



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA DE FÁTIMA DEODATO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE UDP GLICOSE 4-EPIMERASE E β -1,4-
GALACTOSILTRANSFERASE III NO CÂNCER GÁSTRICO E SUA POSSÍVEL
ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E DE DESFECHO**

Recife

2018

MARIA DE FÁTIMA DEODATO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE UDP GLICOSE 4-EPIMERASE E B-1,4-
GALACTOSILTRANSFERASE III NO CÂNCER GÁSTRICO E SUA POSSÍVEL
ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E DE DESFECHO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biologia Química Para Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Co-orientadores: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Souza, Maria de Fátima Deodato

Avaliação da expressão de UDP Glicose 4-Epimerase e β -1,4-galactosiltransferase III no câncer gástrico e sua possível associação com parâmetros clínico-patológicos e de desfecho / Maria de Fátima Deodato Souza. – 2018.

67 f. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maira Galdino da Rocha Pitta.

Coorientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2018.

Inclui referências e apêndice.

1. Aparelho digestivo - Câncer. 2. Enzimas. 3. Marcadores biológicos de tumores. I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (Orientadora). II. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (Coorientador). III. Napoleão, Thiago Henrique (Coorientador). IV. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 – 492

MARIA DE FÁTIMA DEODATO DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE UDP GLICOSE 4-EPIMERASE E β -1,4-GALACTOSILTRANSFERASE III NO CÂNCER GÁSTRICO E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E DE DESFECHO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 08/03/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Marcela Silvestre Outtes Wanderley (Examinadora externa)
Universidade de Pernambuco

Dedico este trabalho ao meu avô Vicente Luiz (*In memoriam*), pelo incentivo constante. Tenho certeza de que onde você estiver, estará feliz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar, à Deus, pelo dom da vida, pela saúde e por capacitar-me constantemente a vislumbrar novas metas.

À minha família, em especial aos meus pais José e Josiane e aos meus irmãos Vanessa e Victor, por todo amor, apoio e incentivo recebidos. O amor de vocês me inspira a nunca desistir. Aos meus avós e tios que me incentivaram constantemente. Vocês foram de fundamental importância ao longo dessa jornada.

Ao pequeno Lucas, que me fez renascer. Você chegou para preencher ainda mais nossa vida de amor. Espero ser para você, a prova de que tudo é possível quando portamos de fé e determinação. Aos meus priminhos, por serem refúgio de amor e felicidade. Amo vocês!

À Universidade Federal de Pernambuco, aos docentes, coordenadores e secretária do PPGCB que oportunizaram a aptidão necessária para esse título.

Agradeço aos professores Moacyr Barreto e Maira Galdino, pela oportunidade de viver tamanha experiência, por todo conhecimento transmitido e orientação durante a realização desse trabalho. Sou grata por tudo!

Ao professor Thiago Napoleão, que é um grande incentivador, guiando meus primeiros passos no mundo da pesquisa.

À Marina Ferraz, pelas contribuições acerca do trabalho, pela disponibilidade e por toda dedicação.

Ao Dr. Mário Rino por toda colaboração.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar e pelas contribuições acerca do trabalho.

Aos órgãos de fomento INCT-if e CNPq.

Agradeço aos amigos da pós-graduação, aos quais não posso deixar de mencionar, Wêndeo e Jéssica, nossos caminhos se cruzaram diante de uma ideal comum. Compartilhamos muitos momentos, alegria, desafio e aprendizado. Vocês tornaram a rotina da pós-graduação sem dúvidas, melhor.

Não poderia deixar de agradecer a Mário, permanecemos juntos no decorrer de todo o trabalho. Sempre solícito, não mediu esforços em ajudar. Estendo os meus agradecimentos a Michael e a Antônio pela parceria nos experimentos.

A todos os LINATIANOS gostaria de externar minha satisfação em tê-los como colegas de trabalho.

Aos demais amigos que a vida me proporcionou, pelo apoio e incentivo constantes. A Leandro e a Caio pela parceria firmada na vida. Pelos momentos de descontração e por aturarem meus dramas. Também agradeço a Victor, Gustavo, Raquel, Leyde, Luanna e Larissa.

E por que não agradecer as adversidades da vida? Eu agradeço, elas me ensinaram a ser resiliente, a lutar e persistir pelos meus objetivos, a querer ser sempre a melhor versão de mim.

Enfim, aos que de forma direta ou indireta contribuíram para essa concretização.

A todos, meu eterno agradecimento!

“Tudo é possível àquele que crê.” (BÍBLIA, Marcos 9:23)

RESUMO

O câncer gástrico (CG) é uma doença complexa e heterogênea de difícil diagnóstico e mau prognóstico. Os biomarcadores utilizados na prática clínica não apresentam sensibilidade e especificidade para serem totalmente confiáveis. Como a glicosilação alterada das proteínas é uma característica das células neoplásicas, algumas enzimas que fazem parte deste processo apresentam-se como uma fonte promissora para novos biomarcadores. A enzima UDP glicose 4-epimerase (GALE) é uma glicosiltransferase que desempenha uma tarefa importante na manutenção dos padrões de polissacarídeos da superfície de células com crescimento acelerado. Já a β -1,4-galactosiltransferase III (B4GALT3) desempenha papéis importantes na proliferação, invasão e metástase. Nesse contexto, o presente estudo visou investigar a expressão tecidual de GALE e B4GALT3 e avaliar suas possíveis associações com parâmetros clínico-patológicos e de desfecho no câncer gástrico. Do arquivo do Serviço de Patologia do Hospital do Câncer de Pernambuco – HCP foram selecionados 71 casos de adenocarcinoma gástrico, diagnosticados entre o período de 2013 a 2016. A expressão tecidual de GALE e B4GALT3 foi avaliada por imuno-histoquímica através dos kits comerciais Easylink On, ImmPRESS™ e DAKO EnVision™. Para as análises de associação foi utilizado o teste exato de Fisher; $p < 0,05$ foi considerado significativo. Para análise de desfecho foram utilizadas curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier com Log-Rank. Setenta e um casos foram passíveis de análises para GALE dos quais 48 (67,6%) foram positivos e 23 (32,4%) negativos. A marcação tecidual de GALE foi associada ao grau histológico tumoral bem e modernamente diferenciado ($p < 0,0001$). Já para B4GALT3 70 casos estavam passíveis para análise, desses, 48 (68,6%) foram positivos e 22 (31,4%) negativos. A marcação tecidual de B4GALT3 também foi associada com o grau histológico tumoral bem e moderadamente diferenciado ($p = 0,0002$) e com os estádios (III e IV) ($p = 0,0010$). Ambas não apresentaram associações com os parâmetros de desfecho. Apesar do número amostral ter sido um fator limitante, os resultados obtidos sugerem uma possível utilização dessas enzimas como biomarcadores, uma vez que, tanto GALE quanto B4GALT3 apresentaram-se associados com padrões clínico-patológicos. De forma inédita, esse é o primeiro estudo que avaliou a expressão tecidual dessas glicomoléculas em associação aos parâmetros clínico-patológicos e de desfecho em pacientes com adenocarcinoma gástrico.

Palavras-chave: Câncer gástrico. Glicosiltransferases. Biomarcadores.

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is a complex and heterogeneous disease of difficult diagnosis and poor prognosis. The biomarkers used in clinical practice do not have sensitivity and specificity to be totally reliable. As altered glycosylation of proteins is a characteristic of neoplastic cells, some enzymes that are part of this process are a promising source for new biomarkers. The enzyme UDP glucose-4-epimerase (GALE) is a glycosyltransferase that plays an important role in maintaining the polysaccharide patterns of the surface cells with accelerated growth. B-1,4-galactosyltransferase III (B4GALT3) plays important roles in proliferation, invasion and metastasis. In this context, the present study aimed to investigate the tissue expression of GALE and B4GALT3 and to evaluate its possible associations with clinical-pathological parameters and outcome in gastric cancer. From the file of the Service of Pathology of the Pernambuco Cancer Hospital - HCP 71 cases of gastric adenocarcinoma, diagnosed between the period of 2013 to 2016, were selected. Tissue expression of GALE and B4GALT3 was assessed by immunohistochemistry using commercial Easylink On, ImmPRESS™ and DAKO EnVision™ kits. Fisher's exact test was used for association analysis; $p < 0.05$ was considered significant. Survival curves were used for the analysis of the outcome using the Kaplan-Meier method with Log-Rank. Seventy-one cases were susceptible to GALE analysis, of which 48 (67.6%) were positive and 23 (32.4%) were negative. The tissue marking of GALE was associated with a good and moderately differentiated tumor histological grade ($p < 0.0001$). For B4GALT3, 70 cases were susceptible to analysis, of which 48 (68.6%) were positive and 22 (31.4%) were negative. The tissue marking of B4GALT3 was also associated with well and moderately differentiated tumor histological grade ($p = 0.0002$) and with stages (III and IV) ($p = 0.0010$). Both had no associations with the outcome parameters. Although the sample number was a limiting factor, the results suggest a possible use of these enzymes as biomarkers, since both GALE and B4GALT3 were associated with clinical-pathological patterns. In an unprecedented way, this is the first study to evaluate the tissue expression of these glycomolecules in association with clinical-pathological parameters and outcome in patients with gastric adenocarcinoma.

Keywords: Gastric cancer. Glycosyltransferases. Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Estimativas para o câncer nos Estados Unidos em 2016. Distribuição por idade de novos casos (%), idade média no diagnóstico, número estimado de novos casos e sobrevivência relativa de 5 anos por tipo de câncer. A distribuição da idade foi demonstrada com base nos dados 2011-2012 da Associação Norte-Americana de Registros Centrais de Câncer e exclui os dados de incidência do Arkansas e Nevada. A idade média no diagnóstico e a sobrevivência relativa de 5 anos são baseadas em casos diagnosticados durante 2008-2012 e 2005-2011, respectivamente.....24
- Figura 2** - Distribuição por sexo dos dez tipos de câncer mais incidentes, exceto os casos de câncer de pele não melanoma, estimados para o biênio 2018-2019 no Brasil segundo o INCA.....25
- Figura 3** - Composição da parede do estômago. A parede do estômago é constituída por camadas: Mucosa, submucosa, muscular própria, subserosa e serosa.....27
- Figura 4** - Fatores conhecidos que aumentam o risco do desenvolvimento do câncer gástrico. A figura também representa as cinco áreas principais do estômago: cárdia, fundo, corpo, antro e piloro.....30
- Figura 5** - Fotomicrografias de adenocarcinoma gástrico, classificação de Lauren. A: Subtipo intestinal: células tumorais dispostas de forma coesa, formando estruturas glandulares (HE, 200 x). B: Subtipo difuso: infiltração de células tumorais únicas no estroma, evidenciando células em anel de sinete (HE, 400x).....32
- Figura 6** - Fluxograma com as estratégias terapêuticas para o câncer gástrico.....36
- Figura 7** - Representação de O-glicosilação e N-glicosilação em proteínas.....39

Figura 8 - Metabolismo da galactose (Via de Leloir). A enzima UDP galactose 4-epimerase, atua no terceiro passo da via catalisando de forma reversível a conversão de UDP-galactose em UDP-glucose. Também atua convertendo UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-galNAc) em UDP-Nacetilglucosamina (UDP-glcNAc).....40

Figura 9 - Representação da subunidade da estrutura de UDP-galactose 4-epimerase humana. Os limites de UDP-glucose e NADH são exibidos em representações ovais e em fivelas. O domínio N-terminal, é mostrado em azul, e o domínio C-terminal, é exibido em verde.....41

Figura 10 - Ilustração estrutural dos membros da subfamília B4GALT que compartilham semelhanças quanto á sequência. A figura demonstra o isômero de uma B4GALT catalisando a transferência de UDP-galactose (círculo vermelho) para um resíduo terminal de N-acetilglicosamina (GlcNAc) em uma glicoproteína recém-sintetizada no lúmen do complexo de Golgi.....42

Figura 11 - Fotomicrografias dos tipos histológicos evidenciados pela imuno-histoquímica de GALE. Região tubular (A), região papilar (B), região pouco diferenciada (C) e região de mucina delimitada (D) no aumento de 100x.....46

Figura 12 - Fotomicrografias de adenocarcinoma gástrico evidenciando os tipos de localização celular marcados pela enzima GALE. Citoplasmático e perinuclear (A) nuclear (B) e membranas no aumento de 400x.....47

Figura 13 - Fotomicrografias dos tipos histológicos evidenciados pela imuno-histoquímica de B4GALT3. Região tubular (A), região papilar (B), região de mal diferenciada (C) e região de mucina delimitada (D) no aumento de 100x.....51

Figura 14 - Fotomicrografias de adenocarcinoma gástrico evidenciando os tipos de localização celular marcados pela enzima B4GALT3. Nuclear (A), citoplasmática e membranas (B) no aumento de 400x.....52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Associações com os parâmetros de desfecho. Sobrevida global ($p=0,6658$) (A) e sobrevida livre da doença ($p=0,2289$) (B).....50

Gráfico 2 - Associações com os parâmetros de desfecho Associações com os parâmetros de desfecho. Sobrevida global ($p=0,5703$) (A) e sobrevida livre da doença ($p=0,6619$) (B).....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Associação entre a expressão da enzima UDP glicose 4-epimerase com as principais características clínico-patológicas classificadas pela imuno-histoquímica em amostras de adenocarcinoma gástrico.....48

Tabela 2 - Associação entre a expressão da enzima Beta 1,4galactosyltransferase 3 com as principais características clínico-patológicas classificadas pela imuno-histoquímica em amostras de adenocarcinoma gástrico.....53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação histológica do WHO para tumores gástricos. ¹ A classificação é modificada a partir da classificação histológica para tumores do WHO (2016). Já para as neoplasias endócrinas, é baseada pela classificação clínico-patológica da WHO (1984). ² Código de morfologia da Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O) (542) e a Nomenclatura Sistematizada de Medicina (http://snomed.org). O comportamento está codificado como 0 para tumores benignos, 3 para tumores malignos e 1 para comportamento não especificado, limítrofe ou incerto. A neoplasia intra-epitelial não possui um código genérico na CID-O. Os códigos CID-O estão disponíveis apenas para lesões classificadas para neoplasia glandular intravenosa grau III (8148/2) e adenocarcinoma <i>in situ</i> (8140/2).....	28
Quadro 2 - Estadiamento do câncer gástrico conforme AJCC 8ª edição.	34
Quadro 3 - Estádios patológicos do câncer gástrico conforme a AJCC 8ª edição.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	- Do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
Asn	- Do inglês, <i>asparagine</i>
B4GALT	- β -1,4-galactosiltransferase
B4GALTs	- β -1,4-galactosiltransferases
B4GALT3	- β -1,4-galactosiltransferase III
CAAE	- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CA 19.9	- Antígeno Carboidrato 19-9
CA 72.4	- Antígeno Carboidrato 72.4
CA 50	- Antígeno Carboidrato 50
CCS	- Centro de Ciências da Saúde
CEA	- Antígeno Carcinoembrionário
CF	- Cisplatina e Capecitabina
CG	- Câncer Gástrico
CID-0	- Código de Morfologia da Classificação Internacional de Doenças para Oncologia
CX	- Cisplatina e Capecitabina
C33A	- Do inglês, <i>Cervical Cancer Cell Line</i>
DAB-H ₂ O ₂	- Do inglês, <i>Peroxidase Solution</i>
EBV	- Vírus Epstein-Barr
GAL	- Galactose
GALE	- UDP glicose 4-epimerase
GALT	- Galactoquinase
GALK	- Galactose-1-fosfato uridil-transferase
GDP Man	- GDP- manose
GIST	- Tumor Estromal Gástrico
Glc	- Glicose
GTs	- Glicosiltransferases
HCP	- Hospital do Câncer de Pernambuco
HE	- Hematoxilina e Eosina
HER2	- Do inglês, <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HeLa	- Do inglês, <i>Cervical Cancer Cell Line</i>

IDH	- Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
JAK2	- Do inglês, <i>Janus Kinase 2</i>
JGCA	- Classificação Japonesa para Carcinoma Gástrico
LINAT	- Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas
MALT	- Tecido Linfóide Associado à Mucosa
miRNA	- Micro-RNA
PBS	- Tampão Fosfato-salino
PBS-BSA	- Tampão Fosfato-salino- Albumina de Soro Bovino
PDCD1LG2	- Do inglês, <i>Programmed Cell Death 1 Ligand 2</i>
PIK3CA	- Do inglês, <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
Ser/Thr	- Do inglês, <i>Serine/threonine</i>
TCGA	- Do ingles, <i>The Cancer Genome Atlas Research Network</i>
TGI	- Trato Gastrointestinal
TNM	- Classificação de Tumores Malignos
UDP-Gal	- UDP-galactose
UDP-Glc	- UDP-glicose
UDP-GalNAc	- UDP-N-acetilgalactosamina
UDP-GlcNAc	- UDP-N-acetilglicosamina
UES	- Ultrassonografia Endoscópica
UICC	- União Internacional contra o Câncer
WHO	- Do ingles, <i>World Health Organization</i>
Xil	- Xilose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 OBJETIVOS.....	22
1.1.1 Objetivo Geral.....	22
1.1.2 Objetivos Específicos.....	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 ESTATÍSTICA DO CÂNCER: UM BREVE RELATO.....	23
2.2 CÂNCER GÁSTRICO.....	26
2.3 EPIDEMIOLOGIA	26
2.4 ASPECTOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E ETIOLÓGICOS DO TUMOR GÁSTRICO	27
2.5 DIAGNÓSTICO	33
2.6 OPÇÕES TERAPÊUTICAS	36
2.7 GLICOSILAÇÃO NO CÂNCER	38
2.7.1 UDP glicose 4-epimerase.....	40
1.7.2 Beta 1,4 galactosiltransferase 3	42
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	44
3.1 AMOSTRAS CLÍNICAS	44
3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	44
3.3 ANÁLISE DE IMAGENS	45
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICAS	45
4 ANÁLISE DOS RESULTADOS	46
4.1 EXPRESSÃO TECIDUAL DE UDP GLICOSE 4-EPIMERASE EM AMOSTRAS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.....	46
4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TECIDUAL DE UDP GLICOSE 4-EPIMERASE EM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E DE DESFECHO DO CG.....	48
4.3 EXPRESSÃO TECIDUAL DE BETA 1,4 GALACTOSILTRANSFERASE 3 EM AMOSTRAS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.....	50
4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TECIDUAL DE 1,4 GALACTOSILTRANSFERASE 3 EM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E DE DESFECHO DO CG.....	52
5 DISCUSSÃO.....	55

6 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DE PESQUISA.....	66

1 INTRODUÇÃO

O câncer gástrico (CG) é uma doença complexa e heterogênea caracterizada por alterações multifatoriais. A cada ano, quase um milhão de novos casos são diagnosticados e setecentos mil pacientes morrem em todo o mundo, estabelecendo essa doença como a terceira principal causa de morte associada ao câncer (LEAL et al., 2016; SONG et al., 2016; TARAZONA et al., 2016). No Brasil, estimam-se 21.290 novos casos de câncer gástrico para cada ano do biênio 2018-2019. No Nordeste, o CG é o segundo tumor mais frequente em homens (11,17/100 mil) e o sexto mais frequente em mulheres (7,16/100 mil), excluindo-se os casos de tumores de pele não-melanoma. Para Pernambuco estimam-se 930 novos casos para 2018 (INCA,2018).

