

ALINE CRISTINA TARGA

Investigação de apoptose pelas técnicas TUNEL e expressão da caspase-3 ativada em lesões gástricas benignas e câncer gástrico e associação com *Helicobacter pylori*, aneuploidias e expressão da proteína p53.



1910001301



ALINE CRISTINA TARGA

Investigação de apoptose pelas técnicas TUNEL e expressão da caspase-3 ativada em lesões gástricas benignas e câncer gástrico e associação com *Helicobacter pylori*, aneuploidias e expressão da proteína p53.

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.**

São José do Rio Preto - SP

2004

ALINE CRISTINA TARGA

Investigação de apoptose pelas técnicas TUNEL e expressão da caspase-3 ativada em lesões gástricas benignas e câncer gástrico e associação com *Helicobacter pylori*, aneuploidias e expressão da proteína p53.



7.1301/04

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.**

Orientadora: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury

São José do Rio Preto - SP

2004

616.33

T185i

21/10/2004

Doação

R\$ 25,00

Autor

ND: 117/04 –

Proc. 047/04

Targa, Aline Cristina.

Investigação de apoptose pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada em lesões gástricas benignas e câncer gástrico e associação com *Helicobacter pylori*, aneuploidias e expressão da proteína p53 / Aline Cristina Targa – São José do Rio Preto : [s.n.], 2004

114 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ana Elizabete Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

I. Apoptose. 2. Apoptose - TUNEL. 3. Caspase-3 ativada. 4. Estômago - Inflamação. 5. Estômago - Câncer. 6. *Helicobacter pylori*. 7. Adenocarcinoma gástrico. I. Silva, Ana Elizabete. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616.33

ALINE CRISTINA TARGA

**Investigação de apoptose pelas técnicas TUNEL e expressão da caspase-3
ativada em lesões gástricas benignas e câncer gástrico e associação com
Helicobacter pylori, aneuploidias e expressão da proteína p53.**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE.

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientadora:.....

2º Examinador:.....

3º Examinador:.....

São José do Rio Preto - SP

____/____/____



O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - SP, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, com Bolsa CAPES e Auxílio à Pesquisa da FAPESP.



*Dedico este trabalho às pessoas
que mais amo, meus pais, Ademélio
José Targa e Maria Célia Targa,
meu irmão Flávio e ao meu noivo,
Rodrigo, pelo apoio, ajuda e
confiança que sempre depositaram
em mim.*

Agradecimentos

A realização deste trabalho contou com a colaboração de várias pessoas e, em especial, agradeço:

À Deus, que pela sua graça divina, me deu forças e sabedoria para que pudesse desenvolver este trabalho e enfim, agradeço pelo maior milagre que me proporciona, a vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, pela amizade adquirida e oportunidade que me concedeu, orientando-me e auxiliando-me desde a iniciação científica até o final deste trabalho.

À Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury, sempre companheira, pela amizade conquistada, ajuda e paciência em ensinar-me a compreender, o mínimo necessário, sobre as patologias dos tecidos e aos funcionários do Serviço de Patologia do Hospital de Base, por serem atenciosos e gentis, sempre.

Ao Supervisor de Serviços Técnicos, Domingos Zanchetta Netto, principalmente amigo e futuro padrinho, não só pelos ensinamentos teóricos e práticos sobre imuno-histoquímica, mas por estar presente em todos os momentos dessa caminhada, apoiando-me não só nas horas difíceis mas também compartilhando alegrias, ensinando-me que devemos depositar amor em tudo que realizamos, a ele, minha eterna gratidão.

Aos membros que irão compor a banca examinadora, Profa. Dra. Elza Tieme Sakamoto Hojo e ao Prof Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela disponibilidade e contribuição para o meu trabalho.

À chefe do Laboratório de Histotecnologia da FAMERP, Profa. Dra. Sueli Suzigan, pela permissão para que realizasse a parte prática deste estudo e aos técnicos Zanclayr Alves Santana e Mateus Henrique da Silva pela ajuda, amizade e convivência agradáveis que vivenciamos.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, por disponibilizar o laboratório de Microscopia e Microanálise para realização de parte deste trabalho e, pelo auxílio e atenção prestados.

Ao Prof. Dr. José Antônio Manzato pela orientação indispensável na análise estatística.

Aos amigos do laboratório de Microscopia e Microanálise e, em especial, às amigas Ana Maria, Cristiane, Lucilene, e ao técnico Luís Roberto, pela disposição e boa vontade em ajudar-me no aprendizado de algumas colorações.

A amiga e companheira Ana Cristina Gobbo César, pela importante contribuição em meu trabalho e também, pelas palavras de amizade com que sempre me dirigiu.

À pós-graduanda Marília de Freitas Calmon, pelo generoso auxílio com a técnica imuno-histoquímica em parte de minhas amostras.

Ao técnico Josué Rodrigues dos Santos, pela ajuda e amizade oferecidas em todos os momentos da realização deste trabalho.

À técnica Rosana pelo auxílio com parte dos cortes histológicos.

À amiga Fernanda Toledo Gonçalves, a quem tive o prazer de aproximar-me durante a realização deste projeto, agradeço a disposição, o interesse e atenção com que sempre preocupou-se em me oferecer.



À grande amiga Cláudia Pacheco, presente em todas as etapas dessa minha caminhada, apoiando-me e ensinando-me a superar as dificuldades da vida.

À maravilhosa amiga Silvana Pegorin, pessoa com uma simpatia e astral invejáveis, pela ajuda, amizade e companheirismo demonstrados a todo instante.

Aos pós-graduandos de Genética e, em especial, as amigas Patrícia Ianella, Paula Renata e Tatiana pela amizade e pelos momentos de descontração compartilhados.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação e, em especial, à Rosana, pelo atendimento prestado sempre gentil e carinhoso.

À secretária do Departamento de Biologia, Simone, que apesar dos seus afazeres, sempre mostrou-se prestativa e gentil.

Em especial, agradeço aos meus queridos pais e ao meu irmão, pessoas que amo, por me apoiarem de forma incondicional em tudo o que foi possível, amparando-me em todos os momentos difíceis, além da intensa dedicação de amor e carinho que me conferem, da constante preocupação com o meu bem estar, conquistas e realizações ... a eles, minha eterna gratidão.

Ao meu querido noivo e futuro esposo, pelo mais sincero amor, por dedicar seu carinho a mim, por compartilhar os melhores momentos da minha vida e por acreditar que nossos sonhos se tornarão realidade.



*Vós, os que vos tendes entregado às artes,
às letras, às ciências, não esqueçais que de todas elas,
a mãe é a liberdade, e que sem esta o desenvolvimento
daquelas é uma quimera fatal.*

Rui Barbosa

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	10
1. Aspectos gerais da apoptose.....	11
2. Apoptose em lesões gástricas.....	18
3. Métodos imuno-histoquímicos para detecção de apoptose.....	25
4. Objetivos.....	28
 II. MATERIAL E MÉTODOS	29
1. Caracterização das amostras.....	30
2. Avaliação imuno-histoquímica.....	34
2.1. Detecção de apoptose pela técnica TUNEL.....	34
2.2. Detecção de apoptose pela caspase-3 ativada.....	36
3. Análise Microscópica.....	37
4. Análise estatística.....	38
III. RESULTADOS.....	39
1. Imuno-histoquímica para a apoptose.....	40
2. Associação entre apoptose, infecção pela <i>H. pylori</i> , aneuploidias e expressão da proteína p53.....	61
IV. DISCUSSÃO.....	68
 V. CONCLUSÕES.....	90
 VI. RESUMO.....	93
 VII. ABSTRACT.....	96
 VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99



I. INTRODUÇÃO

I. Introdução

1. Aspectos gerais da apoptose

Os organismos multicelulares desenvolveram um processo para a eliminação de células excedentes ou potencialmente danificadas, por meio de um programa molecular tão importante quanto a divisão e a migração celular, denominado de morte celular programada. Este mecanismo permite aos organismos controlarem o número e o tamanho celulares, eliminando as células alteradas que ameaçam a homeostase (HENGARTNER, 2000). O termo apoptose é derivado do grego *αποπτωσις*, que refere-se à queda das folhas das árvores no outono (BÖHM; SCHILD, 2003; VALEN, 2003).

A apoptose, proposta primeiramente por Kerr et al (1972) é uma forma de morte celular, geneticamente regulada, caracterizada por mudanças morfológicas, bioquímicas e alterações genética moleculares. Fisiologicamente ela pode ser evidenciada durante o desenvolvimento embrionário, na organogênese, na renovação de células epiteliais e hematopoéticas, sendo importante no remodelamento e na formação de tecidos e órgãos. A apoptose constitui a principal defesa do organismo, pois é responsável pela destruição de células não funcionais. Dessa forma, alterações no balanço entre a apoptose e a proliferação celular resultam em distúrbio na homeostase do tecido e, a sua desregulação está relacionada com o desenvolvimento de diversas doenças como o câncer, doenças autoimunes, infecções virais e processos degenerativos, neste último caso, devido a morte celular excessiva (REED, 2002).

Morfologicamente, a apoptose é caracterizada pela degeneração de células esparsas com condensação e fragmentação da cromatina, condensação citoplasmática e redução do volume celular, mantendo, porém, a integridade das organelas citoplasmáticas e da membrana celular. Em sequência, procede a formação de

corpos apoptóticos, contendo núcleos fragmentados e organelas intactas e, fagocitose pelas células vizinhas normais e macrófagos (KERR et al., 1972; 1994; WALDMEIER, 2003). Apesar de, na apoptose, não ocorrer o comprometimento do tecido adjacente, com processo inflamatório, recentemente tem sido observado que vários genes pró-inflamatórios são ativados durante a morte celular apoptótica. Em certos tipos de tecidos, como as placas ateroscleróticas, a fagocitose das células apoptóticas pode ser ineficiente, assim, nessas circunstâncias, as células apoptóticas sofrem necrose secundária (KANG; IZUMO, 2000; SARASTE; PULKI, 2000).

Bioquimicamente, na morte celular apoptótica, a degradação do DNA não é casual, ocorrendo nos espaços internucleossomais por nucleases endógenas dependentes de Ca^{+2} e Mg^{+2} , originando fragmentos de DNA de fita dupla de 180 a 200 pares de bases, que se agrupam para formar corpos hipercromáticos densos visíveis pela microscopia de luz (SAVIL; FADOK, 2000). De modo contrário, a necrose ocorre por um estímulo patológico resultante de uma lesão maciça no tecido, caracterizada pela diminuição de adenosina trifosfato (ATP), pelo inchaço celular e perda da integridade da membrana celular, seguida pela lise das organelas e da célula. Devido à liberação dos constituintes celulares, a necrose é acompanhada, *in vivo*, por uma resposta inflamatória, sendo bioquimicamente caracterizada por degeneração casual do DNA nuclear (VON HERBAY; RUDI, 2000).

A apoptose é um processo rápido e não sincronizado por todo o órgão, com tempo de duração, desde a sua ativação até a morte celular de uma a três horas, portanto diferentes estágios de apoptose coexistem em diversas regiões dos tecidos (HALL, 1999).

A apoptose pode ser induzida por diferentes agentes etiológicos, como infecção viral, radiação, choque térmico, metais pesados, várias toxinas e drogas,

isquemia, perturbação metabólica, fatores hormonais e depleção de fatores de crescimento (ASHKENAZI; DIXIT, 1998). Por outro lado, alguns outros fatores previnem a apoptose (anti-apoptóticos), como os fatores de sobrevivência tecido-específicos ou gerais, por exemplo hormônios, citocinas e fatores de crescimento (JÄÄTTELÄ, 1999).

Em geral, a apoptose procede em duas fases distintas, a fase de decisão e a fase de execução. Na primeira fase, ocorre o acúmulo de produtos gênicos necessários para desencadear o processo, com a integração de sinais pró e anti-apoptóticos na superfície da membrana e interior celulares. Se este balanço for favorável à apoptose, inicia-se a fase de execução pela ativação em cascata de enzimas específicas denominadas caspases, sendo que a partir dessa etapa o processo é irreversível (VALEN, 2003)

As caspases são proteases específicas de aspartato contendo cisteína que clivam seus substratos protéicos especificamente após um resíduo de ácido aspártico (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). Elas são formadas constitutivamente e estão presentes como pró-enzimas inativas. Cada pró-caspase consiste de um pró-domínio, uma subunidade grande (aproximadamente 20 kDa) e uma subunidade pequena (aproximadamente 10 kDa) (ROBERTSON et al., 2000). A indução da atividade enzimática dessas proteases requer clivagem em resíduos internos de ácido aspártico específicos, que separam as subunidades grande e pequena e, subsequente, heterodimerização dessas subunidades (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). A ativação das caspases iniciadoras, tais como as caspases 2, 8, 9 e 10, por sinais pró-apoptóticos leva à ativação proteolítica das caspases efetoras 3, 6 e 7. Essas caspases clivam um grupo de proteínas vitais, como as lâmininas, gelsolinas e, ativam proteoliticamente enzimas latentes, como as nucleases, iniciando e executando a fase de



degradação celular, como a degradação do DNA e as mudanças morfológicas típicas da célula (SARASTE; PULKI, 2000).

A apoptose pode ser iniciada por meio de três vias celulares de sinalização distintas (Figura 1) conhecidas como via extrínseca ou de sinalização externa, via intrínseca ou mitocondrial (estímulo interno) e a terceira via descrita mais recentemente também dependente da mitocôndria, mas independente das caspases, ativada pelo fator de indução de apoptose (AIF) (JOZA et al., 2001).

Na via extrínseca, o processo é ativado por estímulos externos por meio de ligantes a receptores de morte específicos na membrana celular, que recrutam proteínas adaptadoras, ativando assim, a cascata de caspases, culminando na morte celular (ASHE; BERRY, 2003).

Esses receptores de morte pertencem à família de receptor do fator de necrose tumoral (TNF), constituída por receptores transmembrânicos do tipo I caracterizados por apresentarem motivos de morte intracelular (citoplasmático) e extracelular repetidos ricos em cisteína (BEUTLER; VAN HUFFEL, 1994; SCHNEIDER; TSCHOPP, 2000). Os domínios citoplasmáticos da maioria dos membros dessa família de receptores são variáveis, apresentando motivos de domínios de morte (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; 1999; MAGNUSSON; VAUX, 1999) envolvidos na transdução do sinal de morte celular, ou motivos que promovem o crescimento celular (WALLACH et al., 1999). A família dos receptores de TNF compreende o receptor TNF-1 (TNF-R1), Fas (Apo-1 ou CD95), receptor de morte DR3, 4 (TRAIL R1) e DR5 (TRAIL R2) (CHEN; GOEDDEL, 2002; WAJANT, 2002). A ligação de qualquer ligante a seus respectivos receptores de morte, promovem o recrutamento de proteínas adaptadoras (FADD com o Fas; TRADD com TNF-R1, RIP



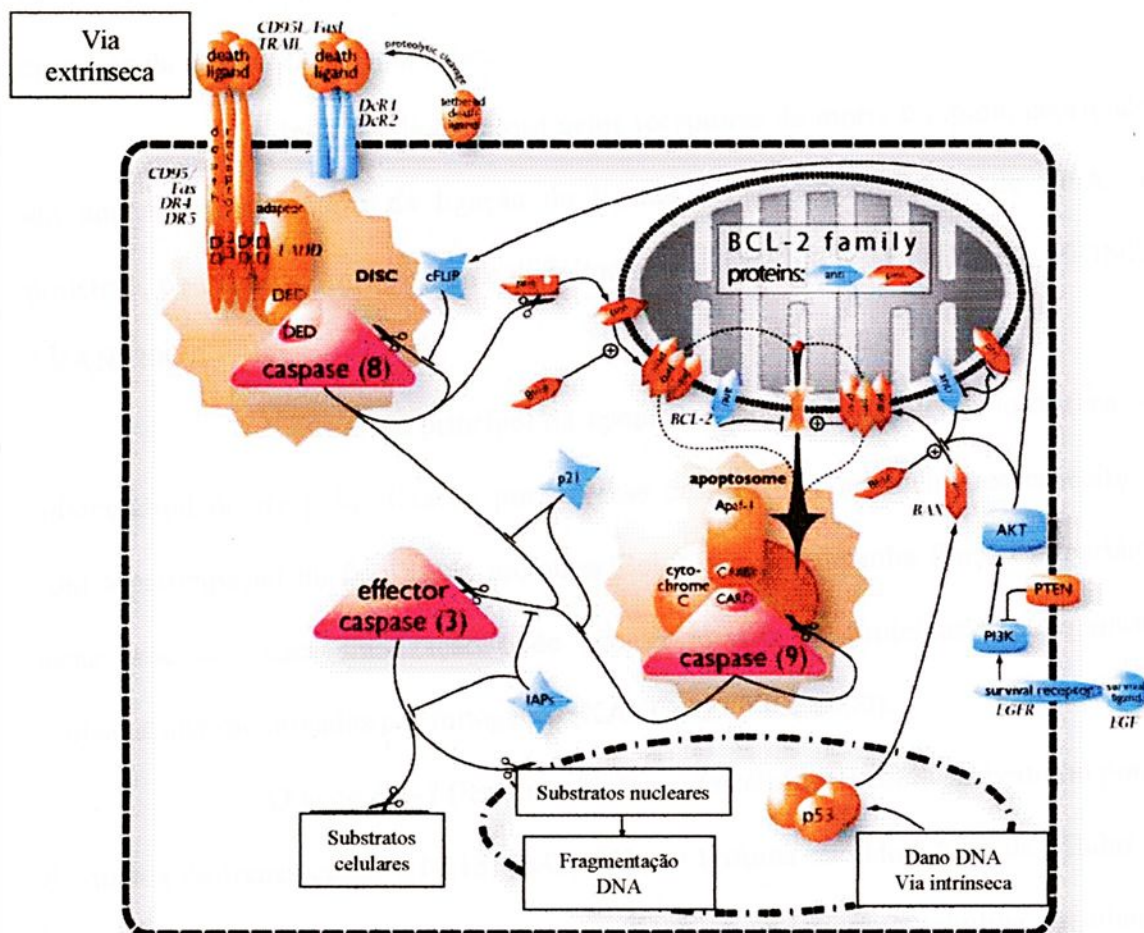


Figura 1. Esquema representando as principais vias apoptóticas, vias extrínseca e intrínseca. (Fonte: urology/news/lab/images/vol9r.gif).

ou ambos), convertendo a forma inativa da caspase-8 para formar um complexo de sinalização de indução de morte (DISC) (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; MATSUMIYA et al., 2001; WAJANT, 2002). Esse complexo ativa a caspase-8, iniciando assim, a cascata de caspases, que por sua vez, ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7, resultando na execução da morte celular apoptótica.

A indução da apoptose pelos receptores de morte é rápida, ocorrendo em poucas horas a partir da ligação do ligante e não requer síntese de RNA ou proteínas, podendo ser independente da mitocôndria (BENNET, 1999; KRUIDERING; EVAN, 2000).

A outra via principal da apoptose, conhecida como via intrínseca ou mitocondrial ocorre pela ativação por estresse de proteínas intracelulares específicas com a participação da família de proteínas Bcl-2 que desempenha função importante neste processo. Essa sinalização pode ocorrer através de proteínas G e quinases protéicas que são ativadas por mitógenos (KANG; IZUMO, 2000).

O gene *Bcl-2* (leucemia/linfoma de células B) foi descoberto no ponto de quebra da translocação t(14;18) (q32;q21) em linfoma não-Hodgking de células B, em que ele é translocado para o locus da cadeia pesada da imunoglobulina, resultando em sua expressão aumentada em células B (TSUJIMOTO et al., 1985). Os membros da família de proteínas intracelulares Bcl-2 são considerados os mediadores essenciais da sobrevivência e apoptose celular (ASHE; BERRY, 2003). A família de proteínas Bcl-2 consiste de membros pró-apoptóticos, como Bax, Bak, Bad, Bim, Bid, Bik, Blk e Hrk, e membros anti-apoptóticos, como Bcl-2, Bcl-w, Bcl-x_l, Mcl-1, Bfl-1 e BHRF (REED, 1998; WEI et al, 2001; YIN et al, 2002). Estas proteínas localizam-se na membrana mitocondrial externa, no envelope nuclear e no retículo endoplasmático das células (KORSMEYER, 1995). Os membros da família Bcl-2, com função anti-apoptótica

estabilizam a membrana da mitocôndria, enquanto que os pró-apoptóticos permeabilizam e induzem a liberação do citocromo c, que na presença de dATP forma um complexo de ativação com o fator 1 de ativação da proteína apoptótica (APAF-1) e caspase-9, ativando a cascata de caspases efetoras, como a caspase-3 (KANG; IZUMO, 2000). Ainda, pode ocorrer uma interação entre a via de apoptose extrínseca e a mitocondrial, pois a ativação de Fas pode induzir também, a clivagem de Bid para a forma t_cBid mediada pela caspase-8, assim induzindo as alterações mitocondriais que amplificam a cascata de caspases (SCHENDEL et al., 1999).

A terceira via de sinalização também dependente da mitocôndria, ocorre pela liberação de fatores apoptogênicos, como o citocromo c, o fator de indução da apoptose (AIF), ATP, proteínas *heat shock* e DIABLO/Smac (direct IAP-binding protein with low p1/second mitochondria-derived activator of caspases) (DU et al., 2000; VERHAGEN et al., 2000; WANG, 2001), um inibidor de IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), neutralizando sua atividade anti-apoptótica. O fator de indução da apoptose (AIF), localizado na mitocôndria, juntamente com a proteína *heat shock* hsp60, participa da apoptose induzida pela estaurosporina ou *c-myc*, devido a translocação de AIF para o núcleo, causando a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA. A translocação de AIF, no entanto, pode ser inibida pela proteína bcl-2 (JOZA et al., 2001).

