



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
LABORATÓRIO DE IMUNOMODULAÇÃO E NOVAS ABORDAGENS
TERAPÊUTICAS

MÁRIO SÉRGIO DE SOUZA ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASES COMO
POTENCIAIS BIOMARCADORES NO CÂNCER GÁSTRICO**

Recife
2018

MÁRIO SÉRGIO DE SOUZA ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASES COMO
POTENCIAIS BIOMARCADORES NO CÂNCER GÁSTRICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.
Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Co-Orientadores: Profa. Dra. Luiza Rayanna Amorim Lima

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Recife
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Albuquerque, Mário Sérgio de Souza.

AVALIAÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASES COMO POTENCIAIS
BIOMARCADORES NO CÂNCER GÁSTRICO / Mário Sérgio de Souza
Albuquerque. - Recife, 2018.

76 p. : il., tab.

Orientador(a): Maira Galdino da Rocha Pitta

Cooorientador(a): Luiza Rayanna Amorim Lima

Cooorientador(a): Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2018.

Inclui referências.

1. Câncer Gástrico. 2. Imunohistoquímica. 3. Glicosiltransferases. 4.
ppGalNAc-T15. 5. ppGalNAc-T16. I. Pitta, Maira Galdino da Rocha.
(Orientação). II. Lima, Luiza Rayanna Amorim. (Cooorientação). IV. Rêgo,
Moacyr Jesus Barreto de Melo. (Cooorientação). V. Título.

610 CDD (22.ed.)

MÁRIO SÉRGIO DE SOUZA ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASES COMO
POTENCIAIS BIOMARCADORES NO CÂNCER GÁSTRICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.
Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde

Aprovado em: 23/03/2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vália Pereira Hernandes

Instituição: Departamento de Imunologia - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Profa. Dra. Gabriela Ayres Fragoso Nascimento

Instituição: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE

Prof. Dr. Jaciel Benedito de Oliveira

Instituição: Departamento de Anatomia - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

RESUMO

O câncer gástrico (CG) é caracterizado como a terceira principal causa de morte, relacionada ao câncer em todo o mundo, e a falta de um marcador de prognóstico preditivo e de seguimento é preocupante para a prática clínica. A glicosilação aberrante precede as características patológicas do câncer e é determinada, em parte, pela ação das glicosiltransferases na formação de glicoconjugados dos tumores em diferentes etapas da oncogênese, diferenciação e metástase. O presente estudo avaliou a marcação tecidual das glicosiltransferases ppGalNAc-T15 e ppGalNAc-T16 por imuno-histoquímica, em associação com os dados clínicos-patológicos e de desfecho dos pacientes. Foram incluídas 70 amostras de CG no estudo para ppGalNAc-T15 e 72 para ppGalNAc-T16. Os tumores foram classificados de acordo com sua área marcada, sendo aqueles com ausência de marcação ou apenas com uma área focal marcada considerados não reativos, e os pacientes com marcação leve, moderada e intensa como reativos. Dentre o total de amostras, foi observado que 37 pacientes expressaram marcação positiva para ppGalNAc-T15. Além disso, foram encontradas associações entre a expressão de ppGalNAc-T15 e a idade dos pacientes e o tipo de cirurgia realizada. Pacientes com idade superior a 60 anos ($p=0,0306$) e que foram submetidos à gastrectomia total ($p=0,0087$) foram reativos para enzima. Não foi encontrada significância nas análises dos parâmetros de sobrevida para expressão de ppGalNAc-T15. Para a ppGalNAc-T16, 42 amostras de pacientes foram reativas para enzima. A expressão da ppGalNAc-T16 não mostrou associação com os parâmetros clínicos, contudo nas análises dos parâmetros de desfecho, o tempo de sobrevida livre de recidiva foi significativamente maior para os indivíduos reativos ($p=0,0364$) com mediana em meses igual a 17, e para o grupo não-reativos a mediana foi de 11 meses. A ppGalNAc-T15 e ppGalNAc-T16 mostraram características promissoras como potencial biomarcador.

Palavras-chaves: Imuno-histoquímica; Glicosiltransferases; Neoplasias Gástricas

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is the third leading cause of cancer-related death worldwide, and the lack of a predictive prognostic marker and follow-up is a concern for clinical practice. Aberrant glycosylation precedes the pathological features of cancer and is determined, in part, by the action of glycosyltransferases in the formation of tumor glycoconjugates at different stages of oncogenesis, differentiation, and metastasis. The present study evaluated tissue staining of the glycosyltransferases ppGalNAc-T15 and ppGalNAc-T16 by immunohistochemistry, in association with the clinicopathological and outcome data of the patients. There were 70 GC samples included in the study for ppGalNAc-T15 and 72 for ppGalNAc-T16. Tumors were classified according to their stained area, with those with no staining or only a focal stained area considered nonreactive, and patients with mild, moderate, and intense staining as reactive. Among the total samples collected, 37 patients showed positive staining for ppGalNAc-T15. Furthermore, associations were found between ppGalNAc-T15 expression and patient age and type of surgery performed. Patients older than 60 years ($p=0.0306$) and who underwent total gastrectomy ($p=0.0087$) were reactive for enzymes. No significance was found in the analyses of survival periods for ppGalNAc-T15 expression. For ppGalNAc-T16, 42 patient samples were reactive for enzymes. The expression of ppGalNAc-T16 was not shown to be associated with clinical periods, however, in the analysis of stage periods, the recurrence-free survival time was significantly longer for reactive individuals ($p=0.0364$) with a median of months equal to 17, and for the non-reactive group the median lasted 11 months. Both of them, ppGalNAc-T15 and ppGalNAc-T16 showed promising features as potential biomarkers.

Keywords: Immunohistochemistry; Glycosyltransferases; Gastric Neoplasms

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Os <i>hallmarks</i> do câncer (modificado a partir da figura original de Hanahan e Weinberg)	14
FIGURA 2 - O câncer na América do Norte em 2016	15
FIGURA 3 - Divisões anatômicas do estômago e sua histologia	18
FIGURA 4 - Microfotografia Adenocarcinoma Gástrico evidenciando os subtipos intestinal e difuso	19
FIGURA 5 - Expressão de E-caderina nos subtipos de adenocarcinoma Gástrico	22
FIGURA 6 - Fluxograma de terapia para o câncer gástrico	23
FIGURA 7 - O-glicosilação e N-glicosilação	27
FIGURA 8 - Mucina e seus quatro núcleos de glicanos oriundos da O-glicosilação	28
FIGURA 9 - Ação da ppGalNAc-Ts adicionando substratos	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Perfil de Incidência do tipo de câncer mais frequente em Homens e Mulheres para cada região do Brasil segundo estimativas de novoscasos 2016/2017	16
TABELA 2 - Classificação histológica de tumores gástricos (WHO)	20
TABELA 3 - Sistema TNM para tumores gástricos (Estadiamento)	21
TABELA 4 - Características genéticas da família das ppGalNAc-Ts	30
TABELA 5 - Perfil de expressão da família das ppGalNAc-Ts em diferentes Tecidos	31
TABELA 6 - Associação entre a expressão das ppGalNAc-Ts em diferentes tipos de câncer	33

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU - Fluoracila medicamento quimioterápico

CA 19-9 - Marcador Tumoral para pacientes com câncer colo retal e de pâncreas

CA 72-4 - Marcador Tumoral para pacientes com tumores gastrointestinais e ovário

CEA - Antígeno Carcinoembrionário

CG - Câncer Gástrico

D1- cadeia linfática de linfonodos periféricos

D2 - cadeia linfática de linfonodos regionais

ECF - Tratamento quimioterápico combinado com Epirubicina, Cisplatina e Fluoracila

GIST - (do inglês, tumor gastrointestinal estromal)

INCA - Instituto Nacional de Câncer

(MMP2) - metaloproteinase2

(MMP-9) - metaloproteinase9

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

PpGalNAc-Ts/GALNTs - polipeptídeo N-acetilgalactosaminiltransferases nome genérico usado para retratar a família em geral.

PpGalNAc-T1 - polipeptídeo N-acetilgalactosaminiltransferases tipo 1

Região ORF - *Open Read Frame* (Regiões abertas de leitura)

TGF- β 1 - Fator transformante do crescimento

β 1TNM - (do inglês, Tumor, Node e Metástase)

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

UICC - União Internacional Contra o Câncer

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	11
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 O Câncer gástrico e sua epidemiologia	13
2.1.2 Aspectos Clínicos-Patológicos e Etiológicos.....	16
2.1.3 Terapia.....	22
2.2 Glicobiologia	25
2.2.1 Glicobiologia no Câncer.....	25
2.2.2 As polipeptídio n-acetilgalactosaminiltransferases.....	29
3- OBJETIVO GERAL	33
3.1 Objetivos Específicos	33
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Amostras Clínicas	34
4.2 Critérios de inclusão e exclusão	34
4.3 Imunohistoquímica.....	34
4.4 Análise das Imagens	35
4.5 Análise Estatística.....	35
5- RESULTADOS	36
5.1 CAPITULO 1	36
5.2 CAPITULO 2	47
6- DISCUSSÃO	57
7- CONCLUSÃO.....	62
8- PERSPECTIVAS	63
9- REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

O câncer pode ser caracterizado por um acúmulo de alterações genéticas multifatoriais que são oriundas de erros endógenos e/ou por influência de fatores externos. O aumento da sinalização proliferativa, assim como a resistência à apoptose, favorecem a sua sustentação, desencadeando um consequente aumento da morbidade e mortalidade nos pacientes (HANAHA; WEINBERG, 2011).

Entre os fatores de risco associados ao desenvolvimento do CG, além dos fatores genéticos, estão os hábitos alimentares e culturais, como o tabagismo e infecções secundárias (*Helicobacter pylori* e *Epstein-Barr*). Outros fatores como socioeconômicos e demográficos podem contribuir de forma significativa para o desenvolvimento do câncer (GULLEY, 2015; STEWART, B. W., WILD, 2014).

O câncer gástrico (CG) é um dos mais frequentes no mundo e, para o biênio de 2017- 2018 estima-se cerca de 21.290 mil casos no Brasil. O CG possui baixa sobrevida, uma vez que, somente cerca de um quinto dos indivíduos acometidos pela doença não recidivam. Esses desfechos ocorrem muito em parte devido a sua complexidade e heterogeneidade intratumoral (BRASIL, 2018).

Predizer os aspectos mais relevantes em relação à evolução das neoplasias é a melhor escolha terapêutica voltada para o paciente, com o uso das classificações histológicas, onde cada uma delas tem sua devida relevância no diagnóstico e seu valor prognóstico. Contudo, tais classificações tornaram-se por vezes falhas ou insuficientes em direcionar o tratamento correto (PULI et al., 2008).

Com o intuito de auxiliar também o melhor seguimento aos pacientes surgem os marcadores séricos, como é o caso do CA19-9 que também é usado para câncer de pâncreas e CA72-4 para câncer gástrico avançado. Outro exemplo seria o antígeno carcino embrionário (CEA) usado para seguimento de câncer de cólon, que foi estabelecido no final da década de 1960, quando foi descoberto que pacientes com este tipo de neoplasia apresentavam altos níveis desse marcador na corrente sanguínea (MATTAR et al., 2002).

