

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE SMAC/ DIABLO, AIF, CITOCROMO C E CASPASE-3 CLIVADA EM ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS E SUA CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS E MORFOLÓGICOS

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF SMAC/DIABLO, AIF, CYTOCHROME C AND CLEAVED CASPASE-3 IN GASTRIC ADENOCARCINOMAS AND CLINICAL AND MORPHOLOGICAL CORRELATION

Larissa Comparini da Silva Nascimento

Departamento de Patologia, Universidade Federal de
São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil.

Viviane Carlin

Departamento de Biologia Molecular, Universidade
Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil.

Ricardo Artigiani Neto

Departamento de Patologia, Universidade Federal de
São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil.

Paolo Rugerro Errante

Departamento de Farmacologia, Universidade Federal
de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil. Laboratório de
Funcionômica (Departamento de Farmacologia) - Escola
Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo-
UNIFESP, Brasil. Av. Pedro de Toledo, 699, 7º andar. São
Paulo-SP-Brasil. E-mail:errantepr@yahoo.com.

RESUMO

Introdução: O câncer gástrico é um dos tumores malignos mais comuns e a segunda causa de morte associada ao câncer no mundo. Objetivo: Avaliar a imunopresença de Smac/DIABLO, AIF, citocromo c e caspase-3 clivada em carcinomas gástricos e verificar suas correlações com parâmetros clínicos e morfológicos. Metodologia: Arranjo tecidual de matriz foi construído a partir de 87 amostras teciduais em blocos de parafina contendo amostras teciduais de carcinoma gástrico e mucosa gástrica

adjacente não tumoral de 87 amostras controle. Os achados de imuno-histoquímica foram correlacionados com os parâmetros clínicos e histológicos dos pacientes. Resultados: O experimento teve a participação de 56,8% dos pacientes no estudo do sexo masculino, e 78.1% com idade superior a 50 anos. Os linfonodos estiveram comprometidos em 72.4% dos casos, sendo o carcinoma gástrico do tipo intestinal o mais verificado (67.8%). Houve um predomínio de cânceres com mais de 3 cm de tamanho (75.9%). Diferença estatística significativa foi observada para a associação Smac/DIABLO e localização do câncer no antro ($p=0.049$), citocromo c com o carcinoma gástrico do tipo difuso ($p=0.018$), e caspase-3 clivada com o carcinoma gástrico do tipo difuso ($p=0.049$). Conclusão: Foi observada uma associação entre a expressão de Smac/DIABLO com a localização do câncer no antro, citocromo c e caspase 3 clivada com o tipo histológico do tipo difuso.

Palavras-chave: Câncer; apoptose; imuno-histoquímica; adenocarcinoma gástrico.

ABSTRACT

Introduction: The gastric cancer is one of the most common malignant tumors and the second leading cause of cancer-related deaths in world. Objective: To analyze the immunoexpression of Smac/DIABLO, AIF, cytochrome c and cleaved caspase-3 in gastric cancer and verify their correlations with clinical and morphological parameters. Methods: A tissue microarray paraffin block was constructed using gastric carcinoma tissue and adjacent normal adjacent mucosa from 87 patients. These results are associated with clinical and histological parameters. Results: The experiment had the participation of 56,8% of patients in the study were male and 78.1% older than 50 years. Lymph nodes were compromised in 72.4% of cases, gastric carcinoma of intestinal type as found (67.8%). There was a predominance of cancers larger than 3 cm in size (75.9%). Statistically significant differences were observed for the association Smac/DIABLO and location of the tumor in antrum ($p=0.049$), cytochrome c with gastric carcinoma of the diffuse type ($p=0.018$), and cleaved caspase-3 with gastric carcinoma of the diffuse type ($p=0.049$). Conclusion: Was observed an association between the expressions of Smac/DIABLO with cancer localization, cytochrome c and cleaved caspase-3 with diffuse histological type.

Keywords: Cancer; apoptosis; immuno-histochemical; gastric adenocarcinoma.

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma gástrico é a segunda maior causa de óbitos relacionados ao câncer no mundo, com significado epidemiológico na Ásia, leste Europeu e América Latina ^{1,2,3}. Apesar das diferenças de incidência e dos programas de detecção precoce entre o Oriente e o Ocidente, a sobrevida em 5 anos é de 30% nos países desenvolvidos e de 20% nos países em desenvolvimento ⁴.

Histologicamente o carcinoma gástrico é dividido em duas variantes, do tipo intestinal e do tipo difuso. O carcinoma do tipo intestinal é acompanhado de formação papilar ou componente sólido ⁵, ao passo que o carcinoma do tipo difuso é constituído por células em anel de sinete, caracterizadas por alteração da relação núcleo citoplasma, hipercromasia nuclear, muco intracitoplasmático e nucléolo evidente ⁶.

A apoptose é um mecanismo fisiológico de morte celular que se encontra alterado no processo de tumorigênese, e três vias de sinalização estão correlacionadas com a apoptose; a via extrínseca, via intrínseca, e a via ativada pelo fator de indução de apoptose (AIF) ⁷. Na via ativada pelo AIF ocorre liberação de fatores apoptogênicos como o AIF, citocromo c e Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-Binding Protein with Low pI) ⁸. O AIF é uma proteína mitocondrial que se translocado para o núcleo e inicia a condensação da cromatina e fragmentação do DNA ⁷. O citocromo c é translocado da membrana mitocondrial para o citoplasma, liga-se à protease ativadora do fator 1 (APAF-1) formando um complexo citosólico que converte a pró-caspase 9 em caspase 9, que ativa as caspases efetoras 3 e 7 ⁹.

Smac/DIABLO tem um efeito pró-apoptótico no citoplasma mediado por sua interação com proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) e liberação de caspases ¹⁰.

O objetivo deste trabalho foi avaliar por imuno-histoquímica a expressão de Smac/DIABLO, AIF, citocromo c e caspase-3 clivada no carcinoma gástrico e correlacionar estes parâmetros com as variáveis clínicas dos pacientes e morfológicas dos tumores na busca de novos marcadores prognósticos e potenciais alvos terapêuticos.

2. METODOLOGIA

2.1 Pacientes

Foram preparadas lâminas de arranjo tecidual em matriz (ATM) a partir de 87 amostras teciduais em blocos de parafina obtidos do Departamento de Patologia da UNIFESP/EPM. As amostras de adenocarcinoma gástrico foram obtidas de pacientes atendidos no ambulatório de Gastro-Oncologia da Disciplina de Gastroenterologia da UNIFESP/EPM, no período de janeiro/2000 a maio/2005 que não apresentavam história prévia de radioterapia ou quimioterapia. Como controle foram avaliadas 87 amostras de mucosas gástricas morfolologicamente normais, provenientes da margem adjacente dos adenocarcinomas dos mesmos pacientes. Os dados clínicos foram coletados dos prontuários dos pacientes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM (CEP: 0129/10).

2.2 Construção do Arranjo Tecidual em Matriz

Para a confecção do Arranjo Tecidual em Matriz (ATM) os blocos com material embebido em parafina, os cortes histológicos foram corados por hematoxilina e eosina (H/E), para a seleção da área representativa do tumor. Os blocos foram puncionados, sendo removidos fragmentos com 1.0 mm de diâmetro para a confecção de dois blocos receptores. No primeiro foram incluídos 49 cilindros (adenocarcinoma gástrico + mucosa normal) e no segundo bloco foram incluídos 38 cilindros (adenocarcinoma gástrico + mucosa normal). Os blocos foram colocados na estufa a 35°C por 15 minutos para permitir a aderência entre a parafina do bloco e os cilindros. Após a aderência, os blocos receptores foram retirados da estufa e cortados com espessura de 4 micromêtros. Para manter a aderência, as lâminas foram submetidas à luz ultravioleta por 15 minutos, colocadas em solução solvente TPC por 15 minutos e armazenadas a -20°C.