Numerosas classificações patológicas são propostas para avaliação do comportamento do tumor gástrico. (ACCESS, 2016; BERLTH et al., 2014; HU et al., 2012a). Atualmente, as duas classificações mais utilizadas são as com base nos critérios da *World Health Organization* (WHO) e nos critérios de Lauren (HU et al., 2012b;KATONA; RUSTGI, 2017).

A classificação da WHO (2010) classifica o câncer gástrico em quatro padrões histológicos: tubular, papilar, mucinoso e pouco coeso, além de variáveis histológicas incomuns (HSU et al., 2016; HU et al., 2012b). Já a classificação com base nos critérios de Lauren (1965) descrita com mais útil e aplicável ao CG, classifica esses tumores em intestinal e difuso (CHEN et al., 2016). O tipo mais frequente é o intestinal que possui maior prevalência em pacientes idosos do sexo masculino, afeta o antro gástrico e apresenta um melhor prognóstico. Em contrapartida, o tipo difuso acomete frequentemente pacientes mais jovens do sexo feminino, geralmente afeta o corpo do estômago, apresentando um comportamento tumoral mais agressivo que resulta em um pior prognóstico (CHEN et al., 2016; MA et al., 2016).

Em suma, os dois subtipos histológicos propostos por essa classificação apresentam uma série de características clínicas e moleculares distintas, incluindo histogênese, diferenciação celular, epidemiologia, etiologia e prognóstico. Por outro lado, o valor dessa classificação tem sido questionado, a existência de dois subtipos em porções variáveis de um mesmo tumor tem incentivado o surgimento de classificações alternativas (KANEKO; YOHIMURA, 2001;CHEN et al., 2015b; MA et al., 2016).

Um estudo da THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK (TCGA) propôs uma nova classificação para o tumor gástrico através de análises de polimorfismo de nucleotídeo único, análises de número e cópia somática, sequenciamento do exoma, de mRNA

e miRNA, metilação do DNA e atividade proteica; resultando em quatro novos subtipos: tumores positivos para o vírus Epstein-Barr (EBV), tumores instáveis que apresentem microssatélites, tumores genomicamente estáveis e tumores com instabilidade cromossômica. No entanto, sua aplicação na prática clínica é inviabilizada pela quantidade de técnicas de ponta e de alto custo (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK*, 2014).

O tratamento do câncer gástrico é o mesmo há aproximadamente 50 anos e envolve estratégias terapêuticas como cirurgias, quimioterapia e radioterapia. Porém, essas estratégias não têm se mostrado tão promissoras, já que a sobrevida livre de doença em 5 anos dessa neoplasia é de apenas 29%. Além disso, os biomarcadores para diagnóstico e segmento utilizados na prática clínica muitas vezes não apresentam sensibilidade e especificidade para serem totalmente confiáveis. Assim, torna-se cada vez mais essencial a busca por novas estratégias terapêuticas e de biomarcadores para o câncer gástrico (CONNELLY et al., 2016; SUTTER; FECHNER, 2006; ZALI; REZAEI-TAVIRANI; AZODI, 2011).

Estudos sobre as alterações moleculares no câncer gástrico ainda são incipientes, principalmente no tocante aos aspectos glicobiológicos (EL-RIFAI; POWELL, 2002). Alterações nos perfis de glicosilação celular estão associadas ao comportamento de algumas transformações malignas (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; ROSETE, 2008).

A glicosilação é um evento pós-traducional e vital, comum a várias proteínas (SPIRO, 2004). Os glicoconjugados caracterizam-se pela ligação de diversos tipos de carboidratos a proteínas ou lipídios, que conferem a essas moléculas diferentes propriedades funcionais e estruturais. Nessa classe de biomoléculas estão incluídas, por exemplo, as glicoproteínas, proteoglicanos e glicoesfingolipídios, que podem conferir às células tumorais a capacidade de migração, invasão e metástase (REIS et al., 2010; DALL'OLIO, 2000; ANDERGASSEN et al., 2015).

A biossíntese dos glicoconjugados é catalisada pelas glicosiltransferases (GTs), uma família de mais de 100 enzimas que são responsáveis por transferir um resíduo de açúcar para um carboidrato, aminoácido ou lipídio. As alterações de glicosilação nas células tumorais são relacionadas a alterações na expressão das glicosiltransferases, que podem contribuir para oncogênese e progressão tumoral. Ademais, a expressão de glicosiltransferases podem ser marcadores importantes no diagnóstico e prognóstico do câncer (REIS et al., 2010; DALL'OLIO, 2000; ANDERGASSEN et al., 2015).

A enzima UDP glicose 4-epimerase (GALE) é uma importante glicosiltransferase que possui função catalítica e biossintética. Atua catalisando a conversão de UDP-galactose (UDP-Gal) em UDP-glicose (UDP-Glc) e na interconversão de UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-

GalNAc) e UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) (DAENZER et al., 2012; WENA et al., 2014). A nível celular atua como precursora para síntese das unidades de oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolípidios, assim como, desempenha uma tarefa importante na manutenção dos padrões de polissacarídeos da superfície de células com crescimento celular acelerado (ROBINSON; KALCKAR; HOSPITAL, 1966; ZINSSER et al., 2015).

A β -1,4-galactosiltransferase III (B4GALT3) é uma glicosiltransferase que pertence à família das β -1,4-galactosiltransferases (B4GALTs). Esse grupo de enzimas atua catalisando a biossíntese de poli-N-acetilactosamina ao transferir a galactose (GAL) da uridina difosfato galactose para oligossacarídeos N-acetilglicosamina (GlcNAc). Unidades repetidas de N-acetilgalactonasamina se repetem para formar poli-N-acetilactosamina, presente nos glicolípídeos, glicosaminoglicanos, O-glicanos e/ou N-glicanos (CHEN et al., 2014). Estudos recentes sugerem que B4GALT3 desempenha papéis importantes na proliferação, invasão e metástase em alguns tipos de cânceres como o câncer colorretal, câncer cervical e neuroblastoma (CHANG et al., 2013; CHEN et al., 2014; SUN et al., 2016a).

Diante desse contexto, o presente estudo visou investigar a expressão tecidual de GALE e B4GALT3 e avaliar suas possíveis associações com parâmetros clínico-patológicos e de desfecho no câncer gástrico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão das glicosiltransferases UDP glicose 4-epimerase e β -1,4-galactosiltransferase III no câncer gástrico.

1.1.2 Objetivos Específicos

Investigar a expressão tecidual de GALE e B4GALT3 em amostras de adenocarcinoma gástrico por imuno-histoquímica;

- Correlacionar a expressão tecidual das glicosiltransferases aos parâmetros clínico-patológicos da doença;
- Avaliar os marcadores utilizados com os parâmetros de desfecho (Sobrevida Global e Sobrevida Livre da Doença).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTATÍSTICA DO CÂNCER: UM BREVE RELATO

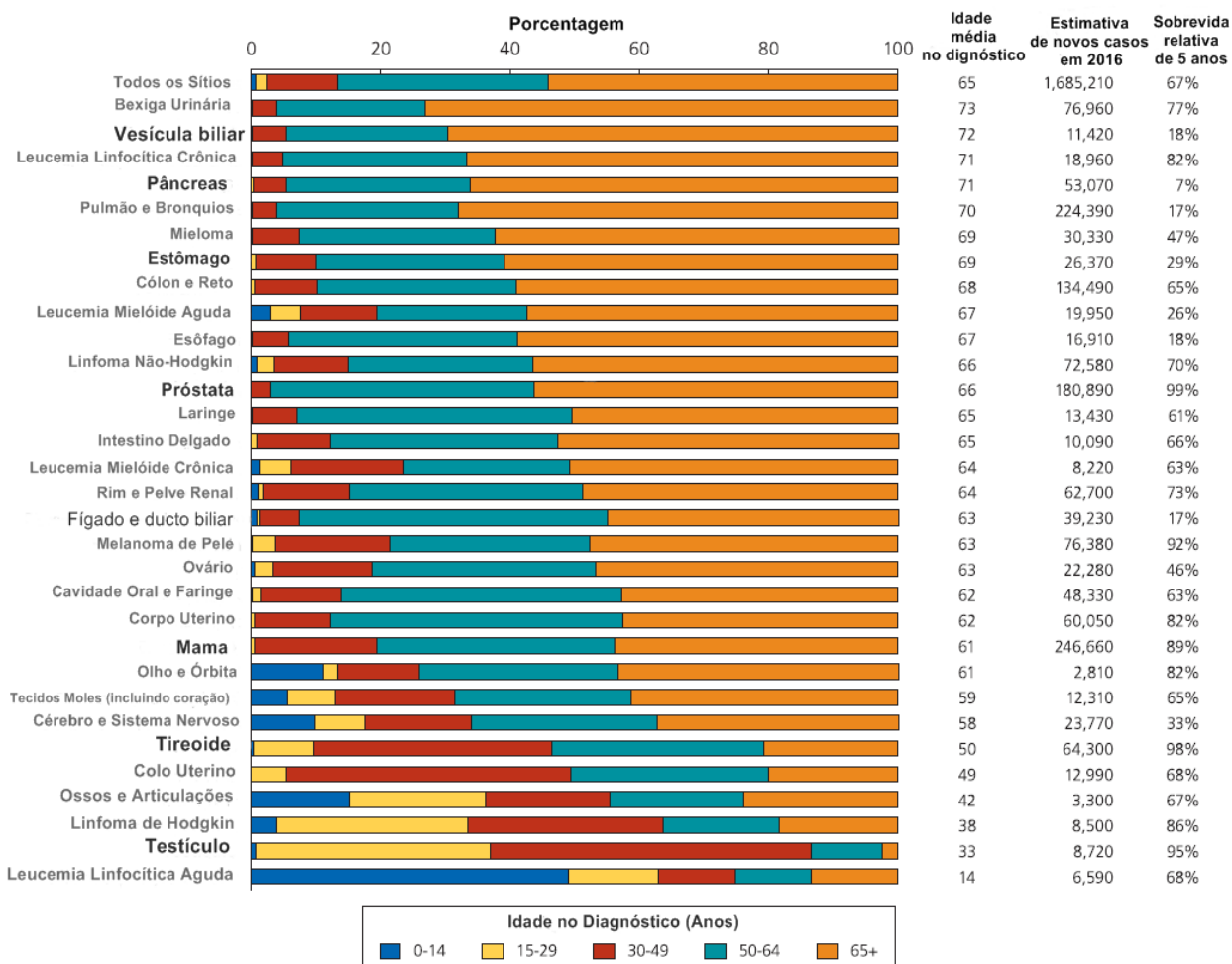
A palavra “câncer” denomina um grupo de doenças crônicas de relevância global, caracterizada por alterações genéticas e multifatoriais (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). A doença é caracterizada pelo crescimento desordenado das células que fogem ao controle do organismo e tendem a autonomia e a perpetuação, culminando em efeitos agressivos ao homem. A doença pode surgir eventualmente em qualquer parte do corpo humano e, embora compartilhem algumas características em comum, apresentam fatores epidemiológicos, etiológicos e biológicos distintos (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2011).

O câncer é tido como um problema de saúde pública em todo o mundo, dada a sua relevância epidemiológica, social e econômica (INCA, 2016). A incidência e a sobrevida da doença estão associadas a padrões diversificados quanto à exposição aos fatores de riscos, aos hábitos de vida, além das disponibilidades às estratégias de prevenção, detecção precoce e tratamento (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018).

Os dados estatísticos relacionados à incidência, prevalência, morbidade e mortalidade do câncer, são a cada dia mais alarmantes. O número de novos casos a cada ano deverá aumentar em cerca de 70% até 2030, decorrentes principalmente a mudanças demográficas. Esta estatística estará voltada, sobretudo, para os países em desenvolvimento em decorrência ao processo de transição epidemiológica (FRANCESCHI; WILD, 2013; KANAVOS, 2006).

Paralelamente, os países mais desenvolvidos apresentam avanços estatísticos relacionados à incidência e sobrevivência do câncer. Nos EUA por exemplo, mais de 15,5 milhões de pessoas com diagnóstico de câncer estavam vivos em 2016, devido a melhorias no diagnóstico e na terapêutica. No entanto, as porcentagens de pacientes que alcançam 5 anos livres da doença também variam conforme ao acometimento do câncer e sua evolução. Por exemplo, os cânceres de próstata (99%), tireoide (98%), testículo (95%) e mama (89%) apresentaram melhoras substancialmente quanto à sobrevida relativa em 5 anos, ao contrário dos tumores do trato gastrointestinal como estômago (29%), vesícula biliar (18%) e pâncreas (7%) (Figura 1) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; MILLER et al., 2016).

Figura 1- Estimativas para o câncer nos Estados Unidos em 2016. Distribuição por idade de novos casos (%), idade média no diagnóstico, número estimado de novos casos e sobrevivência relativa de 5 anos por tipo de câncer. A distribuição da idade foi demonstrada com base nos dados 2011-2012 da Associação Norte-Americana de Registros Centrais de Câncer e exclui os dados de incidência do Arkansas e Nevada. A idade média no diagnóstico e a sobrevivência relativa de 5 anos são baseadas em casos diagnosticados durante 2008-2012 e 2005-2011, respectivamente.



Fonte: (Adaptado do AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Nos Estados Unidos da América, espera-se que cerca de 1,7 milhões de novos casos de câncer sejam diagnosticados em 2018. Estima-se também que cerca de 609.640 americanos morreram em decorrência de câncer, o que se traduz em cerca de 1.670 mortes por dia. Estes dados estabelecem o câncer como a segunda causa mais comum da morte nos EUA, superado apenas pelas doenças cardíacas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018). Quanto à estimativa do perfil de incidência por sexo nos EUA, os tipos mais frequentes de câncer em homens serão próstata (19%), pulmão (14%), colón e reto (9%) e bexiga (7%). Nas mulheres, os cânceres de mama (30%), pulmão (12 %), colón e reto (8 %) e corpo uterino (7%) figurarão uns dos principais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Já a diversificação do continente Asiático, quanto aos aspectos étnicos, socioculturais, socioeconômico, estilo de vida e hábitos alimentares, refletem na diversificação dos padrões de cânceres nas diferentes regiões desse continente. Estima-se que em 2030 cerca de 10,7 milhões de casos serão diagnosticados com ocorrência de 7,5 milhões de mortes, esse aumento será significativo principalmente nos países de baixo e médio recursos. Quanto ao perfil de distribuição nas diferentes regiões do continente Asiático, os tipos mais frequentes de câncer em homens serão pulmão, estômago, fígado, colorretal, esôfago e próstata. Nas mulheres, os cânceres de mama, pulmão, colo do útero, estômago, colorretal e fígado representam alguns dos principais (SANKARANARAYANAN; RAMADAS; QIAO, 2014).

