

Levindo Alves de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE
SINALIZAÇÃO WNT CANÔNICA E NÃO CANÔNICA NO
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2017

Levindo Alves de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE
SINALIZAÇÃO WNT CANÔNICA E NÃO CANÔNICA NO
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Jaques Waisberg

Coorientadora: Prof. Dra. Celina Tizuko
Fujiyama Oshima

SÃO PAULO

2017

Oliveira, Levindo Alves de

Avaliação da imunoexpressão de proteínas da Via de Sinalização Wnt Canônica e não Canônica no Adenocarcinoma Gástrico. / Levindo Alves de Oliveira. -- São Paulo, 2017.

xv, 124f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciência Cirúrgica Interdisciplinar.

Titulo em inglês: Avaliation of proteins imunoexpression of the canonical and non-canonical WNT signaling pathway in gastric cancer.

1.Neoplasias gástricas; 2. Carcinoma; 3.Vias de sinalização; 4. Proteínas Wnt; 5.Imuno-histoquímica; 6.Transdução de sinal.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA CIRÚRGICA
INTERDISCIPLINAR

Chefe do Departamento

Prof. Dr. José Luiz Martins

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Gaspar de Jesus Lopes Filho

Levindo Alves de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE
SINALIZAÇÃO WNT CANÔNICA E NÃO CANÔNICA NO
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

PRESIDENTE DA BANCA

BANCA EXAMINADORA

DEDICATÓRIA

À Deus

À minha esposa Adelma, mulher maravilhosa e companheira. Sempre ao meu lado nos momentos difíceis, com dedicação e compreensão. Não poupou esforços para que eu realizasse essa tese. Amiga e fiel escudeira, tem sido compreensiva nos momentos da minha ausência. Te amo muito.

Aos meus filhos (Beatriz, Juliana e Rafael) que me foram roubados por muitas horas pela dedicação a esse trabalho. Espero que um dia possam compreender a importância do mesmo.

À minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*), por todo o incentivo de sempre, desde o período escolar até hoje. Obrigado por me guiarem no caminho do bem e por todo carinho que me dedicaram ao longo da vida.

Ao meu irmão Marcos que não poupa esforços para me auxiliar nos meus momentos difíceis.

Aos doentes.

A todos que entenderam minha ausência nos momentos de dedicação a esse trabalho.

Tenham coragem. Não tenham medo de sonhar coisas grandes!

(Papa Francisco I)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pela oportunidade para realização do Curso de Doutorado.

À Universidade Federal de Roraima – UFRR, onde atuo como docente. Procuro representar de forma honrosa o nome dessa instituição a que tenho orgulho de pertencer.

Aos colegas e profissionais do Instituto Médico Legal de Boa Vista, Roraima, de onde me encontro afastado para me dedicar à realização dessa tese. Peço desculpas pela minha ausência e agradeço a oportunidade para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Gaspar de Jesus Lopes Filho, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência Cirúrgica Interdisciplinar, pelo apoio para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jaques Waisberg, orientador, amigo e dedicado que, sempre com muita competência e humildade, ajudou-me na realização desse trabalho até a sua conclusão. Não poupou esforços para a realização do mesmo. Agradeço, enormemente, com gratidão e respeito.

À Prof^a. Dr^a. Celina T. F. Oshima, incansável orientadora, dedicada e comprometida. Contribuiu enormemente para realização deste trabalho. Sem a contribuição da mesma, essa tese não teria sido realizada.

Aos colegas de trabalho do Hospital Geral de Roraima que sempre incentivaram e colaboraram para a realização dessa tese.

Aos alunos do curso de graduação em medicina da UFRR – Universidade Federal de Roraima, pela colaboração na confecção desse trabalho.

Ao técnico Marcelo de Souza Silva, pela realização das reações imuno-histoquímicas das proteínas estudadas.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, Cláudia Joanele e Mônica Noleto, pelo apoio e paciência durante essa jornada.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação, que sempre colaboraram nos momentos de alegrias e tristezas. Em especial, ao Dr. Rodrigo Rego Lins, com quem trabalhei junto no desenvolvimento desse estudo.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	xiii
Resumo	xv
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Câncer gástrico.....	01
1.2 A Via de sinalização Wnt.....	02
1.3 Proteínas da via de sinalização Wnt.....	06
1.4 A Via Wnt e a carcinogênese gástrica.....	09
2 OBJETIVOS.....	13
3 MÉTODO.....	14
3.1 Desenho da pesquisa.....	14
3.2 Variáveis do estudo.....	14
3.3 Casuística e adequação do projeto.....	14
3.4 Critérios de inclusão e exclusão.....	15
3.5 Construção do <i>Tissue Microarray</i> (TMA).....	15
3.6 Imuno-histoquímica.....	16
3.7 Interpretação dos resultados das reações.....	17
3.8 Coleta de dados.....	17
3.9 Análise estatística.....	18
4 RESULTADOS.....	19
4.1 Características epidemiológicas dos doentes e macroscópicas do tumor	19
4.2 Características microscópicas do tumor.....	19
4.3 Interpretação do grau de expressão das proteínas	22
4.3.1 Wnt-5a.....	23
4.3.2 FDZ5 (<i>Frizzled-5</i>).....	28
4.3.3 GSK3B (<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>)	31
4.3.4 Axina.....	35
4.3.5 CK1(<i>Casein Kinase 1</i>)	39
4.3.6 Ubiquitina.....	42
4.3.7 Ciclina D1.....	47
4.3.8 myc (<i>c-myc- proto-oncogene</i>)	50
5 DISCUSSÃO.....	55
5.1 Análise da amostra.....	55
5.2 Importância da via Wnt.....	56
5.3 Expressão das proteínas.....	57
5.3.1 Wnt-5a.....	57
5.3.2 FDZ5.....	59
5.3.3 GSK3B.....	60

5.3.4 Axina.....	60
5.3.5 CK1.....	61
5.3.6 Ubiquitina.....	62
5.3.7 Ciclina D1.....	63
5.3.8 myc.....	63
5.4 Considerações finais.....	64
6 CONCLUSÕES.....	67
7 REFERÊNCIAS.....	68
8. ANEXOS.....	81
Abstract	
Bibliografia Consultada	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da via canônica de sinalização Wnt na presença e ausência do sinal Frizzled.	06
Figura 2	Esquema dos principais mecanismos que desregulam a via Wnt.	10
Figura 3	Esquema representativo dos mecanismos adicionais em que a via Wnt/betacatenina pode ser modulada no câncer.	11
Figura 4	Tipos de tumores gástricos de acordo com a classificação de Lauren.	21
Figura 5	Tipos de tumores gástricos de acordo com a classificação TNM.	21
Figura 6	Fotomicrografia. Reação imuno-histoquímica da proteína Wnt-5a em tecido de adenocarcinoma gástrico. (A) 100x; (B) 400x.	23
Figura 7	Fotomicrografia. Reação imuno-histoquímica da proteína FZD5 em tecido de adenocarcinoma gástrico. (A) 100x; (B) 400x.	28
Figura 8	Fotomicrografia. Reação imuno-histoquímica da proteína GSK3B em tecido de adenocarcinoma gástrico. (A) 100x; (B) 400x.	31
Figura 9	Fotomicrografia. Reação imuno-histoquímica da proteína axina em tecido de adenocarcinoma gástrico. (A) 100x; (B) 400x.	35
Figura 10	Fotomicrografia. Reação imuno-histoquímica da proteína CK1 em tecido de adenocarcinoma gástrico. (A) 100x; (B) 400x.	39
Figura 11	Fotomicrografia. Reação imuno-histoquímica da proteína ubiquitina em tecido de adenocarcinoma gástrico. (A) 100x; (B) 400x.	42
Figura 12	Fotomicrografia. Reação imuno-histoquímica da proteína ciclina D1 em tecido de adenocarcinoma gástrico. (A) 100x; (B) 400x.	47
Figura 13	Fotomicrografia. Reação imuno-histoquímica da proteína myc em tecido de adenocarcinoma gástrico. (A) 100x; (B) 400x.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis clínicas dos doentes com adenocarcinoma gástrico.	19
Tabela 2	Características histopatológicas do tumor.	20
Tabela 3	Frequência de positividade e negatividade das proteínas Wnt-5a, FDZ5, GSK3B, axina, CK1, ubiquitina, ciclina D1 e myc nos tecidos de adenocarcinoma gástrico.	22
Tabela 4	Expressão citoplasmática da proteína Wnt-5a no tecido de adenocarcinoma gástrico associada aos dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.	24
Tabela 5	Razão de chances para a associação entre expressão positiva da proteína Wnt-5a no citoplasma e as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas nos doentes com adenocarcinoma gástrico.	25
Tabela 6	Expressão nuclear da proteína Wnt-5a no tecido de adenocarcinoma gástrico associada aos dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor	26
Tabela 7	Razão de chances para a associação entre expressão positiva da proteína Wnt-5a no núcleo e as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas nos doentes com adenocarcinoma gástrico.	27
Tabela 8	Expressão citoplasmática da proteína FZD5 no tecido de adenocarcinoma gástrico associada aos dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.	29
Tabela 9	Razão de chances para a associação entre expressão positiva da proteína FZD5 no citoplasma e as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas nos doentes com adenocarcinoma gástrico.	30
Tabela 10	Expressão citoplasmática da proteína GSK3B no tecido de adenocarcinoma gástrico associada aos dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.	32
Tabela 11	Razão de chances para a associação entre expressão positiva da proteína GSK3B no citoplasma e as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas nos doentes com adenocarcinoma gástrico.	33

Tabela 12	Expressão nuclear da proteína GSK3B no tecido de adenocarcinoma gástrico associada aos dados epidemiológicos dos doentes e morfológicos e anatomopatológicos do tumor.	34
Tabela 13	Expressão citoplasmática da proteína axina no tecido de adenocarcinoma gástrico associada aos dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.	36
Tabela 14	Expressão nuclear da proteína axina nos tecidos de adenocarcinomas gástricos associada aos dados epidemiológicos dos doentes anatomopatológicos do tumor	37
Tabela 15	Razão de chances para a associação entre a expressão positiva da proteína axina no citoplasma e as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas nos doentes com adenocarcinoma gástrico.	38
Tabela 16	Expressão citoplasmática da proteína CK1 no tecido de adenocarcinoma gástrico associada aos dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.	40
Tabela 17	Razão de chances para a associação entre a expressão positiva da proteína CK1 no citoplasma e as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas nos doentes com adenocarcinoma gástrico.	41
Tabela 18	Expressão citoplasmática da proteína ubiquitina nos tecidos de adenocarcinomas gástricos associada aos dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor	43
Tabela 19	Razão de chances para a associação entre a expressão positiva da proteína ubiquitina no citoplasma e as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas nos doentes com adenocarcinoma gástrico.	44
Tabela 20	Expressão nuclear da proteína ubiquitina no tecido de adenocarcinoma gástrico associada aos dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.	45
Tabela 21	Razão de chances para a associação entre a expressão positiva da proteína ubiquitina no núcleo e as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas nos doentes com adenocarcinoma gástrico.	46
Tabela 22	Expressão nuclear da proteína ciclina D1 no tecido de adenocarcinoma gástrico associada aos dados epidemiológicos dos doentes anatomopatológicos do tumor.	48

Tabela 23	Razão de chances para a associação entre a expressão positiva da proteína ciclina D1 no núcleo e as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas nos doentes com adenocarcinoma gástrico.	49
Tabela 24	Expressão citoplasmática da proteína myc no tecido de adenocarcinoma gástricos associada aos dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.	51
Tabela 25	Expressão nuclear da proteína myc no tecido de adenocarcinoma gástrico associada aos dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.	52
Tabela 26	Razão de chances para a associação entre a expressão positiva da proteína myc no citoplasma e as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas nos doentes com adenocarcinoma gástrico.	53
Tabela 27	Razão de chances para a associação entre a expressão positiva da proteína myc no núcleo e as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas nos doentes com adenocarcinoma gástrico.	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BCL – 2	<i>B – Cell lymphoma 2</i>
BETA TRCP	<i>Beta-transduction repect containing</i>
CCND1	Gen Ciclina D1
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK1	<i>Casein kinase 1</i>
Cm	Centímetros
DKK1	<i>Dickkopf-related protein 1</i>
DSH	<i>Disheveled</i>
E-cad	E-caderina
FZD	<i>Frizzled</i>
GIST	<i>Gastrointestinal stromal tumor</i>
G1/S	Fase da mitose celular
GSK3B	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
H. E.	Hematoxilina – eosina
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
kDA	Quilodalton
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LRP	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein</i>
MSI	Microsatelite instability
MYC	<i>c-myc-proto-oncogene</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

pH	Potencial hidrogeniônico
P21	Proteína 21
SRFP	<i>Secreted frizzled related protein</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNKS	<i>Tankyrases</i>
TNM	Tumor, nódulos e metástase
TPC	<i>Total phenolic content</i>
UICC	União Internacional de Combate ao Câncer
UV	Ultravioleta
Wnt	<i>Wingless and int – integration</i>
%	Porcentagem

RESUMO

Objetivos: Analisar a expressão de proteínas da via de sinalização celular Wnt canônica e não canônica no tecido do adenocarcinoma gástrico. Correlacionar a expressão dessas proteínas com as características epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor. **Método:** Foi avaliada a expressão de proteínas da via de sinalização Wnt canônica (GSK3B, axina, CK1, ubiquitina, ciclina D1 e myc) e não canônica (Wnt-5a, FZD5) em 72 doentes operados por adenocarcinoma gástrico. Quarenta e cinco (64,3%) doentes eram homens e a média de idade foi de $64,6 \pm 11,8$ anos. O grau das proteínas foi determinado por estudo imuno-histoquímico com anticorpos monoclonais em amostras do tecido gástrico em *tissue microarray*. **Resultados:** A proteína axina apresentou expressão forte no citoplasma e núcleo celular e sua expressão citoplasmática positiva se relacionou com tumores moderadamente e bem diferenciados e com os tumores do tipo intestinal da classificação de Lauren ($p=0,05$). A expressão da proteína CK1 foi positiva no citoplasma das células e foi significativa nos tumores com margens cirúrgicas livres de comprometimento ($p=0,031$). A proteína ubiquitina apresentou expressão forte no núcleo e citoplasma das células e foi significativamente mais intensa no citoplasma e no núcleo das células de tumores moderadamente e bem diferenciados ($p=0,037$) e nos tumores do tipo intestinal ($p=0,031$). A proteína ciclina D1 foi expressa apenas no núcleo e significativamente mais intensa nos tumores dos doentes masculinos ($p=0,039$). A proteína myc expressou-se tanto no citoplasma quanto no núcleo e ausência de sua expressão citoplasmática foi significativamente maior nos tumores do tipo intestinal ($p=0,028$) e com razão de chances com significância ($p=0,021$). As imunoexpressões das proteínas Wnt-5a e Frizzled-5 não apresentaram diferenças significantes ($p \leq 0,05$) em relação às características epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor. **Conclusões:** A forte expressão das proteínas da via de sinalização Wnt sugere a importância e envolvimento da via canônica no adenocarcinoma gástrico. A ausência de expressão ou relação das proteínas Wnt-5a e FZD5 sugere que a via não canônica não está ativada no tecido do adenocarcinoma gástrico.

Descritores: Neoplasias Gástricas. Carcinoma. Vias de Sinalização. Proteínas Wnt. Imuno-histoquímica. Transdução de Sinal.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer gástrico

O câncer gástrico apresenta alta incidência nos países asiáticos, no Leste Europeu e na América Latina. Mais de 70% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento. Encontra-se entre as principais neoplasias malignas do mundo, ocupando a quinta posição em relação à incidência e a terceira em relação à mortalidade. A média de sobrevivência dos portadores dessa doença é baixa em países desenvolvidos e em desenvolvimento.¹⁻⁴

No Brasil eram esperados 12.920 casos novos de câncer gástrico no ano de 2016. Apresenta uma incidência intermediária em relação aos demais, com risco estimado de 13,04 casos novos para cada 100 mil homens e de 7,37 casos novos para cada 100 mil mulheres.³

É considerado uma doença multifatorial resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais. Fatores ambientais como a infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), ingestão de grande quantidade de sal e de compostos nitrogenados e a baixa ingestão de frutas e vegetais foram associados ao desenvolvimento do câncer gástrico. O tabagismo, com frequência, e o alcoolismo, de forma menos expressiva, também são considerados fatores de risco para o câncer gástrico.⁵⁻⁸

O tipo histológico mais frequente de câncer gástrico é o adenocarcinoma que representa 95% de todas as neoplasias gástricas malignas, seguido pelo linfoma gástrico e pelo tumor estromal gastrointestinal (GIST). A localização mais frequente é na região antral, embora haja aumento consistente dos tumores na região cárdica, e sua incidência predomina a partir da quinta década de vida.^{2,4}

As classificações anatomopatológicas mais difundidas e mais amplamente utilizadas para o adenocarcinoma gástrico são a de Borrmann, de Lauren, proposta em 1965 e que separa o adenocarcinoma gástrico em tipos, intestinal ou difuso, e a classificação TNM (tumor, nódulos, metástases) da OMS^{5,9} (anexo 1). O tipo intestinal de Lauren está associado à presença de lesões pré-neoplásicas como a gastrite atrófica, gastrite crônica, metaplasia intestinal e displasia. Apresenta uma formação glandular semelhante à mucosa gástrica original. É mais frequente em homens idosos e tem relação com fatores ambientais. O tipo intestinal de Lauren é predominante nas regiões onde o câncer gástrico é epidêmico. Geralmente, sua

disseminação metastática para órgãos a distância é pela via hematogênica. O tipo difuso de Lauren é composto por células pouco coesas e com pouca ou nenhuma formação glandular. É caracterizado pela presença das células em anel de sinete e predomina em jovens do sexo feminino com histórico familiar e apresenta pior prognóstico. A variante difusa não está associada às lesões pré-neoplásicas e apresenta padrão de crescimento invasivo.⁴⁻⁹

Apesar das diversas aquisições e avanços na abordagem terapêutica convencional, com modificações na técnica, na tática cirúrgica e na quimioterapia e radioterapia, as taxas de recorrência continuam altas e os índices de sobrevivência baixos para câncer gástrico. Essa neoplasia persiste com alta incidência global e um pior prognóstico em relação aos outros adenocarcinomas, como o colorretal.¹⁰⁻¹⁴

As neoplasias, de maneira geral, aparecem em tecidos normais e decorrem, habitualmente, de acúmulo de mutações ou inativações nos genes somáticos. Várias alterações genéticas são necessárias antes do aparecimento do câncer. Conforme o local de origem do câncer, diferentes tipos de mutações podem ser encontradas. As alterações que levarão ao surgimento do câncer podem ocorrer no genoma propriamente dito, nas vias de sinalização ou no nível pós-transcricional e variam de acordo com o tecido que está originando o tumor.¹⁰⁻¹³

Diversas alterações como mutações, deleções, inativação por vírus e bactérias e hipermetilação foram envolvidas no surgimento do câncer gástrico. Dezenas de caminhos oncogênicos podem estar desregulados no surgimento desse câncer, dentre eles as mutações e inativações na via de sinalização Wnt.¹⁰⁻¹⁶

1.2 A via de sinalização Wnt

Nas neoplasias, mutações oncogênicas modificam as vias homeostáticas de sinalização inter e intracelular, tornando-as independentes das atividades constitutivas normais do organismo. A ativação fisiológica dessas vias sinalizadoras não funciona meramente como estímulo mitogênico, não havendo simples correlação entre a atividade dessas vias e a proliferação celular. No tumor, entretanto, a ativação das vias de sinalização causa maior especificação do destino das células dentro do conceito de órgão alvo, permitindo a proliferação celular aparentemente descontrolada. Neste contexto, é importante destacar que o epitélio,

fonte de 90% de tumores malignos em adultos, requer renovação constante para manter sua integridade celular. Como essa renovação celular precisa ser governada por mecanismos regulatórios de crescimento, existe a necessidade de haver padrão de especificação contínuo, além do que ocorre durante a embriogênese.^{11,13}

Os carcinomas representam a mais prevalente das neoplasias malignas humanas, emergindo dos tecidos epiteliais normais a partir de lesões precursoras benignas numa progressão de múltiplas etapas. As células do carcinoma subvertem estas adaptações evolucionárias para a multicelularidade e as revertem para um estilo de crescimento intensamente dependente dos aspectos nutricionais das células. Metástases – o passo final no processo de conversão maligna – é a causa principal de morte em doentes com câncer. As etapas importantes de formação de metástases são consideradas reversíveis e, conseqüentemente, não podem ser explicadas isoladamente por alterações genéticas irreversíveis, indicando a existência de componente dinâmico para a progressão neoplásica em seres humanos.^{14,16}

O epitélio gastrointestinal tornou-se importante tecido no entendimento da biologia do carcinoma, devido ao seu rápido *turnover* celular, exposição a toxinas dietéticas e à alta prevalência do carcinoma entre as neoplasias malignas. O trato gastrointestinal é um dos mais frequentes locais de carcinogênese por causa de sua contínua auto-renovação e o resultado de grande número de eventos mitóticos diários.^{13,16}

Possivelmente, uma das mais importantes vias para o controle do epitélio gastrointestinal é a via de sinalização Wnt. Genes da via de sinalização Wnt codificam uma grande família de moléculas secretadas que tem importante papel no controle do destino e proliferação das células epiteliais.^{13,14}

Frequentemente, a via de sinalização celular Wnt está envolvida na carcinogênese gástrica e diversas proteínas desta via podem estar mutadas ou expressas de forma atípica no tecido gástrico tumoral. No entanto, a participação da via Wnt no aparecimento do câncer gástrico não está tão esclarecida como no câncer colorretal.^{16,17}

Após estudos de desenvolvimento de câncer de mama em rato, foi detectado um gene que permitia a integração viral e conseqüentemente contribuía para o aparecimento do câncer. Esse mesmo gene, denominado *INT 1*, foi detectado

em moscas drosófilas e está relacionado à capacidade de polarização das asas desses insetos. O termo Wnt surgiu, portanto, da associação das expressões *Wingless* e *Int – integration*.^{10-13,18-21}

Os genes Wnt codificam proteínas de sinalização secretadas e são encontrados nos genomas de todos os animais. A sinalização é iniciada quando ligantes da via de sinalização Wnt encaixam-se num complexo consistindo de um receptor serpentinoso da família *frizzled* e um membro da família de receptores de lipídeos de baixa densidade. Molécula chave na cascata é a proteína citoplásmica chamada betacatenina cuja estabilidade é regulada pelo chamado “complexo de destruição”. Quando os receptores da via Wnt não são encaixados, duas proteínas do complexo de destruição, os supressores de tumor APC e a axina, unem-se à betacatenina sintetizada. CK1 e GSK3B, duas quinases do complexo de destruição, sequencialmente fosforilam um conjunto de resíduos no N terminal da betacatenina. A resultante marca fosforilada na molécula da betacatenina recruta uma beta TrCP contendo ubiquitina-ligase E3, que se liga à betacatenina para a degradação proteossomal. Quando os produtos da via de sinalização Wnt unem-se ao complexo de receptores, a atividade do complexo de destruição é inibida. Como consequência, a betacatenina acumula-se e liga-se às proteínas da família TCF-4/LEF do DNA nuclear. Na ausência do sinal Wnt, as proteínas TCF-4/LEF reprimem os genes alvos por meio da associação com corepressores. A interação com a betacatenina transitoriamente converte os fatores TCF-4/LEF em ativadores transcricionais.^{13,14,16}

Desde a sua descoberta inicial, vários outros genes foram descritos e passaram a fazer parte da família Wnt. As proteínas Wnt possuem papel importante na embriogênese e na maturação dos tecidos. Essas proteínas agem como ligantes aos componentes da família de proteínas *Frizzled* que são receptores celulares transmembrana. Uma vez ligadas a esses receptores, as proteínas Wnt podem ativar duas vias distintas de sinalização celular: a via canônica e a via não canônica.¹¹

A via canônica é considerada a mais importante na carcinogênese. Uma vez ocorrido o estímulo, o mesmo é direcionado ao núcleo da célula pelo aumento da proteína betacatenina, o que leva à replicação celular e ao possível aparecimento de uma neoplasia.¹¹

A via canônica pode estar ativada ou, então, desativada. No estado desativado, inibidores como as proteínas sFRPs (*Secreted Frizzled Related Proteins*) impedem que as proteínas da via Wnt entrem em contato com os receptores *Frizzled* para desencadear o estímulo de ação da betacatenina. Na ausência de sinalização promovida pelas proteínas da via Wnt, a betacatenina livre se acopla à E-caderina (E-CAD) na membrana celular ou, então, é fosforilada pelo complexo de degradação da betacatenina que promove a sua ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteossoma. Os baixos níveis da betacatenina no citoplasma e no núcleo impedem o deslocamento do repressor transcricional *Groucho* e a formação do complexo betacatenina/TCF (*T-cell factor*), o que inibe a transcrição dos genes alvos dessa via e que estão localizados no interior do núcleo da célula. Outro mecanismo de inibição da via Wnt é a partir da proteína DKK1 (*Dickkopf-related protein 1*) que, em humanos, é codificada pelo gene *DKK1* e membro da família Dickkopf. Essa proteína apresenta em sua estrutura duas regiões ricas em cisteína e está envolvida no desenvolvimento embrionário pela sua atuação na inibição da via de sinalização Wnt e age inativando os receptores de superfície de LRP5 e LRP6, essenciais à via canônica de sinalização Wnt.^{11,16,17}