2.3 Imuno-histoquímica

Para a realização da imuno-histoquímica, as lâminas foram tratadas com 3-aminopropiltriétoxisilano (Sigma, Co-USA-A3648) e mantidos em estufa a 60°C por 12 horas. A seguir realizou-se a desparafinização das lâminas em xilol, hidratação com etanol 95% e lavadas em água corrente. A recuperação antigênica foi realizada em panela de vapor utilizando tampão citrato, pH 6.0, 95°C por 45 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da aplicação de peróxido de hidrogênio 3%, seguido de lavagem em água corrente e tampão PBS-BSA 1%, pH 7.4. O bloqueio de proteínas foi realizado através da aplicação de PBS-leite mólico desnatado 3% durante 30 minutos.

A incubação com o anticorpo primário (anti-Smac/Diablo diluição 1:200, Cell Signalling; anti-AIF diluição 1:300, Santa Cruz; anti-citocromo c, diluição 1:500, Santa Cruz; e anti-caspase-3 clivada, diluição 1:100, Calbiochem) foi realizada depois da diluição do anticorpo em tampão PBS-BSA 1%, em câmara úmida a 4°C por 18 horas.

As lâminas foram lavadas em tampão PBS e incubadas com o anticorpo secundário biotilado (Kit Advance-DAKO, Denmark) em câmara úmida a temperatura ambiente por 15 minutos, e depois lavadas duas vezes com tampão PBS. A seguir foi realizada a incubação com o complexo streptavidina-biotina (Kit Advance-DAKO, Denmark) em câmara úmida a temperatura ambiente por 15 minutos seguido de lavagem em tampão PBS.

As lâminas foram reveladas com substrato cromógeno (3´3 – diaminobenzidine – Sigma Co-USA- DS637) e água oxigenada 1% em tampão PBS pH 7.4 por 5 minutos a 37°C, e lavadas em água destilada. A contra-coloração foi realizada

com Hematoxilina de Harris por 30 segundos, seguida de lavagem em água destilada. As lâminas foram submetidas a desidratação em 3 banhos com etanol 95% e depois submetidas a 2 banhos de xilol para diafanização.

As lâminas foram montadas com lamínula utilizando resina Entellan (Sigma Co-USA), identificadas e visualizadas em microscópio óptico (Zeiss).

A positividade foi considerada pela formação de cor marrom-acastanhada na área nuclear (caspase-3 clivada) e citoplasma (Smac/DIABLO, AIF e citocromo c) (Figura 1). Como controle negativo foi omitido o anticorpo primário.

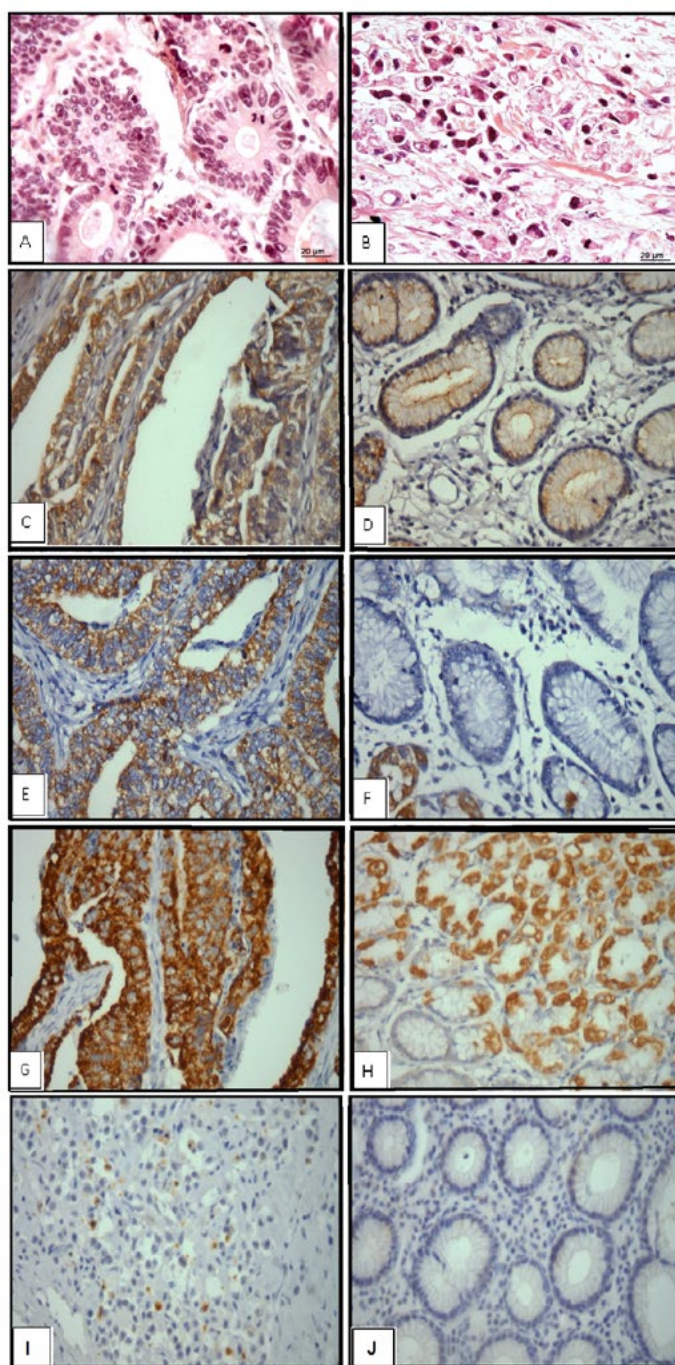


Figura 1 - Fotomicrografia de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (A) e do tipo difuso (B) corados por Hematoxilina-Eosina (H/E). Imunohistoquímica de Smac/

DIABLO em adenocarcinoma gástrico (C); Smac/DIABLO em mucosa gástrica não tumoral (D); AIF em adenocarcinoma gástrico (E); AIF em mucosa gástrica não tumoral (F); citocromo c em adenocarcinoma gástrico (G); citocromo c em mucosa gástrica não tumoral (H); caspase 3 clivada em adenocarcinoma gástrico (I); caspase-3 clivada em mucosa gástrica não tumoral (J). Aumento de 400x.

Smac/DIABLO, citocromo c e AIF foram analisados semiquantitativamente utilizando o sistema de escore, baseado na intensidade da reação e extensão da coloração. A intensidade da reação foi classificada em escala de 0 a 3 (0=negativo; 1=fraco; 2=moderado; 3=forte). A extensão da área positiva foi classificada em escala de 0 a 3 (0=0 a 10% das células neoplásicas coradas; 1=11 até 25%; 2=26 até 50%; e 3 acima de 51% das células neoplásicas coradas). O escore para cada reação foi realizado multiplicando-se a intensidade da coloração pela extensão da coloração. As reações com escore maior ou igual a 4 foram consideradas positivas, e com escore menor que 4 negativas. Caspase-3 clivada foi determinada através do número total de células coradas positivas por 200 células analisadas, sendo considerado positivo quando presentes no mínimo 10% de células marcadas.

