

# **EQUIPE EDITORIAL - VOL. 6**

## **Editor Científico**

Prof. Dr. Daniel Manzoni de Almeida, Escola de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário Faculdades Metropolitanas Unidas

## **Equipe Editorial**

Jefferson Russo Victor, Faculdade de Medicina - USP, Brasil

Priscila Cardoso Cristovam, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, Brasil

Rogéria Maria Ventura, Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, Brasil

## **Assistente Editorial**

Gerson Victor dos Santos, Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, Brasil



# ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DE CORPOS CARBONIZADOS ATRAVÉS DE TÉCNICAS FORENSES

## ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF CARBONIZED CORPSES THROUGH FORENSIC TECHNIQUES

**Lopez LM**  
**Ventura RM**  
**Borda CC**

Centro universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas -FMU, Av. Santo Amaro ,1239, Vila Nova Conceição, São Paulo, SP, Brasil. CEP:04505-002  
E-mail: biomedicalarissa17@gmail.com

### RESUMO:

Este trabalho tem o intuito de explicar como é realizada, em corpos carbonizados, a identificação através das técnicas forense que utiliza DNA como prova para obtenção desta identificação, também esclarecer como é feita a análise das lesões provocadas pela morte por queimaduras. Usando uma técnica realizada em laboratório de biologia molecular, que usam diversos tipos de tecidos ou fluidos fonte de DNA, podem-se identificar indivíduos ou ajudar a Justiça, na identificação de criminosos, através da Análise Polimórfica do DNA. Além disso, este artigo relata casos que utilizaram a técnica de biologia molecular para identificar indivíduos.

**Palavra-chave:** carbonização; DNA; identificação humana; polimorfismo.

### ABSTRACT:

This work has the intention to explaining how it's performed, in carbonized corpses, the identification through forensic techniques that use DNA as evidence for this identification, also clarify how is the analysis of burn death injuries. Using a technique done in molecular biology laboratories, which use various types of tissues or fluids source of DNA, can be identify individuals or help Justice in identifying criminals, through DNA Polymorphic Analysis. Furthermore, this paper report cases that used the technique of molecular biology to identify individuals.

**Keywords:** charring; AND; human identification; polymorphism.

# 1. INTRODUÇÃO

A ciência forense consiste na aplicação de técnicas científicas inseridas dentro de um processo legal. Os vestígios encontrados por profissionais, nem sempre vistos a olho nu, podem ajudar na solução de crimes e no auxílio de vítimas, entre outros casos.<sup>1</sup>

As lesões de tecido podem ser provocadas por queimaduras, devido à ação de algum trauma ou causada por um agente térmico, como por exemplo chama, eletricidade; também podem ser ocasionadas por substâncias químicas, por exemplo, as ácidas ou alcalinas.<sup>2</sup>

As queimaduras são classificadas em três graus: 1.º grau: a lesão atinge apenas a epiderme; 2.º grau: atinge a epiderme consequentemente atingindo a parte da derme; 3.º grau: atinge a epiderme a derme e raramente também atinge o tecido subcutâneo.<sup>3</sup>

A Antropologia Forense é uma ciência recente que aplica as técnicas da antropologia biológica (que consiste no estudo da biologia humana dentro da evolução, com ênfase na interação entre a biologia e a cultura.) e da arqueologia para coletar e analisar as provas legais, investigando a identidade do indivíduo por meio da determinação de características exclusivas. Esta área do conhecimento iniciou-se no século 20, pela necessidade do conhecimento da anatomia do esqueleto em ações que envolvam a identificação e avaliação de restos humanos.<sup>4</sup>

A análise de DNA com fins para determinar a identificação genética é uma das ferramentas de maior revolução para a moderna genética molecular humana. Nos últimos 20 anos, com aumento de se determinar paternidade e de se resolver crimes, além de identificar pessoas e restos de seres humanos em desastres de massa ou em guerras, tornou a identidade genética, uma das ferramentas essenciais em investigação criminal.<sup>5</sup>

A nível forense, o auge do avanço da ciência e da tecnologia, se deu em meados dos anos 80, foi quando as técnicas, de identificação, eram fundamentais na análise direta do ácido desoxirribonucleico (DNA), tornando-se uma das ferramentas mais eficaz para a identificação humana e investigações criminais.<sup>6</sup>

Através da descoberta da genotipagem de regiões específicas do DNA, tornou-se a mais importante ferramenta para a ciência forense para identificação humana. Entretanto, em muitas situações, a amostra disponível está prejudicada, dificultando a recuperação das informações genéticas integras.<sup>7</sup>

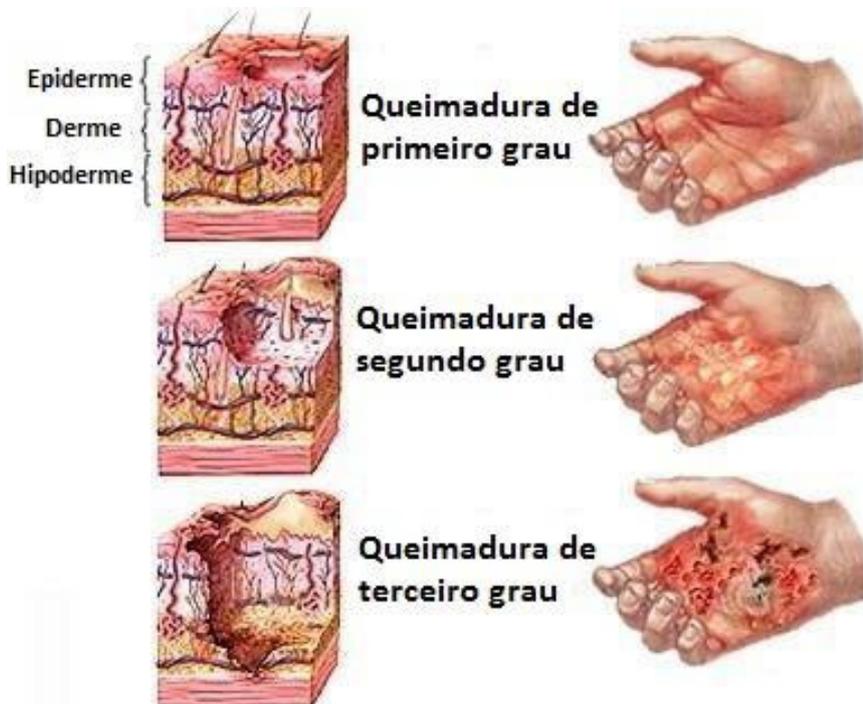
## 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 2.1 Queimaduras

As queimaduras são lesões altamente agressivas, por causar alterações não só físicas como também psicológicas. O indivíduo tem perda de volume de líquidos, risco para infecção, dor, além de ter estresse psicológico podendo chegar a ter deformidades corporais dependendo do grau da queimadura.<sup>8</sup>

As queimaduras de primeiro grau apenas afetam a epiderme, as queimaduras de segundo grau são caracterizadas pela formação de bolhas sobre a epiderme com perda líquida e atinge tanto a derme como a epiderme, as queimaduras de terceiro grau caracterizam por atingir uma área mais profunda da pele, podendo incluir músculos e tecido ósseo, costuma apresentar uma necrose no local afetado.<sup>9</sup>

A queimadura de quarto grau ou carbonização é a atuação direta do calor em qualquer de suas formas, afeta totalmente a epiderme e a derme, podendo comprometer músculos, nervos, tendões até os ossos (Figura 1 e 2). Dependendo do grau da queimadura, podemos dizer que ela seja parcial ou queimadura de espessura total, ou seja, carbonização generalizada.<sup>10</sup>



**Figura 1.** Esquematização dos graus de queimaduras. <sup>11</sup>



**Figura 2.** Esquemática de queimadura de 4º grau generalizada(A) e parcial(B).<sup>12,13</sup>

## 2.2 Antropologia forense

A antropologia forense é uma ciência que utiliza os conhecimentos da biologia do esqueleto humano e de outras ciências na identificação de cadáveres em avançado estado de decomposição, carbonizados ou gravemente mutilados e restos esqueléticos e no esclarecimento da causa e circunstâncias da morte dos indivíduos.<sup>14</sup> Através da análise dos ossos, podemos obter dados sobre o sexo, idade, estatura do falecido e particularidades da vida que o indivíduo possuía.