As células também podem sofrer apoptose em resposta à sinais internos, incluindo lesões no DNA, com a participação de genes envolvidos no controle do ciclo celular. O gene supressor de tumor *TP53* mapeado em 17p13.1 (BENCHIMOL et al., 1985) é considerado o “guardião do genoma”, devido seu papel na manutenção da integridade do DNA e indução de apoptose, eliminando, de forma seletiva, as células danificadas, assim protegendo o organismo do desenvolvimento de cânceres. Alguns

genes da família *Bcl-2* (BALINT; VOUSDEN, 2001) e da superfamília de receptores TNF (BATES; VOUSDEN, 1999) são regulados transcricionalmente pela proteína p53. Sabe-se que a p53 é capaz de estimular a apoptose de forma independente da transcrição, por meio da regulação de receptores de morte Fas e DR5 (BALINT; VOUSDEN, 2001; RYAN et al., 2001), ou alterando o potencial da membrana mitocondrial (VOUSDEN, 2000). As lesões no DNA induzem um rápido aumento da regulação do *TP53*, sendo que a proteína p53 ativa a transcrição de genes como *Gadd45*, *mdm2*, *p21*, envolvidos na regulação do ciclo celular e reparo do DNA, e *Bax*, com atividade pró-apoptótica. Portanto, nem todas as vias da morte celular programada são dependentes da ativação das caspases, como nos casos de células que apresentam alterações drásticas no DNA ou que estão privadas de fatores de crescimento, pois podem sofrer apoptose mesmo na presença dos inibidores das caspases (McCARTHY et al., 1997; AMARENTE-MENDES et al., 1998).

Diante do exposto, torna-se evidente que uma das funções mais importante da apoptose é a remoção de células com alterações no DNA, evitando a proliferação de clones malignos ou a propagação de células contendo DNA viral (VAUX; KORSMEYER, 1999). Dessa forma, anormalidades no processo de morte celular podem contribuir para o desenvolvimento de doenças humanas graves (THOMPSON, 1995; VAUX; KORSMEYER, 1999).

2. Apoptose em lesões gástricas

No epitélio gástrico, a apoptose desempenha função essencial na manutenção da integridade da mucosa gastrointestinal sendo que a sua desregulação está associada com a ocorrência de lesões como a gastrite atrófica, a úlcera péptica e tumorigênese do estômago (QUE; GORES, 1996).



A carcinogênese gástrica é um processo de múltiplas etapas, associada com uma série de mudanças histológicas pré-malignas, iniciando-se a partir de uma gastrite ativa crônica freqüentemente infectada pela bactéria *Helicobacter pylori* e progredindo por meio de uma sequência patogênica para gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma (ATTALAH et al., 1996).

A gastrite é a lesão que mais freqüentemente afeta o estômago e é definida como uma inflamação da mucosa gástrica. A gastrite aguda é raramente observada em biopsia de rotina, por causa de sua característica transitória. Na gastrite crônica, as lesões vão desde um processo inflamatório superficial, até atrofia do epitélio, que é evidenciada pela perda significativa de estruturas glandulares e mostra-se, algumas vezes, associada à metaplasia intestinal. Na gastrite atrófica crônica, ocorre destruição do tecido, atrofia da mucosa e regeneração ativa associada com atipia e displasia (ATTALAH et al., 1996). É caracterizada pela infiltração superficial ou difusa da lâmina própria por células mononucleadas e neutrófilos (DIXON et al., 1996). Aproximadamente 10% dos pacientes com atrofia gástrica desenvolvem carcinoma em período de 15 anos (CHELI; GIACOSA, 1983), sendo por isso, considerada uma lesão pré-maligna (GENTA, 1998).

As doenças gástricas inflamatórias estão freqüentemente associadas com o aumento da proliferação epitelial. Todavia, na gastrite crônica não é observado espessamento da mucosa, indicando que a hiperproliferação epitelial, aparentemente, está balanceada com a perda celular pela apoptose (VON HERBAY; RUDI, 2000). Essa hiperproliferação pode ser uma resposta aos danos celulares ou morte celular induzidos pela infecção pela *H. pylori* (MOSS et al., 1996), pois o aumento discreto da proliferação epitelial gástrica é um aspecto comum em gastrite induzida por essa bactéria.

A bactéria *Helicobacter pylori*, conhecida por colonizar o estômago humano, é o principal agente etiológico de gastrite crônica, úlcera péptica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico (AZUMA et al., 1998) e tem sido classificada como um carcinógeno gástrico da classe I pela Organização Mundial de Saúde (IARC, 1994). A infecção pela *H. pylori* prejudica a função da barreira gástrica e estimula a proliferação de células gástricas para o reparo da mucosa, mas este processo também pode induzir danos no DNA celular, predispondo à mutagênese no modelo multipasso da carcinogênese gástrica (MOSS et al., 1996).

O mecanismo pelo qual a infecção pela *H. pylori* promove a apoptose ainda não está esclarecido. Todavia, algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar tal evento. Moss et al. (1996) propuseram que seria devido a um efeito direto da bactéria e não em consequência do processo inflamatório, pela liberação de citocinas e produtos endógenos citotóxicos. No entanto, alguns produtos bacterianos, incluindo as proteínas CagA (*Cytotoxin-associated gene*) e VacA (gene que codifica *vacuolating cytotoxin*), citotoxinas que determinam a patogenicidade da bactéria, podem ser diretamente responsáveis pela indução de apoptose. Conforme a expressão dessas toxinas, as bactérias podem ser classificadas como tipo I (virulenta) ou tipo II (não virulenta), sendo que o primeiro tipo expressa citotoxinas codificadas pelos genes *VacA* e *CagA*, enquanto o segundo tipo, só expressa o gene *VacA*, indicando que o gene *CagA* possa estar relacionado à patogenicidade das bactérias (SCHEIMAN et al., 1999). Contudo, alguns estudos não relataram uma associação entre a linhagem CagA e apoptose. Por exemplo, Peek et al. (1997) e Von Herbay e Rudi (2000) verificaram que em pacientes infectados pelas linhagens CagA⁺ VacA s1a da *H. pylori*, a apoptose não estava aumentada em relação a proliferação celular.



Outros estudos têm mostrado que pacientes com lesões gástricas pré-neoplásicas e neoplásicas são mais provavelmente infectados pela linhagem CagA+, que possui uma inserção genômica denominada “ilha de patogenicidade cag”, incluindo genes envolvidos na virulência (BLASER et al., 1995; PARSONNET et al., 1997). A infecção pela linhagem de *H. pylori* CagA+ aumenta o risco de atrofia e metaplasia intestinal, possivelmente devido ao potencial inflamatório aumentado demonstrado por essa linhagem (NARDONE et al., 1999).

Outros fatores possivelmente relacionados com o aumento da apoptose em lesões gástricas são a amônia gerada durante a quebra da uréia pela urease produzida pela *H. pylori* e a redução do ascorbato, um antioxidante gástrico. Pacientes *H. pylori* positivos têm concentração reduzida de uréia e aumentada de amônia no suco gástrico (KOHDA et al., 1999). Tsuji et al. (1995) constataram que a amônia pode induzir apoptose no epitélio gástrico *in vitro* em linhagem celular de rato. Ainda devem ser considerados outros fatores como a hipergastrinemia associada à *H. pylori* e até mesmo uma resposta inflamatória induzida pela bactéria, alterando a cinética celular epitelial (VON HERBAY; RUDI, 2000). Segundo Kohda et al. (1999), em pacientes com úlcera gástrica, os produtos da bactéria *H. pylori* seriam os fatores iniciais desencadeadores de apoptose, mas posteriormente, seriam substituídos por outros mecanismos mediados pela célula.

Em 60%-80% dos casos, existe associação entre a ocorrência de gastrite e úlcera gástrica. Vários dados da literatura mostram que entre os fatores etiológicos da úlcera estão defeitos primários na resistência da mucosa ou deficiências quantitativas ou qualitativas do seu muco, além de alguns fatores ambientais, como a ingestão de aspirina não-tamponada, álcool e medicamentos antiinflamatórios não-esteróides (ANAND; GRAHAM, 1999; COTRAN et al., 1999).



Os pacientes com úlceras apresentam níveis reduzidos ou normais de ácido gástrico. Hansson et al. (1996) mostraram que, entre aqueles com redução na produção desse ácido e pangastrite, existe risco maior de câncer do que nos pacientes com úlcera duodenal, que têm níveis elevados de ácido e geralmente, também exibem gastrite, predominantemente na região antral. É importante referir que a ressecção gástrica como tratamento da úlcera não diminui esse risco (SAFATLE-RIBEIRO et al., 1998).

Uma possível explicação quanto ao mecanismo de ação da *H. pylori* em úlcera duodenal é que a infecção pela bactéria bloquearia o mecanismo fisiológico inibitório normal do antro gástrico para as células que liberam ácido e gastrina, resultando na liberação aumentada de gastrina e inibição prejudicada da secreção de ácido gástrico (KOHDA et al., 1999).

A relação entre infecção pela *H. pylori*, lesões da mucosa gástrica e a taxa de proliferação também é um problema ainda em discussão. Apesar da atividade de urease da *H. pylori* e a infiltração de leucócitos terem um efeito mitogênico, a hiperproliferação celular gástrica também ocorre independentemente da infecção por essa bactéria. Nardone et al. (1999) observaram a taxa proliferativa aumentada no epitélio gástrico em pacientes com gastrite crônica e câncer gástrico, independente da infecção pela *H. pylori*.

Em gastrite *H. pylori* positiva, com proliferação epitelial aumentada e pouca ou nenhuma morte celular necrótica, Moss et al. (1996) sugeriram que a hiperproliferação celular deveria ser acompanhada pela apoptose. Nestes casos, a infecção pela *H. pylori* estaria associada também com a apoptose epitelial aumentada, que, por sua vez, atuaria como um estímulo para uma resposta hiperproliferativa compensatória e potencialmente pré-neoplásica.



Um aumento moderado de células apoptóticas tem sido relatado em gastrite crônica *H. pylori* positiva, com variação de 3 a 16% (ATTALLAH et al., 1996; HIRASAWA et al., 1999; ISHIDA et al., 1996; MOSS et al., 1996; STEININGER et al., 1998; NARDONE et al., 1999; VON HERBAY; RUDI, 2000). Esta variação pode ser devido à contagem de diferentes células (epitélio foveolar, epitélio glandular, ou ambos) e diferentes fatores de virulência das cepas *H. pylori* (VON HERBAY; RUDI, 2000).

Em outras lesões como metaplasia, displasia e adenocarcinoma gástrico infectadas pela *H. pylori* também têm sido descrito o aumento de apoptose (KOHDA et al., 1996; MOSS et al., 1996; HIRASAWA et al., 1999).

Eventualmente, acompanhando uma gastrite ou durante o processo de cicatrização da mucosa gástrica, é observada a metaplasia intestinal, considerada como uma condição pré-cancerosa. É decorrente da transformação do epitélio de revestimento e glandular secretor em células absortivas colunares metaplásicas intercaladas por células caliciformes de morfologia intestinal. Nesse tipo de lesão também observa-se associação com *H. pylori* (GENTA, 1995) e, embora as características do intestino delgado predominem, em algumas situações as características do epitélio colônico estão presentes, originando a metaplasia do tipo incompleto, que é o mais relacionado ao câncer gástrico (JASS; FILIPE, 1997). Enquanto, o tipo completo apresenta células globosas contendo sialomucina interespaçadas entre células absortivas não secretoras (DIXON et al, 1996).

Em metaplasia intestinal, a cinética epitelial gástrica encontra-se levemente aumentada, com a zona proliferativa localizada na região basal, como no intestino, diferentemente das glândulas gástricas normais. Neste grupo de lesões, a apoptose ocorre mais freqüentemente na zona basal das glândulas do tipo incompleta do



que completa, presumivelmente devido a eliminação de células com lesões no DNA (ISHIDA et al., 1996; VON HERBAY; RUDI, 2000). Em metaplasia intestinal completa, a proteína bcl-2, inibidora da apoptose, encontra-se expressa na maioria dos casos (91%) (SAEGUSA et al., 1995), assim, provavelmente reduzindo o índice de células apoptóticas.

Nos últimos 50 anos, a incidência de câncer gástrico tem declinado, em consequência de mudanças na influência dos fatores ambientais, entretanto, continua sendo o segundo tipo de câncer mais comum e o segundo em mortalidade por câncer (NARDONE, 2003). O câncer de estômago é duas vezes mais freqüente no sexo masculino do que no feminino (AICR, 1997), principalmente entre idosos. A freqüência na população é baixa aos 40 anos e aumenta progressivamente com a idade, até atingir seu valor mais elevado por volta dos 70 anos nos homens e pouco mais tarde nas mulheres (DE VITA et al., 1997).

As estatísticas mundiais mostram distinta variação geográfica (DE VITA et al., 1997). Por exemplo, taxas elevadas são encontradas no Japão, Chile, China, Portugal e Rússia, enquanto, em outros países, essas taxas têm declinado, como na França, Reino Unido, Austrália, Canadá e Estados Unidos. No Brasil, as estimativas para 2003 apontaram para mais de 20 mil casos novos e 11 mil óbitos (INCA, 2003), sendo, na cidade de São Paulo, o tipo de neoplasia mais comum entre os homens e o terceiro entre as mulheres (AICR, 1997).

O adenocarcinoma gástrico representa 90%-95% dos casos de neoplasias malignas do estômago (COTRAN et al., 1999), sendo classificado com base em aspectos histopatológicos e clínicos em dois tipos: intestinal e difuso, que diferem na epidemiologia, patogênese, consequências clínicas e perfil genético (LAUREN, 1965). As lesões do tipo intestinal, são as mais freqüentes, bem diferenciadas, dependentes de



fatores ambientais e associadas com a presença de lesões pré-cancerosas, aparece como resultado final de um processo multipasso que se inicia a partir de uma gastrite crônica e progride para a atrofia, metaplasia intestinal e displasia. São encontradas predominantemente em homens e em indivíduos mais idosos. O tipo difuso é pouco diferenciado, tem prognóstico ruim e não está associado a lesões pré-cancerosas (SIPPONEN et al., 1985). É mais freqüente em mulheres e pacientes jovens e tem alta ocorrência familiar, principalmente entre indivíduos com tipo sangüíneo A (DE VITA et al., 1997). A bactéria *H. pylori* é raramente encontrada na mucosa de pacientes com câncer gástrico devido à modificações no microambiente gástrico, mas anticorpos contra essa bactéria são detectados em 70% dos pacientes acometidos por ambos histotipos do tumor (FORMAN et al., 1991).

A freqüência de apoptose em câncer gástrico é maior em adenocarcinoma bem diferenciado (tipo intestinal) do que naqueles pobremente diferenciados (tipo difuso) (ISHIDA et al., 1996). Consequentemente, a progressão do câncer gástrico será definida por um aumento gradual da atividade proliferativa e constante ocorrência de apoptose.

3. Métodos imuno-histoquímicos para detecção de apoptose

A apoptose é quantificada pelo índice apoptótico (IA), que expressa a porcentagem entre a proporção de células apoptóticas sobre o total de células epiteliais examinadas (POTTEN, 1996; LIPPONEN, 1999). A morte celular apoptótica pode ser identificada em cortes de tecido por colorações histológicas de rotina, como a hematoxilina-eosina (WYLLIE et al., 1980), representando as características mais tardias das células apoptóticas, com citoplasma condensado (eosinofílico), condensação da cromatina e a presença de fragmentos, os corpos apoptóticos (KERR et al., 1972;

WYLLIE et al., 1980). Ensaios baseados no reparo da fragmentação do DNA têm sido amplamente utilizados, por meio de técnicas enzimáticas para a detecção da fragmentação do DNA, como as técnicas TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP-biotin nick-end labelling) (GAVRIELI et al., 1992), ISEL (*in situ* end labelling) (WIJSMAN et al., 1993) e ISNT (*in situ* nick translation) (GOLD et al., 1994). O princípio dessas técnicas consiste no reparo da fragmentação do DNA apoptótico, utilizando enzimas de reparo, como a transferase deoxinucleotidil terminal ou a DNA polimerase. Esses testes baseiam-se na inserção ou adição de nucleotídeos marcados nas extremidades 3'-OH que se ligam em DNA de fita simples ou dupla quebrados. Posteriormente, a detecção das células apoptóticas pode ser realizada empregando-se nucleotídeos conjugados a uma variedade de moléculas, como biotina, digoxigenina, fluoresceína e radioisótopos (LORO et al., 2003).

A natureza assíncrona da apoptose nas populações celulares, assim como o período variável de sua duração *in vivo*, entre seis e 24 horas (KERR et al., 1972; GAVRIELI et al., 1992), acarreta na detecção de apenas algumas células apoptóticas em um determinado local do tecido, podendo levar à diferenças quantitativas significativamente subestimadas. Os corpos apoptóticos não são distribuídos casualmente, sendo encontrados principalmente na direção das extremidades superior e inferior das glândulas gástricas (VON HERBAY; RUDI, 2000). Com a utilização da técnica TUNEL tem-se observado que cerca de 1-3% das células epiteliais gástricas no antro ou corpo/fundo são apoptóticas (STEININGER et al., 1998; VON HERBAY; RUDI, 2000).

A hibridização *in situ* utiliza sondas marcadas com poliadenosinas (poli A). O DNA das células apoptóticas é suscetível à denaturação, permitindo a utilização de DNA genômico para essa técnica (HILTON et al., 1997). O DNA



fragmentado pode ser detectado também por imuno-histoquímica, empregando-se anticorpos monoclonais, como Mab F7-26 (FRANKFURT; KRISHAN, 2001) ou anticorpos policlonais (NARUSE et al., 1994; WATANABE et al., 1999) para detecção de quebras de DNA de fita simples. A detecção imuno-histoquímica dessas quebras baseia-se na suscetibilidade à denaturação do DNA em baixas temperaturas, detectando os estágios iniciais da apoptose (FRANKFURT; KRISHAN, 2001).

Em contraste à detecção da fragmentação do DNA, que não é específico apenas para a apoptose, outras abordagens têm se concentrado na descoberta de marcadores apoptóticos altamente específicos, com a utilização de anticorpos contra produtos clivados pelas caspases (citoqueratina 18, actina, proteína precursora amilóide, PARP, α -fodrina), componentes do citoesqueleto modificados (proteína específica da apoptose) e caspases ativadas (LORO et al, 2003).

Entre as caspases, a caspase-3, também conhecida como CPP32, YAMA, é considerada a enzima efetora central apoptótica. Ela atua no citosol e está ativada apenas nas células em apoptose. Essa enzima é responsável por muitas características morfológicas e bioquímicas da apoptose, devido a sua capacidade de clivar substratos celulares como a actina, a gelsolina, a PARP, quinases de adesão celular, entre outras (CHENGHUA et al., 1999; JEON et al., 1999; STADELMANN et al., 1999).

A medida em que são ampliados os conhecimentos sobre as bases moleculares e bioquímicas da apoptose, marcadores mais específicos para os diferentes estágios da apoptose poderão ser desenvolvidos. A baixa especificidade de alguns dos métodos atuais justificam o uso de mais de um deles para a avaliação da apoptose em secções de tecidos, combinando-se uma ou mais técnicas bioquímicas com as características morfológicas.



4. Objetivos

a) Investigar a frequência de células apoptóticas por técnicas imuno-histoquímicas (TUNEL e expressão da caspase-3 ativada), em gastrite crônica, úlcera gástrica, metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico;

b) Comparar as frequências de apoptose nas diferentes amostras utilizando a técnica de marcação de fragmentação do DNA (TUNEL) com a expressão da caspase-3 ativada;

c) Investigar a associação entre apoptose com infecção pela *H. pylori*, ocorrência de aneuploidias detectadas pela técnica de FISH e expressão aumentada da proteína p53 nas lesões benignas e câncer gástrico.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II. MATERIAL E MÉTODOS

II. Material e Métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP (Protocolo nº 06/2002) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, Processo no. 25000.117533/2002-21, Parecer no. 822/2003. Todas as amostras foram codificadas no laboratório resguardando a identificação dos indivíduos.

1. Caracterização das amostras

Foram avaliadas 97 amostras (8 mucosas gástricas normais, 34 gastrites crônicas não-atróficas, 11 gastrites atróficas crônicas, 17 úlceras gástricas, 15 metaplasias intestinais e 12 adenocarcinomas gástricos) emblocadas em parafina (Tabela 1), obtidas durante a realização do projeto de doutorado “Investigação de aneuploidias, deleção e expressão do gene *TP53* e infecção pela *Helicobacter pylori* em lesões benignas e adenocarcinoma gástrico”, desenvolvido pela aluna Ana Cristina Gobbo César, no Programa de Pós-Graduação em Genética, IBILCE – UNESP, Campus de São José do Rio Preto, SP.

As amostras foram coletadas no período de 1999 a 2002, a partir de biópsias após exame endoscópico, no Serviço de Endoscopia, sob responsabilidade do médico Alaor Caetano, ou após ressecção cirúrgica, pelo médico Prof. Dr. Aldenis Albanese Borim, chefe do Serviço de Cirurgia de Esôfago, Estômago e Duodeno, ambos do Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP. Todas as amostras foram obtidas anteriormente ao tratamento radio ou quimioterápico.

Tabela 1. Caracterização das amostras de mucosa normal, gastrite crônica (atrófica e não atrófica), úlcera gástrica, metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico.