2.4 Análise estatística

As comparações entre o tecido tumoral e normal, número de células positivas e negativas para as variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste T-Student pareado e para as comparações qualitativas, foi utilizado o teste de McNemar. A associação entre os achados imuno-histoquímicos (Smac/DIABLO, AIF, citocromo c e caspase-3 clivada) tumoral e de mucosa gástrica não tumoral foi avaliada pela correlação de Pearson. Os achados imuno-histoquímicos foram associados às variáveis clínicas dos pacientes e morfológicas do tumor pela Análise de Variância (ANOVA) considerando a idade como covariável. A curva de sobrevida e os achados imuno-histoquímicos foram calculados pelo método de Kaplan-Meier. As diferenças foram consideradas positivas quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

Neste estudo, 59.6% dos pacientes eram do sexo masculino e 78.1% apresentaram idade superior a 50 anos. Margem cirúrgica comprometida foi encontrada em 10.3% das amostras tumorais e linfonodos infiltrados por células tumorais em 72.4% das amostras. Oitenta e cinco por cento dos pacientes apresentou doença avançada e 13 pacientes estavam vivos durante o período de estudo. A maior parte dos pacientes do sexo masculino apresentou idade entre 50 e 69 anos, e as mulheres idade entre 60 e 79 anos (Tabela 1). Em relação ao tipo

histológico, o adenocarcinoma do tipo intestinal foi mais freqüente entre os homens com idade entre 50 e 69 anos, e o tipo difuso em mulheres entre 40 e 49 anos (Figura 2).

Tabela 1 - Variáveis clínicas dos pacientes com adenocarcinoma gástrico. n=número de casos.

	Parâmetros Clínicos	n (%)
Sexo	Masculino	51 (58.6%)
	Feminino	36 (41.4%)
Idade	≤50 anos	19 (21.8%)
	>50 anos	68 (78.1%)
Margem Cirúrgica	Livre	78 (89.7%)
	Comprometida	9 (10.3%)
Linfonodos Comprometidos	Metástase	63 (72.4%)
	Livre	24 (27.6%)
Estadiamento Clínico	I	13 (14.9%)
	II	15 (17.2%)
	III	58 (66.7%)
	IV	1 (1.1%)
Seguimento	Vivo com doença	13 (14.9%)
	Morte por câncer	64 (73.6%)
	Perdido seguimento	10 (11.5%)

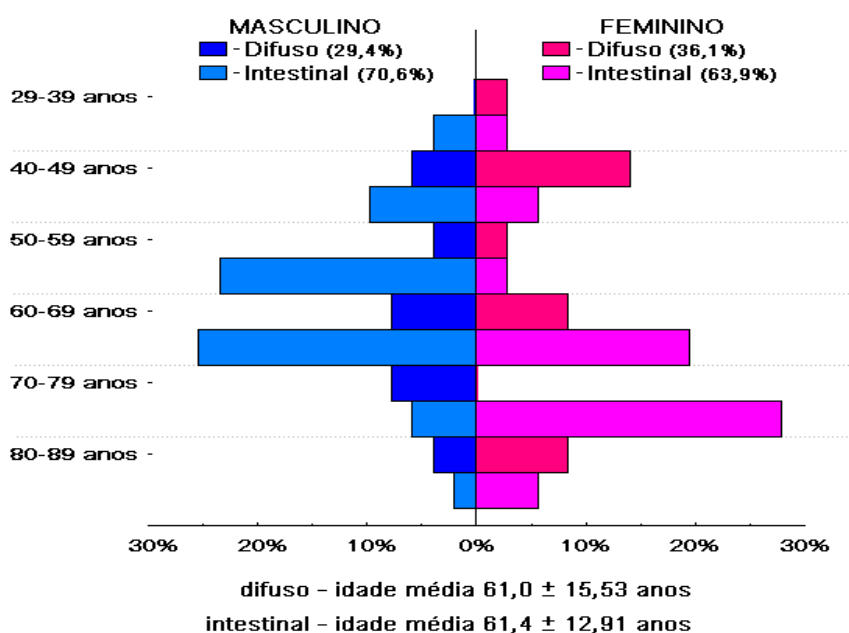


Figura 2 - Distribuição dos pacientes com adenocarcinoma gástrico por faixa etária, gênero e tipo histológico.

Adenocarcinoma do tipo intestinal foi observado em 67.8% dos casos, com 43.7% localizados no antro gástrico. Houve predomínio de tumores com tamanho maior que 3 centímetros (75.9%), e mais de 70% dos pacientes morreu após 24 meses do diagnóstico (Tabela 2).

Tabela 2 - Variáveis morfológicas do adenocarcinoma gástrico e tempo de seguimento dos pacientes. n=número de casos.

Adenocarcinoma gástrico	Parâmetros Morfológicos	n (%)
	Intestinal	59 (67.8%)
	Difuso	28 (32.2%)
Localização	Cárdia	29 (33.3%)
	Antro	38 (43.7%)
	Corpo	20 (23%)
Tamanho	≤3 cm	21 (24.1%)
	>3 cm	66 (75.9%)
Tempo de Seguimento		n (%)
	0,1 – 6 meses	21 (26.9%)
	6,1 – 12 meses	10 (12.8 %)
	12,1 – 24 meses	22 (28.2%)
	24,1 – 48 meses	12 (15.4%)
	> 48 meses	13 (16.7%)
	Sem seguimento	9 (10.34%)

A Tabela 3 apresenta a frequência de marcação de Smac/DIABLO, AIF, citocromo c e caspase-3 clivada nos ATM de adenocarcinoma gástrico e mucosa gástrica não tumoral. Marcação positiva para citocromo c foi observada em 68.9% das amostras tumorais e 54.4% na mucosa gástrica não tumoral.

Tabela 3 - Frequência de expressão de Smac/DIABLO, AIF, citocromo c, e caspase-3 clivada em amostras teciduais de adenocarcinoma gástrica e mucosa gástrica não tumoral.

	n	Negativo n (%)	Positivo n (%)
Adenocarcinoma gástrico			
Smac/DIABLO	81	44 (54.4%)	37 (45.6%)
AIF	84	53 (63.2%)	31 (36.9%)
Citocromo c	87	27 (30.9%)	60 (68.9%)
Caspase 3 clivada	87	66 (75.9%)	21 (24.1%)
Mucosa não tumoral			
Smac/DIABLO	79	42 (53.2%)	37 (46.8%)
AIF	79	43 (54.6%)	36 (45.6%)
Citocromo c	81	37 (45.6%)	44 (54.4%)
Caspase 3 clivada	87	84 (96.6%)	3 (3.4%)

A expressão de Smac/DIABLO foi associada a tumores localizados no antro ($p=0.049$) (Tabela 4), mas a expressão de AIF não esteve correlacionada com os parâmetros clínicos dos pacientes e morfológicos do tumor (Tabela 5). Foi verificada uma correlação positiva para o citocromo c e adenocarcinoma do tipo difuso ($p=0.018$) (Tabela 6).

Tabela 4 - Expressão de Smac/DIABLO em amostras teciduais de adenocarcinomas gástrica e mucosa gástrica não tumoral associada aos dados clínicos dos pacientes e morfológicos do tumor. * $p<0.05$ teste de McNemar.