**Figura 3.** Etapas do trabalho do antropólogo forense.<sup>15</sup>

Quando são encontrados restos humanos, parcialmente ou totalmente esqueletizados, não sendo possível determinar com certeza sua identidade, torna-se necessária a análise antropológica forense.<sup>16</sup>

### 2.3 Odontologia forense

A odontologia forense é uma das subáreas da ciência forense, responsável por investigar os fenômenos que podem atingir os indivíduos.<sup>17</sup>

No caso de cadáveres carbonizados, mudanças estruturais dos dentes e dos materiais utilizados nos tratamentos dentários, fornecem dados importantes na estimativa da temperatura a qual o corpo foi exposto. Essa identificação consiste em um procedimento comparativo.<sup>16</sup>

### 2.4 Genética forense

A técnica de biologia molecular utilizada na análise para a identificação humana é um avanço recente das técnicas de identificação.<sup>19</sup>

Em um tempo curto, a análise genética substituiu as análises sorológicas dos polimorfismos das proteínas e da Análise de Grupos sanguíneos. Tornando fundamental ao sistema judiciário, sendo atualmente um dos principais suportes das ciências forenses no requisito do apoio à investigação criminal.<sup>19</sup>

Uma das áreas das ciências forenses que utiliza o DNA colaborando e auxiliando a Justiça a investigar casos sob inquirição policial ou do Ministério Público refere-se a uma área de análise científica que se dedica a interpretação de exames de provas biológicas criminais.<sup>20</sup>

O principal objetivo dessa técnica é o estudo das características genéticas de um indivíduo ou de uma amostra biológica, utilizada somente para a identificação de cadáveres.<sup>20</sup>

Na análise forense, utiliza-se a técnica de DNA Fingerprint, desenvolvida por Sir Alec Jeffreys, em 1984. Constitui na adição de enzimas de restrição que cortam em locais onde existem sequências de bases repetidas e que correspondem as zonas de restrição. Portanto, gera fragmentos de DNA que regularmente, variam em tamanho de indivíduo para indivíduo. Estes fragmentos são oriundos de amostras de material biológico.<sup>20</sup> Esse fragmento de DNA obtido é submetido a Eletroforese em Gel de agarose de 0,8% a 1,0%.

A eletroforese utiliza como base o polimorfismo do genoma humano para criar as bandas que obteremos no resultado do DNA Fingerprint.

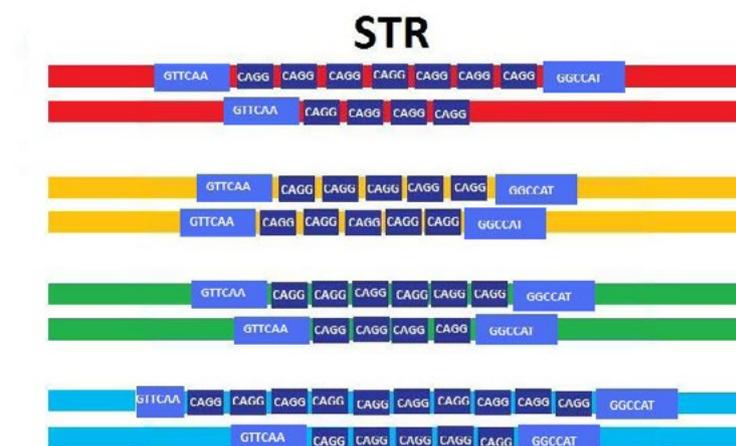
Os polimorfismos são variações genéticas que surgem por consequência de alguma mutação.<sup>21</sup> Essas variações podem ser separadas em classes distintas e bem definidas. Uma diferença na sequência de DNA presente em mais de 1% dos indivíduos de uma população. São geralmente criados por uma inserção ou deleção de uma ou mais bases.

## 2.5 Short Tandem Repeats (STRs)

Atualmente, as identificações humanas são realizadas utilizando os marcadores genéticos chamados microssatélites ou STRs que são sequências curtas que tendem a se repetir no genoma. Para que esses marcadores sejam úteis, eles devem ser polimórficos, ou seja, os indivíduos devem apresentar diferentes números de repetições para que possam ser diferenciados entre si.<sup>16</sup> O tamanho reduzido dos STRs permite que amostras com quantidades menores de DNA, ou apresentando alto grau de degradação, possam ser analisadas.

Os mini-STRs são novos marcadores STRs e foram elaborados para facilitar a análise de amostras de DNA degradadas.<sup>23</sup>

Os STRs, por conterem poucos pares de bases, permitem que amostras com alto grau de degradação sejam analisadas. Essa análise superou as limitações relacionadas à manipulação de sequências de VNTRs, tornando o marcador mais importante em identificação criminal.<sup>22</sup>

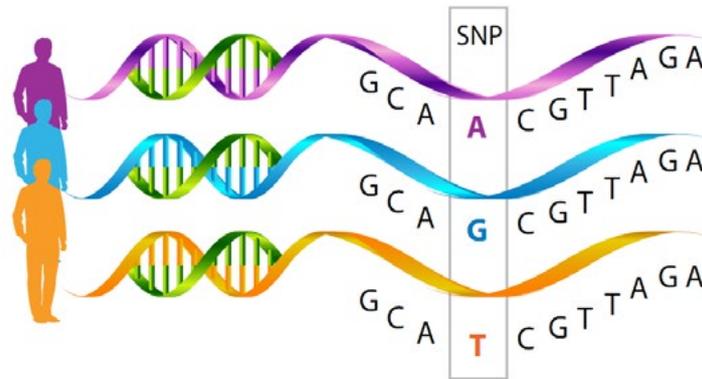


**Figura 4.** Esta imagem mostra uma maneira muito simples o que são a STR.<sup>24</sup>

## 2.6 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

A variação genética mais comum no genoma humana são os polimorfismos de um único nucleotídeo ou SNPs, variações de um único nucleotídeo, em uma determinada posição da sequência de DNA.<sup>16</sup>

Por serem marcadores que tem muitas vantagens, pois conseguem produtos de amplificação muito curtos, alguns pesquisadores têm analisado a possibilidade desse marcador vir a substituir os STRs na análise forense de criminosos.<sup>22</sup> Na identificação, esse marcador possui uma desvantagem, pois só possui dois alelos, tornando muito maior a possibilidade de dois indivíduos terem o mesmo genótipo.<sup>6</sup>



**Figura 5.** Representação dos SNPs.<sup>25</sup>

## 2.7 Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs)

Uma fração de DNA repetido consiste de regiões denominadas minissatélites ou números variáveis que tendem a se repetir (VNTR).<sup>26</sup>

Os marcadores VNTR são analisados através da técnica RFLP, que é baseada em mutações que alteram sequências no DNA de um indivíduo. Os marcadores VNTR são analisados através da técnica RFLP, baseada em mutações que alteram sequências no DNA de um indivíduo. Os organismos podem ser diferenciados pelo comprimento de sequências VNTR do DNA gerados após a ação de uma determinada enzima de restrição. Os organismos podem ser diferenciados pelo comprimento de sequências VNTR do DNA gerados após a ação de uma determinada enzima de restrição.<sup>22,26</sup>

No entanto, a tipagem de alelos de VNTRs tem sua desvantagem, pois requer que o DNA esteja íntegro e esteja em grandes quantidades, inviabilizando a análise de amostras degradadas.<sup>22</sup>

## 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É preciso implementar padrões com exatidão para as etapas da análise da DNA, desde a coleta até a interpretação dos resultados para evitar riscos. As Amostras biológicas devem ser levadas para o laboratório forense com urgência para evitar a degradação, a mistura dos componentes ou até a possibilidade de contaminação

do material. As amostras devem ser documentadas para evitar que as amostras de diferentes cenas do crime se misturem.