A compreensão de mecanismos fisiológicos básicos na glicobiologia pode ser de grande ajuda para o estabelecimento de novas terapias. A reação de glicosilação ocorre tanto no câncer, quanto nos tecidos normais, com caráter pós-traducional ou co-traducional, alterando ou não, a

conformação molecular de algumas proteínas, incluindo as mucinas. Tais mudanças são, em parte, determinadas por fatores que incluem a atividade de glicosiltransferases e glicosidases, as quais sofrem influência direta do nosso genoma (DUARTE et al., 2016). Como consequência da glicosilação aberrante tem-se a formação de glicoconjugados associados a tumores, os quais desempenham papéis importantes, no desenvolvimento, diferenciação e metástase (HOLLINGSWORTH; SWANSON, 2004).

A família de enzimas denominadas como polipeptídios N-acetilgalactosaminiltransferases (PpGalNAc-Ts) são responsáveis por dar início às primeiras etapas da glicosilação e à formação da árvore glicídica, em glicoconjugados. Possuem cerca de 19 genes que as codificam, presentes em vários tecidos (BENNETT et al., 2012). Estão diferencialmente expressas em algumas neoplasias, tais como, câncer de mama, neuroblastoma e bexiga urinária e possuem características de biomarcador (HUSSAIN; HOESSLI; FANG, 2016; KONG et al., 2015). Dessa forma, a alteração na expressão de glicosiltransferases na glicosilação parece contribuir para a progressão e gênese tumoral, mas pouco se sabe sobre seu comportamento ou sua utilidade como potencial biomarcador no câncer gástrico.

A expressão ppGalNAc-Ts tem diferentes afinidades de substratos específicos, além de serem diferencialmente expressos em vários tecidos, o que contribui diretamente para sua homeostase (BENNETT et al., 2012; KONG et al., 2015). Contudo, o uso das isoformas ppGalNAc-T15 e T16 como possível biomarcador e alvo terapêutico para câncer gástrico ainda não está claro, caracterizando assim o ineditismo do presente trabalho.

A fim de entender os processos glicobiológicos nos mais variados tipos de câncer, bem como sua associação com o prognóstico do paciente, mais estudos são necessários. Portanto, este trabalho visa avaliar a expressão das isoformas ppGalNAc-T15 e T16 nos adenocarcinomas de câncer gástrico e sua associação com os dados clínicos patológicos, e indicadores de desfecho clínico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Câncer gástrico e sua epidemiologia

Existem diversas alterações no câncer. Algumas são comuns a todos, como por exemplo, o acúmulo de mutações e instabilidade genética que favorece a sustentação da sinalização proliferativa; o metabolismo celular desregulado; a evasão dos fatores supressores de crescimento; a resistência à morte celular pela apoptose; a evasão do sistema imunológico; a promoção da inflamação; a indução do processo de angiogênese; a invasão nos tecidos adjacentes e a metástase, que contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade, conforme ilustra a figura 1 (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Assim como os outros tipos de câncer, o câncer gástrico (CG) pode ser caracterizado pela proliferação descontrolada de células, eventual metástase e morte do indivíduo. Sua principal causa é o acúmulo de alterações genéticas, por vezes influenciadas por fatores ambientais de riscos diversos, pela perda de controle da supressão tumoral, o que resulta no aumento da expressão de oncogenes (DENG et al., 2012).

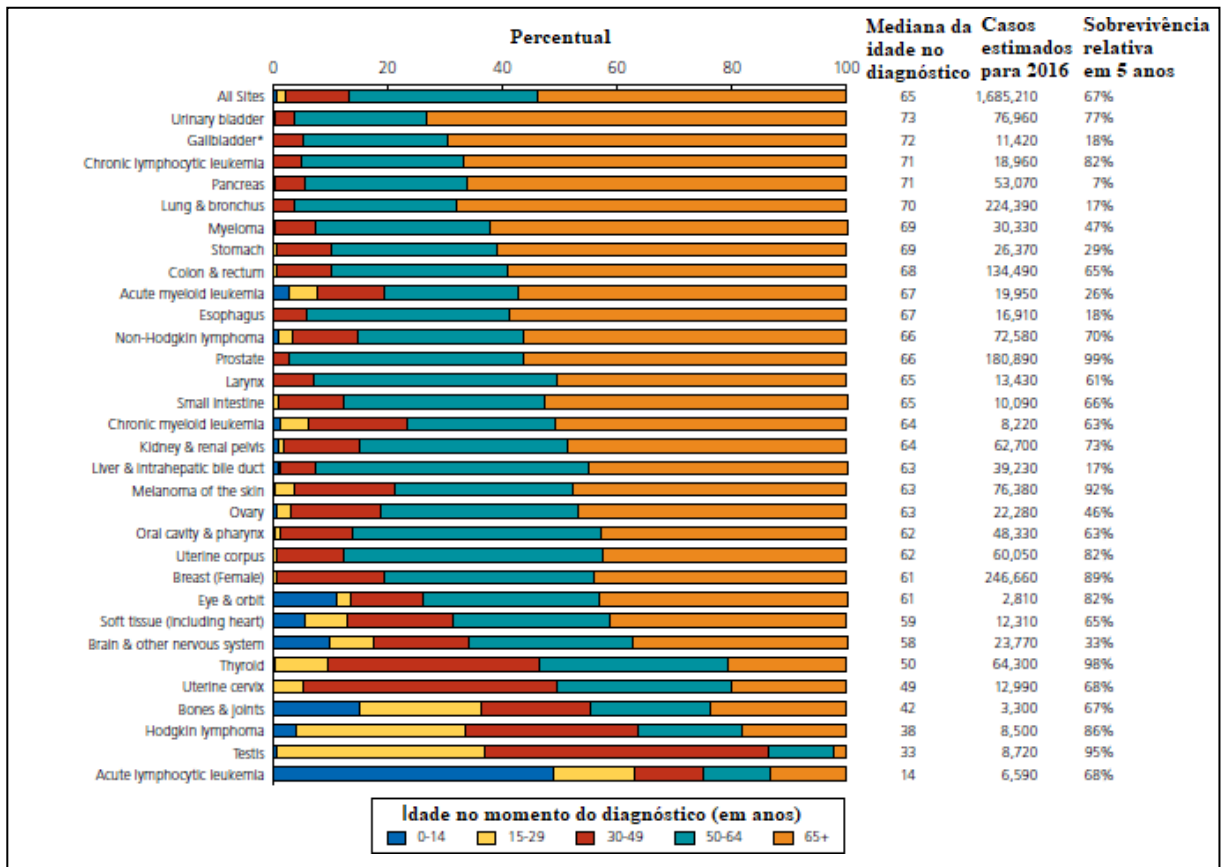
O CG é um problema de saúde pública mundial, sendo uma das neoplasias mais incidentes e com alto índice de mortalidade. Possui estatísticas preocupantes como: baixa sobrevida, apenas 20% dos indivíduos acometidos pela doença não recidivam, muito em parte devido a sua histologia tumoral ser complexa e heterogênea (DENG et al., 2012; STEWART, B. W., WILD, 2014).

Figura 1 - Os *hallmarks* do câncer

Fonte: Adaptado de (HANAHA; WEINBERG, 2011).

No mundo são esperados cerca de 27 milhões de novos casos de câncer até 2030 (BRASIL, 2018). Estima-se que haverá cerca de 1.735.350 de novos casos de câncer na América do Norte no biênio de 2017-2018. Desse total, 319.160 casos são esperados para o trato gastrointestinal e 26.240 novos casos para o câncer gástrico (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Conforme mostra a figura 2, os tumores do trato gastrointestinal possuem uma sobrevida em 5 anos bastante reservada, destacando as neoplasias de pâncreas (7%), esôfago (18%) e estômago (29%).

Figura 2 - O câncer na América do Norte 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.



Fonte: Adaptado de AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016

No Brasil, em geral as neoplasias ocupam o segundo lugar no *ranking* das causas de morte. Dessa forma, a doença representa um grande obstáculo, tanto para o orçamento dos serviços de saúde, quanto para a qualidade de vida dos pacientes. O número de casos estimados para o CG segundo a estimativa do INCA 2017-2018, é de 13.540 para os homens, e de 7.750 para mulheres (BRASIL, 2017).

Na região Nordeste, trata-se do segundo tipo tumoral mais frequente em homens, totalizando uma estimativa de 13,11 novos casos para cada 100 mil habitantes, e o sexto em mulheres com um total de novos casos de 7,32 para cada 100 mil habitantes. A tabela 1 ilustra o perfil de incidência de acordo com cada região do país (BRASIL, 2017).

Tabela 1- Perfil de Incidência do tipo de câncer mais frequente em Homens e Mulheres para cada região do Brasil segundo estimativas de novos casos 2016/2017

Regiões	Perfil por ordem de Incidência do tipo de Câncer mais frequente em Homens	Perfil por ordem de Incidência do tipo de Câncer mais frequente em Mulheres
Norte	Próstata, <u>Estômago</u> Traqueia, Brônquio e Pulmão, Cólon Reto e Bexiga.	Colo do útero, Mama feminina, Cólon e Reto, <u>Estômago</u> , Traqueia, Brônquio e Pulmão
Nordeste	Próstata, <u>Estômago</u> , Traqueia, Brônquio e Pulmão, Cólon e Reto, Cavidade Oral.	Mama feminina, Colo do útero, Cólon e Reto, Traqueia, Brônquio e Pulmão, <u>Estômago</u> .
Centro-Oeste	Próstata, Traqueia, Brônquio e Pulmão, Cólon e Reto, <u>Estômago</u> , Cavidade Oral	Mama feminina, Colo do útero, Cólon e Reto, Traqueia, Brônquio e Pulmão, Ovário, <u>Estômago</u>
Sudeste	Próstata, Cólon e Reto, Traqueia, Brônquio e Pulmão, Cavidade Oral, <u>Estômago</u>	Mama feminina, Cólon e Reto, Colo do útero, Traqueia, Brônquio e Pulmão, Colo do útero, <u>Estômago</u>
Sul	Próstata, Traqueia, Brônquio e Pulmão, Cólon e Reto, <u>Estômago</u> , Esôfago.	Cólon e Reto, Traqueia, Brônquio e Pulmão, Colo do útero, <u>Estômago</u> , Sistema Nervoso Central

Fonte: BRASIL(2017/2018)

2.1.1 Aspectos Clínicos-Patológicos e Etiológicos

O diagnóstico pode ser obtido por exames de imagem como: ultrassonografia, ressonância magnética e tomografia computadorizada de abdômen com auxílio do contraste, com a finalidade de planejar o tratamento de acordo com a extensão apresentada e definir o estadiamento, visto que, é comum a doença ser detectada em estágios avançados (BOHLE; SCHEIDIG; ZOLLER, 2011; KELLY et al., 2001; PULI et al., 2008).

