



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

As metaloproteinases e a metastização linfática do carcinoma gástrico: estudo exploratório

Pedro Augusto Gomes Rodrigues Marques Simões

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Dr. Pedro Miguel Azevedo Serralheiro

Covilhã, maio de 2015

Pelo Sonho é que vamos,
comovidos e mudos.
Chegamos? Não chegamos?
Haja ou não haja frutos,
pelo Sonho é que vamos.

Basta a fé no que temos.
Basta a esperança naquilo
que talvez não teremos.
Basta que a alma demos,
com a mesma alegria,
ao que desconhecemos
e ao que é do dia-a-dia.

Chegamos? Não chegamos?
- Partimos. Vamos. Somos.

SEBASTIÃO DA GAMA
Pelo Sonho é que vamos

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Pedro Miguel Azevedo Serralheiro, por toda a sua dedicação, empenho e ajuda, apesar da distância que nos separou.

Ao Professor Doutor Cláudio Maia pelo apoio prestado na interpretação dos dados do RT-PCR.

Ao Professor Doutor Jorge Gama e ao Dr. Nuno Sena pelas sugestões e ajudas no tratamento estatístico dos dados.

À Dr.^a Andreia Soares pela revisão cuidada de todo o trabalho.

Aos meus pais e ao meu irmão por todo o apoio e ajuda que me deram.

Aos meus amigos pelos 6 anos que passámos e por todo o vosso apoio.

Resumo

Introdução: A neoplasia gástrica é um grave problema de saúde pública e um objeto de investigação científica pertinente. As metaloproteinases (MMP's) e os seus inibidores (TIMP's) têm importantes funções na remodelação fisiológica da matriz extracelular, estando também envolvidas em processos patológicos. Um desequilíbrio na dualidade MMP's/TIMP's aparenta ser crucial para o crescimento, invasão e metastização das células tumorais assim como para a neoangiogénese.

Objetivos: Analisar a variabilidade da expressão genética de MMP's e TIMP's em função do número de gânglios invadidos e do padrão de metastização linfática no carcinoma gástrico. Adicionalmente, estudar a relação entre a expressão de MMP's e TIMP's e outras variáveis como: tipo de amostra da mucosa gástrica testada, variáveis consideradas de mau prognóstico ou características clínico-patológicas.

Materiais e métodos: Foram estudadas 12 amostras de mucosa (metade das quais macroscopicamente tumoral, a outra metade macroscopicamente normal), colhidas em 6 pacientes com carcinoma gástrico. Recorreu-se ao real-time polymerase chain reaction para o estudo da expressão genética de MMP1, MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, TIMP3 e TIMP4.

Resultados: Os dados apontam para a existência de associações, de um modo geral, baixas entre o número de gânglios invadidos e a expressão de MMP's e/ou TIMP's e para um aumento de expressão de MMP's (e da maioria dos seus inibidores) nos tumores com metastização linfática mais distante. Por sua vez, a expressão de algumas MMP's (particularmente a MMP1) apresentou-se aumentada na mucosa tumoral, sobretudo nos tumores de estádios avançados. No entanto, a maioria dos fatores de mau prognóstico surgiu negativa e fortemente correlacionada com as MMP's e/ou TIMP's, destacando-se as associações estatisticamente significativas entre o valor de CA 19.9 e a expressão genética de MMP1 e de MMP2.

Conclusão: Ainda que este estudo exploratório não esteja isento de limitações, há alguns indícios de que os tumores gástricos com a expressão aumentada de MMP's e TIMP's poderão ser mais agressivos, devendo por isso ser tratados com uma linfadenectomia mais alargada.

Palavras-chave

Adenocarcinoma gástrico, marcadores tumorais, metastização linfática, MMP, TIMP.

Abstract

Introduction: Gastric cancer is a major public health problem and a relevant scientific research object. The matrix metalloproteinases (MMP's) and their inhibitors (TIMP's) have important physiological roles in extracellular matrix remodeling and are also involved in pathological processes. An imbalance of MMP's/TIMP's appears to be crucial for the growth, invasion and metastasis of tumor cells as well as for the neoangiogenesis.

Objectives: To analyze the variability of gene expression of MMP's and TIMP's based on the number of invaded lymph nodes and the lymphatic metastasis pattern in gastric carcinoma. In addition, to study the relationship between MMP's and TIMP's expressions and other variables such as the type of gastric mucosa sample, poor prognostic factors and clinicopathologic features.

Materials and methods: 12 mucosa samples (half of which macroscopically tumoral, the other half macroscopically normal) were harvested from 6 patients with gastric carcinoma and subjected to study. Real-time polymerase chain reaction was performed to study the genetic expression of MMP1, MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, TIMP3 and TIMP4.

Results: Data shows generally low associations between the number of invaded lymph nodes and the genetic expression of MMP's and/or TIMP's and an increase of MMP's expression (and of most of their inhibitors) in tumors with more distant lymphatic metastasis. In turn, the expression of some MMP's (particularly MMP-1) appeared to be increased in tumoral mucosa, particularly in advanced-stage tumors. However, the majority of poor prognostic factors seemed to be negative and strongly correlated with MMP's and/or TIMP's, with particular emphasis on statistically significant associations between CA19.9 value and genetic expression of MMP1 and MMP2.

Conclusion: Although this exploratory study has some limitations, there is some evidence that gastric tumors with increased expression of MMP's and TIMP's may be more aggressive and therefore should be treated with more extensive lymphadenectomy.

Keywords

Gastric adenocarcinoma, tumor markers, lymphatic metastasis, MMP, TIMP.

Índice

1 Revisão da Literatura	1
2 Estudo Empírico	3
2.1 Fundamentação, objetivos do estudo e hipóteses de investigação	3
2.2 Amostras e procedimentos de recolha de dados	4
2.3 Variáveis e tratamento estatístico dos dados	6
2.4 Considerações éticas e legais	7
2.5 Resultados	8
2.6 Discussão e Conclusão	13
3 Bibliografia	17
4 Anexos	20

Lista de Figuras

Figura 1 - Estações ganglionares de drenagem linfática do estômago

1

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estadiamento tumoral dos sujeitos do estudo	5
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados no estudo	6
Tabela 3 - Dados descritivos das variáveis quantitativas em estudo	8
Tabela 4 - Dados descritivos das variáveis qualitativas em estudo	8
Tabela 5 - Dados descritivos da expressão de MMP's e TIMP's em função do tipo de amostra de mucosa e de variáveis clínico-patológicas	10
Tabela 6 - Resultados da aplicação dos testes <i>t</i> de Student ou dos testes <i>U</i> de Mann-Whitney	11
Tabela 7 - Resultados da determinação do coeficiente de correlação	12

Lista de Acrónimos

CA 19.9	<i>Cancer antigen 19.9</i>
CA 72.4	<i>Cancer antigen 72.4</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
ECM	Matriz extracelular
MMP's	Metaloproteinases
PCR	Proteína C-reativa
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TIMP's	Inibidores teciduais das metaloproteinases
TNM	Tumor, Nódulos e Metástases
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>

I - Revisão da literatura

A neoplasia gástrica constitui a segunda causa de morte por cancro a nível mundial e a quarta causa na União Europeia, sendo, portanto, um grave problema de saúde pública [1] e um objeto de investigação científica cada vez mais premente.