	Adenocarcinoma gástrico			Mucosa gástrica não tumoral		
	Média (dp)	n	p	Média (dp)	n	p
Sexo						
Masculino	4.2 (3.02)	48	0.676	3.7 (3.30)	47	0.959
Feminino	4.0 (3.41)	33		3.8 (3.58)	32	
Estágio clínico						
I	4.4 (3.73)	12	0.740	5.1 (3.65)	12	0.162
II	4.3 (3.67)	14		3.7 (3.47)	14	
III	4.0 (2.96)	55		3.5 (3.30)	52	
IV		6			9	
Adenocarcinoma						
Difuso	3.6 (3.55)	24	0.234	4.3 (3.55)	25	0.432
Intestinal	4.4 (3.00)	57		3.5 (3.32)	54	
Localização						
Cárdia	4.0 (3.19)	25	0.049*	3.7 (3.37)	27	0.777
Antro	3.4 (2.79)	36		3.6 (3.45)	36	
Corpo	5.7 (3.36)	20		4.3 (3.46)	16	
Tamanho do Tumor						
≤3 cm	3.5 (3.09)	20	0.592	3.0 (2.57)	19	0.153
>3 cm	4.3 (3.19)	61		4.0 (3.60)	60	
Cirurgia						
Total	4.4 (3.09)	39	0.963	3.4 (3.60)	36	0.449
Parcial	3.9 (3.25)	42		4.0 (3.23)	43	
Margem Cirúrgica						
Livre	4.3 (3.20)	73	0.592	3.9 (3.39)	70	0.321
Comprometida	3.0 (2.78)	8		2.3 (3.28)	9	
Linfonodos						
Metástase	4.1 (3.01)	58	0.753	3.9 (3.46)	57	0.209
Comprometidos	4.1 (3.60)	23		3.4 (3.26)	22	

Tabela 5 - Expressão de AIF em amostras teciduais de adenocarcinomas gástrica e mucosa gástrica não tumoral associada aos dados clínicos dos pacientes e morfológicos do tumor.

	Adenocarcinoma gástrico			Mucosa gástrica não tumoral		
	Média (dp)	n	p	Média(dp)	n	p
Sexo						
Masculino	3.2 (3.80)	50	0.573	3.6 (3.76)	48	0.602
Feminino	3.1 (3.67)	34		4.1 (4.00)	31	
Estágio clínico						
I	2.2 (3.47)	13	0.089	3.7 (4.29)	12	0.977
II	5.1 (4.31)	14		3.9 (3.90)	15	
III	2.9 (3.54)	56		3.8 (3.82)	51	
IV		4			9	
Adenocarcinoma						
Difuso	2.5 (3.39)	25	0.303	4.2 (3.81)	25	0.622
Intestinal	3.4 (3.86)	59		3.6 (3.87)	54	
Localização						
Cárdia	2.5 (3.54)	28	0.571	4.0 (4.15)	26	0.796
Antro	3.6 (3.88)	36		3.9 (3.77)	35	
Corpo	3.3 (3.75)	20		3.3 (3.66)	18	
Tamanho do Tumor						
≤3 cm	3.7 (4.00)	20	0.652	3.5 (3.75)	19	0.689
>3 cm	3.0 (3.66)	64		3.9 (3.89)	60	
Cirurgia						
Total	2.8 (3.59)	40	0.637	3.8 (3.75)	33	0.909
Parcial	3.5 (3.86)	44		3.8 (3.94)	46	
Margem Cirúrgica						
Livre	3.0 (3.66)	75	0.299	3.7 (3.85)	71	0.695
Comprometida	4.3 (4.27)	9		4.5 (3.93)	8	
Linfonodos						
Metástase	2.9 (3.56)	60	0.393	3.9 (3.87)	56	0.754
Comprometidos	3.8 (4.14)	24		3.5 (3.81)	23	

Tabela 6 - Expressão de citocromo c em amostras teciduais de adenocarcinomas gástrica e mucosa gástrica não tumoral associada aos dados clínicos dos pacientes e morfológicos do tumor. * $p < 0.05$ teste T Student.

	Adenocarcinoma gástrico			Mucosa gástrica não tumoral		
	Média (dp)	n	p	Média (dp)	n	p
Sexo						
Masculino	5.6 (3.33)	51	0.964	4.5 (3.66)	49	0.656
Feminino	5.7 (3.68)	36		4.3 (3.95)	32	
Estágio clínico						
I	4.8 (3.44)	13	0.755	3.9 (4.48)	13	0.319
II	5.6 (4.03)	15		5.7 (3.27)	15	
III	6.0 (3.28)	58		4.2 (3.72)	52	
IV		1			7	
Adenocarcinoma						
Difuso	4.5 (3.71)	28	0.018*	4.7 (3.83)	27	0.858
Intestinal	6.2 (3.21)	59		4.3 (3.74)	54	
Localização						
Cárdia	5.3 (3.65)	29	0.757	3.5 (3.57)	37	0.324
Antro	5.8 (3.57)	38		4.8 (3.86)	35	
Corpo	6.0 (3.04)	20		5.0 (3.77)	19	
Tamanho do Tumor						
≤3 cm	5.3 (3.44)	21	0.946	3.8 (3.88)	20	0.321
>3 cm	5.8 (3.48)	66		4.7 (3.72)	61	
Cirurgia						
Total	6.3 (3.11)	40	0.154	4.1 (3.81)	36	0.285
Parcial	5.1 (3.68)	47		4.7 (3.73)	45	
Margem Cirúrgica						
Livre	5.6 (3.49)	78	0.707	4.3 (3.73)	73	0.256
Comprometida	6.2 (3.31)	9		5.8 (3.99)	8	
Linfonodos						
Metástase	5.7 (3.46)	63	0.992	4.6 (3.73)	57	0.696
Comprometidos	5.6 (3.54)	24		4.1 (3.88)	24	

A Tabela 7 apresenta a expressão da caspase-3 clivada no adenocarcinomas gástrico e na mucosa gástrica não tumoral associada aos dados clínicos dos pacientes e morfológicos do tumor. Tumores do tipo difuso apresentaram maior contagem de células marcadas para caspase-3 clivada ($p=0.049$).

Tabela 7 - Expressão de caspase-3 clivada em amostras teciduais de adenocarcinomas gástrico e mucosa gástrica não tumoral associada aos dados clínicos dos pacientes e morfológicos do tumor.

Adenocarcinoma gástrico, * $p < 0.05$ teste T-Student; ** $p < 0.05$, teste de McNemar.

	Adenocarcinoma gástrico		p	Mucosa gástrica não tumoral		
	Média (dp)	n		Média (dp)	n	p
Sexo						
Masculino	13.9 (16.54)	51	0.250	2.3 (7.50)	51	0.379
Feminino	10.1 (14.17)	36		1.2 (4.59)	36	
Estágio clínico						
I	9.5 (12.38)	13	0.833	3.5 (11.30)	13	0.041**
II	12.7 (14.81)	15		4.9 (10.15)	15	
III	12.9 (16.73)	58		0.7 (2.48)	58	
IV		1			1	
Adenocarcinoma						
Difuso	7.6 (13.93)	28	0.049*	2.0 (7.81)	28	0.805
Intestinal	14.6 (15.99)	59		1.8 (5.77)	59	
Localização						
Cárdia	13.3 (16.20)	29	0.746	1.1 (3.14)	29	0.806
Antro	10.4 (14.03)	38		2.1 (8.31)	38	
Corpo	14.6 (17.90)	20		2.7 (6.12)	20	
Tamanho do Tumor						
≤3 cm	12.8 (17.70)	21	0.690	2.1 (8.93)	21	0.919
>3 cm	12.2 (15.05)	66		1.8 (5.52)	66	
Cirurgia						
Total	14.1 (15.58)	40	0.601	1.8 (5.75)	40	0.755
Parcial	10.8 (15.66)	47		1.9 (7.05)	47	
Margem Cirúrgica						
Livre	11.7 (14.78)	78	0.219	2.0 (6.78)	78	0.802
Comprometida	17.9 (21.97)	9		0.7 (1.66)	9	
Linfonodos						
Metástase	12.3 (15.18)	63	0.874	1.7 (5.54)	63	0.909
Comprometidos	12.3 (17.07)	24		2.3 (8.51)	24	

Algumas amostras sofreram perda tecidual após o processo de recuperação anti-gênica, por isso em algumas lâminas houve discrepância do número de casos analisados (Tabela 3, 4, 5 e 6) em relação ao número total de pacientes (n=87).

