

# Expressão do P16 e do PDGFR-Beta no adenocarcinoma gástrico

## *Expression of P16 and PDGFR-Beta in gastric adenocarcinoma*

RODRIGO POZZA PINTO<sup>1</sup>; FERNANDO KREBS CIRNE LIMA<sup>2</sup>; JANE M U KULKZYNSKI<sup>3</sup>; LUIS FERNANDO MOREIRA<sup>4</sup>

### R E S U M O

**Objetivo:** Detectar a expressão imunoistoquímica do p16 e do PDGFR-beta no adenocarcinoma gástrico. **Métodos:** Foram estudados 36 pacientes submetidos a cirurgia para adenocarcinoma gástrico entre 1998 e 2002 no Hospital da Santa Casa de Porto Alegre. As variáveis investigadas foram: idade, sexo, tamanho e localização do tumor, número de linfonodos dissecados, número de linfonodos metastáticos, tipo histológico, extensão da ressecção cirúrgica e estadiamento patológico. **Resultados:** Não foi detectada expressão do PDGFR-beta nas peças cirúrgicas. Em relação ao p16, detectou-se perda de expressão menor que 10% e menor que 1% respectivamente em 89% e 79% das peças estudadas. **Conclusão:** Não houve correlação entre a perda de p16 e as variáveis estudadas.

**Descritores:** Genes p16. Receptor tipo beta para fator de crescimento derivado de plaquetas. Adenocarcinoma.

### INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma gástrico foi a principal causa de morte por câncer durante a maior parte do século 20, agora superado pelo câncer de pulmão. Anualmente, 750.000 novos casos são diagnosticados. Ocorrem grandes variações geográficas, e as incidências mais altas são encontradas no Japão, América do Sul, Leste Europeu e Oriente Médio<sup>1</sup>. Este tipo de câncer é duas vezes mais frequente em homens que em mulheres,<sup>1,2</sup> tem uma baixa incidência antes da quarta década de vida e um pico de incidência na sétima década<sup>1</sup>. No Brasil, estima-se que 23.000 novos casos e 11.000 mortes devam ocorrer em 2005<sup>3</sup>.

O prognóstico do adenocarcinoma gástrico é ruim, principalmente devido à ausência de sintomatologia e diagnóstico tardio, com um índice geral de sobrevida de 5-15% em cinco anos<sup>1,4</sup>. No Japão, onde essa doença é endêmica, mas o diagnóstico é geralmente feito num estágio precoce devido à ampla disponibilidade de endoscopia, o índice de sobrevida é de 50% em cinco anos<sup>1</sup>. A ressecção completa de toda a doença em nível macro- e microscópico é o único tratamento potencialmente curativo. Entretanto, a doença tem recidiva em 80% dos pacientes mesmo após a ressecção curativa<sup>1</sup>.

O oncogene p16 está implicado na patogênese de muitos tumores humanos e mesmo na regulação do crescimento celular normal, juntamente com as ciclinas, tirosina-quinases e fatores de transformação e crescimento de tumores, como o TGF-alfa e -beta e os ligantes e receptores (alfa e beta) de fatores de crescimento

derivados de plaquetas (PDGF). Mutações herdadas do p16 estão associadas com melanomas hereditários. Deleções e a inativação adquirida do p16 são encontradas em 75% dos carcinomas pancreáticos, 40-70% dos glioblastomas, 50% dos carcinomas esofágicos e 20% dos casos de câncer de pulmão de células não-pequenas<sup>5</sup>. Trabalhos recentes demonstraram relação entre a inativação do p16 e o desenvolvimento do câncer de estômago. Quarenta a noventa por cento dos adenocarcinomas gástricos mostram inativação do p16,<sup>6-11</sup> parecendo ter relação com a diferenciação celular<sup>7,10,12</sup>. A expressão do p16 encontra-se diminuída na metástase de linfonodos<sup>6</sup>. Aparentemente, não há diferença na expressão entre os tipos intestinal e difuso de adenocarcinoma<sup>12</sup>.

O receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR-beta), um receptor de superfície da tirosina quinase, é importante no controle do crescimento, diferenciação e morte celular<sup>13,14</sup>. O PDGFR foi encontrado ativado e com mutação em tumor estromal gástrico, onde c-KIT, o marcador mais comumente encontrado, estava em sua forma selvagem.<sup>15,16</sup> Os receptores PDGF agem sobre as células de origem estromal e não são expressos em células epiteliais sob condições fisiológicas normais.<sup>17</sup> A expressão do PDGFR foi descrita em dermatofibromiossarcoma, leucemia mielocítica crônica e em tumores gastrointestinais estromais (GISTs),<sup>18,19</sup> além de outros tumores sólidos, tais como glioblastomas e câncer de próstata<sup>13,18</sup>. O PDGF-beta e seu receptor não foram estudados com relação à expressão e resposta a inibidores de crescimento celular em tumores gástricos não-estromais.

