

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO p16 E DO PDGFR-beta
NO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

RODRIGO POZZA PINTO

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS FERNANDO MOREIRA

Porto Alegre

2005

**“Não há comparação entre
o que se perde por
fracassar e o que se perde
por não tentar.”**

Francis Bacon

**À Fabiana, minha esposa,
pelos melhores anos da minha vida.**

**Aos meus pais, Fábio e Carmen,
por tudo.**

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Luis Fernando Moreira**, meu orientador, pela oportunidade proporcionada, por todo apoio e pela interminável paciência.

À **Dra. Jane Maria Kulczynski**, patologista do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela disponibilidade e competência na análise das lâminas e pelas imprescindíveis sugestões ao trabalho.

Ao colega e cirurgião **Dr. Hélio Pilla**, pelo auxílio nas traduções para o inglês.

À técnica em histologia **Flávia Giusti**, do Laboratório de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela presteza e interesse no preparo das lâminas para o estudo.

À **Equipe de Cirurgia da Décima Enfermaria** do Complexo Hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre, pela disponibilização dos casos para o estudo.

Ao **Serviço de Patologia** do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, pela coleta e cessão dos blocos de parafina.

Aos **coordenadores do Programa de Pós-Graduação**, por possibilitarem a realização deste projeto.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

O adenocarcinoma de estômago foi a principal causa de morte por neoplasia maligna no mundo durante grande parte do século XX e atualmente é superado somente pelas neoplasias epiteliais malignas de pulmão. Cerca de 750.000 novos casos são diagnosticados anualmente. Apresenta grande variação geográfica, sendo suas maiores incidências encontradas no Japão, América do Sul, Europa Oriental e Oriente Médio. É duas vezes mais freqüente em homens do que em mulheres; é pouco comum antes dos 40 anos e atinge sua maior incidência por volta da sétima década de vida. No Brasil as estimativas para o ano de 2005 apontavam para aproximadamente 23 mil casos novos e 11 mil óbitos. O único tratamento potencialmente curativo é a ressecção completa, macro e microscópica, de toda neoplasia. Mesmo após gastrectomia curativa, a recidiva, regional ou à distância, pode ocorrer em 80% dos casos. Esforços para melhorar estes resultados têm se focalizado no desenvolvimento de terapias pré e pós-operatórias mais efetivas. O oncogene *p16* é conhecido por estar implicado na patogênese de muitos tumores humanos e também na regulação do crescimento celular normal, juntamente com as ciclinas, os complexos tirosinoquinases e os fatores de crescimento e transformação tumoral, entre eles o TGF-alfa e beta e os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e seus receptores (PDGFR alfa e beta). A perda de expressão do *p16* no adenocarcinoma gástrico tem sido amplamente estudada. O *PDGFR* tem sido encontrado ativado e mutado nos tumores gástricos estromais em que o *c-KIT*, o marcador mais comumente encontrado, está em sua forma selvagem. Os receptores PDGF atuam sobre células de origem estromal e não se expressam em células epiteliais em condições fisiológicas normais. . Isoladamente, o PGDF-beta e o seu receptor ainda não foram objetivamente estudados nem quanto à expressão nem quanto à resposta aos inibidores do crescimento celular no tecido gástrico tumoral que

não de origem estromal. O objetivo deste estudo foi determinar a expressão imuno-histoquímica do *p16* e do *PDGFR-beta* no adenocarcinoma gástrico. Foram avaliados no estudo 36 pacientes submetidos à cirurgia por adenocarcinoma de estômago entre os anos de 1998 e 2002 no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre. As variáveis estudadas foram idade, sexo, localização do tumor, tamanho do tumor, número de linfonodos ressecados, número de linfonodos metastáticos, tipo histológico, tipo de cirurgia e estadiamento patológico (TNM). Não foi detectada expressão do *PDGFR-beta* em nenhuma das lâminas estudadas. O *p16* apresentou expressão menor que 10% em 89% dos casos e menor que 1% em 78% dos casos. Não foi detectada correlação entre a perda de expressão do *p16* e as variáveis estudadas.

ABSTRACT

Gastric adenocarcinoma has been the main cause of cancer death during most of the twentieth century, now overcome by lung cancer. Annually 750,000 new cases are diagnosed. Great geographic variations are seen and highest incidences can be found in Japan, South America, Eastern Europe and Middle East. It is twice as frequent in men as in women, has a low incidence before the fourth decade with a peak incidence in the seventh decade. In Brazil 23,000 new cases and 11,000 deaths are estimated to 2005. Complete resection of all gross and microscopic disease is the only potentially curative treatment. However, disease recurs in 80% of patients even after curative resection. Efforts to improve these results concentrate on development of new pre and postoperative therapies. Oncogene *p16* is implicated in pathogenesis of many human tumors and even in regulation of normal cellular growth, together with cycline, tyrosine kinases and tumoral transforming and growth factors, like TGF- α and - β and platelet derived growth factors (PDGF) ligands and receptors (α and β). Loss of *p16* has been exhaustively studied.

PDGFR has been found activated and mutated on gastric stromal tumors where c-KIT, the most commonly marker found, is in wild type. PDGF receptors act over stromal origin cells and are not expressed in epithelial cells under normal physiologic conditions. PDGF- β and its receptor have not been studied concerning expression and response to cellular growth inhibitors on non-stromal gastric tumors. The aim of this study has been detect immunohistochemistry expression of *p16* and *PDGFR- β* on gastric adenocarcinoma. Thirty six patients submitted to surgery for gastric adenocarcinoma among 1998-2002 years at Santa Casa de Porto Alegre Hospital have been studied. Variables investigated were: age, gender, tumor size and localization,

number of resected and metastatic nodes, histological type, surgical resection extension and pathological staging. 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. There has been no correlation among p16 loss and the variables studied.

SUMÁRIO

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Abstract	VII
Sumário	IX
Introdução e Justificativa	1
Objetivos	6
Fundamentação Teórica	7
Pacientes e Métodos	19
Resultados	24
Discussão	29
Conclusão	34
Bibliografia	35
Anexo	48
Artigo Completo	49

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O adenocarcinoma de estômago foi a principal causa de morte por neoplasia maligna no mundo durante grande parte do século XX e atualmente é superado somente pelas neoplasias epiteliais malignas de pulmão. Cerca de 750.000 novos casos são diagnosticados anualmente. Apresenta grande variação geográfica, sendo suas maiores incidências encontradas no Japão, América do Sul, Europa Oriental e Oriente Médio¹. É duas vezes mais freqüente em homens do que em mulheres^{1,2}; é pouco comum antes dos 40 anos e atinge sua maior incidência por volta da sétima década de vida¹.

Embora sua incidência venha diminuindo significativamente nas últimas décadas, essa diminuição limita-se às neoplasias abaixo da cárdia, provavelmente em virtude de alterações na dieta e no preparo dos alimentos. Os tumores da junção esofagogástrica, por sua vez, vêm aumentando em freqüência. Acredita-se que o aumento da prevalência da obesidade^{3,4} e do consumo calórico⁵ sejam os responsáveis pelo incremento no número de neoplasias malignas da junção esofagogástrica.

No Brasil as estimativas para o ano de 2005 apontavam para aproximadamente 23 mil casos novos e 11 mil óbitos⁶.

Em virtude da escassa sintomatologia nas fases iniciais da doença, o que ocasiona o diagnóstico tardio, o prognóstico do adenocarcinoma de estômago permanece ruim, com sobrevida de 5-15% em 5 anos^{1,7}. No Japão, onde a doença é endêmica mas o diagnóstico é precoce em virtude da ampla realização de endoscopias, a sobrevida é de 50% em 5 anos¹.

A complexa estrutura da mucosa gástrica torna difícil a classificação histológica do adenocarcinoma gástrico. As classificações tradicionais dividem o adenocarcinoma

gástrico em grupos baseados em características puramente descritivas, como diferenciação celular, quantidade e tipo de estroma e produção de mucina.

A classificação proposta por Lauren,⁸ dividindo os tumores em tipos intestinal e difuso, é a mais amplamente utilizada em nosso meio. Seus critérios baseiam-se nos aspectos histológicos e citológicos, na secreção de mucina e na forma de crescimento das células tumorais. Pacientes portadores de tumores do tipo intestinal têm, em geral, melhor prognóstico. O único tratamento potencialmente curativo é a ressecção completa, macro e microscópica, de toda neoplasia. Mesmo assim, a recidiva, regional ou à distância, pode ocorrer em 80% dos casos.¹ Esforços para melhorar estes resultados têm se focalizado no desenvolvimento de terapias pré e pós-operatórias mais efetivas.

Alterações genéticas e do ciclo celular têm sido buscadas na tentativa de elucidar possíveis implicações na etiologia e patogênese deste tumor. Diversos oncogenes foram identificados no desenvolvimento e progressão do adenocarcinoma gástrico. O *c-met*, que codifica o receptor para o fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), está freqüentemente amplificado nesta neoplasia, principalmente nas formas avançadas, ocorrendo boa correlação entre a presença da amplificação, o estágio clínico, a presença de metástases e o prognóstico.⁹ O *K-sam*, que codifica o receptor para o fator de crescimento dos queratinócitos, está amplificado em neoplasias pouco diferenciadas. O *c-erbB2* está amplificado nas formas bem diferenciadas e relacionado à presença de metástases hepáticas.^{9,10} Outros fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador (TGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), apresentam freqüentemente expressão aumentada nos tipos pouco diferenciados.¹⁰

Alterações em genes supressores tumorais também parecem estar implicadas na gênese do adenocarcinoma gástrico. A inativação do *p53* é encontrada em mais de 60% dos tumores gástricos, independentemente do tipo histológico. As mutações do gene da

polipose adenomatosa do cólon (*APC*) são encontradas em 50% dos adenocarcinomas bem diferenciados.^{9,10}

Moléculas que regulam a adesão celular, como a E-caderina, P-caderina e α -catenina, também têm a sua expressão diminuída nos adenocarcinomas pouco diferenciados e na *linite plastica*.¹⁰

A maioria das células neoplásicas do adenocarcinoma gástrico apresenta expressão aumentada de ciclina-E e de quinases dependentes de ciclinas (CDKs), existindo um risco maior de metastatização quando o gene da ciclina-E está amplificado. As ciclinas, as CDKs e seus inibidores regulam o crescimento, a diferenciação e a morte celular.^{9,10}

O oncogene *p16*, localizado no cromossomo 9p21-22, é conhecido por estar implicado na patogênese de muitos tumores humanos e também na regulação do crescimento celular normal, juntamente com as ciclinas, os complexos tirosinoquinases e os fatores de crescimento e transformação tumoral, entre eles o TGF-alfa e beta e os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e seus receptores (PDGFR alfa e beta). Atualmente, sabe-se que as tirosinoquinases estão implicadas em várias fases da oncogênese em diversas neoplasias. Essa regulação do processo oncogênico ocorre devido à ativação seqüencial e ordenada das CDKs, interferindo no crescimento, diferenciação e morte celular. O *p16* atua no núcleo celular, inibindo a fosforilação do complexo ciclina D – CDK4. Este complexo ativado permite a fosforilação da proteína Rb (pRb) e, assim, a transição da fase G1 para a fase S no ciclo celular. A inativação do gene *p16* leva a uma persistente ativação do complexo ciclina D – CDK4, facilitando a transição G1-S, um dos mais importantes pontos de verificação do ciclo celular.

Mutações herdadas do *p16* estão associadas com os melanomas hereditários. Deleções ou inativações adquiridas do *p16* estão presentes em 75% dos carcinomas

pancreáticos, 40 a 70% dos glioblastomas, 50% dos carcinomas esofágicos e em 20% dos carcinomas não de pequenas células pulmonar.¹¹ Trabalhos recentes têm demonstrado relação entre a inativação do *p16* e o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico. De 40 a 90% dos adenocarcinomas gástricos apresentam inativação do *p16*,¹²⁻¹⁷ aparentemente havendo alguma relação com o grau de diferenciação celular.^{12,16,18} A expressão do *p16* é menor também nas metástases ganglionares.¹² Parece não haver diferença de expressão entre os tipos intestinal e difuso,¹⁸ embora existam dados conflitantes na literatura.¹³

O receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), um receptor de superfície da tirosinoquinase, é igualmente importante no controle do crescimento, diferenciação e morte celular.^{19,20} O PDGFR-beta é uma molécula de 180 kDa localizada no cromossomo 5, próxima ao fator-1 estimulador de colônias (CSF-1). Extracelularmente possui cinco domínios com similaridade a imunoglobulinas; intracelularmente há um domínio tirosinoquinase com seqüência característica, sem homologia com as quinases, que liga-se somente com o PDGF-beta (ao contrário do PDGFR-alfa, que tem afinidade tanto para a cadeia A como para a cadeia B). Tanto o PDGFR-beta quanto o alfa produzem potentes estímulos mitogênicos, aumentam a concentração intracelular de cálcio e atuam sobre os filamentos de actina (enrolamento da extremidade e perda de fibras de estresse), mas somente o receptor beta promove a formação de estruturas circulares de actina na superfície dorsal da célula, estimula a quimiotaxia e tem efeito antiapoptótico.²⁰

O *PDGFR* tem sido encontrado ativado e mutado nos tumores gástricos estromais em que o *c-KIT*, o marcador mais comumente encontrado, está em sua forma selvagem.^{21,22} Os receptores PDGF atuam sobre células de origem estromal e não se expressam em células epiteliais em condições fisiológicas normais, embora tenha sido

identificada expressão do PDGFR-beta em uma linhagem de carcinoma esofágico.²³ A expressão do PDGFR tem sido descrita no dermatofibrossarcoma, na leucemia mielocítica crônica e em neoplasias estromais gastrointestinais malignas,^{24,25} além de outros tumores sólidos, desde glioblastomas a carcinomas de próstata.^{19,24} Isoladamente, o PDGF-beta e o seu receptor ainda não foram objetivamente estudados nem quanto à expressão nem quanto à resposta aos inibidores do crescimento celular no tecido gástrico tumoral que não de origem estromal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência da expressão imunoistoquímica dos marcadores p16 e PDGFR-beta no adenocarcinoma de estômago.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar a relação da expressão imunoistoquímica do p16 e do PDGFR-beta com sexo, idade, número de linfonodos metastáticos, tipo histológico, grau de diferenciação histológica e estadiamento patológico.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A carcinogênese gástrica, à semelhança de outros órgãos, é um processo múltiplo e seqüencial, que clinicamente pode manifestar-se como gastrite, gastrite atrófica, ulcerações, metaplasia, displasia e, finalmente, neoplasia maligna.²⁶ Essas alterações decorrem da exposição a uma variedade de fatores endógenos ou exógenos, e costumam desenvolver-se ao longo de muitos anos. As mutações somáticas em genes e oncogenes supressores tumorais são conseqüência da ação desses fatores, proporcionando às células capacidade maior de proliferação.²⁷