Caso	Biópsia	Sexo/ Idade	Tabagismo (anos)	Etilismo (anos)	H. Pylori	Histologia	Local
Mucosa normal							
MGN01	99-8964	M/35	-	-	-	Normal	A
MGN02	99-5628	F/21	-	-	-	Normal	A
MGN03	01-1972	F/22	+ (6)	-	-	Normal	A
MGN04	01-851	M/38	-	-	-	Normal	A
MGN05	01-850	F/20	-	-	-	Normal	A
MGN06	02-729	F/56	-	-	-	Normal	A
MGN07	02-924	F/66	-	-	-	Normal	A
MGN08	02-1151	F/42	-	-	-	Normal	A
Gastrite crônica não-atrófica							
GC01	99-7042	F/22	-	-	-	GCS	A
GC02	99-7044	F/36	+ (16)	-	+	GCS	A
GC03	99-6990	F/37	-	-	-	GCS	A
GC04	99-5192	M/32	-	-	-	GCS	Co/A
GC05	99-6965	F/72	+ (60)	-	-	GCS	Co
GC06	00-2229	F/18	-	-	-	GCS	A
GC07	00-1860	M/10	-	-	-	GCS	A
GC08	00-734	M/02	-	-	-	GCS	A
GC09	00-5140	F/08	-	-	-	GCS	A
GC10	00-401	F/42	+ (28)	-	-	GCS	A
GC11	00-5139	F/02	-	-	-	GCS	A
GC12	00-2469	M/05	-	-	-	GCS	A
GC13	99-10545	F/55	+ (25)	-	-	GCS	A
GC14	99-10541 ^A	M/51	+ (26)	+ (10)	-	GCS	A
GC15	00-450	F/56	+ (24)	-	-	GCS	A
GC16	99-7079	F/50	-	-	-	GCS	A
GC17	00-1845	M/89	+ (34)	+ (10)	+	GCS	A
GC18	00-151	M/43	+ (25)	+ (25)	-	GCM	A
GC19	00-4640	F/53	-	-	-	GCM	A
GC20	00-103	M/33	+ (15)	+ (15)	-	GCM	F/Co/A
GC21	00-5314	M/67	-	+ (50)	-	GCM	A
GC22	00-3733	M/60	+ (48)	+ (36)	+	GCM	A
GC23	99-10743	F/48	-	-	+	GCM	A
GC24	99-7046	F/27	+ (13)	-	+	GCM	A
GC25	00-2442	F/20	-	-	+	GCM	A
GC26	00-8750	F/47	+ (29)	-	+	GCM	A
GC27	00-5187	F/57	-	-	+	GCM	A
GC28	00-2160	F/34	+ (8)	-	+	GCM	A
GC29	00-2153	F/54	+ (22)	-	-	GCM	A
GC30	00-2444	M/75	+ (50)	-	-	GCM	A
GC31	00-3730	M/54	+ (34)	+ (34)	+	GCM	A
GC32	99-8867	F/53	+ (5)	-	+	GCM	A
GC33	00-732	F/29	-	-	+	GCM	A
GC34	00-13549	M/72	+ (60)	+ (34)	-	GCM	A
Gastrite atrófica crônica							
GAC01	00-3411	M/77	+ (53)	-	-	GAC	A
GAC02	99-6989	F/84	-	-	+	GAC	A
GAC03	99-6023	M/63	+ (59)	+ (15)	+	GAC	A
GAC04	00-13554	M/57	-	+ (30)	+	GAC	A
GAC05	00-9038	M/52	+ (33)	+ (37)	+	GAC	A
GAC06	00-13309	M/65	+ (53)	+ (43)	+	GAC	Co
GAC07	01-13152	M/80	+ (60)	-	-	GAC	A

GAC08	02-932	F/45	-	-	-	GAC	A
GAC09	02-181	F/26	-	-	+	GAC	*
GAC10	02-583	F/41	+(21)	-	+	GAC	A
GAC11	01-1650	F/25	+(5)	-	+	GAC	Co/F
Úlcera gástrica							
UG01	00-1812	M/73	+(53)	+(26)	-		A
UG02	00-1853	M/52	+(37)	+(34)	-		A
UG03	99-5736	M/78	+(25)	+(25)	-		A
UG04	99-4692	M/64	+(54)	+(14)	-		A
UG05	00-109	F/51	*	*	+		A
UG06	00-2443	M/63	+(52)	+(48)	+		A
UG07	00-3128	M/71	+(55)	+(20)	+		A
UG08	00-5183	F/72	-	-	+		A
UG09	99-7288	M/28	+(15)	+(10)	+		A
UG10	99-7751	M/68	+(52)	+(52)	+		A
UG11	99-7289	F/83	-	-	+		A
UG12	00-2225	M/48	+(27)	+(19)	+		A
UG13	99-7071	F/82	-	-	+		A
UG14	00-349	F/45	-	-	+		A
UG15	99-10148	M/71	+(54)	+(46)	+		A
UG16	99-7040	M/43	+(27)	+(19)	+		A
UG17	00-348	M/39	-	+(20)	*		A
Metaplasia intestinal							
MI01	00-9320	M/74	+(54)	+(54)	-	MIC	A
MI02	00-107	F/70	-	-	+	MIC	A
MI03	01-2315	F/91	+(65)	-	+	MIC	A
MI04	00-13552	F/73	+(61)	+(11)	-	MII	A
MI05	99-6988	F/46	+(33)	-	+	MII	A
MI06	99-10543	M/73	-	-	+	MII	A
MI07	00-14102	F/80	-	-	+	MII	A
MI08	99-7043	M/22	-	-	+	MII	A
MI09	00-2441	M/75	+(50)	-	+	MIIf	F
MI10	00-3540	F/68	-	-	+	MICI	A
MI11	00-9036	F/61	+(32)	+(31)	+	MICI	A
MI12	99-7011	M/79	-	-	-	MIC	A
MI13	00-3493	F/67	-	-	+	MIC	A
MI14	01-4558	F/66	+(55)	-	-	MIC	A
MI15	99-5450	M/76	+(50)	+(40)	-	MIC	A
Adenocarcinoma gástrico							
CG01	99-10974B	M/63	+(40)	+(30)	-	Intestinal	A/Co
CG02	00-5703	M/62	+(5)	+(20)	-	Intestinal	F/Co
CG03	99-7259	M/66	+(30)	+(30)	-	Intestinal	A
CG04	00-2458	M/51	+(21)	+(36)	-	Intestinal	A
CG05	00-9155	M/77	+(62)	+(62)	+	Intestinal	A/Co
CG06	00-3510	F/38	-	-	+	Intestinal	A
GC07	99-2820A	M/58	+(32)	-	+	Intestinal	A
GC08	00-1872	M/63	+(55)	+(38)	-	Intestinal	A/Co
CG09	01-199	M/71	+(40)	+(40)	+	Difuso	Ca/Co
CG10	01-895	M/72	+(45)	+(45)	+	Difuso	A/Co
CG11	01-4893	M/93	+(30)	+(10)	+	Difuso	F/Co
GC12	00-1926	M/71	+(60)	-	-	Difuso	Ca

+: sim; -: não; * : dado não disponível; M: masculino; F: feminino; GCS: gastrite crônica superficial; GCM: gastrite crônica moderada; GAC: gastrite atrófica crônica; MIC: metaplasia intestinal completa; MII: metaplasia intestinal incompleta; MIIf: metaplasia intestinal incompleta focal; MICI: metaplasia intestinal completa e incompleta; A: antro; Ca: cárdia; Co: corpo; F: fundo.

O diagnóstico histopatológico das lesões gástricas e adenocarcinomas foi estabelecido em teste-cego, por dois patologistas do Serviço de Patologia do Hospital de Base, sob chefia da Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury, do mesmo hospital, que observaram as lâminas coradas por hematoxilina e eosina. Os tumores foram classificados em intestinal e difuso segundo Lauren (LAUREN, 1965). A classificação das gastrites e metaplasias foi realizada de acordo com o Sistema de Sydney (DIXON et al., 1996). As amostras foram cuidadosamente avaliadas quanto à presença de atrofia e metaplasia intestinal. A infecção pela *H. pylori*, de todas as amostras, foi inicialmente rastreada pela avaliação histológica (coloração de Giemsa) e confirmada molecularmente, por PCR, utilizando-se os primers H3H4 e H5H6. Esse experimento, assim como a investigação das frequências de aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 pela técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) e a expressão da proteína p53, por método imuno-histoquímico, foram realizados por César (2003).

Como controle, foram analisadas oito biópsias de mucosa gástrica histologicamente normal e *H. pylori* negativas (MN), coletadas do antro, de seis indivíduos do sexo feminino e dois do sexo masculino, com idades entre 20 e 66 anos ($\bar{x} \pm s = 37,5 \pm 16,9$). As amostras de gastrite (34 gastrites crônicas não-atrófica - GNA e 11 gastrites atróficas crônicas - GAC), foram provenientes principalmente da região do antro (90,9%) de 26 indivíduos do sexo feminino e 19 do sexo masculino, com idades entre dois e 89 anos ($\bar{x} \pm s = 44,5 \pm 22,5$). Nesse grupo, mais da metade dos indivíduos eram tabagistas (55,5%) e 12 deles eram etilistas (26,7%). A infecção pela *H. pylori* estava presente em 44,0% dos casos.

As biópsias de úlcera gástrica (UG) foram todas coletadas da região do antro de cinco indivíduos do sexo feminino e 12 do sexo masculino, com idades entre 28 e 83 anos ($\bar{x} \pm s = 60,6 \pm 16,3$). A maioria deles eram tabagistas (64,7%) e etilistas (70,6%) e a infecção pela *H. pylori* foi positiva em 70,6% dos casos. No grupo de metaplasia intestinal (MI) foram avaliadas 15 amostras obtidas, na maioria dos casos, da região do antro (93,3%) de nove indivíduos do sexo feminino e seis do sexo masculino, com idades entre 22 e 91 anos ($\bar{x} \pm s = 68,1 \pm 16,1$). Oito deles eram tabagistas (53,3%) e quatro etilistas (26,7%), sendo que neste grupo 66,7% dos casos eram *H. pylori* positivos. Dos 12 casos de adenocarcinomas gástricos (CG) avaliados, provenientes principalmente das regiões do antro (33,3%) e do antro/corpo (33,3%), apenas um indivíduo era do sexo feminino e 11 do sexo masculino, com idades entre 38 e 93 anos ($\bar{x} \pm s = 65,4 \pm 13,6$), sendo em sua maioria tabagistas (91,7%) e etilistas (75,0%). A infecção pela bactéria foi diagnosticada em metade das amostras (50,0%).

2. Avaliação imuno-histoquímica

De todas as amostras procedeu-se os cortes histológicos de 4 μm e montagem em lâminas silanizadas que foram levadas à estufa a 50° C por 48 horas e, posteriormente foram mantidas em temperatura ambiente até o momento da reação.

2.1. Detecção de apoptose pela técnica TUNEL

Para a detecção das células apoptóticas pela técnica TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP-biotin nick end



labelling), descrita primeiramente por Gavrieli et al. (1992) foi utilizado o Kit FragEl (Oncogene), conforme instruções do fabricante.

Após desparafinização em xilol e re-hidratação dos cortes histológicos em álcoois graduados (etanol absoluto, 85% e 50%), realizou-se a digestão enzimática com proteinase k a 1,0% diluída em tampão tris-HCl pH 8,0 por 20 minutos. Posteriormente, seguiu-se a lavagem do material em tampão TBS pH 7,6 e bloqueio das peroxidases endógenas com uma solução contendo peróxido de hidrogênio 30% (H_2O_2) e metanol, por 5 minutos. Em seguida, o material foi submetido ao tratamento de pré-hibridização e incubado com deoxinucleotidil transferase terminal e digoxigenina-11-dUTP e dATP, por uma hora a 37° C em câmara úmida. Após essa etapa, o material foi lavado com tampão TBS pH 7,6 e incubado com uma solução de bloqueio, para interrupção da hibridização. Logo após, foi aplicado um complexo de avidina-estreptoavidina que permite a detecção dos núcleos apoptóticos (TUNEL positivos), após a revelação do material com diaminobenzidina (DAB – Akros), seguida pela contracoloração, com hematoxilina de Harris. Como controle positivo da técnica TUNEL foi utilizado material de biópsia de tumor de mama. O controle negativo da reação foi gerado pela omissão da enzima na reação de marcação, incubando-se apenas com o tampão de hibridização.

Após a montagem da lâmina com Entelan (Merck), os núcleos apoptóticos foram visualizados pela microscopia de luz, corados em marrom.

2.2. Detecção de apoptose pela expressão da caspase-3 ativada

A detecção das células apoptóticas pela expressão da caspase-3 ativada foi realizada empregando-se o anticorpo CPP32 monoclonal (Novocastra), diluição 1:150, conforme instruções do fabricante. Este anticorpo possui um padrão de marcação citoplasmático.

Após a desparafinização em xilol e re-hidratação dos cortes histológicos em álcoois graduados (etanol absoluto, 85% e 50%), realizou-se a recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 em panela à vapor a 96° C, durante 20 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada e em seguida, procedeu-se a inativação de peroxidases endógenas com metanol 3% e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante 30 minutos. Novamente, seguiu-se outra lavagem em água destilada e procedeu-se a incubação das lâminas com o anticorpo primário CPP32 diluído em soroalbumina bovina a 2% (diluição 1:150) em câmara úmida a 37° C, durante 16-18 horas. Em seguida, as lâminas foram lavadas em tampão PBS e após, procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário (Kit ABC – Novocastra) por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o complexo avidina-estreptoavidina durante 30 minutos em câmara úmida. A revelação do material foi realizada com uma solução de diaminobenzidina (DAB), responsável pela coloração marrom do citoplasma das células marcadas. Após, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O controle positivo da reação imuno-histoquímica foi realizado utilizando-se material proveniente de biópsia de mucosa intestinal. O controle negativo da

reação foi obtido omitindo-se o anticorpo primário CPP32, incubando-se o material apenas com a soroalbumina bovina a 2%.

Após a montagem da lâmina com Entelan (Merck), o citoplasma das células apoptóticas foi visualizado pela microscopia de luz, corado em marrom.

2.3. Análise microscópica

A análise do material foi realizada em microscópio de luz, com aumento de 400X, em que foram contadas cerca de 500 células de cada caso por experimento (TUNEL e caspase-3) nos epitélios glandular e foveolar, excluindo-se a região do infiltrado. O índice apoptótico (IA) foi calculado para cada caso, como a porcentagem de células apoptóticas do total de células analisadas. Para o método TUNEL, foi considerado como positivo aqueles casos com IA acima de 3,0%, utilizando-se como estimativa o IA médio observado nas amostras de mucosa gástrica normal.

A classificação da imunorreatividade da caspase-3 ativada em cada caso foi baseada no método de contagem previamente validado por Koomagi *et al.* (2000), com algumas modificações. As amostras foram graduadas como negativas (<10% das células imunocoradas), fracamente marcadas (>10-25% das células imunocoradas), moderadamente marcadas (25-50% das células imunocoradas) ou fortemente marcadas (>50% das células imunocoradas). Os casos fracamente a fortemente imunocorados foram classificados com positivos.

A documentação fotográfica foi realizada por análise de imagem, utilizando-se o programa Image Pro-Plus.



3. Análise Estatística

A metodologia estatística utilizada compreendeu cálculos de estatísticas descritivas, análise de variância (ANOVA) e o Teste Exato de Fisher, utilizado para avaliação de associação entre duas variáveis. Para verificar a existência do efeito de grupo dentro de cada técnica (TUNEL e caspase-3 ativada) procedeu-se a transformação $\arcsen(p)^{1/2}$, o que tornou os dados homocedásticos (ZAR, 1999). O teste de χ^2 foi utilizado para comparar as frequências de casos positivos para as técnicas TUNEL e caspase-3 ativada entre os grupos. As comparações das frequências médias de apoptose detectadas pela caspase-3 ativada entre o grupo MN com os demais grupos foi realizada empregando-se o teste *t-Student*. Por fim, para verificar a existência de correlação dos índices apoptóticos detectados por ambas as técnicas em cada grupo, realizou-se o teste de correlação.

O nível crítico de rejeição foi fixado em 5,0% em todos os testes. Os *softwares* estatísticos utilizados foram MINITAB V.11.0, StatDisk V.5.0 e GraphPad InStat V. 3.0.

III. RESULTADOS

III. Resultados

1. Imuno-histoquímica para a apoptose

Os dados relativos à investigação das células apoptóticas pelas técnicas imuno-histoquímicas TUNEL e expressão da caspase-3 ativada (CPP32) nas amostras de mucosa gástrica histologicamente normal *H. pylori* negativa (MN), gastrite crônica não-atrófica (GNA) e atrófica (GAC), úlcera gástrica (UG), metaplasia intestinal (MI) e adenocarcinoma gástrico (CG) estão apresentados nas Tabelas 2, 3, 4, e 5, respectivamente, sendo caracterizadas quanto ao tipo histológico, localização, infecção pela *H. pylori*, ocorrência de aneuploidias e expressão da proteína p53. As biópsias de mucosa normal e lesões gástricas benignas foram provenientes, na maioria dos casos, da região do antro, enquanto os adenocarcinomas tanto do antro como do antro-corpo, sendo a maioria deles em estágio avançado (estádios III e IV).

Os estudos quanto à infecção pela *H. pylori*, aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 pela técnica FISH e expressão da proteína p53 foram realizados anteriormente por César (2003), sendo esses dados ora utilizados apenas para comparações com as frequências de apoptose observadas por ambas as técnicas empregadas.

O diagnóstico da *H. pylori* foi considerado positivo nos casos com resultado molecular positivo para, pelo menos, um dos primers (H3H4 ou H5H6).

No grupo de mucosa normal, os casos foram considerados sem aneuploidias, pois a maioria dos núcleos (~97,8%) apresentou dissomia para os cromossomos avaliados. Nas lesões benignas foram observadas frequências

crescentes de núcleos com um e/ou três sinais de alguns desses cromossomos, evidenciando monossomias e trissomias, enquanto nos adenocarcinomas, as frequências de núcleos com três e quatro sinais (trissomias/tetrassomias) dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 foram significativamente mais elevadas quando comparadas com a mucosa normal e lesões benignas ($p=0,0000$), (CÉSAR, 2003).

Na avaliação da expressão da proteína p53 por técnica imuno-histoquímica, considerou-se como positivos, ou seja, com expressão aumentada da proteína os casos com mais de 10,0% dos núcleos imunocorados (CÉSAR, 2003).

Mucosa Normal

A amostra de mucosa histologicamente normal de estômago *H. pylori* negativa (Tabela 2) foi constituída por oito casos, utilizados como controle para estabelecer as frequências basais de apoptose, aneuploidias e expressão da proteína p53. A frequência de células apoptóticas detectadas pela técnica TUNEL com núcleos imunomarcados em marrom (Figura 2A) teve variação de 0 a 3,6% ($\bar{x} \pm EP = 1,82 \pm 0,47$). Utilizando-se o anticorpo para a caspase-3 ativada, com padrão de marcação citoplasmática (Figura 3A), a variação da frequência de células apoptóticas foi de 0 a 11,0% ($\bar{x} \pm EP = 3,20 \pm 1,31$). Considerando-se a média dos índices apoptóticos e o IA máximo observado em ambas as técnicas, foram considerados como positivos os casos com mais de 3,6% das células imunomarcadas pela técnica TUNEL e acima de 10,0% das células imunomarcadas, para a caspase-3 ativada. Neste grupo, as células apoptóticas, detectadas por ambas as técnicas estavam presentes nos epitélios foveolar e

glandular, sendo mais freqüente neste último. A presença de marcação também foi observada nas células do infiltrado.

Tabela 2. Distribuição das frequências de células apoptóticas detectadas pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada e expressão da proteína p53 na amostra de mucosa gástrica normal *H. pylori* negativa.

Caso	Biópsia	Localização	Apoptose		Imuno p53 %
			TUNEL %	Caspase-3 %	
MGN01	99-8964	Antro	0,0	2,0	-
MGN02	99-5628	Antro	0,0	5,0	*
MGN03	01-1972	Antro	1,2	11,0	*
MGN04	01-851	Antro	3,6	0,2	-
MGN05	01-850	Antro	2,8	0,0	-
MGN06	02-729	Antro	2,0	4,0	-
MGN07	02-924	Antro	2,0	0,0	-
MGN08	02-1151	Antro	3,0	3,4	-
$\bar{X} \pm EP$			1,82±0,47	3,20±1,31	

*: dado não disponível; -: ausente; EP: erro padrão.

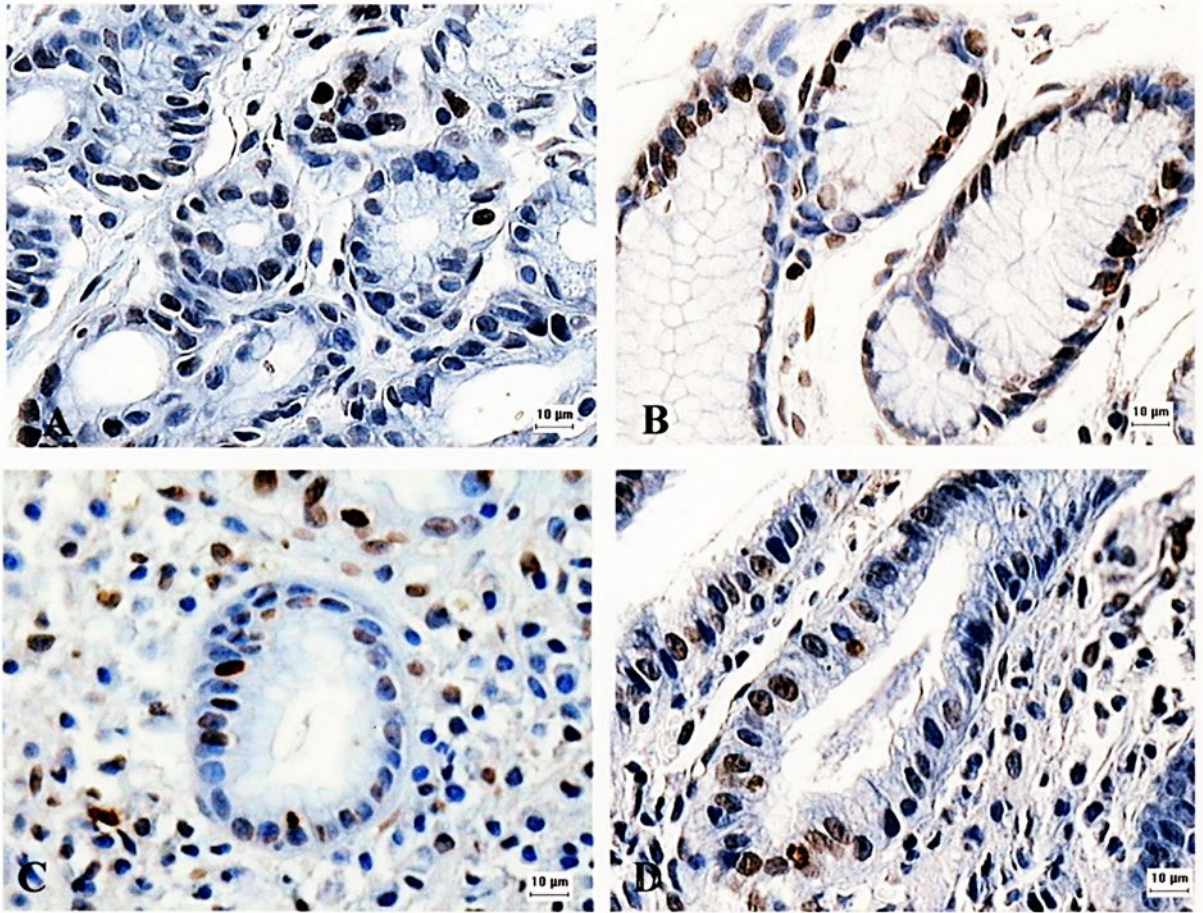


Figura 2. Células apoptóticas imunomarcadas pela técnica TUNEL (núcleos corados em marrom) em (A) mucosa gástrica normal; (B) gastrite crônica superficial; (C) gastrite crônica moderada e (D) gastrite atrófica crônica. Aumento original de 400x.

