Na análise de sobrevida em 5 anos foi notada diferença importante em relação ao grupo COX-2 positivo (36,4%) *versus* negativo (59,8%) ($p < 0,001$). Esse resultado sinaliza para uma maior agressividade dos tumores COX-2 positivos pela intermediação dos processos evolutivos descritos acima.

Outro fenômeno importante descrito na carcinogênese dos tumores gastrointestinais é a degradação da membrana basal e da matriz extracelular (MEC), indispensáveis para o processo de infiltração e metástase. As MMPs, enzimas proteolíticas, exercem uma função central nessa etapa. Já foram descritos mais de vinte tipos de MMPs, sendo reconhecida a importância da MMP-7 neste processo. A MMP-7 ativa MMP-2 e MMP-9, atuando

centralmente na degradação da MEC, incluindo a degradação do colágeno tipo IV. Apesar de muitas MMPs serem produzidas pelo estroma das células que circundam as células tumorais, a MMP-7 é sintetizada também pelas próprias células neoplásicas, sugerindo forte associação desta enzima com a transformação maligna (CHAMBERS e MATRISIAN 1997; YAMASHITA et al. 1998; NELSON et al. 2000).

Publicações recentes têm apontado que a expressão de MMP-7 encontra-se relacionada a mau prognóstico em tumores de esôfago e pâncreas (YAMAMOTO et al. 1999 e 2001; YAMASHITA et al. 2000, LIU et al. 2002). Em tumores de estômago também há relatos de associação entre MMP-7, disseminação peritoneal e comprometimento linfonodal (NAGASHIMA et al. 1997; YONEMURA et al. 2000).

Em nosso estudo não foi encontrada diferença na expressão de MMP-7 em relação ao estadiamento. TANG (2008) descreveu associação em progressão linfonodal e expressão de MMP-9. Quanto à sobrevida, indivíduos com expressão negativa para MMP-7 e MMP-9 apresentaram taxas maiores do que aqueles com expressão positiva, podendo estes últimos estar relacionados a um maior potencial de agressividade e estádios mais avançados.

Outro ponto da sequência evolutiva do processo de gênese tumoral analisado foi a seleção de órgãos alvo pelo tumor, etapa que conhecemos muito superficialmente. Um exemplo de proteínas envolvidas nesse processo são as quimiocinas. Estas são proteínas que induzem migração direta de vários tipos de leucócitos por meio da interação com um grupo de

receptores transmembrânicos acoplados à proteína G. Os receptores têm capacidade de mediar efeitos biológicos, como a migração celular. Mais de 50 quimiocinas e 20 receptores já foram identificados, inclusive com relações importantes entre tumor primário e local de metástases, determinados por um efeito “chave/fechadura”, entre as quimiocinas e seus receptores (KOISUMI et al. 2007).

CXCR4 está envolvido na formação de metástases de vários tipos de tumores sólidos, podendo ter influência direta nas taxas de sobrevida. Constitui receptor chave entre as células tumorais e o microambiente que as circundam. Células mesenquimais e outras células estromais não-neoplásicas secretam uma quimiocina, SDF-1/CXCL12 (SCOTTON et al. 2002). Esta atrai células circulantes pela ligação com seu receptor, CXCR4. A expressão do receptor de quimiocinas pelas células tumorais é considerada um elemento determinante na evolução metastática, pois as células tumorais que expressam CXCR4 são atraídas aos órgãos onde há expressão de CXCL12. Este, por sua vez, também induz migração, crescimento e sobrevivência de células neoplásicas por produção parácrina, o que ajuda a promover angiogênese tumoral, por atrair células endoteliais para o seu microambiente. Assim, a expressão de CXCR4 está diretamente envolvida com a formação de metástases, incluindo as micrometástases, em vários tipos de tumor, podendo contribuir como importante fator prognóstico (Tabela 9).

Tabela 9 - Expressão de CXCR4 por tipo de tumor.

Tipo de tumor	Sítio de metástase	Autor	Ano
Mama	Pulmão / linfonodo	Muller A	2001
Pulmão	Pleura	Oonakahara K	2004
Próstata	Osso	Taichman et al.	2002
Ovário	Peritônio	Scotton et al.	2001
Estômago	Peritônio	Yasumoto et al.	2006

Fonte: Adaptado de KOISUMI et al. (2007).