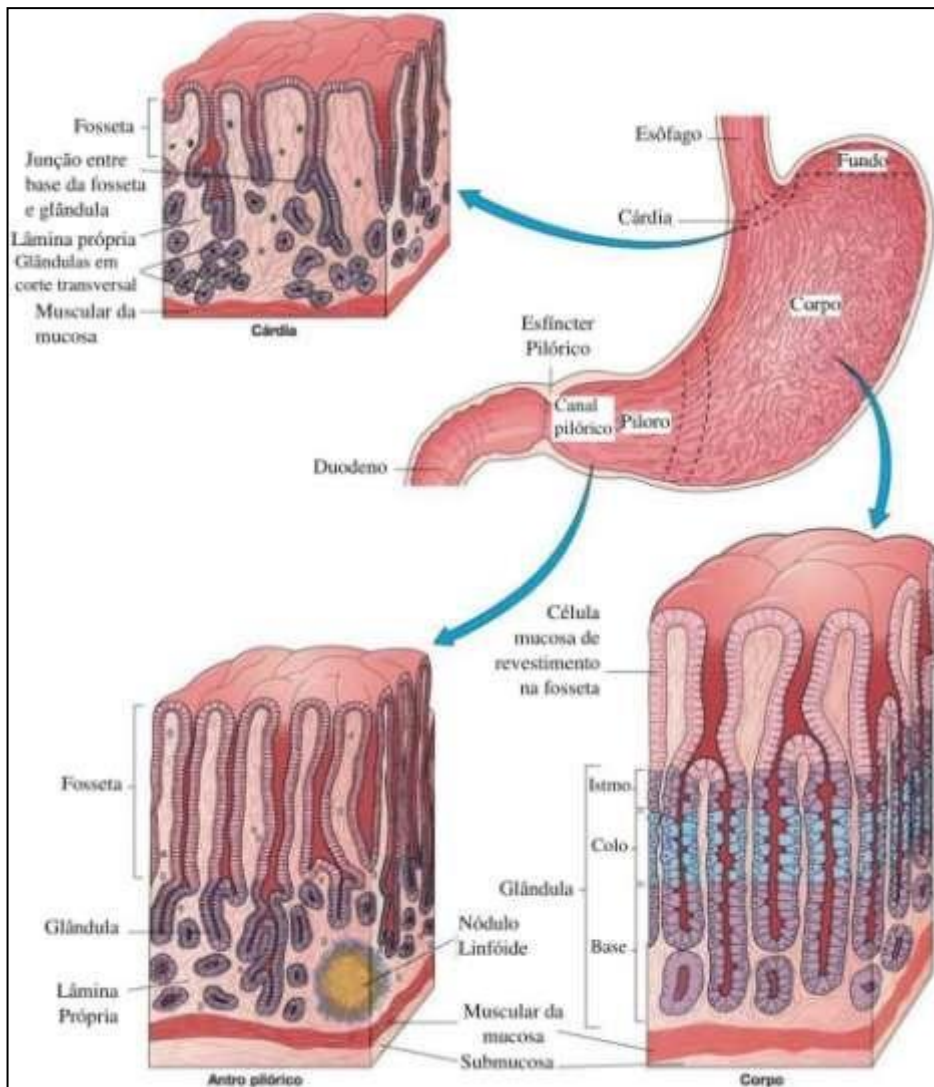
Em contrapartida, o diagnóstico clínico do câncer gástrico é difícil, pois pode cursar assintomático, inclusive, na sua fase mais avançada, já com metástases. Os sinais clínicos mais relevantes relacionados ao câncer gástrico são: sensação de plenitude gástrica, sangramento digestivo, náusea e vômito, assim como perda de peso e astenia (BRASIL, 2014).

Existem também, alguns fatores de risco que podem estar associados ao desenvolvimento do CG, tais como: hábitos alimentares, tabagismo e além dos fatores genéticos, os geográficos e os socioeconômicos. Outro fator de risco é a infecção secundárias por *Helicobacter pylori*, que possui um alto potencial carcinógeno, pois está, em muitos casos envolvida na gênese e progressão de tumores do trato gástrico (STEWART, B. W., WILD, 2014).

Descobertas recentes, também relacionadas a infecção secundária, apontam para o envolvimento do vírus *Epstein-Barr*, representando, em alguns estudos, uma positividade aproximada de 10% dos casos analisados. Nesses casos o prognóstico torna-se promissor, uma vez que, o agente infeccioso é tratado em conjunto com a neoplasia e o paciente pode apresentar melhores resultados (GULLEY, 2015; LIU et al., 2015; OK et al., 2016).

Quando existe a suspeita de lesões gástricas, o paciente é submetido a endoscopia digestiva, com a finalidade de retirar lesões suspeitas e definir a localização primária, a qual é baseada nas divisões anatômicas do órgão que são: a região da cárdia (com especial atenção à junção gastroesofágica), a região do fundo, do corpo, do antro e do piloro (Figura 3). É fundamental que durante a retirada da lesão suspeita seja feita uma avaliação do grau de comprometimento do órgão (BRASIL, 2014).

Figura 3 - Divisões anatômicas do estômago e sua histologia

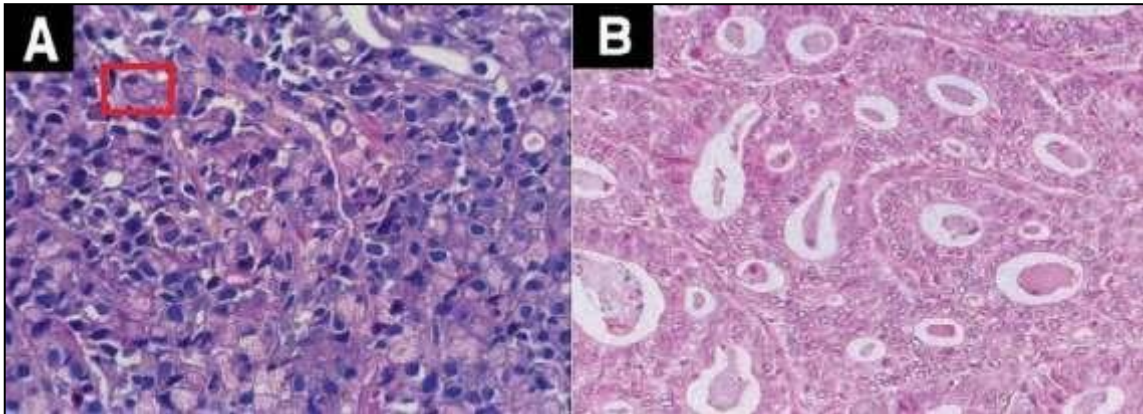


Fonte: (JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. 2013)

Para fazer a avaliação da lesão suspeita existem várias classificações histológicas estabelecidas, contudo podem ocorrer possíveis falhas no direcionamento da melhor conduta médica a ser seguida. A partir deste fato buscam-se novas tentativas de classificações histopatológicas com o intuito de estudar o comportamento do tumor, em várias perspectivas, como por exemplo: na avaliação prognóstica do tumor gástrico (BERLTH et al., 2014); na classificação molecular (LIN et al., 2015); e na pesquisa genética (ROGAR, 2016; SANDOVAL-BÓRQUEZ et al., 2015; SATHERLEY et al., 2015). Entretanto, nenhuma delas mostrou aplicabilidade na prática clínica por falta de estudos de sensibilidade/especificidade nesta área.

A classificação mais utilizada é a de Lauren, com bases nos seus critérios morfológicos, que divide os tumores gástricos, classificando-os como adenocarcinoma, subtipos intestinal e difuso (Figura 4). O subtipo intestinal é mais frequente em pacientes idosos do sexo masculino, onde as células tumorais apresentam metaplasia intestinal e adesão celular, estando assim dispostas em formações tubulares, papilares ou glandulares, cursando geralmente com um bom prognóstico. O subtipo difuso é mais frequente em pacientes mais jovens na faixa dos 30 anos e apresenta células neoplásicas mal diferenciadas sem arranjo arquitetural, geralmente espalhadas no estroma, o que acarreta em um mal prognóstico que podem apresentar ou não uma característica patognomônica deste tipo de câncer que é a célula em sinete em destaque na figura abaixo (MA et al., 2016).

Figura 4 - Microfotografia Adenocarcinoma Gástrico com coloração Hematoxilina-Eosina(x400): (A) O subtipo difuso evidenciando uma célula em sinete. (B) O subtipo intestinal.



Fonte: Adaptado de (QUIÑONES; PORTANOVA; YABAR, 2011)

Baseado nas características histológicas a classificação da *World Health Organization* (WHO) subdivide os tipos de CG em dois grandes grupos, os tumores epiteliais e não epiteliais, conforme mostra a tabela 2. Os tumores de origem epitelial são os mais frequentes e, dentre eles, estão os adenocarcinomas, os maiores representantes deste grupo. O grupo dos tumores de origem não epitelial, são formados por entidades patológicas pouco frequentes (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2000).

Tabela 2 - Classificação histológica de tumores gástricos (WHO)

Tumores Epiteliais	Tumores não Epiteliais
Neoplasia intraepitelial - Adenoma	Leiomioma
Carcinoma	Schwanoma
Adenocarcinoma	Tumor de célula Granular
tipo	Tumor de Glomus
intestinal	
tipo difuso	Leiomiossarcoma
Adenocarcinoma papilar	Tumor estromal do GI
Adenocarcinoma tubular	Começo
	o
Adenocarcinoma mucinoso	potencial maligno incerto
Carcinoma de Anel sinete	Maligo
Carcinoma Adenoescamoso	Sarcoma de Kaposi
Carcinoma de células escamosas	Outros
Carcinoma de células pequenas	
Carcinoma indiferenciado	Linfomas Malignos
Outros	Zona marginal de células-B
	delinfoma de MALT-type
Carcionoide (neoplasia endócrina bem diferenciada)	Linfoma de célula de manto
	Linfoma de células-B largo difuso
	Outros

Fonte: Adaptado de (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2000)

O sistema de estadiamento/classificação dos tumores malignos mais utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), o Sistema TNM (do inglês, Tumor, Node e Metástase). Cada letra corresponde a uma característica diferente baseando-se na extensão cito-morfo- anatômica da doença, de acordo com as características do tumor primário (T0 a T4) o comprometimento e a positividade dos linfonodos da cadeia linfática subjacente (N0 a N3) e a presença e ausência de sítios metastáticos (M0 a M1) (Tabela 3). A classificação TNM é uma das ferramentas mais utilizadas para definir conduta médica e manejo do paciente (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2000; SMYTH et al., 2016).

Tabela 3 - Sistema TNM para tumores gástricos (Estadiamento)

Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio IA	T1	N0	M0
Estágio IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estágio II	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estágio IIIA	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
Estágio IIIB	T3	N2	M0
	T4	N1, N2, N3	M0
Estágio IV	T1, T2, T3	N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

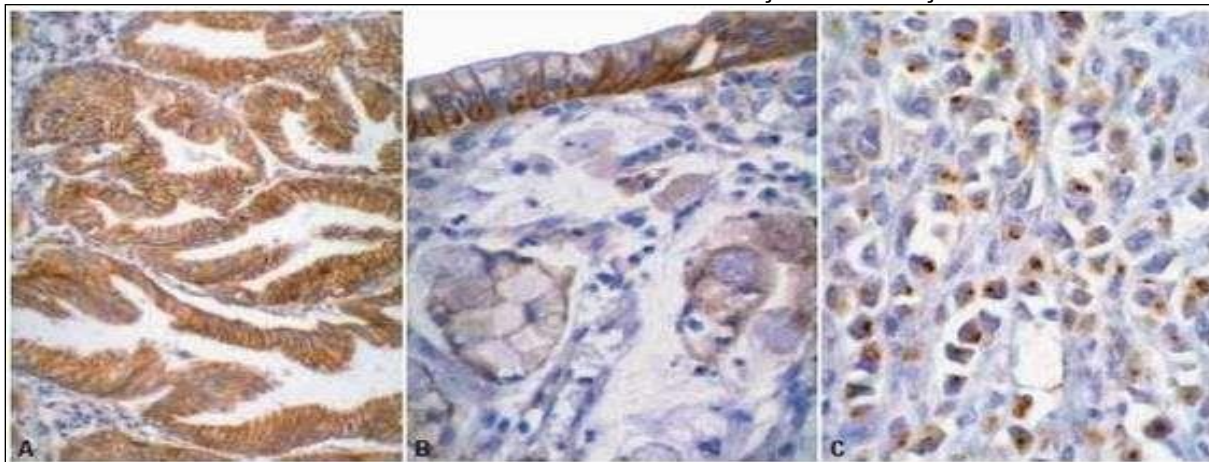
Fonte: Adaptado de (SMYTH et al., 2016)

Ao contrário do adenocarcinoma gástrico, os tumores de pulmão, mama e melanoma, nos últimos anos, possuem estudos que demonstram biomarcadores patológicos efetivos na prática clínica e também o benefício das terapias alvo moleculares, como é o caso do HER2 para mama (MOTOSHIMA et al., 2018; SONG et al., 2017).