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Faculdade de Medicina, UFRGS, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

1. Aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da UFRGS; 2. Aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da UFRGS; 3. Prof. Adjunta da FAMED, UFRGS; 4. Prof. Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da UFRGS.

## MÉTODOS

Trinta e seis pacientes submetidos a cirurgia para adenocarcinoma gástrico entre 1998 e 2002 no Hospital da Santa Casa de Porto Alegre foram estudados com o objetivo de determinar a prevalência do p16 e do PDGFR-beta.

Nenhum dos 36 pacientes tinha histórico de outros tumores malignos (exceto tumores epiteliais de células escamosas e de células basais), de quimioterapia ou radioterapia pré-operatória, o que os excluiria do estudo.

As variáveis investigadas foram: idade, sexo, tamanho e localização do tumor, número de linfonodos dissecados e linfonodos metastáticos, tipo histológico, extensão da ressecção cirúrgica e estadiamento patológico. Dados clínicos e patológicos foram coletados dos prontuários dos pacientes, bem como de relatórios cirúrgicos.

A análise de peças cirúrgicas (hematoxilina-eosina, HE) incluiu a avaliação da profundidade da invasão tumoral na parede gástrica, a metástase de linfonodos, o grau e tipo histológicos (intestinal ou difuso, segundo a classificação de Lauren).

### Imunoistoquímica

As peças foram processadas de acordo com a rotina do Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Anticorpos monoclonais anti-p16<sup>ink4a</sup> de camundongo (DakoCytomation, Carpinteria, California, USA) e anticorpos policlonais anti-PDGFR beta Ab-1 de coelho (DakoCytomation, Carpinteria, California) foram usados na avaliação imunoistoquímica, diluídos em solução salina de PBS a 1:100 e 1:75, respectivamente. A positividade foi determinada pelo método ABS (complexo streptavidina-biotina-peroxidase; LABS+System HRP, DakoCytomation, Carpinteria, California, USA).

### Análise das amostras de lâminas

Até 20 campos de grande aumento (400X) de cada amostra foram capturados para o computador (Image Pro-Plus, v 4.5.1.2.2, Media Cybernetics). Na tela do computador, depois de inserida uma grade sobre as imagens, foram contados o número total de células cancerosas e o número total de células cancerosas imunorreativas. Coloração castanha do núcleo sobre a coloração do citoplasma foi considerada como positividade para p16. Amostras de câncer de pulmão foram usadas como controles positivos externos. A percentagem de positividade para p16 foi calculada dividindo-se o número de células cancerosas coradas pelo número total de células cancerosas, multiplicado por 100. Dois pontos de corte foram considerados como perda de expressão: <10% e <1%. Uma escala qualitativa foi estabelecida para PDGFR-beta, conforme a intensidade da coloração: (uma) sem coloração, (duas) fraca, (três) moderada e (quatro) forte coloração. Amostras de câncer de mama foram usadas como controles positivos externos. Para ser considerada positiva, a amostra deveria ter no mínimo 10% de células cancerosas coradas moderadamente ou fortemente.

### Análise estatística

Dados qualitativos foram descritos como média e desvio-padrão. Frequência percentual e absoluta foram usadas com variáveis categóricas. O teste exato de Fischer foi usado para comparar a expressão de p16 em relação a sexo e tipo histológico. O teste t de Student foi utilizado para verificar a associação do p16 com tamanho, idade e número de linfonodos metastáticos. O estadiamento patológico foi associado ao p16 usando-se o teste do qui-quadrado (valor de  $p < 0.05$  para todos os testes). A análise estatística foi realizada através do Excel Microsoft Office 2003.

## RESULTADOS

Trinta e seis pacientes com adenocarcinoma gástrico foram estudados; 20 (55,5%) homens e 16 (44,5%) mulheres (Tabela 1). A média geral das idades dos pacientes foi 59,2 (13,2); 59,2 (10,7) para os homens e 59,3 (16,6) para as mulheres. A diferença não foi estatisticamente significativa.