O campo de trabalho da perícia antropológica forense necessita dois profissionais, que deverão formar uma equipe coerente, sendo eles o antropólogo forense e o patologista forense. Mas, não podemos esquecer o membro do órgão de investigação criminal, pois a perícia em antropologia forense começa com o exame do local e muitas vezes este profissional fornece as informações referentes ao local onde foram encontrados os restos cadavéricos.

Em situações que existem cadáveres em estado de decomposição adiantado, cadáveres carbonizados, gravemente mutilados ou em situações de desastres de massa, os conhecimentos e a experiência do antropólogo forense pode fazer a diferença entre a identificação de um cadáver e o esclarecimento do motivo da morte.

Não se pode excluir a competência do DNA mitocondrial dentro da genética forense no âmbito atual. Em casos onde a quantidade de DNA extraído é muito pequena, como em tecidos ósseos, dentes, cabelos e em amostras bastante degradadas ou antigas, a análise de DNA mitocondrial pode ser a única alternativa.

Nos últimos anos, no Brasil, o crescimento da investigação forense cresceu bastante, do mesmo modo que numerosos avanços relacionados às técnicas de biologia molecular usada em laboratório. As técnicas de identificação que se baseiam no DNA são consideradas a maior mudança do campo criminal, pois existem duas vantagens importantes: a estabilidade química do DNA e sua ocorrência em todas as células nucleadas dos organismos humanos.

## REFERÊNCIAS

1. Veríssimo LS, Silva HRC, Correia SC, Silva LM, Elias RM. Análises dos perfis genéticos de corpos humanos carbonizados recebidos pela Politec de Cuiabá no ano de 2014. In: Anais do Congresso Nacional de Iniciação Científica; 2015 nov 27-28; Ribeirão Preto, BR: Sindicato das Mantenedoras do Ensino Superior; 2015.
2. Queiroz PR, Kenio CL, Alcântara IC. Prevalência e fatores associados a queimaduras de terceiro grau no município de Natal, RN - Brasil. Rev Bras Queimaduras. 2013; 3(12):169-176.
3. Freitas MC, Mendes MMR. Idoso vítima de queimaduras: identificação do diagnóstico e proposta de intervenção de enfermagem. REBEN. 2006; 59(3):362-366.

4. Soares ATC, Guimarães MA. Dois anos de antropologia forense no centro de medicina legal (CEMEL) da faculdade de medicina de ribeirão preto – USP. In: Anais do simpósio de medicina legal; 2008 jan/mar 7-11; Ribeirão Preto, BR: Antropologia Forense no CEMEL; 2008.
5. Lima LO. Utilização dos polimorfismos em análises forenses [Internet]. [acesso em 05 Ago 2015]. Disponível em: [www.academia.edu/6598269/UTILIZA%C3%87%C3%83O\\_DOS\\_POLIMORFISMOS\\_EM\\_AN%C3%81LISES\\_FORENSES](http://www.academia.edu/6598269/UTILIZA%C3%87%C3%83O_DOS_POLIMORFISMOS_EM_AN%C3%81LISES_FORENSES).
6. Koch A, Andrade FM. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: Uma Revisão. RBCA. 2008; 40(1):163-8.
7. Barbosa CA, Faria RA, Malaghini M, Nogozyky KA. Aplicação de mini -STRs non-codis na casuística forense. In: Anais do XXIV congresso brasileiro em engenharia biomédica; 2014 out 13-17; Foz do Iguaçu, BR: Cbeb; 2014.
8. Pereira EMC, Dutra FC, Lonien SCH. A dieta enteral na reabilitação e cicatrização do paciente queimado [Internet]. [acesso em 2016 Out 30]. Disponível em: [www.inesul.edu.br/revista/arquivos/arq-idvol\\_14\\_1310159642.pdf](http://www.inesul.edu.br/revista/arquivos/arq-idvol_14_1310159642.pdf)
9. Gomes DR, Serra MC, Pellon MA. Queimaduras. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1995. 306p.
10. Fernandes LS. O papel do DNA na identificação de corpos carbonizados [monografia]. São Paulo: UNIFMU; 2003.
11. Biomedicina dinâmica. O que fazer em caso de Queimadura? [Internet]. 2015. [acesso em 2016 Nov 19]. Disponível em: [biomedicinadinamica.blogspot.com.br/search?q=queimaduras](http://biomedicinadinamica.blogspot.com.br/search?q=queimaduras)
12. Maia A, Mesquita J. Empresário é morto à tiro tem seu corpo carbonizado [Internet]. Rondon do Pará; 2015. [acesso em 2016 Jun 11]. Disponível em: [portalplantaopolicia.com.br/noticias/empresario-e-morto-a-tiros-e-tem-seu-corpo-carbonizado](http://portalplantaopolicia.com.br/noticias/empresario-e-morto-a-tiros-e-tem-seu-corpo-carbonizado)
13. Alves V. Corpo de homem é encontrado parcialmente carbonizado em estrada de MT [Internet]. 2015. [acesso em 2015 Jun 11]. Disponível em: [olhardireto.com.br/noticias/exibir.asp?noticia=Corpo\\_de\\_homem\\_e\\_encontrado\\_parcialmente\\_carbonizado&id=366283](http://olhardireto.com.br/noticias/exibir.asp?noticia=Corpo_de_homem_e_encontrado_parcialmente_carbonizado&id=366283)
14. Gonçalo C. Antropologia forense: sucessos e limites de uma ciência forense. [Internet]. 2012. [acesso em 2016 Ago 05]. Disponível em: [segurancaecienciasforenses.com/2012/12/27/antropologia-forense-sucessos-e-limites-de-uma-ciencia-forense/](http://segurancaecienciasforenses.com/2012/12/27/antropologia-forense-sucessos-e-limites-de-uma-ciencia-forense/)

- 15.** Equipa de investigação. Antropologia forense – Parte I [Internet]. São Paulo; 2009. [acesso em 2016 Out 17]. Disponível em : [dizqueeuumaespeciedecsi.blogspot.com.br/2009/01/antropologia-forense-parte-i.html](http://dizqueeuumaespeciedecsi.blogspot.com.br/2009/01/antropologia-forense-parte-i.html)
- 16.** Velho JA, Geiser GC. Ciências forenses. 2 ed. Campinas: Millennium; 2013. 470 p.
- 17.** Araujo LLG, Biancalana, RC, Terada, ASSD, Paranhos LR, Machado EPM, Silva HA. A identificação humana de vítimas de desastres em massa: a importância e o papel da Odontologia Legal. RFO. 2014; 18(2):224-229.
- 18.** Cortez V. Análises físico - químicas em Odontologia Forense [Internet]. 2015. [acesso em 2015 Jun 11]. Disponível em: [www.olhardireto.com.br/noticias/exibir.asp?noticia=Corpo\\_de\\_homem\\_e\\_encontrado\\_parcialmente\\_carbonizado&id=366283](http://www.olhardireto.com.br/noticias/exibir.asp?noticia=Corpo_de_homem_e_encontrado_parcialmente_carbonizado&id=366283)
- 19.** Moreti T. Identificação humana: Uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina [monografia]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2009.
- 20.** Raposo B, Monteiro J, Cintrão N, Pereira T. Genética: Forense [Internet]. [acesso em 2016 Out 30]. Disponível em: [genetica-humana.blogspot.com.br/p/genetica-forense.html](http://genetica-humana.blogspot.com.br/p/genetica-forense.html)
- 21.** Castro RCB. O que são polimorfismos e qual a sua relação com a nutrigenética. [Internet]. 2013. [acesso em 2016 nov 2016]. Disponível em: [www.nutritotal.com.br/mod/pergres/view.php?id=13634](http://www.nutritotal.com.br/mod/pergres/view.php?id=13634)
- 22.** Campos JO. A utilização de marcadores moleculares aplicados na identificação humana [monografia]. Brasília: Centro de Ensino Unificado de Brasília; 2015.
- 23.** Agostinho LA, Paradela ER, Paiva CLA, Figueiredo AL. Construção de sistema multiplex utilizando cinco marcadores genéticos do tipo mini-STR (Short – Amplicons) para identificação humana por análise de DNA. Revista Científica de FAMINAS. 2011; 7(3):11-41.
- 24.** Gutiérrez D, Santos CP. STRs [Internet]. [acesso em 2016 Nov 19]. Disponível em : [forensemolecular.es.tl/STRs.htm](http://forensemolecular.es.tl/STRs.htm).
- 25.** Abbasi AMSSAKS. Sequence homology and SNP detection in Abiotic Stress responsive genes in Rice (guide-priyaranjan – Kumar) [Internet]. [acesso em 2016 Out 17]. Disponível em : [www.emaze.com/@AORTFFOQ/SEQUENCE-HOMOLOGY-AND-SNP-DETECTION-IN-ABIOTIC-STRESS.pptx](http://www.emaze.com/@AORTFFOQ/SEQUENCE-HOMOLOGY-AND-SNP-DETECTION-IN-ABIOTIC-STRESS.pptx)