A gastrite crônica se caracteriza por lesões da mucosa gástrica que vão desde processo inflamatório superficial até a atrofia do epitélio. Esta última é evidenciada pela perda de estruturas glandulares e pela eventual associação com a metaplasia intestinal. Cerca de 10% dos pacientes com gastrite atrófica desenvolvem adenocarcinoma em aproximadamente 15 anos,²⁸ sendo, por isso, considerada uma lesão pré-maligna.²⁹

O risco de desenvolver neoplasia maligna também é maior em pacientes portadores de úlcera gástrica quando infectados pelo *Helicobacter pylori* carcinogênico. Defeitos primários na resistência da mucosa gástrica ou deficiências quantitativas ou qualitativas no muco (medicamentosas ou não) são os fatores etiológicos fundamentais na sua gênese, geralmente não havendo aumento na produção de ácido. De modo inverso, na úlcera duodenal, em que a produção de ácido está aumentada, parece haver pouca ou nenhuma relação com o desenvolvimento de câncer.^{30,31}

A metaplasia intestinal, decorrente da transformação do epitélio de revestimento e glandular em células absortivas colunares metaplásicas intercaladas por células calciformes de morfologia intestinal, é freqüentemente encontrada em associação com

a gastrite ou durante o processo de cicatrização da mucosa gástrica. Essa lesão está associada à infecção pelo *Helicobacter pylori*.³²

As displasias podem surgir em epitélios com inflamação crônica de longa duração, podendo evoluir para carcinoma intra-epitelial, principalmente do tipo intestinal. O tipo difuso surge, originalmente, sem evolução por meio de displasia.³³

O adenocarcinoma representa 90-95% das neoplasias malignas do estômago, sendo classificado, com base em aspectos histopatológicos, em intestinal e difuso.⁸ As lesões do tipo intestinal são as mais freqüentes, melhor diferenciadas e associadas à presença de lesões pré-malignas. São mais freqüentes em homens e idosos. O tipo difuso é menos diferenciado, de pior prognóstico e não está associado a lesões pré-malignas, sendo um pouco mais freqüente em mulheres. Pode estar relacionado à história familiar de câncer gástrico (somente 4% dos tumores gástricos são familiares),¹¹ principalmente em indivíduos do tipo sanguíneo A.¹

FATORES ETIOLÓGICOS NO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Fatores genéticos e ambientais têm papel importante na carcinogênese gástrica. Dramáticas diferenças na incidência de adenocarcinoma gástrico em populações migrantes, em gerações subseqüentes, sugerem maior importância dos fatores ambientais.³³ Entre os últimos destacam-se o elevado consumo de sal, álcool,³⁵ baixo consumo de frutas, vegetais e leite,³⁶ cirurgia gástrica prévia³⁵ e infecção pelo *Helicobacter pylori*.³⁷

Os compostos nitrogenados e seus metabólitos são capazes de provocar, provavelmente por inibição da vitamina C e outros antioxidantes, a desaminação de purinas e pirimidinas do DNA, causando mutações em ponto no gene supressor *p53*.³⁸

Ao contrário, os carotenóides, as vitaminas C e E, o folato e o selênio presente em frutas e vegetais parecem estar relacionados à diminuição do risco de desenvolver adenocarcinoma gástrico.²

O *Helicobacter pylori*, considerado o principal agente etiológico em mais de 90% das gastrites, é responsável pelo aumento do adenocarcinoma gástrico em mais de nove vezes.^{37,39} A cepa *cagA* positiva tem forte associação com ulceração gástrica³⁵ e parece estar associada a tumores gástricos agressivos.⁴⁰ Sessenta a oitenta por cento dos pacientes com neoplasia gástrica apresentam a bactéria no estômago.³⁹ Entretanto, a infecção pelo *Helicobacter pylori*, aparentemente, não constitui elemento isolado para o desenvolvimento de câncer, cujo risco é de apenas 1% em indivíduos infectados.

CARCINOGENESE GÁSTRICA

A transformação de célula epitelial normal em célula maligna é um processo complexo e resulta do acúmulo de múltiplas anormalidades genéticas.^{36,41} Correa sugeriu uma seqüência de alterações histomorfológicas que resultariam em adenocarcinoma gástrico.⁴¹ De acordo com o modelo proposto, gastrite crônica, atrofia da mucosa, metaplasia intestinal e displasia seriam as alterações predecessoras do adenocarcinoma gástrico. Ainda não está claro, no entanto, se as neoplasias gástricas desenvolvem-se necessariamente nesta seqüência ou se alguma das alterações precede diretamente o desenvolvimento de malignidade.⁴²

Entre as anormalidades moleculares identificadas na carcinogênese gástrica têm-se: instabilidade microsatélite, inativação de genes supressores tumorais, ativação de oncogenes e reativação da telomerase.^{41,42} (FIGURA 1)

Instabilidade Microsatélite (IMS)

A IMS é definida como a presença de erros de replicação em seqüências microsatélites repetitivas simples devido a deficiências de reparo do DNA. É classificada como: alta frequência (*MSI-H*), baixa frequência (*MSI-L*) ou estável.⁴³ A IMS é uma das alterações mais precoces na carcinogênese e resulta em instabilidade genômica.⁴⁴ Está relacionada com tumores de localização antral, diferenciação tipo intestinal e melhor prognóstico.⁴⁵ A IMS está presente em 13 a 44% dos tumores gástricos.⁴⁵ Em particular, a *MSI-H* está presente em 10 a 16% dos adenocarcinomas gástricos, principalmente em tumores bem diferenciados em idosos.⁴⁵ Tais neoplasias exibem mutações do receptor II do fator de crescimento transformador (*TGFRII*) e não apresentam mutações do *p53*.⁴⁶ A *MSI-L* é detectada em cerca de 30% dos adenocarcinomas gástricos, incluindo os precoces.⁴⁷ Algumas metaplasias de tipo intestinal e adenomas também apresentam *MSI-L*.⁴⁸ Os genes especificamente alterados no carcinoma gástrico, que demonstram IMS incluem: *BAX*, *hMSH3*, *hMSH6*, *E2F-4*, *TGFBRII* e o receptor II do fator de crescimento semelhante à insulina (*ILGFRII*).^{45,49}

Inativação de Genes Supressores Tumoriais

Inativação de genes supressores tumorais devido a mutações ou ainda perda de heterozigosidade (LOH) também é um evento freqüente na carcinogênese gástrica. Por exemplo: a inativação do *p53* e do *p16* é relatada em ambos os tipos histológicos (intestinal e difuso), enquanto mutações gênicas do *APC* estão relacionadas ao tipo intestinal.⁵⁰ Outros genes supressores alterados no adenocarcinoma gástrico são o da tríade histidina frágil (*FHIT*) e o deletado no câncer de cólon (*DCC*).⁵⁰

Mutação ou LOH do *p53* é encontrada em 80% dos adenocarcinomas gástricos, independentemente do tipo histológico e, predominantemente, em doença metastática.⁵⁰ Também é identificada alteração do *p53* em 10% das displasias e metaplasias de tipo intestinal.⁵²

Até 60% dos tumores do tipo intestinal e 25% dos adenomas gástricos apresentam LOH do gene de supressão tumoral *APC*.⁵³⁻⁵⁶ É uma alteração pouco freqüente nos carcinomas difusos, mas pode estar associada aos carcinomas de células em anel de sinete.⁵⁷ Um estudo recente sugere importante papel do gene *APC* na gênese dos adenomas e displasias, mas papel limitado na progressão destes para adenocarcinoma.⁵⁸ O *APC* é importante na degradação da beta-catenina.⁵⁹ Ele liga-se a beta-catenina, cuja concentração livre no interior da célula é mantida em níveis baixos. Após interação com o fator acentuador de transcrição linfóide1 (LEF-1), a beta-catenina transloca-se para o núcleo, regulando a expressão gênica.⁶⁰ As mutações da beta-catenina estão presentes nos tumores tipo intestinal, mas não no tipo difuso.⁶¹ Nos tumores tipo intestinal o acúmulo da proteína beta-catenina resulta do impedimento de sua degradação devido a alterações da beta-catenina e do gene *APC*.⁴⁵

Anormalidades na regulação de transcrição por metilação de ilhas CpG são as alterações epigenéticas mais importantes no adenocarcinoma gástrico.⁶³ Entre 20 e 40% dos tumores gástricos exibem metilação de ilhas CpG da região promotora do *p16*.⁶⁴⁻⁶⁶ Muitos destes casos com hipermetilação de regiões promotoras demonstraram fenótipo MSI-H e múltiplos sítios de metilação, incluindo a região promotora *hMLH1*. A hipermetilação do *hMLH1* ocorre também na metaplasia de tipo intestinal, sugerindo que a hipermetilação de ilhas CpG é evento precoce na carcinogênese gástrica.⁶⁷

A metilação aberrante de genes promotores pode levar ao silenciamento de vários genes: *E-caderina*, *p16*, *p15*, *MGMT*, *hMLH1*.^{68,69} Aproximadamente 40% dos

tumores gástricos são tumores com fenótipo de metilação de ilhas CpG e freqüentemente exibem metilação do *p16* e do *hMLH1*.⁷⁰ A E-caderina, uma molécula fundamental na manutenção da adesão celular e da integridade tecidual, tem a sua expressão diminuída em cerca de 50% dos carcinomas gástricos de tipo difuso, mas não encontra-se mutada nos de tipo intestinal.⁷¹ Uma vez que estas alterações podem ser encontradas na mucosa normal, acredita-se que sejam eventos precoces na carcinogênese.⁷⁰

A perda de heterozigosidade do gene deletado no câncer de cólon (*DCC*) é freqüentemente observada em tumores gástricos bem diferenciados, mas não nos pouco diferenciados.^{9,72,73} Sua expressão diminuída está associada a metástases hepáticas⁷² e a estágios mais avançados de progressão tumoral.⁷⁴

Ativação de Oncogenes

O grupo de oncogenes ativados consiste dos fatores de crescimento e seus receptores. O *c-met*, que codifica um receptor tirosinoquinase para o fator de crescimento dos hepatócitos, está hiperexpresso em 50% dos tumores gástricos, independente do tipo, e sua expressão é indicativa de mau prognóstico.^{55,75}

O *c-erbB2* é um receptor tirosinoquinase transmembrana e a sua hiperexpressão ou amplificação está associada a 25% de todas as neoplasias gastrointestinais.⁷⁶ No adenocarcinoma gástrico está associado à doença avançada e tem sido implicado como potencial marcador de mau prognóstico.^{77,78}

Outros oncogenes como a *ciclina E*, o *c-erbB3*, *K-sam*, *Ras* e *c-myc* estão hiperexpressos ou amplificados nos adenocarcinomas gástricos.⁷⁹⁻⁸¹ O *k-sam*, que pertence à família dos receptores para o fator de crescimento dos fibroblastos, está

freqüentemente hiperexpresso nos carcinomas tipo difuso.⁸² O *ras* está mais associado ao tipo intestinal⁸³ e em tumores avançados.⁸⁴ A expressão do *c-myc* relaciona-se com o estágio da doença, profundidade de invasão⁸⁵ e disseminação peritoneal.⁸⁶

Reativação da Telomerase

Os telômeros cobrem a parte final dos cromossomos e são importantes na manutenção da integridade dos mesmos. O telômero gradualmente encurta em células normais na ausência de atividade da telomerase e age como um relógio mitótico controlando o número de vezes que uma célula se divide. A telomerase adiciona uma seqüência TTAGGG terminal 3`do cromossomo,⁸⁷ o que impede a célula de entrar em senescência fisiológica, induzindo à formação de clones de células imortalizadas⁸⁸ e proporcionando à célula capacidades replicativas permanentes. Forte atividade da telomerase é detectada na maioria dos carcinomas gástricos, independente do tipo histológico e do estágio tumoral.⁸⁹ A telomerase está expressa também nas metaplasias de tipo intestinal e nos adenomas gástricos, sugerindo sua atuação nos estágios iniciais da carcinogênese.^{90,91}

ANORMALIDADES NOS REGULADORES DO CICLO CELULAR

Anormalidades nos reguladores do ciclo celular estão envolvidas no desenvolvimento e progressão dos tumores gástricos por proporcionarem proliferação celular desordenada.^{55,92} A ciclina E está amplificada em 15 a 20% dos adenocarcinomas gástricos. Sua hiperexpressão tende a correlacionar-se com a agressividade desses carcinomas, tal como a profundidade de invasão e o estágio

avanzado. A redução da expressão de um inibidor de quinases dependentes de ciclinas (*CDKs*), o *p27kip1*, está freqüentemente relacionada a tumores gástricos avanzados, correlacionando-se também com a profundidade de invasão e a presença de metástases linfonodais.⁹³ Adenomas gástricos com reduzida expressão do *p27kip1* tendem a evoluir para carcinomas.⁹⁴