A figura 3 apresenta a curva de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com adenocarcinoma gástrico, onde não foi verificada nenhuma associação entre a sobrevida dos pacientes e a expressão de Smac/DIABLO, AIF, citocromo c e caspase-3 clivada.

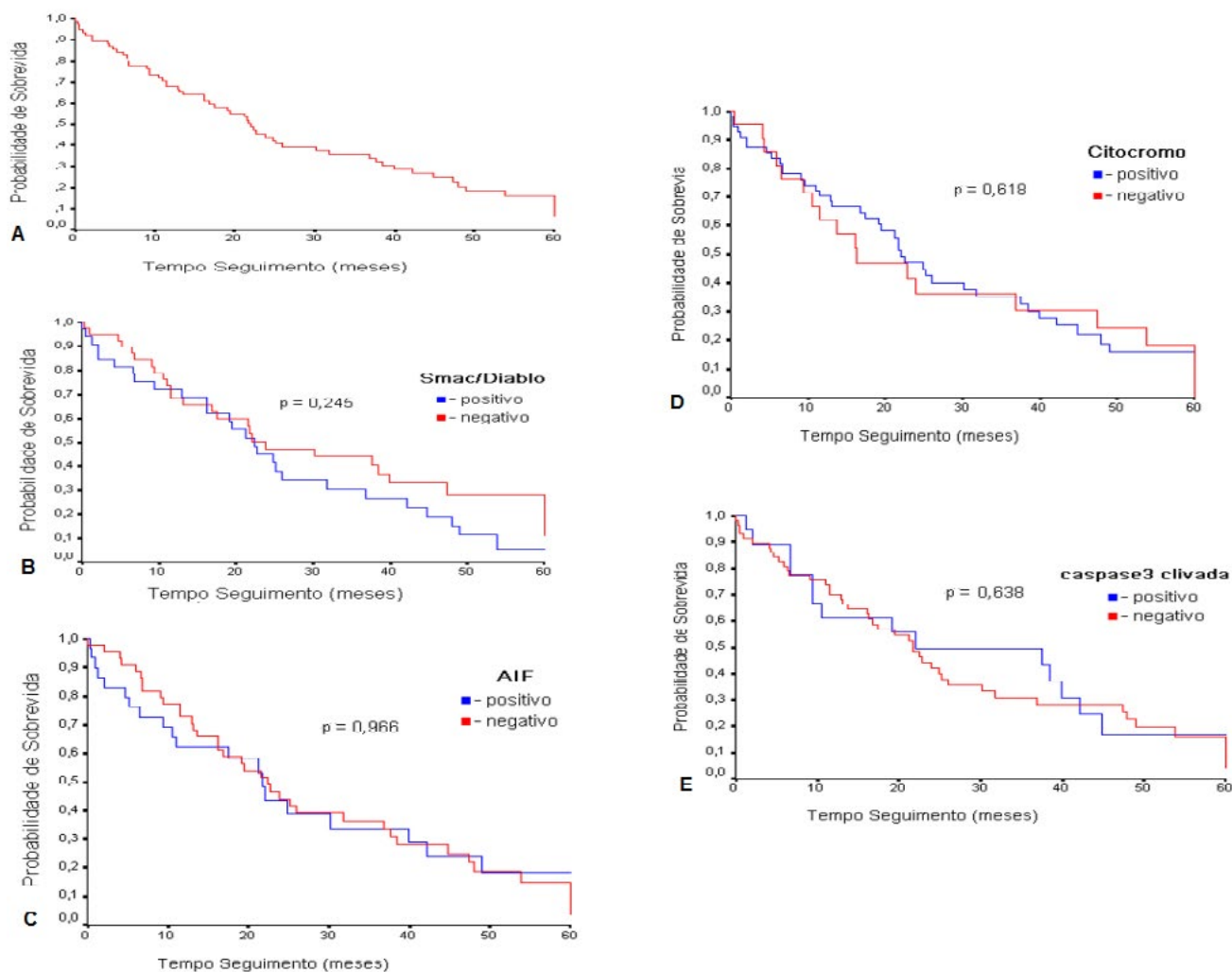


Figura 3 - Curva de sobrevida de pacientes com adenocarcinoma gástrico.

Curva de Sobrevida Global de Kaplan-Meier dos pacientes com adenocarcinomas gástrico em relação a (A); Smac/DIABLO (B); AIF (C); citocromo c (D); e caspase-3 clivada (E).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo foi observada uma associação entre a expressão de Smac/DIABLO com a localização do câncer gástrico no antro, e citocromo c e caspase-3 clivada com o tipo histológico do tipo difuso. Não foi verificada nenhuma associação entre Smac/DIABLO, AIF, citocromo c e caspase-3 clivada com a sobrevida dos pacientes.

O carcinoma gástrico é a segunda maior causa de óbitos relacionados ao câncer no mundo, ^{1,2,3} e no Brasil é o quarto câncer mais prevalente no sexo masculino e o sexto no sexo feminino. O prognóstico e tratamento do carcinoma gástrico normalmente é definido pela sua localização, estadiamento e linfonodos acometidos ¹¹.

Os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico incluem a infecção pelo *Helicobacter pylori*¹², idade avançada, em especial em pacientes do sexo masculino¹³, dieta rica em sal e pobre em fibras vegetais¹⁴, tabagismo¹⁵, gastrite crônica atrófica¹⁶, metaplasia intestinal da mucosa gástrica¹⁷, pólipos adenomatosos gástricos¹⁸, gastrite hipertrófica gigante¹⁹, e polipose adenomatosa familiar²⁰.

Até o momento não existem marcadores tumorais de prognóstico e/ou conduta terapêutica bem estabelecidos para o tratamento do câncer gástrico. A única possibilidade de melhora significativa na sobrevida dos pacientes ocorre quando o câncer é diagnosticado em fases iniciais²¹. Uma vez que pacientes com câncer gástrico em estágios iniciais são assintomáticos, o diagnóstico é realizado tardiamente na grande maioria dos casos²². Assim, a maior possibilidade de cura destes pacientes reside na ressecção tumoral em casos onde não ocorre disseminação para órgãos distantes²³.

O tipo histológico mais comum observado em pacientes com câncer gástrico é o adenocarcinoma (mais de 90% dos casos), seguido do linfoma, sarcomas, tumores estromais gastrointestinais e tumores neuroendócrinos²⁴.

O adenocarcinoma gástrico apresenta dois tipos morfológicos, denominados intestinal e difuso. O tipo intestinal normalmente surge a partir de células mucosas gástricas que sofreram metaplasia intestinal²⁵, ao passo que o tipo difuso tem origem a partir de células mucosas gástricas nativas²⁶. A amplificação de HER-2²⁷ e a expressão aumentada de β -catenina²⁸ estão presentes em 20 a 30% dos casos de adenocarcinoma tipo intestinal. Mutações que envolvem a E-caderina estão presentes em 50% dos adenocarcinomas tipo difuso²⁹, e mutações no gene que codifica o receptor 2 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR2) estão presentes em 30% dos adenocarcinomas tipo difuso³⁰.

Em nosso estudo o adenocarcinoma gástrico esteve presente em 58.6% dos pacientes do sexo masculino, e a idade de acometimento foi de 29 a 85 anos, com média de 62 anos, cuja prevalência é descrita com maior frequência em pacientes do sexo masculino e com idade mais avançada^{2, 13}.