A drenagem linfática do estômago é realizada para 16 estações ganglionares principais (Figura 1). Para os tumores do cárdia e do fundo gástrico, as estações 1, 2, 3 e 4 são consideradas estações de proximidade (N1) e as 5, 6 e 7-11 são consideradas distais (N2). Para os tumores do corpo, as estações 1 e 3-6 são assumidas como estações de proximidade (N1) e as 2 e 7-11 são assumidas como distais (N2). Finalmente, para os tumores do antro, as estações 3-6 são consideradas estações de proximidade (N1) e as 1, 2 e 7-9 são consideradas distais (N2). Os grupos ganglionares N1 são ressecados quando se realiza uma linfadenectomia tipo D1. As estações 12 e 13 (N3) e 15 e 16 (N4), consideram-se ainda mais distantes e, quando se encontram invadidas, a doença tumoral é considerada avançada [1]. Para uma linfadenectomia D2 é necessário ressecar os grupos ganglionares N2.

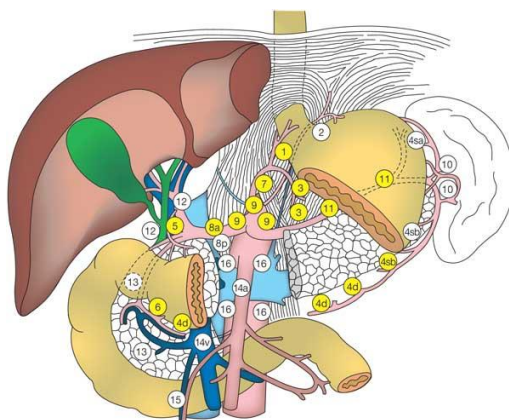


Figura 1 - Estações ganglionares de drenagem linfática do estômago. Roukos & Kappas, Perspectives in the treatment of gastric cancer, 2005 [2].

A ressecção cirúrgica com margens livres de doença é considerada crucial para uma terapêutica curativa, sendo o fator prognóstico mais importante na neoplasia gástrica ressecável a invasão linfática, ou seja, depende do número de gânglios linfáticos invadidos. Não existe, contudo, consenso quanto ao correto estadiamento da doença, na medida em que este depende do número de gânglios invadidos que são sujeitos a excisão operatória. Assim, uma linfadenectomia mais extensa (D2) apresenta um valor prognóstico mais elevado do que uma linfadenectomia menos extensa (D1), mas é também responsável por uma maior taxa de morbi-mortalidade pós-operatória [3].

O facto anterior motivou a realização de vários estudos cujo objetivo foi definir o verdadeiro benefício da extensão da linfadenectomia [1, 4, 5]. Os resultados obtidos em centros asiáticos demonstraram benefícios na sobrevida a cinco anos dos doentes sujeitos a uma linfadenectomia D2, enquanto a maioria dos resultados obtidos no ocidente não confirmaram benefícios na sobrevida global e ainda apontaram para um aumento da morbi-mortalidade hospitalar [4-5]. Atualmente, apesar de se considerar que devem ser realizadas linfadenectomias D2, acredita-se que estas só deverão ser realizadas por cirurgiões que exerçam as suas funções em centros de elevado volume e com experiência suficiente para tal. Não obstante este facto, mantém-se a discussão científica sobre a linfadenectomia mais apropriada a cada doente, sendo de importância vital a definição da extensão da linfadenectomia mais benéfica em cada caso.

As metaloproteinases da matriz (MMP's) compreendem uma vasta família de endopeptidases ligadas ao zinco [6-9]. Podem ser divididas em cinco grupos principais de acordo com a sua estrutura e especificidade do substrato: colagenases, gelatinases, tipo de membrana, estromelisinases e matrilisinases. A maioria das MMP's são reguladas por inibidores endógenos denominados inibidores tecidulares das metaloproteinases (TIMP's) [9].

As MMP's têm importantes funções na remodelação fisiológica da matriz extracelular (ECM), tais como a regeneração, reparação de lesões e desenvolvimento embrionário [8, 10], estando também envolvidas em processos patológicos, como a degradação da ECM [6, 8, 9, 11, 12] que está associada ao crescimento, invasão e metastização das células tumorais assim como na angiogénese [6-17]. Para que este processo ocorra, acredita-se que seja necessário um desequilíbrio da dualidade MMP/TIMP [9], ou seja, uma sobre-expressão de MMP's em relação aos TIMP's, nas células tumorais.

Estudos recentes sugerem que as células tumorais metastizam especificamente para locais recetivos, designados nichos pré-metastáticos, numa complexa interação com as células inflamatórias e as células progenitoras hematopoiéticas, sendo provável que as MMP's tenham um papel crucial na formação destes nichos metastáticos [15].

Vários estudos já identificaram uma relação significativa entre a expressão de MMP's (nomeadamente MMP-2 e MMP-9) e os estádios *Union for International Cancer Control* (UICC - TNM; que têm em consideração a profundidade da invasão do tumor, as metástases linfáticas e a metastização à distância), indicando que estas enzimas podem ter um papel significativo na migração tumoral. Tal facto desencadeou o interesse pelo estudo do papel das MMP's como marcadores de prognóstico do carcinoma gástrico [7, 10, 18-20].

II - Estudo Empírico

1. Fundamentação, objetivos do estudo e hipóteses de investigação

Da revisão da literatura sobressaiu que (1) a neoplasia gástrica é um grave problema de saúde pública e um objeto de investigação científica pertinente; (2) apesar do mecanismo molecular que influencia a progressão da doença ainda não ser totalmente conhecido, um desequilíbrio na dualidade MMP's/TIMP's aparenta ser crucial para o crescimento, invasão e metastização das células tumorais e para a angiogénese, atuando na degradação e remodelação da ECM.

Este estudo pretende contribuir para o corpo de conhecimento da investigação sobre a patologia a nível molecular no adenocarcinoma gástrico. A sua pertinência clínica prende-se com a identificação de um padrão de metastização linfática gástrica que auxiliaria a melhorar o tratamento cirúrgico, na medida em que permitiria realizar a linfadenectomia dirigida às adenopatias metastizadas, em detrimento da realização da linfadenectomia alargada indiscriminada. Deste modo, com uma simples biópsia por endoscopia e estudo genético da amostra de tecido, seria possível identificar o padrão de metastização linfática e realizar a linfadenectomia mais apropriada ao caso.

Assim, definiu-se como objetivo principal a análise da variabilidade da expressão genética de MMP's ou de TIMP's em função do número de gânglios invadidos e do padrão de metastização linfática no carcinoma gástrico. Adicionalmente procurou-se estudar de modo exploratório a relação entre a expressão de MMP's ou de TIMP's e outras variáveis como: tipo de amostra da mucosa gástrica testada, variáveis consideradas de mau prognóstico (valor de CEA, valor de CA 19.9, valor de CA 72.4 e valor de PCR) e características clínico-patológicas (profundidade da invasão, existência de embolização venosa/linfática, estágio do tumor).