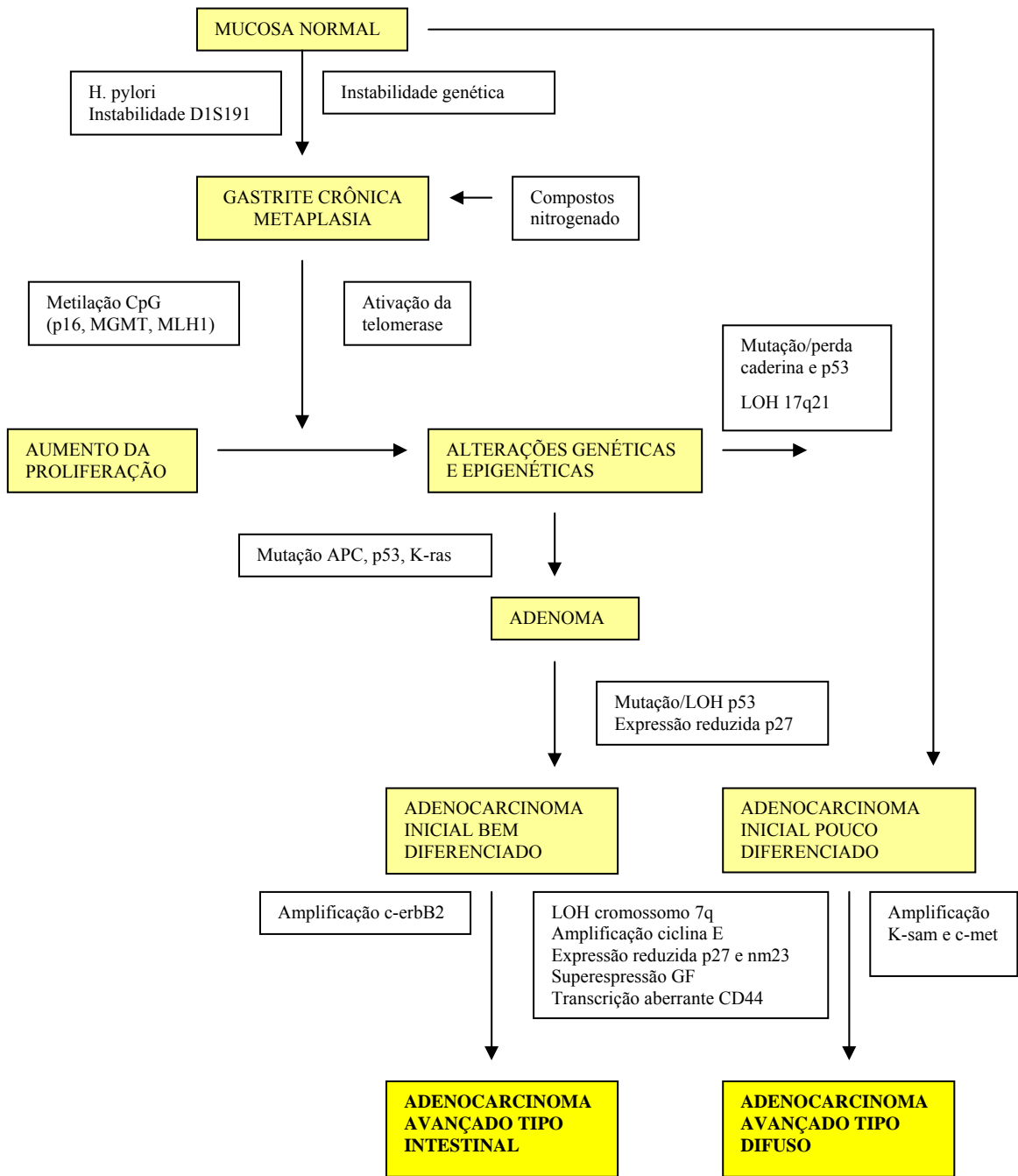


FIGURA 1: a progressão do adenocarcinoma gástrico.

O CICLO CELULAR E A AÇÃO DO P16 E DO PDGFR-beta

Em condições fisiológicas normais, a proliferação celular pode ser resumida na seguinte seqüência: (a) um fator de crescimento liga-se ao seu receptor específico na membrana celular; (b) o receptor do fator de crescimento sofre ativação limitada e transitória, o que, por sua vez, ativa várias proteínas de transdução de sinal no folheto interno da membrana citoplasmática; (c) o sinal transduzido é transmitido ao núcleo via segundos-mensageiros através do citosol; (d) fatores regulatórios nucleares que iniciam a transcrição do DNA são induzidos e ativados; (e) ocorre a entrada e progressão da célula no ciclo celular, resultando em divisão celular.

Os receptores de fatores de crescimento, entre eles o PDGFR-beta (FIGURA 2), são proteínas trans-membrana com um sítio externo de ligação e um domínio tirosinoquinase citoplasmático. Em sua forma normal, a atividade da quinase é transitoriamente ativada pela ligação ao fator de crescimento específico, seguida pela rápida dimerização do receptor e fosforilação de vários substratos que são parte da cascata mitogênica. A ativação do PDGFR-beta pelo seu fator de crescimento induz à fosforilação da proteína de transdução ras, localizada no folheto interno da membrana citoplasmática, permitindo que o sinal mitogênico seja enviado ao núcleo. Quando mutados estes receptores exibem dimerização persistente e ativação sem ligação ao fator de crescimento, fornecendo persistentes estímulos mitogênicos à célula.

Quando a célula entra em replicação, as ciclinas, as CDKs e seus inibidores são os responsáveis pela regulação do ciclo celular. As CDKs regem o ciclo pela fosforilação de proteínas alvo críticas na progressão da célula para a fase seguinte do ciclo. As CDKs são ativadas pela ligação às ciclinas. A transição G1-S, um dos mais importantes pontos de verificação do ciclo celular, é facilitada pela fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb) pelos complexos ciclinaD/CDK4 e ciclinaD/CDK6. Os inibidores

específicos deste complexo (p15, p16, p18 e p19), conhecidos como proteínas INK4 (*Inhibitors of CDK4 and CDK6*), impedem a fosforilação da pRb e a progressão do ciclo celular (FIGURA 3). Desse modo, o p16 é também conhecido sob a nomenclatura de p16^{ink4a}. Outros complexos ciclina-CDK também atuam nas fases S e G2 do ciclo celular.

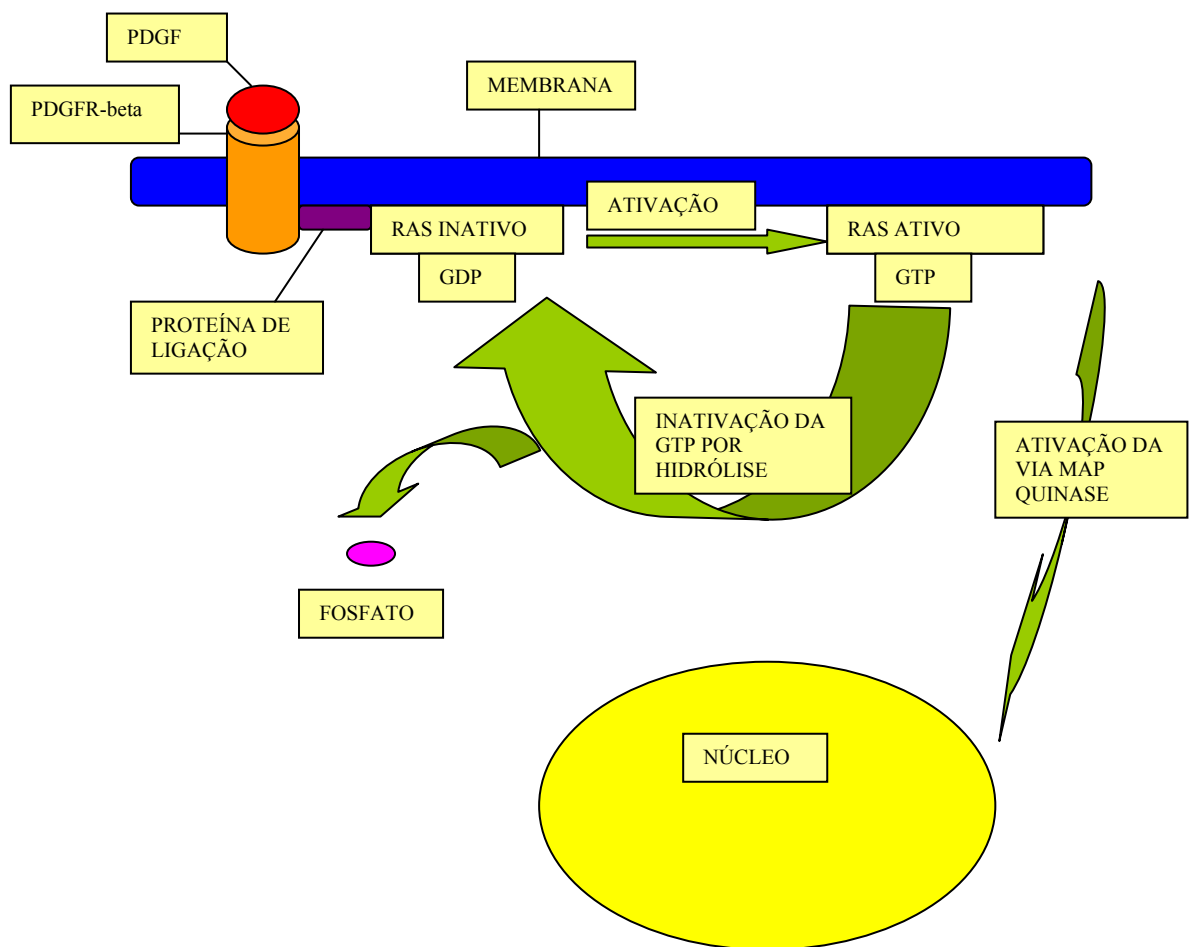


FIGURA 2: o PDGFR-beta e seu mecanismo de ação.

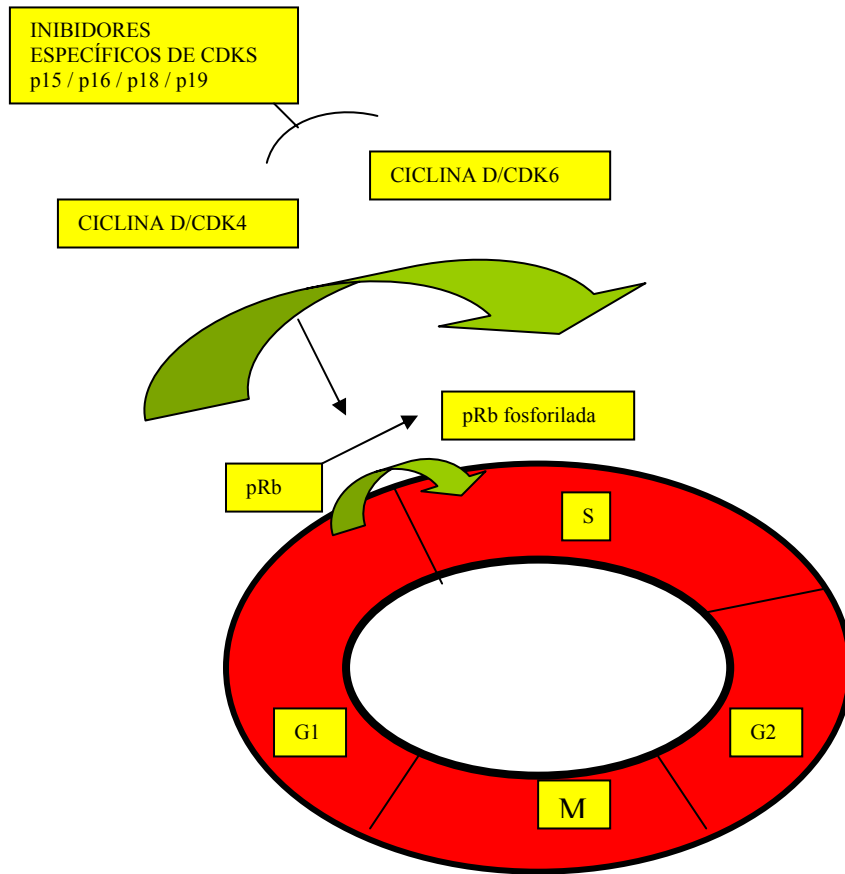


FIGURA 3: o p16 e seu mecanismo de ação.

PACIENTES E MÉTODOS

Foram avaliados no estudo 36 pacientes submetidos à cirurgia por adenocarcinoma de estômago entre os anos de 1998 e 2002 no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, com o objetivo de determinar a prevalência da expressão dos marcadores p16 e PDGFR-beta.

Nenhum dos 36 pacientes tinha história de neoplasias prévias ou concomitantes, exceto carcinoma espino e basocelular de pele, ou de quimio ou radioterapia pré-operatória, critérios esses de exclusão do estudo..

As variáveis estudadas foram: idade, sexo, localização do tumor, tamanho do tumor (maior eixo, em cm), número de linfonodos ressecados, número de linfonodos metastáticos, tipo histológico, tipo de cirurgia e estadiamento patológico (TNM).

Os dados clínico-patológicos foram obtidos dos prontuários dos pacientes conforme protocolo do anexo I, bem como dos laudos anatomopatológicos das cirurgias.

A análise da peça cirúrgica (hematoxilina-eosina, HE) incluiu a determinação da profundidade de penetração do tumor na parede gástrica, o comprometimento linfonodal, o grau de diferenciação histológica e o tipo histológico (intestinal ou difuso, conforme a Classificação de Lauren).

Imunoistoquímica

As amostras de tecido foram processadas conforme a rotina do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, descrita a seguir.

As lâminas para coloração em hematoxilina-eosina (HE) e imunohistoquímica (IH) foram preparadas a partir dos blocos de parafina das peças cirúrgicas estocadas pelo Serviço de Patologia da Santa Casa de Porto Alegre. Para avaliação IH foram utilizados o anticorpo monoclonal de camundongo anti-p16^{ink4a} Ab-4 (DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia, USA) e o anticorpo policlonal de coelho anti-PDGFR, beta Ab-1 (DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia, USA), diluídos em solução salina PBS às razões de 1:100 e 1:75, respectivamente. Para a determinação da positividade nestes tecidos foi utilizado o método ABS (complexo streptavidina-biotina-peroxidase; LABS + System HRP, DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia, USA).

Inicialmente os blocos de parafina foram resfriados no congelador e cortados no micrótomo circular em secções de 4µm. O material foi colocado sobre as lâminas previamente preparadas com soluções de acetona e organossilano a 5% e então levado à estufa a 60°C por 24h. A desparafinização e hidratação foi realizada pela imersão das lâminas em soluções com concentrações decrescentes (100 a 70%) de etanol e xilol a temperatura ambiente (ATA) e, após, lavadas em água corrente e destilada. Após isto, as lâminas foram levadas ao forno de microondas, em três sessões de 7 minutos à potência máxima, para a recuperação antigênica. Foi efetuada então a imersão em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 5% e em leite desnatado em pó (Glória), ambos diluídos em água destilada, a fim de bloquear reações inespecíficas. As lâminas foram então incubadas com os seus respectivos anticorpos em câmara úmida e escura, por 1h30min, seguidos da incubação com os anticorpos secundários (LABS). Realizada, após, imersão em solução de diaminobenzedina (Dako Liquid DAB) por 1 minuto. Finalmente, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 20 minutos, banhadas com água amoniacal e submetidas novamente a imersões em etanol e xilol. A fixação da lamínula sobre a lâmina foi feita com imersão em Bálsamo de

Entelan (Merck). Duas lâminas foram coradas somente com os anticorpos secundários e utilizadas como controle negativo.