No Brasil, as estimativas disponibilizadas pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o biênio 2018-2019, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer, excluindo-se os casos de câncer de pele não melanoma (aproximadamente 170 mil casos novos). A distribuição da incidência por sexo aponta que os tipos mais frequentes de câncer em homens serão próstata (31,7%), pulmão (8,7%), cólon e reto (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), cólon e reto (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%), tireoide (4,0) e estômago (3,8%) figurarão entre os principais (Figura 2) (INCA, 2018).

Figura 2 - Distribuição por sexo dos dez tipos de câncer mais incidentes, exceto os casos de câncer de pele não melanoma, estimados para o biênio 2018-2019 no Brasil segundo o INCA.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Fonte: (INCA,2018).

2.2 CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico, também denominado câncer de estômago, é uma das doenças malignas mais comuns do aparelho digestivo. A patologia é caracterizada pelo crescimento desordenado das células que compõem o órgão, podendo acometer qualquer parte da sua extensão. A iniciação ou progressão da carcinogênese desta doença está associada a múltiplos fatores genéticos e ambientais. Com características heterogêneas, esse tipo de neoplasia apresenta diferentes comportamentos biológicos, além de variações quanto à resposta terapêutica e ao curso clínico (CHEN et al., 2015^a; DOUGLAS E. GUGGENHEIM, MD AND MANISH A. SHAH, 2012; TANG et al., 2018).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A incidência das neoplasias gástricas é mais comum nos países em desenvolvimento com médio ou baixo índice de desenvolvimento humano (IDH). Além disso, a taxa de incidência é mais alta no sexo masculino do que no feminino. Em ambos os sexos, a incidência aumenta a partir dos 50 anos de vida (TSAI et al., 2017; INCA,2018).

Ademais, a incidência também é variável conforme a região geográfica e os fatores socioeconômicos, que são associados a variações na dieta. As regiões de alta incidência incluem, entre outros, o Leste da Ásia, Europa Oriental, América Central e do Sul e Japão enquanto as que apresentam taxas de baixa incidência incluem, o Sul da Ásia, Norte e África Oriental e América do Norte (MA et al., 2016).

No Brasil, para o biênio 2018 -2019 são estimados cerca de 21.290 novos casos de câncer de estômago, dos quais serão 13.540 em homens e 7.750 mulheres. Excluindo-se os casos de câncer de pele não melanoma, esses tumores aparecem em quarto lugar na incidência entre homens e em sexto, entre as mulheres. Nas Regiões Norte (12,35/100 mil) e Nordeste (11,17/100 mil) é o segundo mais frequente. Nas Regiões Sul (17,12/100 mil) e Centro-Oeste (11,52/ 100 mil) é o quarto mais frequente. Já na Região Sudeste (13,46/100 mil), ocupa a quinta posição. Quanto à incidência em mulheres, nas Regiões Sul (8,95/100 mil), Centro-Oeste (6,52/100) e Norte (5,34/100 mil) ocupa a quinta posição. Nas Regiões, Nordeste (7,16/100) ocupa a sexta posição e Sudeste ocupa a sétima posição (7,41/100 mil) (INCA,2018).

Ao longo das décadas tem sido observado em todo o mundo, um declínio na incidência e nas taxas de mortalidade. Apesar disso, os tumores gástricos causam mais do que 723.000 mortes anualmente (RYU et al., 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE,2018). Na maioria dos casos,

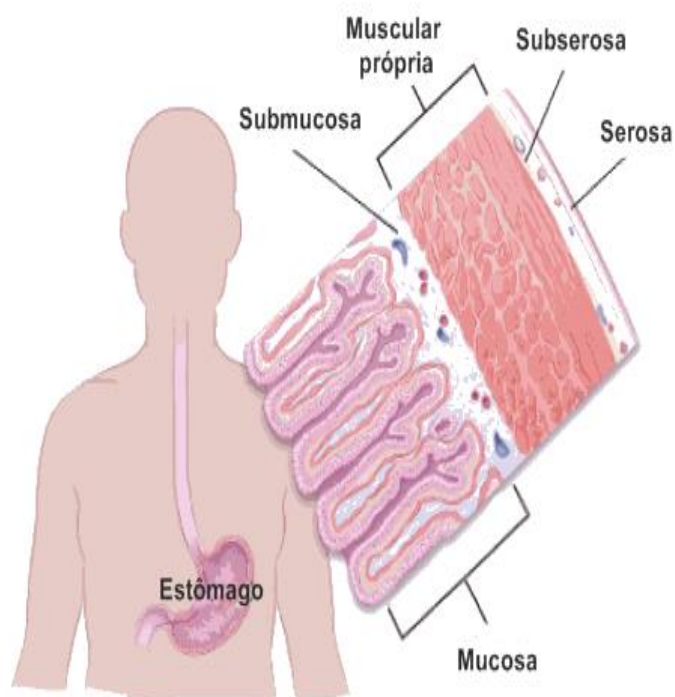
esse tipo de tumor não possui um bom prognóstico. A taxa de sobrevivência em 5 anos é estimada em cerca de 25% -30% e ligeiramente maior para alguma experiência asiática. No Brasil, por exemplo, a sobrevida em cinco anos diminuiu entre os períodos de 1995 a 1999 e 2005 a 2009 (de 33% para 25%) (GARATTINI et al., 2017; INCA,2016).

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E ETIOLÓGICOS DO TUMOR GÁSTRICO

O estômago é um segmento dilatado do trato gastrointestinal (TGI), cuja função principal é a liquefação do bolo alimentar (quimo) e a digestão de alguns alimentos por meio da atividade muscular e química. Localiza-se na cavidade abdominal entre o esôfago e o intestino delgado (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO. J, 2013).

Anatomicamente, o estômago é dividido em cinco áreas principais: fundo, corpo, antro piloro e cárdia. A parede desse órgão é constituída pelas seguintes camadas: mucosa, camada de revestimento composta por glândulas; a submucosa, camada de suporte; a muscular própria e por último a camada subserosa e serosa que revestem o órgão (Figura 3). (JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO. J, 2013; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

Figura 3 - Composição da parede do estômago. A parede do estômago é constituída por camadas: Mucosa, submucosa, muscular própria, subserosa e serosa.



Fonte: (Adaptado do AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

Histologicamente, a parede do órgão é revestida por um epitélio colunar simples produtor de muco. O epitélio sofre invaginações formando as fossetas gástricas, onde são encontradas as glândulas. A parte muscular do estômago é composta por células musculares lisas. Já a camada subserosa é formada por tecido conjuntivo moderadamente denso, apresentando vasos sanguíneos e linfáticos (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J, 2013).

Os tumores que acometem o estômago podem ser benignos, malignos ou de comportamento não específico, podendo ter origem tanto em tecidos epiteliais quanto não epiteliais (Quadro 1) (HAMILTON; AALTONEN, 2001). Dessa forma, existem vários tipos de tumores decorrentes do estômago, como por exemplo, os carcinomas, linfomas, sarcomas, entre outros tipos histológicos que possuem padrões evolutivos e tratamentos diferentes. O tipo histológico mais comum do câncer gástrico é o adenocarcinoma que corresponde a aproximadamente 95% dos casos. Esse tipo de tumor surge nas glândulas da camada mais superficial ou da mucosa do estômago (AJANI et al., 2017; KARIMI PARISA, ISLAMI FARHAD, SHARMILA ANANDASABAPATHY, NEAL D. FREEDMAN et al., 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Quadro 1 - Classificação histológica do WHO para tumores gástricos. ¹A classificação é modificada a partir da classificação histológica para tumores do WHO (2016). Já para as neoplasias endócrinas, é baseada pela classificação clínico-patológica da WHO (1784). ² Código de morfologia da Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O) (542) e a Nomenclatura Sistematizada de Medicina (<http://snomed.org>). O comportamento está codificado como 0 para tumores benignos, 3 para tumores malignos e 1 para comportamento não especificado, limítrofe ou incerto. A neoplasia intra-epitelial não possui um código genérico na CID-O. Os códigos CID-O estão disponíveis apenas para lesões classificadas para neoplasia glandular intravenosa grau III (8148/2) e adenocarcinoma *in situ* (8140/2).

TUMORES EPITELIAIS		TUMORES NÃO EPITELIAIS	
Neoplasia intra-epitelial – Adenoma	8140/0²	Leiomioma	8890/0
Carcinoma		Sarcoma	9560/0
Adenocarcinoma	8140/3	Tumor de células glandulares	9580/0
tipo intestinal	8144/3	Tumor de glomus	8711/0
tipo difuso	8145/3	Leiomiosarcoma	8890/3
Adenocarcinoma papilar	8260/3	Tumor estromal GIST	8936/1
Adenocarcinoma tubular	8211/3	benigno	8936/0
Adenocarcinoma mucoso	8480/3	potencial maligno incerto	8936/1
	8490/3	maligno	8936/3

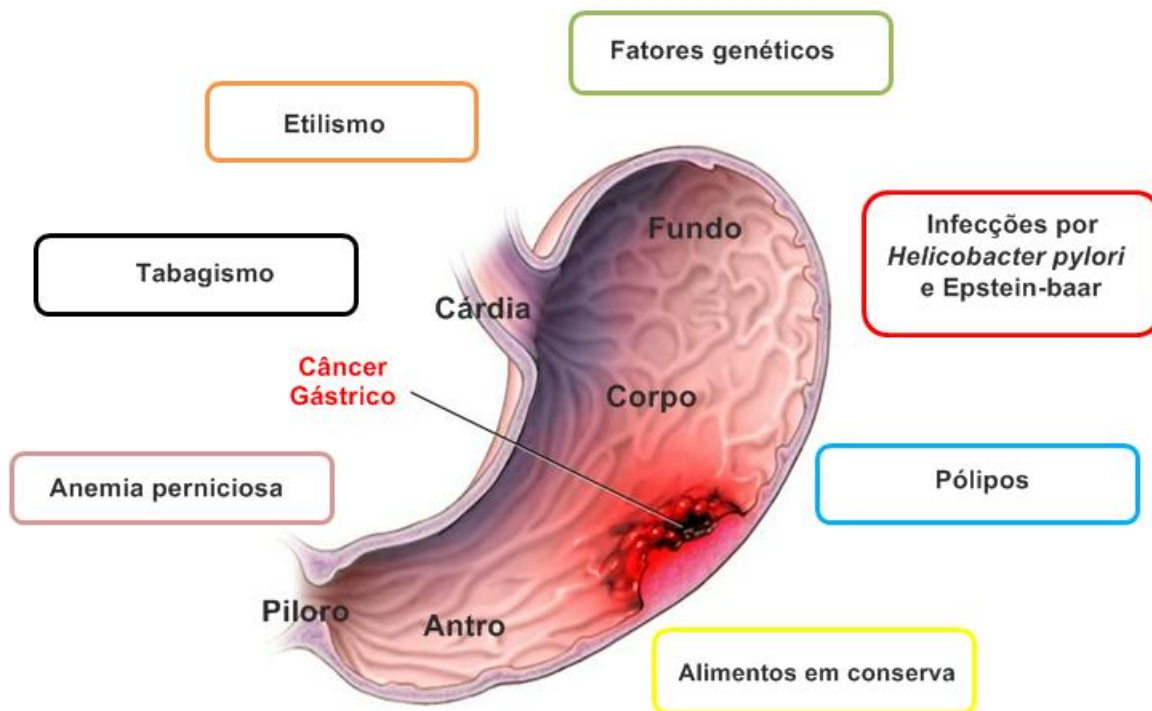
Carcinoma de células em anel de sinete	8560/3	Sarcoma de kaposi	9140/3
Carcinoma adenosquâmico	8070/3	Outros	
Carcinoma de células escamosas	8041/3	Linfomas malignos	
Carcinoma de células pequenas	8020/3	Linfoma de células B de zona marginal (MALT)	9699/3
Carcinoma indiferenciado		Linfoma de células manto	9673/3
Outros	8240/3	Linfoma difuso de células B grandes	9680/3
Carcinoide (neoplasia endócrina bem diferenciada)		Outros	
		Tumores secundários	

Fonte: (Adaptado de HAMILTON; AALTONEN, 2001).

O câncer gástrico é um tipo de neoplasia maligna que possui uma biologia molecular complexa e heterogênea que varia de acordo com o local de origem no estômago e a histologia. Além disso, a doença possui um perfil etiológico multifatorial, relacionados a fatores genéticos e ambientais (Figura 4) (CHENG; LIN; TU, 2016).

As características clínicas do CG são inespecíficas, fato que corrobora ao tardio diagnóstico. Muitos dos sintomas apresentados são comuns a outras desordens gástricas (inchaço, gases e sensação de plenitude) e que geralmente só aparecem em um estado mais avançado. De modo geral, os pacientes com CG podem cursar com perda de apetite, azia, dificuldades em engolir, náuseas e vômitos, dores abdominais, perda de peso, vômitos com ou sem sangue, cansaço devido à anemia, entre outros (SHANG; PENA, 2005).

Figura 4 - Fatores conhecidos que aumentam o risco do desenvolvimento do câncer gástrico. A figura também representa as cinco áreas principais do estômago: cárdia, fundo, corpo, antro e piloro.



Fonte: (Disponível em: < <https://www.homenaturalcures.com/stomach-cancer/> > Acesso em: 15/02/2018., adaptado).

Alguns dos fatores conhecidos que aumentam o risco de câncer gástrico incluem os fatores genéticos, esporádicos e hereditários (ZALI; REZAEI-TAVIRANI; AZODI, 2011).

A associação dietética também está diretamente relacionada a esse tipo tumor. Alimentos salgados aumentam fortemente o risco de tumores gástricos. Também existem evidências que alimentos em conservas como carnes, alimentos defumados e grelhados são causas da doença. Por outro lado, uma adequada ingestão de frutas e alimentos frescos diminuem o risco de desenvolvimento da doença pelo alto poder antioxidantes destes alimentos (CATALANO et al., 2009; GIORDANO; CITO; FOUN-, 2012).

Além disso, infecções por *Helicobacter pylori* e Epstein-Baar (EBV) desempenham um papel crítico na carcinogênese do tumor gástrico. Acredita-se que a infecção por *H. pylori* causa efeitos oncogênicos que podem ocorrer através de vários mecanismos, incluindo os efeitos inflamatórios na mucosa gástrica que podem progredir para os seguintes estágios: atrofia da mucosa, metaplasia intestinal e displasia que pode resultar em um processo neoplásico (FUKAYAMA; USHIKU, 2011; ISHAQ; NUNN, 2015; SHANG; PENA, 2005).

Países com alta incidência de câncer gástrico apresentam alta prevalência de infecção por *H. pylori*, em contrapartida, os países desenvolvidos que apresentam baixa prevalência da

infecção apresentam uma incidência menor de câncer gástrico. Já a infecção por Epstein-Baar (EBV), acredita-se causar anormalidades moleculares decorrentes ao processo de metilação em regiões de genes promotores e supressores tumorais. Esse tipo de infecção associa-se a aproximadamente 10% dos casos de CG. Sendo relatada por apresentar um prognóstico favorável, embora, estes dados ainda sejam controversos (CATALANO et al., 2009; CHO; KANG; KIM, 2016; FUKAYAMA; USHIKU, 2011).

Além dos fatores mencionados, o histórico de tabagismo, etilismo, anemia perniciosa, pólipos estomacais e gastrite crônica atrófica também são tidos como condições importantes para o desenvolvimento do câncer gástrico (ZALI; REZAEI-TAVIRANI; AZODI, 2011).

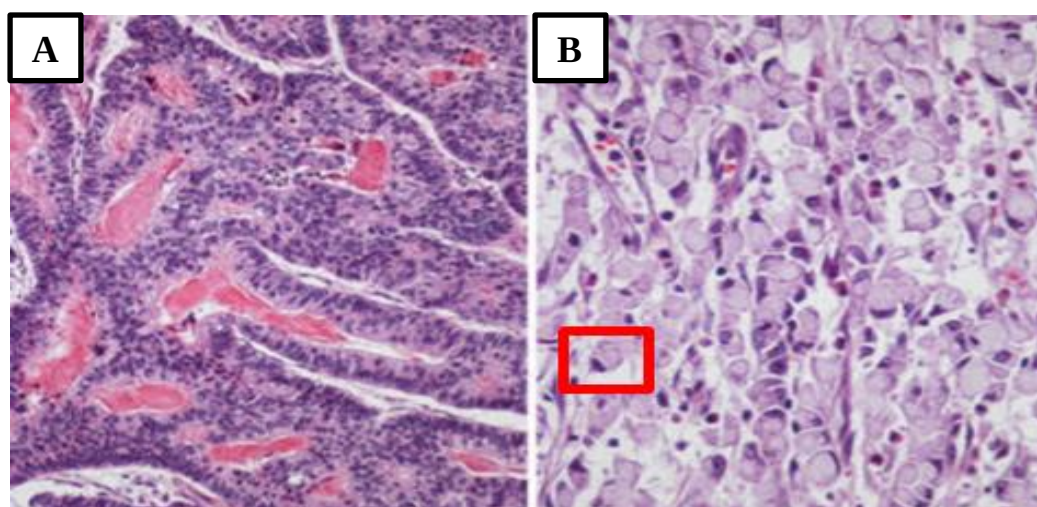
O CG é categoricamente heterogêneo. Acredita-se que esse tipo de tumor representa clones totalmente diferentes que surgem no mesmo órgão, apresentando comportamentos biológicos distintos (SHAH et al., 2011). Partindo-se desse pressuposto, muitas tentativas foram feitas para tentar reclassificar esse tipo de tumor, objetivando-se agrupar novos subgrupos que poderiam ter diferentes prognósticos. Foram desenvolvidas classificações anatômicas como, por exemplo, a classificação de Borrmann e classificação Siewert e Stein, assim como classificações histopatológicas (GARATTINI et al., 2017).