**26.** Góes CDS. Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais [Internet]. 2010 [acesso em 2016 Nov 08]. Disponível em: [www.crbm1.gov.br/bio65/artigocien\\_65.asp](http://www.crbm1.gov.br/bio65/artigocien_65.asp)

**Recebido em: 04/01/2017**

**Aceito em: 23/08/2018**

# **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 <sup>1,2,3</sup>. 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 <sup>4</sup>.

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 <sup>5</sup>, 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 <sup>6</sup>.

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) <sup>7</sup>. 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) <sup>8</sup>. O AIF é uma proteína mitocondrial que se translocado para o núcleo e inicia a condensação da cromatina e fragmentação do DNA <sup>7</sup>. 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 <sup>9</sup>.

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

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.

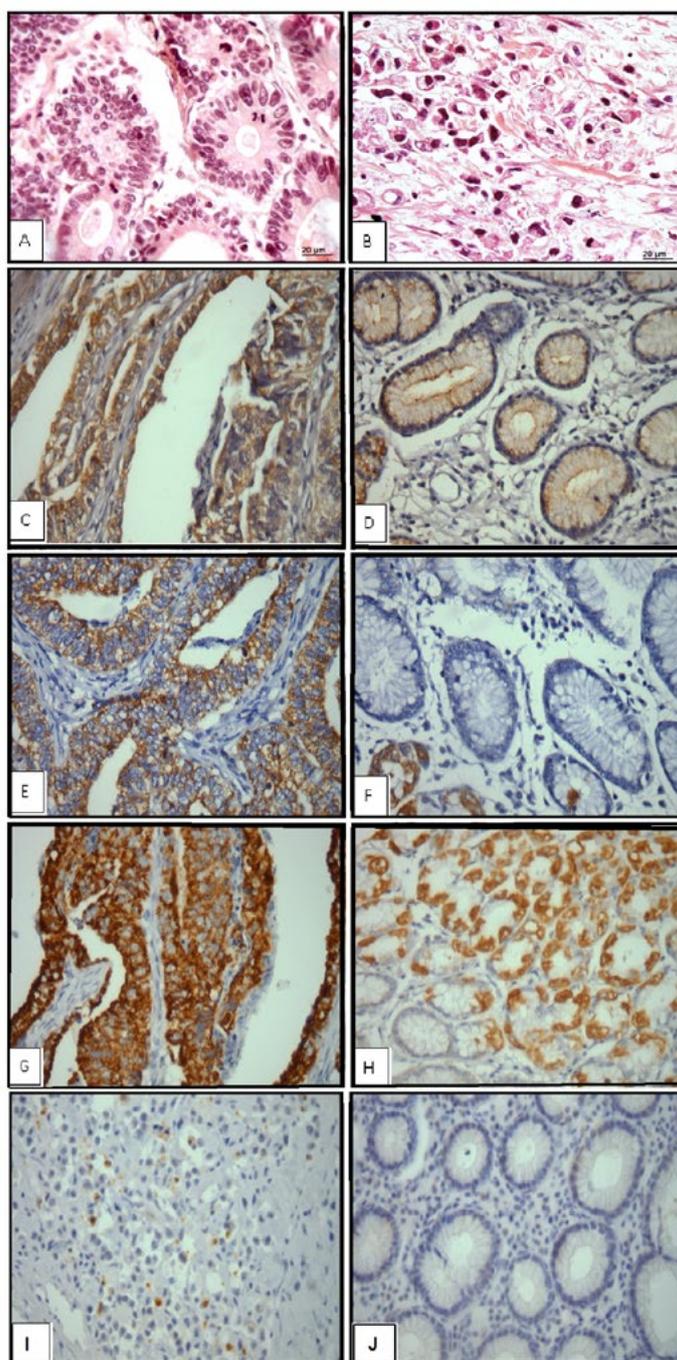
As lâminas foram lavadas em tampão PBS e incubadas com o anticorpo secundário biotilado (Kit Advance-DAKO, Denmark) em câmara úmida a temperatura ambiente por 15 minutos, e depois lavadas duas vezes com tampão PBS. A seguir foi realizada a incubação com o complexo streptavidina-biotina (Kit Advance-DAKO, 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  $p < 0.05$ .

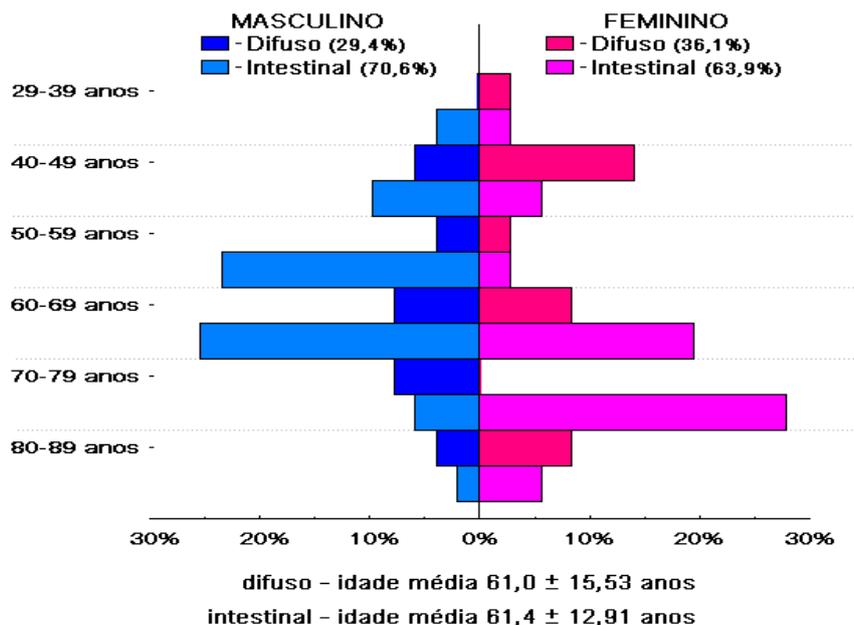
## 3. RESULTADOS

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.

