

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES ASSOCIADAS AO CÂNCER DE ESTÔMAGO

Henrique Douglas Melo Coutinho¹⁶
hdouglas@zipmail.com.br
h-douglas@bol.com.br

RESUMO

O Câncer gástrico apresenta altas taxas de mortalidade devido ao diagnóstico tardio da doença. O surgimento de novas técnicas laboratoriais altamente sensíveis e específicas é de fundamental importância para uma análise e detecção precoce da carcinogênese. Neste contexto, a descoberta e utilização de marcadores moleculares com sinais de alterações gênicas ou cromossômicas podem tornar mais fácil o controle do câncer gástrico. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é revisar através da literatura mais atualizada os marcadores moleculares já descobertos em associação ao câncer gástrico, visando informar seus tipos e como podem ser utilizados. Verificamos a existência de uma grande variedade de marcadores protéicos, imunológicos e genéticos, o que favorece a tipificação do tumor gástrico, permitindo um tratamento mais eficaz e menos agressivo ao paciente.

Palavras-chave: Carcinogênese. Marcadores Moleculares. Alterações Gênicas. Alterações cromossômicas.

INTRODUÇÃO

HISTÓRICO

Os tumores de estômago são descritos desde épocas antigas. Registros em textos árabes do séc. X d.C., das escolas médicas de Isphaham, na Pérsia, e de Córdoba, na Espanha, escritos pelos grandes médicos da época, como Avicena (980-1037 d.C.). Os conhecimentos anatomopatológicos sobre esta doença iniciaram no séc. XVIII com Morgani, Rokitansky e Virchow (SEGAL, 2000).

Até o início do séc. XX, o diagnóstico do câncer gástrico era suspeitado pela história clínica de dor epigástrica, anorexia e emagrecimento, além do exame físico dos pacientes, sendo que, geralmente, estes já apresentavam massa abdominal palpável, sendo deste modo uma doença avançada e incurável. A descoberta dos Raios-X, em

¹⁶ Mestre em Genética. Docente da Universidade Regional do Cariri – URCA.

1895, possibilitou o estudo das lesões gástricas. Na década de 70, o estudo radiológico do estômago era o único exame empregado para o diagnóstico pré – operatório das doenças gástricas, pois a endoscopia, apesar de ter sido desenvolvida anteriormente a radiologia, ainda estava dando seus primeiros passos nessa época (SEGAL, 2000). Em MÓDENA, 2000, foi apresentada uma proposta de classificação microscópica das neoplasias gástricas, dividindo-se em dois tipos histológicos principais: tipo intestinal (ou diferenciado) e tipo difuso (ou indiferenciado). Essa classificação permitiu uma associação com a patogênese, pois o tipo difuso evoluía a partir da mucosa normal e estava ligado a fatores hereditários; e o tipo intestinal evoluía a partir da mucosa com gastrite crônica e metaplasia intestinal.

CÂNCER GÁSTRICO NA POPULAÇÃO

O câncer gástrico assume grande importância devido a sua alta prevalência em nosso país. Segundo as estimativas de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil, publicadas pelo INCA – Instituto Nacional do Câncer, o câncer gástrico será o quarto tipo de câncer mais mortal (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER-INCA, 2004).

O câncer é considerado uma doença genética que ocorre devido ao acúmulo de mutações não esperadas por recombinação mendeliana em virtude, principalmente, a exposição a agentes genotóxicos do meio ambiente. Virtualmente, todos os tumores têm anormalidades gênicas ou cromossômicas. A célula alterada passa para sua progênie mensagens sobre o comportamento celular alterado e é este fato que caracteriza o câncer como uma doença letal (WUNSCH FILHO & GATTÁS, 2001).

O desenvolvimento de técnicas laboratoriais altamente sensíveis e específicas para reconhecer e mensurar moléculas que possam indicar a presença do desenvolvimento tumoral é de grande importância (FORONES & OSHIMA, 2002).

Os marcadores moleculares são indicadores de alterações genéticas ou cromossômicas que podem levar ao câncer, por isso, quanto mais cedo for feito o diagnóstico dos marcadores moleculares, melhor será o prognóstico do paciente. O marcador molecular ideal tem por finalidade permitir o rastreamento populacional, o diagnóstico, a localização do tumor, determinar o prognóstico e facilitar a monitorização terapêutica.

GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Os marcadores moleculares indicam alterações gênicas ou cromossômicas, que podem ser indicativas de carcinogênese. Esses podem ser detectados por técnicas altamente sensíveis e específicas para cada marcador. A análise precoce dos marcadores pode aumentar as chances de cura, principalmente nos pacientes que apresentam história familiar de câncer e nos pacientes que vivem em áreas de maior risco, como o Japão. No Japão, desde 1978, o câncer gástrico é a quinta causa de morte (TAHARA, 1996).

Constituem-se importantes mecanismos na carcinogênese gástrica: a inativação dos genes supressores tumorais, o defeito no reparo do DNA, a ativação de oncogenes e a apoptose (SEGAL, 2000).

MARCADORES RELACIONADOS À SUPRESSÃO TUMORAL

Genes supressores tumorais são genes cuja perda de função induz ou facilita a tumorigênese. O gene supressor tumoral apresenta a perda de um ou ambos os alelos e mutação no alelo remanescente, gerando o aparecimento do câncer devido a sua ausência funcional (FORONES & OSHIMA, 2002).

Alterações nos genes supressores tumorais como o MCC e o APC têm sido descritas em aproximadamente 60% dos casos (TAHARA, 1995).

Mutações e perda do alelo do gene APC são frequentemente associadas com adenocarcinoma bem diferenciado. A proteína APC pode formar um complexo com α -catenina e β -catenina. A cadherina organiza complexos com α , β e γ -catenina que mediam adesão e proteção citoesquelética. A expressão diminuída ou a perda das cadherina ou catenina são comumente encontradas em carcinomas indiferenciados ou do tipo esquizoide por causa de alterações gênicas (TAHARA, 1995).

Perda da heterozigidade no cromossomo 1q geralmente origina adenocarcinoma diferenciado, enquanto que no cromossomo 1p o adenocarcinoma indiferenciado é mais comum (TAHARA, 1995).

O processo de gênese tumoral está intimamente associado à reprodução celular, ou seja, aos mecanismos que regem o ciclo celular. Para que a cada ciclo duas células-filhas idênticas sejam geradas, é necessário que ocorra duplicação e subsequente

segregação dos cromossomos e demais componentes da célula. Cromossomos são replicados numa fase conhecida como S (síntese) e segregados para as células-filhas na fase M (mitose) do ciclo celular. Esse processo ocorre de forma contínua, passando de G1-S-G2-M, sendo G1 e G2 (gap 1 e 2) fases que antecedem os períodos de síntese e divisão celular.

O controle do ciclo celular é feito basicamente por intermédio de proteínas que atuam nas fases G1 e G2, acionando mecanismos de reparo ou interrompendo o processo de divisão celular quando detectam mutações no material genético. Grande parte dos genes supressores tumorais sintetiza proteínas com funções de regulação do ciclo celular, as quais quando ausentes ou ineficientes podem contribuir para a evolução de clones de células tumorais (WUNSCH FILHO & GATTÁS, 2001).

A ciclina D1 é membro da família das proteínas que atua no ciclo de divisão celular, regulando a atividade da proteína quinase ciclina dependente. Essa ciclina é essencial para a progressão da fase G1 para S, acelerando a proliferação celular e está relacionada com a patogênese de diversas neoplasias humanas, incluindo o câncer do tubo digestivo (FORONES & OSHIMA, 2002).

O desenvolvimento do adenocarcinoma indiferenciado ou difuso, incluindo a sua forma avançada tipo esquizoide em adição a mudanças nos genes p53 e c-met, requerem disfunção na E-cadherina.

A E-cadherina é uma molécula de adesão celular cuja função é importante para o estabelecimento da polaridade do tecido epitelial e manutenção da morfologia normal do tecido e diferenciação celular (ELTERMAN, 2001).