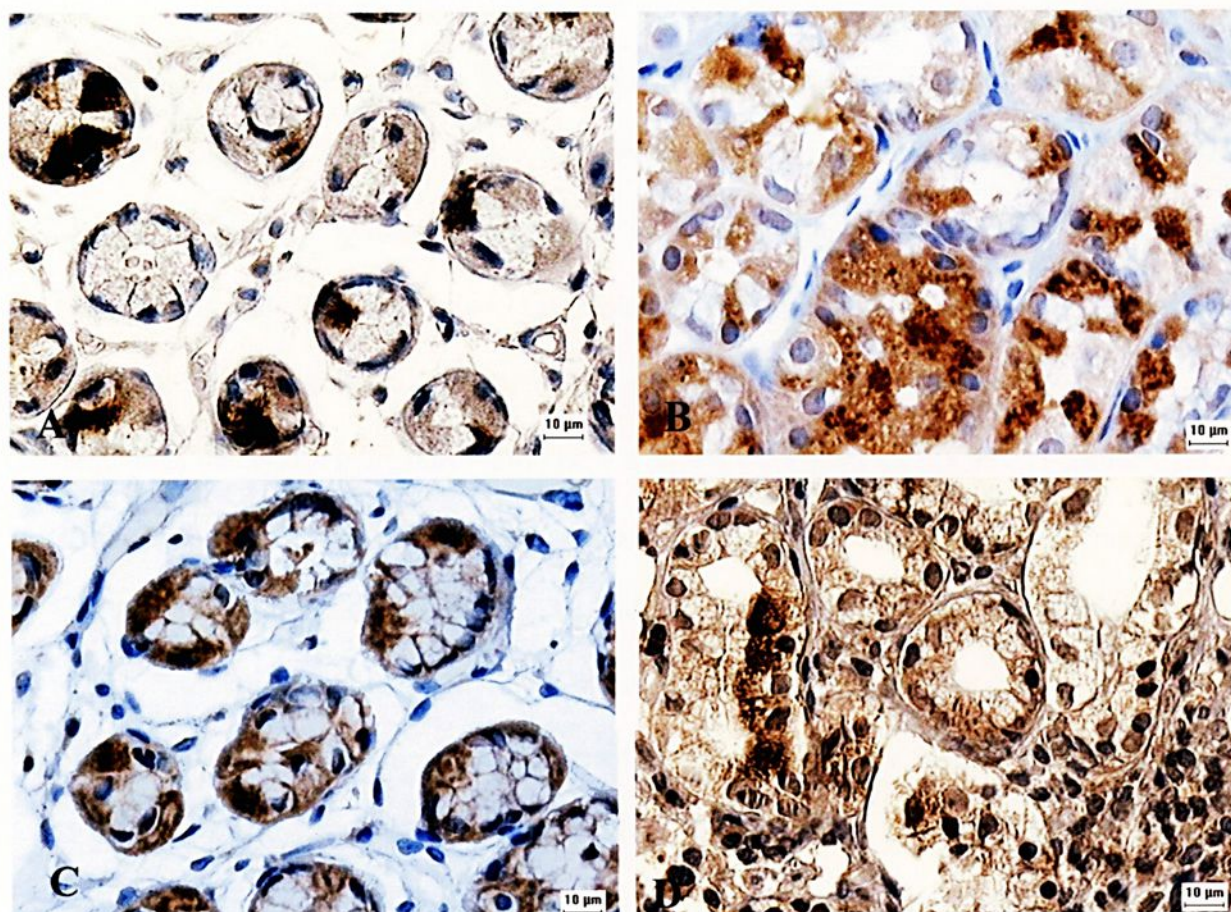


Figura 3. Células apoptóticas imunomarcadas com o anticorpo para a caspase-3 ativada (citoplasma corado em marrom) em (A) mucosa gástrica normal; (B) gastrite crônica superficial; (C) gastrite crônica moderada e (D) gastrite atrófica crônica. Aumento original de 400x.

Gastrite Crônica

Dos 34 casos de gastrite crônica não-atrófica (Tabela 3), nove (26,5%) apresentaram células TUNEL positivas (Figura 2B-C), com marcação nuclear superior a 3,6%. O índice apoptótico, neste grupo variou de 0 a 7,4% ($\bar{x} \pm EP = 2,60 \pm 0,32$). Quanto à frequência de células apoptóticas detectadas pela caspase-3 ativada, 15 casos (44,1%) apresentaram imunopositividade para esse anticorpo, com marcação citoplasmática superior a 10,0% (Figura 3B-C). A frequência de células marcadas variou de 0 a 52,0% ($\bar{x} \pm EP = 13,82 \pm 2,58$). O padrão de marcação foi quase que exclusivamente citoplasmático, com exceção do caso GC14 que apresentou alguns núcleos marcados. Neste grupo, as células apoptóticas apresentaram-se distribuídas com maior frequência no epitélio glandular.

No grupo de gastrite atrófica crônica, mais da metade dos casos (54,5%) foram considerados TUNEL positivos (Figura 2D) com índice apoptótico entre 0 e 7,0% ($\bar{x} \pm EP = 3,93 \pm 0,63$). Apenas três casos (27,3%) apresentaram imunopositividade para a caspase-3 (Figura 3D), com variação de células imunomarcadas entre 0 e 13,4% ($\bar{x} \pm EP = 6,20 \pm 1,57$). As células apoptóticas detectadas por ambas as técnicas foram observadas nos epitélios foveolar e glandular, sendo mais freqüente neste último.

Tabela 3. Distribuição das freqüências de células apoptóticas detectadas pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada, infecção pela *H. pylori*, ocorrência de aneuploidias e expressão da proteína p53 nas amostras de gastrite crônica não-atrófica e atrófica.

Caso	Biópsia	Histologia	Local	Apoptose		H. pylori	Aneuploidias	Imuno p53 %
				TUNEL %	Caspase-3 %			
Gastrite crônica não-atrófica								
GC01	99-7042	GCS	A	4,4	51,0	-	-	-
GC02	99-7044	GCS	A	6,2	49,4	+	+	-
GC03	99-6990	GCS	A	4,0	18,0	-	-	-
GC04	99-5192	GCS	Co/A	4,8	12,4	-	+	-
GC05	99-6965	GCS	Co	1,6	25,0	-	-	-
GC06	00-2229	GCS	A	4,8	52,0	-	-	-
GC07	00-1860	GCS	A	3,0	12,2	-	-	-
GC08	00-734	GCS	A	1,8	23,2	-	-	+
GC09	00-5140	GCS	A	1,6	23,0	-	-	-
GC10	00-401	GCS	A	1,2	0,4	-	-	-
GC11	00-5139	GCS	A	0,2	34,8	-	-	-
GC12	00-2469	GCS	A	0,0	1,0	-	-	-
GC13	99-10545	GCS	A	0,6	17,6	-	-	-
GC14	99-10541 ^A	GCS	A	2,4	17,2	-	-	-
GC15	00-450	GCS	A	1,6	19,0	-	-	+
GC16	99-7079	GCS	A	2,6	7,6	-	-	*
GC17	00-1845	GCS	A	2,4	4,6	+	-	+
GC18	00-151	GCM	A	1,6	2,4	-	-	*
GC19	00-4640	GCM	A	2,2	9,2	-	-	*
GC20	00-103	GCM	F/Co/A	2,4	9,8	-	-	*
GC21	00-5314	GCM	A	3,2	12,6	-	-	*
GC22	00-3733	GCM	A	0,8	0,0	+	-	*
GC23	99-10743	GCM	A	1,0	2,0	+	-	*
GC24	99-7046	GCM	A	5,2	5,2	+	-	*
GC25	00-2442	GCM	A	2,6	1,8	+	-	*
GC26	00-8750	GCM	A	2,0	6,0	+	+	-
GC27	00-5187	GCM	A	0,4	7,6	+	-	+
GC28	00-2160	GCM	A	7,4	2,4	+	+	*
GC29	00-2153	GCM	A	3,4	0,0	-	-	+
GC30	00-2444	GCM	A	1,0	3,2	-	-	*
GC31	00-3730	GCM	A	1,2	34,0	+	+	*
GC32	99-8867	GCM	A	5,0	0,0	+	-	*
GC33	00-732	GCM	A	5,4	1,2	+	-	*

GC34	00-13549	GCM	A	0,6	4,0	-	-	*
$\bar{X} \pm EP$				2,60±0,32	13,82±2,58			
Gastrite atrófica crônica								
GAC01	00-3411	GAC	A	5,2	13,4	-	+	-
GAC02	99-6989	GAC	A	4,4	5,4	+	+	-
GAC03	99-6023	GAC	A	7,0	13,4	+	-	*
GAC04	00-13554	GAC	A	6,2	0,0	+	+	*
GAC05	00-9038	GAC	A	3,0	0,0	+	-	-
GAC06	00-13309	GAC	Co	0,0	5,0	+	+	-
GAC07	01-13152	GAC	A	5,6	8,6	-	-	-
GAC08	02-932	GAC	A	3,0	4,0	-	-	-
GAC09	02-181	GAC	*	4,6	1,2	+	-	+
GAC10	02-583	GAC	A	1,8	4,0	+	-	*
GAC11	01-1650	GAC	Co/F	2,4	13,2	+	-	-
$\bar{X} \pm EP$				3,93±0,63	6,20±1,57			

+: presente; -: ausente; *: dado não disponível; EP: erro padrão; A: antro; Ca: cárdia; Co: corpo; F: fundo; GCS: gastrite crônica superficial; GCM: gastrite crônica moderada; GAC: gastrite atrófica crônica.

Úlcera gástrica

Em úlcera gástrica (Tabela 4), apenas 2/17 (11,8%) casos foram classificados como TUNEL positivos (Figura 4A), com índice apoptótico variando de 0 a 7,0% ($\bar{x} \pm EP = 2,03 \pm 0,39$). A imunomarcção positiva para o anticorpo CPP32 (Figura 5A) foi observada em quatro casos (23,5%), e a variação de células imunomarcadas foi de 0 a 34,8% ($\bar{x} \pm EP = 9,47 \pm 2,92$). Além da marcação citoplasmática, a marcação nuclear foi observada em 6 casos (35,3%). Neste grupo, o epitélio foveolar apresentou-se mais imunomarcado que o glandular.

Metaplasia intestinal

Das 15 amostras de metaplasia intestinal (Tabela 4), duas (13,3%) foram classificadas como TUNEL positivas (Figura 4B-C), com índice apoptótico entre 0 a 5,2% ($\bar{x} \pm EP = 2,36 \pm 0,41$). Enquanto apenas um caso (6,7%) apresentou imunopositividade para a caspase-3 ativada (Figura 5B-C). A frequência de células marcadas variou de 0,8 a 24,4% ($\bar{x} \pm EP = 6,72 \pm 1,47$). O padrão de marcação citoplasmático foi observado em quase todas as amostras, exceto no caso MI09, que apresentou alguns núcleos marcados. As células apoptóticas foram observadas com maior frequência no epitélio glandular.



Tabela 4. Distribuição das freqüências de células apoptóticas detectadas pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada, infecção pela *H. pylori*, ocorrência de aneuploidias e expressão da proteína p53 nas amostras de úlcera gástrica e metaplasia intestinal.

Caso	Biópsia	Histologia	Local	Apoptose		H. pylori	Aneuploidias	Imuno p53 %
				TUNEL %	Caspase-3 %			
Úlcera gástrica								
UG01	00-1812	MIC/MII	A	0,2	0,0	-	+	-
UG02	00-1853		A	2,0	2,8	-	+	+
UG03	99-5736		A	7,0	1,0	-	+	-
UG04	99-4692		A	0,0	0,0	-	+	-
UG05	00-109		A	2,0	2,0	+	+	-
UG06	00-2443		A	1,4	34,8	+	+	-
UG07	00-3128		A	1,4	13,6	+	-	-
UG08	00-5183		A	1,6	10,0	+	-	+
UG09	99-7288		A	2,2	1,6	+	+	-
UG10	99-7751		A	0,8	32,4	+	-	-
UG11	99-7289	A	3,2	2,4	+	+	-	
UG12	00-2225	A	2,0	3,4	+	-	-	
UG13	99-7071	A	2,0	2,8	+	+	-	
UG14	00-349	A	0,8	8,4	+	-	-	
UG15	99-10148	MIC	A	2,4	5,0	+	-	-
UG16	99-7040	A	1,8	7,6	+	+	*	
UG17	00-348	A	3,8	33,2	+	-	*	
$\bar{x} \pm EP$				2,03±0,39	9,47±2,92			
Metaplasia intestinal								
MI01	00-9320	MIC	A	3,2	7,4	-	+	+
MI02	00-107	MIC	A	1,2	1,2	+	+	-
MI03	01-2315	MIC	A	1,4	9,4	+	+	-
MI04	00-13552	MII	A	3,6	9,2	-	+	-
MI05	99-6988	MII	A	0,0	7,6	+	+	-
MI06	99-10543	MII	A	4,2	4,0	+	+	-
MI07	00-14102	MII	A	5,2	6,8	+	+	+
MI08	99-7043	MII	A	3,4	24,4	+	-	-
MI09	00-2441	MIIf	F	0,0	2,8	+	+	-
MI10	00-3540	MICI	A	2,4	5,4	+	+	-
MI11	00-9036	MICI	A	2,4	6,8	+	-	-

MI12	99-7011	MIC	A	1,4	0,8	-	-	*
MI13	00-3493	MIC	A	0,4	8,8	+	-	*
MI14	01-4558	MIC	A	3,2	4,4	-	-	*
MI15	99-5450	MIC	A	3,4	1,8	-	-	*
$\bar{X} \pm EP$				2,36 $\pm$ 0,41	6,72 $\pm$ 1,47			

+: presente; -: ausente; *: dado não disponível; A: antro; Ca: cárdia; F: fundo; MIC: metaplasia intestinal completa; MII: metaplasia intestinal incompleta; MIIIf: metaplasia intestinal incompleta focal; MICI: metaplasia intestinal completa e incompleta.

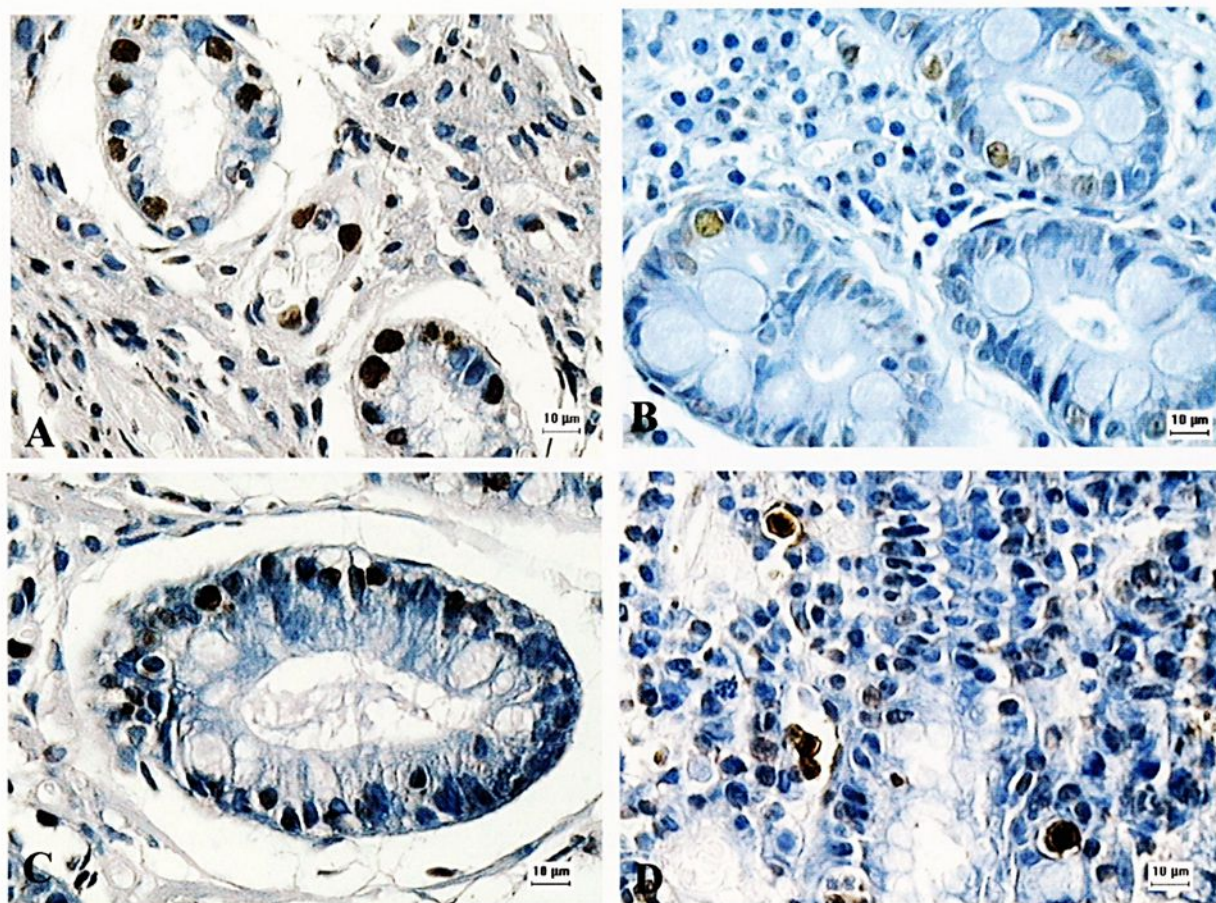


Figura 4. Células apoptóticas imunomarcadas pela técnica TUNEL (núcleos corados em marrom) em (A) úlcera gástrica; (B) metaplasia intestinal do tipo completa; (C) metaplasia intestinal do tipo incompleta e (D) adenocarcinoma gástrico. Aumento original de 400x.

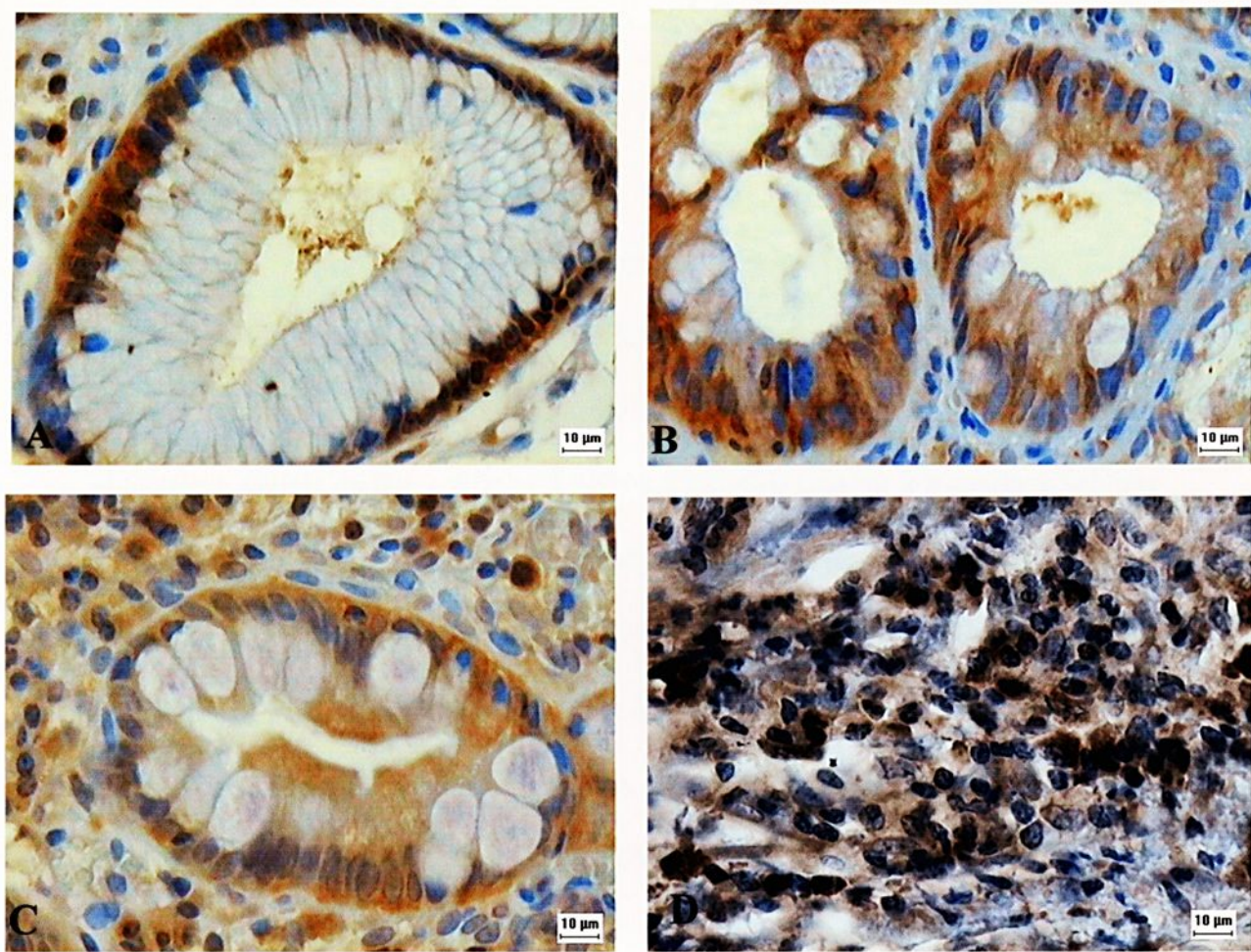


Figura 5. Células apoptóticas imunomarcadas com o anticorpo para a caspase-3 ativada (citoplasma corado em marrom) em (A) úlcera gástrica; (B) metaplasia intestinal do tipo completa; (C) metaplasia intestinal do tipo completa e incompleta e (D) adenocarcinoma gástrico. Aumento original de 400x.