Na sequência dos objetivos apresentados, é pertinente enunciar as seguintes hipóteses de investigação para este estudo, que se espera infirmar pela rejeição da hipótese nula:

H1: Existe uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão de MMP's ou TIMP's e o número de gânglios invadidos.

H2: Existem diferenças estatisticamente significativas na expressão de MMP's ou TIMP's perante padrões de metastização linfática diferentes.

H3: Existem diferenças estatisticamente significativas na expressão de MMP's ou TIMP's entre amostras de mucosa gástrica tumoral e normal.

H4: Existem diferenças estatisticamente significativas na expressão de MMP's ou TIMP's perante profundidades da invasão diferentes.

H5: Existem diferenças estatisticamente significativas na expressão de MMP's ou TIMP's perante a existência/ausência de embolização venosa.

H6: Existem diferenças estatisticamente significativas na expressão de MMP's ou TIMP's perante estádios do tumor diferentes.

H7: Existe uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão de MMP's ou TIMP's e o valor de CEA.

H8: Existe uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão de MMP's ou TIMP's e o valor de CA 19.9.

H9: Existe uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão de MMP's ou TIMP's e o valor de CA 72.4.

H10: Existe uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão de MMP's ou TIMP's e o valor de PCR.

2. Amostra e procedimentos de recolha de dados

Pacientes e espécimes

Foram estudadas 12 amostras de mucosa, colhidas em 6 pacientes com carcinoma gástrico, submetidos a gastrectomia no Serviço de Cirurgia do Centro Hospitalar Cova da Beira, aos quais foi pedido o consentimento informado para a utilização das amostras para a realização do presente estudo. Os pacientes eram todos do sexo masculino e encontravam-se na faixa etária dos 63-80 anos (idade média: 74,7 anos). Apenas um foi sujeito a quimioterapia neoadjuvante e nenhum foi sujeito a radioterapia neoadjuvante. A gastrectomia total foi realizada em 3 pacientes e a gastrectomia subtotal em 3 pacientes, tendo sido todos submetidos a linfadenectomia tipo D2.

O estadiamento tumoral foi realizado de acordo com a classificação UICC TNM [21], obtendo-se os dados seguintes (Tabela 1).

Tabela 1 - Estadiamento tumoral dos sujeitos do estudo.

Doente	Estadiamento	T	N
1	IIB	T1b	N3a
2	IIIC	T4a	N3a
3	IIIA	T2	N3a
4	IIB	T4a	N0
5	IIB	T3	N1
6	IIB	T2	N2

Os gânglios linfáticos foram ressecados e divididos por estações segundo a proposta da *Japanese Research Society for the study of gastric cancer* [21] e enviados para exame histopatológico.

Foram colhidas duas amostras de mucosa, uma macroscopicamente tumoral e outra macroscopicamente normal (o mais longe possível do tumor), que foram transferidas para um tubo limpo de congelação com RNA-Later, mantidos a 6°C por 24h e posteriormente armazenadas a -80°C para extração de ácido ribonucleico (RNA), correspondente síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA), seguida de *real-time polymerase chain reaction*, para comparar a expressão genética das MMP's e TIMP's de mucosa macroscopicamente tumoral e de mucosa macroscopicamente normal.

Extração de ácido ribonucleico (RNA)

As amostras de mucosa foram homogeneizadas em 500 µL de TRI Reagente® (Sigma-Aldrich) por 100 mg de tecido. A extração de RNA foi feita de acordo com o protocolo recomendado pelo método TRI Reagente® (Anexo 1).

Síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA)

Realizado com o kit da Nzytech de transcriptase reversa M-MuLV, segundo o protocolo recomendado pelo fabricante (Anexo 2).

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Foram utilizados *primers* específicos para MMP1, MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, TIMP3 e TIMP4 e a expressão foi normalizada com o gene *housekeeping* β -actina (Tabela 2).

Para o RT-PCR foi usado o Maxima® SYBR® Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Fermentas). Para avaliar a especificidade dos fragmentos de PCR amplificados, as curvas de fusão foram obtidos por:

1. Desnaturação inicial (95°C) durante 3 minutos;
2. 32 ciclos de:
 - a. 95°C durante 10 segundos;
 - b. 60°C durante 30 segundos;
 - c. 72°C durante 10 segundos;
3. 81 ciclos com início a 55°C e aumento de 0,5°C a cada 10 segundos até atingir 95°C.

As expressões genéticas foram calculadas com base no modelo proposto por Pfaffl usando a fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 2 - *Primers* utilizados no estudo.

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>	<i>Marca</i>
MMP1_FW	5- AAG ATG AAA GGT CCA ACA ATT -3	STAB VIDA
MMP1_RV	5- CCA AGA GAA TGG CCG AGT TC -3	STAB VIDA
MMP2_FW	5- AAC TAC GAT GAC GAC CGC AAG T -3	STAB VIDA
MMP2_RV	5- AGG TGT AAA TGG GTG CCA TCA -3	STAB VIDA
MMP9_FW	5- AGG CGC TCA TGT ACC CTA TGT AC -3	STAB VIDA
MMP9_RV	5- GCC GTG GCT CAG GTT CA -3	STAB VIDA
TIMP1_FW	5- GAC GGC CTT CTG CAA TTC -3	STAB VIDA
TIMP1_RV	5- GTA TAA GGT GGT CTG GTT GAC TTC TG -3	STAB VIDA
TIMP2_FW	5- GAG CCTGAA CCA CAG GTA CCA -3	STAB VIDA
TIMP2_RV	5- AGG AGA TGT AGC ACG GGA TCA -3	STAB VIDA
TIMP3_FW	5- CCA GGA CGC CTT CTG CAA -3	STAB VIDA
TIMP3_RV	5- CCC CTC CTT TAC CAG CTT CTT C -3	STAB VIDA
TIMP4_FW	5- CAC CCT CAG CAG CAC ATC TG -3	STAB VIDA
TIMP4_RV	5- GGC CGG AAC TAC CTT CTC ACT -3	STAB VIDA
β -actina_FW	5- CAT CCT CAC CCT GAA GTA CCC -3	STAB VIDA
β -actina_RV	5- AGC CTG GAT AGC AAC GTA CAT G -3	STAB VIDA

3. Variáveis e tratamento estatístico dos dados

Tal como explicitado nas hipóteses de investigação, as variáveis incluídas na análise dos dados são:

1. Expressão genética de MMP's ou TIMP's (variáveis quantitativas);
2. Número de gânglios invadidos (variável quantitativa);
3. Padrão de metastização linfática (variável qualitativa dicotômica: distante ou local; esta variável foi recodificada a partir de outras duas variáveis, nomeadamente, a localização do tumor e a existência de metastização dos gânglios das diferentes estações);
4. Localização do tumor (variável qualitativa dicotômica: 1/3 superior ou 2/3 inferiores do estômago);
5. Amostras de mucosa gástrica (variável qualitativa dicotômica: tumoral ou normal);
6. Profundidade da invasão (variável qualitativa dicotômica: T1/T2 ou T3/T4);

7. Existência de embolização venosa/linfática (variável qualitativa dicotômica: positiva e negativa);
8. Estádio do tumor (variável qualitativa: II e III);
9. Valor de CEA (variável quantitativa);
10. Valor de CA 19.9 (variável quantitativa);
11. Valor de CA 72.4 (variável quantitativa);
12. Valor de PCR (variável quantitativa).