Análise das Lâminas

As lâminas foram examinadas no microscópio óptico, onde até 20 campos de 400 aumentos foram escolhidos e capturados para o computador (Image Pro-Plus, versão 4.5.1.2.2, Media Cybernetics). Na tela do computador, após inserção de grade sobre as fotografias, contou-se o número total de células neoplásicas por campo e o número de células neoplásicas imunopositivas. Para o p16, considerou-se como imunopositivas as células neoplásicas com núcleo corado (coloração marrom) com intensidade acima da coloração citoplasmática de fundo (FIGURA 4).^{12,95-98} Lâminas de carcinoma de pulmão foram utilizadas como controle externo positivo. O cálculo da percentagem de células neoplásicas imunopositivas foi feito dividindo-se o número de células neoplásicas coradas pelo número total de células neoplásicas, multiplicando-se este valor por 100.^{12,96,98} Os pontos de corte considerados como perda da expressão foram 1% e 10%. Para o PDGFR-beta determinou-se uma escala qualitativa de um a quatro, de acordo com a intensidade da coloração: (1) negativa, (2) fraca, (3) moderada e (4) forte.^{99,100} Lâminas com carcinoma de mama foram utilizadas como controle externo. A presença de pelo menos 10% de células neoplásicas com coloração moderada ou forte foi o critério determinado para positividade.

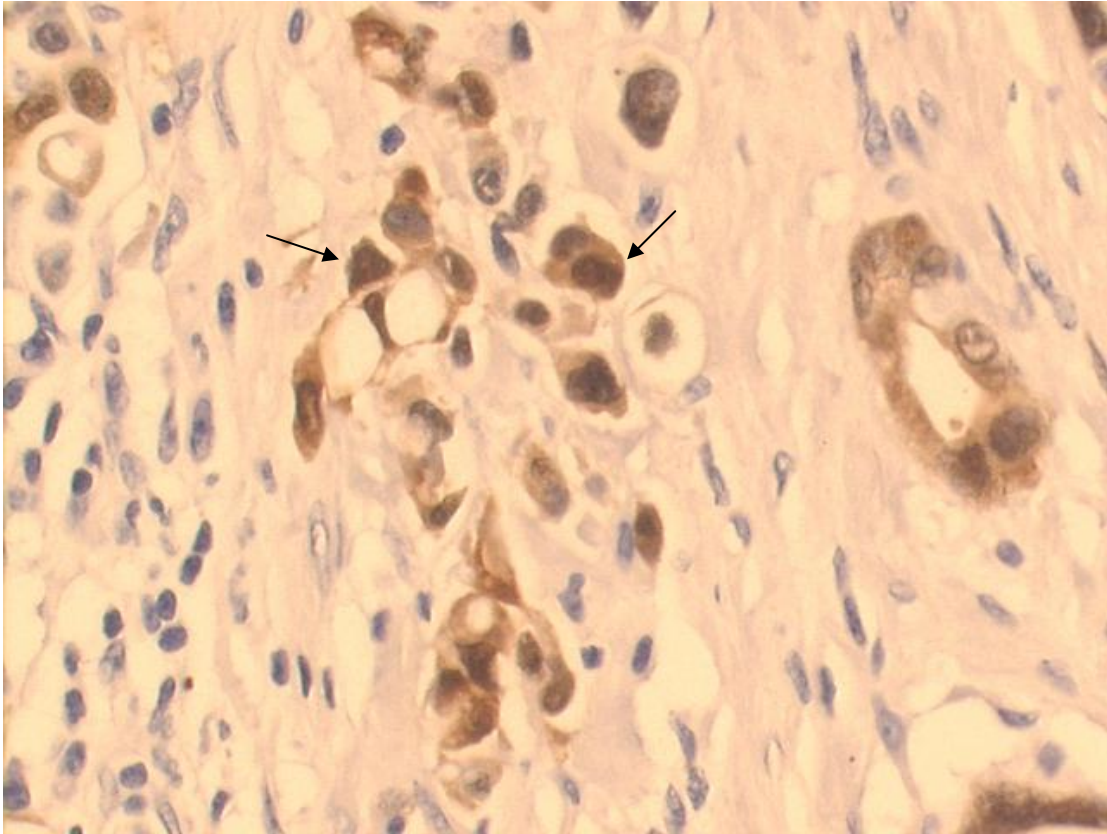


FIGURA 4: Positividade para p16 em núcleo de células de adenocarcinoma gástrico, de tipo difuso da classificação de Lauren. (imunohistoquímica; 400X)

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram descritos com média e desvio padrão. Nas variáveis categóricas utilizou-se frequência absoluta e percentual. Utilizou-se o teste Exato de Fischer para análise da associação da expressão do p16 com sexo e tipo histológico. O teste t de Student, bicaudal com correção para amostras heteroscedásticas, foi utilizado na comparação com idade, tamanho do tumor e número de linfonodos metastáticos. A associação do p16 com o estadiamento patológico foi feita com o teste Qui-Quadrado. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$. Os cálculos estatísticos foram efetuados com o Microsoft Office Excel 2003.

RESULTADOS

Estudou-se 36 casos de adenocarcinoma de estômago; 20 pacientes (55,5%) eram do sexo masculino e 16 (44,5%) eram do sexo feminino (TABELA 1). A média das idades dos pacientes no momento da cirurgia era de 59,2 anos ($\pm 13,2$), sendo a média dos homens 59,2 anos ($\pm 10,71$) e das mulheres 59,3 anos ($\pm 16,16$). A diferença entre as médias não foi significativa estatisticamente.

Em relação à localização do tumor (FIGURA 5), de acordo com o laudo anatomopatológico, dois (5,55%) localizavam-se na cárdia, quatro (11,11%) na cárdia e fundo, cinco (13,88%) no corpo e fundo, um (2,77%) no corpo, dois (5,55%) no corpo e antro, dezenove (52,77%) no antro e três (8,33%) no antro e piloro.

Vinte e três (63,88%) pacientes foram submetidos à gastrectomia parcial, onze (33,33%) à gastrectomia total e dois (5,55%) à esofagogastrectomia. O número médio de linfonodos ressecados com a peça cirúrgica foi de 15,9 ($\pm 10,4$); destes, 30,8% ($4,9 \pm 5,2$) apresentavam metástases (TABELA 1). Informações sobre a extensão das linfadenectomias realizadas não constavam na maioria das descrições cirúrgicas, o que não permitiu a sua análise.

Quanto ao tipo histológico, segundo a classificação de Lauren, 63,9% eram do tipo difuso e 36,1% eram do tipo intestinal. No que diz respeito à diferenciação histológica, 91,6% eram pouco diferenciados, 5,6% moderadamente diferenciados e 2,8% bem diferenciado (TABELA 1). No estadiamento patológico, conforme a sexta edição do TNM, a seguinte distribuição foi observada: 13,88% pacientes eram estágio IA, 5,55% eram estágio IB, 8,33% eram estágio II, 27,77% eram estágio IIIA, 27,77% eram estágio IIIB e 16,66% eram estágio IV (TABELA 1).

Quanto à análise do p16, 32 (88,9%) demonstraram positividade menor que 10% (FIGURA 6) e 28 (77,8%) menor que 1% (FIGURA 7). Comparou-se a positividade ao

p16, nos dois pontos de corte (1% e 10% respectivamente), com sexo ($p=1$; $p=1$), idade ($p=0,05$; $p=0,7$), tamanho do tumor ($p=0,28$; $p=0,55$), tipo histológico de Lauren ($p=1$; $p=1$), linfonodos metastáticos ($p=0,37$; $p=0,28$) e estadiamento patológico ($p=0,02$; $p=0,22$). Não identificou-se diferença estatisticamente significativa em nenhuma das variáveis analisadas para um nível de significância $p < 0,05$.

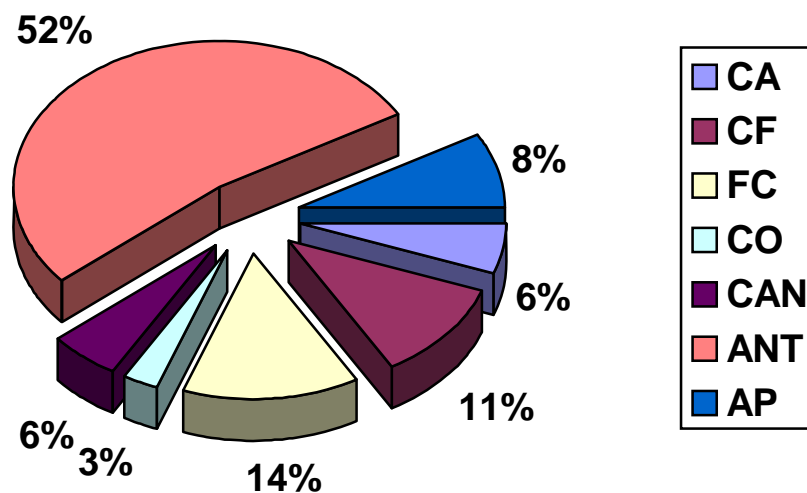


FIGURA 5: Localização da neoplasia, segundo informações previamente descritas em laudo macroscópico, sob as designações de: CA: cárdia; CF: cárdia e fundo; FC: fundo e corpo; CO: corpo; CAN: corpo e antro; ANT: antro; AP: antro e piloro

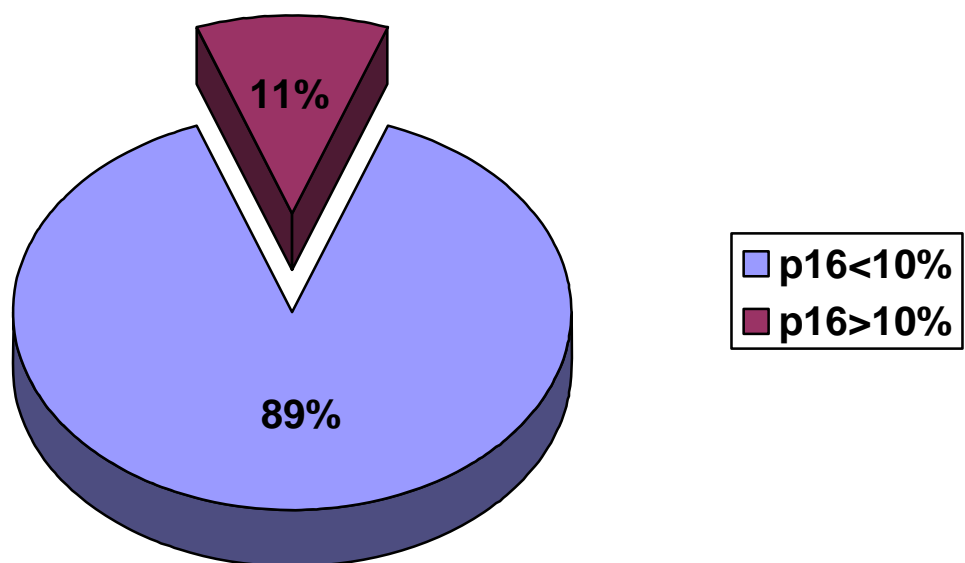


FIGURA 6: Expressão da positividade do p16, em casos de adenocarcinoma gástrico, considerando o ponto de corte em 10%.

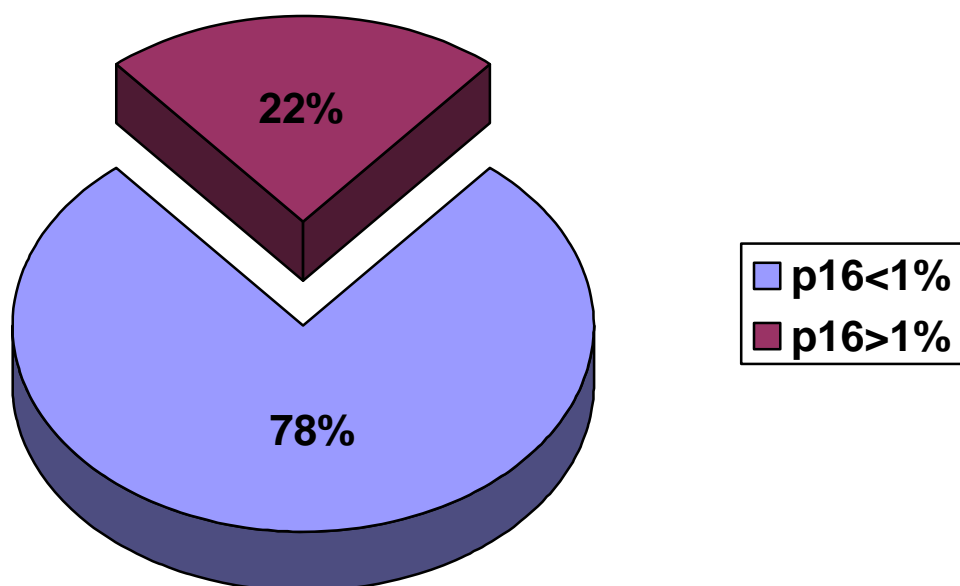


FIGURA 7: Expressão da positividade do p16, em casos de adenocarcinoma gástrico, considerando o ponto de corte em 1%.

TABELA 1: Características demográficas e anatomopatológicas dos pacientes.

Variável	n	descrição
Idade (DP, anos)	36	59,2 (13,2)
Sexo masculino (DP, anos)	20	59,2 (10,7)
Sexo feminino (DP, anos)	16	59,3 (16,16)
Tipo	36	
Intestinal de Laurén	13	36,1%
Difuso de Laurén	23	63,9%
Diferenciação	36	
Bem diferenciado	1	2,77%
Moderadamente diferenciado	2	5,55%
Pouco diferenciado	33	91,66%
Linfonodos isolados (DP)	573	15,9 (10,4)
Linfonodos com metástases (DP)	178	4,9 (5,2)
Estadiamento	36	
IA	5	13,88%
IB	2	5,55%
II	3	8,33%
IIIA	10	27,77%
IIIB	10	27,77%
IV	6	16,66%

Os dados são apresentados com média \pm desvio padrão ou frequência (percentual)

TABELA 2: Associação da expressão do p16 com diversos fatores clinicopatológicos estudados.