Entretanto, TSUBOI et al. (2008) analisaram 98 pacientes com tumores de estômago, estágio pT3 submetidos à gastrectomia e com achado intra-operatório de carcinomatose peritoneal. Não foi demonstrado correlação entre CXCR4 e CXCL12 no tumor primário e células livres na cavidade peritoneal com acometimento peritoneal secundário. Contudo, foi encontrada uma tendência a maior recorrência hepática e linfonodal dependente da expressão destas proteínas.

Em nossa amostra não foi encontrada diferença significativa da expressão de CXCR4 em relação ao estadiamento. Em relação à sobrevida, a expressão positiva de CXCR4 levou a uma sobrevida global de 47,8%, enquanto a expressão negativa apontou para uma sobrevida de 76,2% ($p=0,01$). Esses resultados demonstram que CXCR4 pode ser um marcador de mau prognóstico, corroborando os dados descritos por TSUBOI et al. (2008).

Como referido anteriormente, quase todas essas vias têm pontos de interligação, sendo alguns pouco conhecidos e muitos ainda por serem desvendados. Nossa análise apresentada na Tabela 7 (correlação não-

paramétrica) aponta para moléculas que se relacionam de forma forte ou moderadamente forte.

A relação entre MMP-7 e MMP-9 já foi discutida e é bastante clara; relações entre receptores de quimiocinas e MMPs parecem apontar para uma possibilidade interessante no mecanismo de implantação e desenvolvimento de metástases ainda por ser confirmados.

LOU et al. (2005) descreveram a relação entre CD44v6, molécula envolvida nos mecanismos de adesão e MMP9, enzima proteolítica com papel no desenvolvimento local do tumor, em tumores de Krukenberg. Nosso modelo encontrou essa relação nas mesmas proporções.

Outra proteína importante é o TGF- α . Notamos relação forte positiva com as MMPs, CXCR4, moderada positiva com CD44v6 e COX-2. A relação com as MMPs, CXCR4 e CD44v6 pode ser traduzida por um fenótipo mais agressivo. Quanto à presença de metástases e interação com COX-2, pode ser que esteja relacionada ao maior comprometimento angiogênico e linfonodal, como sinalizado por IWATA et al. (2007). Este autor demonstrou em modelo animal, que o tratamento com inibidor seletivo de COX-2 em camundongos portadores de câncer gástrico, com ou sem comprometimento peritoneal, reduzia de maneira significativa a linfangiogênese tumoral.

Concluindo, em nossa amostra, as expressões de COX-2, TGF- α , MMP-7, MMP-9 e CXCR4 interferiram negativamente na sobrevida global de pacientes com adenocarcinoma gástrico, resultados estes que podem ser justificados pelo papel na disseminação tumoral desempenhado por estas moléculas. COX-2 apresentou influência significativa no estágio clínico, sugerindo que pode ser candidata a estudos terapêuticos.

7 CONCLUSÕES

Diante do que foi exposto, podemos concluir que:

- 1- A maior expressão da proteína COX-2 em nossa amostra apresentou correlação estatisticamente significativa com estádios mais avançados de adenocarcinoma gástrico;
- 2- A expressão de COX-2, TGF- α , MMP-7, MMP-9 e CXCR4 nos tumores relacionou-se a pior sobrevida global dos pacientes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Begnami MD. **Classificação molecular dos carcinomas gástricos**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Boyer B, Vallés AM, Edme N. Induction and regulation of epithelial mesenchymal transitions. **Biochem Pharmacol** 2000; 60:1091-9.

Castella EM, Ariza A, Pellicer I, Fernandez-Vasalo A, Ojanguren I. Differential expression of CD44v6 in metastases of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. **J Clin Pathol** 1998; 51:134-7.

Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:1260-70.

Chen JQ, Zhan WH, He YL, Peng JS, Wang JP, Cai SR, Ma JP. Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. **World J Gastroenterol** 2004; 10:776-82.

Chen NC, Sung TC, Lin TM, Lee HP, Chang JK. Clinicopathologic association of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in gastric adenocarcinomas. **Ann Surg** 2001; 233:183-8.