As duas classificações histopatológicas mais utilizadas são as com base nos critérios da WHO e nos de Lauren. A classificação da WHO categoriza o câncer gástrico em quatro subtipos histológicos: tubular, papilar, mucinoso, pouco coeso (inclui o carcinoma de células do anel de sinete) e outras variáveis histológicas incomuns (HSU et al., 2016; HU et al., 2012b; LUU et al., 2017). Já a classificação de Lauren, que é amplamente utilizada na prática clínica, categoriza o tumor gástrico em dois subtipos principais: intestinal e difuso, que exibem diferenças patológicas, epidemiológica e etiológica (MA et al., 2016; RIBEIRO et al., 1981).

O subtipo intestinal geralmente ocorre em pacientes idosos do sexo masculino e afeta frequentemente a região anatômica do antro gástrico. As células tumorais são caracterizadas por exibirem adesão e metaplasia intestinal, estando assim, dispostas em formações tubulares ou glandulares. Esse subtipo cursa com melhor prognóstico. Em contrapartida, o subtipo difuso ocorre mais frequentemente em pacientes mais jovens, sendo mais prevalente no sexo feminino, acometendo frequentemente a região anatômica do corpo gástrico. As células tumorais não exibem um padrão de adesão, e infiltram o estroma como células isoladas ou pequenos subgrupos tumorais dispersos e não coesivos. Uma característica patognomônica desse subtipo são as células em anel de sinete. Formadas quando o muco intracelular empurra o núcleo da célula para o lado exterior da mesma. Esse subtipo é mais agressivo e cursa com pior prognóstico (Figura 5) (DICKEN et al., 2005; MA et al., 2016).

A patogênese desses dois subtipos está associada a alterações genéticas e epigenéticas, como a metilação do DNA, modificações nas histonas e recombinação cromossômica. Também compartilham fatores de risco alimentares e ambientais em comum. Contudo, o subtipo intestinal está mais associado a fatores ambientais, como, por exemplo, a infecção por *Helicobacter pylori* e o subtipo difuso a fatores genético (MA et al., 2016).

Figura 5 - Fotomicrografias de adenocarcinoma gástrico, classificação de Lauren. A: Subtipo intestinal: células tumorais dispostas de forma coesa, formando estruturas glandulares (HE, 200x). B: Subtipo difuso: infiltração de células tumorais únicas no estroma, evidenciando células em anel de sinete (HE, 400x).



Fonte: (Adaptado de CORREA; PIAZUELO, 2011).

Há alguns anos, um estudo propôs uma nova classificação com base em critérios moleculares, na qual, o CG foi dividido em quatro subtipos: tumores positivos para o vírus Epstein-Barr, que apresentam mutações PIK3CA, hipermetilação de DNA e amplificação de JAK2, CD274 e PDCD1LG2; tumores instáveis que apresentem microssatélites; tumores genomicamente estáveis; e tumores com instabilidade cromossômica. A classificação foi realizada por meio da análise de polimorfismos de nucleotídeo único, análises de número e cópia somática, sequenciamento do exoma, de mRNA e miRNA, metilação do DNA e atividade protéica. Logo, sua aplicação na prática clínica é inviabilizada pela quantidade de técnicas de alto custo (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK*, 2014).

Nenhuma dessas classificações é clinicamente útil, pois suas capacidades prognósticas e preditivas não são eficientes em orientar adequadamente o gerenciamento dos pacientes. Partindo-se dessa premissa, novas classificações são necessárias para que se forneçam informações mais detalhadas sobre a patogênese da doença, junto a isso, a identificação de novos biomarcadores para o diagnóstico dos pacientes acometidos. Assim como outros

neoplasias malignas, o diagnóstico e tratamento precoce auxiliam a uma melhor sobrevivência (KIM et al., 2017).

2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico do câncer gástrico é inicialmente guiado pela anamnese, principalmente pelos relatos dos sintomas constitucionais (perda de peso, anorexia e astenia). Quando indicativo, o paciente é submetido a uma endoscopia digestiva alta, na qual será realizada biopsia das lesões suspeitas para confirmação histológica, bem como serão descritos a localização e o grau de disseminação no órgão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Após o diagnóstico histopatológico, a tomografia computadorizada do abdômen e do tórax, com ou sem contraste, deve ser realizada para detecção de metástases e para determinar as opções de tratamento. No entanto, a tomografia computadorizada não permite a avaliação da disseminação do tumor na linfa nem a determinação da profundidade da invasão tumoral, além de não ser efetivo em detectar metástases menores que 5 mm de diâmetro. Dessa forma, a ultrassonografia endoscópica (UES) é uma modalidade que permite a determinação mais precisa do estadiamento (LAYKE; LOPEZ, 2004).

A laparoscopia também pode ser solicitada nos casos em que as investigações de imagens são negativas para detectar tumores pequenos. Ademais, a laparoscopia também permite análise citológica por meio de biópsias obtidas de lesões suspeitas e deve ser realizada antes do tratamento definitivo (THRUMURTHY et al., 2013).

Na prática clínica, a dosagem dos antígenos tumorais utilizada principalmente para segmento (CEA, CA19.9, CA72.4, CA50) não tem se mostrado útil, devido à baixa especificidade, o que limita a sua recomendação. Logo, a busca por marcadores biológicos que permitam a detecção precoce e rastreamento do câncer gástrico estão sendo integrados a pesquisa em patologia molecular (CATALANO et al., 2009).

O estadiamento do CG mais aceito é o da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e o da União Internacional Contra o Câncer (UICC) que utilizam o sistema TNM para o estadiamento do câncer gástrico. O código do sistema corresponde à extensão do tumor primário (T), número de nódulos linfáticos (N) e metástases distantes (M). Estes parâmetros recebem graduações numéricas, geralmente T0 a T4, N0 a N3 e de M0 a M1 e graduação alfabética (A, B, C) ambas expressam o grau de evolução do tumor e dos linfonodos acometidos (Quadro 2) (EDGE; COMPTON, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Quadro 2 - Estadiamento do câncer gástrico conforme AJCC 8ª edição.

CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA TNM	
TUMOR	
Tx	O tumor não pode ser avaliado.
T0	Sem evidência de tumor primário.
Tis	Tumor <i>in situ</i> / displasia de alto grau: tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria.
T1	O tumor invade a lâmina própria ou muscular da mucosa (T1a) ou submucosa (T1b).
T2	O tumor invade a muscular própria.
T3	O tumor invade a subserosa.
T4	O tumor perfura a serosa (T4a) ou invade estruturas adjacentes (T4b).
NÓDULOS LINFÁTICOS	
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Sem invasão linfática regional.
N1	1 a 2 linfonodos regionais acometidos.
N2	3 a 6 linfonodos regionais acometidos.
N3	7 ou mais linfonodos regionais acometidos.
N3a	7 a 15 linfonodos regionais acometidos.
N3b	16 ou mais linfonodos regionais acometidos.
METÁSTASE	
M0	Sem metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

Fonte: (Adaptado do MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Os códigos da classificação TNM são utilizados em conjunto para expressar o grau de evolução do câncer gástrico, ou seja, o estágio patológico (Quadro 3). Por isso, o sistema é atualizado periodicamente para permanecer relevante na prática clínica mediante aos avanços no prognóstico do câncer gástrico (EDGE; COMPTON, 2010).

Quadro 3 - Estádios patológicos do câncer gástrico conforme a AJCC 8ª edição.

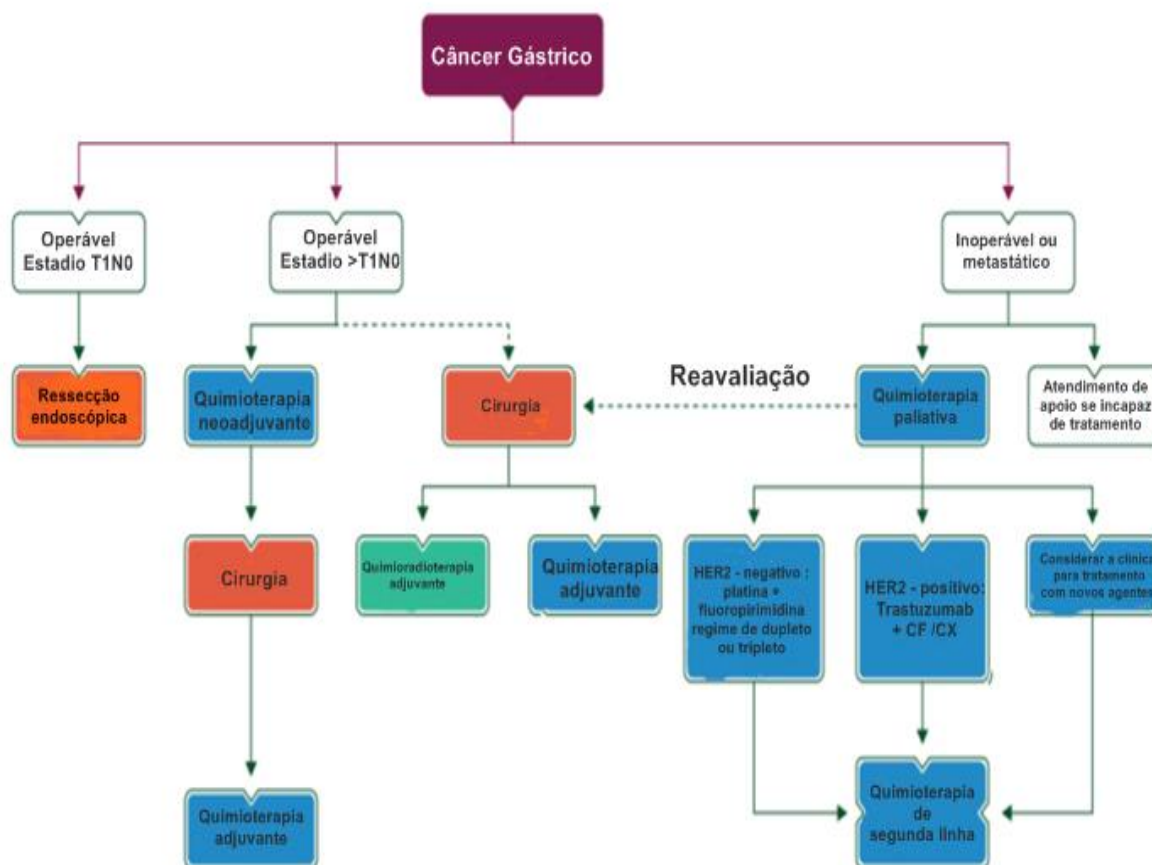
GRUPAMENTO POR ESTÁDIO			
ESTÁDIOS	T	N	M
ESTÁDIO 0	Tis	N0	M0
ESTÁDIO IA	T1	N0	M0
ESTÁDIO IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
ESTÁDIO IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
ESTÁDIO IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3a	M0
ESTÁDIO IIIA	T4a	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3a	M0
	T4b	N0	M0
ESTÁDIO IIIB	T4b	N1-N2	M0
	T4a	N3a	M0
	T3	N3a	M0
	T2	N3b	M0
	T1	N3b	M0
ESTÁDIO IIIC	T4a	N3b	M0
	T4b	N3a	M0
	T4b	N3b	M0
	T3	N3b	M0
ESTÁDIO IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

2.6 OPÇÕES TERAPÊUTICAS

O tratamento do câncer gástrico envolve várias estratégias como cirurgias, quimioterapia e radioterapia que dependem basicamente de fatores como o local e extensão do tumor (Figura 6) (ZALI; REZAEI-TAVIRANI; AZODI, 2011).

Figura 6 - Fluxograma com as estratégias terapêuticas para o câncer gástrico.



Fonte: (Adaptado de SMYTH et al., 2016).

Os tumores com estágio inicial que acometem apenas a camada interna do estômago, podem ser tratados apenas por ressecção endoscópica. Já os tumores com estágio maiores que T1N0 possuem como primeira estratégia terapêutica a gastrectomia. Que consiste na ressecção cirúrgica do estômago, podendo ser total ou subtotal. Sendo estabelecida mediante a algumas condições como tamanho do tumor, localização, extensão e capacidade de alcance as margens livres da doença. Nesse tipo de cirurgia os gânglios linfáticos proximais também são removidos (DICKEN et al., 2005; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

A linfadenectomia consiste na dissecação dos gânglios linfáticos que associado à gastrectomia tem finalidade curativa. A extensão desse procedimento é dependente da propagação nodal que geralmente varia com a gravidade da doença. Estudos sugerem que a proporção de linfonodos metastáticos para o número de gânglios linfáticos dissecados é um dos principais fatores prognósticos para os pacientes com câncer gástrico (ALATENGBAOLIDE et al., 2013; DEGIULI et al., 2016).

A linfadenectomia é classificada pela letra D e varia numericamente conforme sua extensão. Em suma, a linfadenectomia D1 corresponde à ressecção dos linfonodos do nível 1 da cadeia linfática gástrica. A D2 inclui a ressecção dos linfonodos do primeiro e segundo nível do grande epíplon e da bolsa omental. Já a D3 consiste ressecção dos linfonodos do primeiro e segundo nível mais os linfonodos do ligamento hépato-duodenal e da raiz do mesentério (COLA et al., 2005; TONETO, 2012).

Outra estratégia terapêutica é a quimioterapia neoadjuvante indicada para pacientes com câncer gástrico avançado de alto risco, sendo administrada antes do tratamento principal com o objetivo de reduzir o tamanho e extensão do tumor para tornar mais fácil sua remoção. O tratamento neoadjuvante pode consistir em quimioterapia, radioterapia e imunoterapia. Esse tipo de terapia pode resultar em uma melhor taxa de sobrevivência para esses pacientes (CATALANO et al., 2009).

A ressecção cirúrgica do câncer gástrico em estágios iniciais é potencialmente curativa. No entanto, um número considerável de pacientes apresentam recaídas após esse tipo de tratamento (SMYTH et al., 2016). Quando submetidos ao tratamento cirúrgico sem outras combinações terapêuticas os pacientes com câncer gástrico apresentem taxas de sobrevivência de 5 anos que se aproximam de 75%. No entanto, pacientes que apresentam disseminação nos linfonodos as taxas de sobrevivência diminuem consideravelmente para 10% a 30%. A extensão de acometimento linfonodal e metástases após o procedimento cirúrgico estimulou a adição de terapias adjuvantes para melhores resultados (DICKEN et al., 2005).

Nos casos de estágios mais avançados, onde a neoplasia se disseminou para órgãos distantes, as chances de cura são mínimas. No entanto, algumas estratégias terapêuticas podem aliviar os sintomas e ajudar a manter o tumor sob controle, é o que se convencionou chamar de terapia paliativa (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

Para esses pacientes são indicados dois esquemas quimioterápicos de primeira linha, um deles com fluoropirimidina (fluorouracila ou capecitabina) e o outro com um quimioterápico derivado da platina. Outra estratégia terapêutica consiste nos quimioterápicos de segunda linha, um deles com um taxano (docetaxel, paclitaxel) e outro com irinotecan, ou ramucirumab como

agente único ou em combinação com paclitaxel (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018;SMYTH et al., 2016; TAKAHARI, 2017).

A inclusão de quimioterápicos-alvos como o trastuzumab é recomendado em conjunto com quimioterapia à base de cisplatina e 5-fluorouracilo (CF) ou cisplatina e capecitabina (CX) para pacientes com câncer gástrico avançado que superexpressam o receptor HER2 (SMYTH et al., 2016). Alguns estudos demonstraram um benefício na sobrevida global com o uso desse agente biológico que em combinação com a quimioterapia configuram o tratamento de primeira linha. Porém, alguns pacientes com HER2 positivo não respondem ou adquirem resistência a este agente biológico (KELLY; JANJIGIAN, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

As estratégias terapêuticas para outros tipos de tumores como pulmão, mama e melanoma evoluíram consideravelmente com base em alvos moleculares e com os anticorpos monoclonais, fato que não se aplica ao câncer gástrico. Além disso, a terapia convencional para o CG não tem se mostrado eficiente. Logo, existe uma necessidade pela busca de novas estratégias terapêuticas potencialmente eficazes ao CG (SUTTER; FECHNER, 2006).