Variável	p16		p16	
	<1% (n=28)	>1% (n=8)	<10% (n=32)	>10% (n=4)
Homens	16	4	19	1
Mulheres	12	4	13	3
	$P=1$ (ns)*		$P=1$ (ns)*	
Idade (DP,anos)	57,3 (13,6)	66,1 (9,1)	59 (13,6)	61,2 (9,8)
	$P=0,05$ (ns)**		$P=0,7$ (ns)**	
Tamanho do tumor (DP,cm)	6,7 (3,8)	5,2 (3,0)	6,5 (3,6)	5,2 (3,6)
	$P=0,28$ (ns)**		$P=0,55$ (ns)**	
Tipo histológico				
Intestinal	9	4	11	2
Difuso	19	4	21	2
	$P=1$ (ns)*		$P=1$ (ns)*	
Linfonodos metastáticos (DP)	4,5 (5,0)	6,6 (6,0)	4,4 (4,7)	9,5 (7,8)
	$P=0,37$ (ns)**		$P=0,28$ (ns)**	

*ns: não significativo; *Teste Exato de Fischer; ** Teste t de Student (bicaudal, com ajuste para amostras heteroscedásticas); DP: desvio padrão.*

DISCUSSÃO

O adenocarcinoma gástrico é a segunda causa de morte por neoplasias malignas no mundo, sendo superado somente pelas neoplasias epiteliais malignas de pulmão.¹ Seu comportamento biológico, uma vez que o diagnóstico é quase sempre tardio, é determinado pelo potencial metastático do tumor, sendo mais favorável o prognóstico dos pacientes que não apresentam metástases.¹⁰¹ O único tratamento potencialmente curativo para o adenocarcinoma gástrico localizado é a ressecção cirúrgica completa de toda neoplasia, sendo os resultados, a longo prazo, ainda pobres para pacientes estadiamento IIIA e IIIB. Assim sendo, determinar os mecanismos biológicos de progressão tumoral, tornou-se elemento de fundamental relevância para melhorar o desfecho clínico desses pacientes.

A célula tumoral, à semelhança da célula normal, apresenta um ciclo celular regular, normalmente dividido em fases G1, S, G2 e M. A progressão das células no ciclo celular depende da ativação de CDKs, o que ocorre quando estas se ligam às ciclinas. A inibição da atividade das CDKs dá-se pela ligação a um grupo de pequenas proteínas, entre as quais o p16, que são responsáveis pela regulação negativa do ciclo celular. Alterações destas proteínas resultam em proliferação celular descontrolada e, assim, carcinogênese.

O PDGF é um bem conhecido mitógeno de células mesenquimais, como fibroblastos, células musculares lisas e células endoteliais. Em condições fisiológicas normais, o PDGF e seus receptores (PDGFR) não se expressam em células epiteliais.¹⁰² Durante processos de reparação tecidual porém, detecta-se a atividade de ligantes e receptores do PDGF, e esta atividade parece fazer parte das funções reparadoras do epitélio normal.¹⁰² Assim, o contínuo estímulo determinado por agressões crônicas pode levar a um permanente estímulo mitogênico, com constante ativação do PDGF e

receptores, induzindo , por exemplo, à fibrose pulmonar e neoplasia maligna de pulmão ¹⁰²

A escolha de estudar-se simultaneamente, no adenocarcinoma gástrico, o p16, cuja perda de expressão tem sido exaustivamente estudada nesta neoplasia, e o PDGFR-beta, cujos relatos na literatura relacionando-o ao adenocarcinoma gástrico são inexistentes, foi arbitrária. Embora aparentemente não possuam íntima ligação em suas atividades, poder-se-ia imaginar que, em células tumorais, o aumento da expressão do PDGFR e, conseqüentemente, do estímulo mitogênico à célula, poderia associar-se à perda da atividade do p16, inibidor do ciclo celular. Além disso, clinicamente tem-se demonstrado promissores resultados no tratamento de tumores estromais do trato digestivo (GISTs), em que há expressão do PDGFR, com o uso de drogas inibidoras tirosinoquinases, como o imatinib (anteriormente conhecido como STI571, [Gleevec], Novartis Pharmaceuticals Corp, East Hanover, NJ, USA).^{19,21,102,103} Em um modelo animal de carcinoma gástrico demonstrou-se aumento da citotoxicidade e do efeito antitumoral do 5-FU e do paclitaxel quando combinados ao imatinib.¹⁰⁴

Quanto aos critérios para análise das lâminas, verificou-se que não existe uniformidade na literatura para nenhum dos dois marcadores estudados. Em ambos os casos optou-se pelo uso do critério mais objetivo possível (contagem do número de células) na determinação da percentagem células coradas.

No presente estudo 89% dos casos demonstraram perda de expressão do p16 (positividade menor que 10%), o que está em consonância com os 40 a 90% de perda de expressão relatados na literatura.^{6,12,13} Setenta e oito por cento dos casos demonstraram positividade menor que 1%. Este ponto de corte foi arbitrariamente inserido no estudo com o objetivo de aumentar o poder de associação entre perda de expressão do p16 e as variáveis em estudo. Os mecanismos de perda de expressão do p16, os quais não são

detectáveis nas técnicas de imunistoquímica, são variados, e incluem: deleção, mutação, rearranjo, inserção, translocação e hipermetilação, sendo essa última a alteração mais freqüentemente encontrada.^{12,13}

Não detectou-se expressão do PDGFR-beta nos 36 casos analisados. Não encontrou-se na literatura pesquisada nenhum estudo sobre expressão do PDGFR-beta adenocarcinoma gástrico, embora identifique-se sua expressão do PDGFR (alfa e beta) em diversos tumores epiteliais, como colangiocarcinoma,¹⁰⁵ carcinoma de ovário¹⁰⁶ e carcinoma de mama.¹⁰⁷

No presente estudo, a média etária dos pacientes foi de 59,2 anos ($\pm 13,2$), sendo de 59,2 anos ($\pm 10,7$) para homens e 59,3 anos ($\pm 16,2$) para mulheres, não sendo encontrada diferença estatística entre as médias ($p=0,98$), em contraste com o verificado na literatura americana, em que a idade das mulheres tende a ser um pouco mais elevada.¹ Em conformidade com resultados já descritos,^{12,99} não detectou-se diferença na comparação entre a expressão do p16, idade e sexo.

Quanto ao tipo histológico, 63,9% dos 36 casos eram do tipo difuso e 36,1% do tipo intestinal (razão aproximada de 2:1), ao contrário do esperado.^{1,3,35,108} Não houve diferença, neste trabalho, entre o tipo histológico de Lauren e a perda de expressão do p16 nos dois pontos de corte ($p=1$). As lesões do tipo intestinal tendem a ser melhor diferenciadas, dependem de fatores ambientais e estão associadas à presença de lesões pré-malignas. São encontradas predominantemente em homens e indivíduos mais idosos.³⁵ O tipo difuso é pouco diferenciado por definição, tem pior prognóstico e não está associado a lesões pré-malignas, sendo um pouco mais freqüente em mulheres e indivíduos mais jovens.³⁵ Embora pacientes com adenocarcinoma gástrico tipo intestinal em geral tenham melhor prognóstico, a evolução da doença não é independente do estadiamento patológico (TNM). No que diz respeito ao grau de diferenciação celular,

91% dos casos foram classificados como pouco diferenciados. Os dados da literatura quanto a expressão do p16 e o tipo histológico de Lauren são conflitantes: há relatos de forte associação entre perda de expressão do p16 em tumores pouco diferenciados do tipo difuso,¹³ bem como de igual frequência desta alteração em tumores do tipo intestinal.¹⁸

O número médio de linfonodos ressecados por peça foi de 15,9 ($\pm 10,4$), o que está dentro do preconizado na 6ª ed. do TNM como mínimo para o adequado estadiamento patológico. O elevado desvio padrão (10,4) da amostra, no entanto, demonstra a heterogeneidade das linfadenectomias realizadas. O número médio de linfonodos metastáticos encontrados foi de 4,9 ($\pm 5,2$), mas não foi efetuada análise imunoistoquímica nos linfonodos para p16. Sabe-se que tumores com perda de expressão do p16 tendem a ter maior potencial metastático e, em geral, a expressão do p16 nos linfonodos afetados é ainda menor que na lesão primária.^{12,99}

Não houve diferença entre o tamanho do tumor e a perda de expressão do p16 nos pontos de corte avaliados. Não há, até o momento, na literatura de língua inglesa e portuguesa pesquisada, referência a esta associação.

Quanto ao estadiamento patológico, aproximadamente 72% dos pacientes eram estágio III ou IV no momento da cirurgia, reflexo do diagnóstico tardio na maioria dos casos. Não houve diferença entre estadiamento e perda de expressão do p16 nos pontos de corte avaliados.

A relação do p16 com a sobrevida não foi realizada neste estudo pois essa informação não foi encontrada em 16 dos 36 prontuários revisados. Segundo dados da literatura, no entanto, não parece haver associação entre a expressão do p16 e a sobrevida.⁹⁹

Assim, o presente estudo demonstrou perda de expressão do p16 em 89% e 78% dos casos, para pontos de corte de 10% e 1% respectivamente, embora não tenha-se observado diferença entre as variáveis nos pontos de corte estudados. A inclusão de um grupo controle, composto por amostras de mucosa gástrica normal, faz-se necessária para determinar estatisticamente a associação entre perda de expressão do p16 e adenocarcinoma gástrico.

É necessário o prosseguimento do estudo para determinar a associação do p16 com metástases linfonodais e sobrevida, bem como para determinar o mecanismo de inativação envolvido nestes casos.

CONCLUSÃO

O presente estudo com 36 casos de adenocarcinoma gástrico permite as seguintes conclusões:

Houve perda de expressão do p16 em 89% dos casos em um ponto de corte de 10%, e em 78% dos casos em um ponto de corte de 1%.

Não houve relação entre a perda de expressão do p16 e as variáveis estudadas, independentemente do ponto de corte.

Não foi demonstrada hiperexpressão do PDGFR-beta nos casos de adenocarcinoma gástrico estudados, segundo as técnicas utilizadas no presente trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg AS. Cancer – Principles and Practice of Oncology. 6th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001.
2. 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.
3. 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.
4. Lagergren J, Bergstron R, Nyren O. Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med* 1999; 130:883.
5. Zhang ZF, Kurtz RC, Yu GP, et al. Adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia: the role of diet. *Nutr Cancer* 1997; 27:298.
6. INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2005 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2005.
7. Brien TP, Depowski MD, Sheehan CE, Ross JS, McKeenna BJ. Prognostic factors in gastric cancer. *Mod Pathol* 1998; 11:870-7.
8. Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and the so-called intestinal type carcinoma. *Acta Pathol* 1965; 64:31.
9. Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg* 1995; 19(4): 484:88.

10. Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol* 1996; 23(3): 307-15.
11. Wistuba II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol*. 2001 Apr;28(2 Suppl 4):3-13
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. George D. Platelet-derived growth factor receptors: a therapeutic target in solid tumors. *Semin Oncol* 2001 Oct; 28(5 Suppl 17): 27-33.

20. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews* 1999 Oct; 79(4): 1283- 316.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor c-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 1037-51.
25. Esposito I, KleeffJ, Bischoff SC, et al. The stem cell factor c-kit system and mast cells in human pancreatic cancer. *Lab Invest* 2002; 82: 1481-92.
26. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Pathologic basis of disease*. 6^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1999.
27. Cho KR, Volgenstein B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992; 70: 1727-31.
28. Cheli R, Giacosa A. Atrophic gastritis. In: Sherlock P, Morson BC, Barbara L, Veronesi U. Editors. *Precancerous lesions for the gastrointestinal tract*. New York: raven Press; 1983.
29. Genta RM. Gastric atrophy and atrophic gastritis – nebulous concepts in search of a definition. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 17-23.
30. Anand BS, Graham DY. Ulcer and gastritis. *Endoscopy* 1999; 31: 215-25.

31. Hasson L, Nyren O, Hsing AW. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Eng J Med* 1996; 335: 242-9.
32. Jass JR, Filipe MI. Variants of intestinal metaplasia associated with gastric carcinoma. A histochemical study. *Histopathology* 1997; 3: 191-9.
33. Chan AO, Luk JM, Hui WV, et al. Molecular biology of gastric carcinoma: from laboratory to bedside. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 1150-60.
34. Kokkola A, Haapiainen R, Laxen F, et al. Risk of gastric carcinoma in patients with mucosal dysplasia associated with atrophic gastritis: a follow-up study. *J Clin Pathol* 1996; 49: 979-84.
35. César AC, Silva AE, Tajara EH. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. *Arq Gastroenterol* 2002 Out-Dez; 39(4): 253-59.
36. Stadlander CT, Waterbor JW. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2195-208.
37. Danesh J. Helicobacter pylori infection and gastric cancer: systematic review of epidemiological studies. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 851-6.
38. Poremba C, Uandell DW, Huang Q, et al. Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer: a molecular genetic and immunohistochemical study. *Virchows Ach* 1995; 426: 447-55.
39. Kuipers EJ, Exploring the link between Helicobacter pylori and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 3-11.
40. Churin Y, Al-Ghou L, Keep O, et al. Helicobacter pylori cagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol* 2003; 161: 249-55.

41. Correa P. Human gastric carcinogenesis. A multistep and multifactorial process – first American Cancer Society Lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-40.
42. Meining A, Morgner A, Miehke S, Bayerdorffer E, Stolte M. Atrophy – metaplasia – dysplasia – carcinoma sequence in the stomach: a reality or merely an hypothesis? *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001; 15: 983-98.
43. Werner M, Becker KF, Keller G, et al. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 207-16.
44. Miyoshi E, Haruma K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Shimamoto F, et al. Microsatellite instability is a genetic marker for the development of multiple gastric cancers. *Int J Cancer* 2001; 95: 350-3.
45. El-Rifai W, Powell SM. Molecular biology of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol* 2002; 12: 128-40.
46. Iacopetta BJ, Soong R, House AK, Hamelin R. Gastric carcinoma with microsatellite instability: clinical features and mutations to the TGF-beta type II receptor, IGFII receptor and BAX genes. *J Pathol* 1999; 187: 428-32.
47. Kapadia CR. Gastric atrophy, metaplasia and dysplasia: a clinical perspective. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36(5 Suppl): S29-36.
48. González CA, Sala N, Capellá G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* 2002; 100: 249-60.
49. Fiocca R, Luinetti O, Villani L, Mastracci L, Quilici P, Grillo F, et al. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of gastric carcinoma: interactions between genetic alterations, cellular phenotype and cancer histotype. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1523-30.

50. Wang JY, Lin SR, Hsieh JS, Hsu CH, Huang YS, Huang TJ. Mutations of p53 gene in gastric carcinoma in Taiwan. *Anticancer Res* 2001; 21: 513-20.
51. Hallstein M, Shamer B, Grennblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, et al. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: update compilations. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 141-6.
52. Yamada Y, Yoshida T, Hayashi K, Sekiya T, Yokota J, Hirohashi S, et al. p53 in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases. *Cancer Res* 1991; 51: 5800-5.
53. Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. *Cancer* 1995; 75: 1410-7.
54. Hofler H, Becker KF. Molecular mechanisms of carcinogenesis in gastric cancer. *Recent Results Cancer Res* 2003; 162: 65-72.
55. Yokozaki H, Yasui W, Tahara E. Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. *Int Rev Cytol* 2001;204:49–95.
56. Hanna NN, Mentzer RM Jr. Molecular genetics and management strategies in hereditary cancer syndromes. *J Ky Med Assoc* 2003; 101: 100-7.
57. Nakatsuru S, Yanagisawa A, Ichii S, Tahara E, Kato Y, Nakamura Y, et al. Somatic mutation of the APC gene in gastric cancer: frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. *Hum Mol Genet* 1992;1:559–63.
58. Lee JH, Abraham SC, Kim HS, Nam JH, Choi C, Lee MC, et al. Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002;161:611–8.

59. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular β -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3046–50.
60. Peifer M. Signal transduction. Neither straight nor narrow. *Nature* 1999;400:213–5.
61. Park WS, Oh RR, Park JY, Lee SH, Shin MS, Kim YS, et al. Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res* 1999;59:4257–60.
62. Ebert MP, Fei G, Kahmann S, Muller O, Yu J, Sung JJ, 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.
63. Nan X, Ng H-H, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998;393:386–9.
64. Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab Invest* 2000;80:689–95.
65. Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, Nakanishi Y, Hirohashi S. DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and pericentromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int J Cancer* 2001;91:205–12.
66. Oue N, Kuraoka K, Kuniyasu H, Yokozaki H, Wakikawa A, Matsusaki K, et al. DNA methylation status of *hMLH1*, *p16INK4a*, and *CDH1* is not associated with mRNA expression levels of DNA methyltransferase and DNA demethylase in gastric carcinomas. *Oncol Rep* 2001;8:1085–9.

67. Nakajima T, Akiyama Y, Shiraishi J, Arai T, Yanagisawa Y, Ara M, et al. Age-related hypermethylation of the hMLH1 promoter in gastric cancers. *Int J Cancer* 2001;94:208–11.
68. Leung WK, Yu J, Ng EK, To KF, Ma PK, Lee TL, et al. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer* 2001;91:2294–301.
69. Yasui W, Oue N, Kuniyasu H, Ito R, Tahara E, Yokozaki H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer* 2001;4:113–21.
70. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8681–6.
71. Tanaka M, Kitajima Y, Edakuni G, Sato S, Miyazaki K. Abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin may be a molecular marker of submucosal invasion and lymph node metastasis in early gastric cancer. *Br J Surg* 2002;89:236–44.
72. Yoshida Y, Itoh F, Endo T, Hinoda Y, Imai K. Decreased DCC mRNA expression in human gastric cancers is clinicopathologically significant. *Int J Cancer* 1998;79:634–9.
73. Tamura G. Molecular pathogenesis of adenoma and differentiated adenocarcinoma of the stomach. *Pathol Int* 1996;46:834–41.
74. Graziano F, Cascinu S, Staccioli MP, Catalano V, Rossi MC, Baldelli AM, et al. Potential role and chronology of abnormal expression of the Deleted in Colon Cancer (DCC) and the p53 proteins in the development of gastric cancer. *BMC Cancer* 2001;1:9–10.

75. Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* 2000;88:238–40.
76. Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest* 2001;19:554–68.
77. Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. C-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol* 2000;18:2201–9.
78. Wang YL, Sheu BS, Yang HB, Lin PW, Chang YC. Overexpression of c-erbB-2 proteins in tumor and non-tumor parts of gastric adenocarcinoma—emphasis on its relation to *H. pylori* infection and clinicohistological characteristics *Hepatogastroenterology* 2002;49:1172–6.
79. Rajevic U, Juvan R, Gazvoda B, Repse S, Komel R. Assessment of differential expression of oncogenes in gastric adenocarcinoma by fluorescent multiplex RT-PCR assay. *Pflugers Arch* 2001;442(6 Suppl 1):R190–2.
80. Yu J, Miehke S, Ebert MP, Szokodi D, Wehvnigh B, Malfertheiner P, et al. Expression of cyclin genes in human gastric cancer and in first degree relatives. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:710–5.
81. Kozma L, Kiss I, Hajdu J, Sz entkereszty Z, Szakall S, Ember I. C-myc amplification and cluster analysis in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 2001;21:707–10.
82. Katoh M. WNT2 and human gastrointestinal cancer (review). *Int J Mol Med* 2003;12:811–6.

83. Czerniak B, Herz F, Gorczyca W, Koss LG. Expression of rās oncogene p21 protein in early gastric carcinoma and adjacent gastric epithelia. *Cancer* 1989;64:1467–73.
84. Ohuchi N, Hand PH, Merlo G, Fujita J, Mariani-Costantini R, Thor A, et al. Enhanced expression of c-Ha-ras p21 in human stomach adenocarcinomas defined by immunoassays using monoclonal antibodies and in situ hybridization. *Cancer Res* 1987;47:1413–20.
85. Spandidos DA, Karayiannis M, Yiagnisis M, Papadinitrion K, Field JK. Immunohistochemical analysis of the expression of the c-myc oncoprotein in human stomach cancers. *Digestion* 1991; 50:127–34.
86. Ninomiya I, Yonemura Y, Matsumoto H, Sugiyama K, Kamata T, Miwa K, et al. Expression of c-myc gene product in gastric carcinoma. *Oncology* 1991;48:149–53.
87. Krupp G, Bonatz G, Parwaresch R. Telomerase, immortality and cancer. *Biotechnol Annu Rev* 2000;6:103–40.
88. Yasui W, Tahara H, Tahara Ej, Fujimoto J, Nakayama J, Ishikawa F, et al. Expression of telomerase catalytic component, telomerase reverse transcriptase, in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:1099–103.
89. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011–5.
90. Yang SM, Fang DC, Luo YH, Lu R, Battle PD, Liu WW. Alterations of telomerase activity and terminal restriction fragment in gastric cancer and its premalignant lesions. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:876–82.

91. Yasui W, Tahara Ej, Tahara H, Fujimoto J, Naka K, Nakayama J, et al. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and precancerous lesions of the stomach. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:589–95.
92. Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000;35:111–5.
93. Yasui W, Kudo Y, Senba S, Yokozaki H, Tahara E. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:625–9.
94. Yasui W, Yokozaki H, Shimamoto F, Tahara H, Tahara E. Molecular-pathological diagnosis of gastrointestinal tissues and its contribution to cancer histopathology. *Pathol Int* 1999;49:763–74..
95. Geradts J, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. CDKN2A Promoter methylation in gastric adenocarcinomas: clinical variables. *Human Pathol* 2002; 33(12): 1200-4.
96. Kang YK, Kim WH, Jang JJ. Expression of G1-S modulators (p53, p16, p27, cyclin D1, Rb) and Smad4/Dpc4 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Human Pathol* 2002; 33(9):877-83.
97. Beasley MB, Lantuejoul S, Abbondanzo S, Chu WS, Hasleton P, et al. The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung. *Human Pathol* 2003; 34(2): 136-42.
98. Feakins RM, Nickols CD, Bidd H, Walton SJ. Abnormal expression of pRb, p16 and cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and its lymph node metastases:

- relationship with pathological features and survival. *Human Pathol* 2003 34(12): 1276-82.
99. Feakins RM, Wells CA, Young KA, Sheaf MT. Platelet-derived growth factor expression in phyllodes tumors and fibroadenomas of the breast. *Human Pathol* 2000; 31(10): 1214-22.
100. Hofer MD, Fecko A, Shen R, Setlu S, Pienta K, Tomlins S, et al. Expression of platelet derived growth factor in prostate cancer and treatment implications with tyrosine kinase inhibitors. *Neoplasia* 2004; 6(5): 503 – 512.
101. Mori M, Mimori K, Yoshikawa Y, Shibuta K, Utsonomyia T, Sadanaga N, Tanaka F, et al. Analysis of the gene-expression profile regarding the progression of human gastric carcinoma. *Surgery* 2002; 131(1 suppl): s39-47.
102. Shinomura Y, Kinoshita K, Tsutsui S, Hirota S. Pathophysiology, diagnosis and treatment of gastrointestinal stromal tumors. *J Gastroenterol* 2005; 40: 775-80.
103. von Mehren M. Recent advances in the management of gastrointestinal stromal tumors. *Current Oncol Rep* 2003; 5(4): 288-94.
104. 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.
105. 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.

106. 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.
107. 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.
108. Marigo C, Okuyama MH, Santos GS. Tipos histológicos e mortalidade por câncer gástrico em São Paulo. 1997 *Cad Saúde Pub* 13 supl 1.

ANEXO I

ADENOCARCINOMA GÁSTRICO/ p16/PDGFR-beta

QUESTIONÁRIO DE REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS

1. Prontuário nº:
2. Data de Nascimento: / /
3. Sexo: M () F ()
4. Data do Procedimento: / /
5. Gastrectomia e: total () parcial () esofagogastrectomia ()
6. Reconstrução: BI () BII () Y-Roux ()
7. Ressecção Linfonodal: R0 () R1 () R2 () R3 ()
8. Número Total de Linfonodos:
9. Número de Linfonodos Metastáticos:
10. Tamanho do Tumor: ____ x ____ x ____
11. Tipo Histológico: intestinal. () difuso ()
12. Diferenciação: bem diferenciados () mod. dif () pouco dif ()
13. Estadiamento Patológico (TNM):
14. Óbito: () não () sim Data do Óbito: / / . Meses de Sobrevida:
15. Observações:

ARTIGO

Expressão do p16 e PDGFR-beta no Adenocarcinoma de Estômago

Rodrigo Pozza Pinto; Jane Kulkzynski; Luis Fernando Moreira

ABSTRACT: Oncogene *p16* is implicated in pathogenesis of many human tumors and even in regulation of normal cellular growth. Loss of p16 has been exhaustively studied on gastric adenocarcinoma. *PDGFR* has been found activated and mutated on gastric stromal tumors where c-KIT, the most commonly marker found, is in wild type. PDGF-beta and its receptor have not been studied concerning expression and response to cellular growth inhibitors on non-stromal gastric tumors. The aim of this study has been detect immunohistochemistry expression of *p16* and *PDGFR-beta* on gastric adenocarcinoma. Thirty six patients submitted to surgery for gastric adenocarcinoma among 1998-2002 years at Santa Casa de Porto Alegre Hospital have been studied. Variables investigated were: age, gender, tumor size and localization, number of resected and metastatic nodes, histological type, surgical resection extension and pathological staging. 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. There has been no correlation among p16 loss and variable studied.

INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma de estômago foi a principal causa de morte por câncer no mundo durante grande parte do século XX e atualmente é superado somente pelo câncer de pulmão. Cerca de 750.000 novos casos são diagnosticados anualmente. Apresenta

grande variação geográfica, sendo suas maiores incidências encontradas no Japão, América do Sul, Europa Oriental e Oriente Médio¹. É duas vezes mais freqüente em homens do que em mulheres^{1,2}; é pouco comum antes dos 40 anos e atinge sua maior incidência por volta da sétima década de vida¹. No Brasil as estimativas para o ano de 2005 apontavam para aproximadamente 23 mil casos novos e 11 mil óbitos³.

Em virtude da pouca sintomatologia e principalmente do diagnóstico tardio, o prognóstico do adenocarcinoma de estômago permanece ruim, com sobrevida de 5-15% em 5 anos^{1,4}. No Japão, onde a doença é endêmica mas o diagnóstico é precoce em virtude da ampla realização de endoscopias, a sobrevida é de 50% em 5 anos¹. O único tratamento potencialmente curativo é a ressecção completa de toda doença macro e microscópica. Mesmo após gastrectomia curativa, a recidiva, regional ou à distância, pode ocorrer em 80% dos casos.¹

O oncogene *p16* é conhecido por estar implicado na patogênese de muitos tumores humanos e também na regulação do crescimento celular normal, juntamente com as ciclinas, os complexos tirosinoquinases e os fatores de crescimento e transformação tumoral, entre eles o TGF-alfa e beta e os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e seus receptores (PDGFR alfa e beta). Mutações herdadas do *p16* estão associadas com os melanomas hereditários. Deleções ou inativações adquiridas do *p16* estão presentes em 75% dos carcinomas pancreáticos, 40 a 70% dos glioblastomas, 50% dos carcinomas esofágicos e em 20% dos carcinomas não de pequenas células pulmonar.⁵ Trabalhos recentes têm demonstrado relação entre a inativação do *p16* e o desenvolvimento de câncer gástrico. Quarenta a 90% dos adenocarcinomas gástricos apresentam inativação do *p16*,⁶⁻¹¹ aparentemente havendo alguma relação com o grau de diferenciação celular.⁷⁻¹⁰⁻¹² A expressão do *p16* é menor

também nas metástases ganglionares.⁶ Parece não haver diferença de expressão entre os tipos intestinal e difuso.¹²

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), um receptor de superfície da tirosinoquinase, é igualmente importante no controle do crescimento, diferenciação e morte celular.^{13,14} O *PDGFR* tem sido encontrado ativado e mutado nos tumores gástricos estromais em que o *c-KIT*, o marcador mais comumente encontrado, está em sua forma selvagem.^{15,16} Os receptores PDGF atuam sobre células de origem estromal e não se expressam em células epiteliais em condições fisiológicas normais.¹⁷ A expressão do PDGFR tem sido descrita no dermatofibromiossarcoma, na leucemia mielocítica crônica e em tumores estromais gastrointestinais,^{18,19} além de outros tumores sólidos, desde glioblastomas a carcinomas de próstata.^{13,18} Isoladamente, o PDGF-beta e o seu receptor ainda não foram objetivamente estudados nem quanto à expressão nem quanto à resposta aos inibidores do crescimento celular no tecido gástrico tumoral que não de origem estromal.

PACIENTES E MÉTODOS

Foram avaliados no estudo 36 pacientes submetidos à cirurgia por adenocarcinoma de estômago entre os anos de 1998 e 2002 no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, com o objetivo de determinar a prevalência da expressão dos marcadores p16 e PDGFR-beta.

Nenhum dos 36 pacientes tinha história de neoplasias prévias ou concomitantes exceto carcinoma espino e basocelular de pele, ou de quimio ou radioterapia pré-operatória, critérios estes de exclusão do estudo.

As variáveis estudadas foram idade, sexo, localização do tumor, tamanho do tumor (maior eixo, em cm), número de linfonodos ressecados, número de linfonodos metastáticos, tipo histológico, tipo de cirurgia e estadiamento patológico (TNM).

Os dados clínico-patológicos foram obtidos dos prontuários dos pacientes, bem como dos laudos anatomopatológicos das cirurgias.

A análise da peça cirúrgica (hematoxilina-eosina, HE) incluiu a determinação da profundidade de penetração do tumor na parede gástrica, o comprometimento linfonodal, o grau de diferenciação histológica e o tipo histológico (intestinal ou difuso, conforme a Classificação de Laurén).