Contudo, esforços para identificação de biomarcadores para o CG vem sendo realizado a passos lentos, assim como no início das terapias para o câncer de mama na década de 1980, como o HER2 (LIN et al., 2015; MOTOSHIMA et al., 2018). Um dos candidatos a marcador, além do HER2, é a E-caderina, utilizado em alguns estudos de câncer gástrico (GUO et al., 2017; GURZU et al., 2017; MOTOSHIMA et al., 2018; TILL; YOON; RYEOM, 2017).

A expressão da E-caderina contribui para a organização e a adesão entre células epiteliais. A perda de expressão e sua localização citoplasmática no decorrer da progressão tumoral (Figura 5) favorece a transcrição de oncogenes que podem aumentar as chances de invasão (TILL; YOON; RYEOM, 2017).

Figura 5 - Expressão de E-caderina no adenocarcinoma gástrico. (A) Subtipo Intestinal mostrando expressão normal. (B) Subtipo Difuso mostrando uma redução da expressão normal. (C) Subtipo mais indiferenciado mostrando uma intensa redução na marcação.



Fonte: Adaptado de INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2000.

Para avaliar as condições clínicas dos pacientes alguns marcadores laboratoriais podem ser utilizados. Os altos níveis séricos dos marcadores tumorais: CEA, CA 19-9 e CA 72-4 estão em conjunto associados a um pior prognóstico da doença mais avançada no CG. Contudo, a utilização destes marcadores na avaliação pré-operatória, na resposta ao tratamento e/ou no seguimento, ainda não tem resultados em estudos de fase III, logo sua acurácia é variável nos estudos diagnósticos publicados, limitando sua utilidade na prática clínica e tornando o CG carente de um biomarcador (MATTAR et al., 2002).

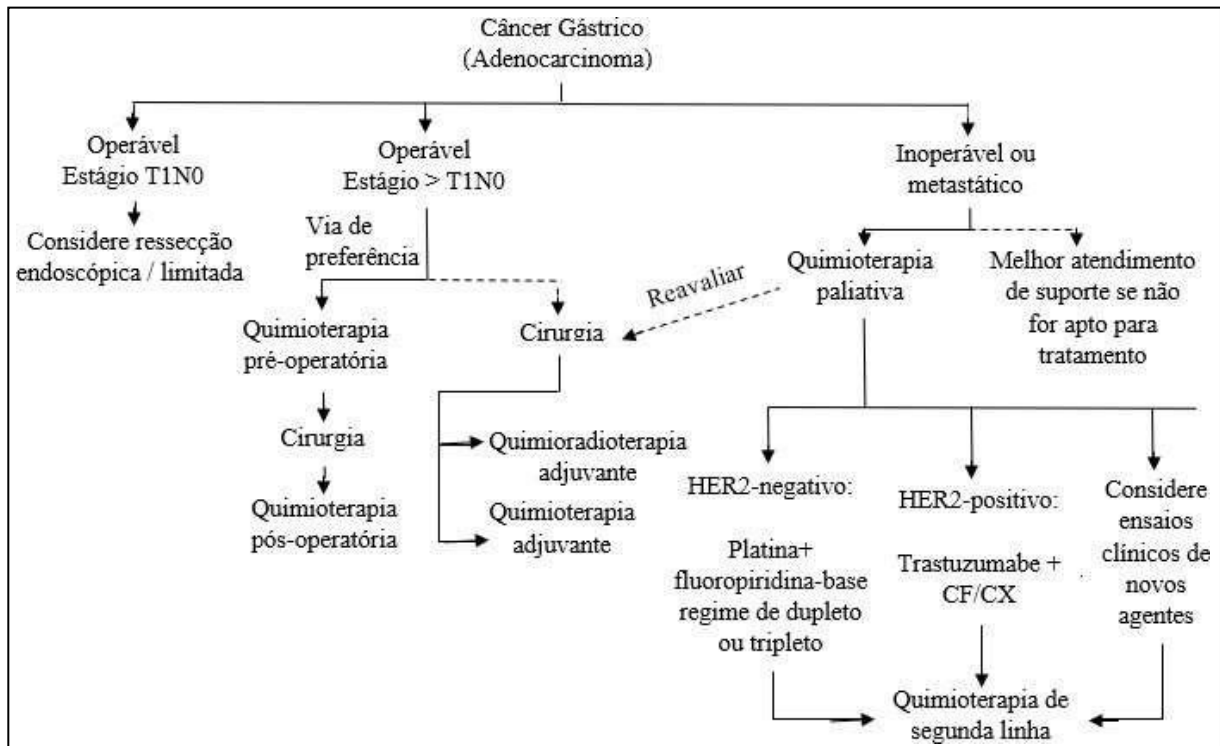
2.1.2 Terapia

As principais formas de tratamento do CG são através da cirurgia, radioterapia e quimioterapia neoadjuvante. Se o diagnóstico for precoce, a taxa de sobrevivência global em 5 anos chega a 95%. Este tipo de tratamento geralmente é multidisciplinar envolvendo médicos oncologistas, radiologistas, gastroenterologistas, enfermeiros, farmacêuticos e outros profissionais (SONG et al., 2017). No entanto, a dificuldade de detecção precoce favorece o crescimento do número de pacientes em estágio avançado do CG, comprometendo assim o direcionamento da janela cirúrgica curativa (BRASIL, 2014; SONG et al., 2017).

O tratamento cirúrgico é a linha principal de tratamento e pode ser realizada por meio da gastrectomia parcial ou total. Este tratamento depende do estadiamento para direcionar qual a melhor conduta médica a ser tomada (Figura 6). É comum que, durante a gastrectomia, ocorra também a retirada de alguns linfonodos

periféricos, procedimento chamado de linfadenectomia das cadeias linfonodais (D1) e (D2). Em casos de metástases, nos linfonodos periféricos (D1) ou regionais (D2) e (D3), se faz necessário uma ressecção mais agressiva, como a retirada de órgãos como o baço, pois células neoplásicas são comuns de serem encontradas neste órgão em mais de 80% dos casos examinados pós cirurgia e a permanência do baço (NG; LEE, 2017).

Figura 6 - Fluxograma de terapia para o câncer gástrico



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

Os altos índices de linfonodos com células neoplásicas apontam que a cirurgia sozinha não pode ser utilizada como única forma de tratamento para pacientes com câncer gástrico avançado. Segundo a Sociedade Japonesa de Endoscopia Gastroenterológica, para um melhor direcionamento da conduta médica, os linfonodos das cadeias linfáticas D1 e D2 devem ser retirados para uma avaliação mais criteriosa do estadiamento (ALATENGBAOLIDE et al., 2013; PINTO et al., 2001; TONETO, 2012).

Apesar da importância, efetividade e segurança da linfadenectomia na cirurgia do CG alguns estudos sugerem que, existe uma relação proporcional, entre o maior número de linfonodos ressecados e a sobrevida. Este benefício da linfadenectomia pôde ser observado quando são retirados números maiores de linfonodos, mostrando uma relação linear com a sobrevida do paciente, independente do estadiamento (LI et al., 2016; ZONG et al., 2015).

Segundo a União Internacional Contra o Câncer – UICC, para a linfadenectomia D0, não são retirados nenhum linfonodo, para a D1 são retirados de 1 a 15 linfonodos, e acima disso é classificada como D2. Recomenda-se que se retire pelo menos 15 linfonodos para melhorar, tanto o estadiamento, quanto para promover menores chances de recidiva (COLA et al., 2005).

Outro parâmetro importante da tomada de decisão clínica no manejo do paciente com CG é a razão nodal. A razão nodal é definida pela divisão do número de linfonodos positivos (com presença de células neoplásicas) pelo número total de linfonodos retirados durante a cirurgia. Em um estudo sobre razão nodal, o ponto de corte usado foi 0.3, valores acima deste são considerados positivos para avaliação do acometimento linfonodal, e para os valores abaixo deste, foram considerados negativos (ALATENGBAOLIDE et al., 2013).

Para os pacientes com diagnóstico de metástase distal confirmado, o indicado é fazer tanto a radioterapia paliativa quanto a quimioterapia dependendo do seu estado geral. Porém sabe-se que a combinação cirurgia e quimiorradioterapia adjuvante é o mais indicado (HO et al., 2017; VALENTINI et al., 2009).

No processo de quimioterapia nos pacientes com CG é comum a aplicação da 5-FU (Fluoracila), sendo utilizado na maioria dos casos, principalmente em comparação com a cirurgia isolada. Outro caso semelhante a este seria, cirurgia isolada *versus* cirurgia com quimioterapia perioperatória (pré-operatório, intra-operatório e pós-operatório) usando 3 ciclos de epirubicina, cisplatina e 5-FU (ECF) antes da cirurgia, com o uso de uma dose específica durante a cirurgia e por fim mais 3 ciclos de ECF após a cirurgia. Este último procedimento em particular mostrou resultados promissores nesta abordagem de tratamento combinado, aumentando a taxa de sobrevida global em relação a cirurgia isolada tornando-se uma estratégia de tratamento amplamente utilizada (NG; LEE, 2017).

Em outro estudo, desta vez randomizado com 556 pacientes, mostrou que a quimiorradioterapia adjuvante após ressecção cirúrgica, com duração de 4 meses e com utilização da 5-FU / leucovorin com 45 Gy, apresentou uma média superior de sobrevivência global de 36 meses *versus* 27 meses para cirurgia isolada (NG; LEE, 2017; VALENTINI et al., 2009). Entretanto, deve-se avaliar a tolerabilidade do paciente de acordo com o seu estado geral, a depender do tipo de quimioterápico utilizado (ANTONIO, 2001; SMALLEY et al., 2012).

Já outro estudo utilizando apenas o ECF infusional, mostrou benefício na

sobrevida global e livre de doença em pacientes com diversos graus de estadiamento. O tratamento foi oferecido apenas para pacientes cuja avaliação prévia demonstrou tolerabilidade aos efeitos colaterais do esquema com três fármacos e a cirurgia de ressecção (CUNNINGHAM et al., 2006; YCHOU et al., 2011).

Ao contrário do CG, o GIST (do inglês, tumor gastrointestinal estromal), mais comum dentre as neoplasias mesenquimais gastrointestinais, possui terapia alvo molecular específica. O mesilato de imatinibe e succinato desidrogenase são usados para a mutação no inibidor de tirosina quinase presente em cerca de (80-90%) dos casos relatados de GIST (EL-MENYAR; MEKKODATHIL; AL-THANI, 2017; GILL, 2018; PLATOFF et al., 2017).