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

|                                | <b>n</b> | <b>Negativo n (%)</b> | <b>Positivo n (%)</b> |
|--------------------------------|----------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Adenocarcinoma gástrico</b> |          |                       |                       |
| <b>Smac/DIABLO</b>             | 81       | 44 (54.4%)            | 37 (45.6%)            |
| <b>AIF</b>                     | 84       | 53 (63.2%)            | 31 (36.9%)            |
| <b>Citocromo c</b>             | 87       | 27 (30.9%)            | 60 (68.9%)            |
| <b>Caspase 3 clivada</b>       | 87       | 66 (75.9%)            | 21 (24.1%)            |
| <b>Mucosa não tumoral</b>      |          |                       |                       |
| <b>Smac/DIABLO</b>             | 79       | 42 (53.2%)            | 37 (46.8%)            |
| <b>AIF</b>                     | 79       | 43 (54.6%)            | 36 (45.6%)            |
| <b>Citocromo c</b>             | 81       | 37 (45.6%)            | 44 (54.4%)            |
| <b>Caspase 3 clivada</b>       | 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     |
| <b>Sexo</b>             |                         |    |        |                             |    |       |
| 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 |       |
| <b>Estágio clínico</b>  |                         |    |        |                             |    |       |
| 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  |       |
| <b>Adenocarcinoma</b>   |                         |    |        |                             |    |       |
| 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 |       |
| <b>Localização</b>      |                         |    |        |                             |    |       |
| 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 |       |
| <b>Tamanho do Tumor</b> |                         |    |        |                             |    |       |
| ≤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 |       |
| <b>Cirurgia</b>         |                         |    |        |                             |    |       |
| 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 |       |
| <b>Margem Cirúrgica</b> |                         |    |        |                             |    |       |
| 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  |       |
| <b>Linfonodos</b>       |                         |    |        |                             |    |       |
| 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     |
| <b>Sexo</b>             |                         |    |       |                             |    |       |
| <b>Masculino</b>        | 3.2 (3.80)              | 50 | 0.573 | 3.6 (3.76)                  | 48 | 0.602 |
| <b>Feminino</b>         | 3.1 (3.67)              | 34 |       | 4.1 (4.00)                  | 31 |       |
| <b>Estágio clínico</b>  |                         |    |       |                             |    |       |
| <b>I</b>                | 2.2 (3.47)              | 13 | 0.089 | 3.7 (4.29)                  | 12 | 0.977 |
| <b>II</b>               | 5.1 (4.31)              | 14 |       | 3.9 (3.90)                  | 15 |       |
| <b>III</b>              | 2.9 (3.54)              | 56 |       | 3.8 (3.82)                  | 51 |       |
| <b>IV</b>               |                         | 4  |       |                             | 9  |       |
| <b>Adenocarcinoma</b>   |                         |    |       |                             |    |       |
| <b>Difuso</b>           | 2.5 (3.39)              | 25 | 0.303 | 4.2 (3.81)                  | 25 | 0.622 |
| <b>Intestinal</b>       | 3.4 (3.86)              | 59 |       | 3.6 (3.87)                  | 54 |       |
| <b>Localização</b>      |                         |    |       |                             |    |       |
| <b>Cárdia</b>           | 2.5 (3.54)              | 28 | 0.571 | 4.0 (4.15)                  | 26 | 0.796 |
| <b>Antro</b>            | 3.6 (3.88)              | 36 |       | 3.9 (3.77)                  | 35 |       |
| <b>Corpo</b>            | 3.3 (3.75)              | 20 |       | 3.3 (3.66)                  | 18 |       |
| <b>Tamanho do Tumor</b> |                         |    |       |                             |    |       |
| <b>≤3 cm</b>            | 3.7 (4.00)              | 20 | 0.652 | 3.5 (3.75)                  | 19 | 0.689 |
| <b>&gt;3 cm</b>         | 3.0 (3.66)              | 64 |       | 3.9 (3.89)                  | 60 |       |
| <b>Cirurgia</b>         |                         |    |       |                             |    |       |
| <b>Total</b>            | 2.8 (3.59)              | 40 | 0.637 | 3.8 (3.75)                  | 33 | 0.909 |
| <b>Parcial</b>          | 3.5 (3.86)              | 44 |       | 3.8 (3.94)                  | 46 |       |
| <b>Margem Cirúrgica</b> |                         |    |       |                             |    |       |
| <b>Livre</b>            | 3.0 (3.66)              | 75 | 0.299 | 3.7 (3.85)                  | 71 | 0.695 |
| <b>Comprometida</b>     | 4.3 (4.27)              | 9  |       | 4.5 (3.93)                  | 8  |       |
| <b>Linfonodos</b>       |                         |    |       |                             |    |       |
| <b>Metástase</b>        | 2.9 (3.56)              | 60 | 0.393 | 3.9 (3.87)                  | 56 | 0.754 |
| <b>Comprometidos</b>    | 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     |
| <b>Sexo</b>             |                         |    |        |                             |    |       |
| 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 |       |
| <b>Estágio clínico</b>  |                         |    |        |                             |    |       |
| 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  |       |
| <b>Adenocarcinoma</b>   |                         |    |        |                             |    |       |
| 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 |       |
| <b>Localização</b>      |                         |    |        |                             |    |       |
| 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 |       |
| <b>Tamanho do Tumor</b> |                         |    |        |                             |    |       |
| ≤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 |       |
| <b>Cirurgia</b>         |                         |    |        |                             |    |       |
| 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 |       |
| <b>Margem Cirúrgica</b> |                         |    |        |                             |    |       |
| 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  |       |
| <b>Linfonodos</b>       |                         |    |        |                             |    |       |
| 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 ( $p=0.049$ ).

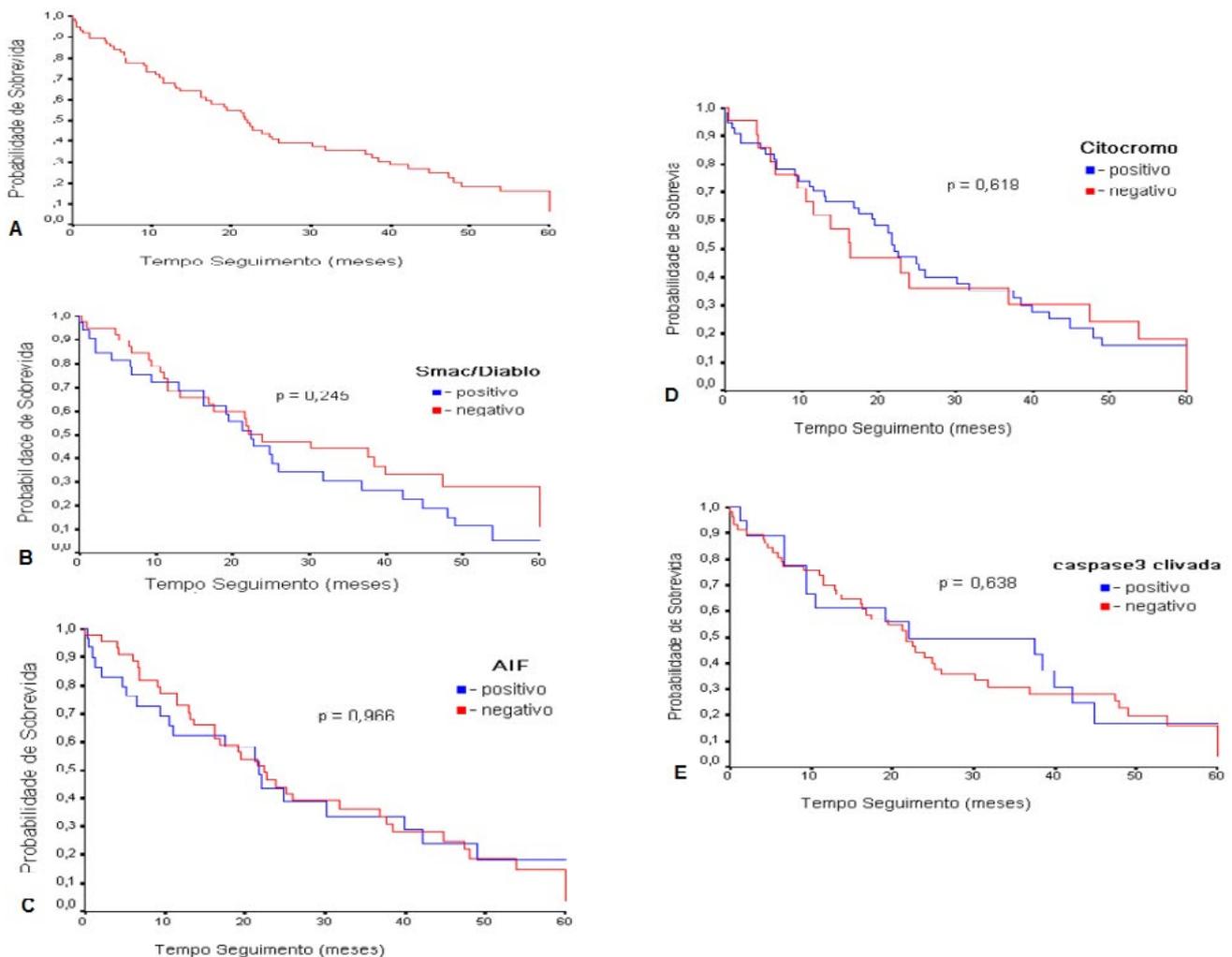
**Tabela 7** - Expressão de caspase-3 clivada em amostras teciduais de adenocarcinomas gástrico e mucosa gástrica não tumoral associada aos dados clínicos dos pacientes e morfológicos do tumor.