Para o tratamento estatístico dos dados utilizou-se a versão 21 do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

No âmbito da estatística descritiva, determinaram-se frequências (absolutas e relativas) e medidas de tendência central (médias e medianas), de dispersão (desvios-padrão, máximos e mínimos) e de associação (coeficientes de correlação r de Pearson, depois de garantidos os pressupostos da normalidade e da linearidade da relação entre as variáveis).

No âmbito da estatística inferencial, foram aplicados testes t de Student para amostras independentes (depois de garantido o pressuposto da normalidade da distribuição dos dados) ou o seu equivalente não paramétrico (U de Mann-Whitney).

A opção por alternativas não paramétricas prendeu-se com o incumprimento dos pressupostos para os testes paramétricos e o reduzido tamanho da amostra. Perante o pequeno número de participantes, optou-se por recorrer a um nível de significância maior ($\alpha = 0,10$) no teste de hipóteses.

4. Considerações éticas e legais

Os investigadores envolvidos neste trabalho regeram-se pelas boas práticas éticas e legais. O estudo foi submetido e autorizado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira. Foi dada informação adequada sobre o estudo a todos os indivíduos participantes e obtido o seu consentimento informado por escrito. O anonimato dos dados foi garantido através da utilização de um código numérico, não constando assim dos formulários ou da base de dados informática qualquer elemento identificativo dos doentes. Neste estudo foram respeitadas as recomendações de Helsínquia e Tóquio, da Organização Mundial de Saúde e da Comunidade Europeia.

5. Resultados

Antes de se proceder à verificação das hipóteses, determinaram-se os dados descritivos das variáveis quantitativas e qualitativas em estudo (Tabelas 3 e 4), bem como os dados descritivos da expressão de MMP's ou TIMP's em função das variáveis clínico-patológicas que interessa examinar (Tabela 5).

Tabela 3 - Dados descritivos das variáveis quantitativas em estudo.

	MMP1	MMP2	MMP9	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TIMP4	Gânglios invadidos	CEA	CA 19.9	CA 72.4	PCR
M	75,26	14,93	8,6	5,33	5,58	1,01	5,13	4,33	2,55	16,05	3,2	0,33
Me	45,77	7	3,17	3,22	2,17	0,86	3,52	3	1,81	14,43	2,8	0,24
DP	86,18	21,45	11,77	4,52	8,95	0,98	6,74	3,98	2,13	6,26	2,39	0,22
Min	5,86	1,74	0,74	1,67	0,35	0,06	0,38	0	0,34	7,29	1,3	0,12
Max	224,21	57,68	31,12	12,13	2,87	2,87	18,42	11	5,95	23,74	7,3	0,69
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5

Nota: M = média; Me = mediana; DP = desvio-padrão; Min = Mínimo; Max = Máximo; N = número total de pacientes

Tabela 4 - Dados descritivos das variáveis qualitativas em estudo.

	Mucosa gástrica		Localização do tumor		Profundidade da invasão		Embolização venosa/linfática		Estádio do tumor		Metastização linfática	
	Tumoral	Normal	1/3 sup	2/3 inf	T1/T2	T3/T4	Sim	Não	II	III	Distante	Local
fa	6	6	3	3	3	3	3	3	4	2	3	2
fr	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	66,67%	33,33%	60%	40%
N	(2x)6		6		6		6		6		5	

Nota: fa = frequência absoluta; fr = frequência relativa; N = número total de pacientes

Da análise dos dados apresentados nas duas tabelas anteriores sobressaem os seguintes factos: a expressão média das MMP's é superior à dos seus inibidores e a expressão de MMP1 é consideravelmente superior à expressão das restantes MMP's (Tabela 3); com a exceção do estágio do tumor e da metastização linfática, as restantes variáveis têm subgrupos com efetivos equilibrados (Tabela 4).

Relativamente aos dados da expressão das MMP's, apresentados na tabela seguinte (Tabela 5), é possível observar que, aparentemente:

- O valor médio da expressão de MMP1 na mucosa com tumor é consideravelmente superior ao da mucosa normal, a expressão média de MMP9 na mucosa com tumor é apenas ligeiramente superior à da mucosa normal e não existem grandes diferenças entre os subgrupos quanto à expressão média de MMP2;
- A expressão aumentada de MMP1, MMP2 e MMP9 ocorre nos tumores com menor invasão transmural (as duas medidas de tendência central do subgrupo T1/T2 são superiores às medidas do outro subgrupo);

- O valor médio das expressões de MMP1 e MMP2 nos tumores sem embolização venosa/linfática é superior ao dos tumores com embolização venosa/linfática, assim como o valor mediano da expressão de MMP9 (ainda que esta tendência não se verifique para o seu valor médio);
- O valor médio das expressões de MMP1 e MMP2 nos tumores de estágio avançado (III) é superior ao dos tumores de estágio inicial (II), verificando-se a tendência inversa na expressão média de MMP9;
- A expressão aumentada de MMP1, MMP2 e MMP9 ocorre nos tumores com metastização à distância (ambas as medidas de tendência central do subgrupo distante são consideravelmente superiores às medidas do subgrupo local).

Atendendo aos dados da expressão dos TIMP's, apresentados na mesma tabela (Tabela 5), é possível observar que, aparentemente:

- Não existem grandes diferenças entre os valores de tendência central da expressão de TIMP's na mucosa com tumor e os valores da mucosa normal, sobressaindo apenas a expressão ligeiramente aumentada de TIMP4 na mucosa normal;
- À semelhança do que acontece na expressão de MMP's, a expressão aumentada de TIMP1, TIMP2, TIMP3 e TIMP4 ocorre nos tumores com menor invasão transmural (as duas medidas de tendência central do subgrupo T1/T2 são superiores às medidas do subgrupo T3/T4, ainda que a diferença entre os dois grupos relativamente aos valores médios de TIMP3 seja praticamente negligenciável);
- Os valores de tendência central da expressão de TIMP1 e TIMP3 estão muito próximos nos dois subgrupos da variável embolização venosa/linfática, destacando-se apenas a expressão aumentada de TIMP2 nos tumores sem embolização venosa/linfática e a expressão aumentada de TIMP4 nos tumores com embolização venosa/linfática;
- Mais uma vez, os valores de tendência central da expressão de TIMP1 e TIMP3 estão muito próximos nos dois subgrupos da variável estágio do tumor, destacando-se apenas a expressão aumentada de TIMP2 nos tumores de estágio avançado (III) e a expressão aumentada de TIMP4 nos tumores de estágio inicial (II);

Tabela 5 - Dados descritivos da expressão de MMP's e TIMP's em função do tipo de amostra de mucosa e de variáveis clínico-patológicas.