O gene E-cadherina, CDH1, tem sido categorizado como um gene supressor tumoral e tem sido implicado na fase inicial da oncogênese. As mutações no CDH1 incluem deleções, transposições e inserções de bases nitrogenadas, e são distribuídas ao longo do gene. Os mecanismos pelos quais as mutações neste gene resultam em câncer ainda estão para serem desvendados. As mutações no CDH1 e a perda da proteína E-cadherina têm sido implicados na patogênese de câncer humano não hereditário incluindo o câncer gástrico (ELTERMAN, 2001).

O gene p53 localiza-se no braço curto do cromossomo 17 (17p13), codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kD e está presente em células normais na forma selvagem. As mutações no p53 são eventos genéticos freqüentemente observados em vários tipos de câncer em humanos e relacionados com o agente ambiental envolvido (FORONES & OSHIMA, 2002). O p53 é uma das proteínas que controla o

ciclo celular, durante a fase G1, retardando o processo de divisão para que ocorra o reparo ou mesmo impedindo a divisão celular através de apoptose (morte celular). Por outro lado, mutações no gene p53 induzem à formação de proteínas alteradas que não conseguem interromper o processo de divisão celular e, sem tempo suficiente para que ocorra o reparo do DNA, a célula carrega o dano para as divisões subsequentes possibilitando a formação de tumores (WUNSCH FILHO & GATTÁS, 2001).

A proteína p53 normal tem uma vida média bastante curta, mensurada em minutos. Já a proteína com mutação apresenta uma estabilidade maior permitindo a sua observação através da imuno-histoquímica. Dos diversos eventos moleculares que são reconhecidos como fazendo parte da carcinogênese gástrica, a mutação do gene p53 é o que tem sido mais estudado. Pacientes com p53 positivo apresentaram atividade proliferativa maior, medidos pelo índice de Ki-67. A identificação de p53 é de extrema importância diagnóstica e prognóstica e normalmente está associada ao alto índice de Ki-67 e à expressão de *c-erb-2* (FORONES & OSHIMA, 2002).

O espectro da mutação p53 no carcinoma gástrico primário é caracterizado pela mutação freqüente no par de bases A:T, incidência extremamente alta na transversão, sem transição no CpG e sem transversão G:C para G:C para T:A. A análise do espectro de mutações no p53 em determinada exposição ambiental pode ser útil para identificar fatores envolvidos na etiopatogênese do câncer (TAHARA, 1996).

Os genes *pic1*(p21) e MTS1(p16) estão diretamente envolvidos na carcinogênese humana. Os genes *sdi*, WAF1, *cip1* e p21, que são todos idênticos, são agrupados como sendo *pic1* (p53b é um regulador inibitório da CDK). O *pic1* pode inibir diretamente a replicação do DNA, independentemente da CDK (TAHARA, 1995).

MTS1 codifica a proteína p16, que se liga a CDK4 e inibe a atividade catalítica da enzima CDK4/ciclina D. A mutação MTS1 é detectada em uma grande variedade de tumores sólidos em humanos, como glioma, melanoma, carcinoma esofágico e na carcinogênese do câncer gástrico (TAHARA, 1995).

O gene *K-sam* é amplificado preferencialmente no adenocarcinoma indiferenciado. A amplificação deste gene no carcinoma avançado tipo esquirroso ocorre independentemente da amplificação do gene *c-met*.

De particular interesse é alta freqüência da perda do alelo na porção D7595 do braço longo do cromossomo 7 que ocorre em diferentes tipos histológicos. Essa perda relaciona-se a supressão tumoral (TAHARA, 1996).

A proteína p21/WAF/Cip1 é um supressor de tumor regulado pelo gene supressor de tumor, p53, que inibe a atividade do complexo ciclina/quinase dependente de ciclina. Proteína 27, conhecida como proteína 1 inibidora da quinase dependente de ciclina (Kip 1), inibe o ciclo celular entre as fases G2 e M (FORONES & OSHIMA, 2002).

O aumento na expressão de receptores da tirosinaquinase, dos receptores de fator de crescimento epidérmico ou a amplificação do protooncogene c-met, também foram relatados (SEGAL, 2000).

O gene nm23 também é supressor de tumor, este codifica o nucleotídeo difosfato (NDP) e o fator de transcrição c-myc. A maioria dos carcinomas gástricos apresenta uma expressão aumentada de nm23 na fase inicial (TAHARA, 1995).