2.7 GLICOSILAÇÃO NO CÂNCER

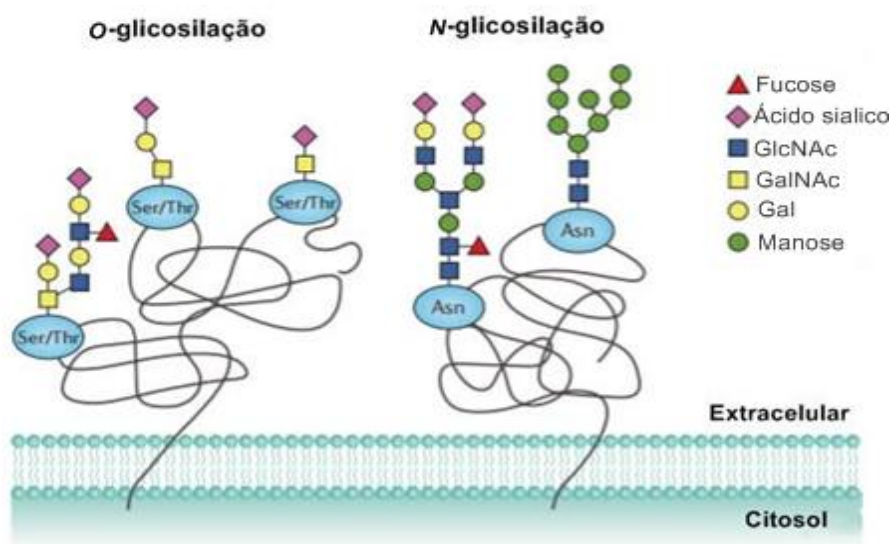
A glicosilação é um evento bioquímico pós-traducional e/ou co-traducional comum às proteínas. Trata-se de um mecanismo celular que regula muitos processos biológicos. Os glicoconjugados caracterizam-se pela ligação covalente de diversos tipos de carboidratos a proteínas, lipídios, carboidratos ou outros compostos orgânicos. Essa reação é catalisada pelas glicosiltransferases (GTs), que utilizam substratos com doadores de açúcar específicos (REIS et al., 2010).

As glicosiltransferases fazem parte de uma grande família de proteínas com cerca de 200 a 300 enzimas envolvidas na biossíntese de oligossacarídeos, polissacarídeos e glicoconjugados (WASSLER, 2013). São moléculas que possuem uma enorme diversidade tanto estrutural quanto funcional. As mais frequentes são aquelas que transferem um resíduo de açúcar de um nucleótideo difosfato (por exemplo, UDP Gal,GDP Man) para moléculas aceitadoras específicas, por meio de ligações glicosídicas (BRETON et al., 2006; LAIRSON et al., 2008).

Existem dois tipos principais de glicosilação, a *N*-glicosilação e a *O*-glicosilação que são altamente dinâmicas e medeiam várias vias de sinalização. Ambas podem estar presentes na mesma proteína de uma mesma célula. A *N*-glicosilação é caracterizada pela união do açúcar ao grupamento amina de um resíduo de asparagina. Já a *O*-glicosilação consiste na união do

açúcar a uma hidroxila de um resíduo de serina ou treonina (Figura 7) (OHTSUBO; MARTH, 2006; REIS et al., 2010; WANG, 2004).

Figura 7 - Representação de O-glicosilação e N-glicosilação em proteínas.



Fonte: (Adaptado de MUNKLEY, MILLS; ELLIOTT, 2016).

Os *N*-glicanos têm um papel funcional no processo de sinalização e adesão celular e, quando estão presentes aberrantes ou truncadas nas células cancerígenas, são associados com a invasão e metástases. A mucina é um tipo de glicoproteína mais frequentemente *O*-glicosilada que estão superexpressas em carcinomas, fato que corrobora a substancial parte dos biomarcadores glicosilados no câncer. Além disso, os *O*-glicanos desempenham papéis importantes na invasão e sobrevivências das células tumorais na corrente sanguínea. Muitas moléculas com padrão de glicosilação alterado podem ser qualitativamente ou quantitativamente alteradas podendo assumir uma forma truncada em células cancerígenas (BROCKHAUSEN, 1999; REIS et al., 2010; ZHAO et al., 2008).

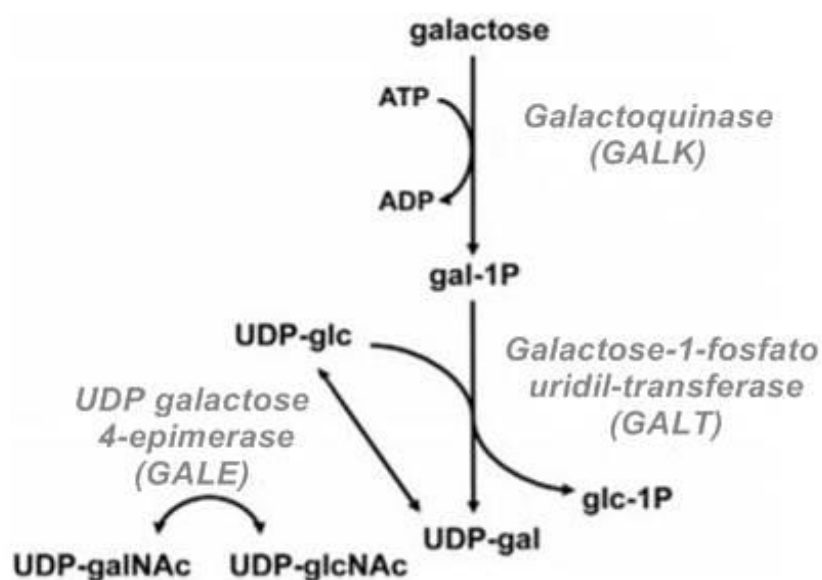
As células tumorais apresentam inúmeras alterações no perfil de glicosilação quando comparadas a células de tecidos normais. Essas alterações podem ser causadas, por exemplo, por alterações na expressão das glicosiltransferases. Além disso, a progressão do câncer pode resultar na secreção dessas glicomoléculas que podem refletir o padrão de glicosilação alterada

nas células cancerígenas, e, portanto, podem ser potenciais candidatos a biomarcadores (MUNKLEY; MILLS; ELLIOTT, 2016).

2.7.1 UDP glicose 4-epimerase

A galactose é um componente das células dos mamíferos. Sua epimerização em glicose ocorre no fígado e envolve vários substratos que atuam na via Leloir do metabolismo da galactose. Inicialmente a enzima galactocquinase fosforila a galactose para galactose 1-fosfato, que na sequência é convertida para UDP-galactose pela enzima galactose-1-fosfato uridil-transferase. Posteriormente, a UDP-galactose é isomerada a UDP-glicose pela enzima UDP galactose 4-epimerase que pode entrar novamente no ciclo (Figura 8). As atividades dessas enzimas são de grande importância para manutenção dos padrões de polissacarídeos da superfície celular em células com crescimento acelerado (EKLUND, 2007; ROBINSON; KALCKAR; HOSPITAL, 1966).

Figura 8 - Metabolismo da galactose (Via de Leloir). A enzima UDP galactose 4-epimerase, atua no terceiro passo da via catalisando de forma reversível a conversão de UDP-galactose em UDP-glicose. Também atua convertendo UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-galNAc) em UDP-N-acetilglucosamina (UDP-glcNAc).

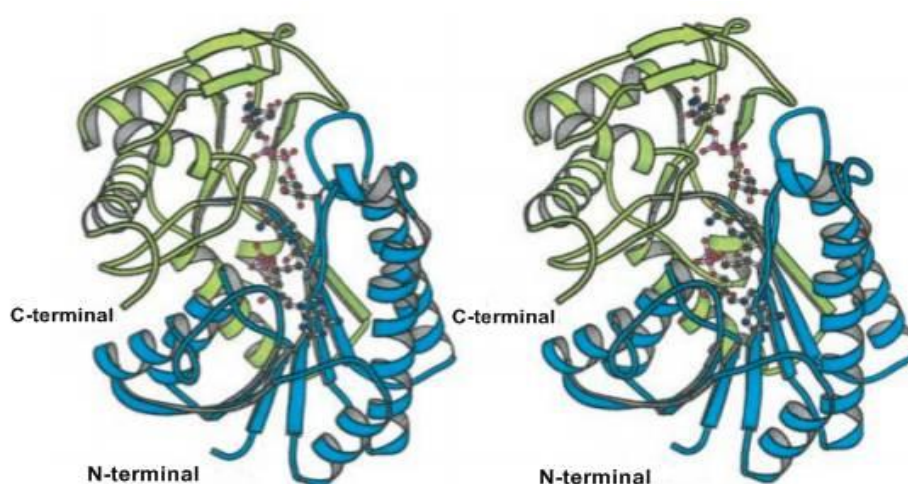


Fonte: (Adaptado de DAENZER et al., 2012).

A enzima UDP-glicose 4-epimerase, também denominada UDP-galactose 4-epimerase (GALE; EC.5.1.3.2) é um membro da superfamília desidrogenase/redutase de cadeia curta. As enzimas pertencentes a esta superfamília atuam em inúmeras reações bioquímicas. A UDP-glicose 4-epimerase pode ser frequentemente encontrada em células de mamíferos, células

bacterianas, fúngicas e de vegetais. A enzima humana é uma epimerase homodimérica com cada subunidade contendo 348 resíduos de aminoácidos, apresentando dois sítios ativos e dois cofatores NAD^+ que estão fortemente unidos. A cadeia polipeptídica da molécula dobra-se em duas regiões: o domínio N-terminal e pelo domínio C-terminal (Figura 9) (SHIN et al., 2015; THODEN et al., 2001; TIMSON, 2005; ZINSSER et al., 2015).

Figura 9 - Representação da subunidade da estrutura de UDP-galactose 4-epimerase humana. Os limites de UDP-glucose e NADH são exibidos em representações ovais e em fivelas. O domínio N-terminal, é mostrado em azul, e o domínio C-terminal, é exibido em verde.



Fonte: (Adaptado de THODEN et al., 2001).

Funcionalmente a UDP galactose 4-epimerase atua catalisando a conversão reversível de UDP-galactose (UDP-Gal) em UDP-glucose (UDP-Glc) no terceiro passo da via Leloir no metabolismo da galactose. Além desse papel catabólico, a enzima também possui papéis biossintéticos, atuando também na interconvenção de UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc) e UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). Logo, possui uma importante ação metabólica em células humanas, influenciando a biossíntese de glicoproteínas e glicolípídeos (DAENZER et al., 2012; SCHULZ et al., 2004; WENA et al., 2014).

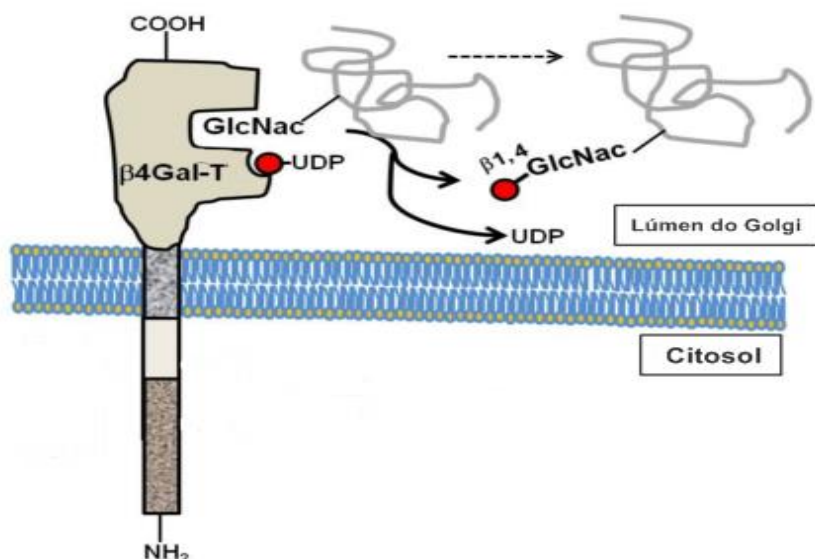
É sabido que no câncer o crescimento celular ocorre em ritmo muito acelerado quando comparado às células normais. Logo, a biossíntese de glicoproteínas e glicolípídeos aumenta substancialmente para suprir esta demanda. Esse fato remete a atividade da UDP-galactose para a biossíntese dessas glicomoléculas que possuem um papel importante para as células tumorais, atuando no reconhecimento celular, na sinalização e no processo de metástase (TANG; ETOKIDEM; LAI, 2016).

2.7.2 Beta 1,4 galactosiltransferase 3

As galactosiltransferases fazem parte de uma extensa família que são classificadas em subfamílias denominadas com os prefixos β 1,4-, β 1,3-, α 1,3-, α 1,4- e α 1,6. As β -1,4-galactosiltransferases (β 4GalTs). São proteínas de membrana do tipo II que possuem a especificidade para transferir uma UDP-galactose ativa em uma ligação β 1,4 a açúcares aceitantes tais como N-acetilglicosamina (GlcNAc), Glicose (Glc), Galactose (Gal) e até Xilose (Xil) (RAMAKRISHNAN et al., 2004; WASSLER, 2013).

Alguns dos membros da subfamília β -1,4-galactosiltransferase (B4GALT) já foram caracterizados (Gal T1 a Gal T7) e compartilham semelhanças quanto à sequência, mas possuem diferentes distribuições de tecidos, especificidade do substrato aceitante e funções biológicas diferentes. Estruturalmente, as B4GALT compartilham uma sequência de sinal hidrofóbico N-terminal que direciona a proteína para o complexo de Golgi que, em seguida, permanece sem clivagem para funcionar como uma âncora transmembranar (Figura 10) (AL-OBAIDE et al., 2015; WASSLER, 2013).

Figura 10 - Ilustração estrutural dos membros da subfamília B4GALT que compartilham semelhanças quanto à sequência. A figura demonstra o isômero de uma B4GALT catalisando a transferência de UDP-galactose (círculo vermelho) para um resíduo terminal de N-acetilglicosamina (GlcNAc) em uma glicoproteína recém-sintetizada no lúmen do complexo de Golgi.



Fonte: (Adaptado de WASSLER, 2013).

A β -1,4-galactosiltransferase III (B4GALT3) catalisa a formação de ligações de N-acetilactosamina na matriz extracelular transferindo a galactose ligada a UDP-Gal da uridina difosfato para oligossacarídeos N-acetilglicosaminas (GlcNAc) para formar N-

acetilgalactosamina. Repetição das unidades de N-acetilgalactonasaminas se prolongam para formar poli-N-acetilgalactosamina nas cadeias de N-glicanos, O-glicanos, glicolípidos ou glicosaminoglicanos (CHEN et al., 2014). Alguns estudos relatam que B4GALT3 desempenha papéis importantes no processo carcinogênico, atuando na proliferação, invasão e metástase (CHEN et al., 2014; LIAO et al., 2015; SUN et al., 2016).

CHANG e colaboradores (2013) observaram em seu estudo que B4GALT3 está associado a um prognóstico desfavorável para pacientes com neuroblastoma, podendo regular os fenótipos invasivos através da modulação da glicosilação, degradação e sinalização da β 1-integrina (CHANG et al., 2013). Contudo, os dados sobre a B4GALT3 diferem em relação ao tipo de câncer. Por exemplo, em câncer colorretal esta enzima está negativamente associada à metástase (CHEN et al., 2014). Já em câncer cervical, a B4GALT3 tem sua expressão aumentada quando comparado aos tecidos adjacentes normais. Além disso, a baixa expressão dessa enzima suprime a migração e invasão de células câncer cervical HeLa e C33A (SUN et al., 2016). No entanto, a literatura não apresenta dados sobre o papel B4GALT3 em células de câncer gástrico.

Portanto, como os biomarcadores utilizados na prática clínica não apresentam sensibilidade e especificidade para serem completamente confiáveis, e como a glicosilação alterada das proteínas é uma característica das células neoplásicas, estes apresentam-se como uma fonte promissora para novos biomarcadores (CONNELLY et al., 2016).

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

Trata-se de um estudo transversal, analítico e de caráter retrospectivo. Do arquivo do Serviço de Patologia do Hospital do Câncer de Pernambuco- HCP foram selecionados setenta e um pacientes com câncer gástrico primário do tipo adenocarcinoma, diagnosticados entre o período de 2013 a 2016. Dos prontuários médicos foram obtidas as seguintes variáveis: idade, sexo, tipo do tumor, localização, estadiamento patológico, tipo tratamento, número e local de linfonodos, linfonodos positivos, recidiva, metástase e óbito. Os espécimes clínicos foram previamente fixados em formalina tamponada e emblocadas em parafina. As amostras clínicas obtidas para o estudo tiveram aprovação pelo Certificado de Apresentação para Apreciação Ética- CAAE (CAAE: 39976214.90000.5205).