Assim, no estado ativado, a proteína citosólica betacatenina deixa de ser fosforilada pelo complexo de degradação formado pelas proteínas axina, *adenomatose poliposis coli* (APC), caseína quinase 1 (CK1) e glicogênio sintetase quinase-3 beta (GSK3B). Em maior concentração no citoplasma, a betacatenina pode translocar para o interior do núcleo celular, onde se liga aos fatores de transcrição *T-cell specific transcription fator/lymphoid enhancer-binding fator 1* (TCF/LEF-1) deslocando o repressor transcricional *Groucho*. A formação do complexo betacatenina/TCF ativa a transcrição de genes alvos da via Wnt, dentre eles os genes *SURVIVINA*, *MYC* e *CCND1* (ciclina D1) (Figura 1).^{11,16-19}

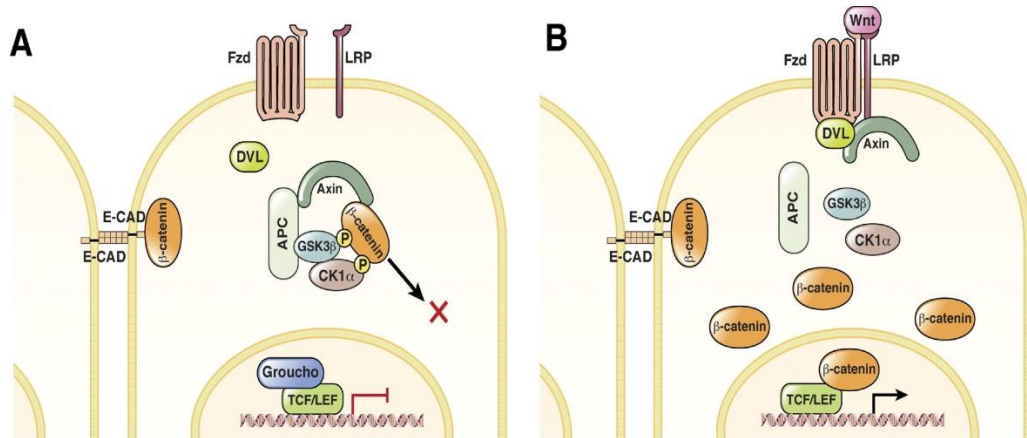


Figura 1 – Esquema representativo da via canônica da sinalização Wnt. A) Na ausência do sinal *Frizzled*, a betacatenina no citoplasma é fosforilada pelo complexo de degradação e degradada no proteossoma ou, então, se liga a E-caderina na membrana. B) Na presença do sinal Frizzled, a betacatenina deixa de ser fosforilada, pois o complexo de degradação se desfaz, se acumula no citoplasma e se desloca para o núcleo para ativar a transcrição de genes alvo. (Fonte: White BD *et al.*, 2012).¹⁶

A via Wnt não canônica é muito importante na fase de gastrulação da embriogênese, polaridade celular e modificações do citoesqueleto de actina. Sua importância ainda não está completamente estabelecida no desenvolvimento das neoplasias malignas. Na via Wnt não canônica ocorre a sinalização e a transcrição gênica, independente da ação da proteína betacatenina. Portanto, todas as vias que levam a transcrição no núcleo não mediada pela proteína betacatenina são consideradas não canônicas. As proteínas Wnt-1, Wnt-5a e FZD5 são relacionadas à via Wnt não canônica e aumentam a concentração de cálcio, regulam o citoesqueleto e antagonizam a betacatenina.^{11,20-23}

1.3 Proteínas da via de sinalização Wnt

Diversas proteínas estão envolvidas nas vias canônicas e não canônicas da cascata de sinalização Wnt. As proteínas Wnt constituem um grupo de sinalizadores transmembrana celular. São glicoproteínas com 350 a 400 aminoácidos e foram descritos 19 tipos dessas proteínas na espécie humana, sendo a primeira descrita em 1982.^{11,17,24}

As alterações na expressão das proteínas Wnt bem como a ocorrência de mutações e metilações foram relacionadas ao câncer gástrico. As proteínas Wnt-1, Wnt-2, Wnt-5, Wnt-8b e Wnt-10a foram mais frequentemente estudadas e associadas ao aparecimento do câncer gástrico.²⁵

As proteínas Wnt-1 e a Wnt-3 podem ativar tanto a via canônica quanto a via não canônica, enquanto outras, como a proteína Wnt-5a, parecem ser específicas da via não canônica. Essas proteínas Wnt ligam-se aos receptores *Frizzled* e atuam como proteínas parácrinas para iniciar as várias vias de transdução de sinal. Uma vez que a via de sinalização canônica Wnt estabiliza o coativador da transcrição betacatenina, as proteínas Wnt-1 e Wnt-2 apresentam comportamento carcinogênico, enquanto que a proteína Wnt-5a possui um caráter supressor tumoral.²³⁻²⁶

Existem poucos estudos da expressão da proteína Wnt-1 no tecido gástrico. Até 54% dos tecidos tumorais gástricos estudados podem expressar Wnt-1, sendo esse grau significativamente maior do que em tecidos normais.^{28,29}

A proteína Wnt-2, relacionada à indução da via canônica da sinalização Wnt, foi descrita como tendo expressão positiva no câncer gástrico e seu possível papel na carcinogênese seria na ativação da via de sinalização Wnt.^{29,30}

É atribuído à proteína Wnt-5a a capacidade de inibir a via canônica da sinalização Wnt e, portanto, se comportar como um supressor tumoral. Tal capacidade é caracterizada pela redução da concentração de betacatenina no citoplasma. Por meio de estudos imuno-histoquímicos, Kurayoshi *et al.*³¹ mostraram a expressão anormal de Wnt-5a em 71 dos 237 casos de câncer gástrico estudados em humanos. Essa positividade de Wnt-5a foi correlacionada com estádios avançados e com o pior prognóstico do câncer gástrico.³¹⁻³³

As proteínas *Frizzled* caracterizam um grupo de 10 proteínas estruturalmente relacionadas localizadas na membrana celular e que ocupam uma posição transmembrana. São ricas em aminoácidos cisteína e funcionam como receptores das proteínas Wnt. Podem ativar tanto a via Wnt canônica quanto a não canônica.^{34,36} Os genes *FRIZZLED* codificam essas proteínas e são essenciais para a polaridade celular, formação das sinapses neuronais, regulação e proliferação celular e desenvolvimento embriológico entre outros processos no desenvolvimento dos organismos.³³

A axina é uma proteína do citoplasma celular codificada pelo gene *AXIN 1*. Apresenta 862 aminoácidos e tem massa molecular de 96 kDa. Faz parte e interage com outras proteínas do complexo de destruição da betacatenina.³⁷⁻⁴¹ Mutações no gene *AXIN 1* estão relacionadas ao aparecimento de carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma de endométrio e meduloblastoma.³⁷ Kim *et al.*³⁸ mostraram que nove de 45 tumores gástricos com instabilidade de microssatélites (*microsatellite instability* - MSI) tinham uma mutação *frameshift* no gene *AXIN 1*.

Caseína quinase 1(CK1) é uma enzima que funciona como reguladora do sinal de transdução na maioria das células eucariotas. Está envolvida na via de sinalização Wnt e na transcrição e reparo do DNA.⁴² São conhecidos sete membros na família CK1 em humanos, apresentam de 22 a 55 kDa e podem ser localizadas na membrana, núcleo ou citoplasma. Existem poucos trabalhos avaliando a expressão da proteína CK1 e sua relação com o câncer gástrico.^{41,42}

A proteína glicogênio sintase quinase 3 (*glycogen synthase kinase* - 3GSK3) é multifuncional e está envolvida nas vias de regulação celular dos mamíferos, incluindo a via Wnt. Apresenta-se sob duas isoformas: GSK3A (alfa) e GSK3B. Ambas participam da via de sinalização Wnt canônica. Na ausência do estímulo celular da via Wnt, a GSK3B promove a fosforilação da betacatenina que direciona essa proteína para ubiquitinação e para sua posterior degradação proteassomal.^{43,44} A função de fosforilação de betacatenina é desempenhada juntamente com outras proteínas que, associadas com a GSK3B, formam o complexo de degradação da betacatenina.⁴⁵

A ubiquitina é a proteína responsável pela síntese da cadeia de poliubiquitina que, por sua vez, marca as proteínas a serem degradadas. A ubiquitina apresenta 76 aminoácidos e é encontrada em todas as células eucariotas. Sua ação é caracterizada pela degradação de forma específica levando ao consumo de ATP. Tal processo ocorre também com a betacatenina fosforilada pelo complexo de degradação que é poliubiquitinada e, posteriormente, proteolisada. Uma mutação do gene *BETA TRCP* (*beta-transducin repeat containing*), um dos componentes do complexo da ubiquitina, pode levar à incapacidade de reconhecimento da betacatenina e, conseqüentemente, à baixa degradação dessa proteína, o que eleva a sua concentração citoplasmática, desencadeando a proliferação celular e o aparecimento do câncer.⁴⁶

A ciclina D1 é uma proteína codificada pelo gene *CCND1*. Pertence à família das ciclinas e atua na regulação da expressão das quinases dependentes de ciclina. Funciona como uma sub-unidade reguladora do ciclo celular na transição das G1/S do ciclo celular. Mutações do gene e diferentes imunoexpressões foram relacionadas ao aparecimento de tumores. A superexpressão dessa proteína foi associada ao desenvolvimento e progressão do câncer gástrico. No entanto, a elevação da expressão da proteína ciclina D1 tem sido associada à inibição de degradação da mesma pela ubiquitina em consequência da ação de algumas drogas antitumorais. O aumento da expressão de ciclina D1 foi detectado nos cânceres gástricos precoces.^{47,48}

A proteína *myc* (*c-myc-proto-oncogene*) é sintetizada pelo gene *MYC* que é regulador da via de sinalização celular Wnt e que também regula vários outros genes como *P21* e *BCL-2*. O *MYC* está localizado no braço curto do cromossomo 8 e foi descrito pela primeira vez no linfoma de Burkitt. As mutações no *MYC* estão relacionadas ao aparecimento de linfomas e de carcinomas de colo de útero, colorretal, mama, pulmão e estômago.⁴⁹⁻⁵² Estudos têm mostrado que a amplificação do *MYC* no câncer gástrico varia de 38.1% a 40%. Estudo de Liu *et al.* demonstrou a expressão positiva de *MYC* em 66,3% dos tumores gástricos.⁵²

Lins *et al.*⁵³ estudaram a expressão de proteínas da via Wnt no adenocarcinoma gástrico. Esses autores analisaram a expressão e localização nuclear ou citoplasmática das proteínas E-caderina, betacatenina, APC, TCF-4 e survivina e verificaram relação entre a expressão das proteínas estudadas e as características biodemográficas (idade) dos doentes e os aspectos anatomopatológicos do adenocarcinoma gástrico (tamanho, localização, classificação de Lauren e grau de penetração do tumor na parede gástrica).

1.4 A via Wnt e a carcinogênese gástrica

Na carcinogênese gástrica, os principais mecanismos conhecidos que desregulam a via Wnt são a diminuição da sua função por mutação no gene *APC*, desfazendo o complexo de degradação da betacatenina, a mutação no éxon 3 do gene da betacatenina *CTNNB1*, o que impede que a proteína seja fosforilada, a

hiperexpressão dos receptores FZD e a hipoexpressão dos fatores inibitórios SFRPs. Todos esses mecanismos resultam no aumento dos níveis de betacatenina no citoplasma e no núcleo celular.^{16,41,42,44} (Figura 2)

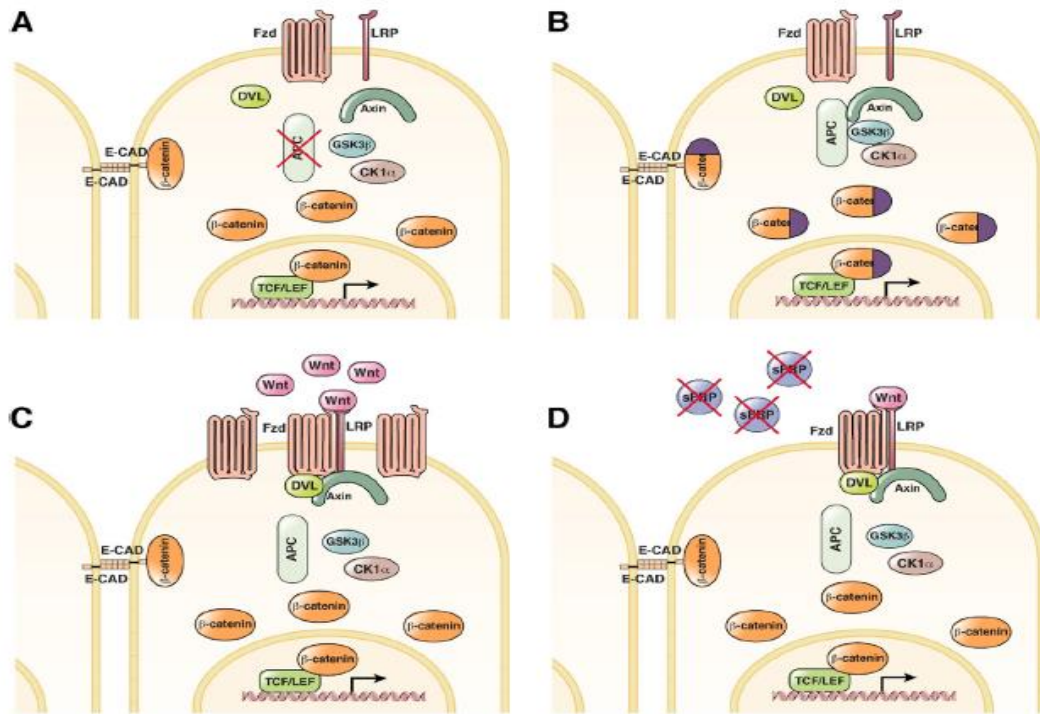


Figura 2 – Esquema ilustrando os quatro principais mecanismos em que a via de sinalização Wnt pode ser desregulada no câncer. (A) Perda da função do gene APC devido mutação causando a destruição do complexo de degradação, acúmulo de betacatenina no citoplasma, translocação para o núcleo com expressão de genes dependentes da via Wnt/betacatenina; (B) Aumento da função da betacatenina devido mutação do éxon 3 impedindo sua ubiquitinação e degradação; (C) Superexpressão dos receptores FZD (*Frizzled*) causando aumento da ativação da via; (D) Hipoexpressão dos fatores inibitórios SRFPs (*Secreted Frizzled Related Proteins*) o que aumenta a sensibilidade dos ligantes Wnt e estimula a ativação da via Wnt. (Fonte: White BD *et al.*, 2012).¹⁶ β-catenin – betacatenina; E-CAD – cadherin E; APC – Adenomatous Polyposis Coli; Axin – axina; GSK-3β - Glycogen synthase kinase 3beta; CK1-α - Casein kinase 1α; TCF/LEF - T-cell transcription factor/ Lymphoid enhancer-binding factor; Wnt - Lymphoid enhancer-binding factor; FZD – frizzled; LRP - Low density lipoprotein receptor-related protein; DVL – disheveled; SRFP – secreted frizzled related protein.

O avanço no conhecimento genético permitiu identificar discrepâncias na importância da via Wnt no aparecimento de neoplasias malignas. No entanto, os

mecanismos e o momento exato em que a via Wnt deixa de ser fisiológica e passa a ser patológica ainda permanecem não completamente esclarecidos.⁵⁴⁻⁵⁹

Nas neoplasias colorretais é possível detectar alterações genéticas na via Wnt em até 90% dos casos. É bem estabelecida a relação e a importância da via Wnt com os tumores colorretais, pois mais de 80% deles apresentam acúmulo de betacatenina no núcleo. Por outro lado, esse percentual torna-se bastante reduzido no câncer hepático e praticamente insignificante no câncer pancreático.¹⁶

A via Wnt está frequentemente envolvida na carcinogênese gástrica e diversas proteínas desta via podem estar mutadas ou expressas de forma atípica no tecido gástrico tumoral. No entanto, a participação da via Wnt no aparecimento do carcinoma gástrico não é bem conhecida como no carcinoma colorretal.^{16,17}

Novas perspectivas terapêuticas e de entendimento da resistência aos quimioterápicos podem advir dos estudos dos genes e das proteínas relacionadas com a via Wnt e vários estudos têm voltado atenção em busca de inibidores dessa via de sinalização. Um grupo dessas substâncias são os inibidores da *tankyrase*, uma enzima que é codificada em humanos pelo gene *TNKS* e cuja função principal é inibir o acúmulo de betacatenina pela desestabilização da axina no complexo destruidor de betacatenina. Por outro lado, o anticorpo monoclonal Vantictumab bloqueia a proteína Frizzled 7 e possui efeito inibidor em tumores sólidos. Esses estudos fazem parte de linhas de pesquisa envolvendo a via Wnt e sua relação com outras proteínas e voltadas para o tratamento das neoplasias.^{11,16,33,59-63} (Figura3)

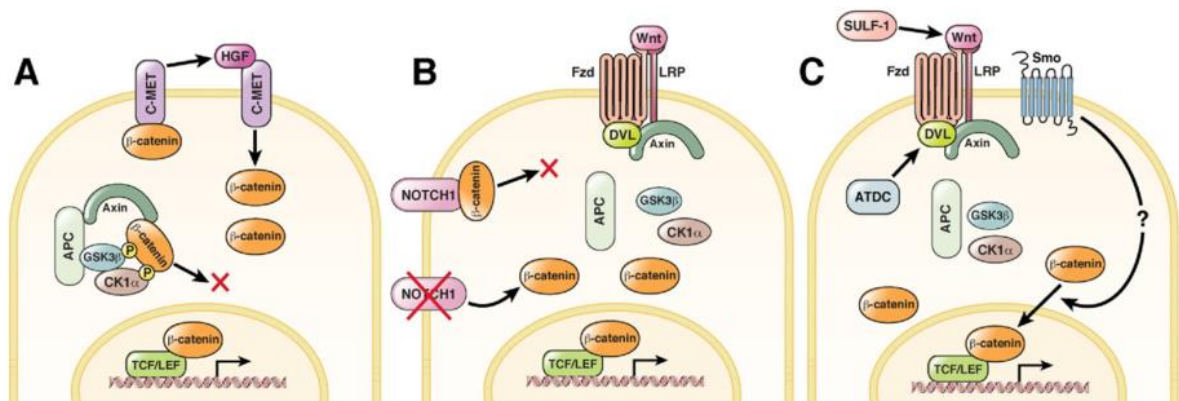


Figura 3 – Esquema representativo dos mecanismos adicionais em que a via Wnt/betacatenina pode ser modulada no câncer. (A) Nos hepatócitos, a betacatenina pode se ligar ao receptor de membrana C-MET; (B) o receptor de membrana NOTCH-1 pode se ligar à betacatenina ativa do citoplasma causando sua destruição lisossomal, inibindo a sinalização Wnt/betacatenina; (C) interação de diversas proteínas alterando o funcionamento da via Wnt/betacatenina em diversos níveis. A sulfatase-1 (SULF-1) estimula a interação das proteínas Wnt aos receptores Fzd. A ATDC (ataxia telangiectasia group D-complementing) potencializa a interação da proteína DVL (Disheveled). A SMO (smoothed) estimula a via Wnt/betacatenina de forma ainda desconhecida. (Fonte: White BD *et al.*, 2012).¹⁶ C-MET - hepatocyte growth factor receptor ; β -catenin – betacatenina; HGF – hepatocyte growth factor; APC – Adenomatous Polyposis Coli; Axin – axina; GSK-3 β - Glycogen synthase kinase 3beta; CK1- α - Casein kinase 1 α ; TCF/LEF - T-cell transcription factor/ Lymphoid enhancer-binding factor; Wnt - Lymphoid enhancer-binding factor; FZD – frizzled; LRP - Low density lipoprotein receptor-related protein; DVL – disheveled; SULF-1 – sulfatase 1 ; ATDC - ataxia telangiectasia group D-complementing; SMO – smoothed.

Visando identificar a imunoexpressão das proteínas da via Wnt no adenocarcinoma gástrico, foi proposto o estudo de oito proteínas participantes dessa via de sinalização (Wnt-5a, FZD5, GSK3B, axina, CK1, ubiquitina, ciclina D1 e myc) e relacionar seus graus de imunoexpressão com características epidemiológicas da amostra, e com as características anatomopatológicas (macroscópicas e microscópicas) do tumor.

2 OBJETIVOS

- 1 Avaliar a imunoexpressão de proteínas da via de sinalização Wnt canônica e não canônica no tecido neoplásico de doentes operados de adenocarcinoma gástrico.
- 2 Relacionar o grau de expressão das proteínas com características epidemiológicas dos doentes e com as características anatomopatológicas macroscópicas e microscópicas do tumor

3 MÉTODO

3.1 Desenho da pesquisa

Esse estudo retrospectivo avaliou o grau de expressão das proteínas Wnt-5a, FZD5, GSK3B, axina, CK1, ubiquitina, ciclina D1 e myc da via de sinalização celular Wnt e relacionou esses graus com características epidemiológicas dos doentes operados de adenocarcinoma gástrico e com as características anatomopatológicas macroscópicas e microscópicas do tumor (anexo 2).

3.2 Variáveis do estudo

As variáveis estudadas foram as seguintes: características epidemiológicas dos doentes (idade e sexo), características macroscópicas da lesão neoplásica (localização e diâmetro), classificação anatomopatológica, classificação de Lauren, estadiamento TNM e o grau tecidual de expressão das proteínas Wnt-5a, FZD5, GSK3B, axina, CK1, ubiquitina, ciclina D1 e myc no tecido do adenocarcinoma gástrico.

3.3 Casuística

Foram utilizadas lâminas de *tissue microarray* (TMA) com amostras de 72 doentes operados de adenocarcinoma gástrico, no período de janeiro de 2007 até dezembro de 2010, e provenientes do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina do ABC (Santo André, SP).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do ABC (parecer Nº 167/2009) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp-EPM (parecer Nº 1.128.919/2015). O material proveniente da Faculdade de Medicina do ABC, para confecção do TMA, foi devidamente autorizado pelo Laboratório de Patologia daquela instituição (Anexos 3).

3.4 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos os doentes maiores de 18 anos, de ambos os sexos, com o diagnóstico anatomopatológico de adenocarcinoma gástrico, não submetidos ao tratamento neoadjuvante com radioterapia e/ou quimioterapia. Foram excluídos os blocos de parafina em condições inadequadas para serem incluídos na montagem do bloco de TMA.

3.5 Construção do TMA (*Tissue Microarray*)

Para a confecção do TMA, os blocos com material embebido em parafina foram selecionados do arquivo de blocos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina do ABC. Posteriormente, os cortes histológicos foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina (H.E.) e analisados por patologista que selecionou e determinou uma área representativa do tumor. A seguir, esta área foi delimitada no “bloco doador” com uma caneta de marcação permanente que serviu de guia para a retirada dos fragmentos tumorais do local exato. Após marcação, o bloco doador foi puncionado e foram retirados fragmentos com 1,0 mm de diâmetro que foram transferidos para um bloco receptor onde foram incluídos cilindros de adenocarcinoma gástrico e foi adicionado tecido hepático como controle de localização.

Os blocos receptores foram colocados na estufa a 35°C, a fim de permitir uma aderência entre a parafina do bloco e os cilindros contendo amostras de tumor. Após 15 minutos, os blocos foram retirados da estufa e cortados numa espessura de 4 µm. Foi colocada fita adesiva em cima do bloco antes de ser cortado, para auxiliar na aderência entre o corte e a lâmina. Para manter esta aderência, a lâmina foi submetida à luz ultravioleta por 15 minutos, depois colocada em solução solvente TPC (*Total phenolic content*) novamente por 15 minutos. Para retirada da fita, a lâmina foi deixada em temperatura ambiente, e posteriormente, a fita foi retirada com o auxílio de uma pinça e a lâmina estocada no freezer.

Foi elaborada uma planilha, usada como mapa, no programa EXCEL® (Windows® - Microsoft® Office, Palo Alto, CA, USA) para localizar e identificar as

amostras de tecido para a construção do bloco de TMA e orientar a leitura das reações imuno-histoquímicas.

3.6 Imuno-histoquímica

O método imuno-histoquímico foi empregado para a detecção das proteínas Wnt-5a, FZD5, GSK3B, axina, CK1, ubiquitina, ciclina D1 e myc em 72 amostras de adenocarcinoma gástrico.

Secções convencionais de 4 µm foram obtidas dos blocos de TMA e montadas em lâminas pré-tratadas com 3-aminopropil-silano. As secções foram desparafinizadas, hidratadas e processadas. A recuperação antigênica foi realizada colocando-se as lâminas em tampão citrato 0,01 M, pH 6,0 e aquecida em panela a vapor (estiber) durante 30 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada pela utilização de 3% de peróxido de hidrogênio durante 20 minutos. A cada etapa do procedimento houve uma lavagem das lâminas com PBS (tampão fosfato pH 7,4).