O plano de tratamento e diagnóstico personalizado é fundamental para trazer maiores perspectivas de vida aos pacientes. Muitos dos estudos que exploram os biomarcadores e sua aplicabilidade na medicina personalizada utiliza as ferramentas de proteômica, transcriptômica, metabolômica (BASS et al., 2014; DENG et al., 2012). Contudo, apesar das mais variadas ferramentas de bioinformática, poucos estudos ainda exploram os aspectos glicobiológicos do CG, tanto visando terapia quanto biomarcadores (BENNUN et al., 2016).

2.2- Glicobiologia

2.2.1 Glicobiologia no Câncer

A Glicobiologia é o estudo da biossíntese, estruturação, função e interações dos glicanos entre si e com outras classes moleculares. A biossíntese de glicanos em eucariotos ocorre no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático rugoso a partir da polimerização de açúcares, processo fundamental para a formação das glicoproteínas, proteínas de membrana e a parte secretada. O estudo da glicosilação e suas enzimas têm apresentado fundamental importância para a biologia celular e vem desvendando vários mecanismos de ação, tais como interação célula-célula e célula com matriz extracelular (YOUNG, W. W. 2004 E NILSSON, T.; AU, C. E.; BERGERON, J. J. M. 2009).

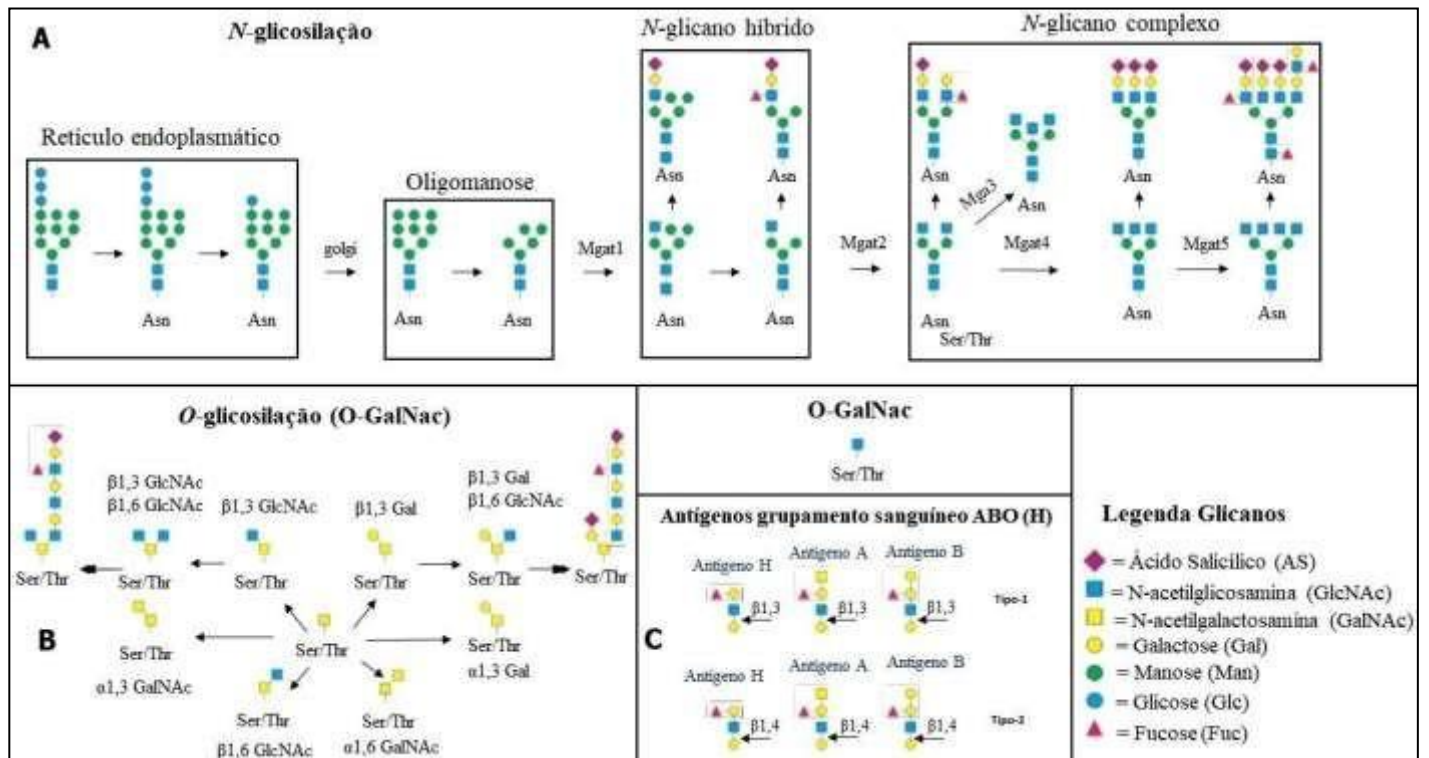
A glicosilação pode ser compreendida principalmente por duas reações, a *N*-glicosilação e a *O*-glicosilação (Figura 7). Na *N*-glicosilação ocorre a ligação de *N*-acetilglucosamina ao grupo amina de cadeias laterais de asparagina. Nesta reação tem-se como principais produtos a oligomanose, a *N*-glicanos híbrida, e a complexa,

acontecendo em paralelo à tradução da proteína e participa no processo de enovelamento da mesma (Figura 7-A). A consequência da alteração da *N*-glicosilação no câncer se chama glicosilação aberrante, que é o resultado da formação de *N*-glicanos complexos mediados pela família da oncoenzima Mgat e está associada a tumores, desempenhando papéis importantes, como progressão e metástase (HASSANI et al., 2017; SILVA-FILHO et al., 2017; TANIGUCHI; KIZUKA, 2015; WANG et al., 2017).

Na *O*-glicosilação, reação pós-traducional que ocorre em proteínas já enoveladas, um grupo de enzimas chamadas ppGalNAc-Ts realizam a primeira etapa da reação, a ligação da *N*-acetilgalactosamina a hidroxila dos aminoácidos Serina ou Treonina (Figura 7-B) (BENNETT et al., 2012).

Os glicoconjugados de origem da *O*-glicosilação possuem funções biológicas muito importantes. É o caso da adesão celular mediada por selectina-glicano. Esta interação é crítica para a ligação de leucócitos ao endotélio capilar durante o rolamento ou extravasamento dos neutrófilos na resposta inflamatória (FUNAKOSHI; SUZUKI, 2009; HOLLINGSWORTH; SWANSON, 2004; MANUSCRIPT, 2011).

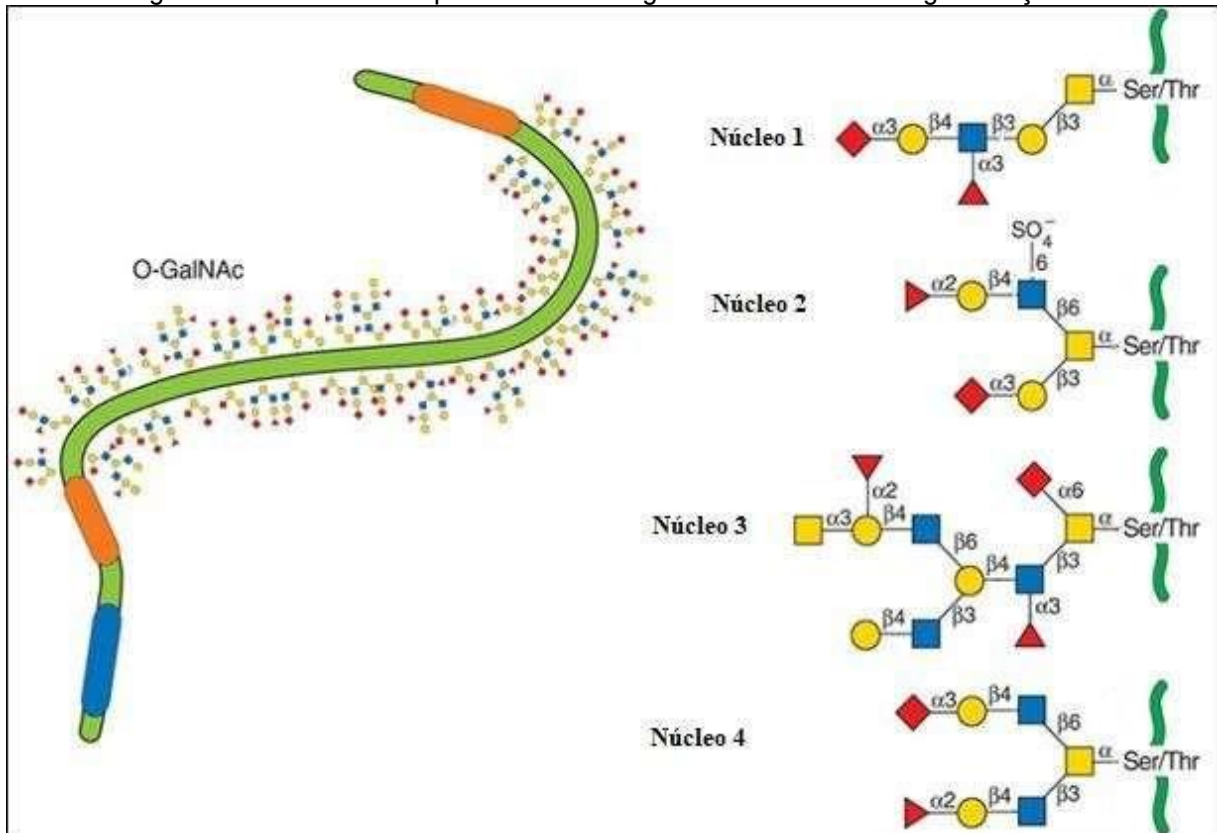
Figura 7 - Esquema exemplificando algumas diferenças entre O-glicosilação e N-glicosilação. Os N-Glicanos participam das propriedades das glicoproteínas, podendo modificar a sua conformação, solubilidade, antigenicidade, atividade e reconhecimento por proteínas de ligação ao glicano. E na O-glicosilação, a reação é pós-traducional envolvendo proteínas já enoveladas



Fonte: Adaptado de (JOHNSON et al., 2013)

Um dos principais produtos da O-glicosilação são as mucinas, as quais participam da determinação do grupamento sanguíneo ABO e da homeostase de vários órgãos glandulares, como o estômago e os intestinos. Toda a sua biossíntese acontece no complexo de Golgi, e envolve quatro reações (Figura 8) com a participação das ppGalNAc-Ts e várias outras enzimas. As mucinas fornecem uma barreira contra o ácido estomacal e também contra patógenos como o *H. pylori* (NIV, 2015; WEN, 2015).

Figura 8 - Mucina e seus quatro núcleos de glicanos oriundos da O-glicosilação



Fonte: Adaptado de (Varki 2017)

A primeira reação do núcleo 1 (Gal β 1-3GalNAc-O-Ser / Thr) é catalizada por uma glicosiltransferase (C1GALT1) que necessita de uma chaperona durante sua síntese no retículo endoplasmático rugoso para garantir a continuidade da reação no Golgi. Esta reação é considerada uma atividade básica, e está presente na maioria das células. Em estado alterado, possui relação com o câncer, por ausência ou por defeito enzimático, que é refletida na alta expressão de antígenos Tn e sialil-Tn que contribuem para a ancoragem e extravasamento de células metastáticas na corrente sanguínea (JU et al., 2013).