		Mucosa gástrica		Profundidade da invasão		Embolização venosa/linfática		Estádio do tumor		Metastização linfática	
		Tumoral	Normal	T1/T2	T3/T4	Positiva	Negativa	II	III	Local	Distante
Pacientes (n)		6	6	3	3	3	3	4	2	2	3
Expressão MMP1	M	75,26	16,76	105,31	45,19	32,47	118,04	32,47	116,10	12,65	101,43
	Me	45,77	34,25	74,03	7,78	17,51	121,94	17,51	116,10	12,65	74,03
	DP	86,18	9,24	106,94	66,47	92,89	108,37	36,46	153,18	6,88	111,82
	Min	5,86	5,86	17,51	5,86	5,86	7,78	5,86	7,78	7,78	5,86
	Max	224,41	30,27	224,41	121,94	74,03	224,41	74,03	224,41	17,51	224,41
Expressão MMP2	M	14,93	16,74	24,61	5,24	7,11	25,66	7,11	29,71	1,89	25,66
	Me	13,99	10,41	14,12	5,17	5,17	8,82	5,17	29,71	1,89	14,12
	DP	21,45	12	29,27	3,54	6,27	30,46	6,27	39,56	0,21	28,09
	Min	1,74	8,17	2,03	1,74	2,03	1,74	2,03	1,74	1,74	5,17
	Max	57,68	37,01	57,68	8,82	14,12	57,68	14,12	57,68	2,03	57,68
Expressão MMP9	M	8,6	3,14	14,84	2,36	11,68	5,51	11,68	6,39	1,05	15,24
	Me	3,17	1,63	12,04	2,57	2,57	3,76	2,57	6,39	1,05	12,04
	DP	11,77	3,95	15,08	1,52	16,84	5,85	16,84	7,99	0,44	14,54
	Min	0,74	0,91	1,36	0,74	1,36	0,74	1,36	0,74	0,74	2,57
	Max	31,12	11,16	31,12	3,76	31,12	12,04	31,12	12,04	1,36	31,12
Expressão TIMP1	M	5,33	2,77	7,9	2,76	5,03	5,63	5,03	6,99	1,76	8,52
	Me	3,22	1,93	9,92	2,93	3,51	2,93	3,51	6,99	1,76	9,92
	DP	4,52	2,19	5,51	0,85	4,33	5,65	4,33	7,28	0,12	4,48
	Min	1,67	1,03	1,67	1,84	1,67	1,84	1,67	1,84	1,67	3,51
	Max	12,13	7,06	12,13	3,51	9,92	12,13	9,92	12,13	1,84	12,13
Expressão TIMP2	M	5,58	4,8	9,48	1,68	2,14	9,03	2,14	12,16	0,54	9,88
	Me	2,17	4,13	4,5	1,56	1,56	2,77	1,56	12,16	0,54	4,5
	DP	8,95	2	12,39	1,03	2,13	12,65	2,13	16,17	0,26	11,96
	Min	0,35	2,5	0,35	0,72	0,35	0,72	0,35	0,72	0,35	1,56
	Max	23,59	8,06	23,59	2,77	4,5	23,59	4,5	23,59	0,72	23,59
Expressão TIMP3	M	1,01	1,41	1,42	0,59	1,36	0,65	1,36	0,54	0,22	1,57
	Me	0,86	1,1	1,02	0,83	0,83	0,88	0,83	0,54	0,22	1,02
	DP	0,98	1,12	1,29	0,46	1,33	0,52	1,33	0,68	0,23	1,13
	Min	0,06	0,49	0,38	0,06	0,38	0,06	0,38	0,06	0,06	0,83
	Max	2,87	3,51	2,87	0,88	2,87	1,02	2,87	1,02	0,3	2,87
Expressão TIMP4	M	5,13	9,91	8,9	1,37	7,51	2,75	7,51	2,48	2,08	7,78
	Me	3,52	6,17	4,54	0,42	3,73	3,3	3,73	2,48	2,08	4,54
	DP	6,74	10,86	8,26	1,67	9,6	2,11	9,6	2,91	2,34	9,54
	Min	0,38	2,56	3,73	0,38	0,38	0,42	0,38	0,42	0,42	0,38
	Max	18,42	31,54	18,42	3,3	18,42	4,54	18,42	4,54	3,73	18,42

Nota: M = média; Me = mediana; DP = desvio-padrão; Min = Mínimo; Max = Máximo; n = número de pacientes em cada subgrupo

- Novamente, à semelhança do que acontece na expressão de MMP's, a expressão aumentada de TIMP1, TIMP2, TIMP3 e TIMP4 ocorre nos tumores com metastização à distância (ambas as medidas de tendência central do subgrupo metastização distante são superiores às medidas do subgrupo metastização local, apesar das diferenças entre os dois subgrupos relativamente aos valores médios de TIMP3 ser praticamente negligenciável).

Na verificação das hipóteses H2-H5, com recurso a testes *t* de Student ou ao seu equivalente não paramétrico, constatou-se porém que nenhuma das diferenças na expressão de MMP's ou de TIMP's anteriormente mencionadas era estatisticamente significativa (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados da aplicação dos testes *t* de Student ou dos testes *U* de Mann-Whitney.

		Mucosa gástrica		Profundidade da invasão		Embolização venosa/linfática		Estádio do tumor		Metastização linfática	
		<i>t</i> (df) <i>U</i>	<i>sig</i>	<i>t</i> (df) <i>U</i>	<i>sig</i>	<i>t</i> (df) <i>U</i>	<i>sig</i>	<i>t</i> (df) <i>U</i>	<i>sig</i>	<i>t</i> (df) <i>U</i>	<i>sig</i>
Expressão de MMP's	MMP1	-1,65 (5,12)	0,16	2	0,4	1,3 (4)	0,27	-0,55 (1,13)	0,67	-1,06 (3)	0,37
	MMP2	12	0,39	1,14 (2,06)	0,37	0,87 (2,17)	0,47	-0,79 (1,02)	0,57	-1,14 (3)	0,34
	MMP9	12	0,39	1,427 (4)	0,227	-0,6 (4)	0,58	0,29 (4)	0,78	-1,31 (3)	0,28
Expressão de TIMP's	TIMP1	10	0,24	1,6 (2,1)	0,25	0,15 (4)	0,89	-0,59 (4)	0,59	-2,03 (3)	0,14
	TIMP2	11	0,31	1,09 (2,03)	0,39	0,93 (2,11)	0,45	-0,86 (1,01)	0,55	-1,05 (3)	0,37
	TIMP3	0,66 (10)	0,53	1,05 (4)	0,35	-0,86 (4)	0,44	0,79 (4)	0,47	-1,6 (3)	0,21
	TIMP4	10	0,24	0	0,1	-0,84 (4)	0,45	0,64 (4)	0,56	-0,8 (3)	0,48

Nota: *t* = valor do teste *t*; *df* = graus liberdade; *U* = valor do teste *U*; *sig* = nível de significância estatística do teste