A localização do tumor foi a seguinte: dois (5,5%) no cárdia, quatro (11,1%) no cárdia e fundo, cinco (13,9%) no corpo e fundo, um (2,8%) no corpo, dois (5,5%) no corpo e antro, 19 (52,8%) no antro e três (8,3%) no piloro. Vinte e três (63,9%) pacientes foram submetidos a gastrectomia parcial, 11 (33,3%) a gastrectomia total e duas (5,5%) a esofagogastrectomia. O número médio de linfonodos ressecados foi 15,9 (desvio-padrão de 10,4), dentre os quais dois (5,2) mostraram metástase (30,8%). A análise dos dados da extensão das ressecções não foi

**Tabela 1** - Características clínicas e patológicas dos pacientes.

Características	n	Percentagem
Idade (mediana, dp)	36	59,2 (13,2)
Sexo masculino:feminino	20:16	55:45
Tipo		
Intestinal	13	36
Difuso	23	64
Grau		
Bem	1	2,8
Moderadamente	2	5,6
Pouco	33	91,6
Linfonodos (dp)	573	15,9 (10,4)
Linfonodos metastáticos (dp)	178	4,9 (5,2)
Estadiamento		
IA	5	13,9
IB	2	5,5
II	3	8,3
IIIA	10	27,8
IIIB	10	27,8
IV	6	16,7

Dados apresentados como as médias e desvios-padrão (dp) ou frequência (percentagem), a menos que especificado diferentemente.

possível devido à falta dessa informação na maioria dos registros cirúrgicos (Tabela 2).

Com relação à classificação de Lauren, 64% eram do tipo difuso e 36% eram do tipo intestinal. O grau de diferenciação histológica incluiu 91,6% de tumores pouco diferenciados, 5,6% moderadamente e 2,8% bem diferenciados. O estadiamento patológico, de acordo com a 6ª. edição do TNM, demonstrou 13,9%, 5,5%, 8,3%, 27,8%, 27,8%, e 16,7% para estadios IA, IB, II, IIIA, IIIB e stage IV, respectivamente.

A análise do p16 mostrou positividade menor que 10% em 32 (89%) pacientes e menor que 1% em 28 (78%). A positividade para p16 foi comparada (nos pontos de corte 10% e 1% respectivamente) com idade, sexo, tamanho do tumor, linfonodos metastáticos, estadiamento patológico e tipo histológico de Lauren, e esses resultados são apresentados na tabela 2. Não houve diferença estatística em nenhum deles, exceto para idade e estadiamento do tumor para uma perda de p16 quando foram comparadas as expressões >1% a <1% (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

Foi uma decisão arbitrária estudar simultaneamente o p16, cuja perda de expressão tem sido exaustivamente estudada nos tumores gástricos, e o PDGFR-beta, cuja associação com o adenocarcinoma gástrico ainda não

foi encontrada na literatura médica. Embora não haja uma íntima relação entre esses marcadores, seria possível especular que o aumento da expressão do PDGFR-beta em células tumorais, aumentando os estímulos mitogênicos às células, poderia estar associada com a perda de atividade de p16, que é um dos importantes inibidores do ciclo celular. Além disso, resultados promissores no tratamento desses pacientes com inibidores da tirosina-quinase, tais como o imatinib (antes conhecido como STI571, Gleevec, Novartis Pharmaceutical Corp, East Hanover, NJ, USA) foram relatados para tumores gastrointestinais estromais (GISTs), nos quais o PDGFR é superexpressado<sup>13,15,20,21</sup>. Em um modelo animal de carcinoma gástrico foi demonstrado aumento dos efeitos antitumorais e citotóxicos da 5-FU e do paclitaxel quando combinados com imatinib<sup>22</sup>.

No presente estudo, 89% dos casos apresentavam perda de expressão do p16 (positividade menor que 10%), o que é comparável aos dados da literatura, com 40%-90% de perda.<sup>3,6,7</sup> Setenta e oito por cento dos casos mostraram positividade inferior a 1%. Esse ponto de corte mais baixo foi escolhido para se determinar o poder de associação da perda de expressão do p16 e as variáveis estudadas.

Não se detectou expressão do PDGFR-beta nos 36 casos estudados. A associação entre esse marcador e o adenocarcinoma gástrico não foi encontrada na literatura médica, embora a sua expressão (PDGFR alfa e beta) tenha sido encontrada em outros tumores epiteliais, tais como o colangiocarcinoma<sup>23</sup>, e o câncer de ovário<sup>24</sup> e de mama<sup>25</sup>.