Clapper ML, Coudry J, Chang WC. β -catenin-mediated signaling: a molecular target for early chemopreventive intervention. **Mutat Res** 2004; 555:97-105.

Cunningham D, Allum WH, Stenneing SP, et al., Perioperative chemotherapy versus surgery alone for respectable gastroesophageal cancer. **N Engl J Med** 2006; 355:11-20.

Davis J, Chalmers A G, Sue-Ling HM, et al. Spiral computed tomography and operative staging of gastric carcinoma: a comparison with histopathological staging. **Gut** 1997; 41:314-9.

Dicken BJ, Graham K, Hamilton SM, et al. Lymphovascular invasion is associated with poor survival in gastric cancer: an application of gene-expression and tissue array techniques. **Ann Surg** 2006; 243:64-73.

Earle CC, Maroun JA. Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer in non-Asian patients: revisiting a meta-analysis of randomized trials. **Eur J Cancer** 1999; 35:1059-64.

Ebert MP, Fei G, Kahmann S, et al. Increased beta-catenin mRNA levels and mutational alterations of the APC and beta-catenin gene are present in intestinal-type gastric cancer. **Carcinogenesis** 2002; 23:87-91.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. **Cancer staging manual**. 6 ed. New York: Springer; 2002. Gastric cancer; p.99 - 106.

Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, et al. Association of E-cadherin and beta-catenin immunoexpression with clinicopathologic features in primary ovarian carcinomas. **Hum Pathol** 2004; 35:663-9.

Ferlay J, Bray F, Parjin DM, Pisani P. **Gobocan 2000: cancer incidence and mortality**. Lyon: IARCPress; 2001. (IARC Cancer Bases n°. 5).

Guarino M, Rubino B, Ballario G. The role of epithelial-mesenchymal transiotion in cancer pathology. **Pathology** 2007; 39:305-18.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. **J Clin Oncol** 1999; 17: 1474-1481.

Hashimoto I, Koizumi K, Tatematsu M, et al. Blocking on the CXCR4/mTOR signalling pathway induces the anti-metastatic properties and autophagic cell death in peritoneal disseminated gastric cancer cells. **Eur J Cancer** 2008; 44:1022-9.

Hermans J, Bonenkamp J, Boon MC, et al. Adjuvant therapy after curative surgery for gastric cancer: meta-analysis of randomised trials. **J Clin Oncol** 1993; 11:1441-7.

Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, et al. The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. **Cancer Res** 1992; 52:3231-3.

Hundahl SA, Philips JL, Menck HR. The national cancer data base report on poor survival of US gastric carcinoma patients treat with gastrectomy, 5th ed. AJCC staging, proximal disease and the different disease hypothesis. **Cancer** 2000; 88:921-32.

Hundahl S, MacDonald J, Smalley S. Stomach. In: Chang A, Ganz P, Hayes D, et al. editors. **Oncology: an evidence-based approach**. New York: Spring; 2006. p.680-703.

Inoue M, Tsugane S. Epidemiology of gastric cancer in Japan. **Postgrad Med J** 2005; 81:419-24.

Iwata C, Kano M, Komuro A, Oka M, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymph node metastasis via reduction of lymphangiogenesis. **Cancer Res** 2007; 67:10181-9.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. **CA Cancer J Clin** 2006; 56:106-30.

Joo EY, Rew SJ, Seo HY, Choi KS, Kim JY. Cyclooxygenase-2 over expression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. **J Clin Gastroenterol** 2003; 37:28-33.

Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, et al. Clinicopathological features and overexpression of matrix metalloproteinases in intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis. **Clin Cancer Res** 2000; 6:3581-4.

Kalluri R, Neilson E. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **J Clin Invest** 2003; 112:1776-84.

Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in primary and remnant gastric carcinoma: comparing it with p53 accumulation, Helicobacter pylori infection, and vascular endothelial growth expression. **J Surg Oncol** 2002; 80:79-88.

Koisumi K, Hojo S, Akashi T, Yasumoto K, Saiki I. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. **Cancer Sci** 2007; 98:1652-8.