O gene *FHIT*, um gene supressor tumoral, está localizado no sítio FRA3B do cromossomo 3p14.2. O gene localiza-se em uma região frágil. Este é composto por 10 éxons, que codificam um pequeno RNAm de 1.1 kb e uma pequena proteína de 16.8 kDa. A expressão da proteína Fhit é detectada na maioria das células epiteliais humanas. A perda de um alelo do gene *FHIT* pode causar a redução na expressão do Fhit. A expressão reduzida do Fhit pode ser detectada em vários tipos de câncer, incluindo o gástrico; esta redução normalmente está associada a alterações genômicas no *FHIT* ou a transcrições alteradas do *FHIT*. Alterações no locus *FHIT* ou a expressão reduzida do Fhit tem sido associados à progressão do tumor gástrico e a baixa sobrevivência dos pacientes com câncer (HUIPING et al.,2002).

CÂNCER GÁSTRICO X *Helicobacter pylori*

Há também relatos que a infecção por uma bactéria espiralada, gram negativa e produtora de urease, chamada *Helicobacter pylori*, parece iniciar uma cascata de alterações, facilitando o desenvolvimento de câncer. O diagnóstico histológico da infecção por *Helicobacter pylori* esteve associado com aumento de 150 vezes no risco subsequente de câncer gástrico, quando comparado com indivíduos *H.pylori* negativos.

Após infecção por *H. pylori*, surgiram alguns fatores essenciais à carcinogênese, que seriam resultado da interação bactéria-hospedeiro e consistem basicamente em: proliferação do epitélio gástrico, apoptose, resposta imune do hospedeiro, redução da concentração do ácido ascórbico e lesão celular direta causada

por fosfolipases, pela uréase e por citotoxinas liberadas por algumas cepas dessa bactéria.

O aumento na proliferação celular é crucial na carcinogênese, pois aumenta a probabilidade de mutações, além de dificultar o reparo ao DNA das células gástricas. Esses eventos estão associados à ação dos radicais livres - agentes oxidantes e compostos nitrogenados - que são produzidas por meio do processo inflamatório conseqüente à infecção pelo *H.pylori*, bem como pela ação das bactérias que colonizam a mucosa gástrica nos estados de atrofia e hipocloridria.

A amônia, resultante da quebra da uréia pela uréase produzida pela *H.pylori*, parece ser o fator bacteriano causador do aumento da frequência das mitoses, observado na zona de proliferação celular da mucosa gástrica.

A formação de radicais livres e compostos nitrogenados derivados do óxido nítrico (NO), leva à agressão da mucosa em decorrência da resposta inflamatória, com potencial efeito genotóxico, levando a mutações de ponto e comprometendo os mecanismos reparadores do DNA - o que propicia a incorporação dessas alterações no genoma. É provável que o câncer gástrico causado pela infecção por *H.pylori* surja em decorrência do desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e a produção de compostos nitrosos.

Normalmente, o ácido ascórbico é secretado na luz do estômago em concentração superior à do plasma. Existem dados epidemiológicos que associam a baixa incidência do câncer gástrico a uma dieta rica em ácido ascórbico. Essa substância exerceria um papel protetor, através da inativação de produtos derivados do oxigênio e pela inibição da reação de N-nitrosação, além de evitar a apoptose. Observou-se que na infecção pelo *H.pylori*, na presença da gastrite crônica, na anemia perniciosa, na úlcera péptica e no câncer gástrico há uma diminuição dos níveis dessa substância na luz gástrica.

O papel do *H.pylori* sobre as alterações moleculares na carcinogênese gástrica ainda é pouco conhecido. A presença do aumento na expressão do p53, c-erb2, c-met e a perda da heterozigosidade dos genes APC e DCC em uma grande série de neoplasias gástricas foi fator independente ao *H.pylori*.