As secções foram incubadas com os anticorpos por 16 a 18 horas em câmara úmida a 4°C. Foram utilizados os seguintes anticorpos: Wnt-5a e FZD5 (titulação 1:100; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), GSK3B, axina, CK1, ciclina D1 e myc (titulação 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) e ubiquitina (titulação 1:150; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA).

Após lavagem com PBS, as secções foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado e estreptavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB+ System-HRP, Dako, Glostrup, DK) durante 30 minutos cada etapa.

Finalmente, a reação foi revelada utilizando-se 3,3'-diaminobenzidina tetraidroclorito (Kit DAB-Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e contrastadas com hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas com lamínulas e resina Entellan (Merck KgaA, Darmstadt, Germany).

Foram anotadas a localização e o grau de expressão das proteínas no interior das células (Wnt-5a, FZD5, GSK3B, axina, CK1, ubiquitina, ciclina D1 e myc). Como controle positivo das reações foi utilizado o corte histológico de adenocarcinoma de colo, comprovadamente positivo para as proteínas estudadas. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por uma solução de BSA (*Bovine Serum Albumine*).

3.7 Interpretação dos resultados das reações

A avaliação das reações foi realizada por dois pesquisadores experientes e independentes que desconheciam os dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos dos tumores. As imagens foram capturadas por câmara (modelo WB350F, Samsung, Tokio, Japan) acoplada em microscópio (modelo Bx40, Olympus, Tokio, Japan). Foi avaliada a presença de expressão positiva e negativa para todas as proteínas nas células tumorais. A análise foi semiquantitativa para os graus citoplasmáticos, nucleares e na membrana da expressão das proteínas estudadas e os resultados categorizados utilizando-se o sistema de escore, baseado na intensidade da reação imuno-histoquímica e na extensão da coloração observada. (Anexo 4).

A intensidade da coloração foi classificada como negativa (0 ponto), fraca (1 ponto), moderada (2 pontos) e forte (3 pontos). A extensão da área positiva de imunocoloração foi classificada em menos de 10% (0 ponto), de 11 a 25% (1 ponto), de 26 a 50% (2 pontos) e acima de 50% (3 pontos). A intensidade da reação foi multiplicada pela extensão da coloração e os resultados categorizados em escore de 0 a 9. As reações com escore ≥ 4 foram consideradas como positivas e as com escore < 4 foram consideradas negativas.⁴

3.8 Coleta dos dados

Os dados epidemiológicos e anatomopatológicos foram obtidos de forma retrospectiva a partir de prontuários do setor de arquivo do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina do ABC.

A coleta de dados foi realizada de acordo com dados de planilhas anexas constando as características epidemiológicas dos doentes e o grau de expressão das proteínas em estudo.

3.9 Análise estatística

Análise descritiva das variáveis qualitativas foi feita pela distribuição de frequência absoluta (N) e relativa (%). As variáveis quantitativas foram analisadas pela média, desvio padrão (dp) e pelos valores mínimos e máximos.

A comparação entre a expressão (positiva ou negativa) de cada proteína (Wnt-5a, FZD5, GSK3B, axina, ubiquitina, CK1, ciclina D1 e myc) realizada de acordo com o local onde a expressão foi observada (membrana, citoplasma e/ou núcleo), com as variáveis epidemiológicas dos doentes e com as variáveis anatomopatológicas do tumor, foi realizada pelo teste exato de Fisher.

O risco de expressão positiva de cada proteína na membrana, no citoplasma e/ou no núcleo em cada variável epidemiológica do doente e anatomopatológica do tumor foi avaliada pelo cálculo da *odds ratio*.

Em todas as comparações, considerou-se como significante as probabilidades menores que 0,05 associadas aos testes, ou seja, com no máximo 5% de chance de rejeitar a hipótese de nulidade quando ela for verdadeira.

Para o cálculo estatístico foi utilizado o software de análise estatística SPSS versão 15.0 (The Predictive Analytics Company, Chicago, IL, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Características epidemiológicas dos doentes e macroscópicas do tumor

Encontram-se descritas na tabela 1 as variáveis epidemiológicas dos doentes e as características macroscópicas do tumor. A amostra composta por 72 doentes apresentou média de idade de $64,6 \pm 11,8$ anos e mediana de 65 anos.

Tabela 1 – Variáveis epidemiológicas dos doentes com adenocarcinoma gástrico e macroscopia dos tumores.

Parâmetro		N (%)
Idade	> 50 anos	64 (90,3)
	≤ 50 anos	7 (9,7)
Sexo	Masculino	45 (64,3)
	Feminino	25 (35,7)
Localização do tumor	Distal	26 (36,1)
	Proximal	46 (63,9)
Diâmetro	> 5 cm	39 (54,9)
	≤ 5 cm	32 (45,1)

N = Número de casos

4.2 Características microscópicas do tumor

As características microscópicas dos adenocarcinomas gástricos dos doentes operados estão assinaladas na tabela 2. A margem cirúrgica encontrava-se comprometida em 7 (10%) doentes. Foi identificada invasão venosa em 23 (33,3%) doentes e invasão linfática em 39 (56,5%) dos casos. Em 38 (55%) enfermos, os tumores eram moderadamente ou bem diferenciados (avaliado por HE).

Tabela 2 – Características microscópicas dos adenocarcinomas gástricos dos doentes da casuística.

Parâmetro	Classificação	N (%)
Margem comprometida	Ausente	63 (90)
	Presente	7 (10)
Invasão venosa	Ausente	46 (66,7)
	Presente	23 (33,3)
Invasão linfática	Ausente	30 (43,5)
	Presente	39 (56,5)
Invasão perineural	Ausente	26 (37,7)
	Presente	43 (62,3)
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	38 (55,9)
	Pouco / Indiferenciado	30 (44,1)
Estádio T	0	1 (1,4)
	1	2 (4,2)
	2	17 (23,6)
	3	41 (56,9)
	4	10 (13,9)
Estádio N	0	24 (34,7)
	1/2/3	46 (65,3)
Classificação de Lauren	Intestinal	49 (69,4)
	Difuso	21 (30,6)

N = Número de casos

Na figura 4 observa-se a distribuição dos tumores em relação à classificação de Lauren.

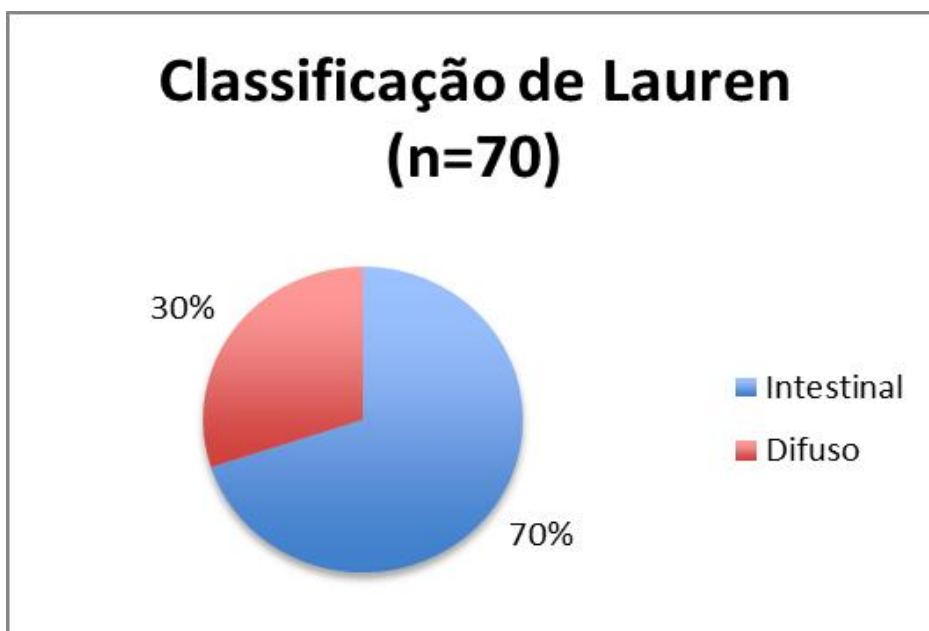


Figura 4 – Classificação dos tumores gástricos dos doentes operados conforme a classificação de Lauren

Na figura 5 observa-se a distribuição dos tumores de acordo com o grau de penetração na parede gástrica segundo a classificação TNM.

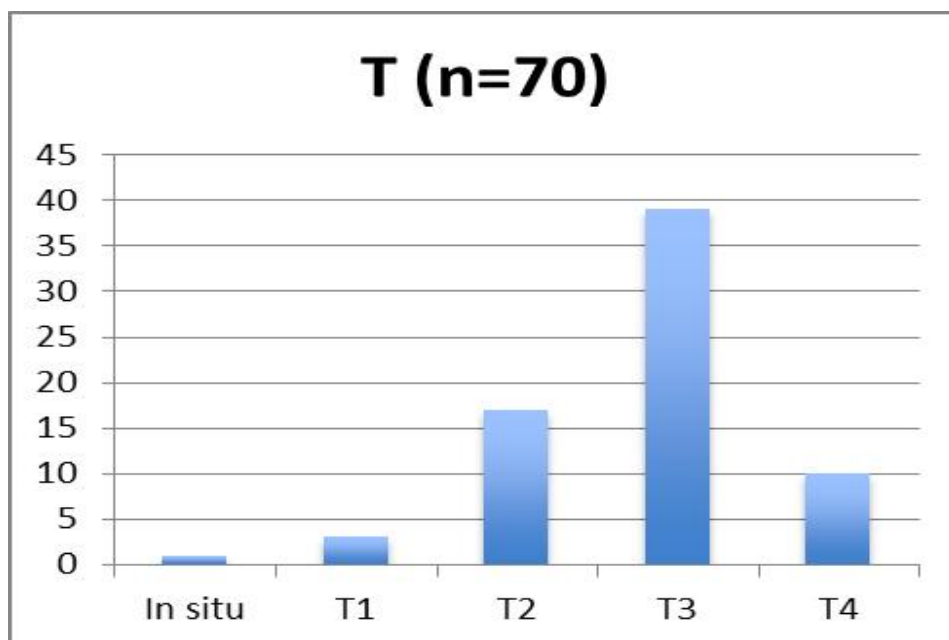


Figura 5 – Classificação dos tumores gástricos dos doentes operados de acordo com o grau de penetração na parede gástrica conforme a classificação TNM

4.3 Interpretação do grau de expressão das proteínas

A tabela 3 apresenta a distribuição da expressão das proteínas estudadas no citoplasma e núcleo das células do adenocarcinoma gástrico. Não foi observada expressão na membrana celular. A proteína Wnt-5a apresentou grau de expressão intensa no núcleo e fraca no citoplasma. A proteína FZD5 apresentou pouca expressão no citoplasma e não apresentou expressão nuclear. A proteína CK1 teve grau de expressão acentuado apenas no citoplasma. Pelo contrário, a proteína ciclina D1 expressou-se de forma intensa no núcleo. As proteínas GSK3B, axina e ubiquitina apresentaram graus fortes de expressão no citoplasma e no núcleo das células; as proteínas GSK3B e a axina tiveram graus de expressão de 100% no núcleo. Na presença de positividade, a expressão de proteína myc foi mais intensa no núcleo.

Tabela 3 – Presença ou ausência de expressão das proteínas Wnt-5a, FZD5, GSK3B, axina, CK1, ubiquitina, ciclina D1 e myc no tecido do adenocarcinoma gástrico dos doentes operados.

Proteína	Localização	N	Positiva (%)	Negativa (%)
Wnt-5a	Citoplasma	71	24 (33,8)	47 (66,2)
	Núcleo	72	59 (81,9)	13 (18,1)
FZD5	Citoplasma	72	2 (2,8)	70 (97,2)
GSK3B	Citoplasma	65	64 (98,5)	1 (1,5)
	Núcleo	65	65 (100)	-
Axina	Citoplasma	67	63 (94)	4 (6)
	Núcleo	67	67 (100)	-
CK1	Citoplasma	67	58 (86,6)	9 (13,4)
Ubiquitina	Citoplasma	67	62 (92,5)	5 (7,5)
	Núcleo	67	62 (92,5)	5 (7,5)
Ciclina D1	Núcleo	64	35 (64,7)	29 (45,3)
Myc	Citoplasma	66	16 (24,2)	50 (75,8)
	Núcleo	70	30 (42,9)	40 (57,1)

N = Número de casos

4.3.1 Wnt-5a

Houve diferença, porém não significativa, para a relação entre a expressão citoplasmática negativa da proteína Wnt-5a (Figura 6) e a ausência de invasão linfática ($p=0,07$) (tabela 4). Observou-se no teste de razão de chances (*odds ratio*) uma expressão citoplasmática negativa mais frequente nos tumores com ausência de invasão linfática ($p=0,05$) (tabela 5).

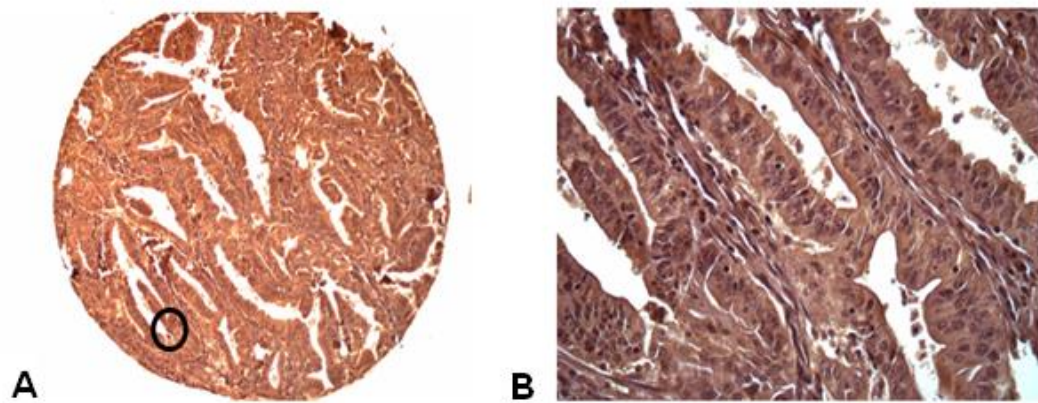


Figura 6 – Fotomicrografia. Imuno-histoquímica para a proteína Wnt-5a no tecido de adenocarcinoma gástrico de doente do estudo. (A) 1000x; (B) 400x.

Tabela 4 – Expressão da proteína Wnt-5a no citoplasma das células no tecido de adenocarcinoma gástrico e sua relação com dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N (%)	Positiva N (%)	p
Sexo	Masculino	29 (65,9)	15 (34,1)	1
	Feminino	18 (66,7)	9 (33,3)	
Idade	≤ 50 anos	6 (85,7)	1 (14,3)	0,41
	>50 anos	41 (64)	23 (36)	
Localização	Distal	18 (69,2)	8 (30,8)	0,78
	Proximal	29 (64,4)	16 (35,6)	
Diâmetro (cm)	≤ 5	24 (77,4)	7 (22,6)	0,13
	> 5	23 (54)	16 (41)	
Margem comprometida	Ausente	42 (66,7)	21 (33,3)	0,66
	Presente	5 (83,3)	1 (16,7)	
Invasão venosa	Ausente	32 (69,6)	14 (30,4)	0,78
	Presente	14 (63,6)	8 (36,4)	
Invasão linfática	Ausente	24 (80)	6 (20)	0,07
	Presente	22 (57,9)	16 (42,1)	
Invasão perineural	Ausente	18 (69,2)	8 (30,8)	1
	Presente	28 (66,7)	14 (33,3)	
Grau de diferenciação	Moderadamente ou bem diferenciado	26 (68,4)	12 (31,6)	1
	Pouco / Indiferenciado	19 (65,5)	10 (34,5)	
T	0+1+2	15 (71,4)	6 (28,6)	0,78
	3	25 (62,5)	5 (37,6)	
	4	7 (70)	3 (30)	
Metástase linfonodal	Ausente	16 (64)	9 (36)	0,8
	Presente	31 (67,4)	15 (32,6)	
Classificação de Lauren	Intestinal	31 (63,3)	8 (36,7)	0,59
	Difuso	16 (72,7)	6 (27,3)	

N = Número de casos

Teste exato de Fisher

Tabela 5 – Razão de chances (*odds ratio*) para a associação entre a expressão da Wnt-5a no citoplasma e as variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do adenocarcinoma gástrico.

		Negativa (N)	Positiva (N)	OR	p
Sexo	Masculino	29	15	0,94	0,94
	Feminino	18	9		
Idade	≤ 50 anos	6	1	0,25	0,25
	> 50 anos	41	23		
Localização	Distal	18	8	0,68	0,68
	Proximal	29	16		
Diâmetro (cm)	≤ 5	24	7	0,10	0,10
	> 5	23	16		
Margem comprometida	Ausente	42	21	0,40	0,40
	Presente	1	5		
Invasão venosa	Ausente	32	14	0,62	0,62
	Presente	14	8		
Invasão linfática	Ausente	24	6	2,91	0,05*
	Presente	22	16		
Invasão perineural	Ausente	18	8	0,82	0,82
	Presente	28	14		
Grau de diferenciação	Moderadamente ou bem diferenciado	26	12	0,80	0,80
	Pouco / Indiferenciado	10	19		
T	0+1+2	15	6	0,48 - 0,96	0,48 - 0,96
	3	25	15		
	4	7	3		
T	0+1+2+3	40	21	0,78	0,78
	4	7	3		
Metástase linfonodal	Ausente	16	9	0,77	0,77
	Presente	31	15		
Classificação de Lauren	Intestinal	31	18	0,43	0,43
	Difuso	16	6		

N = Número de casos

*= Significante

Avaliou-se a expressão de Wnt-5a no núcleo das células (tabelas 6 e 7). Pode-se observar maior ocorrência da expressão negativa nos tumores T3 em relação aos tumores menos avançados e também maior ocorrência da expressão

negativa nos tumores do tipo intestinal da classificação de Lauren em relação aos tumores do tipo difuso. Em ambas as avaliações sem significância.

A razão de chances da ausência de expressão da proteína Wnt-5a no núcleo da célula do adenocarcinoma foi mais frequente nos tumores T3 em relação aos tumores T0 ($p=0,023$) e mais frequente nos tumores do tipo intestinal de Lauren em relação ao tipo difuso ($p=0,046$). A chance da expressão da proteína estar ausente nos tumores T3 foi 2,3 vezes maior em relação aos tumores T0, T1 e T2. A chance de a proteína estar expressa negativamente no tumor gástrico do tipo intestinal de Lauren foi 3,4 vezes maior em relação ao adenocarcinoma do tipo difuso.

Tabela 6 – Expressão nuclear da proteína Wnt-5a no tecido de adenocarcinoma gástrico e sua relação com dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N (%)	Positiva N (%)	p
Sexo	Masculino	38 (84,4)	7 (15,6)	0,53
	Feminino	21 (77,8)	6 (22,2)	
Idade	≤ 50 anos	6 (85,7)	1 (14,3)	1
	> 50 anos	53 (81,5)	12 (18,5)	
Localização	Distal	21 (80)	5 (19,2)	1
	Proximal	38 (82,6)	8 (17,4)	
Diâmetro (cm)	≤ 5	26 (81,3)	6 (18,7)	1
	> 5	32 (81,2)	7 (17,9)	
Margem comprometida	Ausente	53 (81,4)	10 (15,9)	0,59
	Presente	5 (71,4)	2 (28,6)	
Invasão venosa	Ausente	38 (82,6)	8 (17,4)	1
	Presente	19 (82,6)	4 (17,4)	
Invasão linfática	Ausente	24 (80)	6 (20)	0,75
	Presente	33 (84,6)	6 (15,4)	
Invasão perineural	Ausente	20 (76,9)	6 (23,1)	0,34
	Presente	37 (86)	6 (14)	
Grau de diferenciação	Moderadamente ou bem diferenciado	33 (86,8)	5 (13,2)	0,51
	Pouco/ Indiferenciado	24 (80)	6 (20)	
T	0+1+2	14 (66,7)	7 (33,3)	0,06
	3	37 (90,2)	4 (9,8)	
	4	8 (80)	2 (20)	
Metástase linfonodal	Ausente	20 (80)	5 (20)	0,75
	Presente	39 (83)	8 (17)	
Classificação de Lauren	Intestinal	44 (88)	6 (12)	0,09
	Difuso	15 (68,2)	7 (31,8)	

N = Número de casos
Teste exato de Fisher

Tabela 7 – Razão de chances (*odds ratio*) para a associação entre expressão de Wnt-5a no núcleo das células e as variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do adenocarcinoma gástrico.

		Negativa N	Positiva N	OR	p
Sexo	Masculino	7	38	1	0,48
	Feminino	6	21	1,55	
Idade	≤ 50 anos	6	1	1	0,78
	> 50 anos	53	12	1,36	
Localização	Distal	21	5	1,13	0,84
	Proximal	38	8	1	
Diâmetro (cm)	≤ 5	26	6	1,05	0,93
	> 5	32	7	1	
Margem comprometida	Ausente	53	10	1	0,40
	Presente	5	2	2,12	
Invasão venosa	Ausente	38	8	1	1
	Presente	19	4	1	
Invasão linfática	Ausente	24	6	1,38	0,61
	Presente	33	6	1	
Invasão perineural	Ausente	20	6	1,85	0,33
	Presente	37	6	1	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	33	5	1	0,45
	Pouco / Indiferenciado	24	6	1,65	
T	0+1+2	14	7	4,63	0,02*-0,37
	3	37	4	1	
	4	8	2	2,31	
T	0+1+2+3	51	11	1	0,86
	4	8	2	1,16	
Metástase linfonodal	Ausente	20	5	1,22	0,75
	Presente	39	8	1	
Classificação de Lauren	Intestinal	44	6	1	0,04*
	Difuso	15	7	3,42	

N = Número de casos

*=Significante

4.3.2 Frizzled-5 (FZD5)

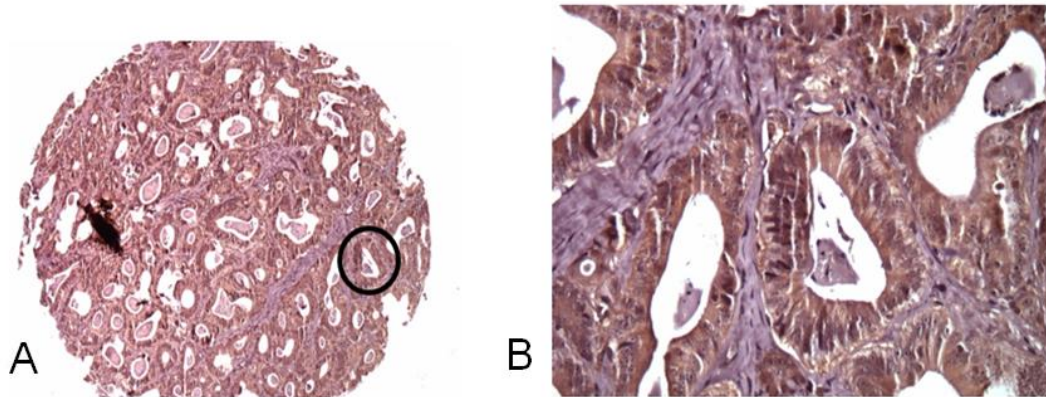


Figura 7 – Fotomicrografia. Imuno-histoquímica para a proteína FZD5 em tecido de adenocarcinoma gástrico de doente do estudo. (A) 1000x; (B) 400x.

Os resultados da expressão da proteína FZD5 no tecido de adenocarcinoma gástrico são mostrados nas tabelas 8 e 9. Observou-se expressão fraca da proteína no citoplasma das células, sem relação com as variáveis estudadas e não houve expressão nuclear dessa proteína. A análise de razão de chances não revelou relação da expressão citoplasmática da proteína FZD5 com as variáveis analisadas.

Tabela 8 – Expressão citoplasmática da proteína FZD5 no tecido de adenocarcinoma gástrico e dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N (%)	Positiva N (%)	P
Sexo	Masculino	44 (97,8)	1 (2,2)	1
	Feminino	26 (96,3)	1 (3,7)	
Idade	≤ 50 anos	7 (100)	0 (0)	1
	> 50 anos	63 (96,9)	2 (3,1)	
Localização	Distal	26 (100)	0 (0)	0,532
	Proximal	44 (95,7)	2 (4,3)	
Diâmetro (cm)	≤ 5	31 (96,9)	1 (3,1)	1
	> 5	38 (97,4)	1 (2,6)	
Margem comprometida	Ausente	61 (96,8)	2 (3,2)	1
	Presente	7 (100)	0 (0)	
Invasão venosa	Ausente	45 (97,8)	1 (2,2)	1
	Presente	22 (95,7)	1 (4,3)	
Invasão linfática	Ausente	29 (96,7)	1 (3,3)	1
	Presente	38 (97,4)	1 (2,6)	
Invasão perineural	Ausente	25 (96,2)	1 (3,8)	1
	Presente	42 (97,7)	1 (2,3)	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	38 (100)	0 (0)	0,191
	Pouco/ Indiferenciado	38 (93,3)	2 (6,7)	
T	0+1+2	20 (95,2)	1 (4,8)	1
	3	40 (97,6)	1 (2,4)	
	4	10 (100)	0 (0)	
Metástase linfonodal	Ausente	25 (100)	0 (0)	0,54
	Presente	45 (95,7)	2 (4,3)	
Classificação de Lauren	Intestinal	49 (98)	1 (2)	0,521
	Difuso	21 (95,5)	1 (4,5)	

N = Número de casos

Teste exato de Fisher

Tabela 9 – Razão de chances (*odds ratio*) para a associação entre o grau de expressão positiva da proteína FZD5 no citoplasma das células do tecido de adenocarcinoma gástrico e as variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor.