Kusano M, Kakiuchi H, Mihara M, et al. Absence of microsatellite instability and germline mutations of E-cadherin, APC and p53 genes in Japanese familial gastric cancer. **Tumour Biol** 2001; 22:262-8

Lazar D, Taban S, Ardeleanu C, et al. Immunohistochemical expression of the cyclooxygenase-2 in gastric cancer. The correlations with the tumor angiogenesis and patients' survival. **Rom J Morph Embryol** 2008; 49:371-9.

Lee LT, Leung KW, Lau YJ, et al. Inverse association between cyclooxygenase-2 overexpression and microsatellite instability in gastric cancer. **Cancer Lett** 2001; 168:133-40.

Lim YH, Joo JH, Choi HJ, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric cancer. **Clin Cancer Res** 2000; 6:519-25.

Liu XP, Kawauki S, Oga A, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression at the invasive front in gastric carcinoma. **Jpn J Cancer Res** 2002; 93:291-5.

Lou G, Gao Y, Ning XM, Zhang QF. Expression and correlation of CD44v6, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2, and matrix metalloproteinase-9 in Krukenberg tumor. **World J Gastroenterol** 2005; 11:5032-6.

Lowy AM, Mansfield PF, Leach SD, Ajani J. Laparoscopic staging for gastric cancer. **Surgery** 1996; 119:611-4.

Marchenko ND, Marchenko GN, Weinreb RN, et al. β -Catenin regulates the gene of MMP-26, a novel matrix metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells. **Int J Biochem Cell Biol** 2004; 36:942-56.

McDonald J, Hill M, Roberts I. Gastric cancer: epidemiology, pathology, detection and staging. In: Ahlgren J, MacDonald J, editors. **Gastrintestinal oncology**. Philadelphia: Lippincott; 1992. p.151-8

McDonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of stomach or gastroesophageal junction. **N Engl J Med** 2001; 345:725-30.

Mareel M, Leroy A. Clinical cellular and molecular aspects of cancer invasion. **Physiol Rev** 2003; 83:337-76.

Mareel M, Oliveira JM, Madani I. Cancer invasion and metastasis: interacting ecosystems. **Virchows Arch** 2009; 454:599-622.

Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature** 2001; 410:50-6.

Muller W, Schneiders A, Heider KH, Meier S, Hommel G, Gabbert HE. Expression and prognostic value of the CD44 splicing variants v5 and v6 in gastric cancer. **J Pathol** 1997; 183:222-7.

Nagashima Y, Hasegawa S, Koshikawa N, et al. Expression of matrilysin in vascular endothelial cells adjacent to matrylisin-producing tumors. **Int J Cancer** 1997; 72:441-5.

Nakamura ES, Koizumi K, Kobayashi M, et al. RANKL-induced CCL22/macrophage – derived chemokine produced from osteoclasts potentially promotes the bone metastasis of lung cancer expressing its receptor CCR4. **Clin Exp Metastasis** 2006; 23:9-18.

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Mastroian ML. Matrix Metalloproteinases: biological activity and clinical implications. **J Clin Oncol** 2000; 18:1135-49.

Nelson JW, Nusse R. Convergence of Wnt, Catenin, and Cadherin Pathways. **Science** 2004; 303:1483-7.

Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, Hasegawa K, et al. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 level in patients with gastric carcinoma. **Cancer** 2001; 91:1876-81.

Oloumi A, McPhee T, Dedhar S. Regulation of E-cadherin expression and β -catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. **Biochim Biophys Acta** 2004; 1691:1-15.

Panzini I, Gianni I, Fatori PP, et al. Adjuvant chemotherapy in gastric cancer: a meta-analysis of randomized trials and a comparison with previous meta-analysis. **Tumori** 2002; 88:21-7.

Parkin DM. Epidemiology of cancer: global patterns and trends. **Toxicol Lett** 1998; 227:102-3.

Parkin D, Bray F, Ferlay J, Pisani D. Global cancer statistics, 2002. **CA: Cancer J Clin** 2005; 55:74-108.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. **Cancer incidence in five continents Vol. VIII**. Lyon: IARC, 2009. (IARC Scientific Publication No. 155)

Peek RM Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:28-37.

Polkowski WP, Skomra DG, Mielko J, et al. E-cadherin expression as predictive marker of proximal resection line involvement for advanced carcinoma of the gastric cardia. **Eur J Surg Oncol** 2004; 30:1084-92.