A infecção pelo *H.pylori* também está estreitamente relacionada a apoptose. Alguns estudos demonstram haver diminuição do índice de apoptose após erradicação desta bactéria e desta forma evitaria a progressão para a neoplasia. Entretanto, alguns relatos referem que um aumento na apoptose contribuiria para o

surgimento da gastrite atrófica, com conseqüente aumento no pH gástrico, condição propícia para o aparecimento do câncer gástrico. Além disto, a perda celular secundária ao aumento na apoptose estimularia a hiperproliferação persistente das células da mucosa gástrica, outro fator de risco ao câncer (SEGAL, 2000).

MARCADOR RELACIONADO Á ONCOGÊNESE

Células neoplásicas possuem seqüência de DNA homólogos a genes de transformação viril e que alterações desses genes estão associados com o câncer. Um dos produtos oncogênicos mais conhecidos é o *c-erbB-2* (HER-2/neu). O gene *c-erbB-2* é homólogo do receptor EGF (fator de crescimento epidérmico), localizado no cromossomo 17q21 e está envolvido no crescimento, diferenciação celular e pior prognóstico.

Amplificação e expressão aumentada do *c-erbB-2* está freqüentemente associado ao carcinoma diferenciado (TAHARA, 1995).

O gene *c-met* está freqüentemente amplificado no carcinoma gástrico avançado, principalmente no tipo esquisroso. Perda da heterozigossidade do gene *c-met*, localizado no cromossomo 7q31, ocorre em 30% dos cânceres gástricos independentemente da amplificação do gene *c-met* (TAHARA, 1995).

MARCADORES RELACIONADOS Á APOPTOSE

A presença de instabilidade de microssatélites foi descrita em 30% das neoplasias do estômago, sendo que esta alteração tende a ser positivamente associada com tumores do tipo intestinal, em estágios avançados e localizados na região ventral. A instabilidade de microssatélites freqüentemente envolve os genes TGF beta II, IGF II R ou o gene pro-apoptose BAX, enquanto possuidores de seqüências de microssatélites.

A expressão de moléculas de adesão celular está freqüentemente alterada no câncer gástrico, sendo descritas mutações no gene E-cadherina em 50% das neoplasias do tipo difuso e foram descritas mutações germinativas desse gene no câncer gástrico hereditário (SEGAL, 2000).

A oncoproteína *bcl-2* é conhecida como um inibidor da apoptose e pode ser considerado como “gene supressor de morte celular”. Essa proteína ocorre numa

variedade de tumores incluindo os carcinomas de estômago e cólon (FORONES & OSHIMA, 2002).

MARCADORES RELACIONADOS Á ANGIOGÊNESE

A formação de novos microvasos, através da angiogênese, é um pré-requisito para o crescimento de tumores sólidos e formação de metástases. Estudos mostram que doentes portadores de tumores com acentuada neovascularização têm maior risco de metástase e pior resultado clínico. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é conhecido como mitógeno altamente específico para células endoteliais (FORONES & OSHIMA, 2002).

FATORES DE CRESCIMENTO E CITOCINAS

As células cancerosas gástricas expressam fatores de crescimento, hormônios e citocinas, que funcionam como moduladores autócrinos ou parácrinos e organizam uma complexa interação entre as células cancerosas e as células do estroma. O fator α de crescimento tumoral (TGF), o fator de crescimento epidermal (EGF) e a interleucina 1 ($IL-1\alpha$) atuam como fatores de crescimento autócrinos. A expressão aumentada do EGF/TGF α e dos receptores EGF estão correlacionados com a malignidade dos tumores (TAHARA, 1995).

OUTROS MARCADORES

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é encontrado em tecidos normais e tumorais de cólon, estômago e intestino delgado. Na clínica, seu principal papel é na monitorização dos doentes tratados cirurgicamente. Níveis séricos de CEA elevados no pré-operatório servem para estabelecer o prognóstico independente do estágio. Níveis elevados no pós-operatório são indicativos de recorrência e podem preceder o diagnóstico do local de recorrência entre 6 a 12 meses.

O CA19-9 é um anticorpo monoclonal sintetizado pelas células, pancreáticas, ductos biliares, epitélio do estômago e cólon. É utilizado como marcador sérico no diagnóstico e monitoração dos pacientes com câncer gastrintestinal.