**Tabela 2** - Perda de p16 de acordo com características clinicopatológicas.

Características	p16		p16	
	<1% (n=28)	>1% (n=8)	<10% (n=32)	>10% (n=4)
Homens: Mulheres	16:12	4:4	19:13	1:3
	<i>P=1 (ns)*</i>		<i>P=1 (ns)*</i>	
Idade (dp) anos	57,3 (13,6)	66,1 (9,1)	59 (13,6)	61,2 (9,8)
	<i>P=0,05 †</i>		<i>P=0,7 (ns) †</i>	
Tamanho do tumor (dp) cm	6,7 (3,8)	5,2 (3)	6,5 (3,6)	5,2 (3,6)
	<i>P=0,28 (ns) †</i>		<i>P=0,55 (ns) †</i>	
Tipo histológico				
Difuso	9	4	11	2
Intestinal	19	4	21	2
	<i>P=1 (ns)*</i>		<i>P=1 (ns)*</i>	
Linfonodos metastáticos (dp)	4,5 (5)	6,6 (6)	44 (4,7)	9,5 (7,8)
	<i>P=0,37 (ns) †</i>		<i>P=0,28 (ns) †</i>	
Estadiamento				
IA	5	0	5	0
IB	2	0	2	0
II	3	0	3	0
IIIA	5	5	8	2
IIIB	10	0	10	0
IV	3	3	4	2
	<i>P=0,02 ‡</i>		<i>P=0,22 (ns) ‡</i>	

ns: não significativo; \*Teste Exato de Fischer; † Teste t de Student; ‡ Teste de Qui-Quadrado; dp: desvio-padrão.

Não houve diferença estatística entre as médias das idades para ambas as expressões, contrastando com relatos estadunidenses, onde a idade das mulheres tende a ser mais elevada<sup>1</sup>. Assim como em outro relato<sup>6</sup>, o presente trabalho não encontrou relação da expressão do p16 com sexo ou com idade.

Com relação ao tipo histológico de Lauren, ao contrário das expectativas, predominou o tipo difuso,<sup>1,26-28</sup> não sendo encontrada diferença estatística entre o tipo histológico de Lauren e a expressão de p16 nos dois pontos de corte estudados, conforme reportado anteriormente,<sup>12</sup> embora não se tenha chegado a um acordo a respeito dessa questão<sup>7,27</sup>.

Embora se saiba que tumores com perda de p16 tendem a ter um potencial metastático mais alto, não foi

realizada no presente estudo a imunoistoquímica para o p16 nos linfonodos, uma vez que a expressão total do p16 é muito mais baixa em linfonodos metastáticos do que na lesão primária<sup>6</sup>.

No estadiamento patológico, 72% dos pacientes estavam no estágio avançado III ou IV como resultado de diagnóstico tardio, embora isso não fosse significativo (perda de p16 e estadiamento) neste estudo.

Foi demonstrada uma grande perda da expressão de p16 em ambos os pontos de corte estudados, embora não houvesse diferenças estatísticas entre as variáveis. Maiores investigações são necessárias nesses casos para estabelecer sua associação com a metástase de linfonodos e com a sobrevida, bem como para o mecanismo envolvido na inativação do p16.

## A B S T R A C T

**Objectives:** To detect immunohistochemistry expression of p16 and PDGFR-beta on gastric adenocarcinoma. **Methods:** Thirty six patients submitted to surgery for gastric adenocarcinoma between 1998 and 2002 at Santa Casa de Porto Alegre Hospital have been studied. Variables investigated were: age, gender, tumour size and localization, number of dissected and metastatic nodes, histological type, surgical resection extension and pathological staging. **Results:** No expression of PDGFR-beta has been detected on surgical specimens. Concerning to p16, loss of expression lower than 10% and 1% has been detected respectively on 89% and 79% of the specimens studied. **Conclusion:** There has been no correlation among p16 loss and variables studied.