3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os blocos de parafina de tumores primários (N= 71) foram cortados em micrótomo em 4 µm de espessura, montados em lâminas silanizadas, desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes em álcool etílico (100%, 95%, 80% e 70%). Em seguida foi feita a recuperação antigênica com tampão citrato 100 mM, pH 6.0 em micro-ondas 300 W por 15 min. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas com bloqueador de peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio) 3% (p/v) por 30 min à temperatura ambiente e posteriormente foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com o bloqueador proteico tampão fosfato-salino-albumina de soro bovino (PBS-BSA) 1% (p/v) por 30 min a temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos primário β-1,4-galactosiltransferase III (CUSABIO) e UDP glicose 4-epimerase (CUSABIO) 1:200 em PBS-BSA 1% (p/v) por 18 h a 4 °C ou 2 h a 37 °C. O excesso do anticorpo foi retirado com duas lavagens com tampão PBS. Em seguida, foi aplicado o sistema de amplificação utilizando kits comerciais Easylink On, ImmPRESS™ e DAKO EnVision™ por 30 a 50 min de acordo com as recomendações do fabricante a temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram reveladas com DAB-H₂O₂ e contracoradas com hematoxilina. Os controles positivos foram utilizados segundo indicação do fabricante dos anticorpos e os controles negativos foram estabelecidos através da substituição do anticorpo primário por anticorpo anti-IgG humana (DAKO).

3.3 ANÁLISE DE IMAGENS

A análise histomorfológica foi realizada com um sistema integrado de análises de imagens utilizando microscópio BIOPTICA B20 acoplado a uma câmera CMOS (resolução de 2584 x 1936 pixels) com o software de captura de imagem ISCapture. Os casos que apresentaram marcações enzimática em mais de 10% das células neoplásicas nos diferentes graus de intensidade foram considerados positivos e os que não apresentaram foram caracterizados como negativos. A localização celular enzimática: combinações citoplasmáticas, membranas, perinuclear e nuclear foram associadas aos parâmetros clínico-patológicos e aos parâmetros de desfecho.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

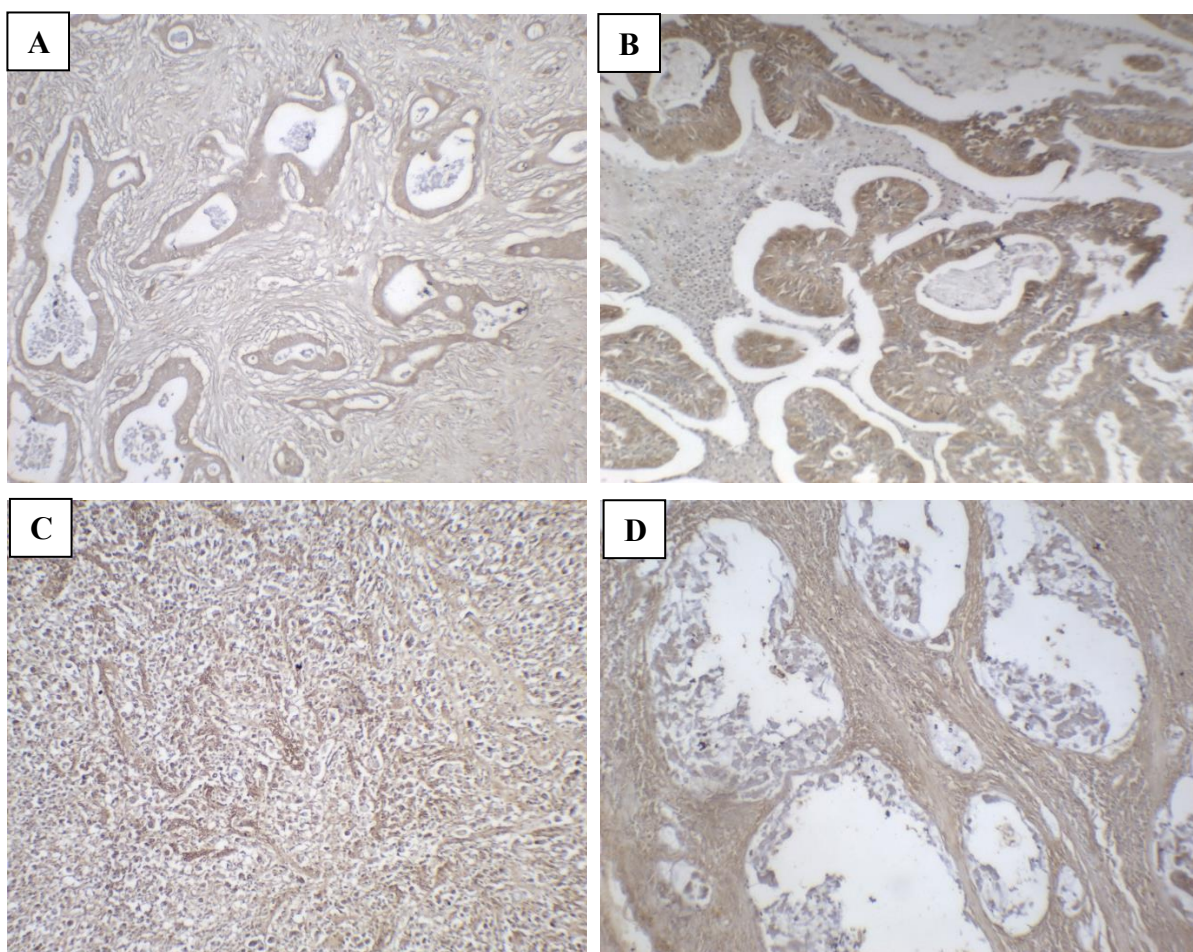
Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism versão 6.00. Para as análises de associação foi utilizado o teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$. Para análise dos parâmetros de desfecho foram utilizadas curvas de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier com Log-Rank.

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO TECIDUAL DE UDP GLICOSE 4-EPIMERASE EM AMOSTRAS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Os 71 pacientes do com adenocarcinoma gástrico incluídos no estudo, tinham idade média de aproximadamente $59,4 \pm 12,9$ (*range* = 30-89) anos. Dos quais, 47 (66,1 %) eram do sexo masculino e 24 (33,9 %) do sexo feminino. As análises por imuno-histoquímica revelaram que 48 (67,6%) amostras foram positivas e 23 (32,4%) negativas para GALE. Os tipos histológicos de CG encontrados nas análises corresponderam aos tipos tubular, papilar, mucinoso e mal diferenciado (Figura 11 A-D).

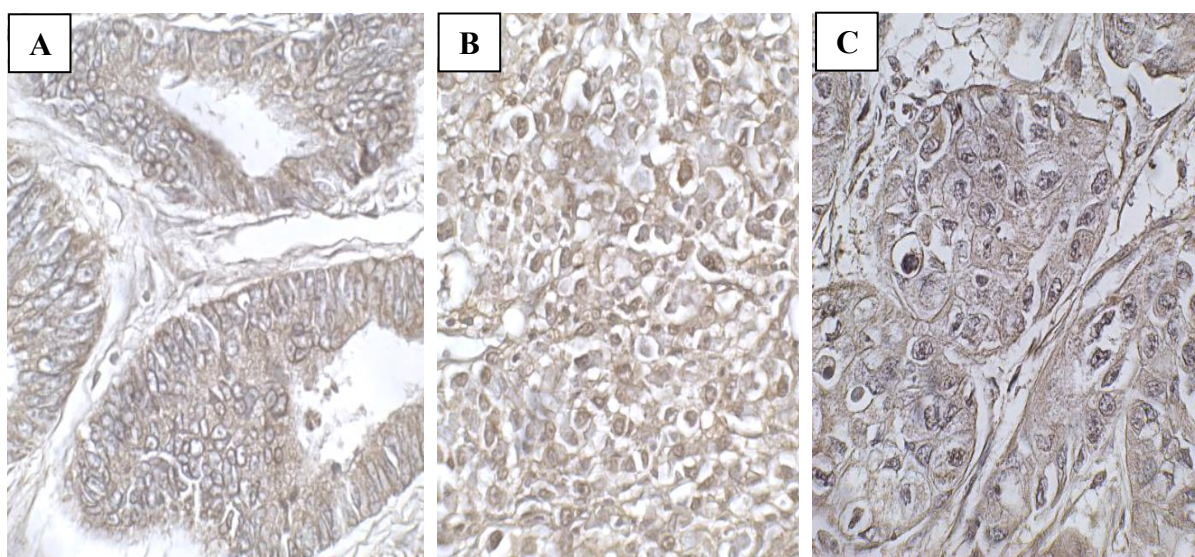
Figura 11 - Fotomicrografias dos tipos histológicos evidenciados pela imuno-histoquímica de GALE. Região tubular (A), região papilar (B), região pouco diferenciada (C) e região de mucina delimitada (D) no aumento de 100x.



Fonte: (Do autor, 2018).

Todas as amostras que apresentaram lesões tubulares foram positivas para GALE, com predomínio da marcação citoplasmática, enquanto que as lesões desdiferenciadas foram negativas para a enzima. A marcação celular por GALE foi citoplasmática em 24 amostras (33,8%), nuclear em 3 (4,2%) e 44 (61,9%) mostraram combinações com marcação citoplasmática, nuclear, perinuclear e de membrana (Figura 12 A-C).

Figura 12 - Fotomicrografias de adenocarcinoma gástrico evidenciando os tipos de localização celular marcados pela enzima GALE. Citoplasmática e perinuclear (A) nuclear (B) e membranar (C) no aumento de 400x.



Fonte: (Do autor, 2018).

Além disso, 35 amostras (49,3%) das 71 investigadas apresentaram áreas correspondentes ao tecido normal adjacente, em que 29 (82,9%) foram positivos para GALE e 6 (17,1%) negativos. Ademais, a reatividade por GALE foi observada na camada basal dos ductos e nas células produtoras das glândulas gástricas, com predominância de marcação no citoplasma e na membrana das células epiteliais.

4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TECIDUAL DE UDP GLICOSE 4-EPIMERASE EM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E DE DESFECHO DO CG

A marcação de GALE foi investigada em relação aos parâmetros clínico-patológicos da doença. Houve associação significativa com o grau histológica bem e moderadamente diferenciado ($p < 0,0001$) quando comparada a tecido pouco diferenciado (Tabela 1).

Tabela 1 - Associação entre a expressão da enzima UDP glicose 4-epimerase com as principais características clínico-patológicas classificadas pela imuno-histoquímica em amostras de adenocarcinoma gástrico.

Características clínico-patológicas	UDP glicose 4-epimerase (+) n (%)	UDP glicose 4-epimerase (-) n (%)	p Value
Idade (anos)			
<60	22 (30.9)	13 (18.3)	0.4537
≥60	26 (36.6)	10 (14.1)	
Sexo			
Feminino	14 (19.7)	10 (14.1)	0.2873
Masculino	34 (47.9)	13 (18.3)	
Cirurgia			
Gastro total	27 (38.02)	12 (16.9)	0.8023
Gastro parcial	21 (29.5)	11 (15.5)	
Tratamento Inicial			
I	43 (60.6)	23 (32.3)	0.1667
III	5 (7.0)	0 (0)	
Estadiamento Cirúrgico (TNM)			
I e II	10 (14.1)	9 (12.7)	0.1515
III e IV	38 (53.5)	14 (19.7)	
Acometimento Linfonodal			
SIM	32 (45.0)	12(16.9)	0.2992
NÃO	16 (22.5)	11 (15.5)	
Status Nodal			
>0,3	19 (26.8)	7 (9.8)	0.5999
<0,3	29 (40.8)	16 (22.5)	

Grau Histológico			
GI + GII	32 (45.0)	3 (4.2)	<0.0001
GIII	16 (22.5)	20 (28.2)	
Quimioterapia			
SIM	28 (39.4)	11 (15.5)	0.4522
NÃO	20 (28.2)	12 (16.9)	
Radioterapia			
SIM	15(21.1)	7 (9.8)	1.0000
NÃO	33 (46.5)	16(22.5)	
Recidiva			
SIM	8 (11.3)	7 (9.8)	0.2207
NÃO	40 (56.3)	16 (22.5)	

Fonte: (Do autor, 2018).

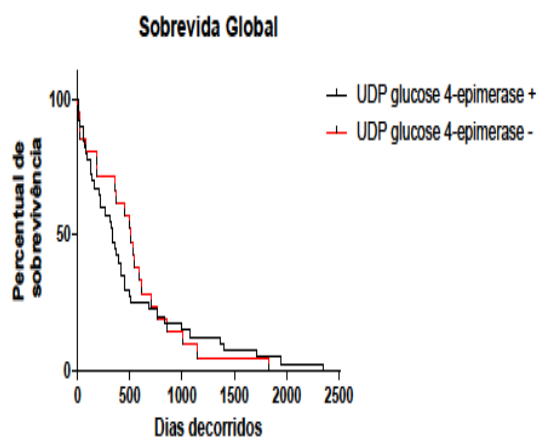
Análises adicionais referentes à idade, sexo, tipo de cirurgia, tratamento inicial, estadiamento cirúrgico, comprometimento linfonodal, status nodal, quimioterapia, radioterapia e recidiva não foram significativas.

Associações com os parâmetros de desfecho não foram significativas. As análises estatísticas relacionas à sobrevida global revelaram que as amostras com marcação positiva para GALE apresentaram sobrevida média de 334,5 dias, enquanto as amostras negativas uma sobrevida média de 514,0 dias ($p = 0,6658$). Em relação à sobrevida livre da doença, as amostras com marcação positiva e as amostras com marcação negativa tiveram uma sobrevida média de, respectivamente 11,50 e 19,00 meses ($p = 0,2289$) (Gráficos 1A e 1B).

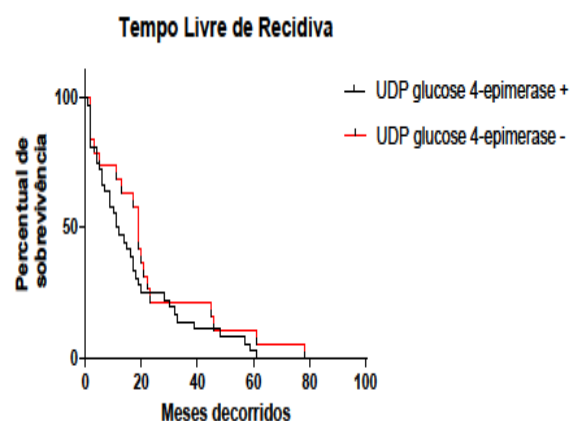
Ademais, associações entre a localização da marcação celular e os parâmetros clínico-patológicos também não foram estatisticamente significantes, assim como, as associações com parâmetros de desfecho (sobrevida global e sobrevida livre de doença) ($p > 0,05$).

Gráfico 1 - Associações com os parâmetros de desfecho. Sobrevida global ($p= 0,6658$) (A) e sobrevida livre da doença ($p= 0,2289$) (B).