A reação subsequente ao primeiro núcleo dá origem ao núcleo 2. Nela é adicionado mais um glicano do núcleo 1 formando núcleo 2. Sua expressão é a ativa em linfócitos, na estimulação de citocinas e no desenvolvimento embrionário. As enzimas responsáveis pela síntese do núcleo dois também são glicosiltransferases (β 1-6 N-acetilglucosaminiltransferases 1, 2 e 3). E no câncer, a exemplo da leucemia, de forma geral, possui quantidades anormais destes glicanos (TABAK, 2010).

Já a síntese do núcleo 3 é mais restrita aos epitélios produtores de muco, tais como o trato gastrointestinal, respiratório e glândulas salivares. Esta reação é catalizada por outra glicosiltransferase da família da reação anterior, $\alpha\beta$ 1-3 N-acetilglucosaminiltransferase 6. As mucinas são ricas em glicanos de núcleo 3. A expressão e atividade desta enzima que catalisa esta reação é praticamente nula em células tumorais em cultura. E o aumento de sua expressão em células de câncer de cólon, diminui a capacidade de metástase (HOLLINGSWORTH; SWANSON, 2004).

A reação responsável por sintetizar o último núcleo, o 4, é iniciada a partir um glicano do núcleo 3. Tanto o núcleo 3 como o 4 possuem ação repressora da progressão tumoral, onde os glicanos oriundos do mecanismo de adição destas glicosiltransferases possuem o papel de supressor do crescimento celular e das propriedades invasivas, embora os mecanismos ainda não estejam claros (JOHNSON et al., 2013; JU et al., 2013).

Os glicanos O-GalNAc, como as mucinas, são marcadores potenciais para o diagnóstico e o prognóstico das neoplasias, como câncer de ovário. Outro exemplo, seria o antígeno CA125, o qual corresponde a uma mucina glicosilada que circula no soro e é usada como marcador de diagnóstico e prognóstico, particularmente no câncer de ovário. Além de serem estudados como marcadores de prognóstico, os produtos da O-glicosilação como a mucina 1 (MUC1) estão sendo considerados como candidatas para imunização do câncer (HOLLINGSWORTH; SWANSON, 2004). A compreensão do comportamento destes produtos da O-glicosilação, assim como das glicosiltransferases que participam desse processo, e como eles estão alterados no câncer pode ajudar a identificar novos alvos terapêuticos.

2.2.2 As polipeptídeo n-acetilgalactosaminiltransferases

As polipeptídeo n-acetilgalactosaminiltransferases podem ser encontradas em todo o reino animal. Nos humanos sabe-se que existem cerca de 19 genes que as codificam, com exceção da ppGalNAc-T4 que é originada através da tradução alternativa das regiões codificantes das ppGalNAc-T1, T2 e T3 (Tabela 4). O grande número de isoformas da família, reflete uma redundância na sua nomenclatura (BENNETT et al., 2012).

Tabela 4 - Características genéticas da família das ppGalNAc-Ts

Genes ppGalNAc-Ts	Região ORF	Locus Cromossomal
<i>GALNT1</i>	10	18q12.1
<i>GALNT2</i>	15	1q41-q42
<i>GALNT3</i>	9	2q24-q31
<i>GALNT4</i>	0	12q21.33
<i>GALNT5</i>	9	2q24.1
<i>GALNT6</i>	9	12q13
<i>GALNT7</i>	11	4q34.1
<i>GALNT8</i>	10	12p13.3
<i>GALNT9</i>	10	12q24.33
<i>GALNT10</i>	11	5q33.2
<i>GALNT11</i>	10	7q36.1
<i>GALNT12</i>	9	9q22.33
<i>GALNT13</i>	10	2q24.1
<i>GALNT14</i>	12	2p23.1
<i>GALNT15</i>	9	3p25.1
<i>GALNT16</i>	13	14q24.1
<i>GALNT17</i>	11	4q34.1
<i>GALNT18</i>	10	11p15.3
<i>GALNT19</i>	10	7q11.23
<i>GALNT20</i>	7	7q36.1

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

Contudo, existem diferenças na especificidade do substrato (Figura 9) e ao seu perfil de expressão em cada tecido, podendo ser classificada em geral, seletiva ou restrita (Tabela 5). O que confere à família das ppGalNAcs-Ts característica única é o fato de a maioria possuir um domínio de lectina (ricina) no terminal carboxílico, são enzimas que catalisam a transferência de N-acetilgalactosamina de um nucleosídeo difosfato N-acetilgalactosamina para uma molécula aceptora, em geral outro carboidrato (KONG et al., 2015).

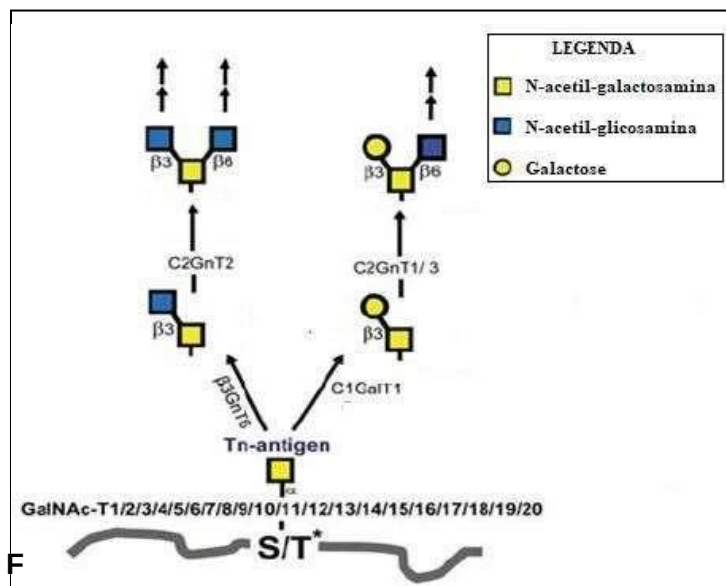


Figura 9 - Ação da ppGalNAc-Ts adicionando substratos. Todas as GALNTs possuem um N-acetilgalactosamina como o substrato doador e diferem nas especificidades do aceitador de peptídeos sendo responsáveis pela primeira reação da O-glicosilação, caracterizada pela reação da n-acetilgalactosamina na ligação α dos aminoácidos Serina ou Treonina, e em sequência a participação de outros tipos de enzimas adicionando outros substratos dando sequência a reação.

Tabela 5 - Perfil de expressão da família das ppGalNAc-Ts em diferentes tecidos.

***O padrão de expressão dessas glicosiltransferases pode ser classificada em: Geral (G) expressa em mais de 70% dos tecidos, Seletiva (S) expressão entre 30-70% dos tecidos e Restrita (R) expressa em menos de 30% dos tecidos.

	Osso	Cérebro	Cervix	Coração	Colon	Rim	Fígado	Pulmão	Glândula	Músculo	Nervo	Pâncreas	Glândula	Pele	Estômago	Timo	Tireóide	***
T1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	G
T2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	-	+		+	+	G
T3	-	+	+	-	+	+	+	+	+		-	+	+	+		+	-	S
T4	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	S
T5	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+		-	-	R
T6	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-	-	S
T7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	G
T8	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-		+	-	R
T9	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	R
T10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-		+	+	R
T11	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+		+	+	S
T12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+		+	+	S
T13	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-		-	-	R
T14	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-		+	+	S
T15	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-		+	-	R
T16	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	S
T17	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-		+	+	R
T18	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-		+	+	S
T19	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-		+	+	R
T20	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	R

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

Testes *in vitro* mostraram que muitas GALNTs não transferem eficientemente GalNAc para Ser, mas sim para Thr. Os subtipos GALNT1, GALNT2 e GALNT3 foram os mais expressos no experimento, atuando nos dois aminoácidos, enquanto aquelas GALNT com expressão de tecido restrita foram um pouco mais seletivas. No câncer, a localização intracelular destas glicosiltransferases é incerta; ao invés de restringir-se ao retículo endoplasmático rugoso e ao Golgi (KONG et al., 2015).

As GALNT's participam diretamente na O-glicosilação e homeostase celular, por meio da produção de mucinas, suas funções podem ser subvertidas pela neoplasia. A principal consequência da ação alterada dessas enzimas reflete na formação de antígenos truncados podendo estar associados a tumores, desempenhando papéis importantes, como progressão e metástase (Liu C. et al, 2017).

Algumas das ppGalNAc-Ts começaram a ser estudadas em diversas neoplasias, com destaque apenas para três estudos envolvendo câncer gástrico (Tabela 6). Ao considerar a baixa quantidade de estudos disponíveis, onde parte das pesquisas são estudos de etiopatogênese, e poucos de biomarcador, surge a necessidade de explorar o potencial das outras isoformas, tais como a ppGalNAc-T15 e T16, que ainda não possuem estudos, e sua possível utilização como biomarcador.

Tabela 06 - Associação entre a expressão das ppGalNAc-Ts em diferentes tipos de câncer.

ppGalNAc-T	Neoplasia	Significado clínico	Referências
ppGalNAc-T1	Câncer de Bexiga	Desfavorável	(DING et al., 2012)
	Câncer de Fígado	Favorável ↓expressão	(HUANG et al., 2015)
ppGalNAc-T2	Glioma	Desfavorável	(WU, 2011)
	Câncer gástrico	Favorável	(HUA et al., 2012)
ppGalNAc-T3	Calcinose tumoral	Desfavorável ↓expressão	(TOPAZ et al., 2005)
	Câncer de ovário	Favorável ↓expressão	(SHETA et al., 2016)
	Carcinoma escamoso	Desfavorável ↓expressão	(HARADA et al., 2016)
		Favorável ↑expressão	
ppGalNAc-T5	Câncer gástrico	Favorável ↓expressão	(HE et al., 2014)
ppGalNAc-T6	Câncer de Mama	Desfavorável Desfavorável Favorável	(BEROIS et al., 2006a) (FREIRE et al., 2006) (PATANI; JIANG; MOKBEL, 2008)
	Câncer Gástrico	Desfavorável ↑expressão	(GOMES et al., 2008)
	Câncer de ovário epitelial	Favorável ↑expressão	(MURAKAMI et al., 2017)
	Câncer endometrial	Favorável ↑expressão	(OBSTETRICS et al., 2017)
	Câncer de Pâncreas	Favorável ↓expressão	(TARHAN et al., 2016)
		Desfavorável ↑expressão	
ppGalNAc-T7	Câncer Cervical	↑expressão	(PENG et al., 2012)
ppGalNAc-T9	Neuroblastoma	Favorável	(BEROIS et al., 2013)
ppGalNAc-T10	Carcinoma renal	Desfavorável ↑expressão	(LIU et al., 2017)
ppGalNAc-T11	Leucemia Linfocítica Crônica	Desfavorável	(LIBISCH et al., 2014)
ppGalNAc-T12	Colón retal câncer tipo X	Desfavorável	(SEGUÍ et al., 2014)
ppGalNAc-T13	Câncer de Pulmão	Desfavorável ↑expressão	(NOGIMORI et al., 2016)
	Neuroblastoma	Desfavorável	(BEROIS et al., 2006b)
ppGalNAc-T14	Câncer de Mama	Desfavorável	(WU et al., 2010)
	Câncer de Fígado	Desfavorável Favorável	(KWON et al., 2015) (LIANG et al., 2016)
	Neuroblastoma	Desfavorável	(MARIANO et al., 2015)
	Câncer de Ovário	Desfavorável	(WANG et al., 2013)

3. OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão diferencial das glicosiltransferases ppGalNAc-T15 e ppGalNAc-T16 como potencial marcador prognóstico em tumores gástricos.