Quanto à verificação das restantes hipóteses, através da determinação do coeficiente *r* de Pearson, percebeu-se que a maioria das correlações não se revelou estatisticamente significativa ($p < 0,10$). Uma análise mais atenta da Tabela 7 (e o recurso à classificação de Marôco para a intensidade das correlações [22]) permite verificar o seguinte:

- A intensidade das correlações entre o número de gânglios invadidos e a expressão de MMP's ou de TIMP's é invariavelmente fraca (i.e. abaixo de 0,25), destacando-se apenas a intensidade moderada (i.e. $0,25 \leq r < 0,50$) da correlação negativa (i.e. as variáveis variam em sentido oposto) entre a expressão de MMP1 e o número de gânglios invadidos;
- A intensidade das correlações (negativas; exceção para TIMP4) entre o valor de CEA e a expressão MMP's ou de TIMP's é, na sua maioria, fraca (i.e. abaixo de 0,25),

havendo algumas correlações moderadas (i.e. $0,25 \leq r < 0,50$), nomeadamente entre a expressão de MMP2 ou de TIMP1 e o valor de CEA;

- As correlações (negativas, na sua totalidade) entre o valor de CA 19.9 e a expressão de MMP's e TIMP's são quase todas moderadas (i.e. $0,25 \leq r < 0,50$) ou fortes (i.e. $0,50 \leq r < 0,75$), havendo ainda uma muito forte (i.e. acima de 0,75). No entanto, apenas as relações entre CA 19.9 e a expressão de MMP1 ou de MMP2 se revelaram estatisticamente significativas;
- A intensidade das correlações (negativas, na sua totalidade) entre o valor de CA 72.4 e a expressão de MMP's e TIMP's são, na sua maioria (exceção para MMP1, que estabeleceu uma correlação muito fraca), moderadas (i.e. $0,25 \leq r < 0,50$) e até fortes (i.e. $0,50 \leq r < 0,75$), ainda que nenhuma seja estatisticamente significativa;
- As correlações entre o valor de PCR e a expressão de MMP's e TIMP's são quase todas (exceção para MMP9 e TIMP4) positivas (i.e. as variáveis variam no mesmo sentido) e de intensidade fraca (i.e. abaixo de 0,25), destacando-se apenas a intensidade liminarmente forte (i.e. $0,50 \leq r < 0,75$), ainda que não estatisticamente significativa, da relação entre a expressão de MMP1 e o valor de PCR.

Tabela 7 - Resultados da determinação do coeficiente de correlação.

		Gânglios invadidos		CEA		CA 19.9		CA 72.4		PCR	
		<i>r</i>	<i>sig</i>	<i>r</i>	<i>Sig</i>	<i>r</i>	<i>sig</i>	<i>R</i>	<i>sig</i>	<i>r</i>	<i>sig</i>
Expressão de MMP's	MMP1	-0,36	0,49	-0,03	0,96	-0,85	0,03	-0,05	0,93	0,51	0,38
	MMP2	-0,19	0,72	-0,26	0,63	-0,74	0,09	-0,44	0,45	0,15	0,81
	MMP9	0,20	0,70	-0,17	0,74	-0,34	0,52	-0,47	0,43	-0,13	0,84
Expressão de TIMP's	TIMP1	-0,06	0,99	-0,35	0,50	-0,63	0,18	-0,62	0,26	0,00	1
	TIMP2	-0,17	0,74	-0,26	0,61	-0,72	0,11	-0,44	0,46	0,14	0,83
	TIMP3	0,02	0,97	-0,14	0,80	-0,28	0,59	-0,33	0,58	0,00	1
	TIMP4	0,19	0,72	0,06	0,91	-0,32	0,53	-0,35	0,56	-0,19	0,76

Nota: *r* = valor do coeficiente *r* de Pearson; *sig* = nível de significância estatística

6. Discussão e Conclusão

Procurou-se com o presente trabalho empírico explorar a variabilidade da expressão de MMP's ou dos seus inibidores em função do número de gânglios invadidos e o padrão de metastização linfática no carcinoma gástrico. Adicionalmente, estudou-se a relação entre a expressão de MMP's ou de TIMP's e outras variáveis como: tipo de amostra da mucosa gástrica testada, variáveis consideradas de mau prognóstico e características clínico-patológicas.

Atendendo aos resultados dos testes de hipóteses, foi possível verificar que quase nenhuma das hipóteses inicialmente levantadas foi confirmada. A exceção recaiu sobre a hipótese H8, que foi parcialmente confirmada, uma vez que as correlações (negativas) entre o valor de CA 19.9 e a expressão genética de MMP1 e de MMP2 se mostraram elevadas e estatisticamente significativas. Tais dados podem indicar que a expressão aumentada (ou diminuída) destas MMP's é acompanhada de valores baixos (ou elevados) de CA 19.9 e vice-versa. Vários estudos [10, 23] têm demonstrado que os níveis de MMP's (nomeadamente a MMP2 e MMP9) e de TIMP's (nomeadamente o TIMP1 e o TIMP2) se encontram diminuídos nos doentes com tumores gástricos, em comparação com as pessoas saudáveis, mas que os marcadores de mau prognóstico (CEA e CA 19.9) se encontram aumentados. Os mesmos estudos demonstraram que a sensibilidade diagnóstica da MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 é maior que as CEA e CA 19.9 [10, 23].

Não obstante aos dados anteriores, e sobretudo porque a validade dos resultados dos testes de hipóteses está diminuída pelo reduzido tamanho da amostra (i.e., não é possível garantir que os resultados obtidos estejam de acordo com a realidade), procurou-se responder às hipóteses de investigação com base nos dados descritivos. Assim, os dados parecem sugerir que:

- Se alguma associação existir entre o número de gânglios invadidos e a expressão de MMP's (ou dos seus inibidores), como sugerido na hipótese H1, ela será mais forte (e negativa) para a expressão de MMP1. Uma expressão aumentada (ou diminuída) de MMP1 parece estar associada a um número reduzido (ou elevado) de gânglios invadidos. Ainda que não seja possível comparar estes resultados com outros equivalentes (até à data, inexistentes na literatura empírica), denota-se alguma incoerência entre estes resultados e os que seguidamente se discutirão;
- Existem diferenças na expressão de MMP's e de TIMP's perante padrões de metastização linfática diferentes (hipótese H2), uma vez que a expressão aumentada de MMP's (e da maioria dos seus inibidores) ocorreu nos tumores com metastização linfática mais distante. Quando confrontado com a literatura existente [10, 24], este achado pode fazer sentido uma vez que a expressão da MMP-2 parece estar correlacionada positivamente com a metastização (linfática e à distância);