A



B

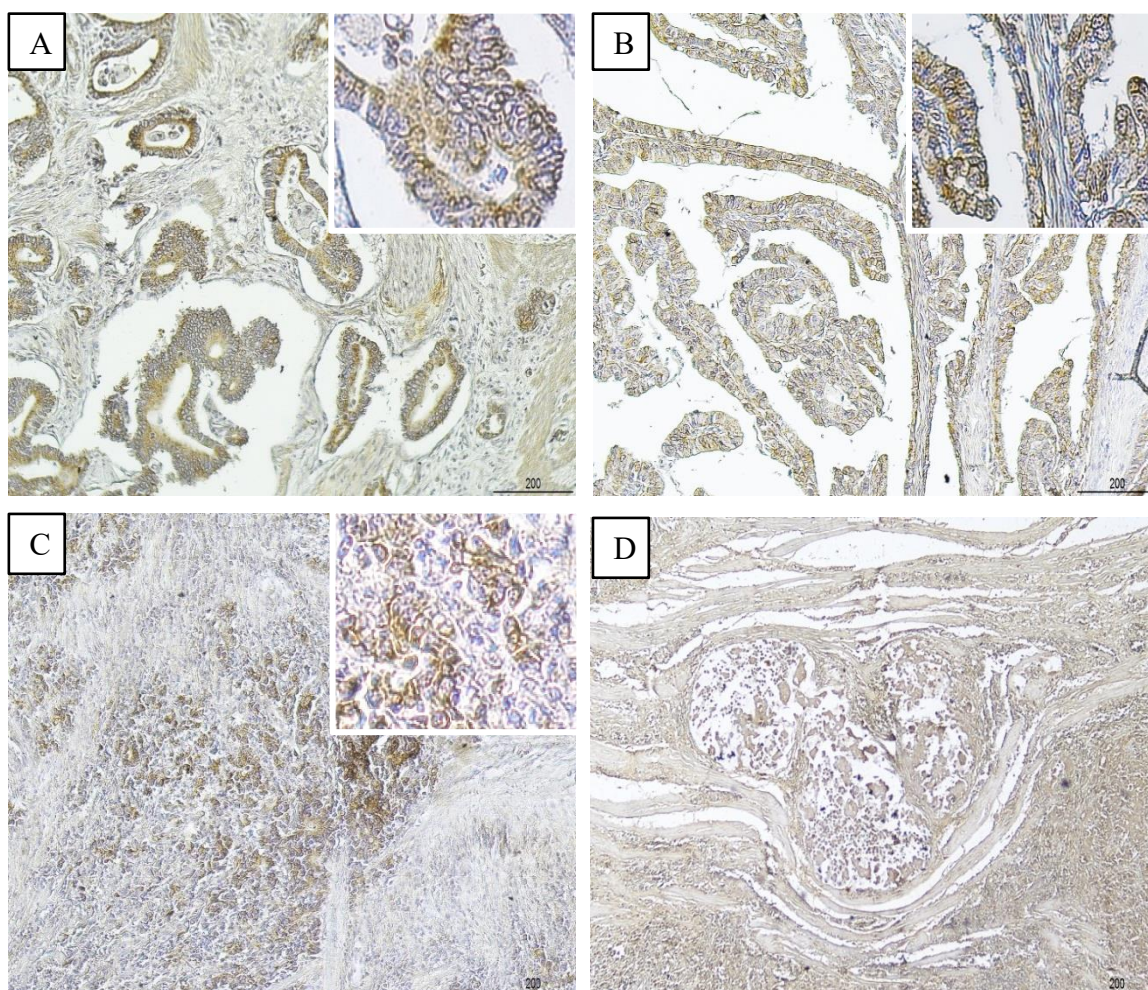


Fonte: (Do autor, 2018).

4.3 EXPRESSÃO TECIDUAL DE BETA 1,4 GALACTOSILTRANSFERASE 3 EM AMOSTRAS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Os 70 pacientes com adenocarcinoma gástrico incluídos no estudo, tinham idade média de aproximadamente $58,9 \pm 12,7$ ($range = 30-89$) anos. Dos quais, 45 (64,2%) eram do sexo masculino e 25 (35,7%) do sexo feminino. As análises por imuno-histoquímica revelaram que das 70 amostras 48 (68,6%) foram positivas e 22 (31,4%) negativas para B4GALT3. Os tipos histológicos encontrados nas análises corresponderam aos tipos tubular, papilar, mucinoso e mal diferenciado (Figura 13 A-D).

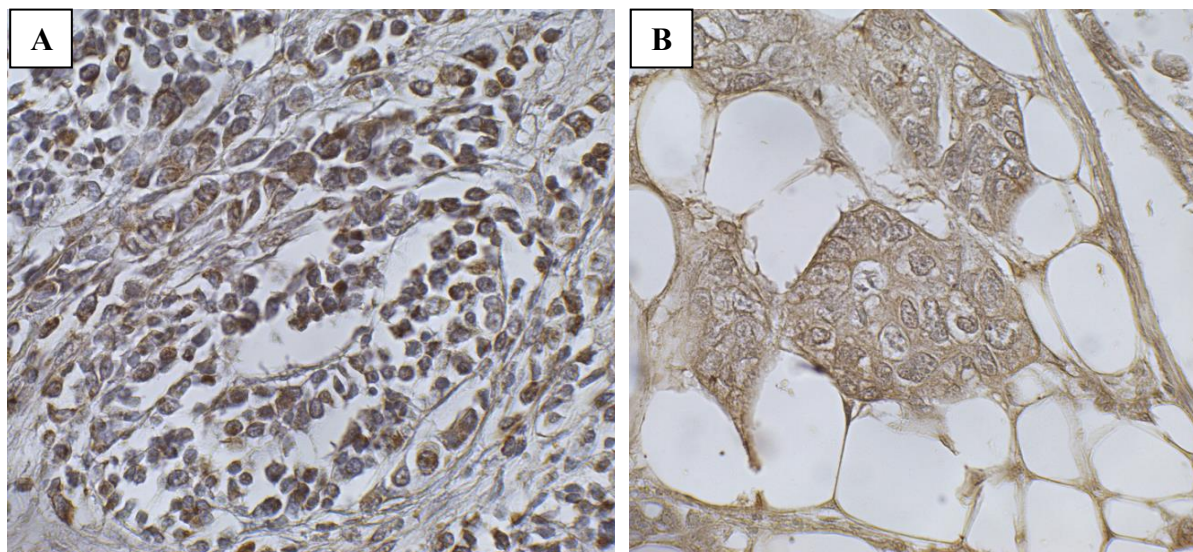
Figura 13 - Fotomicrografias dos tipos histológicos evidenciados pela imuno-histoquímica de B4GALT3. Região tubular (A), região papilar (B), região mal diferenciada (C) e região de Mucina delimitada (D) no aumento de 100x.



Fonte: (Do autor, 2018).

Todas as amostras que apresentaram lesões diferenciadas com células em anel de sinete foram negativas para B4GALT3, enquanto todas as amostras com lesões papilares foram positivas. A localização celular da marcação de B4GALT3 mostrou-se predominantemente citoplasmática 45 (100%) em todos os subtipos histológicos encontrados, apenas 2 (4,4%) apresentaram marcações combinadas citoplasmática e nuclear e 1 (2,2%) apresentou marcação citoplasmática e membranar (Figura 2 A-B).

Figure 14 - Fotomicrografias de adenocarcinoma gástrico evidenciando os tipos de localização celular marcados pela enzima B4GALT3. Nuclear (A), citoplasmática e membranar (B) no aumento de 400x.



Fonte: (Do autor, 2018).

Além disso, 16 amostras das investigadas apresentaram áreas correspondentes ao tecido normal adjacente, dessas, 15 (93,7%) foram positivas para B4GALT3 e 1 (6,2%) negativa. Por meio de análises pareadas, observamos que 7 amostras com neoplasia positiva para B4GALT3 apresentaram tecido normal adjacente também positivo para a enzima, enquanto 8 amostras com neoplasia negativa apresentaram marcação positiva na contrapartida normal, e, apenas 1 amostra com neoplasia negativa para a enzima apresentou marcação das células normais. Ademais, as marcações foram evidenciadas em sua maior parte nas células produtoras normais.

4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TECIDUAL DE 1,4 GALACTOSILTRANSFERASE 3 EM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E DE DESFECHO DO CG

A marcação tecidual de B4GALT3 foi investigada em relação aos parâmetros clínico-patológicos da doença. Houve associação significativa com o grau histológico bem e moderadamente diferenciado ($p < 0,0002$) e com os estadiamentos (III e IV) ($p < 0,0010$). Análises adicionais referentes à idade, sexo, tipo de cirurgia, tratamento inicial, acometimento linfonodal, status nodal, quimioterapia, radioterapia e recidiva não foram significativas ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Associação entre a expressão da enzima Beta 1,4galactosyltransferase 3 com as principais características clínico-patológicas classificadas pela imuno-histoquímica em amostras de adenocarcinoma gástrico.

Características clínico- patológicas	Beta 1,4galactosyl transferase 3 (+) n (%)	Beta 1,4galactosyltrans ferase 3 (-) n (%)	P Value
Idade (anos)			
<60	21 (30)	15 (21.4)	0.0739
≥60	27 (38.5)	7 (10)	
Sexo			
Feminino	14 (20)	11 (15.7)	0.1117
Masculino	34 (48.5)	11 (15.7)	
Cirurgia			
Gastro total	27 (38.6)	10 (14.3)	0.4475
Gastro parcial	21 (30)	12 (17.1)	
Tratamento Inicial			
I	45 (64.2)	21 (30)	1.0000
III	3 (4.2)	1 (1.4)	
Estadiamento Cirúrgico (TNM)			
I e II	7 (10)	12 (17.1)	0.0010
III e IV	41 (58.5)	10 (14.2)	
Acometimento Linfonodal			
NÃO	14 (20)	11 (15.7)	0.1117
SIM	34 (48.6)	11 (15.7)	
Status Nodal			
>0,3	19 (27.1)	5 (7.1)	0.1888
<0,3	29 (41.4)	17 (24.2)	
Grau Histológico			
GI + GII	30 (42.8)	3 (4.2)	0.0002
GIII	18 (25.7)	19 (21.1)	
Quimioterapia			
SIM	25 (35.7)	13 (18.6)	0.6157
NÃO	23 (32,8)	9 (12,8)	

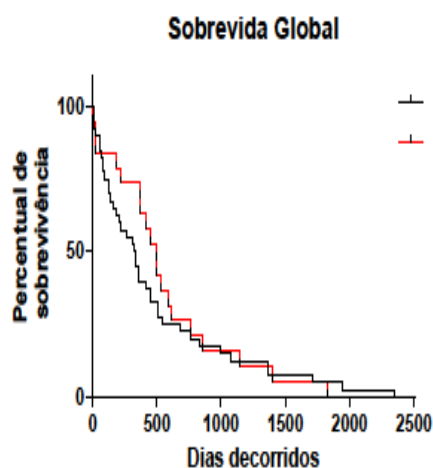
Radioterapia			
SIM	14 (20)	8 (11.4)	0.5868
NÃO	34 (48.5)	14 (20)	
Recidiva			
SIM	10 (14.2)	5 (7.1)	1.0000
NÃO	38 (54.2)	17 (24.2)	

Fonte: (Do autor, 2018).

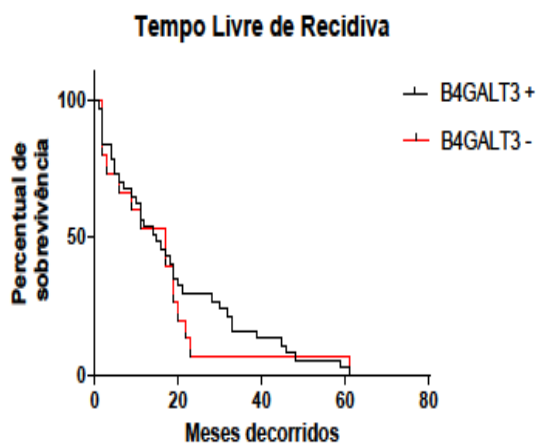
Associações com os parâmetros de desfecho não foram significativas. As análises estatísticas relacionadas à sobrevida global revelaram que as amostras com marcação positiva para B4GALT3 apresentaram sobrevida média de 327,0 dias, enquanto as amostras negativas uma sobrevida média de 496,0 dias ($p=0,5703$). Em relação à sobrevida livre da doença, as amostras com marcação positiva e as amostras com marcação negativa tiveram uma sobrevida média de, respectivamente, 15,00 e 17,00 meses ($p=0,6619$) (Gráficos 2A e 2B).

Gráfico 2 - Associações com os parâmetros de desfecho. Sobrevida global ($p=0,5703$) (A) e sobrevida livre da doença ($p=0,6619$) (B).

A



B



Fonte: (Do autor, 2018).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que a expressão da GALE está associada ao adenocarcinoma gástrico com graus histológicos bem e moderadamente diferenciados. A marcação por GALE foi predominantemente citoplásmica nas lesões tubulares, também houve marcação membranar, perinuclear e nuclear a esse e a outros padrões histológicos. Estes incluem papilar, mucinoso e pouco diferenciado. Além disso, a análise de segmentos normais revelou positividade para GALE nas glândulas gástricas com perfil de marcação citoplasmática e membranar.

A UDP-galactose é um intermediário no metabolismo da D-galactose, a via Leloir, uma via metabólica anfibólica conhecida, que é conservada da *Escherichia coli* para os seres humanos. Alterações na atividade da GALE podem levar ao acúmulo de UDP-galactose, causando estresse, impedindo o crescimento celular e a lise celular em meio complexo (LEE et al., 2009; PETRY; REICHARDT, 1998).

Em seu estudo, Lee e colaboradores (2009) propõem o mecanismo pelo qual a ausência do GALE causa o fim do crescimento celular. Este autor fez uso de cepas negativas de *Escherichia coli* da GALE, e observou que a bacteriostase na presença de D-galactose provém diretamente da deficiência de pirimidina ou de um pool de nucleotídeos desequilibrado. Isso pode ser porque uma quantidade suficiente de uridina e citidina é importada da mídia para apoiar a síntese de RNA, mas não é suficiente para produzir intermediários de UDP, como a UDP-glicose para a síntese de peptidoglicano (LEE et al., 2009).

Em nosso estudo, a expressão de GALE em adenocarcinomas gástricos bem e moderadamente diferenciados pode estar relacionada a um perfil celular menos agressivo. No entanto, Mitteldorf et al. (2010) observaram que a expressão do mRNA do GALE foi significativamente diferente nas amostras benignas e malignas da tireoide, sendo superexpressa no carcinoma papilífero da tireoide (MITTELDORF et al., 2010). Vale ressaltar que os estudos aqui comparados estudam tumores e alvos distintos em diferentes níveis moleculares. No entanto, o carcinoma papilífero da tireoide é um tumor bem diferenciado e isso está de acordo com nossos resultados.

Além disso, encontramos amostras positivas para GALE em áreas adjacentes ao tumor que correspondem ao tecido normal. De acordo com a sua atividade normal, a enzima é um componente dessas células atuando no metabolismo da galactose e influenciando a biossíntese de glicoproteínas e glicolipídios (SCHULZ et al., 2004).

Com relação a B4GALT3, as amostras de adenocarcinoma gástrico apresentaram uma

maior expressão tecidual da enzima associando-se ao grau tumoral bem e moderadamente diferenciado. Ou seja, a expressão da glicosiltransferase foi detectada quando as células neoplásicas ainda se assimilavam histologicamente as células normais. Em analogia a este dado, no câncer colorretal a expressão tecidual da enzima foi associada à histologia bem e moderadamente diferenciada, enquanto uma baixa expressão de B4GALT3 foi associada à histologia mal diferenciada, fases avançadas e a metástase. Nesse tipo de neoplasia, a marcação por B4GALT3 foi demonstrada na região supranuclear do aparelho de Golgi (CHEN et al., 2014). Observamos que B4GALT3 está associada ao estadiamento (III e IV). Demonstrando que sua expressão tecidual também pode estar relacionada a estágios mais avançados da doença.

Os dados sobre a B4GALT5 diferem quanto aos tipos de câncer. CHANG e colaboradores (2013) observaram através de análises por imuno-histoquímica de 101 pacientes com neuroblastoma que B4GALT3 está associada a um prognóstico desfavorável, sendo correlacionada a estágios clínicos avançados, histologia desfavorável, assim como, a uma menor taxa de sobrevivência. O mesmo estudo observou que essa glicosiltransferase pode regular os fenótipos invasivos através da modulação da glicosilação, degradação e sinalização da β 1-integrina (CHANG et al., 2013).

Em seu estudo, Liao e colaboradores (2015) demonstraram que a expressão de B4GALT3 também regula a invasão de trofoblastos através da modificação da glicosilação da β 1-integrina durante a gravidez. Esses dados podem ser atribuídos ao fato de que, erroneamente, o câncer codifica informações genéticas semelhantes às observadas durante as fases embrionárias (LIAO et al., 2015).

No câncer cervical, SUN e colaboradores (2016) observaram através de análises da expressão gênica, que B4GALT3 tem sua expressão aumentada quando comparado a tecidos normais. Além disso, observaram que o silenciamento de B4GALT3 suprime a migração e invasão de células das linhagens de câncer cervical HeLa e C33A (SUN et al., 2016a).

Nossos dados apontam uma predominância no tipo de localização da marcação citoplasmática. O que é justificado pelo fato de B4GALT3 ser membro da família β 1,4 galactosiltransferase, caracterizadas por serem proteínas de membrana tipo II que compartilham uma sequência de sinal hidrofóbico N-terminal direcionando a proteína para o complexo de Golgi, funcionando como uma âncora transmembranar (WASSLER, 2013). Embora os estudos relatados abordem aspectos tumorais diferentes ao do câncer gástrico, a expressão da enzima foi igualmente associada a características clínico-patológicas.

Dessa forma, sugerimos que alterações no perfil de glicosilação, característico das células neoplásicas, resultam principalmente da expressão de glicosiltransferases como a GALE e a B4GALT3.