		Negativa	Positiva	OR	p
		N	N		
Sexo	Masculino	44	1	1	0,71
	Feminino	26	1	1,69	
Idade	≤ 50 anos	28	0	1	0,25
	> 50 anos	42	2		
Localização	Distal	26	0	1	0,28
	Proximal	44	2		
Diâmetro (cm)	≤ 5	31	1	1,23	0,88
	> 5	38	1	1	
Margem comprometida	Ausente	61	2	1	0,65
	Presente	7	0		
Invasão venosa	Ausente	45	1	1	0,61
	Presente	22	1		
Invasão linfática	Ausente	29	1	1,31	0,85
	Presente	38	1	1	
Invasão perineural	Ausente	25	1	1,68	0,71
	Presente	42	1	1	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	38	0	1	0,10
	Pouco / Indiferenciado	28	2		
T	0+1+2	20	1		0,80-0,62
	3	40	1		
	4	10	0	1	
Metástase linfonodal	Ausente	25	2	1	0,29
	Presente	45	0		
Classificação de Lauren	Intestinal	49	1	1	0,54
	Difuso	21	1	2,33	

N = Número de casos

4.3.3 GSK3

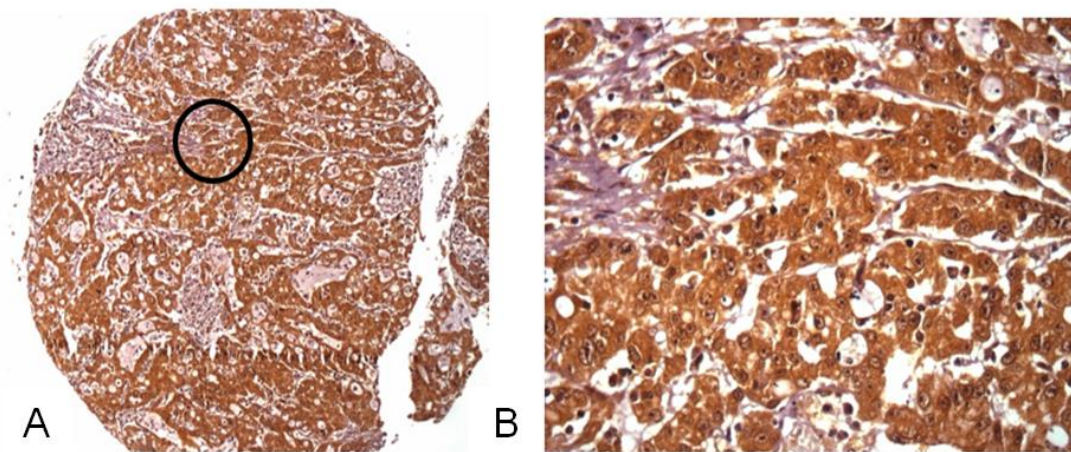


Figura 8 – Fotomicrografia. Imuno-histoquímica para a proteína GSK3B em tecido de adenocarcinoma gástrico de doente do estudo. (A) 100x; (B) 400x.

As tabelas 10, 11 e 12 mostram a expressão da proteína GSK3B e sua relação com as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas. A proteína se expressou de forma intensa tanto no núcleo quanto no citoplasma. Não houve relação significativa do grau de expressão da proteína GSK3B com as variáveis estudadas. A análise de razão de chances (tabela 11) mostrou que a expressão positiva da GSK3B é maior nos tumores com menor penetração na parede gástrica (T0,T1,T2,T3) em relação aos tumores T4 ($p=0,019$).

Tabela 10 – Expressão citoplasmática da proteína GSK3B no tecido de adenocarcinoma gástrico e sua relação com os dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N (%)	Positiva N (%)	p
Sexo	Masculino	1 (2,4)	40 (97,6)	1
	Feminino	-	24 (100)	
Idade	≤ 50 anos	-	5 (100)	1
	> 50 anos	1 (1,7)	59 (98,3)	
Localização	Distal	1 (4,3)	22 (95,7)	0,35
	Proximal	-	42 (100)	
Diâmetro (cm)	≤ 5	-	29 (100)	1
	> 5	1 (2,9)	34 (97,1)	
Margem Comprometida	Ausente	1 (1,8)	56 (98,2)	1
	Presente	-	6 (100)	
Invasão venosa	Ausente	1 (2,5)	39 (97,5)	1
	Presente	-	23 (100)	
Invasão linfática	Ausente	1 (4,2)	23 (95,8)	0,38
	Presente	-	39 (100)	
Invasão perineural	Ausente	-	17 (100)	1
	Presente	1 (2,5)	39 (97,5)	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	-	35 (100)	0,43
	Pouco / Indiferenciado	1 (3,7)	26 (96,3)	
T	0+1+2	-	17 (100)	0,15
	3	-	38 (100)	
	4	1 (10)	9 (90)	
Metástase linfonodal	Ausente	1 (4,8)	20 (95,2)	0,32
	Presente	-	44 (100)	
Classificação de Lauren	Intestinal	-	45 (100)	0,30
	Difuso	1 (5)	19 (95)	

N = Número de casos

Teste exato de Fisher

Tabela 11 – Razão de chances (*odds ratio*) para a associação entre o grau da expressão positiva da proteína GSK3B no citoplasma e variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor.

		Negativa N	Positiva N	OR	p
Sexo	Masculino	1	40	1	0,44
	Feminino	0	24		
Idade	≤ 50 anos	0	5	1	0,77
	> 50 anos	1	59		
Localização	Distal	1	22	1	0,17
	Proximal	0	42		
Diâmetro (cm)	≤ 5	0	29	1	0,36
	> 5	1	34		
Margem comprometida	Ausente	1	56	1	0,74
	Presente	0	6		
Invasão venosa	Ausente	1	39	1	0,44
	Presente	0	23		
Invasão linfática	Ausente	1	23	1	0,20
	Presente	0	39		
Invasão perineural	Ausente	0	23	1	0,44
	Presente	1	39		
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	0	35	1	0,25
	Pouco/ Indiferenciado	1	26		
T	0+1+2	0	17	1	0,05*
	3	0	38		
	4	1	9		
T	0+1+2+3	0	55	1	0,01*
	4	1	9		
Metástase linfonodal	Ausente	1	20	1	0,14
	Presente	0	44		
Classificação de Lauren	Intestinal	0	45	1	0,13
	Difuso	1	19		

N = Número de casos

*=Significante

Tabela 12 – Expressão nuclear da proteína GSK3B nos tecidos de adenocarcinoma gástrico e sua relação com os dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N (%)	Positiva N (%)
Sexo	Masculino	-	41 (100)
	Feminino	-	24 (100)
Idade	≤ 50 anos	-	5 (100)
	> 50 anos	-	60(100)
Localização	Distal	-	23 (100)
	Proximal	-	42 (100)
Diâmetro (cm)	≤ 5	-	29 (100)
	> 5	-	35 (100)
Margem comprometida	Ausente	-	57 (100)
	Presente	-	6 (100)
Invasão venosa	Ausente	-	40 (100)
	Presente	-	23 (100)
Invasão linfática	Ausente	-	24 (100)
	Presente	-	39 (100)
Invasão perineural	Ausente	-	23 (100)
	Presente	-	40 (100)
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	-	35 (100)
	Pouco / Indiferenciado	-	27 (100)
T	0+1+2	-	17 (100)
	3	-	38 (100)
	4	-	10 (100)
Metástase linfonodal	Ausente	-	21 (100)
	Presente	-	44 (100)
Classificação de Lauren	Intestinal	-	45 (100)
	Difuso	-	20 (100)

N = Número de casos

Teste exato de Fisher

4.3.4 Axina

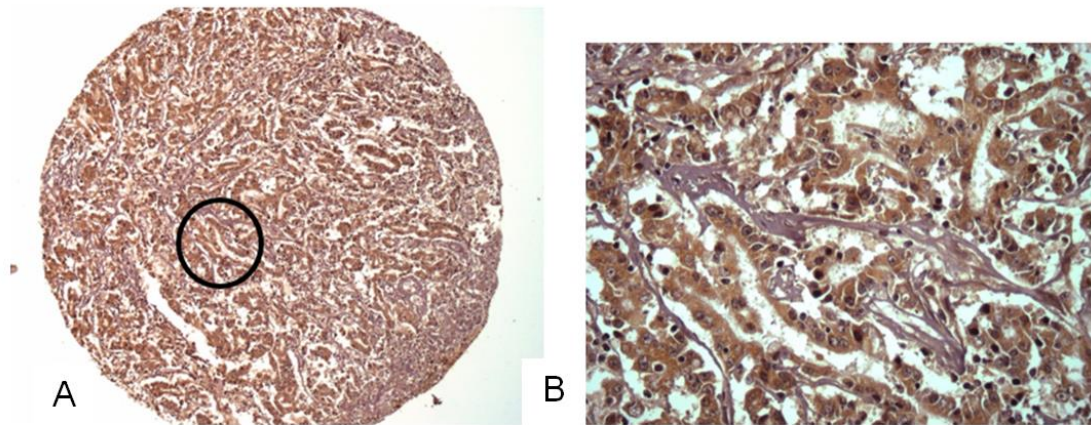


Figura 9 – Fotomicrografia. Imuno-histoquímica para a proteína axina em tecido de adenocarcinoma gástrico de doente do estudo. (A) 100x; (B) 400x.

As tabelas 13, 14 e 15 mostram a análise do grau de expressão da proteína axina no citoplasma e no núcleo das células do adenocarcinoma gástrico.

Verificou-se expressão citoplasmática positiva mais frequente nos tumores moderadamente ou bem diferenciados em relação aos pouco/indiferenciados ($p=0,088$) e nos tumores intestinais em relação aos tumores do tipo difuso ($p=0,088$), porém sem significância (tabela 13). Tais achados são reforçados na tabela 15 onde houve expressão citoplasmática positiva nos tumores moderadamente ou bem diferenciados ($p=0,05$) e nos tumores gástricos do tipo intestinal de Lauren ($p=0,05$). A chance de expressão positiva foi 7,5 vezes maior nos tumores do tipo intestinal em relação aos do tipo difuso de Lauren.

A proteína axina apresentou expressão fortemente positiva no núcleo das células neoplásicas, onde foi identificada em 100% das células (tabela 14).

Tabela 13 – Expressão citoplasmática da proteína axina no tecido de adenocarcinoma gástrico e sua relação com os dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N (%)	Positiva N (%)	p
Sexo	Masculino	2 (4,7)	41 (95,3)	0,45
	Feminino	2 (8,3)	22 (91,7)	
Idade	≤ 50 anos	0 (0)	7 (100)	1
	> 50 anos	4 (6,7)	56 (93,3)	
Localização	Distal	2 (8,3)	22 (91,7)	0,61
	Proximal	2 (4,7)	41 (95,3)	
Diâmetro (cm)	≤ 5	0 (0)	30 (100)	0,12
	> 5	4 (11,1)	32 (88,9)	
Margem comprometida	Ausente	4 (6,8)	55 (93,2)	1
	Presente	0 (0)	6 (100)	
Invasão venosa	Ausente	3 (7,1)	39 (92,9)	1
	Presente	1 (4,3)	2 (95,7)	
Invasão linfática	Ausente	1 (3,8)	25 (96,2)	0,64
	Presente	3 (7,7)	36 (92,3)	
Invasão perineural	Ausente	1 (4,3)	22 (95,7)	1
	Presente	3 (7,1)	39 (92,9)	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	0 (0)	35 (100)	0,08
	Pouco / Indiferenciado	3 (10,3)	26 (89,7)	
T	0+1+2	1 (5,6)	17 (94,4)	0,78
	3	2 (5,1)	37 (94,9)	
	4	1 (10)	9 (90)	
Metástase linfonodal	Ausente	0 (0)	22 (100)	0,29
	Presente	4 (8,9)	41 (91,1)	
Classificação de Lauren	Intestinal	1 (2,2)	45 (97,8)	0,08
	Difuso	3 (14,3)	18 (85,7)	

N = Número de casos
Teste exato de Fisher

Tabela 14 – Expressão nuclear da proteína axina no tecido de adenocarcinoma gástrico e sua relação com os dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N	Positiva N (%)
Sexo	Masculino	-	43 (100)
	Feminino	-	24 (100)
Idade	≤ 50 anos	-	7 (100)
	> 50 anos	-	60 (100)
Localização	Distal	-	24 (100)
	Proximal	-	43 (100)
Diâmetro (cm)	≤ 5	-	30 (100)
	> 5	-	36 (100)
Margem comprometida	Ausente	-	59 (100)
	Presente	-	6 (100)
Invasão venosa	Ausente	-	42 (100)
	Presente	-	23 (100)
Invasão linfática	Ausente	-	26 (100)
	Presente	-	39 (100)
Invasão perineural	Ausente	-	23 (100)
	Presente	-	42 (100)
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	-	35 (100)
	Pouco / Indiferenciado	-	29 (100)
	0+1+2	-	18 (100)
T	3	-	39 (100)
	4	-	10 (100)
Metástase linfonodal	Ausente	-	22 (100)
	Presente	-	45 (100)
Classificação de Lauren	Intestinal	-	46 (100)
	Difuso	-	21 (100)

N = Número de casos
 Teste exato de Fisher

Tabela 15 – Razão de chances para a associação entre o grau de expressão positiva da Axina no citoplasma e as variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor.

		Positiva N	Negativa N	OR	p
Sexo	Masculino	41	2	1,86	0,54
	Feminino	22	2	1	
Idade	≤ 50 anos	24	3	1	0,15
	> 50 anos	39	1	4,88	
Localização	Distal	22	2	1	0,54
	Proximal	41	2	1,86	
Diâmetro (cm)	≤ 5	30	-		0,06
	> 5	32	4	1	
Margem comprometida	Ausente	55	4	1	0,52
	Presente	6	-		
Invasão venosa	Ausente	39	3	1	0,66
	Presente	22	1	1,69	
Invasão linfática	Ausente	25	1	2,08	0,53
	Presente	36	3	1	
Invasão perineural	Ausente	22	1	1,08	0,66
	Presente	39	3	1	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	35	-		0,05*
	Pouco / Indiferenciado	26	3	1	
T	0+1+2	17	1	1,89	0,86-0,57
	3	37	2	2,06	
	4	9	1	1	
Metástase linfonodal	Ausente	22	-		0,15
	Presente	41	4	1	
Classificação de Lauren	Intestinal	45	1	7,5	0,05*
	Difuso	18	3	1	

N = Número de casos

*= Significante

4.3.5 Caseína quinase (CK1)

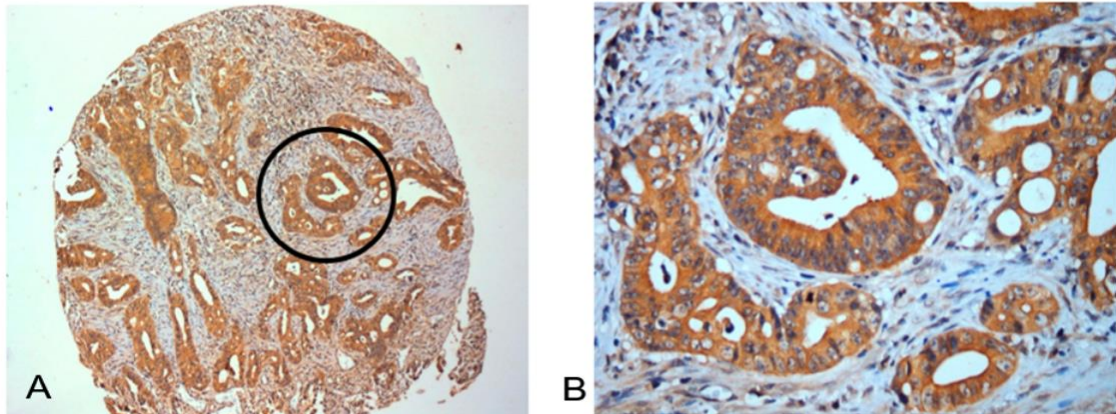


Figura 10 – Fotomicrografia. Imuno-histoquímica para a proteína CK1 em tecido de adenocarcinoma gástrico de doente do estudo. (A) 100x;(B) 400x.

A expressão da proteína CK1 é mostrada nas tabelas 16 e 17. Houve forte expressão positiva no citoplasma das células neoplásicas. Não houve expressão nuclear da proteína CK1 nas células do adenocarcinoma gástrico. Os tumores cujos laudos anatomopatológicos mostraram margem cirúrgica livre de neoplasia apresentaram maior frequência de expressão positiva da proteína ($p=0,031$).

A análise de razão de chances para a expressão positiva da proteína CK1 demonstra que os tumores com margem cirúrgica livre apresentaram com maior frequência a expressão positiva ($p=0,008$). A chance da proteína CK1 apresentar expressão positiva nos tumores sem margem comprometida foi 8,83 vezes maior que nos tumores com margem comprometida.

Tabela 16 – Expressão citoplasmática da proteína CK1 no tecido do adenocarcinoma gástrico e sua relação com os dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N (%)	Positiva N (%)	p
Sexo	Masculino	4 (9,3)	39 (90,7)	0,26
	Feminino	5 (20,8)	19 (79,2)	
Idade	≤ 50 anos	2 (28,6)	5 (71,4)	0,23
	> 50 anos	7 (11,7)	53 (88,3)	
Localização	Distal	3 (13,0)	20 (87,0)	1
	Proximal	6 (13,6)	38 (86,4)	
Diâmetro (cm)	≤ 5	5 (17,2)	24 (82,8)	0,49
	> 5	4 (10,8)	33 (89,2)	
Margem comprometida	Ausente	6 (10,2)	53 (89,8)	0,03*
	Presente	3 (50,0)	3 (50,0)	
Invasão venosa	Ausente	7 (16,3)	36 (83,7)	0,70
	Presente	2 (9,1)	20 (90,9)	
Invasão linfática	Ausente	4 (14,8)	23 (85,2)	1
	Presente	5 (13,2)	33 (86,8)	
Invasão perineural	Ausente	4 (16,7)	20 (83,3)	0,71
	Presente	5 (12,2)	36 (87,8)	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	5 (14,3)	30 (85,7)	1
	Pouco / Indiferenciado	4(13,8)	25 (86,2)	
T	0+1+2	3 (16,7)	15 (83,3)	0,88
	3	5 (12,8)	34 (87,2)	
	4	1 (10)	9 (90,0)	
Metástase linfonodal	Ausente	1 (4,5)	21 (95,5)	0,25
	Presente	8 (17,8)	37 (82,2)	
Classificação de Lauren	Intestinal	4 (8,9)	41 (91,1)	0,14
	Difuso	5 (22,7)	17 (77,3)	

N = Número de casos

Teste exato de Fisher

*=Significante

Tabela 17 – Razão de chances (*odds ratio*) para a associação entre expressão positiva da proteína CK1 no citoplasma e as variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor.

		Negativa N	Positiva N	OR	P
Sexo	Masculino	4	39	2,57	0,18
	Feminino	5	19	1	
Idade	≤ 50 anos	5	22	1	0,32
	> 50 anos	4	36	2,05	
Localização	Distal	3	20	1,05	0,94
	Proximal	6	38	1	
Diâmetro (cm)	≤ 5	5	24	1	0,45
	> 5	4	33	1,72	
Margem comprometida	Ausente	6	53	8,83	0,008*
	Presente	3	3	1	
Invasão venosa	Ausente	7	36	1	0,43
	Presente	2	20	1,94	
Invasão linfática	Ausente	4	23	1	0,85
	Presente	5	33	1,15	
Invasão perineural	Ausente	4	20	1	0,61
	Presente	5	36	1,44	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	5	30	1	0,95
	Pouco / Indiferenciado	4	25	1,04	
	0+1+2	3	15	1	
T	3	5	34	1,36	0,70 - 0,79
	4	1	9	1,8	
Metástase linfonodal	Ausente	1	21	4,54	0,13
	Presente	8	37	1	
Classificação de Lauren	Intestinal	4	41	3,01	0,12
	Difuso	5	17	1	

N= Número de casos

*=Significante

4.3.6 Ubiquitina

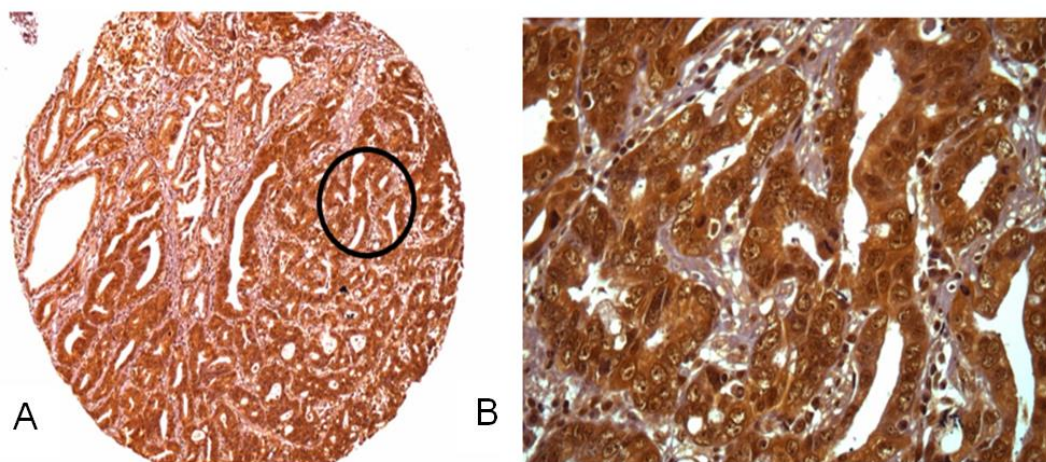


Figura 11 – Fotomicrografia. Imuno-histoquímica para a proteína ubiquitina em tecido de adenocarcinoma gástrico de doente do estudo. (A) 100x; (B) 400x.

As tabelas 18 a 21 mostram a expressão da proteína ubiquitina nos citoplasmas e núcleos das células de adenocarcinoma gástrico com suas respectivas razões de chances de expressão.

A proteína ubiquitina apresentou expressão fortemente positiva e idêntica no núcleo e no citoplasma das células neoplásicas (tabelas 18 e 20). Tanto no núcleo quanto no citoplasma, a expressão da proteína foi mais intensa nos tumores moderadamente a bem diferenciados ($p=0,037$) e do tipo intestinal de Lauren ($p=0,031$).

A análise de razão de chances de expressão positiva da proteína no citoplasma e núcleo mostrou significância nos idosos ($p=0,005$), nos tumores moderadamente e bem diferenciados ($p=0,024$) e nos tumores tipo intestinal de Lauren ($p=0,016$). A chance de expressão positiva no núcleo e citoplasma foi 10,6 vezes maior nos tumores tipo intestinal de Lauren.

Tabela 18 – Expressão no citoplasma da proteína ubiquitina no tecido de adenocarcinoma gástrico e dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N (%)	Positiva N (%)	p
Sexo	Masculino	2 (4,7)	41 (95,3)	0,34
	Feminino	3 (12,5)	21 (87,5)	
Idade	≤ 50 anos	3 (42,9)	4 (57,1)	0,07
	> 50 anos	2 (3,3)	58 (96,7)	
Localização	Distal	2 (8,3)	22 (91,7)	1
	Proximal	3 (7)	40 (93)	
Diâmetro (cm)	≤ 5	1 (3,3)	29 (96,7)	0,36
	> 5	4 (1,1)	32 (88,9)	
Margem comprometida	Ausente	5 (8,5)	54 (91,5)	1
	Presente	-	6 (100)	
Invasão venosa	Ausente	4 (9,5)	38 (90,5)	0,64
	Presente	1 (4,3)	22 (95,7)	
Invasão linfática	Ausente	3 (11,5)	23 (88,5)	0,38
	Presente	2 (5,1)	37 (94,9)	
Invasão perineural	Ausente	1 (4,3)	22 (95,7)	0,64
	Presente	4 (9,5)	38 (90,5)	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	-	35 (100)	0,03*
	Pouco/Indiferenciado	4 (13,8)	25 (86,02)	
T	0+1+2	1 (5,6)	17 (94,4)	1
	3	3 (7,7)	36 (92,3)	
	4	1 (10)	9 (90)	
Metástase linfonodal	Ausente	1 (4,5)	21 (95,5)	1
	Presente	4 (8,9)	41 (91,1)	
Classificação de Lauren	Intestinal	1 (2,2)	45 (97,8)	0,03*
	Difuso	4 (19)	14 (81)	

N = Número de casos

Teste exato de Fisher

*= Significante

Tabela 19 – Razão de chances (*odds ratio*) para a associação entre expressão positiva da ubiquitina no citoplasma e as variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor.