- Se alguma diferença existir na expressão de MMP's ou de TIMP's entre amostras de mucosa gástrica tumoral e normal, como insinuado na hipótese H3, há maior probabilidade desta diferença se refletir na expressão de MMP1, dado que a expressão desta MMP se mostrou consideravelmente aumentada na mucosa com tumor. Em menor grau, também as expressões de MMP9 e de TIMP4 se revelaram ligeiramente aumentada e diminuída, respetivamente, na mucosa tumoral. Estes achados vão ao encontro da bibliografia [6-17] que refere haver uma sobre-expressão adicional de MMP's, causando um desequilíbrio na dualidade MMP/TIMP, que se considera ser um dos fatores facilitadores da expansão e disseminação tumoral;
- Existem diferenças na expressão de MMP's e de TIMP's entre profundidades da invasão distintas, como sugerido na hipótese H4, tendo em consideração que a expressão aumentada de todas as MMP's (e da maioria dos seus inibidores) se verificou nos tumores com menor invasão transmural. Se, por um lado, este achado contraria os resultados de outros estudos científicos, que identificaram um aumento das MMP2 e MMP9 nos tumores com maior invasão transmural [7, 18, 20], por outro, vai ao encontro de outros estudos, que identificaram a expressão aumentada de TIMP1 e TIMP2 nos tumores com menor invasão tumoral [10, 23]. No entanto, a literatura [6-17] refere que é necessária a degradação/produção de ECM para a invasão tumoral nos tecidos. Sendo estas as consequências da atividade das MMP's/TIMP's, fará mais sentido que a expressão de MMP's/TIMP's esteja aumentada nos tumores que apresentem maior invasão transmural, contrariamente ao que os resultados obtidos indicam;
- Não existem diferenças na expressão da generalidade de MMP's e de TIMP's face à existência/ausência de embolização venosa ou linfática (contrariamente ao insinuado na hipótese H5); caso existam, estas diferenças serão mais evidentes na expressão de MMP1 e de MMP2, que se apresentaram aumentadas nos tumores sem embolização venosa ou linfática. Não sendo possível comparar estes resultados com outros equivalentes (até à data, inexistentes na literatura empírica), no entanto, se a embolização venosa ou linfática é considerada um precedente da metastização, estes resultados parecem contrariar os dados dos estudos referidos anteriormente [10, 24], que sugerem que a expressão da MMP-2 está correlacionada positivamente com a metastização (linfática e à distância);
- Se alguma diferença existir na expressão de MMP's ou de TIMP's entre estádios diferentes do tumor (hipótese H6), esta tenderá a refletir-se apenas na expressão de MMP1 e MMP2, tendo em consideração que as suas expressões se mostraram aumentadas nos tumores de estádios avançados (III). Este aumento de MMP's já foi identificado noutros estudos, citados por Mrena et al. [7]. Como foi salientado previamente, isto poderá ocorrer devido à degradação da ECM pelas MMP's, facilitando a invasão tumoral e a promoção da metastização. Quanto às TIMP's, verifica-se um aumento da TIMP4 nos tumores de estágio inicial (II) e de TIMP2 nos

tumores de estádio avançado (III). O aumento da TIMP4 vai ao encontro do pressuposto de que se houver uma sobre-expressão de TIMP's em relaao às MMP's, o tumor terá menor propensão para a invasão; o aumento verificado na TIMP2 está de acordo com um estudo [10] que demonstrou a expressão aumentada de TIMP2 nos tumores com menor invasão tumoral;

- Se alguma associaao existir entre a expressão de MMP's ou de TIMP's e o valor de CEA, como sugerido na hipótese H7, ela será mais intensa (e negativa) para a expressão de TIMP1. Uma expressão aumentada (ou diminuída) de TIMP1 parece estar associada a um valor baixo (ou elevado) de CEA. Estes resultados vão ao encontro dos dados de outros estudos [10, 23] que, como já foi referido anteriormente, demonstraram que os níveis de MMP's (nomeadamente a MMP2 e MMP9) e de TIMP's (nomeadamente o TIMP1 e TIMP2) se encontram diminuídos nos doentes com tumores gástricos, em comparaao com as pessoas saudáveis, mas que os marcadores de mau prognóstico (CEA e CA 19.9) se encontram aumentados;
- Existem correlaoes negativas e de intensidade considerável entre o valor de CA 19.9 e a expressão da maioria das MMP's e dos TIMP's (hipótese H8). Para além das correlaoes estatisticamente significativas mencionadas logo no início desta secao, há uma grande probabilidade de se encontrarem correlaoes negativas e de intensidade moderada a elevada entre aquela variável e a expressão de MMP9, TIMP1 e TIMP2. Uma expressão aumentada (ou diminuída) de MMP's e de TIMP's parece estar associada a um valor diminuído (ou elevado) de CA 19.9. Neste caso, os resultados estão parcialmente suportados pela literatura empírica [10, 23], na medida em que se verificaram correlaoes negativas ainda que de uma intensidade moderada a elevada;
- Existem correlaoes negativas e de intensidade considerável entre a expressão da maioria de MMP's e de TIMP's e o valor de CA 72.4, como insinuado na hipótese H9. Uma expressão aumentada (ou diminuída) de MMP's e de TIMP's parece estar associada a um valor diminuído (ou elevado) de CA 72.4. Contudo não é possível comparar estes resultados com outros equivalentes (até a data, inexistentes na literatura empírica);
- Se alguma associaao existir entre o valor de PCR e a expressão de MMP's ou TIMP's, como sugerido na hipótese H10, é mais provável que ocorra com a expressão de MMP1, para a qual se verificou uma correlaao positiva e forte. No entanto não é possível comparar estes resultados com outros equivalentes (até a data, inexistentes na literatura empírica).

É ainda pertinente discutir os seguintes factos: apesar da expressão de MMP's e TIMP's estar aparentemente aumentada nos doentes com menor invasão transmural (T1/T2), se considerarmos o estádio do tumor (no qual é tomada em linha de conta a invasão transmural e os gânglios linfáticos invadidos), constata-se que quer as MMP's quer os TIMP's estudados

apresentam maior expressão nos doentes em estágio avançado (III) e, inclusivamente, maior expressão nos doentes com invasão linfática à distância. Isto poderá ser explicado pelo facto de existir maior *turnover* celular nos doentes com tumores mais agressivos (estádio mais avançado e/ou com metastização linfática mais distante), apresentando MMP's que degradam a matriz extracelular e consequentemente TIMP's que inibem as MMP's (por feedback), permitindo a produção de nova ECM e possibilitando dessa forma o crescimento do tumor. Nesse sentido seria então possível avançar com a conclusão preliminar de que os doentes que apresentam maior expressão de MMP's e TIMP's serão os doentes com tumores mais agressivos e que mereceriam um tratamento com linfadenectomia mais alargada. O facto da expressão de MMP's e TIMP's estar aumentada nos doentes com menor invasão transmural, poderá ser explicado pela fase inicial e mais rápida de crescimento tumoral (com necessidade de maior *turnover* celular) comparativamente à fase mais avançada com maior invasão transmural (na qual o tumor pode diminuir a velocidade de crescimento e por isso com menor *turnover* celular).

Este estudo não é isento de limitações. Para além de não haver representantes do género feminino entre os participantes da amostra (para o qual não se pode generalizar as conclusões), a dimensão reduzida da amostra condicionou o tratamento estatístico dos dados e consequentemente a validade das conclusões.