6 CONCLUSÃO

- Nossos dados demonstraram que pacientes com adenocarcinoma gástrico apresentam um aumento na expressão tecidual das enzimas GALE e B4GALT3;
- Além disso, os resultados obtidos sugerem uma possível utilização da enzima como biomarcador de prognóstico, uma vez que tanto GALE quanto B4GALT3 estão associadas a parâmetros clínico-patológicos;
- No entanto, ambas não apresentaram associações aos parâmetros de desfecho (Sobrevida Global e Sobrevida Livre da Doença);

REFERÊNCIAS

- ACCESS, O. A. Annals of Oncology Advance Access published February 9, 2016 1. **Annals of Oncology**, p. 1–27, 2016.
- AJANI, J. A. et al. Gastric adenocarcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.
- AL-OBAIDE, M. A. I. et al. Multifaceted roles of 5'-regulatory region of the cancer associated gene B4GALT1 and its comparison with the gene family. **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 4, p. 1393–1404, 2015.
- ALATENGBAOLIDE et al. Lymph node ratio is an independent prognostic factor in gastric cancer after curative resection (R0) regardless of the examined number of lymph nodes. **American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials**, v. 36, n. 4, p. 325–330, 2013.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Treatment & Survivorship Facts & Figures 2016-2017. **American Cancer Society**, p. 44, 2016.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Treatment choices by type and stage of stomach cancer. Disponível em < <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/treating/by-stage.html>>. Acesso em: 28 jan. 2018.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. What is stomach cancer? Disponível em< <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/about/what-is-stomach-cancer.html>>. Acesso em: 24 jan. 2018.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures. **Cancer**, 2017.
- BERLTH, F. et al. Pathohistological classification systems in gastric cancer : Diagnostic relevance and prognostic value. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 19, p. 5679–5684, 2014.
- BRETON, C. et al. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. **Glycobiology**, v. 16, n. 2, p. 29–37, 2006.
- BROCKHAUSEN, I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1473, n. 1, p. 67–95, 1999.
- BROCKHAUSEN, I. et al. UDP-Gal: GlcNAc-R β 1,4-galactosyltransferase - A target enzyme for drug design. Acceptor specificity and inhibition of the enzyme. **Glycoconjugate Journal**, v. 23, n. 7–8, p. 525–541, 2006.
- CATALANO, V. et al. Gastric cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 71, n. 2, p. 127–164, 2009.
- CHANG, H. H. et al. β -1,4-Galactosyltransferase III enhances invasive phenotypes via β 1-integrin and predicts poor prognosis in neuroblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 7, p. 1705–1716, 2013.
- CHEN, C. H. et al. β -1,4-Galactosyltransferase III suppresses β 1 integrin-mediated invasive phenotypes and negatively correlates with metastasis in colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 6, p. 1258–1266, 2014.

CHEN, Y. et al. Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer. **Pathology & Oncology Research**, 2015.

CHEN, Y. C. et al. Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer. **Pathology and Oncology Research**, v. 22, n. 1, p. 197–202, 2016.

CHENG, X. J.; LIN, J. C.; TU, S. P. Etiology and Prevention of Gastric Cancer. **Gastrointestinal Tumors**, v. 3, n. 1, p. 25–36, 2016.

CHO, J.; KANG, M. S.; KIM, K. M. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and specific features of the accompanying immune response. **Journal of Gastric Cancer**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2016.

COLA, C. B. et al. Tratamento cirúrgico do câncer gástrico em pacientes jovens : experiência de 05 anos no INCA. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p. 135–141, 2005.

CONNELLY, M. A. et al. Inflammatory glycoproteins in cardiometabolic disorders, autoimmune diseases and cancer. **Clinica Chimica Acta**, p. 177–186, 2016.

CORREA, P.; PIAZUELO, M. B. Helicobacter pylori Infection and Gastric Adenocarcinoma. **US gastroenterology & hepatology review**, v. 7, n. 1, p. 59–64, 2011.

DAENZER, J. M. I. et al. UDP-Galactose 4'-epimerase activities toward UDP-Gal and UDP-GalNAc play different roles in the development of Drosophila melanogaster. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 5, p. 1–9, 2012.

DEGIULI, M. et al. Gastric cancer: Current status of lymph node dissection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 10, p. 2875–2893, 2016.

DICKEN, B. J. et al. Gastric adenocarcinoma: Review and considerations for future directions. **Annals of Surgery**, v. 241, n. 1, p. 27–39, 2005.

DOUGLAS E. GUGGENHEIM, MD AND MANISH A. SHAH, M. Gastric Cancer Epidemiology and Risk Factors. **Journal of Surgical Oncology**, v. 107, p. 230–236, 2012.

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Annals of Surgical Oncology**, v. 17, n. 6, p. 1471–1474, 2010.

EKLUND, E. A. 4 . 19 Diseases Associated with Carbohydrates / Glycoconjugates *. v. 7, n. 7, 2007.

EL-RIFAI, W.; POWELL, S. M. Molecular Biology of Gastric Cancer. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 12, n. 2, p. 128–140, 2002.

FRANCESCHI, S.; WILD, C. P. Meeting the global demands of epidemiologic transition - The indispensable role of cancer prevention. **Molecular Oncology**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2013.

FUKAYAMA, M.; USHIKU, T. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. **Pathology Research and Practice**, v. 207, n. 9, p. 529–537, 2011.

GARATTINI, S. K. et al. Molecular classifications of gastric cancers: Novel insights and possible future applications. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 9, n. 5, p. 194, 2017.

- GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236–247, 2011.
- GIORDANO, A.; CITO, L.; FOUN-, P. Advances in gastric cancer prevention. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 3, n. 9, p. 128–136, 2012.
- GOROCICA ROSETE, P. et al. Comportamiento tumoral y glicosilación. **Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, v. 21, n. 4, p. 190–197, 2008.
- HAMILTON, S. R.; AALTONEN, L. A. The new World Health Organization classification of lung tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. **International Agency for Research on Cancer (IARC) Pathology**, v. 18, n. 6, p. 1059–1068, 2001.
- HOME NATURAL REMEDIES CURES. Stomach cancer – symptoms, causes and other risk factors. Disponível em < <https://www.homenaturalcures.com/stomach-cancer>>. Acesso em: 15 fev. 2018.
- HSU, C.-W. et al. Novel Method for Differentiating Histological Types of Gastric Adenocarcinoma by Using Confocal Raman Microspectroscopy. **Plos One**, v. 11, p. 1–12, 2016.
- HU, B. et al. Gastric cancer : Classification , histology and application of molecular pathology. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 3, n. 3, p. 251–261, 2012a.
- HU, B. et al. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. **Journal Gastrointest Oncology**, v. 3, p. 251–261, 2012b.
- INCA- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Disponível em < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em : 03 fev. 2018.
- INCA- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa | 2016 Incidência de Câncer no Brasil. Disponível < <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- ISHAQ, S.; NUNN, L. Helicobacter pylori and gastric cancer: A state of the art review. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 8, n. 6, p. S6–S14, 2015.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica: texto e atlas. 12. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KANAVOS, P. The rising burden of cancer in the developing world. **Annals of Oncology**, v. 17, n. SUPPL. 8, p. 15–23, 2006.
- KANEKO, S.; YOHIMURA, T. Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975–1989. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 3, p. 400–405, 2001.
- KARIMI PARISA, ISLAMI FARHAD, SHARMILA ANANDASABAPATHY, NEAL D. FREEDMAN, F. K. et al. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 23, n. 5, p. 700–713, 2014.
- KATONA, B. W.; RUSTGI, A. K. Gastric Cancer Genomics: Advances and

Future Directions. **Cmgh**, v. 3, n. 2, p. 211–217, 2017.

KIM, Y. et al. Profiling cancer-associated genetic alterations and molecular classification of cancer in Korean gastric cancer patients. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 69888–69905, 2017.

LAIRSON, L. L. et al. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 521–555, 2008.

LAYKE, J. C.; LOPEZ, P. P. Gastric Cancer: Diagnosis and Treatment Options. 2004.

LEAL, M. F. et al. What gastric cancer proteomic studies show about gastric carcinogenesis ? **Tumor Biology**, 2016.

LEE, S. J. et al. Cellular stress created by intermediary metabolite imbalances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 46, p. 19515–19520, 2009.

LIAO, W. C. et al. β -1,4-galactosyltransferase III suppresses extravillous trophoblast invasion through modifying β 1-integrin glycosylation. **Placenta**, v. 36, n. 4, p. 357–364, 2015.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, AND S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, v. 136, p. 823–837, 2009.

LUU, C. et al. Does histology really influence gastric cancer prognosis? **Gastroenterology**, v. 152, n. 5, p. S1217, 2017.

MA, J. et al. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer (Review). **Oncology Letters**, n. 5, p. 2959–2964, 2016.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271–289, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). ABC DO CÂNCER: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. Disponível em < http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf >. Acesso em: 13 jan. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Adenocarcinoma de Estômago. Disponível em < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Portaria-Conjunta-DDT-Adenocarcinoma-de-Estomago-17-07-2018.pdf> >. Acesso em: 20 jan. 2018.

MITTELDORF, C. A. T. DA S. et al. FN1, GALE, MET, and QPCT Overexpression in Papillary Thyroid Carcinoma: Molecular Analysis Using Frozen Tissue and Routine Fine-Needle Aspiration Biopsy Samples. **Diagnostic cytopathology**, v. 39, n. 8, p. 556–561, 2010.

MUNKLEY, J.; MILLS, I. G.; ELLIOTT, D. J. The role of glycans in the development and progression of prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 6, p. 324–333, 2016.

OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. **CELL**, p. 855–867, 2006.

PETRY, K. G.; REICHARDT, J. K. V. The fundamental importance of human galactose metabolism: Lessons from genetics and biochemistry. **Trends in Genetics**, v. 14, n. 3, p. 98–

102, 1998.

RAMAKRISHNAN, B. et al. Structure and catalytic cycle of β -1,4-galactosyltransferase. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, n. 5, p. 593–600, 2004.

REIS, C. A. et al. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. **Journal of Clinical Pathology**, v. 2, 2010.

RIBEIRO, M. M. et al. Prognostic significance of Lauren and Ming classifications and other pathologic parameters in gastric carcinoma. **Cancer**, v. 47, n. 4, p. 780–784, 1981.

ROBINSON, A.; KALCKAR, M.; HOSPITAL, M. G. Metabolic Galactose Inhibition 4-Epimerase of Mammalian Uridine in Cell Cultures Diphosphate in Tumor Cells *. n. 12, p. 2737–2745, 1966.

RYU, H. et al. C-C motif chemokine receptors in gastric cancer (Review) HYE WON. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 8, p. 3–8, 2017.

SANKARANARAYANAN, R.; RAMADAS, K.; QIAO, Y. LIN. Managing the changing burden of cancer in Asia. **BMC Medicine**, v. 12, n. 1, 2014.

SAÚDE, M. DA. **ABC DO CÂNCER: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. [s.l.: s.n.].

SAÚDE, M. DA S.-S. DE A. À. Adenocarcinoma de Estômago. 2018.

SCHULZ, J. M. et al. Determinants of function and substrate specificity in human UDP-galactose 4'-epimerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32796–32803, 2004.

SHAH, M. A. et al. Molecular classification of gastric cancer: A new paradigm. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 9, p. 2693–2701, 2011.

SHANG, J.; PENA, A. S. Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 11, n. 27, p. 4131–9, 2005.

SHIN, S. M. et al. The structural basis of substrate promiscuity in UDP-hexose 4-epimerase from the hyperthermophilic Eubacterium Thermotoga maritima. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 585, p. 39–51, 2015.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2018.

SMYTH, E. C. et al. Gastric cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 27, n. August 2016, p. v38–v49, 2016.

SONG, P. et al. Age-specific effects on the prognosis after surgery for gastric cancer : A SEER population-based analysis. **Oncotarget**, 2016.

SPIRO, R. G. Role of N-linked polymannose oligosaccharides in targeting glycoproteins for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 61, p. 1025–1041, 2004.

SUN, Y. et al. B4GALT3 up-regulation by miR-27a contributes to the oncogenic activity in human cervical cancer cells. **Cancer Letters**, v. 375, n. 2, p. 284–292, 2016a.

SUN, Y. et al. B4GALT3 up-regulation by miR-27a contributes to the oncogenic activity in human cervical cancer cells. **Cancer Letters**, v. 375, n. 2, p. 284–292, 2016b.

SUTTER, A. P.; FECHNER, H. Gene therapy for gastric cancer: Is it promising? v. 12, n. 3, p. 380–387, 2006.

TAKAHARI, D. Second-line chemotherapy for patients with advanced gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 20, n. 3, p. 395–406, 2017.

TANG, M.; ETOKIDEM, E.; LAI, K. The Leloir Pathway of Galactose Metabolism – A Novel Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. **Anticancer Research**, v. 36, n. 12, p. 6265–6272, 2016.

TANG, Q. et al. Peiminine serves as an adriamycin chemosensitizer in gastric cancer by modulating the EGFR/FAK pathway. **Oncology Reports**, v. 3, 2018.

TARAZONA, N. et al. Personalised Treatment in Gastric Cancer: Myth or Reality? **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 7, 2016.

THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK*. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, v. 513, p. 202–209, 2014.

THODEN, J. B. et al. Human UDP-galactose 4-Epimerase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 4, p. 15131–15136, 2001.

THRUMURTHY, S. G. et al. The diagnosis and management of gastric cancer. **Bmj**, v. 347, n. nov04 1, p. f6367–f6367, 2013.

TIMSON, D. J. Functional analysis of disease-causing mutations in human UDP-galactose 4-epimerase. **FEBS Journal**, v. 272, n. 23, p. 6170–6177, 2005.

TONETO, M. G. Estado atual do tratamento cirúrgico do adenocarcinoma gástrico avançado. **Rev AMRIGS**, v. 56, n. 1, p. 81–86, 2012.

TSAI, M.-C. et al. Health disparities are associated with gastric cancer mortality-to-incidence ratios in 57 countries. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 44, p. 7881–7887, 2017.

WANG, P.-H. ALTERED SIALYLATION AND SIALYLTRANSFERASE EXPRESSION IN GYNECOLOGIC CANCERS. **J Obstet Gynecol**, v. 43, p. 53–63, 2004.

WASSLER, M. β 1,4-Galactosyltransferases, Potential Modifiers of Stem Cell Pluripotency and Differentiation. Capítulo.16 In: BHARTIYA, DEEPA and LENKA, NIBEDITA. **Pluripotent Stem Cells**, 2013.

WENA, Y. et al. The critical role of UDP-galactose-4-epimerase in osteoarthritis: Modulating proteoglycans synthesis of the articular chondrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 452, n. 4, p. 906–911, 2014.

ZALI, H.; REZAEI-TAVIRANI, M.; AZODI, M. Gastric cancer: Prevention, risk factors and treatment. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 4, n. 4, p. 175–185, 2011.

ZHAO, Y.-Y. et al. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. **Cancer Science**, v. 99, n. 7, p. 1304–1310, 2008.

ZINSSER, V. L. et al. UDP-galactose 4'-epimerase from the liver fluke, *Fasciola hepatica*: biochemical characterisation of the enzyme and identification of inhibitors. **Parasitology**, v. 142, n. 3, p. 463–72, 2015.

APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO DE PESQUISA

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA – MESTRADO EM ONCOLOGIA –										
Mestranda: Maria de Fátima Deodato de Souza										
CÂNCER GÁSTRICO					FICHA DE REGISTRO Nº: 					
Nome do Paciente:										
Sexo	Masc ☐	Fem ☐					Data de Entrada:			
Naturalidade:							Data de Nascimento:			
Residência (cidade e estado):							Data da Cirurgia:			
Escolaridade										
COR : Branca ☐ Parda ☐ Negra ☐										
TRABALHO: empregado ☐ desempregado ☐ licença de saúde ☐ aposentado ☐ trabalho doméstico ☐ outros ☐										
Analfabeto ☐		Básico ☐		Médio ☐		Superior ☐		Completo ☐		Incompleto ☐
Tabagismo	Sim ☐		Não ☐		Ex ☐		Tipo/Dose:			
Etilismo	Sim ☐		Não ☐		Ex ☐		Tipo/Dose:			
IMC										
INFORMAÇÃO SOBRE A DOENÇA E TRATAMENTO										
Outros Tumores		Sim ☐		Não ☐		Qual:				

Outras Informações – Comorbidades

Diabetes – S / N

Hipertensão – S / N

Doenças Auto-imunes – S / N

Infecções Crônicas – S / N

Uso de medicações – S / N : quais:

Passado cirúrgico – S / N

Descrição da Lesão:					cTNM:
					cEstádio:
Localização	FUNDO ☐	CORPO ☐	ANTRO ☐	PILORO ☐	
	LINFONODOS ☐	OUTROS ☐	Qual:		
Tratamento Inicial		Tratamento Adjuvante (Pós)			Data do tratamento inicial:

INFORMAÇÕES SOBRE PACIENTES COM INDICAÇÃO DE CIRURGIA				
Tipo de Cirurgia				TNM-ESTADIAMENTO:
Margens Livres	☐ Sim ☐ Não	Linfadenectomia	Número de Linfonodos	Número de linfonodos:
Tratamento adjuvante	☐ Sim ☐ Não			

RESPOSTA TERAPÊUTICA – Para pacientes com adenocarcinomas metastático Recidiva
--

Resposta estável ☐

Parcial ☐ completa ☐ Progressão ☐

HISTOPATOLOGIA	
Nº Cirurgia:	
OUTRAS INFORMAÇÕES	