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       |
| <b>Sexo</b>             |                         |    |        |                             |    |         |
| 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 |         |
| <b>Estágio clínico</b>  |                         |    |        |                             |    |         |
| 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  |         |
| <b>Adenocarcinoma</b>   |                         |    |        |                             |    |         |
| 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 |         |
| <b>Localização</b>      |                         |    |        |                             |    |         |
| 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 |         |
| <b>Tamanho do Tumor</b> |                         |    |        |                             |    |         |
| ≤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 |         |
| <b>Cirurgia</b>         |                         |    |        |                             |    |         |
| 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 |         |
| <b>Margem Cirúrgica</b> |                         |    |        |                             |    |         |
| 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  |         |
| <b>Linfonodos</b>       |                         |    |        |                             |    |         |
| 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, <sup>1,2,3</sup> 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 <sup>11</sup>.

Os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico incluem a infecção pelo *Helicobacter pylori* <sup>12</sup>, idade avançada, em especial em pacientes do sexo masculino <sup>13</sup>, dieta rica em sal e pobre em fibras vegetais <sup>14</sup>, tabagismo <sup>15</sup>, gastrite crônica atrófica <sup>16</sup>, metaplasia intestinal da mucosa gástrica <sup>17</sup>, pólipos adenomatosos gástricos <sup>18</sup>, gastrite hipertrófica gigante <sup>19</sup>, e polipose adenomatosa familiar <sup>20</sup>.

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 iniciais <sup>21</sup>. Uma vez que pacientes com câncer gástrico em estágios iniciais são assintomáticos, o diagnóstico é realizado tardiamente na grande maioria dos casos <sup>22</sup>. Assim, a maior possibilidade de cura destes pacientes reside na ressecção tumoral em casos onde não ocorre disseminação para órgãos distantes <sup>23</sup>.

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 neuroendócrinos <sup>24</sup>.

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 intestinal <sup>25</sup>, ao passo que o tipo difuso tem origem a partir de células mucosas gástricas nativas <sup>26</sup>. A amplificação de HER-2 <sup>27</sup> e a expressão aumentada de  $\beta$ -catenina <sup>28</sup> 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 difuso <sup>29</sup>, e mutações no gene que codifica o receptor 2 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR2) estão presentes em 30% dos adenocarcinomas tipo difuso <sup>30</sup>.

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 <sup>2, 13</sup>.

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 cirurgicamente <sup>31</sup>. 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 <sup>11</sup>, apresentam sobrevida reduzida <sup>32, 33</sup>, 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 <sup>11, 34</sup>, verificamos em nossos pacientes que 32.2% apresentaram adenocarcinoma tipo difuso e 67.8% do tipo intestinal. LAZAR e colaboradores <sup>32</sup> descreveram uma maior porcentagem de pacientes acometidos pelo tipo intestinal (62.3%), embora outros autores descrevam uma menor prevalência deste tipo histológico <sup>35</sup>. 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 <sup>36, 37</sup>.

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 <sup>38</sup>, 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 <sup>10, 39</sup>.

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

A expressão de Smac/DIABLO por Real-Time PCR esteve correlacionada com estágios avançados e achados clinicopatológicos de carcinoma gástrico <sup>38</sup>, 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 <sup>42</sup>.

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 <sup>42</sup>. 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 <sup>43</sup>.

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 <sup>44</sup>.

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 <sup>45</sup>. LEE e colaboradores <sup>46</sup> verificaram a expressão citoplasmática desta proteína em 73% dos carcinomas gástricos do tipo intestinal e em 65% do tipo difuso. JEONG e colaboradores <sup>47</sup> 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 <sup>48</sup>.

A apoptose de células da linhagem tumoral HGC-27 está associada com diferentes graus de expressão de APAF-1, citocromo c e caspase 3 <sup>49</sup>; e o celecoxib <sup>50</sup> e oridonin <sup>51</sup> 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 <sup>52</sup>.

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 <sup>53</sup>, em 79.8% das amostras de tecido tumoral e em 36.9% das amostras de mucosa gástrica não tumoral adjacente <sup>54</sup>. A expressão de caspase-3 é considerada um fator de mau prognóstico no câncer gástrico avançado <sup>55</sup>.

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

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) <sup>62</sup>, citotoxina vacuolizante (VacA) <sup>63</sup>, acetato de sódio <sup>64</sup>, 3-bromopiruvato e citrato de sódio <sup>65</sup>, dioscina <sup>66</sup>, e ziyuglucoside II <sup>67</sup>.

## 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.

# IMPLICAÇÕES ODONTOLÓGICAS DOS TRANSTORNOS ALIMENTARES EM MULHERES: ANOREXIA NERVOSA E BULIMIA NERVOSA

## DENTAL IMPLICATIONS OF EATING DISORDERS IN WOMEN: ANOREXIA NERVOSA AND BULIMIA NERVOSA

**Spezzia S**

Cirurgião Dentista. Especialista em Saúde da Mulher no Climatério pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Mestre em Ciências pela Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo.

### RESUMO

Os transtornos alimentares constituem alteração persistente do comportamento alimentar e/ou dos comportamentos voltados para o controle de peso. Transtornos alimentares são advindos de distúrbios graves no comportamento alimentar. Os principais tipos são: anorexia nervosa e bulimia nervosa, prevalecendo em mulheres. Existe prevalência e probabilidade muito maior em mulheres, 90 a 95% dos casos envolvem mulheres brancas, jovens e afluentes. O objetivo deste trabalho foi averiguar as implicações odontológicas, possivelmente ocasionadas pela anorexia e pela bulimia. O tratamento realizado requer intervenção de alguns profissionais de saúde, dentre eles, o cirurgião dentista. Sob enfoque odontológico, a erosão dental com perda de substância dental, comumente é encontrada em mulheres com anorexia nervosa e bulimia nervosa. Concluiu-se que o tratamento odontológico empregado nas manifestações orais da AN e BN visa evitar agravantes futuros com piora no quadro geral das pacientes.