Adenocarcinoma gástrico

No grupo de adenocarcinoma gástrico (Tabela 5), apenas um caso (8,3%) foram classificados como TUNEL positivos, com a ocorrência de células imunomarcadas no infiltrado (Figura 4D). Neste grupo, a frequência de células apoptóticas variou de 0,4 a 6,0% ($\bar{x} \pm EP = 1,97 \pm 0,42$). Quanto à imunopositividade para a caspase-3 ativada (Figura 5D), quatro casos (33,3%) apresentaram imunomarcção citoplasmática superior a 10,0%, e as células marcadas variou de 0 a 30,8% ($\bar{x} \pm EP = 8,07 \pm 2,75$). Os índices apoptóticos médios considerando-se os subtipos histológicos, intestinal e difuso, não diferiram significativamente, tanto quando foi utilizada a técnica TUNEL ($p=0,2810$) como com a caspase-3 ativada ($p=0,3134$).

A análise de variância para comparação das médias dos índices apoptóticos entre todas as amostras (Tabela 6) não evidenciou diferenças significantes tanto pela técnica TUNEL ($F=1,60$; $p=0,1670$) como com o anticorpo CPP32 ($F=1,70$; $p=0,1420$). Da mesma forma, a comparação pelo teste t-Student das médias dos índices apoptóticos encontrados por ambas as técnicas nas amostras de mucosa gástrica normal (MN) em comparação com as demais amostras também não mostrou diferenças significantes, com exceção da mucosa gástrica normal com gastrite atrófica crônica, quando foi empregada a técnica TUNEL ($p=0,0231$) e com gastrite crônica não-atrófica, com a utilização da caspase-3 ativada ($p=0,0311$).

Tabela 5. Distribuição das frequências de células apoptóticas detectadas pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada, infecção pela *H. pylori*, ocorrência de aneuploidias e expressão da proteína p53 na amostra de adenocarcinoma gástrico.

Caso	Biópsia	Histologia	Local	Apoptose		<i>H. pylori</i>	Aneuploidias	Imuno p53 %
				TUNEL %	Caspase-3 %			
CG01	99-10974B	Intestinal	A/Co	1,6	20,0	-	+	*
CG02	00-5703	Intestinal	F/Co	3,2	0,0	-	+	+
CG03	99-7259	Intestinal	A	1,6	12,4	-	+	-
CG04	00-2458	Intestinal	A	1,8	0,8	-	+	+
CG05	00-9155	Intestinal	A/Co	0,4	0,0	+	+	+
CG06	00-3510	Intestinal	A	1,0	8,0	+	+	-
CG07	99-2820 ^A	Intestinal	A	1,2	4,0	+	+	*
CG08	00-1872	Intestinal	A/Co	1,0	2,2	-	-	+
CG09	01-199	Difuso	Ca/Co	1,6	4,4	+	-	+
CG10	01-895	Difuso	A/Co	2,4	12,8	+	-	+
CG11	01-4893	Difuso	F/Co	1,6	0,4	+	-	+
CG12	00-1926	Difuso	*	6,0	30,8	-	-	+
$\bar{X} \pm EP$				1,97±0,42	8,07±2,75			

+: presente; -: ausente; *: dado não disponível; A: antro; Ca:cárdia; Co: corpo; F: fundo.

Tabela 6. Estatística descritiva e análise de variância para comparação das médias dos índices apoptóticos entre as amostras de mucosa normal, gastrite crônica não-atrófica, gastrite atrófica crônica, úlcera gástrica, metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico.

Técnica	Grupos	N	Índice apoptótico (IA)			
			$\bar{x} \pm EP$	Mínimo	Mediana	Máximo
TUNEL	MN	08	1,82±0,47	0,0	2,0	3,6
	GNA	34	2,60±0,32	0,0	2,3	7,4
	GAC	11	3,93±0,63	0,0	4,4	7,0
	UG	17	2,03±0,39	0,0	2,0	7,0
	MI	15	2,36±0,41	0,0	2,4	5,2
	CG	12	1,97±0,42	0,4	1,6	6,0
F=1,60; p=0,1670 (NS)						
CASPASE-3	MN	08	3,20±1,31	0,0	2,7	11,0
	GNA	34	13,82±2,58	0,0	8,4	52,0
	GAC	11	6,20±1,57	0,0	5,0	13,4
	UG	17	9,47±2,92	0,0	3,4	34,8
	MI	15	6,72±1,47	0,8	6,8	24,4
	CG	12	8,07±2,75	0,0	4,7	30,8
F=1,70; p=0,1420 (NS)						

(NS)= $p>0,05$; N= número de amostras; MN= mucosa normal; GNA= gastrite crônica não-atrófica; GAC= gastrite atrófica crônica; UG= úlcera gástrica; MI= metaplasia intestinal; CG= câncer gástrico.

Na Tabela 7 estão apresentadas as frequências de casos positivos para apoptose observados em cada grupo com ambas as técnicas. Pode-se verificar que pela técnica TUNEL, as frequências de casos com índices apoptóticos aumentados (TUNEL +) foram 54,5% (6/11) no grupo de gastrite atrófica crônica, 26,5% (9/34) no de gastrite crônica não-atrófica, 13,3% (2/15) em metaplasia intestinal, 11,8% (2/17) em úlcera gástrica e 8,3% (1/12) em câncer gástrico. Com a técnica da caspase-3 ativada foram observadas as seguintes frequências, em ordem decrescente: 44,1% (15/34), 33,3% (4/12), 27,3% (3/11), 23,5% (4/17) e 6,7 (1/15), respectivamente para os grupos de gastrite crônica não-atrófica, câncer gástrico, gastrite atrófica crônica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal.

O teste de χ^2 para comparação das frequências de casos positivos considerando-se todos os grupos evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, tanto para os casos TUNEL positivos ($p=0,00000$), como para os casos positivos pela caspase-3 ativada ($p=0,0000$), devido as frequências estatisticamente maiores de casos positivos nas amostras de GAC, GNA e MI, com a técnica TUNEL e novamente nas amostras de GNA, CG e GAC, quando utilizou o anticorpo CPP32. Portanto, as comparações duas a duas entre os grupos (Tabela 8) evidenciou diferenças significantes para quase todas as combinações, exceto entre UG e MI ($p=0,7498$) e CG ($p=0,4104$) e entre MI e CG ($p=0,2547$), com a técnica TUNEL. Da mesma forma, também observou-se diferenças significantes quando comparou-se as frequências de casos positivos para a caspase-3 ativada entre a maioria dos grupos, com exceção de GNA e CG ($p=0,1169$), GAC e UG ($p=0,5370$), GAC e CG ($p=0,3559$) e entre UG e CG ($p=0,1243$).

Tabela 7. Frequências de casos positivos para apoptose pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada e resultados do teste de χ^2 para comparações dessas frequências entre as amostras.

Técnica	GNA	GAC	UG	MI	CG
TUNEL+	9/34 (26,5%)	6/11 (54,5%)	2/17 (11,8%)	2/15 (13,3%)	1/12 (8,3%)
	$\chi^2 = 9,4877$		$p=0,00000 (*)$		
CPP32+	15/34 (44,1%)	3/11 (27,3%)	4/17 (23,5%)	1/15 (6,7%)	4/12 (33,3%)
	$\chi^2 = 38,401$		$p=0,0000 (*)$		

(*): $p < 0,05$; GNA= gastrite crônica não-atrófica; GAC= gastrite atrófica crônica; UG= úlcera gástrica; MI= metaplasia intestinal; CG= câncer gástrico.

Tabela 8. Resultados do teste de χ^2 para comparações das frequências de casos positivos pela técnica TUNEL entre as diferentes amostras.

Amostra	TUNEL		CPP32	
	χ^2	p	χ^2	p
GNA x GAC	16,267	0,000055(*)	6,15	0,0131(*)
GNA X UG	6,9784	0,0082(*)	9,48	0,0020(*)
GNA X MI	5,4655	0,0194(*)	36,91	0,0000(*)
GNA X CG	11,523	0,0007(*)	2,46	0,1169(NS)
GAC X UG	41,138	0,0000(*)	0,38	0,5370(NS)
GAC X MI	37,876	0,0000(*)	15,04	0,0001(*)
GAC X CG	49,545	0,0000(*)	0,85	0,3559(NS)
UG X MI	0,1025	0,7498(NS)	11,01	0,0009(*)
UG X CG	0,6775	0,4104(NS)	2,36	0,1243(NS)
MI X CG	1,2975	0,2547(NS)	22,11	0,0000(*)

(*)= $p < 0,05$; (NS)= $p > 0,05$; GNA= gastrite crônica não-atrótica; GAC= gastrite atrótica crônica; UG= úlcera gástrica; MI= metaplasia intestinal; CG= câncer gástrico.

Quando avaliou-se a ocorrência de correlação entre os índices apoptóticos de cada caso obtidos pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada não constatou-se correlação nos grupos de mucosa normal ($r=-0,40$), gastrite crônica não-atrófica ($r=-0,07$), gastrite atrófica crônica ($r=0,17$), úlcera gástrica ($r=-0,07$) e metaplasia intestinal ($r=0,17$), exceto no grupo de câncer gástrico ($r=0,70$).



2. Associação entre apoptose, infecção pela *H. pylori*, aneuploidias, expressão da proteína p53, tabagismo e etilismo.

Também avaliou-se a associação entre os casos positivos para as técnicas TUNEL e caspase-3 com infecção pela bactéria *H. pylori*, ocorrência de aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 investigada pela técnica FISH e expressão da proteína p53 e os hábitos de tabagismo e etilismo.

A infecção pela *H. pylori* foi positiva em 35,3% (12/34) dos casos de gastrite crônica não-atrófica, 72,7% (8/11) dos casos de gastrite atrófica crônica, 76,5% (13/17) dos casos de úlcera gástrica, 66,7% (10/15) dos casos de metaplasia intestinal e 50,0% (6/12) dos casos de câncer gástrico. Na Tabela 9 estão discriminadas as médias dos índices apoptóticos obtidos por ambas as técnicas, em cada amostra, considerando-se os casos *H. pylori* positivos e os casos sem infecção. O teste *t-Student* para comparação das médias desses índices apoptóticos em cada grupo, não mostrou qualquer diferença significativa, embora quando foi utilizado o anticorpo CPP32 no grupo de úlcera gástrica com infecção pela *H. pylori*, observou-se um IA médio elevado em relação ao grupo sem infecção pela bactéria. Da mesma forma, quando comparou-se os índices apoptóticos médios de cada grupo de lesões benignas e adenocarcinoma gástrico *H. pylori* positivos com o da amostra de mucosa normal *H. pylori* negativa, também não houve diferenças significantes, para a técnica TUNEL. Contudo, para a caspase-3 ativada foi possível verificar índices apoptóticos estatisticamente maiores nas amostras de úlcera gástrica ($p=0,0233$) e metaplasia intestinal ($p=0,0253$) com infecção pela *H. pylori* em relação a mucosa normal.

Apesar dessas diferenças, não foi possível estabelecer uma associação entre a infecção pela bactéria com os casos TUNEL positivos (Tabela 10),

Tabela 9. Resultados do teste t-Student para comparação das médias dos índices apoptóticos em cada grupo, considerando-se os casos *H. pylori* positivos (Hp+) e sem a infecção (Hp-), com as técnicas TUNEL e expressão da caspase-3 ativada.

Técnica	Grupos	N	$\bar{X} \pm EP$	Estatística
TUNEL	GNA Hp+	12	3,30 $\pm$ 2,40	P=0,1852(NS)
	GNA Hp-	22	2,23 $\pm$ 0,30	
	GAC Hp+	8	3,67 $\pm$ 0,82	P=0,5403(NS)
	GAC Hp-	3	4,60 $\pm$ 0,81	
	UG Hp+	13	1,95 $\pm$ 0,23	P=0,8449(NS)
	UG Hp-	4	2,3 $\pm$ 1,63	
	MI Hp+	10	2,06 $\pm$ 0,57	P=0,3141(NS)
	MI Hp-	5	2,96 $\pm$ 0,40	
	CG Hp+	6	1,37 $\pm$ 0,27	P=0,2083(NS)
	CG Hp-	6	2,53 $\pm$ 0,75	
CPP32	GNA Hp+	12	9,52 $\pm$ 4,49	P=0,2248(NS)
	GNA Hp-	22	16,16 $\pm$ 3,11	
	GAC Hp+		5,27 $\pm$ 1,90	P=0,3584(NS)
	GAC Hp-	3	8,67 $\pm$ 2,71	
	UG Hp+	13	12,09 $\pm$ 3,52	P=0,0528(NS)
	UG Hp-	4	1,27 $\pm$ 0,82	
	MI Hp+	10	7,72 $\pm$ 2,03	P=0,3534(NS)
	MI Hp-	5	4,72 $\pm$ 1,60	
	CG Hp+	6	4,93 $\pm$ 1,98	P=0,2901(NS)
	CG Hp-	6	11,03 $\pm$ 5,09	

N= número de amostras; (NS)= p>0,05.

Tabela 10. Comparações pelo teste exato de Fisher nas amostras de gastrite crônica não atrofica (GNA), gastrite atrofica crônica (GAC), úlcera gástrica (UG), metaplasia intestinal (MI) e câncer gástrico (CG), segundo a técnica TUNEL, considerando-se as variáveis infecção pela *H. pylori*, aneuploidias, imunohistoquímica para p53 (IHC), tabagismo e etilismo.

Variáveis	GNA		GAC		UG		MI		CG	
	TUNEL +	TUNEL -	TUNEL +	TUNEL -	TUNEL +	TUNEL -	TUNEL +	TUNEL -	TUNEL +	TUNEL -
<i>H. pylori</i>										
Positivo	5 (15,0%)	7 (21,0%)	4 (36,0%)	4 (36,0%)	1 (6,0%)	11 (69,0%)	3 (20,0%)	7 (47,0%)	0 (0%)	6 (50,0%)
Negativo	6 (18,0%)	16 (47,0%)	2 (18,0%)	1 (9,0%)	1 (6,0%)	3 (19,0%)	4 (27,0%)	1 (7,0%)	2 (17,0%)	4 (33,0%)
Total	11 (32,0%)	23 (68,0%)	6 (55,0%)	5 (45,0%)	2 (12,0%)	14 (88,0%)	7 (47,0%)	8 (53,0%)	2 (17,0%)	10 (83,0%)
Probabilidade	p=0,4590(NS)		p=1,0000(NS)		p=0,4500(NS)		p=0,1189(NS)		p=0,4545(NS)	
Aneuploidias										
Presente	3 (9,0%)	2 (6,0%)	3 (27,0%)	1 (9,0%)	2 (12,0%)	8 (47,0%)	4 (27,0%)	5 (33,0%)	2 (17,0%)	9 (75,0%)
Ausente	8 (24,0%)	21 (62,0%)	3 (27,0%)	4 (36,0%)	1 (6,0%)	6 (35,0%)	3 (20,0%)	3 (20,0%)	0 (0%)	1 (8,0%)
Total	11 (32,0%)	23 (68,0%)	6 (55,0%)	5 (45,0%)	3 (18,0%)	14 (82,0%)	7 (47,0%)	8 (53,0%)	2 (17,0%)	10 (83,0%)
Probabilidade	p=0,2999(NS)		p=0,5455(NS)		p=1,0000(NS)		p=1,0000(NS)		p=1,0000(NS)	
IHC p53										
Positivo	1 (5,0%)	4 (21,0%)	1 (13,0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (13,0%)	2 (18,0%)	0 (0%)	2 (20,0%)	6 (60,0%)
Negativo	5 (26,0%)	9 (47,0%)	3 (38,0%)	4 (50,0%)	2 (13,0%)	11 (73,0%)	3 (27,0%)	6 (55,0%)	0 (0%)	2 (20,0%)
Total	6 (32,0%)	13 (68,0%)	4 (50,0%)	4 (50,0%)	2 (13,0%)	13 (87,0%)	5 (45,0%)	6 (55,0%)	2 (20,0%)	8 (80,0%)
Probabilidade	p=1,0000(NS)		p=1,0000(NS)		p=1,0000(NS)		p=0,1818(NS)		p=1,0000(NS)	
Tabagismo										
Não fumante	4 (11,8%)	10 (29,4%)	0 (0%)	4 (36,4%)	1 (6,2%)	4 (25,0%)	2 (13,3%)	5 (33,3%)	0 (0%)	1 (8,3%)
Fumantes	5 (14,7%)	15 (44,1%)	3 (27,2%)	4 (36,4%)	1 (6,2%)	10 (62,5%)	0 (0%)	8 (53,3%)	1 (8,3%)	10 (83,4%)
Total	9 (26,5%)	25 (73,5%)	3 (27,2%)	8 (72,8%)	2 (12,5%)	14 (87,5%)	2 (13,3%)	13 (86,7%)	1 (8,3%)	11 (91,7%)
Probabilidade	p=1,0000(NS)		p=0,2364(NS)		p=1,0000(NS)		p=0,2000(NS)		p=1,0000(NS)	
Etilismo										
Não etilista	9 (26,5%)	17 (50,0%)	3 (27,2%)	1 (9,1%)	0 (0%)	4 (25,0%)	2 (13,3%)	6 (40,0%)	1 (8,4%)	2 (16,7%)
Etilistas	0 (0%)	8 (23,5%)	3 (27,2%)	4 (36,4%)	2 (12,5%)	10 (62,5%)	0 (0%)	7 (46,7%)	0 (0%)	9 (75,0%)
Total	9 (26,5%)	25 (73,5%)	6 (54,5%)	5 (45,5%)	2 (12,5%)	14 (87,5%)	2 (13,3%)	13 (86,7%)	1 (8,3%)	11 (91,7%)
Probabilidade	p=0,0770(NS)		p=0,5455(NS)		p=1,0000(NS)		p=0,4667(NS)		p=0,2500(NS)	

(NS)= p>0,05.

nem com os casos positivos para a caspase-3 ativada (Tabela 11) em cada grupo de lesões benignas e adenocarcinoma gástrico, com exceção do grupo de gastrite crônica não-atrófica, em que a infecção pela *H. pylori* foi mais freqüente nos casos negativos para a caspase-3 ativada ($p=0,0297$).

A investigação de associação de fatores, como consumo de tabaco e álcool, com aumento do IA por ambas as técnicas não evidenciou diferenças estatisticamente significantes.

O teste de χ^2 (Tabela 12) para comparação das freqüências apenas dos casos com infecção pela bactéria e positivos para apoptose, em cada uma das técnicas, evidenciou diferenças estatisticamente significantes tanto para os casos TUNEL positivos ($p=0,0000$), devido as freqüências mais elevadas de casos TUNEL+/Hp+ nas amostras de GAC (50,0%), GNA (41,7%) e MI (20,0%), como para os casos imunopositivos para a caspase-3 ativada ($p=0,0297$), em que as maiores freqüências de casos CPP32+/Hp+ ocorreu nas amostras de GAC e UG.



Tabela 11. Comparações pelo teste exato de Fisher nas amostras de gastrite crônica não atrofica (GNA), gastrite atrofica crônica (GAC), úlcera gástrica (UG), metaplasia intestinal (MI) e câncer gástrico (CG), segundo a imunomarcagem para a caspase-3 ativada (CPP32), considerando-se as variáveis infecção pela *H. pylori*, aneuploidias, imuno-histoquímica para p53 (IHC), tabagismo e etilismo.