Imunoistoquímica (IH)

As amostras de tecido foram processadas conforme a rotina do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Para avaliação IH foram utilizados o anticorpo monoclonal de camundongo anti-p16^{ink4a} Ab-4 (DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia, USA) e o anticorpo policlonal de coelho anti-PDGFR, beta Ab-1 (DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia, USA), diluídos em solução salina PBS às razões de 1:100 e 1:75, respectivamente. Para a determinação da positividade nestes tecidos foi utilizado o método ABS (complexo streptavidina-biotina-peroxidase; LABS + System HRP, DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia, USA).

Análise das Lâminas

As lâminas foram examinadas no microscópio óptico, onde até 20 campos de 400 aumentos foram escolhidos e capturados para o computador (Image Pro-Plus,

versão 4.5.1.2.2, Media Cybernetics). Na tela do computador, após inserção de grade sobre as fotografias, contou-se o número total de células neoplásicas por campo e o número de células neoplásicas imunopositivas. Para o p16, considerou-se como imunopositivas as células neoplásicas com núcleo corado (coloração marrom) com intensidade acima da coloração citoplasmática de fundo.^{6,20-23} Lâminas de carcinoma de pulmão foram utilizadas como controle externo positivo. O cálculo da porcentagem de células neoplásicas imunopositivas foi feito dividindo-se o número de células neoplásicas coradas pelo número total de células neoplásicas, multiplicando-se este valor por 100.^{6,21,23} Os pontos de corte considerados como perda da expressão foram 1% e 10%. Para o PDGFR-beta determinou-se uma escala qualitativa de um a quatro, de acordo com a intensidade da coloração: (1) negativa, (2) fraca, (3) moderada e (4) forte.^{24,25} Lâminas com carcinoma de mama foram utilizadas como controle externo. A presença de pelo menos 10% de células neoplásicas com coloração moderada ou forte foi o critério determinado para positividade.

Análise Estatística

Os dados quantitativos foram descritos com média e desvio padrão. Nas variáveis categóricas utilizou-se frequência absoluta e percentual. Utilizou-se o teste Exato de Fischer para análise da associação da expressão do p16 com sexo e tipo histológico. O teste t de Student bicaudal com correção para amostras heteroscedásticas foi utilizado na comparação com idade, tamanho do tumor e número de linfonodos metastáticos. A associação do p16 com o estadiamento patológico foi feita com o teste Qui-Quadrado. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$. Os cálculos estatísticos foram efetuados com o Microsoft Office Excel 2003.

RESULTADOS

Estudou-se 36 casos de adenocarcinoma de estômago; 20 pacientes (55,5%) eram do sexo masculino e 16 (44,5%) eram do sexo feminino (tabela 1). A média das idades dos pacientes no momento da cirurgia era de 59,2 anos ($\pm 13,2$), sendo a média dos homens 59,2 anos ($\pm 10,71$) e das mulheres 59,3 anos ($\pm 16,16$). A diferença das médias das idades não foi significativa estatisticamente.

Em relação à localização do tumor, de acordo com o laudo anatomopatológico, dois (5,55%) localizavam-se na cárdia, quatro (11,11%) na cárdia e fundo, cinco (13,88%) no corpo e fundo, um (2,77%) no corpo, dois (5,55%) no corpo e antro, dezenove (52,77%) no antro e três (8,33%) no antro e piloro. Vinte e três (63,88%) pacientes foram submetidos à gastrectomia parcial, onze (33,33%) à gastrectomia total e dois (5,55%) à esofagogastrectomia. O número médio de linfonodos ressecados com a peça cirúrgica foi de 15,9 ($\pm 10,4$); destes, 30,8% ($4,9 \pm 5,2$) apresentavam metástases (tabela 1). Informações sobre a extensão das linfadenectomias realizadas não constavam na maioria das descrições cirúrgicas, o que não permitiu a sua análise.

Quanto ao tipo histológico, segundo a classificação de Lauren, 63,9% eram do tipo difuso e 36,1% eram do tipo intestinal. No que diz respeito à diferenciação histológica, 91,6% eram pouco diferenciados, 5,6% moderadamente diferenciados e 2,8% bem diferenciado (tabela 1). No estadiamento patológico, conforme a sexta edição do TNM, tivemos a seguinte distribuição: 13,88% pacientes eram estágio IA, 5,55% eram estágio IB, 8,33% eram estágio II, 27,77% eram estágio IIIA, 27,77% eram estágio IIIB e 16,66% eram estágio IV (tabela 1).

Quanto à análise do p16, 32 (88.9%) demonstraram positividade menor que 10% e 28 (77,8%) menor que 1%. Comparou-se a positividade ao p16, nos dois pontos de corte (1% e 10% respectivamente), com: sexo ($p=1$; $p=1$), idade ($p=0,05$; $p=0,7$), tamanho do tumor ($p=0,28$; $p=0,55$), tipo histológico de Laurén ($p=1$; $p=1$), linfonodos metastáticos ($p=0,37$; $p=0,28$) e estadiamento patológico ($p=0,02$; $p=0,22$). Não identificou-se diferença estatisticamente significativa em nenhuma das variáveis analisadas para um nível de significância $p < 0,05$.

TABELA 1: Características demográficas e anatomopatológicas dos casos.

Variável	n	descrição
Idade (DP,anos)	36	59,2 (13,2)
Sexo masculino (DP,anos)	20	59,2 (10,7)
Sexo feminino (DP,anos)	16	59,3 (16,16)
Tipo	36	
Intestinal	13	36,1%
Difuso	23	63,9%
Diferenciação	36	
Bem diferenciado	1	2,77%
Moderadamente diferenciado	2	5,55%
Pouco diferenciado	33	91,66%
Linfonodos isolados (DP)	573	15,9 (10,4)
Linfonodos com metástases (DP)	178	4,9 (5,2)
Estadiamento	36	
IA	5	13,88%
IB	2	5,55%
II	3	8,33%
IIIA	10	27,77%
IIIB	10	27,77%
IV	6	16,66%

Os dados são apresentados com média \pm desvio padrão ou frequência (percentual)

TABELA 2: Associação da expressão do p16 com os diversos fatores clinicopatológicos estudados.

Variável	p16		p16	
	<1% (n=28)	>1% (n=8)	<10% (n=32)	>10% (n=4)
Homens	16	4	19	1
Mulheres	12	4	13	3
	$P=1$ (ns)*		$P=1$ (ns)*	
Idade (DP,anos)	57,3 (13,6)	66,1 (9,1)	59 (13,6)	61,2 (9,8)
	$P=0,05$ (ns)**		$P=0,7$ (ns)**	
Tamanho do tumor (DP,cm)	6,7 (3,8)	5,2 (3,0)	6,5 (3,6)	5,2 (3,6)
	$P=0,28$ (ns)**		$P=0,55$ (ns)**	
Tipo histológico				
Difuso	9	4	11	2
Intestinal	19	4	21	2
	$P=1$ (ns)*		$P=1$ (ns)*	
Linfonodos metastáticos (DP)	4,5 (5,0)	6,6 (6,0)	4,4 (4,7)	9,5 (7,8)
	$P=0,37$ (ns)**		$P=0,28$ (ns)**	

ns: não significativo; *Teste Exato de Fischer; ** Teste t de Student (bicaudal, com ajuste para amostras heteroscedásticas); DP: desvio padrão.

DISCUSSÃO

A escolha de estudar-se simultaneamente, no adenocarcinoma gástrico, o p16, cuja perda de expressão tem sido exaustivamente estudada nesta neoplasia, e o PDGFR-beta, cujos relatos na literatura relacionando-o ao adenocarcinoma gástrico são inexistentes, foi arbitrária. Embora aparentemente não possuam íntima ligação em suas atividades, poder-se-ia imaginar que, em células tumorais, o aumento da expressão do PDGFR e, conseqüentemente, do estímulo mitogênico à célula, poderia associar-se à perda da atividade do p16, inibidor do ciclo celular. Além disso, clinicamente tem-se demonstrado promissores resultados no tratamento de tumores estromais do trato digestivo (GISTs), em que há expressão do PDGFR, com o uso de drogas inibidoras tirosinoquinases, como o imatinib (anteriormente conhecido como STI571, [Gleevec], Novartis Pharmaceuticals Corp, East Hanover, NJ, USA).^{13,15,26,27} Em um modelo animal de carcinoma gástrico demonstrou-se aumento da citotoxicidade e do efeito antitumoral do 5-FU e do paclitaxel quando combinados ao imatinib.²⁸

No presente estudo 89% dos casos demonstraram perda de expressão do p16 (positividade menor que 10%), o que está em consonância com os 40 a 90% de perda de expressão relatados na literatura.^{3,6,7} Setenta e oito por cento dos casos demonstraram positividade menor que 1%. Este ponto de corte foi arbitrariamente inserido no estudo com o objetivo de aumentar o poder de associação entre perda de expressão do p16 e as variáveis em estudo.

Não detectou-se expressão do PDGFR-beta nos 36 casos analisados. Na literatura, não encontrou-se nenhum estudo sobre expressão do PDGFR-beta adenocarcinoma gástrico, embora identifique-se sua expressão do PDGFR (alfa e beta)

em diversos tumores epiteliais, como colangiocarcinoma,²⁹ carcinoma de ovário³⁰ e carcinoma de mama.³¹

Não houve diferença estatística entre as médias das idades ($p=0,98$), em contraste com o verificado na literatura americana, em que a idade das mulheres tende a ser um pouco mais elevada.¹ Em conformidade com resultados já descritos,^{6,23} não detectou-se diferença na comparação entre a expressão do p16, idade e sexo.

Quanto ao tipo histológico, 63,9% dos 36 casos eram do tipo difuso e 36,1% do tipo intestinal (razão aproximada de 2:1), ao contrário do esperado.^{1,32-34} Não houve diferença, neste trabalho, entre o tipo histológico de Laurén e a perda de expressão do p16 nos dois pontos de corte ($p=1$), dado já publicado em outro estudo,¹² embora os dados na literatura sejam conflitantes.^{7,33}

O número médio de linfonodos metastáticos encontrados foi de 4,9 ($\pm 5,2$), mas não foi efetuada análise imunoistoquímica nos linfonodos para p16. Sabe-se que tumores com perda de expressão do p16 tendem a ter maior potencial metastático e, em geral, a expressão do p16 nos linfonodos afetados é ainda menor que na lesão primária.^{6,23}

Quanto ao estadiamento patológico, aproximadamente 72% dos pacientes eram estágio III ou IV no momento da cirurgia, reflexo do diagnóstico tardio na maioria dos casos. Não houve diferença entre estadiamento e perda de expressão do p16 nos pontos de corte avaliados.

Assim, o presente estudo demonstrou perda de expressão do p16 em 89% e 78% dos casos, para pontos de corte de 10% e 1% respectivamente, embora não se tenha observado diferença entre as variáveis nos pontos de corte estudados. O prosseguimento do estudo faz-se necessário para determinar a associação do p16 com metástases

linfonodais e com a sobrevida, bem como para determinar o mecanismo de inativação envolvido nestes casos.

BIBLIOGRAFIA

1. De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg AS. Cancer – Principles and Practice of Oncology. 6th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001.
2. 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.
3. INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2005 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2005.
4. Brien TP, Depowski MD, Sheehan CE, Ross JS, McKeenna BJ. Prognostic factors in gastric cancer. *Mod Pathol* 1998; 11:870-7.
5. Wistuba II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol.* 2001 Apr;28(2 Suppl 4):3-13
6. 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.
7. 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.
8. 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.

9. Ficarella 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. George D. Platelet-derived growth factor receptors: a therapeutic target in solid tumors. *Semin Oncol* 2001 Oct; 28(5 Suppl 17): 27-33.
14. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews* 1999 Oct; 79(4): 1283- 316.
15. 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.
16. 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.
17. 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.

18. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor c-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 1037-51.
19. Esposito 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.
20. Geradts J, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. CDKN2A Promoter methylation in gastric adenocarcinomas: clinical variables. *Human Pathol* 2002; 33(12): 1200-4.
21. Kang YK, Kim WH, Jang JJ. Expression of G1-S modulators (p53, p16, p27, cyclin D1, Rb) and Smad4/Dpc4 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Human Pathol* 2002; 33(9):877-83.
22. Beasley MB, Lantuejoul S, Abbondanzo S, Chu WS, Hasleton P, et al. The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung. *Human Pathol* 2003; 34(2): 136-42.
23. Feakins RM, Nickols CD, Bidd H, Walton SJ. Abnormal expression of pRb, p16 and cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and its lymph node metastases: relationship with pathological features and survival. *Human Pathol* 2003 34(12): 1276-82.
24. Feakins RM, Wells CA, Young KA, Sheaf MT. Platelet-derived growth factor expression in phyllodes tumors and fibroadenomas of the breast. *Human Pathol* 2000; 31(10): 1214-22.
25. Hofer MD, Fecko A, Shen R, Setlu S, Pienta K, Tomlins S, et al. Expression of platelet derived growth factor in prostate cancer and treatment implications with tyrosine kinase inhibitors. *Neoplasia* 2004; 6(5): 503 – 512.
26. Shinomura Y, Kinoshita K, Tsutsui S, Hirota S. Pathophysiology, diagnosis and treatment of gastrointestinal stromal tumors. *J Gastroenterol* 2005; 40: 775-80.

27. von Mehren M. Recent advances in the management of gastrointestinal stromal tumors. *Current Oncol Rep* 2003; 5(4): 288-94.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. César AC, Silva AE, Tajara EH. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. *Arq Gastroenterol* 2002 Out-Dez; 39(4): 253-59.
34. Marigo C, Okuyama MH, Santos GS. Tipos histológicos e maortalidade por câncer gástrico em São Paulo. 1997 *Cad Saúde Pub* 13 supl 1.

ARTIGO (inglês)

Immunohistochemical Expression of p16 and PDGFR-beta in Gastric

Adenocarcinoma

Rodrigo Pozza Pinto; Jane Maria Ulbrich Kulczynski; Luis Fernando Moreira

BACKGROUND: Oncogene *p16* is implicated in pathogenesis of many human tumors and even in regulation of normal cellular growth. *PDGFR* has been found activated and mutated on gastric stromal tumors where c-kit, the most commonly found marker, is in wild type. PDGF-beta and its receptor have not been studied concerning expression and response to cellular growth inhibitors on non-stromal gastric tumors.

PATIENTS AND METHODS: Thirty-six patients submitted to surgery for gastric adenocarcinoma between 1998 and 2000 at Santa Casa de Porto Alegre Hospital have been studied. Variables investigated were: age, gender, tumor size and localization, number of resected and metastatic lymph nodes, histological type, surgical resection extension and pathological staging.