O CA72-4 é um anticorpo monoclonal que reconhece os antígenos B72-3, CC49 e CC83 da mucosa gástrica. É sintetizado a partir de uma glicoproteína associada ao tumor TAG72 e é utilizado no diagnóstico do câncer gástrico (FORONES & OSHIMA, 2002).

TÉCNICAS MOLECULARES E IMUNOHISTOQUÍMICA

Uma variedade de técnicas moleculares, incluindo a extração do DNA proveniente dos tecidos, a amplificação do DNA pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), o sequenciamento e a expressão dos produtos da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e análise de polimorfismos podem ser utilizados para diagnósticos laboratoriais de rotina, particularmente como métodos não-radioativos para a detecção de ácidos nucleicos.

Numerosas proteínas, incluindo fatores ou receptores de crescimento, moléculas de adesão celular, produtos de oncogenes ou de genes supressores tumorais são especificamente examinados por seções embebidas em parafina fixada em formalina, por técnicas imunohistoquímicas que utilizam anticorpos específicos (TAHARA, 1995b).

ABSTRACT

The gastric cancer presents a high mortality rises because its later diagnosis. The creation of new laboratorial techniques with high sensibility and specification is very important for early analyses and detection of carcinogenesis. In this context, the discovery and use of molecular markers how signals of genetic and chromosomal alterations can to make easier the control of gastric cancer. In this form, the main of this paper is review the “*state – of – art*” about the molecular markers, using the most recent bibliography in association with the gastric cancer, mainly your types and uses. We verified the existence of several proteic, immunologic and genetic markers, best typifying the tumor and making possible a treatment more efficient and soft to the patient.

Key Words: Carcinogenesis. Molecular markers. Genetic alteration. Chromosomal alteration.

ABREVIACÕES

DNA – Ácido desóxiribonucléico;

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico;

TGF – Fator de Crescimento Tumoral;
VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular;
IL – Interleucina;
CEA – Antígeno Carcinoembrionário;
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase;
KDa – KiloDalton;
MCC – Carcinoma Celular de Merkel;
CDK – Quinase Dependente de Ciclina;
APC – Polipose Adenomatosa Colônica;
DCC – Deleção em Câncer Colorectal;
MTSI – Instabilidade de Microsatélites;
CDH1 – Gene da E – cadherina;
FHIT – Gene da Tríade de Histidinas Frágeis;
IGF – Fator de Crescimento Semelhante a Insulina.

REFERÊNCIAS

- ELTERMAN, D. Digesting genetic information in gastric cancers. **Clinical Genetics**. v.60, n. 4, p. 264-269, 2001.
- FORONES, N.M.; OSHIMA, C.T.F. Importância dos Marcadores Tumoriais nos Tumores do Aparelho Digestivo. **Revista Compacta**. v. 2, n. 4, p. 16-19, 2002.
- HUIPING, C., et al. High frequency of LOH, MSI and abnormal expression of *FHIT* in gastric cancer. **European Journal of Cancer**. v. 38, n. 5, p. 728-735, 2002.
- INSTITUTO Nacional do Câncer. INCA. Ministério de saúde no Brasil. Disponível em: <[http:// www.inca.gov.br/](http://www.inca.gov.br/)> . Acesso em: 17 jun. 2004.
- MÓDENA, J.L.P. História do Câncer Gástrico. In: CORDEIRO, F.; MENEGHELLI, U. RESENDE, J.M. **A Gastroenterologia no Brasil**. Revinter, 2000.
- SEGAL, F. Adenocarcinoma Gástrico. In: LOURO I.D. **Genética Molecular do Câncer**. São Paulo: MSG, 2000.
- TAHARA, E. Molecular Basis of Stomach Carcinogenesis. **Acta Oncológica do Brasil**. v. 16, n. 3, p. 04-112, 1996.
- _____. Molecular Biology of Gastric Cancer. **World Journal of Surgery**. v.19, p. 484-490, 1995a.

_____. Genetic Alterations in Human Gastrointestinal Cancer: The Application to Molecular Diagnosis. **Supplements in Cancer**. v. 75, n. 6, p. 1410-1417, 1995b.

WUNSCH, F. V.; GATTÁS, G.J.F. Biomarcadores Moleculares em câncer: Implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 17, n. 3, p. 467-480, 2001.