Variáveis	GNA		GAC		UG		MI		CG	
	CPP32+	CPP32-	CPP32+	CPP32-	CPP32+	CPP32-	CPP32+	CPP32-	CPP32+	CPP32-
<i>H. pylori</i>										
Positivo	2 (6,0%)	10 (29,0%)	2 (18,0%)	6 (55,0%)	3 (19,0%)	9 (56,0%)	1 (7,0%)	9 (60,0%)	1 (8,0%)	5 (42,0%)
Negativo	13 (38,0%)	9 (26,0%)	1 (9,0%)	2 (18,0%)	0 (0%)	4 (25,0%)	0 (0%)	5 (33,0%)	3 (25,0%)	3 (25,0%)
Total	15 (44,0%)	19 (56,0%)	3 (27,0%)	8 (73,0%)	3 (19,0%)	13 (81,0%)	1 (7,0%)	14 (93,0%)	4 (33,0%)	8 (67,0%)
Probabilidade	p=0,0297(*)		p=1,0000(NS)		p=0,5286(NS)		p=1,0000(NS)		p=0,5455(NS)	
Aneuploidias										
Presente	3 (9,0%)	2 (6,0%)	1 (9,0%)	3 (27,0%)	1 (6,0%)	9 (53,0%)	0 (0%)	9 (60,0%)	4 (33,0%)	7 (58,0%)
Ausente	12 (35,0%)	17 (50,0%)	2 (18,0%)	5 (45,0%)	3 (18,0%)	4 (24,0%)	1 (7,0%)	5 (33,0%)	0 (0%)	1 (8,0%)
Total	15 (44,0%)	19 (56,0%)	3 (27,0%)	8 (73,0%)	4 (24,0%)	13 (76,0%)	1 (7,0%)	14 (93,0%)	4 (33,0%)	8 (67,0%)
Probabilidade	p=0,6343(NS)		p=1,0000(NS)		p=0,2500(NS)		p=0,4000(NS)		p=1,0000(NS)	
IHC p53										
Positivo	2 (11,0)	3 (16,0%)	0 (0%)	1 (13,0%)	0 (0%)	2 (13,0%)	0 (0%)	2 (18,0%)	2 (25,0%)	4 (50,0%)
Negativo	11 (58,0%)	3 (16,0%)	2 (25,0%)	5 (63,0%)	3 (20,0%)	10 (67,0%)	1 (9,0%)	8 (73,0%)	1 (13,0%)	1 (13,0%)
Total	13 (68,0%)	6 (32,0%)	2 (25,0%)	6 (75,0%)	3 (20,0%)	12 (80,0%)	1 (9,0%)	10 (91,0%)	3 (38,0%)	5 (63,0%)
Probabilidade	p=0,2621(NS)		p=1,0000(NS)		p=1,0000(NS)		p=1,0000(NS)		p=1,0000(NS)	
Tabagismo										
Não fumante	8 (23,5%)	6 (17,6%)	3 (27,3%)	1 (9,1%)	1 (6,2%)	4 (25,0%)	1 (6,7%)	6 (40,0%)	0 (0%)	1 (8,3%)
fumante	7 (20,6)	13 (38,2)	3 (27,3)	4 (36,4%)	3 (18,8%)	8 (50,0%)	0 (0%)	8 (53,35)	4 (33,3%)	7 (58,3%)
Total	15 (44,1)	19 (55,9)	6 (54,6%)	5 (45,4%)	4 (25,0%)	12 (75,0%)	1 (6,7%)	14 (93,3%)	4 (33,3%)	8 (66,7%)
Probabilidade	p=0,2960(NS)		p=0,5455(NS)		p=1,0000(NS)		p=0,4667(NS)		P=1,0000(NS)	
Etilismo										
Não etilista	12 (35,3%)	14 (41,2%)	2 (18,2%)	5 (45,4%)	0 (0%)	4 (25,0%)	1 (6,6%)	7 (46,7%)	1 (8,3%)	2 (16,7%)
etilista	3 (8,8%)	5 (14,7%)	1 (9,1%)	3 (27,3%)	4 (25,0%)	8 (50,0%)	0 (0%)	7 (46,7%)	3 (25,0%)	6 (50,0%)
Total	15 (44,1%)	19 (55,9%)	3 (27,3%)	8 (72,7%)	4 (25,0%)	12 (75,0%)	1 (6,6%)	14 (93,4%)	4 (33,3%)	8 (66,7%)
Probabilidade	p=1,0000(NS)		p=1,0000(NS)		p=0,5165(NS)		p=1,0000(NS)		p=1,0000(NS)	

(*)= p<0,05; (NS)= p>0,05.

Tabela 12. Frequências de casos com infecção pela *H. pylori* e positivos pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada (CPP32) nas amostras de lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico.

Técnica	GNA	GAC	UG	MI	CG
TUNEL+	5/12	4/8	1/12	2/10	0/6
	(41,7%)	(50,0%)	(8,3%)	(20,0%)	(0%)
	$\chi^2 = 95,00$		$P=0,0000(*)$		
CPP32+	2/12	2/8	3/12	1/10	1/6
	(16,7%)	(25,0%)	(25,0%)	(10,0%)	(16,7%)
	$\chi^2 = 10,73$		$P=0,0297(*)$		

(*)= $p < 0,05$; GNA= gastrite crônica não-atrófica; GAC= gastrite atrofica crônica; UG= úlcera gástrica; MI= metaplasia intestinal; CG= câncer gástrico.

A ocorrência de aneuploidias (monossomias e trissomias) dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 foi mais freqüente no grupo de adenocarcinoma gástrico e menos freqüente em gastrite crônica não-atrófica (CG= 91,7%; MI= 66,7%; UG= 58,8%; GAC= 36,4%; GNA= 14,7%). A análise de associação entre os casos positivos pelas técnicas TUNEL (Tabela 10) e caspase-3 ativada (Tabela 11) com a presença de aneuploidias não evidenciou associação entre esses fatores em todos os grupos avaliados.

A expressão aumentada da proteína p53 foi observada respectivamente, em 26,3% (5/19); 12,5% (1/8); 13,3% (2/15); 18,2% (2/11) e 80,0% (8/10) dos casos de GNA, GAC, UG, MI e CG, mas também não houve associação com os casos TUNEL positivos (Tabela 10) ou CPP32 positivos (Tabela 11).

IV. DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

IV. Discussão

No epitélio gástrico, a apoptose desempenha função essencial na manutenção da integridade da mucosa gastrintestinal, sendo que a sua desregulação está associada com a ocorrência de lesões gástricas, tais como, a gastrite atrófica, a úlcera péptica e tumorigênese do gástrica (QUE; GORES, 1996).

O processo de apoptose é responsável pela eliminação das células com danos no DNA ou não necessárias, presentes em lesões gástricas pré-cancerosas, assim induzindo também uma maior atividade proliferativa para manutenção da homeostase do epitélio gástrico (JANG et al, 1997; CHUNG et al, 1998; REED, 2002). Portanto, falhas neste processo, ocasionando uma sobrevivência aumentada de células danificadas, pode aumentar o risco de desenvolvimento do câncer gástrico.

No presente estudo, os índices apoptóticos médios observados em mucosa gástrica normal, lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico pela técnica TUNEL foram semelhantes, apesar do grupo de gastrite atrófica crônica apresentar um índice apoptótico estatisticamente mais elevado (3,93%) em relação ao grupo de mucosa normal (1,82%), mas não entre gastrite crônica não-atrófica (2,60%), úlcera gástrica (2,03%), metaplasia intestinal (2,36%) e câncer gástrico (1,97%). Nestas lesões a variação de células apoptóticas foi de 0 a 7,4%, que foram mais freqüentes no epitélio glandular. Os índices apoptóticos detectados pela expressão da caspase-3 ativada foram respectivamente, 3,20% em mucosa gástrica normal, 13,82% em gastrite crônica não-atrófica, 6,20% em gastrite atrófica crônica, 9,47% em úlcera gástrica, 6,72% em metaplasia intestinal e 8,07% em câncer gástrico, com variação de células apoptóticas entre 0 a 52,0%. Com esta última

técnica, embora todos os grupos tenham apresentado índices apoptóticos mais elevados que a mucosa normal, apenas na amostra de gastrite crônica não-atrófica observou-se um índice apoptótico estatisticamente maior (13,82%) em comparação com a amostra de mucosa gástrica normal (3,20%).

Apesar das médias dos índices apoptóticos, considerando-se todos os grupos, detectadas pela técnica TUNEL não serem estatisticamente diferentes, as frequências de casos TUNEL positivos foram estatisticamente mais elevadas nas amostras de gastrite atrófica crônica (54,5%) e gastrite crônica não-atrófica (26,5%). Pela técnica da caspase-3 ativada, as frequências de casos positivos para este anticorpo foram estatisticamente maiores nas amostras de gastrite crônica não-atrófica (44,1%), câncer gástrico (33,3%) e gastrite atrófica crônica (27,3%).

O índice apoptótico médio observado em mucosa gástrica histologicamente normal e *H. pylori* negativa (1,82%), no presente estudo, está de acordo com o relatado na literatura, em que tem-se verificado uma variação de células apoptóticas de 0,015% a 7,1%, pela técnica TUNEL, predominantemente no epitélio glandular (MOSS et al, 1996; STEININGER et al., 1998; KOHDA et al, 1999; VON HERBAY; RUDI, 2000; UNGER et al, 2001; YOSHIMURA et al, 2001; SATOH et al, 2003).

A maioria dos estudos, enfocando a ocorrência de apoptose em lesões gástricas, concentra-se em gastrite crônica, freqüentemente com atrofia glandular e infecção pela bactéria *H. pylori*. Neste estudo, os grupos de gastrite crônica atrófica e não-atrófica foram os que apresentaram os maiores índices apoptóticos e maior número de casos positivos para apoptose, principalmente pela técnica TUNEL.

Os índices apoptóticos médios relatados em gastrite crônica, na literatura, têm variado de 0,027% a 3,0%, freqüentemente associado com atrofia glandular e infecção pela *H. pylori*, e ocorrendo principalmente nos epitélios foveolar e glandular (ISHIDA et al, 1996; STEININGER et al, 1998; JAM; KIM, 2000; UNGER et al, 2001; 2003), regiões em que há uma maior colonização pela bactéria e inflamação epitelial (STEININGER et al, 1998).

A gastrite crônica *H. pylori* positiva, freqüentemente progride para gastrite atrófica, que é um fator de risco reconhecido para o câncer gástrico, pois tem-se constatado a ocorrência de atrofia gástrica severa na mucosa de pacientes com câncer gástrico, com evidências de que o risco para neoplasia aumenta com o grau e a extensão da atrofia (YOSHIMURA et al, 2000). Além disso, tem sido relatada uma correlação positiva entre o índice apoptótico e o grau de atrofia glandular, indicando que o aumento de apoptose pode ter uma função importante no desenvolvimento de atrofia glandular (YOSHIMURA et al, 2000), e novamente reforçando seu papel na carcinogênese gástrica. Apesar dessas evidências, Moss et al (1999) não observaram diferença significativa dos índices apoptóticos de biópsias da região do corpo e do antro do estômago nos casos que desenvolveram atrofia no início do estudo e aqueles que não a desenvolveram. Da mesma forma, Vorobjova et al (2001) estudando células apoptóticas em três compartimentos do estômago (células foveolares, zona proliferativa e porção glandular) de 68 indivíduos com e sem o desenvolvimento de atrofia, por um período de 18 anos, não observaram diferença dos índices apoptóticos entre as pessoas que desenvolveram ou não atrofia.

Estudos sobre apoptose em úlcera e metaplasia intestinal são escassos, portanto, o presente estudo, contribuiu acrescentando mais informações sobre a ocorrência de apoptose nestes tipos de lesões. A amostra de úlcera gástrica ora analisada, constituída por 17 casos, não apresentou índice apoptótico médio mais elevado em relação a mucosa normal e demais amostras de lesões benignas e adenocarcinoma gástrico. Moss et al (1996) avaliaram 16 pacientes com úlcera duodenal ativa e *H. pylori* positiva e encontraram um índice apoptótico elevado pela técnica TUNEL (16,8%), que abaixou significativamente para 3,1% após a erradicação da infecção pela bactéria. Em úlcera gástrica *H. pylori* positiva, Satoh et al (2003) também detectaram índice apoptótico elevado (14,2%) que diminuiu significativamente (3,4%) após a erradicação da bactéria. De modo contrário, Hirasawa et al (1999) verificaram, em pacientes com úlcera gástrica, que o índice apoptótico aumentou significativamente de 4,2% para 7,4% após o tratamento da infecção. Outros estudos não observaram diferenças entre os índices apoptóticos nos grupos de úlcera gástrica e úlcera duodenal, ambos *H. pylori* positivos (KOHDA et al, 1999; JANG; KIM, 2000).

Em metaplasia intestinal, as células apoptóticas foram mais freqüentes na região glandular da mucosa gástrica, com índice apoptótico médio de 2,36% detectado pela técnica TUNEL e imunomarcção positiva para a caspase-3 com intensidade fraca, na maioria dos 15 casos estudados. Portanto, não evidenciando um aumento de apoptose neste tipo de lesão, com apenas dois casos classificados como TUNEL positivos. Em metaplasia intestinal do tipo incompleta, Ishida et al (1996) verificaram um índice apoptótico médio maior (2,0%) que o observado na do tipo



completa (1,0%), sugerindo que as células com danos no DNA ocorrem mais freqüentemente no tipo incompleto e, presumivelmente, são mais freqüentemente eliminadas por apoptose, para impedir a transformação celular. Esta observação vem corroborar a indicação, de que a metaplasia intestinal incompleta está mais associada com o câncer gástrico que a do tipo completa (ISHIDA et al, 1996). Por outro lado, Leung et al (2001) detectaram um índice apoptótico mais baixo em metaplasia intestinal (0,19%) que em região não-metaplasia (0,51%) infectadas pela *H. pylori*. Neste estudo, os autores também observaram uma taxa reduzida entre os índices de apoptose e de proliferação celular, assim favorecendo o acúmulo celular e possivelmente, contribuindo para a carcinogênese gástrica.

Em adenocarcinoma gástrico, as células apoptóticas não localizaram-se, predominantemente, nas glândulas cancerosas, pois foram também observadas no infiltrado, e apresentaram índice apoptótico médio detectado pela técnica TUNEL de 1,97%, com apenas um caso com apoptose aumentada pela técnica TUNEL, do total de 12 casos avaliados. A caspase-3 ativada teve expressão fraca em 4/12 dos casos estudados, assim não havendo indicações de aumento de apoptose em adenocarcinoma gástrico, tanto do tipo intestinal como difuso, que apresentaram índices apoptóticos semelhantes. Esses índices apoptóticos são similares a outros descritos na literatura (JANG; KIM, 2000; YOSHIMURA et al, 2000), porém menores que os descritos por Ishida et al, (1996), que observaram índice apoptótico de 3,9%. Yoshimura et al (2000) detectaram um índice apoptótico aumentado em pacientes com câncer gástrico *H. pylori* positivo em relação aos indivíduos controles. Os autores sugeriram que o aumento de células apoptóticas pode ter uma função

importante no desenvolvimento de atrofia glandular presente nesses tumores, como consequência da infecção pela *H. pylori*, que também seria responsável pela subsequente metaplasia intestinal, freqüentemente presente em pacientes com câncer gástrico. Portanto, a infecção pela *H. pylori* induziria a inflamação da mucosa gástrica, resultando em lesões no DNA, em pacientes com câncer gástrico, e consequentemente, um aumento na apoptose.

Quanto a ocorrência de apoptose relacionada com os dois subtipos histológicos do tumor gástrico, intestinal e difuso, van der Woude et al (2003) também não encontraram diferenças nos índices de proliferação celular e apoptose, avaliados pela expressão de Ki-67 e da proteína caspase-3 ativada em adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal e difuso. Yoo et al (2002), da mesma forma observaram que as caspases 3, 8, 9 e 10 eram expressas em câncer de estômago, independentemente dos subtipos histológicos e da profundidade da invasão. Estes resultados indicam que a maioria das células de câncer gástrico precisam expressar as caspases para a ocorrência da apoptose *in vivo*, sendo portanto, um bom marcador para a apoptose.

A detecção de células apoptóticas tem sido baseada na morfologia e observação do DNA fragmentado por técnicas bioquímicas e histoquímicas, assim como por métodos mais específicos, por meio da detecção de proteínas expressadas e ativadas seletivamente ou fragmentos de proteínas gerados durante o processo de apoptose (STADELMANN; LASSMANN, 2000). A fragmentação internucleossomal do DNA genômico tem sido utilizada como um marcador bioquímico da apoptose há muitos anos (WYLLIE, 1993).



Outros métodos suplementares à fragmentação do DNA têm sido disponibilizados, por meio de uma variedade de anticorpos específicos contra componentes das vias apoptóticas, como a caspase-3 ativada (STADELMANN; LASSMANN, 2000).

A caspase-3 é considerada a enzima efetora central apoptótica, atua no citosol e está ativada apenas nas células que estão sofrendo apoptose. Ela é responsável por muitas características morfológicas e bioquímicas da apoptose, devido a sua capacidade de clivar substratos celulares como a actina, a gelsolina, a poliadenosina difosfato ribose polimerase (PARP), quinases de adesão celular entre outras (CHENGHUA et al., 1999; JEON et al., 1999; STADELMANN et al., 1999).

A caspase-3 ativada é reconhecida por anticorpos específicos, sendo portanto, considerados marcadores sensíveis para células apoptóticas (STADELMANN; LASSMANN, 2000), uma vez que identificam as células que estão sofrendo este processo mesmo antes delas apresentarem todas as características morfológicas. Um fator importante é que a ativação da cascata de caspases não tem sido encontrada na morte celular necrótica (ARMSTRONG et al., 1997).

A presença da forma ativa da caspase-3 no citoplasma das células em apoptose é um evento inicial e precede o desenvolvimento das características morfológicas clássicas deste processo. Assim, a utilização de um anticorpo que reconheça a forma ativa da caspase-3 pela imuno-histoquímica é capaz de detectar as células apoptóticas mais precocemente.



Vários métodos são utilizados para a detecção de células apoptóticas, mas todos possuem significantes limitações. Dentre eles, as técnicas TUNEL e a expressão da caspase-3 ativada são mais vantajosas para a detecção de células em apoptose do que as técnicas que avaliam apenas as mudanças morfológicas, como a coloração hematoxilina-eosina, tornando a detecção das células apoptóticas mais fácil e menos dependente da interpretação subjetiva. Células com marcação TUNEL e caspase-3 positivas podem ser visualizadas em células aparentemente normais, sem alterações características, correspondendo a células apoptóticas no estágio inicial do processo (ISHIDA et al, 1996).

No estudo ora realizado, a comparação das frequências de apoptose nas diferentes amostras de lesões gástricas e adenocarcinoma gástrico não evidenciou correlação entre os índices apoptóticos avaliados pelas técnicas TUNEL e expressão da caspase-3 ativada, com exceção do grupo de câncer gástrico. Resultados semelhantes foram encontrados por Hoshi et al (1998), que verificaram uma correlação positiva entre a expressão da caspase-3 com o índice apoptótico detectado pela técnica TUNEL em câncer gástrico, porém não observaram correlação com o índice de proliferação celular Ki-67.

Hadjiloucas et al (2001) evidenciaram menos de 0,01% das células com características morfológicas de apoptose, em tumor de mama, que não apresentavam marcação citoplasmática para a caspase-3. Resultados semelhantes, nesse mesmo tipo de neoplasia, foram observados em um estudo anterior com as técnicas TUNEL e a marcação *in situ* das extremidades, admitindo-se que algumas células sofram o processo de morte celular sem a ativação da caspase-3



(MAINWARING et al, 1998), sendo dessa forma um dos fatores que possam justificar a falta de correlação entre as técnicas TUNEL e caspase-3 ativada nas amostras de lesões gástricas benignas e mucosa normal, avaliadas no presente estudo.

Parton et al (2002) evidenciaram a inexistência de correlação entre os índices apoptóticos detectados pelos dois métodos em câncer de mama, a qual foi atribuída ao modo de marcação avaliado, que exclui o padrão de marcação granular da caspase-3 e o agrupamento de *scores*. Em câncer de bexiga, Giannopoulou et al (2002) também verificaram que a expressão das proteínas pró-apoptóticas bax, receptor Fas e caspase-3 ativada não estavam ligadas diretamente ao índice apoptótico detectado pela técnica TUNEL das células cancerosas.

De modo contrário, Hadjiloucas et al (2001) verificaram a existência de correlação entre as frequências apoptóticas médias obtidas pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada em câncer de mama, e Vakkalla et al (1999) verificaram tal correlação entre a expressão das caspases-3, 6 e 8 com os índices apoptóticos detectados pela técnica TUNEL, neste mesmo tipo de tumor, indicando que a utilização do anticorpo para a caspase-3 ativada é um método acurado e sensível, e portanto, recomendado para o estudo de apoptose.

A falta de correlação existente entre a expressão da caspase-3 ativada (CPP32) com o índice apoptótico (TUNEL) relatada em diferentes tumores pode ser, em alguns casos, devido à utilização de um anticorpo que não discrimina entre as formas ativa e inativa da caspase-3 (GIANNOPOULOU et al, 2002). No presente estudo, foi empregado o anticorpo CPP32 monoclonal específico contra a forma ativada da caspase-3. Por outro lado, sabe-se que a técnica TUNEL nem sempre

detecta, seletivamente, as células apoptóticas, exceto quando a morfologia nuclear estiver correlacionada com os resultados TUNEL positivos, neste caso, sendo considerado então como um dos melhores métodos para detecção *in situ* de apoptose.

Durante o desenvolvimento e a progressão tumoral, as células neoplásicas adquirem a capacidade de escaparem da morte celular apoptótica, protegendo-as de vários estímulos apoptóticos (HANAHAH; WEINBERG, 2000). Essa falha no processo apoptótico permitiria a sobrevivência de células propensas a sofrerem danos genéticos posteriormente. Contrariamente, as células cancerosas sem essa capacidade, morreriam durante o desenvolvimento e progressão tumorais. Pode-se supor que a expressão das caspases em câncer de estômago promova a apoptose, produzindo portanto, uma pressão seletiva favorecendo a apoptose durante o processo de múltiplas etapas da carcinogênese gástrica. As células gástricas cancerosas selecionadas devem possuir mecanismos resistentes contra a apoptose dependente das caspases.