O câncer gástrico tem seu prognóstico e tratamento definidos pela localização, estadiamento e número de linfonodos acometidos. Sua localização envolve ou não a junção esofagogástrica, que em alguns casos pode invadir o duodeno. Mais de 50% dos pacientes com câncer gástrico inicial podem ser curados quando o câncer é totalmente removido cirurgicamente³¹. Verificamos que 46% dos pacientes foram submetidos a gastrectomia total, 54% a gastrectomia parcial e 90% apresentaram margem livre de células cancerosas. Setenta e dois, ponto quatro por cento (72.4%) dos pacientes apresentaram linfonodos comprometidos, o que dificulta o sucesso terapêutico e aumenta a chance de recidiva pós-tratamento.

Uma parcela significativa de pacientes com linfonodos comprometidos por células cancerosas e que sofreram gastrectomia total ¹¹, apresentam sobrevida reduzida ^{32, 33}, fato verificado nos pacientes em nosso estudo, onde 85% deles apresentaram estágio clínico avançado, e no final do estudo três quartos dos pacientes morreu pela evolução da doença.

Conforme a classificação histológica de Lauren ^{11, 34}, verificamos em nossos pacientes que 32.2% apresentaram adenocarcinoma tipo difuso e 67.8% do tipo intestinal. LAZAR e colaboradores ³² descreveram uma maior porcentagem de pacientes acometidos pelo tipo intestinal (62.3%), embora outros autores descrevam uma menor prevalência deste tipo histológico ³⁵. O adenocarcinoma gástrico do tipo difuso é mais freqüente em mulheres e jovens, apresentando pior prognóstico. Já o tipo intestinal acomete com maior freqüência indivíduos do sexo masculino e é menos agressivo que o tipo difuso ^{36, 37}.

Buscamos investigar potenciais marcadores de prognóstico e alvos terapêuticos através da avaliação imuno-histoquímica de moléculas envolvidas com o processo de apoptose. Constatamos que a marcação para Smac/DIABLO esteve presente em 45.6% dos adenocarcinomas gástricos e 46.8% dos tecidos não tumorais adjacentes. Smac/DIABLO não esteve associada as variáveis clínicas e mucosa gástrica não tumoral, porém esteve associada em tumores com localização no antro. Segundo a curva de sobrevida Kaplan-Meier e expressão de Smac/DIABLO, 50% dos pacientes foram a óbito em 25 meses.

Smac/DIABLO é uma proteína pró-apoptótica liberada juntamente com o citocromo c da mitocôndria para o citosol ativando a caspase 3, que atua como um inibidor da proteína inibidora de apoptose (IAP). Alta expressão de Smac/DIABLO foi observada em até 70% das amostras de adenocarcinoma gástrico ³⁸, e diferentes tipos de câncer humanos não expressam Smac/DIABLO, sugerindo que a falta da expressão desta proteína nas células cancerosas possa inibir a apoptose ^{10, 39}.

Os carcinomas gástricos apresentam uma expressão maior de Smac/DIABLO em comparação com a mucosa gástrica não-neoplásica sem apresentarem correlação clínica estatisticamente significativa ⁴⁰; e mutações no gene que codifica a proteína Smac/DIABLO não é um achado frequente ⁴¹.

A expressão de Smac/DIABLO por Real-Time PCR esteve correlacionada com estágios avançados e achados clinicopatológicos de carcinoma gástrico ³⁸, e o aumento da expressão de Smac/DIABLO por imuno-histoquímica em adenocarcinomas gástricos e colorretais não apresentou correlação com parâmetros clínicos dos pacientes ou morfológicos do câncer ⁴².

A survivina é um membro da família de proteínas inibidoras da apoptose antagonizada por Smac/DIABLO. O aumento da expressão de Smac/DIABLO, survivina e da proteína 1 de cadeia leve associada a microtúbulos (LC3), um marcador de autofagia, está correlacionada com o surgimento do carcinoma colorretal, mas não do carcinoma gástrico ⁴². Outro trabalho relata a importância da proteína Smac/DIABLO e da proteína inibidora da apoptose Livin/BIRC7 no controle da progressão do carcinoma gástrico. Foi verificado que tanto a expressão quanto a correlação de Livin/BIRC7 e Smac/DIABLO variam conforme o tipo histológico e estágio do câncer. O aumento da expressão de Livin/BIRC7 está correlacionada com um maior grau de indiferenciação celular e surgimento de metástases ⁴³.

SHIBATA e colaboradores avaliaram a expressão do fator regulador da apoptose, x-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), Smac/DIABLO e XIAP-associated fator 1 (XAF1) no adenocarcinoma gástrico. Foi verificado que o aumento na proporção XIAP/XAF1 e uma alteração na expressão de splice alternativo de XAF1 conferem maior resistência a apoptose ⁴⁴.

Em nosso estudo o fator indutor de apoptose (AIF) foi observado em 36.9% dos adenocarcinomas gástricos e em 45.6% das amostras de mucosa gástrica não tumoral. Não houve nenhuma associação entre AIF, variáveis clínicas, morfológicas do tumor e mucosa gástrica não tumoral ou com a curva de sobrevida Kaplan-Meier tanto para o tecido tumoral quanto para o tecido gástrico não tumoral.

O AIF é uma flavoproteína oxidorrredutora NADH-dependente localizado no interior das mitocôndrias, que após estímulo apoptótico sofre proteólise e se transloca para o núcleo, onde inicia a condensação da cromatina nuclear e degradação do DNA ⁴⁵. LEE e colaboradores ⁴⁶ verificaram a expressão citoplasmática desta proteína em 73% dos carcinomas gástricos do tipo intestinal e em 65% do tipo difuso. JEONG e colaboradores ⁴⁷ verificaram que 100% dos adenocarcinomas de cólon e 80.5% das células normais do tecido tumoral adjacente apresentam expressão de AIF. Nenhuma correlação clínica foi estabelecida a partir destes estudos.

Verificamos a presença do citocromo c em 68.9% dos adenocarcinomas gástricos e em 54.4% das amostras de mucosa gástrica não tumoral, não apresentando correlação com as variáveis clínicas ou curva de Kaplan-Meier. O citocromo c apresentou maior expressão no adenocarcinoma gástrico tipo difuso, sugerindo que sua presença pode ser utilizada como fator de mau prognóstico. O citocromo c atua como um transportador móvel da cadeia de transporte de elétrons e na sua ausência o fluxo de elétrons é interrom-

vido, juntamente com a síntese de DNA. Durante a apoptose o citocromo c é liberado da mitocôndria e interage com APAF1 que ativa a pró-caspase 9 e subsequentemente a cascata apoptótica ⁴⁸.

A apoptose de células da linhagem tumoral HGC-27 está associada com diferentes graus de expressão de APAF-1, citocromo c e caspase 3 ⁴⁹; e o celecoxib ⁵⁰ e oridonin ⁵¹ influenciam a expressão do citocromo c e sobrevida de células cancerosas.

A caspase 3 é uma caspase executora clivada pelas caspases 8 e 9 quando sinalizadas pelas vias extrínsecas e intrínsecas da apoptose, respectivamente ⁵².

Verificamos por marcação imuno-histoquímica expressão de caspase-3 clivada em 24.1% dos adenocarcinomas gástricos e em 3.4% das amostras de tecido gástrico não tumoral. Em nosso estudo sua expressão esteve aumentada no carcinoma gástrico tipo difuso. Em outros estudos, a expressão da caspase clivada-3 foi descrita em 33.7% dos adenocarcinomas gástricos, em 8.3% das amostras de mucosa adjacente ⁵³, em 79.8% das amostras de tecido tumoral e em 36.9% das amostras de mucosa gástrica não tumoral adjacente ⁵⁴. A expressão de caspase-3 é considerada um fator de mau prognóstico no câncer gástrico avançado ⁵⁵.