		Positiva N	Negativa N	OR	p
Sexo	Masculino	41	2	2,93	0,24
	Feminino	21	3	1	
Idade	≤ 50 anos	22	5	1	0,005*
	> 50 anos	40	0	21,75	
Localização	Distal	22	2	1	
	Proximal	40	3		
Diâmetro (cm)	≤ 5	29	1	3,63	0,23
	> 5	32	4	1	
Margem comprometida	Ausente	54	5	1	0,46
	Presente	6	0		
Invasão venosa	Ausente	38	4	1	0,84
	Presente	22	1	1,21	
Invasão linfática	Ausente	23	3	1	0,34
	Presente	37	2	2,41	
Invasão perineural	Ausente	22	1	2,32	0,45
	Presente	38	4	1	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	35	0	1	0,02*
	Pouco / Indiferenciado	25	4		
T	0+1+2	17	1	1,89	0,87-0,81
	3	36	3	1,33	
	4	9	1	1	
Metástase linfonodal	Ausente	21	1	2,05	0,52
	Presente	41	4	1	
Classificação de Lauren	Intestinal	45	1	10,59	0,01*
	Difuso	17	4	1	

N = Número de casos

*= Significante

Tabela 20 – Expressão nuclear da ubiquitina nos tecidos de adenocarcinomas gástricos e dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N (%)	Positiva N (%)	p
Sexo	Masculino	2 (4,7)	41 (95,3)	0,34
	Feminino	3 (12,5)	21 (87,5)	
Idade	≤ 50 anos	3(42,9)	4 (57,1)	0,07
	> 50 anos	2 (3,3)	58 (96,7)	
Localização	Distal	2 (8,3)	22 (91,7)	1
	Proximal	3 (7)	40 (93)	
Diâmetro (cm)	≤ 5	1 (3,3)	29 (96,7)	0,36
	> 5	4 (11,1)	32 (88,9)	
Margem comprometida	Ausente	5 (8,5)	54 (91,5)	1
	Presente	-	6 (100)	
Invasão venosa	Ausente	4 (9,5)	38 (90,5)	0,64
	Presente	1 (4,3)	22 (95,7)	
Invasão linfática	Ausente	3 (11,5)	23 (88,5)	0,38
	Presente	2 (5,1)	37 (94,9)	
Invasão perineural	Ausente	1 (4,3)	22 (95,7)	0,64
	Presente	4 (9,5)	38 (90,5)	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	-	30 (100)	0,04*
	Pouco / Indiferenciado	4 (13,8)	25 (86,02)	
T	0+1+2	1 (5,6)	17 (94,4)	1
	3	3 (7,7)	36 (92,3)	
	4	1 (10)	9 (90)	
Metástase linfonodal	Ausente	1 (4,5)	21 (95,5)	1
	Presente	4 (8,9)	41(91,1)	
Classificação de Lauren	Intestinal	1 (2,2)	45 (97,8)	0,03*
	Difuso	4(19)	14 (81)	

N = Número de casos

Teste exato de Fisher

*= Significante

Tabela 21 – Razão de chances (*odds ratio*) para a associação entre expressão positiva da ubiquitina no núcleo e as variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor.

		Positiva N	Negativa N	OR	p
Sexo	Masculino	41	2	2,93	0,24
	Feminino	21	3	1	
Idade	≤ 50 anos	22	5	1	0,005*
	> 50 anos	40	-		
Localização	Distal	22	2	1	0,31
	Proximal	40	3		
Diâmetro (cm)	≤ 5	29	1	3,63	0,23
	> 5	32	4	1	
Margem comprometida	Ausente	54	5	1	0,46
	Presente	6	-		
Invasão venosa	Ausente	38	4	1	0,84
	Presente	22	1	1,21	
Invasão linfática	Ausente	23	3	1	0,34
	Presente	37	2	2,41	
Invasão perineural	Ausente	22	1	2,32	0,45
	Presente	38	4	1	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	35	-		0,02*
	Pouco / Indiferenciado	25	4	1	
T	0+1+2	17	1	1,89	0,87
	3	36	3	1,33	0,81
	4	9	1	1	
Metástase linfonodal	Ausente	21	1	2,05	0,52
	Presente	41	4	1	
Classificação de Lauren	Intestinal	45	1	10,59	0,01*
	Difuso	17	4	1	

N = Número de casos

*= Significante

4.3.7 Ciclina D1

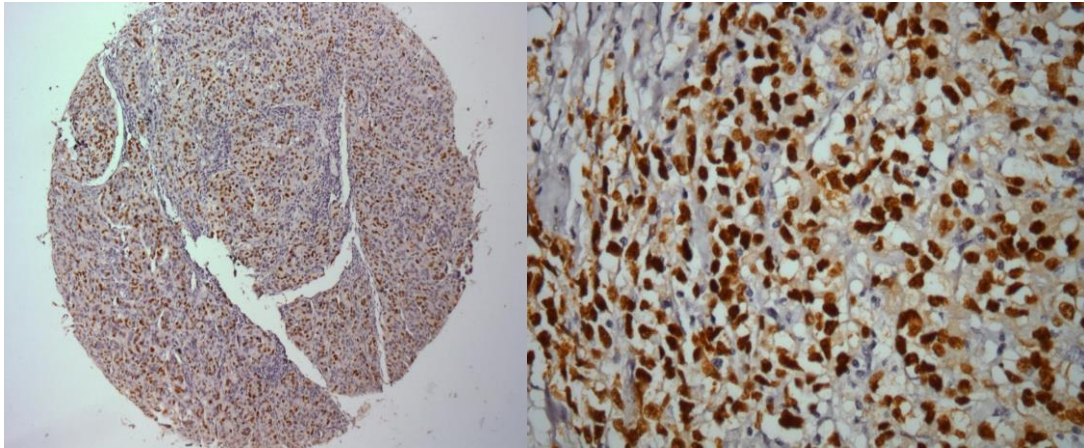


Figura 12 – Fotomicrografia. Imuno-histoquímica para a proteína ciclina D1 em tecido de adenocarcinoma gástrico de doente do estudo. (A) 100x; (B) 400x.

A proteína ciclina D1 apresentou expressão positiva apenas no núcleo das células neoplásicas, não havendo expressão citoplasmática dessa proteína. Os tumores dos doentes masculinos apresentaram expressão positiva com mais frequência do que os tumores dos doentes femininos ($p=0,03$) (tabela 22).

A razão de chances de expressão positiva também foi maior nos indivíduos masculinos ($p=0,03$). A chance de expressão positiva da proteína ciclina D1 nos homens foi 3,15 vezes maior em relação às mulheres (tabela 23).

Tabela 22 – Expressão nuclear da proteína ciclina D1 no tecido de adenocarcinoma gástrico e dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N(%)	Positiva N(%)	p
Sexo	Masculino	15 (35,7)	27 (64,3)	0,03*
	Feminino	14 (63,6)	8 (36,4)	
Idade	≤ 50 anos	3 (50,0)	3 (50,0)	1
	> 50 anos	26(44,8)	32 (55,2)	
Localização	Distal	9 (39,1)	14 (60,9)	0,60
	Proximal	20 (48,8)	21 (51,2)	
Diâmetro (cm)	≤ 5	13 (46,4)	15 (53,6)	0,80
	> 5	15 (42,9)	20 (57,1)	
Margem comprometida	Ausente	26 (45,6)	31 (54,4)	1
	Presente	2 (40,0)	3 (60,0)	
Invasão venosa	Ausente	18 (43,9)	23 (56,1)	0,79
	Presente	10 (47,6)	11 (52,4)	
Invasão linfática	Ausente	11 (42,3)	15 (57,7)	0,79
	Presente	17 (47,2)	19 (52,8)	
Invasão perineural	Ausente	11 (47,8)	12 (52,2)	0,79
	Presente	17 (43,6)	22 (56,4)	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	18 (52,9)	16 (47,1)	0,30
	Pouco / Indiferenciado	10 (37,0)	17 (63,0)	
T	0+1+2	10 (55,6)	8 (44,4)	0,59
	3	15 (40,5)	22 (59,5)	
	4	4 (44,4)	5 (55,6)	
Metástase linfonodal	Ausente	8 (36,4)	14 (63,6)	0,42
	Presente	21 50,0)	21 (50,0)	
Classificação de Lauren	Intestinal	18 (40,9)	26 (59,1)	0,41
	Difuso	11 (55,0)	9 (45,0)	

N = Número de casos

Teste exato de Fisher

*= Significante

Tabela 23 – Razão de chances (*odds ratio*) para a associação entre expressão positiva da proteína ciclina D1 no núcleo e as variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor.

		Negativa N	Positiva N	OR	p
Sexo	Masculino	15	27	3,15	0,03*
	Feminino	14	8	1	
Idade	≤ 50 anos	14	11	1	0,17
	> 50 anos	15	24	2,04	
Localização	Distal	9	14	1,48	0,46
	Proximal	20	21	1	
Diâmetro (cm)	≤ 5	13	15	1	0,77
	> 5	15	20	1,16	
Margem comprometida	Ausente	26	31	1	0,81
	Presente	2	3	1,26	
Invasão venosa	Ausente	18	23	1,16	0,78
	Presente	10	11	1	
Invasão linfática	Ausente	11	15	1,22	0,70
	Presente	17	19	1	
Invasão perineural	Ausente	11	12	1	0,74
	Presente	17	22	1,19	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	18	16	1	0,21
	Pouco/ Indiferenciado	10	17	1,91	
	0+1+2	10	8	0,64	
T	3	15	22	1,17	0,85 - 0,83
	4	4	5	1	
Metástase linfonodal	Ausente	8	14	1,75	0,30
	Presente	21	21	1	
Classificação de Lauren	Intestinal	18	26	1,77	0,29
	Difuso	11	9	1	

N = Número de casos

*= Significante

4.3.8 Myc

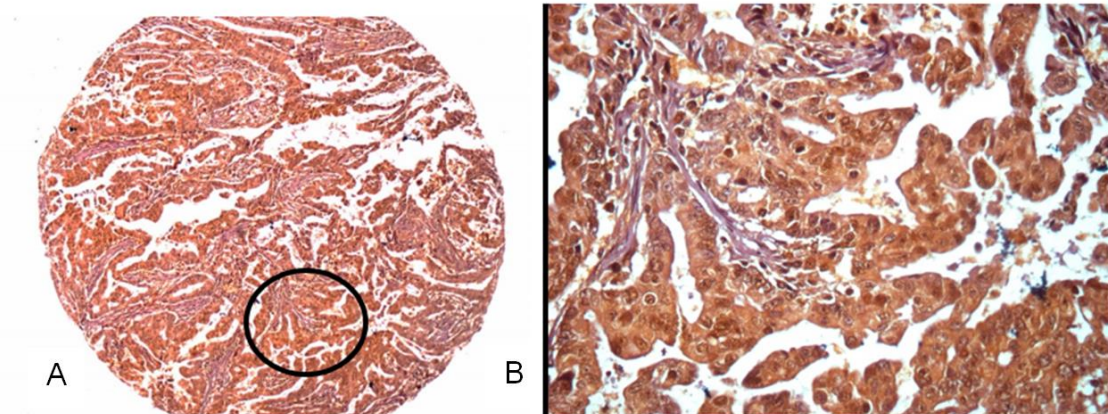


Figura 13 – Fotomicrografia. Imuno-histoquímica para a proteína myc em tecido de adenocarcinoma gástrico de doente do estudo. (A) 100x; (B) 400x.

A proteína myc apresentou expressão positiva no citoplasma e no núcleo das células do adenocarcinoma gástrico. A expressão citoplasmática negativa foi mais frequente nos tumores do tipo intestinal de Lauren ($p = 0,028$). A expressão negativa foi mais frequente nos tumores com metástases linfonodais ($p = 0,068$), porém sem significância. (tabela 24).

A expressão nuclear da proteína não apresentou relação com as variáveis do estudo (tabela 25).

Tabela 24 – Expressão citoplasmática da proteína myc no tecido de adenocarcinoma gástrico e dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N (%)	Positiva N (%)	p
Sexo	Masculino	2 (74,4)	1 (25,6)	1
	Feminino	18 (78,3)	5 (21,7)	
Idade	≤ 50 anos	5 (83,3)	1 (16,7)	1
	> 50 anos	45 (75)	15 (25)	
Localização	Distal	19 (76)	6 (24)	1
	Proximal	31 (75,6)	10 (24,4)	
Diâmetro	≤ 5 cm	21 (72,4)	8 (27,6)	0,73
	> 5 cm	28 (77,8)	8 (22,2)	
Margem comprometida	Ausente	44 (75,9)	14 (24,1)	1
	Presente	5 (83,3)	1 (16,7)	
Invasão venosa	Ausente	32 (78)	9 (22)	0,76
	Presente	17 (73,9)	6 (26,1)	
Invasão linfática	Ausente	22 (81,5)	5 (18,5)	0,55
	Presente	27 (73)	10 (27)	
Invasão perineural	Ausente	17 (79,9)	6 (26,1)	0,76
	Presente	32 (78)	9 (22)	
Grau de diferenciação	Moderadamente ou bem diferenciado	27 (77,1)	8 (22,9)	1
	Pouco/ Indiferenciado	21 (75)	7 (25)	
T	0+1+2	14 (77,8)	4 (22,2)	1
	3	28 (73,7)	10 (26,3)	
	4	8 (80)	2 (20)	
Metástase linfonodal	Ausente	14 (6,9)	9 (39,1)	0,06
	Presente	36 (86,7)	7 (16,3)	
Classificação de Lauren	Intestinal	31 (67,4)	15 (32,6)	0,03*
	Difuso	19 (95)	1 (5)	

N= Número de casos

Teste exato de Fisher

*= Significante

Tabela 25 – Expressão nuclear da proteína myc no tecido de adenocarcinoma gástrico e dados epidemiológicos dos doentes e anatomopatológicos do tumor.

		Negativa N (%)	Positiva N (%)	p
Sexo	Masculino	26 (57,8)	19 (42,2)	1
	Feminino	4 (56)	11 (44)	
Idade	≤ 50 anos	6 (85,7)	1 (14,3)	0,22
	> 50 anos	34 (54)	29 (46)	
Localização	Distal	14 (53,8)	12 (46,2)	0,80
	Proximal	26 (59,1)	18 (40,9)	
Diâmetro (cm)	≤ 5	15 (48,4)	16 (51,6)	0,23
	> 5	24 (63,2)	14 (36,8)	
Margem comprometida	Ausente	16 (59)	25 (41)	0,44
	Presente	14 (42,9)	4 (57,1)	
Invasão venosa	Ausente	27 (60)	18 (40)	0,60
	Presente	12 (52,2)	11 (47,8)	
Invasão linfática	Ausente	15 (51,7)	14 (48,3)	0,46
	Presente	24 (61,5)	15 (38,5)	
Invasão perineural	Ausente	12 (48)	13 (52)	0,31
	Presente	27 (62,8)	16 (37,2)	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	21 (5,3)	17 (44,7)	0,62
	Pouco / Indiferenciado	18 (62,1)	11 (37,9)	
	0+1+2	8 (42,1)	11 (57,9)	
T	3	25 (61)	6 (39)	0,30
	4	7 (70)	3 (30)	
Metástase linfonodal	Ausente	13 (52)	12 (48)	0,61
	Presente	27 (60)	18 (40)	
Classificação de Lauren	Intestinal	31 (63,3)	18 (36,7)	0,12
	Difuso	9 (4,9)	12 (57,1)	

N = Número de casos
Teste exato de Fisher

A razão de chances de expressão negativa da proteína myc no citoplasma foi significativa nos tumores do tipo intestinal de Lauren ($p=0,017$) e nos tumores com metástases linfonodais ($p=0,041$). A chance de expressão negativa da proteína foi 3,31 vezes maior nos doentes com metástases linfonodais e 9,19 vezes maior nos tumores do tipo intestinal (tabela 26).

Tabela 26 – Razão de chances para a associação entre expressão da proteína myc no citoplasma e as variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor.

		Negativa N	Positiva N	OR	p
Sexo	Masculino	32	11	1,24	0,73
	Feminino	18	5	1	
Idade	≤ 50 anos	22	4	1	0,17
	> 50 anos	28	12	2,36	
Localização	Distal	19	6	1	0,97
	Proximal	31	10	1,02	
Diâmetro (cm)	≤ 5	21	8	1,33	0,62
	> 5	28	8	1	
Margem comprometida	Ausente	44	14	1,59	0,68
	Presente	5	1	1	
Invasão venosa	Ausente	32	9	1	0,71
	Presente	17	6	1,25	
Invasão linfática	Ausente	22	5	1	0,43
	Presente	27	10	1,63	
Invasão perineural	Ausente	17	6	1,25	0,71
	Presente	32	8	1	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	27	8	1	0,84
	Pouco / Indiferenciado	21	7	1,13	
T	0+1+2	14	4	1,14	0,96-0,68
	3	28	10	1,43	
	4	8	2	1	
T	0+1+2+3	42	14	1,33	0,73
	4	8	2	1	
Metástase linfonodal	Ausente	14	9	3,31	0,04*
	Presente	36	7	1	
Classificação de Lauren	Intestinal	31	15	9,19	0,02*
	Difuso	19	1	1	

N = Número de casos

*=Significante

A razão de chances de expressão positiva da proteína myc no núcleo mostrou-se significativa ($p=0,01$) nos tumores com margens cirúrgicas livres de comprometimento tumoral. A chance de expressão positiva foi 5,47 vezes maior nos tumores com margem livre do que nas neoplasias com margens comprometidas.

Tabela 27 – Razão de chances para a associação entre expressão positiva da proteína myc no núcleo e as variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor.

		Negativa N	Positiva N	OR	p
Sexo	Masculino	26	19	1	0,88
	Feminino	14	11	1,08	
Idade	≤ 50 anos	6	1	1	0,11
	> 50 anos	34	29	5,12	
Localização	Distal	14	12	1,24	0,67
	Proximal	26	18	1	
Diâmetro (cm)	≤ 5	15	16	1,83	0,22
	> 5	24	14	1	
Margem comprometida	Ausente	16	25	5,47	0,01*
	Presente	14	4	1	
Invasão venosa	Ausente	27	18	1	0,54
	Presente	12	11	1,38	
Invasão linfática	Ausente	15	14	1,49	0,42
	Presente	24	15	1	
Invasão perineural	Ausente	12	13	1,83	0,23
	Presente	27	16	1	
Grau de diferenciação	Moderado ou bem diferenciado	21	17	1,32	0,57
	Pouco / Indiferenciado	18	11	1	
T	0,1,2	8	11	3,21	0,96-0,68
	3	25	16	1,49	
	4	7	3	1	
T	0,1,2,3	33	27	1,91	0,73
	4	7	3	1	
Metástase linfonodal	Ausente	13	12	1,38	0,52
	Presente	27	18	1	
Classificação de Lauren	Intestinal	31	18	1	0,11
	Difuso	9	12	2,3	

N = Número de casos

*=Significante

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise da amostra

No trabalho atual foram avaliados 72 doentes operados de adenocarcinoma gástrico. Trata-se de estudo retrospectivo em que foram analisados os dados epidemiológicos dos doentes, as características macro e microscópicas do tumor e a expressão de oito proteínas relacionadas à via Wnt canônica e não canônica.

O estudo foi feito com padronização adequada e criteriosa na coleta de dados, na confecção do TMA, na realização da técnica de imuno-histoquímica e na interpretação e análise dos resultados com o intuito de minimizar os vieses próprios deste tipo de estudo retrospectivo.

Foi utilizado o método de TMA, tendo em vista algumas características da técnica: aplicabilidade em alta escala, rapidez nas etapas de coloração da imuno-histoquímica, economia de reagentes e menores custos em relação à técnica convencional. Além disso, outra vantagem do TMA em relação à imuno-histoquímica convencional é que as reações são homogêneas, uma vez que são realizadas na mesma lâmina e em todos os casos ao mesmo tempo. Embora a utilização de pequenas amostras de tecido neoplásico seja passível de crítica, esse método (TMA) é validado e considerado confiável e seguro para realização de pesquisas.^{64,65}

Na análise da amostra foi observado um predomínio de doentes com idade maior que 50 anos (90,3%), o que é compatível com a literatura.⁶⁶⁻⁶⁸ Também em compatibilidade com a literatura, encontramos um predomínio de indivíduos do gênero masculino (64,3%) em relação ao feminino (35,7%).^{66,67}

Em nosso meio, da Silva⁶⁶ avaliou as proteínas de caspase em câncer gástrico e identificaram uma população de 58,6% do sexo masculino e 41,4% do sexo feminino, bem como 78,1% acima e 21,9% abaixo de 50 anos. Resultado semelhante foi encontrado por Oshima *et al.*⁶⁷

Na atual série, foi possível, ainda, identificar um predomínio de tumores gástricos proximais (63,9%) em relação aos tumores distais (36,1%). Lazar *et al.*⁶⁸ identificaram 49,2% de tumores proximais enquanto Shintani *et al.*⁶⁹ identificaram 66,6% nessa localização, em conformidade com a presente casuística.

Observou-se, também, um predomínio de tumores do tipo intestinal (69,4%) de Lauren em relação ao tipo difuso (30,6%). Achados semelhantes foram identificados por *Gerfali et al.*⁴¹ (60%) e *Lazar et al.*⁶⁸ (62,2%). *Oshima et al.*⁶⁷ encontraram 58,3% de tumores do tipo intestinal e 41,7% do tipo difuso. Em discordância com esses achados, *Arbiael et al.*⁷⁰ identificaram predomínio do adenocarcinoma gástrico do tipo difuso de Lauren (55,2%).

Caracterizando a pouco exuberante sintomatologia do câncer gástrico na fase inicial, assim como a inexistência de sistema de rastreamento eficaz para essa neoplasia, a maioria dos tumores foi diagnosticada já em fase avançada. Identificou-se aproximadamente 70% dos tumores gástricos como T3 e T4. Os tumores T3 representam 56,9% da atual amostra. *Song et al.*⁷¹ identificaram 66,9% de tumores T3 e *Shitani et al.*⁶⁹ identificaram um predomínio de tumores T4 (48,6%). *Oshima et al.*⁶⁷ identificaram 70% de tumores em estágio clínico avançado.

5.2 Importância da via Wnt

É bem conhecida e estabelecida a importância da via Wnt no adenocarcinoma colorretal, onde é possível detectar até 90% de alterações genéticas nessa via. Em mais de 80% desses tumores ocorre acúmulo de betacatenina no núcleo e as proteínas mais frequentemente mutadas são a APC e a própria betacatenina.^{16,72-74}

Já na carcinogênese gástrica, a via Wnt está frequentemente envolvida e diversas proteínas desta via podem estar mutadas ou expressas de forma atípica. Entretanto, a participação da via Wnt no aparecimento do câncer gástrico não é tão expressiva, bem conhecida e estudada como no câncer colorretal.^{17,75,76}

Os principais mecanismos conhecidos que desregulam a via Wnt são a diminuição da função por mutação no APC, desfazendo, assim, o complexo de degradação, a mutação no éxon 3 da betacatenina impedindo que a mesma seja fosforilada, a superexpressão dos receptores FZD e a hipoexpressão dos fatores inibitórios SRFPs. Todos esses mecanismos resultam no aumento dos níveis de betacatenina no citoplasma e no núcleo celular, com a possibilidade de desenvolvimento do carcinoma.^{16,17}

A via canônica é considerada a mais importante na carcinogênese. Uma vez ocorrido o estímulo, o mesmo é direcionado ao núcleo celular pelo aumento de betacatenina, o que leva à ativação de genes de replicação celular e possível surgimento de neoplasia. No entanto, a via não canônica, embora relacionada inicialmente à gastrulação da embriogênese, polaridade celular e modificações do citoesqueleto de actina tem sido também relacionada ao aparecimento das neoplasias. Nessa situação, ocorre a sinalização e a transcrição gênica, porém independente da ação da betacatenina. Portanto, todas as vias que levam à transcrição no núcleo não mediada por betacatenina são consideradas não canônicas.^{10,16,17} Ramos *et al.*²⁸, em estudo de câncer colorretal, compararam a mucosa normal e o tumor e não encontraram diferença na expressão das proteínas da via não canônica (Wnt-1, Wnt-5a, Frizzled-1 e Frizzled-5).

O avanço no conhecimento genético permitiu identificar controvérsias na importância da via Wnt no aparecimento de neoplasias. No entanto, os mecanismos e o momento exato em que a via Wnt deixa de ser fisiológica e passa a ser patológica permanecem, ainda, obscuros.⁵⁴

No atual estudo, avaliou-se a expressão das proteínas Wnt-5a, FZD5, GSK3B, axina, CK1, ubiquitina, ciclina D1 e myc no citoplasma e no núcleo das células do adenocarcinoma gástrico. Optou-se pela avaliação do grau de expressão das proteínas acima relacionadas porque elas fazem parte da via de sinalização Wnt canônica e não canônica.