A morte celular apoptótica das células neoplásicas pode ser retardada ou bloqueada por vários fatores, incluindo mutação somática e perda de expressão de moléculas pró-apoptóticas e expressão de moléculas que inibem a apoptose. Por exemplo, modificações epigenéticas da caspase-8 pela metilação de seu promotor tem sido implicada, atualmente, na perda de função em vários tipos de tumores sólidos em crianças (TEITZ et al, 2000; FULDA et al, 2001). Contudo, em células gástricas cancerosas *in vivo*, a perda de expressão da caspase-8 por metilação não parece ser um evento freqüente (YOO et al, 2002). No entanto, neste tipo de neoplasia, têm sido relatadas tanto a expressão de inibidores apoptóticos, como Bcl-

2 e FAP-1 (KRAJEWSKA et al, 1996; LEE et al, 1999), como a ocorrência de mutações inativando a caspase-10 (PARK et al, 2002). Dessa forma, podendo explicar porque as células gástricas neoplásicas apresentam resistência à apoptose (LAZEBNIK et al, 1994), apesar, muitas vezes, da expressão elevada das principais caspases.

Conforme Yoo et al (2002) as caspases 3, 8, 9 e 10 podem ser proteínas de localização citoplasmática ou nuclear. Contudo, no presente estudo, a expressão da caspase-3 foi detectada apenas no citoplasma das células cancerosas. As informações ainda limitadas sugerem que as caspases localizam-se primeiramente no citoplasma, sendo transportadas para o núcleo durante a apoptose, em que atua clivando proteínas nucleares envolvidas na fragmentação do DNA genômico (NICHOLSON, 1999) e reparo do DNA pela inativação, de pelo menos, duas proteínas principais envolvidas na manutenção da integridade genômica: PARP e DNA-PK (McCONNELL et al, 1997). Contudo, devido à maioria das células com imunomarcção nuclear das caspases não apresentarem características de núcleos apoptóticos, o significado preciso da expressão das caspases no núcleo em câncer de estômago não está claro (YOO et al, 2002).

A imunomarcção positiva para a caspase-3 ativada também tem sido empregada como um fator prognóstico. Hsia et al (2003) estabeleceram associação entre a imunomarcção para a caspase-3 como um prognóstico favorável em carcinomas primários de células escamosas do esôfago. Kondo et al (1998) demonstraram que a transferência retroviral da caspase-3 induz a apoptose em células de glioma maligno *in vitro*. Além disso, o tratamento de tumores de

camundongos com um retrovírus contendo a caspase-3 inibiu significativamente o crescimento tumoral, através da indução da apoptose. Portanto, Hsia et al (2003) sugeriram que a expressão da caspase-3 pode ser utilizada como um bom e novo fator prognóstico, pelo menos em carcinoma de esôfago.

A indução da apoptose é um dos alvos pretendidos para o controle da progressão tumoral e de metástases, dado que consiste no mecanismo principal de regressão tumoral induzida pela quimioterapia (PARTON et al, 2002). Assim, a regulação da apoptose tem sido um alvo atrativo para a intervenção terapêutica em algumas doenças consideradas previamente incuráveis, como a AIDS e o câncer. Nestes casos, utilizando-se drogas que atuem na ativação das caspases (CHEN et al, 1999; ITOH et al, 2000; MATSUMIYA et al, 2001), ou na regulação da família de genes *Bcl-2* inibindo a expressão de seus membros, por exemplo com a tecnologia anti-sense, ou neutralizando sua atividade anti-apoptótica pela ocorrência natural de proteínas antagonistas, como Bax ou ainda, por compostos farmacêuticos que se ligam nos sítios ativos dessas proteínas (JÄÄTELÄ, 1999). Portanto, novos alvos envolvidos na via apoptótica vêm sendo explorados para o tratamento do câncer com a terapia anti-sense, utilizada para bloquear os membros da família de proteínas inibidoras da apoptose (IAP), que constitui um grupo de supressores apoptóticos ligado ao cromossomo X (cIAP1, cIAP2, NAIP e survivinas), conferindo proteção às células contra agentes anti-câncer e a outros estímulos apoptóticos (STAHEL et al, 2003).

No epitélio gástrico, o aumento da apoptose parece estar relacionado com alguns fatores, como infecção pela *H. pylori*, lesões no DNA e

expressão de proteínas que regulam o ciclo celular e o próprio processo de apoptose, como a proteína p53. No entanto, no estudo ora realizado, a investigação da ocorrência de associação entre apoptose e os casos positivos pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada com infecção pela bactéria *H. pylori*, aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 investigada pela técnica FISH e super-expressão da proteína p53, não revelou associação entre este processo e nenhum desses parâmetros investigados, com uma única exceção.

A infecção pela bactéria *H. pylori* é considerada a causa principal de gastrite crônica e aguda, úlcera gástrica e duodenal (NIH, 1994) e está associada com um risco de 2,7 a 12 vezes de desenvolvimento de câncer gástrico (COVER et al, 1995). Portanto, alguns estudos têm demonstrado a associação entre a infecção pela bactéria e o desenvolvimento, subsequente, de adenocarcinoma gástrico (PARSONNET et al, 1991; EUROGAST, 1993; UEMURA et al, 2001). Por outro lado, o mecanismo de ação da *H. pylori* na carcinogênese gástrica não está esclarecido. Uma das vias refere-se ao fato de que a carcinogênese gástrica está relacionada com o rompimento no balanço entre proliferação das células epiteliais e morte celular, ou apoptose. Também é conhecido que a bactéria é responsável pela formação intracelular de intermediários de nitrogênio reativo (PAKODI et al, 2000) e espécies de oxigênio reativo associado com adutos de DNA em células gástricas expostas a *H. pylori* (SMOOT et al, 2000; ASHKTORAB et al, 2003). Assim, contribuindo para o aumento de danos no DNA, apoptose e proliferação celular. Há relatos ainda, de que a *H. pylori* induz apoptose no epitélio gástrico, pela repressão

da proteína anti-apoptótica Bcl-2, da liberação do citocromo-c no citosol e da ativação da caspase-9 (PATTHOFF et al, 2002).

A infecção pela *H. pylori* induz portanto, um aumento da apoptose (MOSS et al, 1996; JANG; KIM, 2000) e hiperproliferação das células do epitélio gástrico (NARDONE et al, 1999; SATOH et al, 2001), devido uma resposta hiperproliferativa nas células para a manutenção da homeostase do epitélio (XIA; TALLEY, 2001). Wagner et al (1999) propuseram que uma alta densidade de *H. pylori* ou uma resposta imune exagerada pode romper este equilíbrio, tanto pela apoptose excessiva como pela inibição da proliferação das células epiteliais, resultando no desenvolvimento da atrofia glandular.

No presente estudo, não foi observada diferenças significantes entre os índices apoptóticos médios em cada amostra considerando-se a ocorrência ou não de infecção pela *H. pylori*. Também não constatou-se diferenças significantes entre os índices apoptóticos médios quando comparou-se cada amostra considerando-se apenas os casos *H. pylori* positivos com a amostra de mucosa normal. Embora as amostras de úlcera gástrica e metaplasia intestinal tenham apresentado índices apoptóticos estatisticamente maiores, para a caspase-3 ativada, quando comparadas com a amostra de mucosa normal. Da mesma forma, não foi possível associar os casos positivos para apoptose em cada uma das técnicas utilizadas com a infecção pela bactéria, nas lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico, com exceção do grupo de gastrite crônica não-atrófica, em que observou-se um número maior de casos imunomarcados pela caspase-3 ativada sem a infecção pela *H. pylori*. Portanto, de modo geral, os resultados ora apresentados não evidenciaram a participação da

infecção pela *H. pylori* no aumento de apoptose nas amostras de lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico.

Por outro lado, tem sido descrito na literatura uma taxa elevada de apoptose em lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico com infecção pela *H. pylori* (ATTALLAH et al, 1996; ISHIDA et al, 1996; KOHDA et al, 1996; MOSS et al, 1996; STEININGER et al, 1998; HIRASAWA et al, 1999; NARDONE et al, 1999; VON HERBAY; RUDI, 2000; UNGER et al, 2001). Apesar de Anti et al (1998) terem relatado índices apoptóticos similares em gastrite crônica infectada ou não pela *H. pylori* e não encontrarem correlação dos índices apoptóticos com o grau de inflamação e Wagner et al (1997) observarem uma atividade apoptótica reduzida seguida por proliferação celular aumentada na presença da infecção pela *H. pylori*.

Como a infecção pela *H. pylori* parece ser responsável pela hiperproliferação celular, apoptose aumentada e instabilidade genômica em lesões com inflamação gástrica como a gastrite atrófica crônica e a úlcera duodenal, a erradicação da infecção poderia reverter este quadro. Realmente, a diminuição da apoptose foi observada consistentemente após erradicação da *H. pylori* (MOSS et al., 1996; KOHDA et al., 1999; NARDONE et al., 1999; VON HERBAY; RUDI, 2000). Portanto, o aumento da apoptose em infecção *H. pylori* ativa é um fenômeno reversível, após erradicação da *H. pylori* em pacientes com gastrite crônica, houve uma redução da proliferação celular (NARDONE et al. 1999; NOGUCHI et al, 2002), associada com redução da atividade da gastrite, regressão ou desaparecimento da atrofia e metaplasia completa e desaparecimento de marcadores de instabilidade genômica, antes presentes (NARDONE et al, 1999).



Esses últimos autores sugeriram que pacientes com gastrite crônica *H. pylori* positiva com atrofia devem receber tratamento para erradicação da bactéria, enquanto, aqueles com infecção por *H. pylori* que não responderem à tratamento com antibióticos devem ser examinados para marcadores de instabilidade genômica e acompanhados rigorosamente. Por outro lado, Hirasawa *et al.* (1999) observaram que a erradicação de *H. pylori* em pacientes com úlcera gástrica e gastrite atrófica, reduziu a proliferação celular da mucosa gástrica, mas aumentou a taxa de apoptose.

Nas amostras de úlcera gástrica e metaplasia intestinal com infecção pela *H. pylori*, os resultados deste trabalho mostraram com a expressão da caspase-3 ativada, índices apoptóticos estatisticamente maiores nessas amostras em relação a amostra de mucosa normal. Da mesma forma, Kohda *et al.* (1999) observaram uma frequência de células apoptóticas significativamente maior em indivíduos com úlcera duodenal infectados pela *H. pylori* que em pacientes saudáveis sem infecção pela bactéria, sugerindo que a infecção do estômago pela *H. pylori* foi responsável pelo aumento na apoptose das células epiteliais. Após a erradicação completa da bactéria com a administração de antibióticos, foi constatada uma redução significativa do índice apoptótico neste tipo de lesão. Por outro lado, em indivíduos com úlcera gástrica, esses autores verificaram que a erradicação da bactéria não diminuiu a taxa apoptótica, sugerindo que a colonização do estômago pela *H. pylori*, incluindo a região do antro, está relacionada com apoptose aumentada em úlcera duodenal, mas não em úlcera gástrica (KOHDA *et al.*, 1999). Esses resultados são controversos, pois Hirasawa *et al.* (1999) verificaram índices apoptóticos significativamente elevados em

pacientes com úlcera gástrica após a erradicação da *H. pylori*, enquanto Satoh et al (2003) observaram índices apoptóticos significativamente maiores em indivíduos infectados pela bactéria que nos controles, que atingiram níveis normais após sua erradicação.

Em adenocarcinoma gástrico, não foram observadas diferenças significantes quando considerou-se, neste grupo, apenas os casos com infecção pela *H. pylori* e positivos para as técnicas TUNEL e caspase-3 ativada. No entanto, Yoshimura et al (2000) relataram índices apoptóticos maiores em indivíduos com câncer gástrico infectados pela *H. pylori*. Eles também observaram diferenças significantes nos índices apoptóticos entre os dois subtipos histológicos do tumor: na região do antro, índice apoptótico aumentado foi detectado no tipo difuso, enquanto na região do corpo, índice apoptótico mais elevado ocorreu no tipo intestinal. No entanto, no presente estudo, não foi possível estabelecer diferenças entre os índices apoptóticos nos dois subtipos histológicos do tumor.

A ocorrência de aneuploidias (monossomias e trissomias) dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 avaliados pela técnica FISH foi mais freqüente no grupo de adenocarcinoma gástrico em comparação com as lesões gástricas benignas que apresentaram uma freqüência crescente de tais alterações a partir de gastrite crônica não-atrófica, evidenciando, portanto, uma instabilidade cromossômica nas lesões gástricas ora avaliadas (CÉSAR, 2003). Este autor evidenciou associação positiva entre aneuploidias e infecção pela *H. pylori* nos grupos de gastrite atrófica crônica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal, mas não foi verificada tal associação no grupo de gastrite crônica não-atrófica e adenocarcinoma gástrico. Contudo, no presente

estudo, não foi observada uma associação entre a ocorrência de aneuploidias e os casos positivos para apoptose pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada nos grupos de lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico. De modo contrário, Attallah et al (1996) relataram a ocorrência de apoptose associada com conteúdo de DNA aneuplóide em gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal e displasia. Enquanto, Nardone et al (1999) detectaram DNA aneuplóide em 11/53 (20,7%) das biópsias de gastrite crônica *H. pylori* positiva e em 11 amostras de câncer gástrico, em associação com a expressão das proteínas p53 e c-myc. Interessantemente, tais alterações foram revertidas após a erradicação da bactéria *H. pylori*.

A proteína p53 tipo selvagem interrompe o ciclo celular na fase G1, em resposta ao estresse ou danos no DNA, sendo esta parada importante para o reparo do DNA e indução de apoptose (LEVINE, 1997). De modo contrário, a apoptose pode ser suprimida ou atenuada pela forma mutante da proteína p53, evidenciada por imuno-histoquímica por meio de sua expressão aumentada, em consequência de sua vida média prolongada (ISHIDA et al, 1996; IKEDA et al, 1998). Portanto, a expressão aumentada da p53 mutante, pode refletir em um índice apoptótico menor e conseqüentemente, maior risco de progressão maligna.

A expressão aumentada da proteína p53, nas lesões gástricas benignas, foi observada respectivamente, em 26,3% (5/19) dos casos de GNA, 18,2% (2/11) das metaplasia intestinais, 13,3% (2/15) das úlceras gástricas e 12,5% (1/8) das gastrites atróficas crônicas, em contraposição dos 80,0% (8/10) dos casos de adenocarcinoma gástrico. Contudo, não houve associação dos casos TUNEL positivos ou caspase-3 positivos com a expressão da p53.

César (2003), que investigou a ocorrência de deleção e expressão do gene *TP53* nestas amostras de lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico e sua associação com a infecção pela *H. pylori*, propôs que a super-expressão da p53 observada nas lesões benignas, como gastrite crônica e úlcera gástrica pode ser devido a produção excessiva e estabilização da forma selvagem, relacionada a uma resposta inflamatória da mucosa induzida por outros fatores endógenos e exógenos, já que não observou associação com a infecção pela *H. pylori*. Nos casos de metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico, a super-expressão da p53 deve ser devido a forma mutada dessa proteína, pois mutações no gene *TP53* ocorre como um evento precoce na carcinogênese gástrica, tendo sido descritas em metaplasia intestinal (SHIAO et al, 1994; GOMYO et al, 1996).

De modo contrário, outros estudos relataram a ocorrência de associação entre infecção pela *H. pylori* e a expressão aumentada da p53 em metaplasia intestinal e câncer gástrico (NARDONE et al, 1999; ASHKTORAB et al, 2003; UNGER et al, 2003), assim como a associação entre aumento de apoptose e p53 na presença da infecção pela *H. pylori* (ASHKTORAB et al, 2003; UNGER et al, 2003).

O aumento da p53 em lesões gástricas benignas induzida pela *H. pylori* está relacionada com a estabilização da p53 selvagem e ocorre provavelmente como um mecanismo protetivo das células, que resulta no bloqueio do ciclo celular e indução da apoptose (ASHKTORAB et al, 2003). A ausência desse fator protetivo pode aumentar o risco de câncer gástrico nos indivíduos infectados pela *H. pylori*. Por outro lado, a super-expressão da p53 relatada em adenocarcinoma gástrico

(ISHIDA et al, 1996; ASHKTORAB et al, 2003) deve refletir a ocorrência de mutações no gene *TP53*, evidenciando a forma mutada da proteína e assim reduzindo a sensibilidade das células sofrerem apoptose.

Similarmente aos resultados apresentados no presente estudo, quanto a não associação entre apoptose e expressão da p53, Ikeda et al (1998) também não observaram associação entre células gástricas cancerosas positivas para a proteína p53 e o índice apoptótico. Contudo, verificaram que o índice apoptótico e a expressão nuclear da p53 eram mais elevados em adenocarcinoma tipo intestinal (bem diferenciado) do que no adenocarcinoma tipo difuso (pobremamente diferenciado).

Deve ser considerada a possibilidade de algumas formas de apoptose serem induzidas por outras vias não envolvendo a proteína p53 selvagem (ISHIDA et al, 1996) e também a ocorrência de mutações em outros genes relacionados com a apoptose como o *Bcl-2*, *c-Myc* e *Ras*, que têm participação na carcinogênese gástrica.

CONCLUSÃO

V. CONCLUSÕES



V. Conclusões

1. As técnicas imuno-histoquímicas TUNEL e expressão da caspase-3 ativada não evidenciaram apoptose aumentada entre os grupos de lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico. No entanto, a técnica TUNEL destaca um índice apoptótico estatisticamente maior na amostra de gastrite atrófica crônica, enquanto a expressão da caspase-3 ativada, um índice apoptótico estatisticamente mais elevado na amostra de gastrite crônica não-atrófica em relação à mucosa normal. Portanto, corroborando a ocorrência de apoptose elevada em gastrite crônica.
2. Ambas as técnicas evidenciam frequências maiores de casos TUNEL positivos e CPP32 positivos nas amostras de gastrite crônica atrófica e não-atrófica, novamente destacando uma maior ocorrência de apoptose nesses tipos de lesões.
3. Lesões benignas pré-neoplásicas, como úlcera gástrica e metaplasia intestinal e o adenocarcinoma gástrico, independente do subtipo histológico, intestinal ou difuso, não apresentam apoptose aumentada.
4. Não há indicação de correlação entre os índices apoptóticos obtidos pelas técnicas TUNEL e expressão da caspase-3 ativada em mucosa gástrica normal e lesões gástricas benignas, como gastrite crônica atrófica e não-atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal, provavelmente devido à essas técnicas serem específicas para a detecção de determinadas características do processo apoptótico em fases distintas, sendo que a expressão da caspase-3 ativada precede a fragmentação do DNA,

detectada pela técnica TUNEL. Porém, ambas as técnicas são acuradas e sensíveis para indicação de apoptose em tecido gástrico.

5. A infecção pela *H. pylori* parece não aumentar a frequência de apoptose detectada por ambas as técnicas, pois não há diferenças significantes entre os índices apoptóticos dos casos *H. pylori* positivos e negativos, em cada grupo de lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico. Contudo, a infecção pela bactéria, confere um índice apoptótico estatisticamente maior nas amostras de úlcera gástrica e metaplasia intestinal em relação a mucosa normal, apenas quando é avaliado pela expressão da caspase-3 ativada. Portanto, não foi possível estabelecer uma associação entre apoptose e infecção pela bactéria *H. pylori* nas amostras de lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico.

6. Não há evidências de associação entre a ocorrência de aneuploidias e super-expressão da proteína p53 e apoptose aumentada nas amostras de gastrite crônica atrófica e não-atrófica, úlcera gástrica, metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico.



VI. RESUMO

VI. Resumo

A apoptose, uma forma de morte celular geneticamente regulada, desempenha função essencial na manutenção da integridade da mucosa gastrointestinal. A sua desregulação está associada com a ocorrência de lesões como a gastrite atrófica, a úlcera péptica e a tumorigênese do estômago. A detecção de células apoptóticas tem sido baseada na morfologia e observação do DNA fragmentado por técnicas bioquímicas e histoquímicas, assim como por métodos mais específicos, como a detecção de proteínas expressadas e ativadas seletivamente. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a frequência de células apoptóticas pelas técnicas imuno-histoquímicas TUNEL e expressão da caspase-3 ativada (CPP32) em lesões gástricas benignas (gastrite crônica atrófica e não-atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal) e adenocarcinoma gástrico, e a ocorrência de associação com a infecção pela bactéria *H. pylori*, aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 detectadas pela técnica FISH e expressão aumentada da proteína p53. Apesar dos índices apoptóticos (IA) nas amostras de gastrite atrófica crônica (GAC) e gastrite crônica não-atrófica (GNA) serem mais elevados, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos tanto pela técnica TUNEL ($F=1,60$; $p=0,1670$) como com o anticorpo CPP32 ($F=1,70$; $p=0,1420$). Contudo, as amostras de GAC e GNA apresentaram IA estatisticamente maiores em relação à mucosa normal. Quando considerou-se, em cada amostra, o número de casos com IA aumentados (TUNEL+ e CPP32+) também as amostras de GAC e GNA apresentaram uma maior frequência de casos positivos para apoptose. Apesar de ambas as técnicas serem acuradas e sensíveis

para a detecção de células apoptóticas, de modo geral não houve correlação entre os IA encontrados pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada nas amostras de mucosa normal e lesões gástricas benignas. A investigação de associação entre apoptose e infecção pela *H. pylori*, aneuploidias e expressão da proteína p53 foi observada apenas no grupo de GNA ($p=0,0297$), em que ocorreu frequência estatisticamente maior de casos com infecção pela *H. pylori* e negativos para a caspase-3 ativada. Dessa forma, o presente estudo evidencia a ocorrência de apoptose em lesões gástricas benignas, principalmente em gastrite atrófica crônica e gastrite crônica não-atrófica, não necessariamente relacionada com infecção pela *H. pylori*, aneuploidias e expressão aumentada da p53, reforçando a participação de lesões gástricas com potencial pré-canceroso na tumorigênese do estômago. Também indica as técnicas TUNEL e expressão da caspase-3 ativada como adequadas para avaliação de apoptose no epitélio gástrico, apesar que, de modo geral, não tenha sido observada correlação entre os IA encontrados por ambas as técnicas nos diferentes grupos, provavelmente devido a estes marcadores detectarem apoptose em diferentes fases do processo.