Outros marcadores de prognóstico vêm sendo avaliados no câncer gástrico, porém sem representação patognomômica como o carbono anidrase IX (CAIX) ⁵⁶, caderina E ⁵⁷, caspase 3 clivada e Smac/DIABLO ⁵⁸, Ki-67 ^{59, 60}, caspase-3 e p53 ⁶⁰, e HER-2 ⁶¹.

A despeito da paucidade de marcadores de prognóstico no câncer gástrico, a indução da apoptose em ensaios pré-clínicos envolvendo a participação do citocromo c e caspase 3 é descrita para potenciais agentes antineoplásicos como a capasaicina (trans-8-methyl-N-vanillyl-6-6-nonenamide) ⁶², citotoxina vacuolizante (VacA) ⁶³, acetato de sódio ⁶⁴, 3-bromopiruvato e citrato de sódio ⁶⁵, dioscina ⁶⁶, e ziyuglucoside II ⁶⁷.

5. CONCLUSÃO

Foi verificada uma associação entre a expressão das proteínas Smac/DIABLO com a localização do carcinoma gástrico no antro, e citocromo c e caspase-3 clivada com o adenocarcinoma gástrico do tipo difuso. Não foi verificada nenhuma associação destas proteínas com o tempo de sobrevida dos pacientes. Dessa forma,

sugerimos que a expressão destas proteínas no adenocarcinoma gástrico tipo difuso pode ser utilizado como fator prognóstico e potenciais alvos de terapias antitumorais dirigidas.

REFERÊNCIAS

- 1.** PADMAVATHY F, SIDDARAJU N, SISTLA SC. Distinction of intestinal and diffuse types of gastric adenocarcinoma on brush cytology. *Acta Cytol.* 2011; 55(2): 187-192.
- 2.** CORRAL JE, et al. The descriptive epidemiology of gastric cancer in Central America and comparison with United States Hispanic populations. *J Gastrointest Cancer.* 2015; 46(1): 21-28.
- 3.** WU CY, LIN JT. The changing epidemiology of Asian digestive cancers: from etiologies and incidences to preventive strategies. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2015; 29(6): 843-853.
- 4.** RYUN PARK S. Management of gastric cancer: East vs West. *Curr Probl Cancer.* 2015; 39(6): 315-341.
- 5.** SUSMAN S, et al. The Lauren classification highlights the role of epithelial to mesenchymal transition in gastric carcinogenesis: an immunohistochemistry study of the STAT3 and adhesion molecules expression. *J Gastrointest Liver Dis.* 2015; 24(1): 77-83.
- 6.** ADITI R, et al. HER2 expression in gastric adenocarcinoma. A study in a tertiary care center in South India. *Indian J Surg Oncol.* 2016; 7(1): 18-24.
- 7.** KONG GM, et al. Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(11): 3186-3195.
- 8.** SEVRIOUKOVA IF. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 14(12): 2545-2579.
- 9.** ELEFTHERIADIS T, et al. Cytochrome c as a potentially clinical useful marker of mitochondrial and cellular damage. *Front Immunol.* 2016; 7: 279, 2016. doi: 10.3389/fimmu.2016.00279.
- 10.** MARTINEZ-RUIZ G, et al. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008; 27(48). doi:10.1186/1756-9966-27-48.

11. MA J, et al. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2016; 11(5): 2959-2964.
12. WESSLER S, et al. [From inflammation to gastric cancer the importance of Hedgehog/GLI signaling in *Helicobacter pylori*-induced chronic inflammatory and neoplastic diseases](#). *Cell Commun Signal*. 2017; 15(1):15. doi: 10.1186/s12964-017-0171-4.
13. PĂDURARU DN, et al. [Considerations on risk factors correlated to the occurrence of gastric stump cancer](#). *J Med Life*. 2016; 9(2): 130-136.
14. ZHAO Z, YIN Z, ZHAO Q. [Red and processed meat consumption and gastric cancer risk: a systematic review and meta-analysis](#). *Oncotarget*. 2017 Feb 25. doi: 10.18632/oncotarget.15699.
15. LI LF, et al. [Cigarette smoking and gastrointestinal diseases: the causal relationship and underlying molecular mechanisms \(review\)](#). *Int J Mol Med*. 2014; 34(2): 372-380.
16. NA HK, et al. [Atrophic and metaplastic progression in the background mucosa of patients with gastric adenoma](#). *PLoS One*. 2017; 12(1): e0169456. doi: 10.1371/journal.pone.0169456. eCollection 2017.
17. MALIK TH, et al. [Gastric intestinal metaplasia: An intermediate precancerous lesion in the cascade of gastric carcinogenesis](#). *J Coll Physicians Surg Pak*. 2017; 27(3): 166-172.
18. BROSENS LA, et al. [Syndromic gastric polyps: At the crossroads of genetic and environmental cancer predisposition](#). *Adv Exp Med Biol*. 2016; 908: 347-369.
19. AL-TAIE OH, et al. [Giant fold gastritis with consecutive gastric carcinoma in a patient with peutz-jeghers syndrome](#). *Z Gastroenterol*. 2005; 43(7): 653-656.
20. BOLAND CR, YURGELUN MB. [Historical perspective on familial gastric cancer](#). *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017; 3(2): 192-200.
21. TAHARA T, et al. [Evaluations of primary lesions by endoscopy clearly distinguishes prognosis in patients with gastric cancer who receive chemotherapy](#). *PLoS One*. 2017; 12(3): e0173663. doi: 10.1371/journal.pone.0173663. eCollection 2017.
22. PERNOT S, et al. [Dynamic evaluation of circulating tumour cells in patients with advanced gastric and oesogastric junction adenocarcinoma: Prognostic value and early assessment of therapeutic effects](#). *Eur J Cancer*. 2017; 79: 15-22.

- 23.** LIU D, et al. [The patterns and timing of recurrence after curative resection for gastric cancer in China.](#) World J Surg Oncol. 2016; 14(1): 305. Published online 2016 Dec 8. doi: 10.1186/s12957-016-1042-y.
- 24.** MEHMEDAGIC I, et al. [Influence of prognostic factors for recurrence of adenocarcinoma of the stomach.](#) Med Arch. 2016; 70(6): 441-444.
- 25.** LANGNER C. [Precursors of gastric cancer: Dysplasia and adenoma.](#) Pathologie. 2017; 38(2): 67-74.
- 26.** CHANG KK, et al. [Increased RhoA activity predicts worse overall survival in patients undergoing surgical resection for Lauren diffuse-type gastric adenocarcinoma.](#) Ann Surg Oncol. 2016; 23(13): 4238-4246.
- 27.** ROA I, et al. [HER2 gene amplification and overexpression in advanced gastric cancer.](#) Rev Med Chil. 2013; 141(11): 1411-1419.
- 28.** OGASAWARA N, et al. [Mutations and nuclear accumulation of beta-catenin correlate with intestinal phenotypic expression in human gastric cancer.](#) Histopathology. 2006; 49(6): 612-621.
- 29.** PARK JW, et al. [Cooperativity of E-cadherin and Smad4 loss to promote diffuse-type gastric adenocarcinoma and metastasis.](#) Mol Cancer Res. 2014; 12(8): 1088-1099.
- 30.** NADAULD LD, et al. [Metastatic tumor evolution and organoid modeling implicate TGFBR2 as a cancer driver in diffusegastric cancer.](#) Genome Biol. 2014; 15(8): 428. doi: 10.1186/s13059-014-0428-9.
- 31.** WANG W, et al. Prognosis of 980 patients with gastric cancer after surgical resection. Chin J Cancer. 2010; 29 (11): 923-930.
- 32.** LAZAR D, et al. Gastric cancer: correlation between clinic pathological factors and survival of patients. Rom J Morphol Embryol. 2009; 50(2): 185-194.
- 33.** XIAO LB, et al. Superiority of metastatic lymph node ratio to the 7th edition UICC N staging in gastric cancer. World J Gastroenterol. 2011; 17(46): 5123-5130.
- 34.** GELSOMINO F, et al. Gastric carcinoma: an evolutionary scenario. Recent Prog Med. 2017; 108(3): 120-127.
- 35.** ZHENG R, et al. National estimates of câncer prevalence in China, 2011. Cancer Lett. 2016; 370(1): 33-38.