3.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar, a nível histológico, a imunomarcacão da ppGalNAc-T15 e T16 em amostras de câncer gástrico;
- Associar o padrão de expressão tecidual das ppGalNAc-T15 e T16 com os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes;
- Associar a expressão da proteína com os parâmetros de sobrevivência (sobrevida global, sobrevida livre da doença e sobrevida livre de metástases) no câncer gástrico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras Clínicas

Trata-se de um estudo transversal, analítico e de caráter retrospectivo. Amostras parafinizadas de adenocarcinoma gástrico foram selecionadas do arquivo do Serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Pernambuco - HCP. Estão incluídos no estudo apenas casos diagnosticados no período de 2013 a 2016. Dos prontuários médicos, foram obtidas as seguintes variáveis: idade, sexo, tamanho do tumor no momento do diagnóstico, número e local de linfonodos retirados e sua positividade, estadiamento patológico, recorrência, óbito, tratamento cirúrgico, grau histológico, necessidade de quimioterapia/radioterapia, invasão angiolinfática e recidiva. O projeto possui aprovação pelo Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE: 39976214.90000.5205).

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Inclusão: Foram selecionados apenas amostras de pacientes com o diagnóstico confirmados de adenocarcinoma gástrico.

Critério de exclusão: ficaram fora do estudo as amostras que não possuíam uma área tumoral representativa suficiente para análise histológica ou com problemas de fixação evidenciando um alto índice de autólise.

4.3 Imunohistoquímica

As amostras foram cortadas com a espessura de 4 micrometros em lâminas silanizadas e desparafinizadas em xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100, 95, 80, e 75%). Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato 100mM, pH 6.0 em micro-ondas 300W por 15 min. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas com bloqueador de peroxidase endógena com uma solução peroxidase a 3% por 30`min à temperatura ambiente e posteriormente o bloqueio das ligações inespecíficas com uma solução de PBS/BSA 1% por 30`min a temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram incubados com seguinte os anticorpos primários: ppGalNAc-T15 e ppGalNAc-T16 (CUSABIO-Life Science USA) diluído na concentração de 1:100 em PBS-BSA 5% (p/v) e incubado a 37°C por

2 horas. Após a incubação foi utilizado como sistema revelador polímero livre de biotina (DAKO) por 1 hora a temperatura ambiente, e revelado com DAB-H₂O₂ (Sigma). Os controles positivos e negativos utilizados foram intestino delgado não patológico humano para ambos, selecionados segundo indicação do fabricante dos anticorpos primários. Para os controles negativos foi realizada a substituição do anticorpo primário por uma solução de PBS/BSA 1%.

4.4 Análise das Imagens

A análise histomorfológica qualitativa foi realizada com o auxílio de dois observadores independentes. As fotos foram capturadas com um sistema integrado de análise de imagem disponível no Anexo do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT – Universidade Federal de Pernambuco do Departamento de Bioquímica-Centro de Biociências desta mesma universidade. As fotografias foram realizadas utilizando microscópio BIOPTICA B20 acoplado com uma câmera CMOS (resolução de 2584 x 1936) com o software de captura de imagem ISCapture.

Os pacientes foram classificados após a análise qualitativa de acordo com a extensão da área marcada (tumoral) e o tipo de marcação. Divididos em 2 grupos para as análises estatísticas de associação dos resultados experimentais com as características clínico patológicas: aqueles com marcação leve, moderada e intensa foram considerados positivos para os anticorpos ppGalNAc-T15 e T-16. Os demais classificados sem marcação ou com marcação focal foram considerados negativos para os mesmos anticorpos.

4.5 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prism versão 6.00. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$ utilizando o teste de Fisher. Para análise dos parâmetros de sobrevivência, foram utilizadas curvas de sobrevida segundo o método de kaplan-meyer com log-rank.

5. RESULTADOS

5.1 CAPÍTULO 1

GALNAC-T15 OVEREXPRESSION CAN BE A USEFUL TOOL IN GASTRIC CANCER PROGNOSIS

Mário Sérgio de Souza Albuquerque¹; Antônio Felix da Silva Filho¹; Marina Ferraz Cordeiro¹; Maria de Fátima Deodato de Souza¹; Michael Willames Leal Quirino¹; Luiza Rayanna Amorim Lima²; Maira Galdino da Rocha Pitta¹; Mário Rino Martins³; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹;

1. Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT / Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino - NUPIT SG, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE- Brasil.

2. Universidade de Pernambuco - Campus Garanhuns, Garanhuns - PE-Brasil.

3. Hospital do Câncer de Pernambuco - HCP, Recife - PE - Brasil.

Correspondence:

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil.

e-mail: moacyr.rego@gmail.com

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is the second most common cause of cancer-related deaths in the world. This study aims to investigate the differential tissue expression of ppGalNAC-T15 and to evaluate its possible association with clinical-pathological parameters and outcome of gastric adenocarcinoma patients. For these 70 patients were evaluated the expression by immunohistochemistry to ppGalNAC-T15. Our results showed that 33 (47,1%) patients were ppGalNAC-T15+ positive and 37 (52,9%) negative. Positive staining for ppGalNAC-T15 was significantly present in patients older than 60 years ($p = 0,0306$) and submitted to total gastrectomy ($p=0.0087$). Also, some results remained at the limit of significance as surgical standing ($p = 0,0562$) and histological grade ($p = 0,0549$). Therefore, the ppGalNAC-T15 immunoreactivity can be useful to understand the prognosis of patients with gastric cancer.

Key-words: Gastric adenocarcinoma, polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases, clinical- pathological analyses, immunohistochemistry.

INTRODUCTION

GC is a heterogeneous disease and the endpoint of a long multistep process largely influenced by *Helicobacter pylori* infection, genetic susceptibility, and environmental factors. Despite the decrease in incidence, avoidance of gastric cancer remains a priority. Patients with higher risk should be screened for early detection and chemoprevention. Surgical resection enhanced by standardized lymphadenectomy remains the gold standard in gastric cancer therapy.

Gastric carcinoma demonstrates marked heterogeneity at both architectural and cytologic level, often with co-existence of several histologic elements which reproduce duodenal epithelium. According to the World Health Organization guidelines, GC can be classified in four major histologic patterns of gastric cancers: tubular, papillary, mucinous, poorly cohesive and others uncommon histologic variants.

Many secretory and cell surface proteins are modified through the addition of carbohydrate portion formed by mucin-type O-linked oligosaccharide structures, present in organs that have secretory characteristics like the stomach. The biosynthesis of mucin-type O-linked oligosaccharides is catalyzed by UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (pp-GalNAc-Ts), an enzyme family responsible for transferring GalNAc from UDP-GalNAc to a serine or threonine residue on the polypeptide acceptor. A total of 20 human GalNAc-T gene entries are available, in which 17 have been characterized. The GalNAc-T family is highly conserved throughout metazoan evolution and although the number of members varies, the completed genomes contain large families of highly homologous sequences indicating that the structure and function of GalNAc-Ts have been conserved. Several isoforms are expressed in various tissues and catalyze a broad spectrum of substrates (pp-GalNAc-T1, T2), whereas the other isoforms are more restricted in expression and/or in substrate preference (pp-GalNAc-T3, T4, T7, T9, T11 and T13).

Pp-GalNAc-T15 transcript is broadly expressed in various tissues, mainly in small intestine, nervous and female reproductive systems. This enzyme has a homologous sequence to Pp-GalNAc-T2, however exhibits different substrate specificities and diverges in the number of GalNAcs they incorporate into the acceptor peptide. In addition, there is little information about Pp-GalNAc-T15 importance on maintenance and development of normal and neoplastic cells. The clinical relevance of immunoreactivity of Pp-GalNAc-T15 in gastric cancer and normal tissues was evaluated in this study.

MATERIALS E METHODOS

Samples

Seventy patients sample of primary gastric adenocarcinoma, diagnosed between 2013 and 2016, were selected from the Service Registry of the Pernambuco Cancer Hospital - HCP. All samples obtained from this service were approved by the Certificate of Presentation for Ethical Assessment - CAAE (CAAE: 39976214.90000.5205). The clinical specimens were previously fixed in buffered formalin and embedded in paraffin. Following variables were collected in medical charts: age, sex, extension of the surgery performed, therapeutic modality, surgical staging, lymph node involvement, histological grade, submission to chemotherapy and radiation therapy, and recurrence.

Immunohistochemistry

Biopsy slices (4 μ m) were deparaffinized with xylol and rehydrated in graded ethanol (100%, 95%, 80% and 70%). Antigen retrieval was done using 100mM citrate buffer, pH 6.0 in microwave 300W for 15 min. Endogenous peroxidase blocker was performed with hydrogen peroxide 3% for 30 min at room temperature followed by blocking the non-specific binding (phosphate-buffered saline-1% bovine serum albumin (PBS-BSA) for at same conditions. The primary antibody anti-ppGalNAcT15 (CUSABIO - clone 35-335AA) was diluted in 1% PBS-BSA and the samples were incubated for 18h at 4°C or 2h at 37°C. The amplification system (Easylink On, ImmPRESS™ and DAKO EnVision™) was applied between 30 to 50 min at 25°C. Reaction was visualized with diaminobenzidine (DAB-H₂O₂) and tissues were counterstained with hematoxylin. Positive control was used following the antibody manufacturer's designation and the negative controls were established by replacing the primary antibody with anti-human IgG (DAKO) antibody.

Image analysis

Histomorphological analysis was performed with an integrated image system (BIOPTICA B20) microscope coupled to a CMOS camera (2584 x 1936 pixels resolution) with ISCapture image capture software. Samples with enzyme staining in more than 10% of the neoplastic cells in different degrees of intensity were considered positive and those that did not present were negative. The labeling at subcellular isolated was cytoplasmic, membrane, perinuclear and nuclear combinations were associated with clinical-pathological parameters and outcome parameters. Semi-quantitative analysis of the stained cells was done by analyzing ten random fields in each case and the stained cells were counted using ImageJ Software.

Statistical analysis

Fisher's exact test was performed in GraphPad Prism version 6.0. $p < 0.05$ was considered significant. Analysis of outcome was evaluated through log-rank method and Kaplan-Meier survival curves.

RESULTS

GC patients included in this study had a mean age of 59.4 ± 12.9 (range = 30-89) years and 47 (66.1%) were male and 24 (33.9%) were female.

Evaluation of ppGalNAc-T15 using immunohistochemistry in paraffin sections of a series of 70 patients showed expression of this enzyme in 33 (47.14%) cases. The four histological lesions of gastric cancer were found in this study (Figure 1A-D). These lesion types were present in individual samples and simultaneously in the same sample. Immunohistochemical analysis showed that 32.85% of the samples had a cytoplasmic staining pattern while 45.71% presented a combination of cytoplasmic, nuclear and perinuclear staining (Figure 2). Thirty-four patients (48.6%) exhibit samples with normal gastric glands areas. This non-cancerous gastric tissue showed expression in 24 cases with cytoplasmic staining restricted to basal portion (Figure 3C and 3D).