5.3 Expressão das proteínas

5.3.1 Wnt-5a

É atribuído à proteína Wnt-5a a capacidade de inibir a via canônica da sinalização e, portanto, se comportar como um supressor tumoral. Tal capacidade caracteriza-se pela redução da concentração de betacatenina no citoplasma. Dejemek *et al.*³², em estudos de câncer colorretal, demonstraram que a expressão de Wnt-5a está associada ao aumento da sobrevivência de cinco anos dos doentes em estágio Dukes B. Ramos *et al.*²⁸ não encontraram diferença na expressão dessa

proteína na mucosa colorretal normal e no tecido neoplásico. Benhaj *et al.*⁷⁷ avaliaram a expressão das proteínas Wnt-5a e Wnt-5b no câncer de mama e detectaram uma baixa expressão. Peng *et al.*⁷⁸ avaliaram o câncer de ovário e lesões não malignas desse órgão e relacionaram a hiperexpressão da proteína Wnt-5 com a presença de malignidade e com a piora do prognóstico. Por outro lado, uma análise comparativa entre câncer de endométrio e endométrio atrófico não evidenciou diferença de expressão da proteína Wnt-5a.⁷⁹

Por meio de estudo imuno-histoquímico, Kurayoshi *et al.*³¹ mostraram expressão anormal de Wnt-5a em 71 dos 237 casos de câncer gástrico. Esta positividade de Wnt-5a foi correlacionada com estádios avançados e pior prognóstico. Ara *et al.*⁸⁰ avaliaram a relação da Wnt-5a com a laminina g2, uma proteína relacionada com adesão celular e invasão neoplásica. Os resultados encontrados sugerem que a Wnt-5a está envolvida na progressão do câncer gástrico, achado semelhante ao de outros autores.⁸¹⁻⁸³ Zhang *et al.*⁸⁴ mostraram que a expressão positiva de Wnt-5a está relacionada com o melhor prognóstico do carcinoma gástrico.

No presente estudo, observou-se a expressão positiva da proteína Wnt-5a no núcleo (81,9%) e no citoplasma (33,8%) das células do adenocarcinoma gástrico. Tal expressão positiva não se relacionou a nenhuma das variáveis estudadas. Observou-se, no entanto, que a expressão negativa da proteína Wnt-5a, no citoplasma, foi mais frequente nos doentes sem invasão linfática ($p=0,07$). Porém, esse achado não foi significativo. A análise da razão de chances de expressão da proteína Wnt-5a no citoplasma demonstrou uma expressão negativa mais frequente nos doentes sem invasão linfática ($p=0,05$).

A análise da expressão nuclear da proteína mostra uma expressão negativa mais frequente nos tumores T3 da classificação TNM em relação aos tumores T0, T1 e T2, bem como nos tumores do tipo intestinal de Lauren. De maneira semelhante, a razão de chances demonstrou expressão negativa mais frequente nos tumores T3 em relação aos tumores T0, T1 e T2 e mais frequente nos tumores do tipo intestinal em relação aos do tipo difuso.

Esses achados sugerem que a expressão negativa da proteína se relaciona com mais frequência com os tumores menos avançados e menos agressivos, o que sugere um efeito não protetor da proteína Wnt-5a. No entanto, a expressão negativa

também foi mais frequente em tumores T3 em relação aos tumores T0, T1 e T2. Essa atuação ambivalente da proteína Wnt-5a também é descrita na literatura, quanto à relação da proteína com o prognóstico do carcinoma gástrico. A ocorrência de uma mutação poderia levar à ausência de síntese dessa proteína e à consequente expressão negativa e a perda da função supressora de tumor.

5.3.2 FZD5

Os receptores FZD5 recebem sinal da via canônica e não canônica, sendo importantes na via de sinalização celular Wnt. Porém, a proteína FZD5 tem sido mais relacionada à via Wnt não canônica.⁸⁵

Os genes *FRIZZLED* são essenciais para a polaridade das células, formação das sinapses neuronais, regulação e proliferação celular, desenvolvimento embriológico e outros processos no desenvolvimento dos organismos.⁸⁶

Ramos *et al.*²⁸ mostraram que ambos os receptores FZD1 e FZD5 apresentaram expressão reduzida, tanto na mucosa cólica normal quanto no carcinoma colorretal.

Menezes *et al.*⁸⁷, em análise comparativa entre o endométrio atrófico e o adenocarcinoma de endométrio, identificaram a expressão de FZD5 significativamente maior no endométrio atrófico (80%) do que no adenocarcinoma (31,1%). Esses autores sugerem que a baixa expressão de FZD5 levou ao desenvolvimento do câncer, tendo em vista sua função inibidora da via Wnt canônica.⁸⁷

No presente estudo, identificou-se uma expressão baixa no citoplasma da proteína FZD5. Não houve expressão nuclear dessa proteína e não foi identificada relação da expressão citoplasmática com as variáveis desse estudo.

É possível sugerir que em função do provável efeito de supressão tumoral da via não canônica exercido pelas suas proteínas, que esta via inibidora não funcionou de forma adequada, o que pode ter levado à hiperexpressão da via canônica e ao aparecimento da neoplasia.

5.3.3 GSK3B

GSK3 é uma proteína multifuncional e envolvida nas vias de regulação celular dos mamíferos incluindo a via Wnt. Apresenta-se sob duas isoformas: GSK3 alfa e GSK3 beta (GSK3B). Essas proteínas estão envolvidas na via de sinalização Wnt canônica. Na ausência do estímulo celular da via Wnt, a GSK3B promove a fosforilação da betacatenina, o que direciona essa última proteína para a ubiquitinação e posterior degradação proteossomal.⁸⁸

A função de fosforilação de betacatenina é desempenhada juntamente com outras proteínas que, associadas com a GSK3B, formam o complexo de degradação da betacatenina.^{14,16}

Cho *et al.*⁸⁸ analisaram a expressão de GSK3B em 281 casos de adenocarcinoma gástrico. A expressão positiva da proteína foi relacionada aos tumores em estágio inicial, sem metástases linfonodais e sem invasão angiolinfática.

Tang *et al.* mostraram que a GSK3B apresenta expressão proteica baixa nos tumores mais avançados e que inibe a expressão de micro-RNA 183-96-182 pela via betacatenina/TCF/LEF1.⁸⁹

No presente estudo, a proteína apresentou forte expressão tanto no núcleo quanto no citoplasma, porém não houve relação da expressão da proteína com as variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor.

A análise de razão de chances para expressão positiva da proteína GSK3B no citoplasma mostrou ser significativamente maior nos tumores T0,T1,T2 e T3 em relação aos tumores T4. Tais achados também foram observados por outros autores.^{88,89} Verificou-se, também, uma razão de chances significativa para a expressão positiva nos tumores T3 em relação aos mais iniciais (T0,T1 e T2) ou mesmo mais avançados (T4).

5.3.4 Axina

A proteína axina faz parte do complexo de destruição da betacatenina e atua como supressor tumoral. Há duas proteínas denominadas axina (axina 1 e axina 2) que são funcionalmente equivalentes. Mutações nos genes que sintetizam a axina

estão relacionadas ao aparecimento de carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma de endométrio e meduloblastoma.^{37,54}

Ramos *et al.*²⁸ encontraram forte expressão da proteína no tumor colorretal e baixa expressão no tecido não neoplásico. Kim *et al.*³⁸ mostraram que nove dos 45 tumores gástricos com MSI tinham uma mutação *frameshift* AXIN2. Jin *et al.*³⁹ analisaram 54 tumores colorretais e identificaram 11% de mutação do gene *AXINA*. Pan *et al.*⁹¹ analisaram 70 carcinomas gástricos e identificaram 7,1% de mutação no gene *AXINA* e concluíram que as mutações contribuem para a carcinogênese gástrica. Mazzoni e Fearon⁹⁰ realizaram revisão sobre a importância da axina e suas variantes nos cânceres gastrointestinais e observaram que a proteína axina apresentou expressão fortemente positiva nas células neoplásicas. No presente estudo, a expressão da proteína axina foi mais intensa no núcleo do que no citoplasma e foi identificada em 100% dos núcleos das células do adenocarcinoma gástrico. A expressão citoplasmática também foi intensa e predominou a expressão positiva nos tumores moderadamente ou bem diferenciados em relação aos pouco diferenciados ou indiferenciados. Também nos tumores gástricos do tipo intestinal de Lauren observa-se maior expressão da proteína axina em relação aos tumores do tipo difuso.

A análise de razão de chances para a expressão citoplasmática positiva da proteína axina mostrou uma expressão significativa nos adenocarcinomas gástricos moderadamente ou bem diferenciados, e nos tumores do tipo intestinal de Lauren.

Tomados em seu conjunto, esses resultados sugerem que a proteína tende a ter expressão positiva nos tumores menos agressivos. A forte expressão da proteína no citoplasma e no núcleo das células sugere seu envolvimento e importância no aparecimento do câncer, evidenciando a influência da via Wnt canônica no surgimento das neoplasias gástricas.

5.3.5 CK1

A proteína CK1 pode ser identificada na membrana, núcleo ou citoplasma celular e são conhecidos sete membros na família CK1 em humanos. A CK1 épsilon tem sido relacionada à fosforilação da via Wnt. Existem poucos trabalhos avaliando a expressão de CK1 e sua relação com o aparecimento do adenocarcinoma

gástrico.^{41,42} Por fazer parte do complexo de destruição da betacatenina, a expressão positiva da proteína sugere que ela pode estar presente nas etapas de aparecimento do carcinoma gástrico.

Nesse estudo, a proteína CK1 não apresentou expressão nuclear. Verificou-se forte expressão positiva no citoplasma das células neoplásicas. É esperada a positividade da proteína no citoplasma das células onde normalmente exerce sua função e não no núcleo. Os tumores cujos laudos anatomopatológicos evidenciaram margem cirúrgica livre de neoplasia apresentaram, com maior frequência, a expressão positiva da proteína.

5.3.6 Ubiquitina

A ubiquitina é responsável por marcar proteínas para serem degradadas a partir da cadeia de poliubiquitina. A regulação da concentração plasmática da betacatenina como membro da via Wnt é realizada pelo complexo de destruição juntamente com a ubiquitina.⁹² Três diferentes proteínas fazem parte do processo de ubiquitinação: a ub-ativada ou E1, a ubiquitina conjugada ou E2 e a ubiquitina ligante ou E3. Uma mutação do gene *BETA TRCP*, um componente da família ubiquitina, pode levar à incapacidade de reconhecimento da betacatenina, à baixa degradação da mesma com a elevação da sua expressão citoplasmática e, conseqüentemente, ao câncer.^{46,92}

Bourroul *et al.*⁹³, em análise comparativa da expressão da ubiquitina em mucosa colorretal normal e no tecido do carcinoma colorretal, observaram uma maior expressão da proteína ubiquitina nos tecidos de carcinoma colorretal e tal achado pode ser explicado pela ativação do processo de carcinogênese.^{46,94} No atual estudo, a proteína ubiquitina apresentou expressões fortemente positivas e idênticas no núcleo e no citoplasma. Tanto no núcleo quanto no citoplasma, a expressão da proteína foi significativamente mais intensa nos tumores moderadamente diferenciados ou bem diferenciados e nos tumores do tipo intestinal de Lauren.

A análise de razão de chances de expressão positiva da proteína no citoplasma e no núcleo mostrou significância nos tumores de doentes acima de 50 anos, naqueles moderadamente diferenciados ou bem diferenciados e nos tumores

gástricos do tipo intestinal de Lauren. Esses resultados indicam que a expressão positiva da proteína ubiquitina foi mais frequente nos tumores gástricos menos agressivos. Além disso, é possível especular que a proteína ubiquitina pode estar envolvida no processo da carcinogênese gástrica.

5.3.7 Ciclina D1

Arici *et al.*⁹⁵ avaliaram a expressão da proteína ciclina D1 na mucosa gástrica e no tecido neoplásico gástrico. A expressão da proteína foi detectada em 72% das células do carcinoma gástrico e em 55,8% das células da mucosa gástrica. Tal achado sugere que a expressão da ciclina D1 surge desde as lesões gástricas iniciais e tende a se manter com a progressão do tumor.

No presente estudo, a proteína ciclina D1 apresentou expressão positiva apenas no núcleo das células neoplásicas e não houve expressão citoplasmática dessa proteína. Os tumores nos doentes masculinos apresentaram expressão significativamente mais positiva em relação aos tumores nas mulheres. A razão de chances de expressão positiva também foi maior nos indivíduos de sexo masculino. A expressão apenas nuclear foi esperada tendo em vista que a ciclina D1 é uma proteína sintetizada a partir do estímulo da betacatenina no núcleo da célula. Esse achado sugere que a via de sinalização celular Wnt canônica está ativada.

5.3.8 Myc

Estudos têm mostrado que a amplificação do gene *MYC* no câncer gástrico varia de 38.1% a 40%.^{49,50} Liu *et al.*⁵² verificaram a presença de expressão positiva da proteína myc em 66,3% dos tumores gástricos.

Khaleghian *et al.*⁹⁶ avaliaram a relação da expressão e amplificação do gene *MYC* com as características biodemográficas e anatomopatológicas do adenocarcinoma gástrico. A hibridização *in situ* foi positiva em 43% e a expressão positiva foi identificada em 14,7% dos casos. Esses autores identificaram a maior expressão de *MYC* nos tumores difusos, ao contrário de Calgano *et al.*⁹⁷ que identificaram maior expressão da proteína myc nos tumores gástricos do tipo

intestinal de Lauren. Ademais, não foi encontrada diferença significativa na expressão de proteína myc em relação aos estádios do tumor.⁹⁷

No presente estudo, a expressão da proteína myc foi positiva no citoplasma em 24,2% e no núcleo em 42,9% dos casos. A expressão citoplasmática negativa foi significativamente mais frequente nos tumores gástricos do tipo intestinal. A expressão nuclear da proteína myc não apresentou relação com as variáveis em estudo.

A razão de chances de expressão negativa da proteína myc no citoplasma foi significativa nos tumores gástricos do tipo intestinal de Lauren e no adenocarcinoma gástrico com metástases linfonodais. A razão de chances da proteína myc no núcleo das células neoplásicas mostrou expressão significativamente positiva nos tumores com margens cirúrgicas livres de comprometimento tumoral.

5.4 Considerações finais

Vários fatores podem ter contribuído para a identificação de resultados discrepantes da literatura. O tamanho da amostra, por exemplo, embora pareça adequado (72 doentes), quando subdividido nas várias variáveis, muitas vezes, o número tornava-se reduzido, o que dificultou a análise estatística. Os resultados sem significância poderiam tê-la atingido, se a casuística fosse maior.

Na tentativa de minimizar os vieses e encontrar significância, trabalhamos com dois testes estatísticos: teste exato de Fisher e *odds ratio*. Em algumas situações encontramos resultados com diferenças, porém, não significantes no teste exato de Fisher e esses mesmos resultados alcançaram significância no teste de *odds ratio* ou razão de chances.

Na utilização do método imuno-histoquímico, a expressão da proteína indica que a proteína existe no citoplasma ou no núcleo, mas não foi possível afirmar se ela está funcionando. Além disso, processos epigenéticos podem alterar a estrutura da proteína impedindo o seu funcionamento e as mutações genéticas podem produzir uma proteína não funcionante.

O grau elevado de expressão de proteínas da via canônica mostra a importância dessas proteínas e dessa via de sinalização celular na gênese do carcinoma gástrico. Há necessidade de mais estudos para a localização das mutações nos genes envolvidos de mutação e das alterações epigenéticas que permitam o desenvolvimento de novos quimioterápicos com objetivo terapêutico para o carcinoma gástrico.

As expressões das proteínas da via de sinalização que apresentaram relação com as variáveis estudadas sugerem que elas podem estar envolvidas na carcinogênese do adenocarcinoma gástrico e esse resultado, tomado em seu conjunto, cria perspectiva de novos estudos para esclarecer o envolvimento da via Wnt no surgimento do adenocarcinoma gástrico.

As terapias atuais de câncer frequentemente envolvem toxicidade grave devido aos efeitos gerais em todas as células que rapidamente se dividem. Identificação de alvos celulares candidatos a modalidades mais específicas de tratamento do câncer dependem de mecanismos de ação que podem utilizar tecnologia baseada em genes com chips, revelando padrões de assinatura de característica transcricional de ativação das vias de sinalização Wnt. Entretanto, aspecto crítico da terapia baseada no bloqueio da ativação dessas vias é se adultos tolerariam a inibição das vias de sinalização Wnt. Isto seria o caso se a tumorigênese representasse a ativação aberrante das vias de sinalização que normalmente são necessárias apenas durante o desenvolvimento embrionário. Entretanto, evidências sugerem que essas vias controlam a padronização e o crescimento dos tecidos adultos. Pesquisas adicionais são necessárias para determinar se a atividade contínua das vias de sinalização é necessária para os tecidos normais e neoplásicos, e se essas condições diferem suficientemente para permitir uma intervenção terapêutica.⁹⁸⁻¹⁰³

Foi proposto que o processo maligno é determinado em todos os tecidos pela desregulação do conjunto comum de funções celulares que controlam o crescimento produzindo proliferação celular, apoptose, invasão e angiogênese. A alta frequência de mutações nas vias Wnt em tipo tumores específicos sugere que a potência transcricional ativada dessas vias altera eficientemente as funções múltiplas regulatórias do crescimento. Mas a escala restrita de tipos de tumores associados com mutações nas vias Wnt questiona se a iniciação da tumorigênese

necessita de outros fatores característicos do estado de diferenciação da célula alvo. Agentes terapêuticos para o tratamento de tais tumores, consequentemente, podem atingir não somente os componentes das vias de sinalização, mas também outros alvos de transcrição crítica das vias Wnt ou, então, proteínas que cooperam com essas vias para desregular o crescimento.⁹⁹⁻¹⁰¹

Indubitavelmente, as mutações genéticas que ocorreram na célula maligna são irreversíveis; mas se for possível identificar e desligar cascatas das vias de crescimento ativado, talvez possamos direcionar essas células mutadas para a apoptose ou potencializar a sua sensibilidade para a quimioterapia e radioterapia antineoplásicas convencionais. Essas abordagens podem levar a novas e mais eficazes terapias para o câncer.

Os discernimentos que estão emergindo dos estudos estão esboçando um quadro de desenvolvimento de fatores que controlam o comportamento de células individuais nas condições fisiológicas e no câncer. Aparentemente, o processo de transformação maligna utiliza reguladores fisiológicos cruciais do epitélio intestinal normal como estratégia para abrir a mais eficiente estrada para o câncer. O processo maligno que emerge em outros tecidos autorenovadores pode explorar estratégias similares. Os estudos da fisiologia molecular do processo de autorenovação do epitélio digestivo devem, basicamente, permitir o desenho de moldes sofisticados de interferência terapêutica na doença maligna gastrointestinal.

6 CONCLUSÕES

Nas condições desse estudo, em relação à expressão das proteínas analisadas nos doentes com adenocarcinoma gástrico, os resultados obtidos permitiram concluir que:

- 1 - A forte expressão de proteínas da via de sinalização celular Wnt canônica sugere o seu envolvimento na carcinogênese do adenocarcinoma gástrico.
- 2 - Houve relação da expressão positiva de proteínas da via de sinalização celular canônica Wnt com os tumores do tipo intestinal da classificação de Lauren, aqueles menos avançados da classificação TNM, com margens livres de comprometimento tumoral e com os moderadamente e bem diferenciados.
- 3 - A fraca expressão de proteínas da via de sinalização celular Wnt não canônica e a ausência de relação da expressão positiva com as variáveis epidemiológicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor sugerem que essa via pode ter uma baixa participação no aparecimento do adenocarcinoma gástrico.

7 REFERÊNCIAS

- 1- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013 [cited 2017 Mar 15]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.

- 2- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. 2003;22(53):8581–9.

- 3- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativa 2016: incidências do câncer no Brasil [Internet]. INCA; 2016 [citado 2017 Mar 15]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/dncc>.

- 4- van der Woude CJ, Kleibeuker JH, Tiebosch AT, Homan M, Beuving A, Jansen PL, et al. Diffuse and intestinal type gastric carcinomas differ in their expression of apoptosis related proteins. *J Clin Pathol*. 2003;56(9):699-702.

- 5- Ernst PB, Peura DA, Crowe SE. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. *Gastroenterology*. 2006;130(1):188–206.

- 6- Figueiredo C, Garcia-Gonzalez MA, Machado JC. Molecular pathogenesis of gastric cancer. *Helicobacter*. 2013;18 Suppl.1:28-33.

- 7 - Conteduca V, Sansonno D, Lauletta G, Russi S, Ingravallo G, Dammacco F. H. *pylori* infection and gastric cancer: state of the art (review). *Int J Oncol*. 2013;42(1):5-18.

- 8 -Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(4):1457–62.

- 9 - Lauren P. The Two Histological Main Types Of Gastric Carcinoma: Diffuse And So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt At A Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.
- 10 - Ooi CH, Ivanova T, Wu J, Lee M, Tan IB, Tao J, et al. Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer. *PLoS Genet*. 2009;5(10):e1000676.
- 11 – Ilyas M. Wnt signaling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol*. 2005;205(2):130-44
- 12- Zheng H, Takahashi H, Muray Y, Cui Z, Nomoto k, Miwa S, et al. Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray. *J Clin Pathol*. 2007;60(3):273-7.
- 13 – Cheng X, Wang Z, Chen X, Sun Y, Kong KY, Liu J, et al. Correlation of Wnt 2 expression and B catenin intracellular accumulation in Chinese gastric cancers: relevance with tumour dissemination. *Cancer Lett*. 2005; 223(2):339-47
- 14- Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF. Genetic pathways in colorectal and others cancers. *Eur J Cancer*. 1999;35(14):1986-2002.
- 15- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5):759-67.
- 16- White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal. *Gastroenterology*. 2012;142(2):219-32.
- 17- Chiurillo MA. Role of the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review. *World J Exp Med*. 2015;5(2):84–102.
- 18- Rijisewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the

segment polarity gene wingless. *Cell*. 1987;50(4):649-57.

19- Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, et al . A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*. 1991; 64(2):231.

20- McMahon AP. The Wnt family of development regulators. *Trends Genet*. 1992;8(7):236-42

21- Miller JR. The Wnts. *Genome Biol*. 2002;3(1):Reviews3001.

22- Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon: functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*. 2003;5(3):367-77.

23- Topol L, Jiang X, Choi H, Garret–Beal L, Carolan PJ, Yang Y. Wnt 5a inhibits the canonical wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J cell Biol*. 2003;162(5):899-908.

24- Habas R. Canonical Wnt signaling: an unexpected new player. *Dev Cell*. 2006;11(2):138-9.

25 –Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki Y, et al. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric câncer. *Oncogene*. 2007;26(32):4699-713.

26- McDonald SL, Silver A. The opposing roles of Wnt-5a in cancer. *Br J Cancer*. 2009;101(2):209-14.

27- Gaver N, Bent-Ze'ev A. beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem*. 2007;102(4):820-8.

28- Ramos RF, Oshima CT, Gomes TS, Mader AM, Alves CD, Waisberg J. Immunohistochemical study of the canonical and non-canonical Wnt signaling

pathway in colorectal carcinoma and non-neoplastic mucosa. *J Coloproctol.* 2015;35(3):156–61.

29- Katoh M. Frequent up-regulation of WNT2 in primary gastric cancer and colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2001;19(5):1003-7.

30- Kanzawa M, Semba S, Hara S, Itoh T, Yokozaki H. WNT5A is a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human gastric carcinoma cells. *Pathobiology.* 2013;80(5):235-44.

31- Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, et al. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res.* 2006;66(21):10439-48.

32 - Dejmek J, Dejmek A, Säfholm A, Sjölander A, Anderson T. Wnt-5a protein expression in primary Dukes B colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis. *Cancer Res.* 2005;65(20):9142–6.

33 – Blagodatski A, Poteryaev D, Katanaev VL. Targeting the wnt pathways for therapies. *Mol Cell Ther.* 2014;2(28):1-15.

34 – Vinson CR, Conover S, Adler PN. A drosophila tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature.* 1989;338(6212):263-4.

35 – Katanaev VL, Ponzielle R, Sémériva M, Tomlinson A. Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in Drosophila. *Cell.* 2005;120(1):111-22.

36 – Burns CJ, Zhang J, Brown EC, Van Bibber AM, Van Es J, Clevers H, et al. Investigation of Frizzled-5 during embryonic neural development in mouse. *Dev Dyn.* 2008;237(6):1614–26.

- 37 – Kim S, Lee J, Hong ME, Do IG, Kang SY, Ha SY, et al. High-throughput sequencing and copy number variation detection using formalin fixed embedded tissue in metastatic gastric cancer. *PLoS One*. 2014;9(11):e111693.
- 38 – Kim MS, Kim SS, Ahn CH, Yoo NJ, Lee SH. Frameshift mutations of Wnt pathway genes AXIN2 and TCF7L2 in gastric carcinomas with high microsatellite instability. *Hum Pathol*. 2009;40(1):58–64.
- 39 - Jin LH, Shao QJ, Luo W, Ye Zy, Li Q, Lin SC. Detection of point mutations of the axin1 gene in colorectal cancers. *Int J Cancer*. 2003;107(5):696–9.
- 40 - Webster MT, Rozycka M, Sara E, Davis E, Smalley M, Young N, et al. Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosome Cancer*. 2000;28(4):443–53.
- 41- Ayed-Guerfali DB, Hassairi B, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Expression of APC, β -catenin and E-cadherin in Tunisian patients with gastric adenocarcinoma: clinical significance. *Tumour Biol*. 2014 ;35(3):1775-83.
- 42- Knippschild U, Wolff S, Giamas G, Brockschmidt C, Wittau M, Wörl PU, et al. The role of the casein kinase 1 (CK-1) family in different signaling pathways linked to cancer development. *Onkologie*. 2005;28(10):508–14.
- 43 - Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J*. 1990; 9(8):2431-8.
- 44 - Kawazoe H, Bilim VN, Ugolkov AV, Yuuki K, Naito S, Nagaoka A, et al. GSK-3 inhibition in vitro and in vivo enhances antitumor effect of sorafenib in renal cell carcinoma (RCC). *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;423(3):490-5.