- 36.** HASS HG, et al. Signet ring cell carcinoma of the stomach is significantly associated with poor prognosis and diffuse gastric cancer (Lauren's): single-center experience of 160 cases. *Onkologie*. 2011; 34(12): 682-686.
- 37.** CHEN WY, et al. [Factors that affect life expectancy of patients with gastric adenocarcinoma](#). *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013; 11(12): 1595-600.
- 38.** ZHAO Y, DENG X, WANG Q. Expression and clinical significance of apoptosis associated genes Livin and Smac/DIABLO in human gastric carcinoma. *Ai Zheng*. 2009; 28(6): 593-601.
- 39.** YOO NJ, et al. [Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas](#). *APMIS*. 2003; 111(3): 382-388.
- 40.** DA SILVA LC, et al. Immunoexpression of DIABLO, AIF and cytochrome c in gastric adenocarcinoma assessed by tissue microarray. *Anticancer Res*. 2013; 33(2): 647-653.
- 41.** SOUNG YH, et al. [SMAC/DIABLO mutation is uncommon in gastric and colorectal carcinomas](#). *Pathology*. 2006; 38(1): 85-87.
- 42.** SHINTANI M, et al. [Smac/DIABLO expression in human gastrointestinal carcinoma: Association with clinicopathological parameters and survivin expression](#). *Oncol Lett*. 2014; 8(6): 2581-2586.
- 43.** ZHAO Y, DENG X, WANG Q. [Expression and clinical significance of apoptosis associated genes Livin and Smac/DIABLO in human gastric carcinomas](#). *Ai Zheng*. 2009; 28(6): 593-601.
- 44.** SHIBATA T, et al. [Disturbed expression of the apoptosis regulators XIAP, XAF1, and Smac/DIABLO in gastric adenocarcinomas](#). *Diagn Mol Pathol*. 2007; 16(1): 1-8.
- 45.** POLSTER BM. [AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: a "complex" problem](#). *Neurochem Int*. 2013; 62(5): 695-702.
- 46.** LEE JW, et al. Immunohistochemical analysis of apoptosis-inducing factor (AIF) expression in gastric carcinomas. *Pathol Res Pract*. 2006; 202(7): 497-501.
- 47.** JEONG EG, et al. Immunohistochemical and mutational analysis of apoptosis-inducing factor (AIF) in colorectal carcinomas. *APMIS*. 2006; 114(12): 867-873.
- 48.** SHAKERI R, KHEIROLLAHI A, DAVOODI J. [Apaf-1: Regulation and function in cell death](#). *Biochimie*. 2017; 135: 111-125.

- 49.** SUN KW, et al. Oridonin induces apoptosis in gastric cancer through Apaf-2, cytochrome-c and caspase-3 signaling pathway. *World Gastroenterol.* 2012; 18(48): 7166-7174.
- 50.** WANG YJ, et al. Effects of celecoxib on cycle kinetics of gastric cancer cells and protein expression of cytochrome c and caspase-9. *Asian Pac Cancer Prev.* 2013; 14(4): 2343-2347.
- 51.** SHIN M, et al. Oridonin, a novel lysine acetyltransferases inhibitor, inhibits proliferation and induces apoptosis in gastric cancer cells through p53 and caspase-3-mediated mechanisms. *Oncotargets.* 2016; 7(16): 22623-226231.
- 52.** MIRZAYANS R, et al. [The growing complexity of cancer cell response to DNA-damaging agents: Caspase 3 mediates cell death or survival?](#) *Int J Mol Sci.* 2016; 17(5). pii: E708. doi: 10.3390/ijms17050708.
- 53.** GOMES TS, et al. The extrinsic apoptotic signaling pathway in gastric adenocarcinomas assessed by tissue microarray. *Pathol Res Pract.* 2011; 207(10): 613-617.
- 54.** BARREZUETA LF, et al. The intrinsic apoptotic signaling pathway in gastric adenocarcinomas of Brazilian patients: immunoexpression of the Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-x, Bak, Bax, Bad) determined by tissue microarray analysis. *Mol Med Rep.* 2010; 3(2): 261-267.
- 55.** AMPTOULACH S, et al. [Expression of caspase-3 predicts prognosis in advanced noncardia gastric cancer.](#) *Med Oncol.* 2015; 32(1):416. doi: 10.1007/s12032-014-0416-7.
- 56.** SENOL S, et al. [Gastric adenocarcinoma biomarker expression profiles and their prognostic value.](#) *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2016; 35(3): 207-222.
- 57.** VAN DER POST RS, et al. [Histopathological, molecular, and genetic profile of hereditary diffuse gastric cancer: Current knowledge and challenges for the future.](#) *Adv Exp Med Biol.* 2016; 908: 371-391.
- 58.** KIM MA, et al. [Expression of apoptosis-related proteins and its clinical implication in surgically resected gastric carcinoma.](#) *Virchows Arch.* 2011; 459(5):503-510.
- 59.** NASCIMENTO LCS, ERRANTE PR. Imunoexpressão do Ki-67 no adenocarcinoma gástrico. *Rev UNILUS Ensino e Pesquisa.* 2016; 13(32): 76-83.
- 60.** XIAO LJ, et al. [Clinicopathological and prognostic significance of Ki-67, caspase-3 and p53 expression in gastric carcinomas.](#) *Oncol Lett.* 2013; 6(5): 1277-1284.

61. LEI YY, et al. [The clinicopathological parameters and prognostic significance of HER2 expression in gastric cancer patients: a meta-analysis of literature.](#) World J Surg Oncol. 2017; 15(1): 68. doi: 10.1186/s12957-017-1132-5.
62. MERAL O, et al. [Capsaicin inhibits cell proliferation by cytochrome c release in gastric cancer cells.](#) Tumour Biol. 2014; 35(7): 6485-6492.
63. LAN CH, et al. [Involvement of VDAC1 and Bcl-2 family of proteins in VacA-induced cytochrome c release and apoptosis of gastric epithelial carcinoma cells.](#) J Dig Dis. 2010; 11(1): 43-49.
64. XIA Y, et al. [Apoptotic effect of sodium acetate on a human gastric adenocarcinoma epithelial cell line.](#) Genet Mol Res. 2016; 15(4). doi: 10.4238/gmr.15048375.
65. GUO X, et al. [3-Bromopyruvate and sodium citrate induce apoptosis in human gastric cancer cell line MGC-803 by inhibiting glycolysis and promoting mitochondria-regulated apoptosis pathway.](#) Biochem Biophys Res Commun. 2016; 475(1): 37-43.
66. HU M, et al. [Cytotoxicity of dioscin in human gastric carcinoma cells through death receptor and mitochondrial pathways.](#) J Appl Toxicol. 2013; 33(8): 712-722.
67. ZHU AK, et al. [Ziyuglycoside II-induced apoptosis in human gastric carcinoma BGC-823 cells by regulating Bax/Bcl-2 expression and activating caspase-3 pathway.](#) Braz J Med Biol Res. 2013; 46(8): 670-675.