**Palavras-Chave:** anorexia nervosa; bulimia nervosa; erosão dentária; mulheres; qualidade de vida.

### ABSTRACT

Eating disorders are a persistent alteration in eating behavior and/or weight control behaviors. Eating disorders are the result of serious disturbances in eating behavior. The main types are: anorexia and bulimia nervosa, prevailing in women. There is a much higher prevalence and probability in women, 90 to 95% of the cases involving white, young, affluent women. The objective of this study was to investigate the odontological implications, possibly caused by anorexia

and bulimia. The treatment performed requires the intervention of some health professionals, among them the dental surgeon. Under a dental approach, dental erosion with loss of dental substance is commonly found in women with anorexia nervosa and bulimia nervosa. It was concluded that the dental treatment used in the oral manifestations of AN and BN aims to avoid future aggravators with worsening of the patients' overall condition.

**Key-words:** anorexia nervosa; bulimia nervosa; tooth erosion; quality of life; women.

## 1. INTRODUÇÃO

Os transtornos alimentares constituem alterações persistentes do comportamento alimentar e/ou dos comportamentos voltados para o controle de peso, acarretando em prejuízos a saúde física<sup>1</sup>.

Um transtorno alimentar é marcado por extremos e faz-se presente quando a pessoa experimenta distúrbios graves no comportamento alimentar, como redução extrema da ingestão de comida, comer exageradamente ou sentimentos de grande angústia ou desconforto sobre o peso e forma do corpo. Uma pessoa com transtorno alimentar pode começar comendo quantidades menores ou maiores que o usual, porém em algum ponto o impulso de comer mais ou menos sai fora do controle. A etiologia dos transtornos alimentares é constituída por um conjunto de fatores em interação, que envolvem componentes biológicos, psicológicos, familiares e sócio-culturais. Os dois principais tipos são: anorexia nervosa (AN) e bulimia nervosa (BN). A prevalência de AN e BN é muito maior em mulheres, 90 a 95% dos casos envolvem mulheres brancas e jovens<sup>2,3</sup>.

O objetivo deste trabalho foi averiguar as implicações odontológicas, possivelmente ocasionadas pela AN e pela BN.

## 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A AN é doença grave de etiologia multifatorial, que envolve predisposição genética, fatores socioculturais, vulnerabilidades biológicas e psicológicas<sup>4</sup>.

Caracteriza-se por séria restrição alimentar auto-imposta, com consequências orgânicas e psíquicas graves e alta taxa de mortalidade. Sua definição clínica diz que estabelece como característica principal a perda auto-induzida de importância, provocada por uma preocupação patológica pela forma e o peso do próprio corpo, que mais tarde se manifesta mediante o controle excessivo

da ingesta de alimentos. Apresenta-se normalmente na adolescência, mas em outros casos em idades mais tardias (20 aos 40 anos de idade). Normalmente aparece nas mulheres, mas também se dão casos no gênero masculino<sup>4</sup>.

Uma mulher com AN é chamada de anoréxica. Uma mulher anoréxica pode ser também bulímica<sup>4</sup>.

O indivíduo anoréxico recusa-se a manter o peso mínimo de acordo com sua idade e altura, podendo estar com o peso corporal 15% abaixo do esperado. A pessoa com anorexia pode empregar métodos adicionais para perder peso, como abuso de laxantes, diuréticos ou anorexígenos, indução de vômitos e exercícios físicos em excesso. Pode desenvolver rituais alimentares, como pesar todos alimentos e pesar compulsivamente. Há grande prejuízos nos relacionamentos interpessoais. Estima-se uma incidência de morte em 20% dos casos<sup>5-10</sup>.

Na BN a pessoa ingere muita comida em pouco tempo e então busca prevenir o ganho de peso ao tentar se livrar do que comeu, tentando vomitar ou tomando laxantes. A mulher encontra-se com bulimia quando ela tem compulsão alimentar, ou seja, come exageradamente, sem nenhum tipo de controle e em seguida faz uso inadequado de laxantes, diuréticos, vômitos, jejum ou exercícios para prevenir o ganho de peso. A atitude em relação ao peso é extremada: pesam-se compulsivamente ou evitam a balança. A pessoa com BN sente como se não pudesse controlar a quantidade de alimentos que come. Pessoas com bulimia também podem se exercitar muito para prevenir o ganho de peso. Ao contrário da anorexia, pessoas com bulimia podem estar dentro da faixa de peso normal. A alimentação compulsiva pode ser desencadeada por dieta, estresse ou emoções desconfortáveis<sup>11-14</sup>.

Na BN, os critérios diagnósticos incluem episódios recorrentes de compulsão alimentar caracterizados pelos critérios de ingerir em curto espaço de tempo uma quantidade de comida muito maior do que a maioria das pessoas em circunstâncias semelhantes conseguiria comer num período semelhante de tempo e sensação de total falta de controle durante o episódio, além de compulsões alimentares e comportamentos compensatórios que ocorrem pelo menos duas vezes por semana por três meses; indevida influência do peso ou forma corporal na auto-avaliação<sup>15-17</sup>.

No enfoque odontológico, a erosão dental com perda de substância dental, comumente é encontrada em pacientes com AN e BN<sup>4</sup>.

Os dentes adquirem coloração escuro-acinzentada. Em dentes com restaurações de amálgama pode haver um aspecto de projeção dessas restaurações, as chamadas ilhas de amálgama, produzidas pela deterioração do esmalte adja-

cente. Em casos mais graves, as bordas incisais dos dentes são acometidas, produzindo coroas clínicas curtas e aparência de pseudomordida aberta<sup>18</sup>.

No contexto da conduta odontológica é importante o ganho de confiança do paciente na anamnese pelo cirurgião dentista, ao invés de dirigir perguntas diretas sobre AN e BN, o mesmo deve discorrer sobre hábitos alimentares e possibilidade de existência de problemas gastrointestinais. Essa postura de certa forma leva a resultados positivos sob o ponto de vista do tratamento do transtorno alimentar, pois possibilita melhora da autoestima da paciente por meio do tratamento odontológico ao longo do tempo, evitando a deterioração dos dentes<sup>15,16</sup>.

O cirurgião dentista deve estar preparado para um manejo adequado da paciente, abordando o assunto com habilidade suficiente para ganhar sua confiança<sup>19</sup>, além disso ele pode ser possivelmente o primeiro profissional de saúde a diagnosticar a AN, BN<sup>15,16</sup>, devido a perdas de substância dental resultantes, chamadas de erosão dental, oriundas de um ambiente bucal cronicamente ácido, o que o torna com papel de destaque na identificação da doença nas mulheres contactantes que veem em busca de atendimento dentário<sup>17</sup>.

Objetos usados na indução do vômito, dedos, escovas e canetas podem provocar lesões no palato mole, também pode ocorrer desidratação, eritema e queilite angular. Além da erosão, outras manifestações das desordens de alimentação podem incluir aumento assintomático das parótidas, xerostomia, irritações da mucosa oral, sensibilidade dental à alteração de temperatura, mordida aberta anterior e maior frequência de cáries, como as cáries radiculares e de outros tipos<sup>18,20,21</sup>. Aparece ainda, o sinal de Russel, que é uma lesão no dorso da mão provocada pelo trauma repetido dos dentes incisivos na indução do vômito<sup>22</sup>.

Nesse contexto de abordagem clínica odontológica, gerar-se-à nessas mulheres, melhor resultado no tratamento odontológico, possibilitando sua referência para serviços com abordagem multidisciplinar, dentre eles: psicoterápico, médico e nutricional<sup>4</sup>.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em Psicologia, a autoestima, inclui a avaliação subjetiva que uma pessoa faz de si mesma, como sendo intrinsecamente positiva ou negativa em algum grau. É a avaliação que o indivíduo faz de suas experiências interpessoais, atribuindo juízo de valor a si mesmo. As crianças formam sua autoestima, dependendo da maneira como são tratadas por pessoas importantes para ela, tais como: pais,

amigos e professores. Outros dois termos são usados, muitas vezes como sinônimos de autoestima: autoconfiança e autoaceitação<sup>4</sup>.