Rajnakova A, Moolchala S, Goh MP, Ngoi S. Expression of nitric oxide synthase, cyclooxygenase and p53 in different stages of human gastric cancer. **Cancer Lett** 2001; 172:177-85.

Ramis-Conde I, Drasdo D, Anderson ARA, Chaplain MA. Modeling the Influence of the E-cadherin-b-catenin pathway in cancer cell invasion: a multiscale approach. **Biophys J** 2008; 95:155-65.

Ristimäki A, Honjanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. **Cancer Res** 1997; 57:1276-80.

Saito H, Tsujitani S, Katano K, et al. Serum concentration of CD44 variant 6 and its relation to prognosis in patients with gastric carcinoma. **Cancer** 1998; 83:1094-101.

Saukkonen K, Nieminen O, van Rees B, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinomas. **Clin Cancer Res** 2001; 7:1923-31.

Scotton CJ, Wilson JL, Scorr K. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. **Cancer Res** 2002; 62:5930-8.

Shi H, Xu MJ, Hu ZN, Xie JH. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. **World J Gastroenterol** 2003; 9:1421-6.

Son JH, Kim HY, Park ID, et al. Interaction between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. **J Clin Gastroenterol** 2001; 33:383-8.

Sun WH, Sun YL, Fang RN, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in gastric carcinoma and its correlation with angiogenesis. **Jpn J Clin Oncol** 2005; 35:707-13

Taichman RS, Cooper C, Keller ET, et al. Use of the stromal cell-derived factor-1/ CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. **Cancer Res** 2002; 62:1832-37.

Tan DSP, Agarwal R, Kaye SB. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer: review. **Lancet Oncol** 2006; 7:925-34.

Tang Y, Zhu J, Chen L, Chen L, Zhang S, Lin J. Associations of matrix metalloproteinase-9 protein polymorphisms with lymph node metastasis but not invasion of gastric cancer. **Clin Cancer Res** 2008; 14:2870-7.

Tsuboi K, Kodera Y, Nakanishi H, et al. Expression of CXCL12 and CXCR4 in T3-stage gastric cancer does not correlate with peritoneal metastasis. **Oncol Rep** 2008; 20:1117-23.

Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Expression of cyclooxygenase-2 human gastric adenoma and adenocarcinomas **J Surg Oncol** 2001; 76:26-30.

Xin Y, Grace A, Gallagher MM, Curran BT, Leader MB, Kay EW. CD44V6 in gastric carcinoma: a marker of tumor progression. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2001; 9:138-42.

Yamamoto H, Adachi Y, Itoh F, et al. Association of matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Res** 1999; 59:3313-6.

Yamamoto H, Itoh F, Iku S, et al. Expression of matrix metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinical pathologic and prognosis significance of matrilysin expression. **J Clin Oncol** 2001; 19:1118-27.

Yamashita K, Azumano I, Mai M, Okada Y. Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human gastric carcinomas: implications for vessel invasion and metastasis. **Int J Cancer** 1998; 79:187-94.

Yamashita K, Mori M, Shiraiashi T, Shibuta K, Sugimachi K. Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 expression in esophageal carcinoma. **Clin Cancer Res** 2000; 6:1169-74.

Yamauchi K, Uehara Y, Kitamura N, et al. Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlates with distant metastasis and prognosis in gastric cancer. **Int J Cancer** 1998; 79:256-62.

Yasui W, Naohide O, Aung PP, et al. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. **Gastric Cancer** 2005; 8:86-94.

Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, et al. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. **Cancer Res** 2006; 66:2181-7.

Yonemura Y, Endou Y, Fujita H, et al. Role of MMP-7 in the formation of peritoneal dissemination in gastric cancer. **Gastric Cancer** 2000; 3:63-70.

Yoshie O. Role of chemokines in trafficking of lymphocytes and dendritic cells. **Int J Hematol** 2000; 72:399-407.

Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by β -catenin and plakoglobin. **Mol Cell Biol** 2000a; 20:4238-52.

Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. Plakoglobin and β -catenin: protein interactions, regulation and biological roles. **J Cell Sci** 2000b; 113:3127-39.