- 45 - McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Sokolosky M, Abrams SL, et al. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget*. 2014;5(10):2881-911.
- 46 – Chen D, Dou QP. The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention. *Curr Protein Pept Sci*. 2010;11(6):459-70.
- 47 – Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999;398(6726):422–6.
- 48 –Kumari S, Puneet PS, Yadav SS, Kumar M, Khanna A, Dixit VK, et al. Cyclin D1 and Cyclin E2 are differentially expressed in gastric cancer. *Med Oncol*. 2016;33(5):40.
- 49- Prochownik EV, Vogt PK. Therapeutic Targeting of Myc. *Genes Cancer*. 2010;1(6):650-9.
- 50- Faria MH, Rabenhorst SH. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. *Rev Bras Cancerol*. 2006;52(2):165-71.
- 51 - Georgakopoulos G, Tsiambas E, Korkolopoulos P, Kavantzias N, Karameris A, Ragkos V, et al. c-MYC and h-TERT co-expression in colon adenocarcinoma: a tissue microarray digitized image analysis. *J BUON*. 2013;18(1):124-30.
- 52 - Liu X, Yu H, Cai H, Wang Y. Expression of CD24, p21, p53, and c-myc in alpha-fetoprotein-producing gastric cancer: Correlation with clinicopathologic characteristics and survival. *J Surg Oncol*. 2014;109(8):859-64.
- 53 - Lins RR, Oshima CT, Oliveira LA, Silva MS, Mader AM, Waisberg J. Expression of E-cadherin and WNT pathway proteins betacatenin, APC, TCF-4 and survivin in gastric adenocarcinoma: clinical and pathological implication. *Arq Bras Cir Dig*. 2016;29(4):227–31.

- 54 – Mohammed MK, Shao C, Wang J, Wei Q, Wang X, Collier Z, et al. Wnt/ B catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance. *Genes Dis.* 2016;3(1):11-40.
- 55 – Clevers H, Loh KM, Nusse R. Stem cell sinaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science.* 2014;346(6205):1248012.
- 56 – Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(12):767-79.
- 57 – Anastas JN, Moon RT. Wnt signaling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(1):11-26
- 58 – Yang K, Wang X, Zhang H, Wang Z, Nan G, Li Y, et al. The evolving roles of canonical wnt signaling in stem cell and tumorigenesis: implications in target cancer therapies. *Lab Investig.* 2016;96(2):116-36.
- 59 – Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(5):a008052.doi:10.1101
- 60 – Munemitsu S, Albert L, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(7):3046-50.
- 61 – Geyer FC, Lacroix-Triki M, Savage K, Arnedos M, Lambros MB, Makay A, et al. Beta catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Mod Pathol.* 2011;24(2):209-31.
- 62 – Kola L, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(8):711-5.

63 – Hutchings CJ, Koglin M, Marshall FH. Therapeutic antibodies directed at G protein–coupled receptors. *MAbs*. 2010;2(6):594-606.

64 –Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Sato Y, Ferreira SS, et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;43(1):55-60

65- Hernandez BY, Frierson HF, Moskaluk CA, Li YJ, Clegg L, Cote TR, et al. CK 20 and CK7 protein expression in colorectal cancer: demonstration of the utility of a population based tissue microarray. *Human Pathol*. 2005;36(3):275-81.

66 – Silva LC. Imunoexpressão de Smac/DIABLO, AIF e citocromo c em tecidos de adenocarcinoma gástrico preparados em arranjo tecidual em matriz (ATM) [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina; 2012.

67 – Oshima CT, Iriya K, Forones NM. Ki 67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer. *Neoplasma*. 2005;52(5):420-4.

68 - Lazar D, Tăban S, Ardeleanu C, Dema A, Sporea I, Cornianu M, et al. The immunohistochemical expression of E-cadherin in gastric cancer; correlations with clinicopathological factors and patients' survival. *Rom J Morphol Embryol*. 2008;49(4):459–67.

69 – Shintani M, Sangawa A, Yamao N, Kamoshida S. Smac/DIABLO expression in human gastrointestinal carcinoma: association with clinicopathological parameters and survivin expression. *Oncol Lett*. 2014;8(6):2581–6.

70 – Anbiaee R, Mojir Sheibani K, Torbati P, Jaam H. Abnormal expression of e-cadherin in gastric adenocarcinoma, and Its correlation with tumor histopathology and helicobacter pylori infection. *Iran Red Crescent Med J*. 2013;15(3):218–22.

71 – Song KY, Jung CK, Park WS, Park CH. Expression of the antiapoptosis gene survivin predicts poor prognosis of stage III gastric adenocarcinoma. *Jpn J Clin*

Oncol. 2009;39(5):290–6.

72– Martensson A, Oberg A, Jung A, Cederquist K, Stenling R, Palmqvist R, et al . Beta-catenin expression in relation to genetic instability and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2007;17(2):447-52.

73 – Wanitsuwan W. Kanngurn S, Boonpipattanapong T, Sanqthong R, Sanqkhthat S. Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. *World J Gastroenterol.* 2008;14(39):6052-9

74 – Elzagheid A, Buhmeida A, Korkeila E, Collar Y, Syrjanen K, Pyrhonen S. Nuclear beta-catenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008;14(24):3866-71.

75 – Ishimoto T, Oshima H, Oshima M, Kai K, Torii R, Masuko T et al. Cd44+ Slow cycling tumor cell expansion is triggered by cooperative actions of Wnt and prostaglandin E2 in gastric tumorigenesis. *Cancer Sci.* 2010;101(3):673-8.

76 – Cai C, Zhu X. The Wnt/beta –catenin pathway regulates self renewal of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *Mod Med Rep.* 2012;5(5):1191-6.

77 – Benhaj K, Akcali KC, Ozturk M. Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines. *Oncol Rep.* 2006;15(3):701-7.

78 – Peng C, Zhang X, Yu H, Wu D, Zheng J. Wnt5 a as a predictor in poor clinical outcome of patients and a mediator in chemoresistance of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2011;21(2):280-8.

79– Badiglian Filho L, Oshima CT, De Oliveira Lima F, De Oliveira Costa H, de Sousa Damião R, Gomes TS, Gonçalves WJ. Canonical and noncanonical Wnt pathway: a comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2009;21(2):313-20.

- 80 – Ara H, Takagishi M, Enomoto A, Asai M, Ushida K, Asai N, et al. Role for Daple in non-canonical Wnt signaling during gastric cancer invasion and metastasis. *Cancer Sci.* 2016;107(2):133-9.
- 81 – Shojima K, Sato A, Hanaki H, Tsujimoto I, Nakamura M, Hattori K, et al. Wnt5a promotes cancer cell invasion and proliferation by receptor – mediated endocytosis-dependent and independent mechanisms, respectively. *Sci Rep.* 2015;5:8042.
- 82 – Yamamoto H, Kitadai Y, Yamamoto T, Que N, Ohdan H, Yasui W, Kikuchi A. Laminin gamma2 mediates Wnt5a induced invasion of gastric cancer cells. *Gastroenterology.* 2009;137:242-52.
- 83 – Hanaki H, Yamamoto H, Sakane H, Matsumoto S, Ohdan H, Sato A, Kikuchi A. An anti-Wnt5a antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells in vivo by inhibiting receptor-mediated endocytosis. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(2):298-307.
- 84 – Zhang Y, Du J, Zheng J, Liu J, Xu R, Shen T, et al. EGF- reduced Wnt5a transcription induces epithelial-mesenchymal transition via Arf6-ERK signaling in gastric cancer. *Oncotarget.* 2015;6(9):7244-61.
- 85 – Vider BZ, Zimmer A, Chastre E, Prevot S, Gespach C, Estlein D et al. Evidence for the involvement of the Wnt 2 gene in human colorectal cancer. *Oncogene.* 1996;12(1):153-8.
- 86 – You XJ, Bryant PJ, Jurnak F, Holcombe RF. Expression of Wnt pathway components frizzled and disheveled in colon cancer arising in patients with inflammatory bowel disease. *Oncol Rep.* 2007;18(3):691-4.
- 87 – Menezes MP, Oshima CT, Badiglian Filho L, Gomes TS, Barrezueta LF, Stavale JN, et al. Vias Wnt canônica e não canônica: uma comparação entre o cancer endometrial tipo I e o endométrio atrófico no Brasil. *São Paulo Med J.* 2011;129(5):320-4.

- 88 – Cho YJ, Kim JH, Yoon J, Cho SJ, Ko YS, Park JW, et al. Constitutive activation of glycogen synthase kinase 3 β correlates with better prognosis and cyclin-dependent kinase inhibitors in human gastric cancer. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:91.
- 89 – Tang X, Zheng D, Hu P, Zheng Z, Li M, Tucker L, et al. Glycogen synthase kinase 3 β inhibits microRNA-183-96-182 cluster via the β -catenin/TCF/LEF-1 pathway in gastric cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(5):2988-98.
- 90 – Mazzone SM, Fearon ER. AXIN1 and AXIN2 variants in gastrointestinal cancers. *Cancer Lett.* 2014;355(1):1-8.
- 91 - Pan KF, Liu WG, Zhang L, You WC, Lu YY. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2008;14(10):1570-4.
- 92 – Hong CS, Jeong O, Piao Z, Guo C, Jung MR, Choi C, Park YK. HOXB5 induces invasion and migration through direct transcriptional upregulation of β -catenin in human gastric carcinoma. *Biochem J.* 2015;472(3):393-403.
- 93 – Bourroul GM. Imunoexpressão da proteína ubiquitina no carcinoma colorretal e na mucosa colorretal adjacente não neoplásica e sua relação com os aspectos clínico patológicos [Tese]. São Paulo: Instituto de Assistência médica ao Servidor Público Estadual, IAMSPE; 2013.
- 94 – Li-Chang HH, Kasaian K, Ng Y, Lum A, Kong E, Lim H, et al. Retrospective review using targeted deep sequencing reveals mutational differences between gastroesophageal junction and gastric carcinomas. *BMC Cancer.* 2015;15:32.
- 95 – Arici DS, Tuncer E, Ozer H, Simek G, Koyuncu A. Expression of retinoblastoma and cyclin D1 in gastric carcinoma. *Neoplasma.* 2009;56(1):63-7.

96 – Khaleghian M, Jahanzad I, Shakoori A, Emami Razavi A, Azimi C. Association Between Amplification and Expression of C-MYC Gene and Clinicopathological Characteristics of Stomach Cancer. *Iran Red Crescent Med J.* 2016;18(2):e21221.

97 – Calcagno DQ, Freitas VM, Leal MF, de Souza CR, Demachki S, Montenegro R, et al. MYC, FBXW7 and TP53 copy number variation and expression in gastric cancer. *BMC Gastroenterol.* 2013;13:141.

98 – Huang M, Chen C, Geng J, Han D, Wang T, Xie T, Wang L, Wang Y, Wang CH, Lei Z, Chu X. Targeting KDM1A attenuates Wnt/ β -catenin signaling pathway to eliminate sorafenib-resistant stem-like cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2017 Apr 1. pii: S0304-3835(17)30220-3. doi: 10.1016/j.canlet.2017.03.038. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28377178.

99 - Thorvaldsen TE. Targeting Tankyrase to Fight WNT-dependent Tumours. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017 Apr 2. doi: 10.1111/bcpt.12786. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28371398.

100 - Wang C, Yue Y, Shao B, Qiu Z, Mu J, Tang J, et al. Han Dickkopf-Related Protein 2 is Epigenetically Inactivated and Suppresses Colorectal Cancer Growth and Tumor Metastasis by Antagonizing Wnt/ β -Catenin Signaling. *Cell Physiol Biochem.* 2017 Mar 30;41(5):1709-1724. doi: 10.1159/000471861. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28365691.

101 - Bhuvanalakshmi G, Basappa, Rangappa KS, Dharmarajan A, Sethi G, Kumar AP, Warriar S. Breast Cancer Stem-Like Cells Are Inhibited by Diosgenin, a Steroidal Saponin, by the Attenuation of the Wnt β -Catenin Signaling via the Wnt Antagonist Secreted Frizzled Related Protein-4. *Front Pharmacol.* 2017;8:124.

102 - Zhou H, Mak PY, Mu H, Mak DH, Zeng Z, Cortes J, et al. Combined inhibition of β -catenin and Bcr-Abl synergistically targets tyrosinekinase inhibitor-resistant blast crisis chronic myeloid leukemia blasts and progenitors in vitro and in vivo. *Leukemia.*

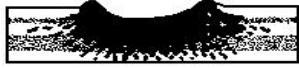
2017 Mar 21. doi:10.1038/leu.2017.87. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28321124.

103 - Martinez-Font E, Felipe-Abrio I, Calabuig-Fariñas S, Ramos RF, Terrasa J, Vögler O, et al. Disruption of TCF/ β -catenin binding impairs Wnt signalling and induces apoptosis in soft tissue sarcoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2017 Mar 14. pii: molcanther.0585.2016. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0585. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28292937.

ANEXOS

Anexo 1

Classificação das lesões neoplásicas do estômago segundo Borrmann

Borrmann I - Lesão polipóide ou vegetante, bem delimitada.	
Borrmann II - Lesão ulcerada, bem delimitada, de bordas elevadas.	
Borrmann III - Lesão ulcerada, infiltrativa em parte ou em todas as suas bordas.	
Borrmann IV - Lesão difusamente infiltrativa, não se notando limite entre o tumor e a mucosa normal.	

Estadiamento do carcinoma gástrico pela classificação TNM de acordo com a UICC

- T1- Tumor invade a mucosa e a submucosa
- T2 – Tumor invade a muscularis própria
- T3 – Tumor invade a serosa
- T4 – Tumor invade estruturas adjacentes
- N0 - Linfonodos não comprometidos
- N1- Metástases em 1 a 6 linfonodos
- N2 – Metástases em 7 a 15 linfonodos
- N3 – Metástases em mais de 15 linfonodos
- M0 – Ausência de metástases à distância
- M1 – Metástase à distância

Anexo 2 - Dados epidemiológicos e anatomopatológicos dos doentes operados de adenocarcinoma gástrico

TMA	IDADE (ANOS)	SEXO	LOCAL	TAM. (cm)	CLAS. LAUREN	GRAU DIF	T	N	VEN	LINF	PERIN
1a	61	M	Antro	5,5	Intestinal	Moderado	3	0	N	N	N
2a	67	M	Antro	6,8	Intestinal	Pouco	3	1	S	S	S
3a	63	M	Piloro	4	Intestinal	Pouco	3	0	S	S	S
4a	58	F	Antro	16	Intestinal	Pouco	3	1	N	S	N
5a	76	M	Antro	4	Intestinal	Moderado	2	0	N	N	N
6a	60	F	Corpo	2,5	Intestinal	Moderado	2	2	N	S	N
7a = 5f											
8a	66	M	Corpo	9	Intestinal	Moderado	4	1	N	S	S
9a	45	M	Corpo	9,5	Intestinal	Pouco	3	2	N	S	S
10a	53	F	Corpo	3,5	Intestinal	Moderado	3	1	N	S	S
1b	55	F	Antro	7,5	Difuso	99	3	1	N	N	N
2b	59	M	Antro	2	Intestinal	Pouco	2	0	N	N	N
3b	73	M	Corpo	10	Intestinal	Pouco	3	0	S	S	S
4b	59	M	Corpo	8	Difuso	Pouco	4	3	S	S	S
5b	63	M	Fundo	4	Intestinal	Moderado	4	1	N	S	S
6b	65	F	Antro	5	Intestinal	Moderado	3	0	N	N	N
7b	45	M	Corpo	9	Difuso	Pouco	3	2	N	S	S
8b	72	M	Corpo	16	Intestinal	Moderado	3	1	S	S	S
9b-rim											
10b	65	M	Corpo	3,5	Intestinal	Moderado	2	0	N	N	N
1c	59	F	Corpo	7	Difuso	Pouco	4	1	N	S	S
2c	65	M	Corpo	5,8	Intestinal	Pouco	3	2	S	S	S
3c	80	F	Corpo	4	Intestinal	Moderado	3	1	S	S	S
4c	37	M	Antro	6	Difuso	Pouco	3	2	N	N	S
5c	68	F	Corpo	4,5	Difuso	Pouco	2	1	N	N	N
6c	49	M	Antro	4	Difuso	Pouco	4	3	S	S	S
7c	41	F	Corpo	7	Difuso	Pouco	3	2	S	S	S
8c											
9c	76	M	Corpo	2	Intestinal	Moderado	3	0	N	N	S
10c	79	M	Corpo	3	Difuso	Moderado	3	1	N	N	N
1d	54	M	Corpo	4	Intestinal	Pouco	3	1	S	S	S
2d	62	M	TEG	7	Intestinal	Moderado	3	1	N	S	N
3d	56	M	Corpo	1,5	Intestinal	Moderado	1	1	N	N	S
4d	75	M	Fundo	3	Intestinal	Moderado	4	1	S	S	N
5d	88	F	Corpo	3,5	Intestinal	Moderado	3	1	N	S	S
6d	60	F	Antro	5,5	Intestinal	Moderado	2	1	N	S	S
7d	76	M	Corpo	8,4	Intestinal	Pouco	3	0	N	N	S
8d	77	M	Antro	8,3	Intestinal	Moderado	3	1	S	S	N
9d	85	M	Corpo	5,5	Difuso	Pouco	2	0	N	N	N
10d	55	M	Corpo	6	Difuso	Pouco	4	1	S	S	S
1e	57	F	Corpo	10	Difuso	Pouco	3	3	N	S	S
2e	69	F	Corpo	15	Difuso	Pouco	3	1	N	N	S
3e	77	F	Corpo	8	Difuso	Moderado	2	1	N	S	N
4e	74	F	Fundo	9,5	Intestinal	99	2	1	2	1	1
5e	83	M	Antro	3,5	Intestinal	Moderado	2	0	S	S	N
6e	51	M	Corpo	99	Intestinal	99	4	0	4	0	0
7e	58	M	Antro	8	Intestinal	Moderado	3	1	N	N	S
8e	86	F	Corpo	2	Intestinal	Moderado	3	0	S	S	N
9e	77	F	Antro	7	Intestinal	Moderado	3	1	N	N	S
10e	53	M	Corpo	4	Difuso	Pouco	2	0	S	S	S
1f	78	F	Corpo	3,5	Intestinal	Moderado	3	1	N	S	S

continua ...

... continuação e conclusão

2f	70	M	Antro	6	Intestinal	Pouco	3	1	S	S	S
3f	69	F	Antro	9	Intestinal	Moderado	3	0	N	N	N
4f	54	M	Piloro	4,5	Difuso	Moderado	3	2	S	S	S
5f = 7a	82	F	Fundo	2,5	Intestinal	Moderado	3	1	S	N	S
6f	67	F	Antro	1,5	Intestinal	Bem	1	0	N	N	N
7f	68	M	Corpo	4	Difuso	Pouco	3	1	N	N	S
8f	81	F	Antro	7,2	Intestinal	Moderado	3	2	S	S	S
9f	41	M	Corpo	2,7	Intestinal	Pouco	1	0	N	N	S
10f	57	M	Antro	7	Difuso	Pouco	4	0	N	N	S
1g	67	F	Corpo	4	Intestinal	Bem	2	0	N	N	N
2g	71	M	Corpo	9	Intestinal	Pouco	3	0	N	S	N
3g	71	M	Corpo	2,5	Intestinal	Pouco	3	0	N	N	S
4g	54	M	TEG	6,5	Difuso	Moderado	4	1	N	S	S
5g	66	M	Antro	4	Intestinal	Bem	is	0	N	N	N
6g	73	F	Antro	8	Intestinal	Moderado	3	1	N	N	N
7g	64	M	Antro	4	Intestinal	Pouco	3	0	S	S	S
8g	55	M	Antro	6	Difuso	Pouco	2	1	N	S	S
9g	70	M	Fundo	5,5	Intestinal	Pouco	3	1	S	S	S
10g	68	M	Corpo	12	Intestinal	Moderado	3	1	N	N	N
1h	40	M	Corpo	2	Difuso	Moderado	2	1	S	S	N
2h	59	F	Antro	4	Difuso	Moderado	2	0	N	N	S
3h	82	F	Corpo	6,5	Intestinal	Moderado	2	1	N	N	N
4h	52	M	Corpo	7	Intestinal	Moderado	3	0	N	N	S

Anexos 3 - Autorizações e aprovações dos comitês de ética em pesquisa (CEP)**Comitê de Ética em Pesquisa****Faculdade de Medicina do ABC**

Mantida pela Fundação do ABC

Santo André, 17 de Setembro de 2009.

PROTOCOLO CEP/FMABC, REGISTRADO SOB O Nº. 167/2009

Ilmo(a). Sr(a).

JAQUES WAISBERG

Prezado (a) Senhor (a):

Projeto de Pesquisa Intitulado: IMUNOEXPRESSÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT CANÔNICA NO CARCINOMA GÁSTRICO.

Vimos por meio desta, informar que em reunião do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do ABC, realizada em **16/09/2009**, foi **aprovado** o protocolo de pesquisa acima mencionado.

O Comitê de Ética em Pesquisa da FMABC, em obediência à Resolução 196/96, deverá encaminhar a CONEP/MS, relatórios anuais dos projetos de pesquisa que encontram-se em andamento. Solicitamos informar sobre o andamento do seu projeto anualmente isto é, se já foi concluído, suspenso ou se ainda está em andamento: neste último caso comunicar qual o tempo previsto para a conclusão do mesmo, e encaminhar breve resumo dos resultados obtidos no estudo.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos com os protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Elie Fiss
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa da FMABC

São Paulo, 07 de outubro de 2014.

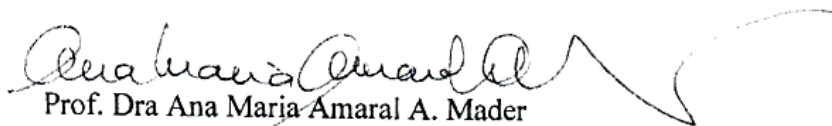
À

Comissão de Ética e Pesquisa da Unifesp

Prezados Senhores,

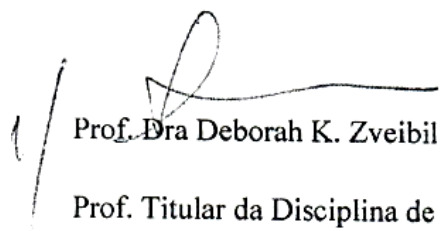
Declaro para os devidos fins que, sob prévia autorização da Prof. Dra Deborah K. Zveibil, autorizei o Prof. Dr Jaques Waisberg, a utilizar os blocos de parafina, dos casos de adenocarcinoma gástrico, provenientes do arquivo do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina do ABC, como material para realização de trabalho de pesquisa, sem qualquer prejuízo ou ônus a quem quer que seja.

Atenciosamente,



Prof. Dra Ana Maria Amaral A. Mader

Auxiliar de Ensino da Disciplina de Patologia da Faculdade de Medicina do ABC



Prof. Dra Deborah K. Zveibil

Prof. Titular da Disciplina de Patologia da Faculdade de Medicina do ABC



São Paulo, 02 de outubro de 2014.

À

Comissão de Ética e Pesquisa da UNIFESP

Prezados Senhores,

Declaro para os devidos fins, que os blocos de TMA de Carcinoma gástrico (T0304, T0305 e T0306) foram confeccionados em 08.03.12, no Laboratório LIM14 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a pedido do Prof. Jaques Waisberg.

Respeitosamente,

Prof. Dr. Venancio Avancini Ferreira Alves

Professor Titular do Depto de Patologia da Faculdade de Medicina da USP
Diretor da Divisão de Anatomia Patológica – DAP
Responsável pelo LIM 14 – Patologia Hepática
Faculdade de Medicina da USP.

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pannel imuno-histoquímico da via Wnt em tecido gástrico normal e neoplásico e sua relação com as características clínicas da amostra e com os aspectos morfológicos, topográficos e histopatológicos do tumor

Pesquisador: Levindo Alves de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46211215.0.0000.0065

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.128.919

Data da Relatoria: 24/06/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo retrospectivo utilizando a técnica de imunohistoquímica em TMAs (tissue microarrays) para avaliar o perfil de expressão de proteínas da via de sinalização WNT em câncer gástrico. Projeto tem boa fundamentação científica e objetivos claramente definidos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a imunoexpressão de proteínas da via de sinalização WNT em tecido tumoral de pacientes com câncer gástrico e em mucosa gástrica normal e correlacionar os achados imunohistoquímicos com as características clinicopatológicas dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo é retrospectivos e não oferece nenhum risco adicional aos pacientes. Será garantido sigilo e respeito à confiabilidade. Os resultados do estudo não trazem benefício direto ao sujeito da pesquisa, mas podem gerar novos conhecimentos para área com potencial aplicação futura.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo retrospectivo visando avaliar o perfil de expressão de um painel de proteínas da via de sinalização Wnt canônica e sua associação ao processo de tumorigênese gástrica. Projeto de baixo custo, exequível e se bem conduzido deve gerar novos conhecimentos para o entendimento de

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.128.919

desregulação da via Wnt em câncer gástrico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos apresentados estão de acordo com a legislação vigente.