A psicoterapia para baixa autoestima, baseia-se em quatro pilares da auto-estima: autoaceitação, autoconfiança, competência social e rede social. A baixa autoestima gera: ansiedade, medo, depressão e fobias. Na anorexia nervosa, baixa autoestima e distorção da imagem corporal são os principais componentes que reforçam a busca de um emagrecimento incessante, levando a prática de exercícios físicos, jejum e uso de laxantes ou diuréticos de uma forma intensa<sup>4</sup>.

O tratamento a ser realizado é longo e exige atendimento permanente, devido a frequentes recaídas, oriundas na maioria das vezes do ganho de peso que causa horror as doentes. É preciso alimentar as pacientes aos poucos, uma vez que seu corpo está desacostumado a comida. Além de ser individualizado de acordo com as necessidades de cada paciente pode incluir medicações e é realizado de forma interdisciplinar: médico, psicológico, nutricional e odontológico, acompanhando-se a paciente, juntamente com a família<sup>23-25</sup>.

No âmbito do tratamento realizado por equipe multidisciplinar, o tratamento odontológico restaurador será realizado com o intuito de auxiliar o tratamento psicológico, na tentativa de aumentar a autoestima da paciente e poderá variar, desde uma simples restauração até reabilitações bucais complexas em pacientes com perda de dimensão vertical<sup>15</sup>. Lembrando ainda, que se houver falta de dentes nessas mulheres, ter-se-à prejuízo na qualidade de vida e muitas vezes na autoestima, principalmente quando a estética do sorriso fica comprometida<sup>4</sup>.

Um dos principais problemas para o cirurgião dentista no trabalho com pacientes com desordens alimentares, advém de seus problemas psicológicos<sup>19</sup>.

Normalmente os pacientes são bastante compulsivos em seus comportamentos diários. Sua higiene bucal é bastante meticulosa, repetitiva e muitas vezes seguida de escovações agressivas após o ato de vomitar, podendo resultar em abrasão severa. A mucosa bucal e a faringe dos pacientes com distúrbios alimentares podem sofrer também traumatismos, devido a rápida ingestão de grande quantidade de comida e a força de regurgitação<sup>15,16</sup>.

Concluiu-se que o tratamento odontológico empregado nas manifestações orais da AN e BN visa evitar agravantes futuros com piora no quadro geral das pacientes.

O atendimento odontológico é capaz de melhorar as condições e a qualidade de vida das mulheres com AN e BN, minimizando o desconforto ocasionado pelas doenças que possuem repercussões em âmbito bucal.

## REFERÊNCIAS

1. Fairburn CG, Walsh BT. Atypical eating disorders. In: Brownell KD, Fairburn CG, editors. Eating disorders and obesity: a comprehensive handbook. New York: The Guilford Press; 1995. p. 183-7.
2. Castro MJ, Goldstein JS. Eating attitudes and behaviors of pré-and postpubertal females: clues to the etiology of eating disorders. *Physiology and Behavior*, 1995; 58(1):15-23.
3. Holk HW. Incidence, prevalence and mortality of anorexia nervosa and other eating disorders. *Current Opinion in Psychiatry*, 2006; 19(4):389-94.
4. Spezzia S, Saba A, Antunes RVC, Calheiros ESJ, Limberte CS, Munhoz J et al. Alterações da Autoestima em Mulheres com Transtornos Alimentares: Anorexia e Bulimia Nervosas. Implicações Odontológicas e Psicológicas. In: VIII Jornada Apoiar - Promoção de Vida e Vulnerabilidade Social na América Latina: Reflexões e Propostas, 2010, São Paulo - SP. Caderno de Anais da VIII Jornada Apoiar - Promoção de Vida e Vulnerabilidade Social na América Latina: Reflexões e Propostas. Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (IPUSP). São Paulo - SP: Biblioteca Dante Moreira Leite, 2010. p. 315-26.
5. Garfinkel PE, Garner DM. Anorexia nervosa: a multidimensional perspective. New York: Brunner and Mazel; 1982.
6. Russell GF, Dare C, Eisler BA, LeGrange PD. Controlled trials of family treatments in anorexia nervosa. In: Halmi KA, editor. Psychobiology and treatment of anorexia nervosa and bulimia nervosa. Washington (DC): American Press Association; 1992. p. 237-61.
7. Garner DM, Needleman LD. Sequencing and integration of treatments. In: Handbook of treatment for eating disorders. New York: Guilford Press; 1997. p. 50-63.
8. Silva MR. Anorexia nervosa em crianças e adolescentes: uma experiência clínica hospitalar. *Psicoterapia e Estudos Psicossociais*, 2003; 2(1):21-40.
9. Ballone GJ. Anorexia Nervosa. PsiqWeb: Psiquiatria Geral. Disponível em: <<http://gballone.sites.uol.com.br/anorexia.html>>. Acesso em 21 nov. 2016.
10. Giordani RCF. A auto-imagem corporal na anorexia nervosa: uma abordagem sociológica. *Psicologia & Sociedade*, 2006; 18(2):81-8.
11. Russell GFM. Bulimia nervosa: an ominous variant of anorexia nervosa. *Psychol Med*, 1979; 9:429-48.
12. Johnson C, Tobin DL, Dennis A. Differences in treatment outcome between borderline and nonborderline bulimics at 1 year follow-up. *Int J Eat Disord*, 1990; 9:617-27.

- 13.** Griffiths RA, Channon-Little L. Psychological treatments and bulimia nervosa: an update. *Austr Psychol*, 1996; 31:79-96.
- 14.** Oliveira MD. O impasse narcísico na bulimia nervosa. *Mudanças Psicoter Estud Psicossociais*, 2001; 9(15):13-26.
- 15.** Burke FJT, Bell TJ, Ismail N, Hartley P. Bulimia: implications for the practicing dentist. *Brit Dent J*, 1996; 180(11):421- 6.
- 16.** Schmidt U, Treasure J. Eating disorders and the dental practitioner. *Eur J Prosthodont Restor Dent*, 1997; 5(4):161-7.
- 17.** Wiseman CV, Harris WA, Halmi KA. Eating disorders. *Med Clin North Am*, 1998; 82(1): 145-57.
- 18.** Pegoraro CN, Sakamoto FFO, Domingues LA. Perimólise: etiologia, diagnóstico e prevenção. *Rev Assoc Paul Cir Dent*, 2000; 54:156-61.
- 19.** Hazelton LR, Faine MP. Diagnosis and dental management of eating disorder patients. *Int J Prosthodont*, 1996; 9(1):65-73.
- 20.** Rytomaa I, Järvinen V, Kanerva R, Heinonen OP. Bulimia and tooth erosion. *Acta Odontol Scand*, 1998; 56(1):36-40.
- 21.** Francischone CE, D'alpino PHP, Castañeda-Espinosa JC, Mondelli RFL. Tratamento conservador de dentes com erosão decorrente de bulimia nervosa: restabelecimento da guia anterior. *J Bras Clin Odontol Int*, 2003; 7(38):100-5.
- 22.** Fisher M, Golden NH, Katzman DK, Kreipe RE, Ress J, Schebendach J, et al. Eating disorders in adolescents: a Background Paper. *J Adolesc Health*, 1995;16:420-37.
- 23.** Sedikides C, Gregg AP. "Portraits of the self." In: Hogg MA, Cooper J (Eds.), *Sage handbook of social psychology*. Londres: Sage Publications, 2003, p. 110-38.
- 24.** Castro J, Toro J, Cruz M. Quality of rearing practices as predictor of short-term outcome in adolescent anorexia nervosa. *Psychological Medicine*, 2000; 30:61-7.
- 25.** Webster JJ, Palmer RL. The childhood and family background of women with clinical eating disorders: a comparison with major depression and women without psychiatric disorder. *Psychological Medicine*, 2000; 30:53-60.