**Key words:** Genes, p16. Receptor, Platelet-derived growth factor beta. Adenocarcinoma.

## REFERÊNCIAS

- De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg AS. Cancer – Principles and Practice of Oncology. 6<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001.
- AICR – American Institute for Cancer Research. World Cancer Research Fund. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: Banta Book Group; 1997.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2005 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2005.
- Brien TP, Depowski MD, Sheehan CE, Ross JS, McKeenna BJ. Prognostic factors in gastric cancer. Mod Pathol 1998; 11:870-7.
- Wistuba II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell carcinoma. Semin Oncol. 2001 Apr;28(2 Suppl 4):3-13
- He XS, Su Q, Chen ZC, et al. Expression, deletion and mutation of p16 gene in human gastric cancer. World J Gastroenterol 2001 Aug; 7(4): 515-21.
- Zhao GH, Li TC, Shi LH, et al. Relationship between inactivation of p16 gene and gastric carcinoma. World J Gastroenterol 2003 May; 9(5): 905-9.
- Kanyama Y, Hibi K, Nakayama H, et al. Detection of p16 promoter hypermethylation in serum of gastric cancer patients. Cancer Sci 2003 May; 94(5): 418-20.
- Ficorella C, Cannita K, Ricevuto E, et al. P16 hypermethylation contributes to the characterization of gene inactivation profiles in primary gastric cancer. Oncol Rep 2003 Jan-Feb; 10(1): 169-73.
- Tang S, Luo H, Yu J, et al. Relationship between alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) genes of CDKN2A locus and gastric cancer. Chin Med J 2003 Jul; 116(7): 1083-7.
- Lee HS, Lee HK, Kim HS, et al. Tumor suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis. J Pathol 2003 May; 200(1): 39-46.
- Rocco A, Schandl L, Nardone G, et al. Loss of expression of tumor suppressor p16(INK4) protein in human primary gastric cancer is related to the grade of differentiation. Dig Dis 2002; 20(1): 102-5.
- George D. Platelet-derived growth factor receptors: a therapeutic target in solid tumors. Semin Oncol 2001 Oct; 28(5 Suppl 17): 27-33.
- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. Physiological Reviews 1999 Oct; 79(4): 1283- 316.
- Koh JS, Trent J, Chen L, et al. Gastrointestinal stromal tumors: overview of pathologic features, molecular biology, and therapy with imatinib mesylate. Histol Histopathol 2004 Apr; 19(2): 565-74.
- Hirota S, Ohashi A, Nishida T, et al. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. Gastroenterology 2003 Sep; 125(3): 660-7.
- Liu YC, Chen SC, Chang C, et al. Platelet-derived growth factor is an autocrine stimulator for the growth and survival of human esophageal carcinoma cell lines. Exp Cell Res 1996 Nov 1; 228(2): 206-11.
- Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor c-kit. Int J Biochem Cell Biol 1999; 31: 1037-51.
- Espósito I, Kleeff J, Bischoff SC, et al. The stem cell factor c-kit system and mast cells in human pancreatic cancer. Lab Invest 2002; 82: 1481-92.
- Shinomura Y, Kinoshita K, Tsutsui S, Hirota S. Pathophysiology, diagnosis and treatment of gastrointestinal stromal tumors. J Gastroenterol 2005; 40: 775-80.
- von Mehren M. Recent advances in the management of gastrointestinal stromal tumors. Current Oncol Rep 2003; 5(4): 288-94.
- Kim R, Emi M, Arihiro K, Tanabe K, Uchida Y, Toge T. Chemosensitization by STI571 targeting the platelet derived growth factor/platelet derived growth factor receptor- signaling pathway

- in the tumor progression and angiogenesis of gastric carcinoma. *Cancer* 2005; 103(9): 1800-9.
23. Holcombe RF, Gu M, Imagawa D, Milovanovic T. Expression of Kit and platelet derived growth factors alpha and beta in cholangiocarcinoma, and case report of therapy with imatinib mesylate (STI571). *Anticancer Drugs* 2003; 14(8): 651-7.
24. Wilczynski SP, Chen YY, Chen W, Howell SB, Shively JE, Alberts DS. Expression and mutational analysis of tyrosine kinase receptors c-kit, PDGFR-alpha and PDGFR-beta in ovarian cancers. *Human Pathol* 2005; 36(3): 242-9.
25. Carvalho I, Milanezi F, Martins A, Reis RM, Schmidt F. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in breast cancer is associated with tumor progression. *Brest Cancer Res* 2005; 7(5)R788-95.
26. Chow WH, Blot WJ, Vaughan TL, et al. Body mass index and the risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:150.
27. César AC, Silva AE, Tajara EH. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. *Arq Gastroenterol* 2002 Out-Dez; 39(4): 253-59.
28. Marigo C, Okuyama MH, Santos GS. Tipos histológicos e mortalidade por câncer gástrico em São Paulo. 1997 *Cad Saúde Pub* 13 supl 1.

Recebido em 08/10/2008

Aceito para publicação em 15/12/2008

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

**Como citar este artigo:**

Pinto RP, Lima FKC, Kulkzynski JMU, Moreira LF. Expressão do p16 e do pdgfr-beta no adenocarcinoma gástrico. *Rev Col Bras Cir.* [periódico na Internet] 2009; 36(3). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rbc>

**Endereço para correspondência:**

Rodrigo Pozza Pinto

E-mail: [rppinto@terra.com.br](mailto:rppinto@terra.com.br)