Esta dimensão reduzida prendeu-se com o facto das amostras de mucosa e de tecido linfático terem sido recolhidas em doentes operados por um só cirurgião, num curto período de tempo. Também o procedimento cirúrgico de recolha dos espécimes se revelou demorado e laborioso, visto que foi necessário diferenciar as estações ganglionares, para as submeter separadamente a estudo histopatológico. Da mesma forma, a colheita de dados clínico-patológicos foi realizada pelo já mencionado cirurgião, agravando a morosidade de todo o procedimento de recolha de dados.

Em futuras investigações sobre o mesmo tema, seria pertinente (1) conseguir envolver uma equipa de cirurgiões na recolha de espécimes, (2) obter uma amostra de dimensão razoável e que integrasse participantes de ambos os sexos em diferentes estádios UICC TNM e (3) repetir as análises estatísticas para ser possível testar as hipóteses levantadas.

Apesar das limitações deste estudo, é importante salientar o seu valor enquanto pioneiro na procura de evidências que comprovem a variabilidade da expressão de MMP's ou de TIMP's em função do número de gânglios invadidos e do padrão de metastização linfática no carcinoma gástrico. Mais uma vez se reafirma a convicção de que a identificação de um padrão de metastização linfática auxiliaria na tomada de decisão cirúrgica quanto à linfadenectomia mais apropriada a cada doente.

Bibliografia

1. Lawson JD, Sicklick JK, Fanta PT: Gastric cancer. *Curr Probl Cancer*, 35(3):97-127.
2. Roukos, D.H. and A.M. Kappas, Perspectives in the treatment of gastric cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2005. 2(2): p. 98-107.
3. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2010 (ver.3). *Gastric Cancer* 2001. doi:10.1007/s/10120-011-0042-4
4. Schmidt B, Yoon SS: D1 versus D2 lymphadenectomy for gastric cancer. *J Surg Oncol* 2012, 107(3):259-264.
5. Yoon SS, Yang HK: Lymphadenectomy for gastric adenocarcinoma: should west meet east? *Oncologist* 2009, 14(9):871-882.
6. Sounni NE, Janssen M, Foidart JM, Noel A: Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol* 2003, 22(1):55-61.
7. Mrena J, Wiksten JP, Nordling S, Kokkola A, Ristimaki A, Haglund C: MMP-2 but not MMP-9 associated with COX-2 and survival in gastric cancer. *J Clin Pathol* 2006, 59(6):618-623.
8. Koskensalo S, Mrena J, Wiksten JP, Nordling S, Kokkola A, Hagstrom J, Haglund C: MMP-7 overexpression is an independent prognostic marker in gastric cancer. *Tumour Biol*, 31(3):149-155.
9. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG: Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol*, 20(3):161-168.
10. Mroczko, B., et al., Clinical significance of serum levels of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) in gastric cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. 49(1): p. 125-31.
11. Matsumura S, Oue N, Kitadai Y, Chayama K, Yoshida K, Yamaguchi Y, Toge T, Imai K, Nakachi K, Yasui W: A single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter is correlated with histological differentiation of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004, 130(5):259-265.

12. Alakus H, Afriani N, Warnecke-Eberz U, Bollschweiler E, Fetzner U, Drebber U, Metzger R, Holscher AH, Monig SP: Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *World J Surg*, 34(12):2853-2859.
13. Wu CY, Wu MS, Chen YJ, Chen CJ, Chen HP, Shun CT, Chen GH, Huang SP, Lin JT: Clinicopathological significance of MMP-2 and TIMP-2 genotypes in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2007, 43(4):799-808.
14. Hornebeck W, Lambert E, Petitfrere E, Bernard P: Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression. *Biochimie* 2005, 87(3-4):377-383.
15. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z: Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1):52-67.
16. Kubben FJ, Sier CF, Meijer MJ, van den Berg M, van der Reijden JJ, Griffioen G, van de Velde CJ, Lamers CB, Verspaget HW: Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *Br J Cancer* 2006, 95(6):744-751.
17. Mizutani K, Kofuji K, Shirouzu K: The significance of MMP-1 and MMP-2 in peritoneal disseminated metastasis of gastric cancer. *Surg Today* 2000, 30(7):614-621.
18. Wu ZY, Li JH, Zhan WH, He YL: Lymph node micrometastasis and its correlation with MMP-2 expression in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006, 12(18):2941-2944.
19. Yonemura Y, Endou Y, Fujita H, Fushida S, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Sugiyama K, Sasaki T: Role of MMP-7 in the formation of peritoneal dissemination in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2000, 3(2):63-70.
20. Chen, S.Z., et al., Expression levels of matrix metalloproteinase-9 in human gastric carcinoma. *Oncol Lett*. 9(2): p. 915-919.
21. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer* 2001. doi:10.1007/s/10120-011-0041-5
22. Marôco, J., *Análise Estatística com o SPSS Statistics: 6ª edição*. R. Number. 2014, Pêro Pinheiro: p. 14
23. Mroczo B, Groblewska M, Łukaszewicz-Zajac M, Bandurski R, Kedra B, Szmitkowski M. Pre-treatment serum and plasma levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and

tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 (TIMP-1) in gastric cancer patients. Clin Chem Lab Med. 2009;47:1133-1139

24. Zheng H, Takahashi H, Murai Y et al. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. Anticancer Res. 2006;26:3579-3583

Anexos

Anexo 1: Extração de RNA total pelo método TRI Reagente®

1. Homogeneizar o tecido com TRI reagente 500µL.
2. Deixar 5 minutos à temperatura ambiente.
3. Adicionar clorofórmio (100µL), vortex.
4. Deixar 10 minutos à temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 12000g a 4°C durante 15 minutos.
6. Remover a fase aquosa (contém RNA) para um novo tubo de 1.5 mL.
7. Adicionar isopropanol (250µL).
8. Homogeneizar a solução por inversão e deixar 10 minutos à temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 12000g a 4°C durante 10 minutos.
10. Deitar fora o sobrenadante.
11. Lavar o *pellet* com 1mL de etanol 75%, vortex.
12. Centrifugar a 7500g a 4°C durante 5 minutos.
13. Deitar fora o etanol.
14. Repetir os passos 11, 12 e 13.
15. Fazer um *quick spin* e remover com uma micropipeta o excesso de etanol.
16. Ressuspender o *pellet* em 20µL de H₂O tratada com DEPC.
17. Colocar a 65°C durante 5 minutos (Opcional).
18. Congelar a -80°C.

Anexo 2: Síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) com transcriptase reversa M-MuLV

1. Adicionar num microtubo os seguintes reagentes:
 - a. 2,5µL de Random primer (50ng/µL)
 - b. 50ng de RNA total
 - c. 1 µL de dNTPs mix (10mM)
 - d. H₂O estéril até perfazer 35µL
2. Aquecer 65°C durante 5 minutos e colocar de seguida em gelo.
3. Adicionar:
 - a. 2µL de Buffer 10x
 - b. 1µL de M-MuLV
4. Misturar os reagentes e incubar a 25°C durante 10 minutos.
5. Incubar a 37°C durante 60 minutos.
6. Inativar a reação a 70-75°C durante 15 minutos.