RESULTS: No expression of PDGFR-beta has been detected on surgical specimens. Concerning 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 the variables studied.

INTRODUCTION

Gastric adenocarcinoma has been the main cause of cancer death during most of the twentieth century, now overcome by lung cancer. Annually 750,000 new cases are

diagnosed. Great geographic variations are seen and the highest incidences can be found in Japan, South America, Eastern Europe and Middle East.¹ It is twice as frequent in men as in women,^{1,2} has a low incidence before the fourth decade with a peak incidence in the seventh decade.¹ In Brazil 23,000 new cases and 11,000 deaths are estimated to 2005.³

The prognosis of gastric adenocarcinoma is poor, mainly because of lack of symptoms and late diagnosis, with an overall survival of 5-15% in 5 years.^{1,4} In Japan, where this disease is endemic but diagnosis is usually done at an early stage due to wide availability of endoscopies, survival rate is 50% in 5 years.¹ Complete resection of all gross and microscopic disease is the only potentially curative treatment. However, disease recurs in 80% of patients even after curative resection.¹

Oncogene *p16* is implicated in pathogenesis of many human tumors and even in regulation of normal cellular growth, together with cyclin, tyrosine kinases and tumoral transforming and growth factors, like TGF- α and - β and platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors (α and β). Inherited mutations of *p16* are associated with hereditary melanomas. Deletions and acquired inactivation of *p16* are found in 75% of pancreatic carcinomas, 40-70% of glioblastomas, 50% of esophageal carcinomas and 20% of non-small cell lung cancer.⁵ Recent papers have demonstrated a relation between *p16* inactivation and development of stomach cancer. Forty to ninety per cent of gastric adenocarcinomas show inactivation of *p16*,⁶⁻¹¹ appearing to have relation with cellular differentiation.^{7,10,12} Expression of *p16* is decreased in lymph node metastasis.⁶ Apparently there is no difference in expression between intestinal and diffuse-type gastric adenocarcinoma.¹²

Platelet derived growth factor receptor- β (PDGFR- β), a tyrosine kinase surface receptor, is important to growth, differentiation and cell death controls.^{13,14}

PDGFR has been found activated and mutated in gastric stromal tumor where c-kit, the most commonly marker found, is in wild type.^{15,16} PDGF receptors act over stromal-derived cells and are not expressed in epithelial cells under normal physiologic conditions.¹⁷ Expression of PDGFR has been described in dermatofibromiosarcoma, chronic myelocytic leukemia and in gastrointestinal stromal tumors (GISTs),^{18,19} besides other solid tumors like glioblastomas and prostate cancer.^{13,18} PDGF-beta and its receptor have not been studied concerning expression and response to cellular growth inhibitors on non-stromal gastric tumors.

PATIENTS AND METHODS

Thirty-six patients submitted to surgery for gastric adenocarcinoma between 1998 and 2000 at Santa Casa de Porto Alegre Hospital have been studied with the aim of determining prevalence of p16 and PDGFR-beta.

None of the 36 patients had medical history of other malignant tumors (except to skin spinocellular and basocellular) or pre-operative chemo or radiation therapy, which would be exclusion criteria to the study.

Variables investigated were: age, gender, tumor size and localization, number of resected and metastatic lymph nodes, histological type, surgical resection extension and pathological staging. Clinical and pathological data were collected from hospitalar records, as were surgical descriptions.

Surgical specimens analysis (hematoxylin-eosin, HE) included determination of tumor penetration on gastric wall, nodal metastasis, histological differentiation and histological type (intestinal or diffuse, according to Lauren).

Specimens were processed according to routine of Pathology Department of Clinicas Hospital of Porto Alegre. Mouse monoclonal antibody anti-p16^{ink4a} (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) and rabbit polyclonal antibody anti-PDGFR beta Ab-1 (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) were used to IH valuation, diluted on PBS saline solution at 1:100 and 1:75, respectively. After dewaxing, rehydration and antigen recovery, inactivating endogenous peroxidase activity and blocking cross-reaction with normal serum, the sections were incubated for 12 hours at 4°C with a solution of the primary antibody diluted as mentioned above. Positivity was determined with ABS method (streptavidin-biotin-peroxidase complex; LABS+System HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA).

Up to 20 high power fields (x400) of each sample were captured to computer (Image Pro-Plus, v 4.5.1.2.2, Media Cybernetics). On computer screen, after insertion of a grid over pictures, total number of cancer cells and total number of immunopositive cancer cells were counted. Nuclear brown staining over cytoplasmic staining was considered to be positive to p16. Lung carcinoma samples were used as external positive control. Percentage of p16 positivity was calculated dividing the number of stained cancer cells by the total number of cancer cells, and then this value was multiplied by 100. Two thresholds were regarded as loss of expression: <10% and <1%. A qualitative scale was determined to PDGFR-beta, according to staining intensity: (1) no staining, (2) weak, (3) moderately and (4) strong. Breast carcinoma samples were used as external positive controls. To be considered positive the sample should have at least 10% of moderately or strong stained cancer cells.

Qualitative data was described as mean and standard deviation. Percentage and absolute frequency were used to categorical variable. Fischer's Exact Test was used to relate p16 expression to gender and histological type. Student's T Test was used to

compare p16 to size, age and number of metastatic lymph nodes. Pathological stage was compared to p16 using Chi-Square Test (P value <0,05 to all tests). Statistical analysis was performed with SPSS 10.0 software..

TABLE 1: Clinical and pathological characteristics of the patients.

Variable	n	Description
Age (SD,years)	36	59,2 (13,2)
Male : Female	20:16	
Lauren Classification	36	
Intestinal	13	36,1%
Diffuse	23	63,9%
Tumor Differentiation*	36	
Well	1	2,77%
Moderately	2	5,55%
Poorly	33	91,66%
Lymph nodes (SD)	573	15,9 (10,4)
Positive	178	4,9 (5,2)

Data presented as media \pm standard deviation or frequency (percentage). * well: well differentiated; moderately: moderately differentiated; poorly: poorly differentiated.

TABLE 2: p16 loss and association to variables.

Variable	p16		p16	
	<1% (n=28)	>1% (n=8)	<10% (n=32)	>10% (n=4)
Men	16	4	19	1
Women	12	4	13	3
	<i>P=1 (ns)*</i>		<i>P=1 (ns)*</i>	
Age (SD,years)	57,3 (13,6)	66,1 (9,1)	59 (13,6)	61,2 (9,8)
	<i>P=0,05 (ns)**</i>		<i>P=0,7 (ns)**</i>	
Tumor size (SD,cm)	6,7 (3,8)	5,2 (3,0)	6,5 (3,6)	5,2 (3,6)
	<i>P=0,28 (ns)**</i>		<i>P=0,55 (ns)**</i>	
Lauren Classification				
Diffuse	9	4	11	2
Intestinal	19	4	21	2
	<i>P=1 (ns)*</i>		<i>P=1(ns)*</i>	
Positive lymph nodes (SD)	4,5 (5,0)	6,6 (6,0)	4,4 (4,7)	9,5 (7,8)
	<i>P=0,37 (ns)**</i>		<i>P=0,28 (ns)**</i>	

*ns: not significant; *Fischer's Exact Test; ** Student's t Test ; SD: standard deviation.*

RESULTS

Thirty-six patients with gastric adenocarcinoma were studied; 20 (55,5%) men and 16 (44,5%) women (table 1). Global mean age was 59,2 years ($\pm 13,2$); men median age was 59,2 ($\pm 10,71$) and women 59,3 ($\pm 16,6$). The difference was not statistically significant.

Tumor localization was the following: 2 (5,55%) cardia, 4 (11,11%) cardia and fundus, 5 (13,88%) body and fundus, 1 (2,77%) body, 2 (5,55%) body and antrum, 19 (52,77%) antrum and 3 (8,33%) pylorus. Twenty-three (63,88%) patients were submitted to partial gastrectomy, 11 (33,33%) to total gastrectomy and 2 (5,55%) esophagogastrectomy. The mean number of lymph nodes resected was 15,9 ($\pm 10,4$); of those, 30,8% ($4,9 \pm 5,2$) showed metastatic disease. Analysis of lymphadenectomy extension data was not possible because it was not available in most surgical descriptions.

Concerning to Lauren classification 63,9% was diffuse type and 36,1% was intestinal type. Histological differentiation was the following: 91,6% poorly differentiated, 5,6% moderately differentiated and 2,8% well differentiated. Pathological staging, according to TNM 6th edition was as follows: 5 (13,88%) cases in stage IA, 2 (5,55%) cases in stage IB, 3 (8,33%) cases in stage II, 10 (27,77%) cases in stage IIIA, 10 (27,77%) cases in stage IIIB and 6 (16,66%) cases in stage IV.

P16 analysis showed positivity lower than 10% in 32 (88,9%) patients and lower than 1% in 28 (77,8%). Positivity to p16 was compared (10% and 1% respectively) to age ($p=0,7$; $p=0,05$), gender ($p=1$; $p=1$), tumor size ($p=0,55$; $p=0,28$), positive nodes ($p=0,28$, $p=0,37$), pathological staging ($p=0,22$, $p=0,02$) and Laurén histological type ($p=1$, $p=1$). There was no statistical difference in none of the variables studied ($p<0,05$).

DISCUSSION

It was an arbitrary decision to study simultaneously in gastric adenocarcinoma p16, whose loss of expression has been exhaustively studied in this kind of tumor and PDGFR-beta, whose association to gastric adenocarcinoma has not been found in medical literature. Although there is not a close relationship between the two markers, one could imagine that in cancer cells the hyper-expression of PDGFR-beta, which increases the mitogenic stimulus to cell could be associated with loss of activity of p16, which is one of the cell cycle inhibitors. Besides that, promising results in treatment of this patients with tyrosine kinases inhibitors, like imatinib (formerly known as STI571, {Gleevec}, Novartis Pharmaceutical Corp, East Hanover, NJ, USA) have been described in stromal gastrointestinal tumors (GISTs), in which PDGFR is hyper expressed.^{13,15,26,27} In a gastric carcinoma animal model it was demonstrated increases in antitumoral and cytotoxic effects of 5-FU and paclitaxel when associated to imatinib.²⁸

In our study, 89% of cases had loss of expression of p16 (positivity lower than 10%) which is similar to literature data of 40-90% loss.^{3,6,7} Seventy-eight percent of cases showed positivity lower than 1%. This lower threshold was chosen to increase the associative power of p16 loss expression and the variables studied.

Expression of PDGFR-beta was detected in none of the 36 cases studied. The association between this marker and gastric adenocarcinoma has not been found in medical literature, although its expression (PDGFR alpha and beta) has been found in other epithelial tumors like cholangiocarcinoma²⁹, ovary carcinoma³⁰ and breast carcinoma.³¹

In gender, there was not statistical difference between mean ages ($p=0,98$), in contrast to American literature, in which women tend to be older.¹ In similarity to other reports,^{6,23} there was not relationship to p16 expression, gender and age.

Concerning Laurén histological type, 63,9% was diffuse type and 36,1% was intestinal type, contrary to expected.^{1,32-34} There was not difference between Laurén histological type and p16 expression in the two thresholds studied (1% and 10%), data found in other report,¹² although in literature it is not consensus.^{7,33}

The mean number of metastatic lymph nodes found was 4,9 ($\pm 5,2$). Immunohistochemistry to p16 in lymph nodes was not realized. It is known that tumors with p16 loss tend to have a higher metastatic potential and, in general, p16 expression is lower in metastatic lymph nodes than in primary lesion.^{6,23}

In pathological staging 72% of patients was stage III or IV, a reflex of late diagnosis. There was no difference between p16 loss and staging in this study.

The present report has demonstrated loss of p16 expression in 89% ($<10\%$) and 78% ($<1\%$) of cases, although there were no differences among the variables studied. Continuing investigation is necessary in these cases to establish p16 expression and its association to lymph nodes metastasis and survival, as well as the p16 inactivation mechanism involved.

REFERENCES

1. De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg AS. Cancer – Principles and Practice of Oncology. 6th Edition. Philadelphia: Lippincott Willians and Wilkins; 2001.

2. 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.
3. INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2005 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2005.
4. Brien TP, Depowski MD, Sheehan CE, Ross JS, McKeenna BJ. Prognostic factors in gastric cancer. *Mod Pathol* 1998; 11:870-7.
5. Wistuba II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol*. 2001 Apr;28(2 Suppl 4):3-13
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.

12. 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.
13. George D. Platelet-derived growth factor receptors: a therapeutic target in solid tumors. *Semin Oncol* 2001 Oct; 28(5 Suppl 17): 27-33.
14. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews* 1999 Oct; 79(4): 1283- 316.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor c-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 1037-51.
19. Esposito 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.
20. Geradts J, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. CDKN2A Promoter methylation in gastric adenocarcinomas: clinical variables. *Human Pathol* 2002; 33(12): 1200-4.

21. Kang YK, Kim WH, Jang JJ. Expression of G1-S modulators (p53, p16, p27, cyclin D1, Rb) and Smad4/Dpc4 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Human Pathol* 2002; 33(9):877-83.
22. Beasley MB, Lantuejoul S, Abbondanzo S, Chu WS, Hasleton P, et al. The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung. *Human Pathol* 2003; 34(2): 136-42.
23. Feakins RM, Nickols CD, Bidd H, Walton SJ. Abnormal expression of pRb, p16 and cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and its lymph node metastases: relationship with pathological features and survival. *Human Pathol* 2003 34(12): 1276-82.
24. Feakins RM, Wells CA, Young KA, Sheaf MT. Platelet-derived growth factor expression in phyllodes tumors and fibroadenomas of the breast. *Human Pathol* 2000; 31(10): 1214-22.
25. Hofer MD, Fecko A, Shen R, Setlu S, Pienta K, Tomlins S, et al. Expression of platelet derived growth factor in prostate cancer and treatment implications with tyrosine kinase inhibitors. *Neoplasia* 2004; 6(5): 503 – 512.
26. Shinomura Y, Kinoshita K, Tsutsui S, Hirota S. Pathophysiology, diagnosis and treatment of gastrointestinal stromal tumors. *J Gastroenterol* 2005; 40: 775-80.
27. von Mehren M. Recent advances in the management of gastrointestinal stromal tumors. *Current Oncol Rep* 2003; 5(4): 288-94.
28. 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.

29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. César AC, Silva AE, Tajara EH. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. *Arq Gastroenterol* 2002 Out-Dez; 39(4): 253-59.
34. Marigo C, Okuyama MH, Santos GS. Tipos histológicos e mortalidade por câncer gástrico em São Paulo. 1997 *Cad Saúde Pub* 13 supl 1.