Recomendações:

Projeto não apresenta pendências éticas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há alterações ou recomendações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 29 de Junho de 2015

Assinado por:
Roger Chammas
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

Anexos 4 - Planilhas com resultados das análises imuno-histoquímicas

Intensidade X Área = Expressão do marcador. Se ≥ 4 positivo e se <4 negativo

Intensidade - 0 negativa, 1- fraca 2- moderada e 3- forte

Área – 0- 0 , 1 a 25%-1 , 26 a 50%- 2, 51 a 100% - 3

Resultados da Imunoexpressão da WNT 5a no Adenocarcinoma Gástrico				
TMA	CITOPLASMA		NÚCLEO	
	INTENSIDADE	Área %	INTENSIDADE	ÁREA%
1a	1	3	0	0
2a	1	3	0	0
3a	1	3	0	0
4a	1	3	0	0
5a	1	3	0	0
6a	1	3	0	0
7a = 5f	1	3	0	0
8a	1	3	0	0
9a	2	3	0	0
10a	1	1	2	3
1b	0			
2b	1	1	2	2
3b	1	1	2	3
4b	1	1	0	0
5b	1	1	2	2
6b	1	1	0	0
7b	1	1	0	0
8b	1	1	0	0
9b – rim	2	1	0	0
10b	2	3	0	0
1c	1	1	0	0
2c	3	3	0	0
3c	2	2	0	0
4c	1	1	0	0
5c	2	1	0	0
6c	2	3	0	0
7c	1	1	0	0
8c	1	1	0	0
9c	2	3	0	0
10c	2	3	0	0
1d	0		0	0
2d	2	3	0	0
3d	0	0	0	0
4d	0	0	0	0
5d	2	3	0	0
6d	2	3	0	0
7d	2	3	0	0
8d	2	3	0	0
9d	2	3	0	0

continua...

... continuação e conclusão

10d	2	3	0	0
1e	2	2	0	0
2e	2	3	1	3
3e	-		1	3
4e	2	3	3	1
5e	2	3	0	0
6e	2	3	0	0
7e	1	2	0	0
8e	3	3	0	0
9e	2	3	0	0
10e	2	2	3	3
1f	2	3	0	0
2f	2	2	0	0
3f	1	1	0	0
4f	1	1	0	0
5f = 7a	1	2	0	0
6f	2	1	0	0
7f	2	1	0	0
8f	2	2	0	0
9f	2	1	0	0
10f	2	1	2	3
1g	1	1	0	0
2g	2	3	0	0
3g	2	1	0	0
4g	2	3	0	0
5g	2	3	2	2
6g	1	1	0	0
7g	2	2	2	3
8g	1	1	0	0
9g	1	3	0	0
10g	2	3	0	0
1h	1	1	2	2
2h	1	1	0	0
3h	1	1	1	3
4h	1	1	0	0

Resultados da Imunoexpressão da FZ5 no Adenocarcinoma Gástrico				
	CITOPLASMA		NÚCLEO	
TMA	INTENSIDADE	Área %	INTENSIDADE	ÁREA%
1a	1	3	-0	0
2a	1	0	-0	-0
3a	0	0	-0	-0
4a	0	0	-0	-0
5a	1	3	-0	-0
6a	0	0	-0	-0
7a = 5f	0	0	-0	-0
8a	0	0	-0	-0
9a	1	3	-0	-0
10a	0	0	-0	-0
1b	0	0	-0	-0
2b	1	3	-0	-0
3b	1	3	-0	-0
4b	0	0	-0	-0
5b	0	0	-0	-0
6b	0	0	-0	-0
7b	0	0	-0	-0
8b	0	0	-0	-0
9b - rim	0	0	-0	-0
10b	0	0	-0	-0
1c	1	3	-0	-0
2c	2	2	-0	-0
3c	0	0	-0	-0
4c	0	0	-0	-0
5c	2	3	-0	-0
6c	1	3	-0	-0
7c	0	0	-0	-0
8c	0	0	-0	-0
9c	0	0	-0	-0
10c	1	3	-0	-0
1d	0	0	-0	-0
2d	0	0	-0	-0
3d	0	0	-0	-0
4d	0	0	-0	-0
5d	1	3	-0	-0
6d	1	3	-0	-0
7d	0	0	-0	-0
8d	1	3	-0	-0
9d	1	3	-0	-0
10d	0	0	-0	-0
1e	0	0	-0	-0
2e	0	0	-0	-0
3e	0	0	-0	-0
4e	1	3	-0	-0
5e	1	3	-0	-0
6e	0	0	-0	-0

continua ...

... continuação e conclusão

7e	0	0	-0	-0
8e	1	3	-0	-0
9e	1	3	-0	-0
10e	0	0	-0	-0
1f	0	0	-0	-0
2f	0	0	-0	-0
3f	0	0	-0	-0
4f	0	0	-0	-0
5f = 7a	0	0	-0	-0
6f	1	3	-0	-0
7f	1	3	-0	-0
8f	0	0	-0	-0
9f	0	0	-0	-0
10f	0	0	-0	-0
1g	0	0	-0	-0
2g	0	0	-0	-0
3g	0	0	-0	-0
4g	0	0	0-	-0
5g	0	0	0-	-0
6g	0	0	-0	-0
7g	1	3	-0	-0
8g	0	0	-0	-0
9g	0	0	-0	-0
10g	1	3	-0	-0
1h	0	0	-0	-0
2h	0	0	-0	-0
3h	0	0	-0	-0
4h	0	0	-0	0-

Resultados da Imunoexpressão da GSK3B no Adenocarcinoma Gástrico				
	CITOPLASMA		NÚCLEO	
TMA	INTENSIDADE	Área %	INTENSIDADE	ÁREA%
1a	3	3	3	3
2a	2	3	3	3
3a	2	3	3	2
4a	2	3	3	3
5a	3	3	3	3
6a	2	3	2	3
7a = 5f	2	3	3	3
8a	2	3	3	3
9a	2	3	3	3
10a	3	3	3	3
1b	2	3	3	3
2b	3	3	3	3
3b	3	3	3	3
4b	2	3	3	3
5b	2	3	3	2
6b	2	3	3	3
7b	2	3	2	3
8b	2	3	3	3
9b - rim	2	3	3	3
10b	2	3	3	3
1c	2	3	3	3
2c	2	3	3	2
3c	2	3	3	2
4c	SEM TUMOR		SEM TUMOR	
5c	SEM TUMOR		SEM TUMOR	
6c	2	3	3	3
7c	2	3	3	3
8c	SEM TUMOR		SEM TUMOR	
9c	2	3	3	3
10c	2	3	3	3
1d	3	3	3	3
2d	2	3	3	3
3d	2	3	3	3
4d	3	3	3	3
5d	3	3	3	3
6d	3	3	3	3
7d	2	3	3	3
8d	3	3	3	3
9d	3	3	3	3
10d	2	3	3	2
1e	2	3	3	3
2e	2	3	3	2
3e	2	3	3	2
4e	2	3	3	3
5e	2	3	3	3
6e	2	3	3	3

continua ...

...continuação e conclusão

7e	2	3	3	3
8e	3	3	3	3
9e	2	3	3	3
10e	2	3	3	3
1f	2	3	3	3
2f	2	3	3	2
3f	2	3	DESCOLAMENTO	
4f	2	3	3	3
5f = 7a	3	3	3	3
6f	SEM TUMOR		3	2
7f	1	3	3	2
8f	3	3	3	2
9f	2	3	SEM TUMOR	
10f	2	3	3	3
1g	3	3	3	3
2g	2	3	3	3
3g	2	3	3	2
4g	2	3	3	2
5g	DESCOLAMENTO		DESLOCAMENTO	
6g	2	3	3	3
7g	3	3	3	2
8g	1	3	2	3
9g	1	3	2	3
10g	2	3	2	3
1h	2	3	3	3
2h	2	3	3	3
3h	3	3	3	2
4h	DESCOLAMENTO		DESCOLAMENTO	

Resultados da Imunoexpressão da Axina no Adenocarcinoma Gástrico				
	CITOPLASMA		NÚCLEO	
TMA	INTENSIDADE	Área %	INTENSIDADE	ÁREA%
1a	2	3	3	3
2a	2	3	3	3
3a	2	3	3	3
4a	2	3	3	2
5a	2	3	3	2
6a	2	3	3	3
7a = 5f	2	3	3	3
8a	2	3	2	3
9a	2	3	2	3
10a	3	3	2	3
1b	1	3	3	3
2b	3	3	3	3
3b	2	3	3	3
4b	2	3	3	3
5b	2	3	3	3
6b	3	3	3	3
7b	2	3	3	3
8b	2	3	3	3
9b - rim	2	3	3	3
10b	2	3	3	3
1c	1	3	3	3
2c	2	3	3	2
3c	3	3	3	2
4c	2	3	3	3
5c	PERDA	PERDA	PERDA	PERDA
6c	3	3	3	3
7c	2	3	3	3
8c	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR
9c	2	3	3	3
10c	3	3	3	3
1d	2	3	3	3
2d	2	3	3	3
3d	3	3	3	3
4d	3	3	3	2
5d	3	3	3	2
6d	2	3	3	3
7d	2	3	3	3
8d	2	3	3	3
9d	2	3	3	2
10d	3	3	3	3
1e	2	3	3	3
2e	2	3	3	3
3e	2	3	3	3
4e	2	3	3	3
5e	3	3	3	2
6e	3	3	3	3
7e	2	3	3	3
8e	3	3	3	3

continua...

... continuação e conclusão

9e	2	3	3	3
10e	2	3	3	3
1f	3	3	3	2
2f	2	3	3	3
3f	3	3	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO
4f	3	3	3	3
5f = 7a	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	3	3
6f	3	3	3	3
7f	3	3	3	3
8f	1	3	3	2
9f	1	3	3	3
10f	3	3	3	3
1g	3	3	3	3
2g	3	3	3	2
3g	3	3	3	2
4g	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO
5g	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	3	3
6g	3	3	3	3
7g	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	2	3
8g	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	3	3
9g	3	3	3	3
10g	3	3	3	3
1h	3	3	3	3
2h	3	3	3	3
3h	3		3	2
4h	3	3	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO

Resultados da Imunoexpressão da UBIQUITINA no Adenocarcinoma Gástrico				
TMA	CITOPLASMA		NÚCLEO	
	INTENSIDADE	Área %	INTENSIDADE	ÁREA%
1a	2	3	2	3
2a	2	3	2	3
3a	2	3	2	3
4a	3	3	3	3
5a	3	3	3	3
6a	3	3	3	3
7a = 5f	3	3	3	3
8a	3	3	3	3
9a	3	3	3	3
10a	3	3	3	3
1b	1	3	1	3
2b	3	3	3	3
3b	3	3	3	3
4b	2	3	2	3
5b	3	3	3	3
6b	3	3	3	3
7b	3	3	3	3
8b	3	3	3	3
9b - rim	2	3	2	3
10b	3	3	3	3
1c	1	3	1	3
2c	3	3	3	3
3c	2	3	2	3
4c	1	3	1	3
5c	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR
6c	3	3	3	3
7c	1	3	1	3
8c	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR
9c	2	3	2	3
10c	2	3	2	3
1d	2	3	2	3
2d	3	3	3	3
3d	3	3	3	3
4d	3	3	3	3
5d	3	3	3	3
6d	3	3	3	3
7d	3	3	3	3
8d	3	3	3	3
9d	3	3	3	3
10d	3	3	3	3
1e	2	3	2	3
2e	3	3	3	3
3e	3	3	3	3
4e	3	3	3	3
5e	3	3	3	3

continua...

... continuação e conclusão

6e	3	3	3	3
7e	3	3	3	3
8e	3	3	3	3
9e	3	3	3	3
10e	SEM TUMOR	SEM TUMOR		
1f	3	3	3	3
2f	3	3	3	3
3f	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO
4f	2	3	2	3
5f = 7a	3	3	3	3
6f	2	3	2	3
7f	2	3	2	3
8f	3	3	3	3
9f	1	3	1	3
10f	2	3	2	3
1g	3	3	3	3
2g	2	3	2	3
3g	3	3	3	3
4g	3	3	3	3
5g	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO
6g	3	3	3	3
7g	3	3	3	3
8g	2	3	2	3
9g	2	3	2	3
10g	3	3	3	3
1h	3	3	3	3
2h	3	3	3	3
3h	2	3	2	3
4h	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO

Resultados da Imunoexpressão da UBIQUITINA no Adenocarcinoma Gástrico				
	CITOPLASMA		NÚCLEO	
TMA	INTENSIDADE	Área %	INTENSIDADE	ÁREA%
1a	2	3	2	3
2a	2	3	2	3
3a	2	3	2	3
4a	3	3	3	3
5a	3	3	3	3
6a	3	3	3	3
7a = 5f	3	3	3	3
8a	3	3	3	3
9a	3	3	3	3
10a	3	3	3	3
1b	1	3	1	3
2b	3	3	3	3
3b	3	3	3	3
4b	2	3	2	3
5b	3	3	3	3
6b	3	3	3	3
7b	3	3	3	3
8b	3	3	3	3
9b - rim	2	3	2	3
10b	3	3	3	3
1c	1	3	1	3
2c	3	3	3	3
3c	2	3	2	3
4c	1	3	1	3
5c	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR
6c	3	3	3	3
7c	1	3	1	3
8c	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR
9c	2	3	2	3
10c	2	3	2	3
1d	2	3	2	3
2d	3	3	3	3
3d	3	3	3	3
4d	3	3	3	3
5d	3	3	3	3
6d	3	3	3	3
7d	3	3	3	3
8d	3	3	3	3
9d	3	3	3	3
10d	3	3	3	3
1e	2	3	2	3
2e	3	3	3	3
3e	3	3	3	3
4e	3	3	3	3
5e	3	3	3	3
6e	3	3	3	3

continua...

...continuação e conclusão

7e	3	3	3	3
8e	3	3	3	3
9e	3	3	3	3
10e	SEM TUMOR	SEM TUMOR		
1f	3	3	3	3
2f	3	3	3	3
3f	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO
4f	2	3	2	3
5f = 7a	3	3	3	3
6f	2	3	2	3
7f	2	3	2	3
8f	3	3	3	3
9f	1	3	1	3
10f	2	3	2	3
1g	3	3	3	3
2g	2	3	2	3
3g	3	3	3	3
4g	3	3	3	3
5g	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO
6g	3	3	3	3
7g	3	3	3	3
8g	2	3	2	3
9g	2	3	2	3
10g	3	3	3	3
1h	3	3	3	3
2h	3	3	3	3
3h	2	3	2	3
4h	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO

Resultados da Imunoexpressão da CK1 no Adenocarcinoma Gástrico				
	CITOPLASMA		NÚCLEO	
TMA	INTENSIDADE	Área %	INTENS-IDADE	ÁREA%
1a	2	3	0--	-0
2a	2	3	-0-	-0
3a	2	3	---0	-0
4a	2	3	--0	-0
5a	3	3	--0	-0
6a	2	3	---0	-0
7a = 5f	2	3	--0	-0
8a	2	3	--0	-0
9a	2	3	--0	-0
10a	1	3	--0	-0
1b	3	3	--0	-0
2b	3	3	--0	-0
3b	2	3	--0	-0
4b	2	3	--0	-0
5b	2	3	--0	-0
6b	3	3	--0	-0
7b	1	3	--0	-0
8b	2	3	--0	-0
9b - rim	1	3	--0	-0
10b	2	3	--0	-0
1c	3	3	--0	-0
2c	2	3	--0	-0
3c	3	3	--0	-0
4c	2	3	--0	-0
5c	1	3	--0	-0
6c	1	3	--0	-0
7c	2	3	--0	-0
8c	SEM TUMOR	SEM TUMOR	--0	-0
9c	3	3	--0	-0
10c	2	3	--0	-0
1d	1	3	--0	-0
2d	2	3	--0	-0
3d	-	3	--0	-0
4d	2	3	--0	-0
5d	3	3	--0	-0
6d	3	3	--0	-0
7d	3	3	--0	-0
8d	2	3	--0	-0
9d	2	3	--0	-0
10d	3	3	--0	-0
1e	3	3	-0	-0
2e	2	3	---0	-0
3e	1	3	-0	-0
4e	2	3	-0	-0
5e	3	3	-0	-0
6e	3	3	-0	-0
7e	2	3	-0	-0
8e	2	3	-0	-0

continua...

...continuação e conclusão

9e	2	3	-0	-0
10e	3	3	-0	-0
1f	3	3	-0	-0
2f	2	3	-0	-0
3f	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO	-0	-0
4f	2	3	-0	-0
5f = 7a	3	3	-0	-0
6f	SEM TUMOR	SEM TUMOR	-0	-0
7f	3	3	-0	-0
8f	2	3	-0	-0
9f	3	3	-0	-0
10f	2	3	-0	-0
1g	3	3	-0	-0
2g	2	3	-0	-0
3g	2	3	-0	-0
4g	3	3	-0	-0
5g	2	3	-0	-0
6g	1	3	-0	-0
7g	2	3	-0	-0
8g	3	3	-0	-0
9g	NEGATIVO	NEGATIVO	-0	-0
10g	3	3	-0	-0
1h	NEGATIVO	NEGATIVO	-0	-0
2h	2	3	-0	-0
3h	3	3	-0	-0
4h	3	3	-0	-0

Resultados da Imunoexpressão da CICLINA D1 no Adenocarcinoma Gástrico				
	CITOPLASMA		NÚCLEO	
TMA	INTENSIDADE	Área %	INTENSIDADE	ÁREA%
1a	0-	-0	2	3
2a	-0	-0	3	3
3a	-0	-0	2	1
4a	-0	-0	2	3
5a	-0	-0	3	1
6a	-0	-0	-0	-0
7a = 5f	-0	-0	-0	-0
8a	-0	-0	3	2
9a	-0	-0	2	2
10a	-0	-0	-0	-0
1b	-0	-0	2	3
2b	-0	-0	3	3
3b	-0	-0	3	3
4b	-0	-0	2	3
5b	-0	-0	2	2
6b	-0	-0	3	3
7b	-0	-0	0-	-0
8b	-0	-0	3	3
9b - rim	-0	-0	-0	-0
10b	-0	-0	2	1
1c	-0	-0	2	3
2c	-0	-0	3	3
3c	-0	-0	3	1
4c	-0	-0	3	2
5c	-0	-0	SEM TUMOR	SEM TUMOR
6c	-0	-0	SEM TUMOR	SEM TUMOR
7c	-0	-0	2	1
8c	-0	-0	SEM TUMOR	SEM TUMOR
9c	-0	-0	3	3
10c	-0	-0	3	3
1d	-0	-0	1	3
2d	-0	-0	-0	-0
3d	-0	-0	3	2
4d	-0	-0	-	-0
5d	-0	-0	3	2
6d	-0	-0	2	1
7d	-0	-0	3	2
8d	-0	-0	3	3
9d	-0	-0	3	3
10d	-0	-0	1	2
1e	-0	-0	3	1
2e	-0	-0	1	1
3e	-0	-0	1	2
4e	-0	-0	3	3
5e	-0	-0	3	3
6e	-0	-0	0-	-0
7e	-0	-0	-0	-0
8e	-0	-0	3	1

continua...

...continuação e conclusão

9e	-0	-0	2	1
10e	-0	-0	1	1
1f	-0	-0	2	1
2f	-0	-0	2	3
3f	-0	-0	DESCOLAMENTO	DESCOLAMENTO
4f	-0	-0	2	2
5f = 7a	-0	-0	2	1
6f	-0	-0	SEM TUMOR	SEM TUMOR
7f	-0	-0	3	3
8f	-0	-0	3	3
9f	-0	-0	2	3
10f	-0	-0	-0	-0
1g	-0	-0	3	3
2g	-0	-0	3	3
3g	-0	-0	3	3
4g	-0	-0	3	3
5g	-0	-0	3	3
6g	-0	-0	-0	-0
7g	-0	-0	3	2
8g	-0	-0	3	1
9g	-0	-0	SEM TUMOR	SEM TUMOR
10g	-0	-0	-0	-0
1h	-0	-0	-0	-0
2h	-0	-0	1	1
3h	-0	-0	-0	-0
4h	-0	0-	SEM TUMOR	SEM TUMOR

Resultados da Imunoexpressão de myc no Adenocarcinoma Gástrico				
	CITOPLASMA		NÚCLEO	
TMA	INTENSIDADE	Área %	INTENSIDADE	ÁREA%
1a	-0		2	3
2a	-0		1	2
3a	2	3	2	2
4a	2	3	3	1
5a	1	3	3	3
6a	SEM MATERIAL	SEM MATERIAL	3	1
7a = 5f	SEM MATERIAL	SEM MATERIAL	-0	-0
8a	1	3	0	0
9a	2	3	3	0
10a	0	0	0	0
1b	0	0	0	0
2b	2	3	3	3
3b	2	3	3	0
4b	0	0	3	3
5b	2	3	3	3
6b	2	2	3	1
7b	SEM TUMOR	SEM TUMOR	2	2
8b	2	3	0	0
9b - rim	2	2	-0	-0
10b	0	0	-0	-0
1c	0	0	1	0
2c	1	3	3	2
3c	0	0	0	0
4c	0	0	1	3
5c	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR
6c	0	0	1	3
7c	0	0	2	0
8c	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR
9c	SEM TUMOR	SEM TUMOR	3	0
10c	0	0	3	3
1d	0	0	3	3
2d	0	0	0	0
3d	0	0	0	0
4d	0	0	0	0
5d	1	3	3	1
6d	0	0	0	0
7d	2	3	2	3
8d	1	3	1	0
9d	0	0	1	0
10d	0	0	2	3
1e	1	3	2	3
2e	1	3	3	0
3e	0	0	2	2
4e	2	3	2	3
5e	2	3	3	3
6e	-0	-0	2	0

continua...

...continuação e conclusão

7e	-0	-0	0	0
8e	2	3	2	1
9e	-0	-0	2	1
10e	-0	-0	1	0
1f	1	3	2	2
2f	0	0	3	0
3f	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR	SEM TUMOR
4f	-0	-0	1	0
5f = 7a	-0	-0	2	3
6f	-0	-0	2	3
7f	-0	-0	2	2
8f	2	3	2	1
9f	1	3	1	3
10f	0	0	1	3
1g	1	3	3	3
2g	-0	-0	2	0
3g	2	3	2	0
4g	3	3	3	3
5g	1	3	3	3
6g	-0	-0	0	0
7g	1	3	3	3
8g	-0	-0	3	3
9g	-0	-0	0	0
10g	2	1	2	3
1h	-0	-0	2	3
2h	-0	-0	2	3
3h	1	3	3	3
4h	-0	-0	0	0

Abstract

Objectives: The aim was to analyze the expression of proteins in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways in gastric adenocarcinoma tissue. To correlate the expression of such proteins with the patients' biodemographical characteristics and morphological and anatomopathological characteristics of the tumor. **Method:** The expression of proteins in Wnt signaling pathways (Wnt-5a, FZD5, GSK3B, axin, CK1, ubiquitin, D1 cyclin and C-MYC) was evaluated in 72 patients who underwent gastric adenocarcinoma surgery. Forty-five (64.3%) were male and the age average was 64.6 ± 11.8 years. The protein level was determined by immunohistochemistry using monoclonal antibodies in gastric tissue samples in tissue microarray. **Results:** The expression of CK1 protein was positive in cell cytoplasm and significant in tumors without compromised surgical margins ($p = 0.031$). The ubiquitin protein presented strong expression in both cell nucleus and cytoplasm and was significantly more intense in both nucleus and cytoplasm of cells of moderately and well-differentiated tumors ($p = 0.037$) and in intestinal tumors ($p = 0.031$). The D1cyclin protein was expressed only in cell nucleus and was significantly more intense in male patients' tumors ($p = 0.039$). The C-MYC protein was expressed in both cell cytoplasm and nucleus and the absence of its cytoplasmic expression was significantly higher in intestinal tumors ($p = 0.028$) and significant odds ratio ($p = 0.021$). The immunoexpressions of the Wnt-5a and Frizzled-5 proteins did not present significant differences ($p \leq 0.05$) regarding the epidemiological characteristics of the patients and anatomopathological aspects of the tumor. **Conclusions:** The strong expression of the protein of Wnt signaling pathway suggests the relevance and involvement of the canonical pathway in the occurrence of gastric adenocarcinoma. The significant absence of expression of Wnt-5a and FZD5 proteins suggests that the non-canonical pathway is not activated in gastric adenocarcinoma tissue.

Describers: Gastric neoplasms. Carcinoma. Signaling pathways. Wnt proteins. Immunohistochemistry. Signal transduction.

Bibliografia Consultada

- 1 - DeCs- Descritores em Ciências da Saúde. São Paulo: Bireme, 1996.
- 2 - Fletcher RH, Fletcher SW. Epidemiologia clínica. Elementos Essenciais. 4a .ed. Traduzido por Martins RM. São Paulo: Artmed, 2006.
- 3 - Michaelis. Dicionário de Termos Médicos Inglês-Português com Glossário Português-Inglês. São Paulo: Melhoramentos, 2007.
- 4 - Oxford dictionary 8 Ed. Oxford University Press, 2002.
- 5 - Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª ed. rev. e ampliada. São Paulo. 2005.
- 6 – Splendore A. Para que existem regras de nomenclatura genética? Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.2005;27(2):148-52