Palavras-chaves: apoptose, TUNEL, caspase-3 ativada, lesões gástricas benignas, adenocarcinoma gástrico, *H.pylori*.

VII. ABSTRACT

VII. Abstract

Apoptosis, a form of genetically regulated cell death, has an essential function in maintaining the integrity of the gastrointestinal mucosa. Its deregulation is associated with the occurrence of lesions like atrophic gastritis, peptic ulcers and stomach tumorigenesis. The detection of apoptotic cells has been based on the morphology and detection of DNA fragmented by biochemical and histochemical techniques, as well as by more specific methods, like the detection of selectively activated and expressed proteins. Thus, the objective of this study was to investigate the frequency of apoptotic cells by TUNEL and the expression of activated caspase-3 (CPP32) immuno-histochemical techniques in benign gastric lesions (atrophic and non-atrophic chronic gastritis, gastric ulcers and intestinal metaplasia) and gastric adenocarcinoma, and the occurrence of an association with infection by the bacteria *H. pylori*, aneuploidy of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17 detected by the FISH technique and the increased expression of the protein p53. Despite the more elevated levels of apoptotic indices (IA) in the samples of atrophic chronic gastritis (GAC) and non-atrophic chronic gastritis (GNA), no significant differences were observed between the groups, whether by the TUNEL technique ($F=1.60$; $p=0.1670$) or by the CPP32 antibody ($F=1.70$; $p=0.1420$). Nonetheless, the samples of GAC and GNA had IA that were statistically higher in relation to normal mucosa. When one takes into consideration the number of cases in each sample with increased IA (TUNEL+ and CPP32+), the samples of GAC and GNA also presented a greater frequency of apoptosis-positive cases. Despite the fact that both techniques are accurate and sensitive for the detection of

apoptotic cells, generally there was no correlation between the IA detected by the TUNEL and activated caspase-3 techniques in normal mucosa sample and those of benign gastric lesions. The investigation of the association between apoptosis and *H. pylori* infection, aneuploidy and the expression of p53 protein was only observed in the GNA group ($p=0.0297$), in which there was a statistically higher frequency of *H. pylori* infection cases and negative activated caspase-3 results. Thus, this study demonstrates the occurrence of apoptosis in benign gastric lesions, principally in atrophic and non-atrophic chronic gastritis, not necessarily related to *H. pylori* infection, aneuploidy and the -increased expression of p53, reinforcing the participation of gastric lesions with pre-cancerous potential in stomach tumorigenesis. It also indicates that TUNEL and activated caspase-3 techniques are adequate for the evaluation of apoptosis in the gastric epithelium, although, in general, no correlation has been observed between the IA found by both techniques in the different groups, probably due to these markers detecting apoptosis in different steps of the process.

Key words: apoptosis, TUNEL, activated caspase-3, benign gastric lesions, gastric adenocarcinoma, *H. pylori*.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



VIII. Referências Bibliográficas

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.

Amarente-Mendes, G.P. et al. Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death Different*, v.5, p.298-306, 1998.

Anand, B.S.; Graham, D.Y. Ulcer and gastritis. *Endoscopy*, v. 31, p. 215-225, 1999.

Anti, M.; Armuzzi, A.; Gasbarrini, A. Importance of changes in epithelial cell turnover during *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis. *Gut*, v. 43, p. S27-S32, 1998.

Armstrong, R.C. et al. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J Neurosci*, v.17, p.553-562, 1997.

Ashe, P.C.; Berry, M.D. Apoptotic signaling cascades. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 27, p. 199-214, 2003.

Ashkenazi A.; Dixit, V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*, v. 11, p. 255-260, 1999.

Ashkenazi, A.; Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, v. 281, p. 1305-1308, 1998.

Ashktorab, H. et al. p53 and p14 increase sensitivity of gastric cells to *H. pylori*-induced apoptosis. *Dig Dis Sci*, v. 48, p. 1284-1291, 2003.



Attallah, A. M. et al. Apoptosis in Chronic Gastritis: Evaluation of the gastric mucosa by DNA flow cytometry and the expression of the high molecular weight cytokeratin. *Hepato-Gastroenterology*, v.43, p.1305-1312, 1996.

Azuma, T. et al. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer*, v. 82, p. 1013-1018, 1998.

Balint, E.E.; Vousden, K.H. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer*, v. 85, p. 1813-1823, 2001.

Bates, S.; Vousden, K.H. mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, v. 55, p. 28-37, 1999.

Benchimol, S. et al. Transformation associated p53 is encoded by a gene on human chromosome 17. *Som. Cell Mol. Gen.*, v.11, p. 505-509, 1985.

Bennet, M.R. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res*, v. 41, p. 361-368, 1999.

Beutler, B.; Van Huffel, C. Unraveling function of the TNF ligand and receptor families. *Science*, v. 264, p. 667-669, 1994.

Blaser, M.J.; Perez-Perez, G.I.; Kleanthous, H. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing CagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, v.55, p.2111-2115, 1995.

Böhm, I.; Schild, H. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol Imag Biol*, v. 5, p. 2-14, 2003.



César, A.C.G. Investigação de aneuploidias, deleção e expressão do gene *TP53* e infecção pelo *Helicobacter pylori* em lesões benignas e adenocarcinomas gástricos, 2003, 162 f. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, 2003.

Cheli, R.; Giacosa, A. Atrophic gastritis. In: Sherlock, P. et al. Precancerous lesion for the gastrointestinal tract. New York: Raven Press, 1983.

Chen, G.; Goeddel, D.V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, v. 296, p. 1634-1635, 2002.

Chen, Z. et al. ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene*, v. 18, p. 173-180, 1999.

Chenghua, G. et al. Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *J Neurosci*, v.19, p.3043-3049, 1999.

Chung, S.S. et al. Relation of apoptosis and cell proliferation in *Helicobacter pylori* infection. *Kor J Gastroenterol*, v. 32, p. 427-434, 1998.

Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. Pathologic basis of disease. 6 ed. Philadelphia: WB. Saunders, 1999.

Cover, T.L.; Blaser, M.J. *Helicobacter pylori*: a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. *Am Soc Micro News*, v.61, p.21-26, 1995.

De Vita, V.T.Jr.; Hellman, S.; Rosenberg, S.A. Cancer – Principles and practice of oncology. 5 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, v. 1, 1997.

Dixon, M.F. et al. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney System. *Am J Surg Pathol*, v. 20, p. 1161-1181, 1996.



Du, C. et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, v. 102, p. 33-42, 2000.

Forman, D. et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from perspective investigation. *Br Med J*, v. 302, p. 1302-1305, 1991.

Frankfurt, O.S.; Krishan, A. Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin. *J Histochem Cytochem*, v. 49, p. 369-378, 2001.

Fulda, S. et al. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene*, v. 20, p. 5865-5867, 2001.

Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Bem-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, v.119, p.493-501, 1992.

Genta, R.M. Gastric atrophy and atrophic gastritis – nebulous concepts in search of definition. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 12, p. 17-23, 1998.

Genta, R.M. *Helicobacter pylori* as a promotor of intestinal metaplasia and gastric cancer: an alluring hypothesis in search of evidence. *Eur J Gastroenterol Hepathol*, v. 7, p. S25-30, 1995.

Giannopoulou, I. et al. Immunohistochemical study of pro-apoptotic factors Bax, Fas and CPP32 in urinary bladder cancer: prognostic implications. *Urol Res*, v. 30, p. 342-345, 2002.



Gold, R. et al. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Lab Invest*, v. 71, p. 219-225, 1994.

Gomyo, Y. et al. Numerical aberration and point mutation of p53 gene in human gastric intestinal metaplasia and well-differentiated adenocarcinoma: analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Int J Cancer*, 1996.

Hadjiloucas, I. et al. Assessment of apoptosis in human breast tissue using an antibody against the active form of caspase 3: relation to tumour histopathological characteristics. *Br J Cancer*, v. 85, p. 1522-1526, 2001.

Hall, P.A. Assessing apoptosis: a critical survey. *Endocr Relat Cancer*, v. 6, p. 3-8, 1999.

Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, p. 57-70, 2000.

Hansson, L.; Nyren, O.; Hsing, A.W. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med*, v. 335, p. 242-249, 1998.

Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, v. 407, p. 770-776, 2000.

Hilton, D.A.; Love, S. Barber, R. Demonstration of apoptotic cells in tissue sections by *in situ* hybridization using digoxigenin-labeled poly(A) oligonucleotide probes to detect thymidine-rich DNA sequences. *J Histochem Cytochem*, v. 45, p. 13-20, 1997.

Hirasawa, R. et al. Increase in apoptosis and decrease in ornithine decarboxylase activity of the gastric mucosa in patients with atrophic gastritis and gastric ulcer after successful eradication of *Helicobacter pylori*. *The Am J Gastroenterol*, v.94, p.2398-2402, 1999.

Hoshi, T et al. Immunohistochemistry of caspase2/CPP32 in human stomach and its correlation with cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res*, v. 18, p. 4347-4353, 1998.

Hsia, J.Y. et al. Prognostic significance of caspase-3 expression in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *EJSO*, v. 29, p. 44-48, 2003.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Helicobacter pylori*. In: Schistosomes, liver flukes, and *Helicobacter pylori*: views and expert opinions of na IARC Working Group of the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon: IARC, 177-240, 1994.

Ikedo, M. et al. Frequent occurrence of apoptosis is an early event in the carcinogenesis of human gastric carcinoma. *Virchows Arch*, v. 432, p. 43-47, 1998.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2002.

Ishida M. et al. Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, dysplasia and carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling. *Virchows Arch*, v.428, p.229-235, 1996.

Itoh, M. et al. Cleavage of Bax-alpha and Bcl-x (L) during carboplatin-mediated apoptosis in squamous cell carcinoma cell line. *Oral Oncol*, v. 36, p. 277-285, 2000.

Jäättelä, M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*, v. 248, p. 30-43, 1999.

Jang, T.J. et al. Decreased gastric proliferation of foveolar epithelial cells after the eradication of *Helicobacter pylori*. *J Kor Med Sci*, v. 12, p. 421-426, 1997.

Jang, T.J.; Kim, J.R. Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial cells of patients infected with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol*, v. 35, p. 265-271, 2000.

Jass, J.R.; Filipe, M.I. Variants of intestinal metaplasia associated with gastric carcinoma. A histochemical study. *Histopathology*, v. 3, p. 191-199, 1997.

Jeon, B.S. et al. Activation of caspase-3 in developmental models of programmed cell death in neurons of the substantia nigra. *J Neurochem*, v.73, p.322-333, 1999.

Joza, N. et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, v. 410, p. 549-554, 2001.

Kang, P.M.; Izumo, S. Apoptosis and heart failure. A critical review of the literature. *Circ Res*, v. 86, p. 1107-1113, 2000.

Kerr, J.F.R.; Winterford, C.M.; Harmon, B.V. Apoptosis, its significance in cancer and therapy. *Cancer*, v. 73, p. 2013-2026, 1994.

Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, v. 26, p. 239-256, 1972.

Kohda, K. et al. Role of apoptosis induced by *Helicobacter pylori* infection in the development of duodenal ulcer. *Gut*, v.44, p.456-462, 1999.

Kondo, S. et al. Retroviral transfer of CPP32 beta gene into malignant gliomas *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res*, v. 5, p. 962-967, 1998.

Korsmeyer, S.J. Regulators of cell death. *Trends Genet*, v. 11, p. 101-105, 1995.

Krajewska, M. et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. *Am J Pathol*, v. 149, p. 1449-1557, 1996.

Kruidering, M.; Evan, G.I. Caspase 8 in apoptosis: the beginning of "the end"? *Life*, v. 50, p. 85-90, 2000.

Lauren, P. The two histological main types of gastric cancer: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand*, v. 64, p. 331-349, 1965.

Lazebnik Y.A. et al. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by proteinase with properties like ICE. *Nature*, v. 371, p. 346-347, 1994.

Lee, S.H. et al. Immunohistochemical localization of FAP-1, an inhibitor of Fas-mediated apoptosis, in normal and neoplastic human tissues. *APMIS*, v. 107, p. 1101-1108, 1999.

Leung, W.K. et al. Apoptosis and proliferation in *Helicobacter pylori*-associated gastric intestinal metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 15, p. 1467-1472, 2001.

Levine, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, v. 88, p. 323-331, 1997.

Lipponen, P. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocr Relat Cancer*, v. 6, p. 13-16, 1999.

Loro, L.L.; Vintermyr, O.K.; Johannessen, A.C. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med*, v. 32, p. 125-138, 2003.

Magnusson, C.; Vaux, D.L. Signalling by CD95 and TNF receptors: not life and death. *Immunol Cell Biol*, v. 77, p. 41-46, 1999.

Mainwaring, P.N. et al. Comparison of in situ methods to assess DNA cleavage in apoptotic cells in patients with breast cancer. *J Clin Pathol*, v. 51, p. 34-37, 1998.

Matsumiya, T. et al. Cisplatin inhibits the expression of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in an oral carcinoma cell line. *Oral Oncol*, v. 37, p. 296-300, 2001.

McCarthy, N.J. et al. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol*, v.136, p.215-227, 1997.

McConnell, K.R.; Dynan, W.S.; Hardin, J.A. The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (p460) is cleaved during Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells. *J Immunol*, v. 158, p. 2083-2089, 1997.

Moss, S. F. et al. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut*, v.38, p.498-501, 1996.

Moss, S.F. The carcinogenesis effect of *H. pylori* on gastric epithelial cell. *J Physiol Pharmacol*, v. 50, p. 847-856, 1999.

Nardone, G. et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut*, v.44, p.789-799, 1999.

Nardone, G. Molecular basis of gastric carcinogenesis. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 17, p. 75-81, 2003.

Naruse, I.; Keino, H.; Kawarada, Y. Antibody against single-stranded DNA detects both programmed cell death and drug-induced apoptosis. *Histochemistry*, v. 101, p. 73-78, 1994.



Nicholson, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, v. 6, p. 1028-1042, 1999.

NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer diseases. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA*, v. 272, p. 65-69, 1994.

Noguchi, K. et al. Analysis of cell damage in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Pathol Int*, v. 52, p. 110-118, 2002.

Park, W.S. et al. Inactivating mutations of the caspase-10 gene in gastric cancer. *Oncogene*, v. 21, p. 2919-2925, 2002.

Parsonnet, J. et al, *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med*, v. 325, p. 1127-1131, 1991.

Parsonnet, J. et al. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, v. 40, p. 297-301, 1997.

Parton, M. et al. Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy. *Clin Cancer Res*, v. 8, p. 2100-2108, 2002.

Peek, R.M.; Kerr, L.D.; Miller, G.G. *H. pylori* induces apoptosis in gastric epithelial cells by a NFκ-B-independent mechanism. *Gut*, v.41, A45, 1997.

Potten, C.S. What is an apoptotic index measuring? A commentary. *Br J Cancer*, v. 74, p. 1743-1748, 1996.

Potthoff, A.S. et al. Significance of the caspase family in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis. *Helicobacter*, v. 7, p. 367-377, 2002.

Que, F.G.; Gores, G.J. Cell death apoptosis: Basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology*, v.110, p.1238-1243, 1996.

Reed, J.C. Apoptotic-based therapies. *Nat Rev Drug Disc*, v. I, p. 111-121, 2002.

Reed, J.C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, v. 17, p. 3225-3236, 1998.

Robertson, J.D.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. Nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol*, v. 129, p. 346-358, 2000.

Ryan, K.M.; Phillips, A.C.; Vousden, K.H. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*, v. 13, p. 332-337, 2001.

Saegusa, M.; Takano, Y.; Okayasu, I. Bcl-2 expression and its association with cell kinetics in human gastric carcinomas and intestinal metaplasia. *J Cancer Res Clin Oncol*, v.121, p.357-363, 1995.

Safatle-Ribeiro, A.; Ribeiro, U.; Reynolds, J.C. Gastric stump cancer: What is the risk? *Dig Dis*, v. 16, p. 159-168, 1998.

Saraste, A.; Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, v. 45, p. 528-537, 2000.

Satahel, R.A.; Zangemeister-Wittke, U. Antisense oligonucleotides for cancer therapy – an overview. *Lung Cancer*, v. 41, p. S81-88, 2003.

Satoh, K. et al. Change in apoptosis in the gastric surface epithelium and glands after eradication of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci*, v. 35, p. 78-84, 2003.

Satoh, K. et al. p53 expression in the gastric mucosa before and after eradication of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, v. 6, p. 31-36, 2001.



Savill, J.; Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, v. 407, p. 784-788, 2000.

Scheiman, J.M.; Cutler, A.F. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer. *Am J Medicine*, v.106, p.222-226, 1999.

Schendel, S.L. et al. Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, Bid. *J Biol Chem*, v. 274, p. 21932-21936, 1999.

Schneider, P.; Tschopp, J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv*, v. 74, p. 281-286, 2000.

Shiao, Y.H. et al. p53 alteration gastric precancerous lesions. *Am J Pathol*, v. 144, p. 511-517, 1994.

Sipponen, P.; Kekki, M.; Siurala, M. Precancerous conditions. Gastric cancer. Current problems in tumour pathology. London: Churchill Livingstone, p. 152-171, 1985.

Smoot, D.T. et al. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. *Carcinogenesis*, v. 21, p. 2091-2095, 2000.

Stadelmann, C. et al. Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, v.155, p.1459-1466, 1999.

Stadelmann, C.; Lassmann, H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res*, v. 301, p. 19-31, 2000.

Steininger, H. et al. Apoptosis in chronic gastritis and its correlation with antigastric autoantibodies. *Virchows Arch*, v.433, p.13-18, 1998.

Teitz, T. et al. Caspase-8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat med*, v. 6, p. 529-535, 2000.

The Eurogast Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric. *Lancet*, v. 341, p. 1359-1362, 1993.

Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, v. 267, p. 1456-1462, 1995.

Thornberry, N.A.; Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science*, v. 281, p. 1312-1316, 1998.

Tsuji, S. et al. Ammonia induces gastric cell apoptosis: possible implication to *Helicobacter*-related gastric mucosa atrophy. *Gastroenterology*, v.108, A244, 1995.

Tsujimoto, Y. et al. The t(14;18) chromosome translocation involved in the B cell neoplasms results from mistakes in VDJ joining. *Science*, v. 229, p. 1390-1393, 1985.

Uemura, N et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*, v. 345, p. 784-789, 2001.

Unger, Z. et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection and eradication on gastric epithelial cell proliferation and apoptosis. *J Physiol*, v. 95, p. 355-360, 2001.

Unger, Z. et al. Mutant p53 expression and apoptotic activity of *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis in cirrelation with the presence of intestinal metaplasia. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v. 15, p. 389-393, 2003.

Vakkala, M. et al. Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res*, v. 5, p. 319-324, 1999.



Valen, G. The basic biology of apoptosis and its implications for cardiac function and viability. *Ann Thorac Surg*, v. 75, p. 656-660, 2003.

Van der Woude, C.J. et al. Diffuse and intestinal type gastric carcinomas differ in their expression of apoptosis related proteins. *J Clin Pathol*, v. 56, p. 699-702, 2003.

Vaux, D.L.; Korsmeyer, S.J. Cell death in development. *Cell*, v. 96, p. 245-254, 1999.

Verhagen, A. et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, v. 102, p. 43-53, 2000.

Von Herbay, A.; Rudi, J. Role of apoptosis in gastric epithelial turnover. *Microscopy Research and Technique*, v.48, p.303-311, 2000.

Vorobjova, T. et al. Apoptosis in different compartments of antrum and corpus mucosa in chronic *Helicobacter pylori* gastritis. An 18-year follow-up study. *Scand J Gastroenterol*, v. 36, p. 136-143, 2001.

Vousden, K.H. p53: death star. *Cell*, v. 103, p. 691-694, 2000.

Wagner, S. et al. Regulation of gastric apithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: evidence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology*, v. 113, p. 1836-1847, 1997.

Wajant, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, v. 296, p. 1635-1636, 2002.



Waldmeier, P.C. Prospects for antiapoptotic drug therapy of neurodegenerative diseases. *Prog. Neuro-Psycho-pharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 27, p. 303-321, 2003.

Wallach, D. et al. Tumour necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*, v. 17, p. 331-367, 1999.

Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, v. 15, p. 2922-2933, 2001.

Watanabe, I. et al. Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different *in situ* methods: antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labelling (TUNEL) methods. *Jpn J Cancer Res*, v. 90, p. 188-193, 1999.

Wei, M.C. et al. Proapoptotic Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, v. 292, p. 272-730, 2001.

Wijsman, J.H. et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: *in situ* end-labelling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem*, v. 41, p. 7-12, 1993.

Wyllie, A.H. Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer*, v. 67, p. 205-208, 1993.

Wyllie, A.H.; Kerr, J.F.; Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, v. 68, p. 251-306, 1980.

Xia, H.H.X.; Talley, N.J. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *The Am J Gastroenterol*, v. 96, p. 16-26, 2001.

Yin, X.M. et al. Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. *J Biol Chem*, v. 277, p. 42074-42081, 2002.

Yoo, N.J. et al. Stomach cancer highly expresses both initiator and effector caspases; an immunohistochemical study. *APMIS*, v. 110, p. 825-832, 2002.

Yoshimura, T et al. Gastric mucosal inflammation and epithelial cell turnover are associated with gastric cancer in patients with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Pathol*, v. 53, p. 532-536, 2000.

Zar, J.H. Bioestatística Analysis. 4. Ed. Prentice-Hall, Inc. Simon & Schuster/A Viacom Company, p. 663, 1999.

Fonte consultada:

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: Informação e Documentação: Referências: Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10520** - Informação e Documentação: Citações em Documentos - Apresentação. Rio de Janeiro, Agosto, 2002.