Statistics analysis revealed significant association between the ppGalNAc-T15 immunoreactivity and the parameters age ($p = 0.0306$) and extension of the surgery performed ($p < 0.05$). Association with surgical staging ($p = 0.0562$) and histological grade ($p = 0.0549$) was in close to significance. Of analyzed samples 32 (31.42%) were positive for ppGalNAc-T15 and belonged to patients older than 60 years, while 23 (32.85%) were ppGalNAc-T15 - and younger than 60 years. In relation to the extension of surgery performed, 25 (35.71%) samples that expressed ppGalNAc-T15 was obtained from a total gastrectomy, while 21 (30%) samples ppGalNAc-T15 negative came from partial gastrectomy (Table 1).

In the paired analysis of total positive cases, tumor staining with adjacent normal tissue showed marking concordance in 17 cases (51.51%), and the remaining 16 (48.48%) cases were discordant.

Associations with overall patient survival 496 days for the negative group and 414 days for the positive group ($p = 0.6672$) and relapse-free time 11 months for the negative group and 12 months for the positive group ($p = 0.6195$) do not show statistics significance (supplementary file).

DISCUSSION

The most common lesions were found in GC is like a tubular forms irregularly distended, fused or branching tubule of different sizes, with intraluminal mucus, nuclear and inflammatory debris. Papillary like adenocarcinoma is characterized by epithelial projections scaffolded by a central fibrovascular core. Signet ring cell carcinoma like and other poorly cohesive carcinomas are often composed of a mixture of signet ring cells and non-signet ring cells. Poorly cohesive non-signet ring tumor cells like are those that morphologically resemble histiocytes, lymphocytes, and plasma cells, part of these changes are commonly found in altered glycosylation, a common feature of cancer.

GalNAc transferases (GALNTs) are crucial O-glycosyltransferases that initiate the formation of mucin-type O-glycan are differentially expressed in various tissues. Whether

GALNTs may act as markers of gastric cancer or potential therapeutic targets remains unclear. Here, we show that the ppGalNAc-T15 expression was present in approximately half of the GC samples, presenting a general cytoplasmic pattern, and in smaller percentages, nuclear, perinuclear and membrane staining. Observation of non-cancerous gastric tissue revealed the same cytoplasmic profile but restricted to basal and productive portion of gastric glands. Besides, ppGalNAc-T15 immunoreactivity was associated with the following clinical parameters: age, extension of the surgery performed, surgical staging and histological grade.

A more than decade, Cheng, L and collaborators (2004) characterized the expression and activity of ppGalNAc-T15 transcripts in some human tissues, as small intestine, placenta, spleen and cerebral cortex, and since then there have been no studies to better understand this expression. Studies have found that the pp-GalNAc-Ts display differences in both substrate specificity and tissue distribution. The use of ppGalNAc-T15 as a possible tissue biomarker for gastric cancer was never published.

The GALNT genes can be grouped into subfamilies. Bennett and collaborators (2011) surveyed all 20 GALNT genes and identified additional closely related subfamilies consisting of GALNT1/T13, GALNT2/T14/T16, GALNT7/T10/T17, GALNT4/T12, GALNT8/T9/T18/T19 and GALNT11/T20. This classification was based on predicted predominant peptide and GalNAc-peptide substrate specificities, respectively. Of these, two genes, GALNT5 and T15, do not show a significant relationship with the subfamilies. These two genes did not group into subfamilies in the phylogenetic analysis and contained unique intron positions. Cheng, L suggests the comparison between ppGalNAc-T15 and T2, this due to its homology and better characterization of ppGalNAc-T2.

PpGalNAc-Ts activity was seen for the first time by Hennebicq et al (1998) in gastric tumors through capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry. These authors analyzed the number of O-linked GalNAc residue on the peptide backbone and the relative levels of a dipeptidylpeptidase/transferase activity and observed that non-cancerous gastric tissue had a higher ppGalNAc-T activity than the tumor tissue.

PpGalNAc-T15 staining profile in gastric cancer samples was mostly cytoplasmic. Similarly, for ppGalNAc-T2 Shin Yun and collaborators (2016) reported the same pattern. Among the 20 genes analyzed only ppGalNAc-T2 and ppGalNAc-T8 were highly expressed in non-cancerous gastric tissue. This normal gastric tissue had a higher ppGalNAc-T2 expression than the gastric cancer samples and was present to basal portion of gastric glands, as well as in our study. Through the transwell migration assay, matrigel invasion assay and metastases in vivo model, they indicate that ppGalNAc-T2 suppresses the malignant potential of GCA cells (gastric representative lineage) and provide novel insights into the significance of O-glycosylation in MET activity and GCA progression. Similar results were found by Dong et al (2012), which made use of SGC7901 gastric cancer lineage and proved the anti-proliferative and anti-metastatic role of ppGalNAc-T15.

Age was an important factor analyzed in our study. Gastric cancer patients with ppGalNAc-T15 expression were relatively older than those without ppGalNAc-T15 expression. Some protein biomarkers are important in regulating metabolism, stress resistance and aging. It is likely that ppGalNAc-T15 may be an important element in the aging process through regulation of metabolism by reducing stress-related cell damage. This hypothesis, however, needs further experiments to elucidate the detailed mechanism.

In this paper patients with gastric tumors ppGalNAc-T15 positive were submitted to more extensive surgical procedures, what may be associated to an aggressive behavior. These results differ from those related to ppGalNAc-T2, whose expression was smaller in gastric cancer samples. This is possibly due to differences in kinetic and binding-protein properties.

CONCLUSION

The expression of ppGalNAc-T15 in gastric lesions, was identified an association between an enzyme staining with relatively elderly people and the type of surgical procedure. This result indicates that ppGalNAc-T15 has relevant characteristics for these patients. However, further studies are needed to uncover the role of ppGalNAc-T15 in gastric cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thanks to CNPq, CAPES, and FACEPE for financial support.

Figure 1. Histological Classification of Gastric Cancer Evidenced by PpGalNAc-T15 Immunohistochemistry. Tubular region (A), papillary region (B), poorly differentiated region (C) and delimited mucine region (D). 40X and 200X magnification, normal gastric glands in 40X magnification (C) and normal gastric glands in 200X magnification (D).

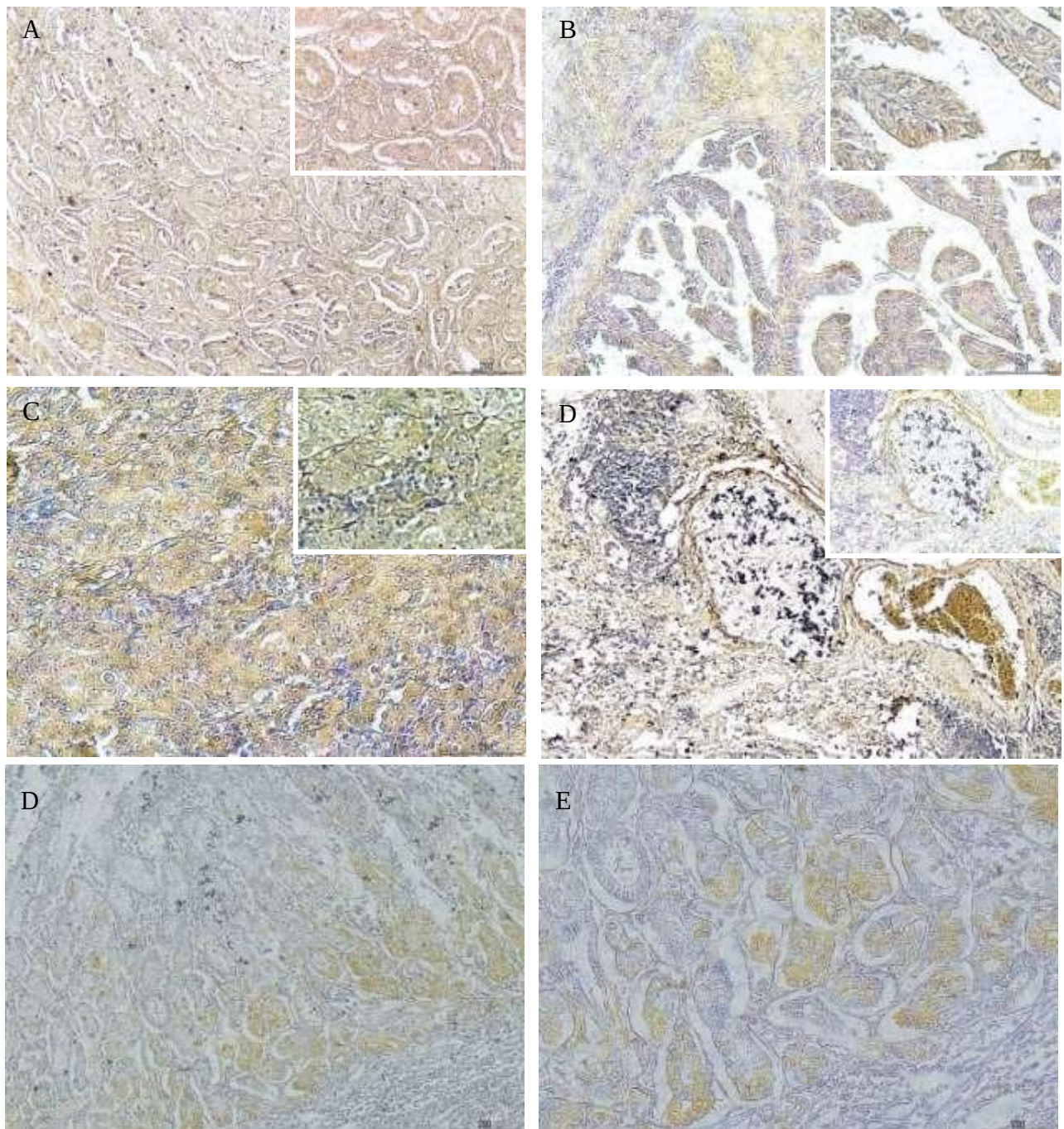


Figure 2. PpGalNAc-T15 subcellular staining in gastric cancer.
Cytoplasmic (A) and perinuclear (B) staining. 400x magnification.

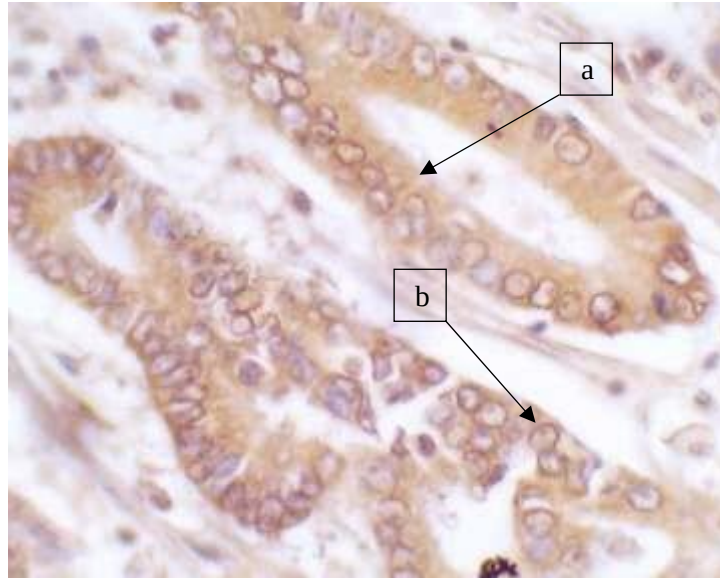


Table 1: Association analysis of ppGalNAc-T15 expression with clinicopathological features of gastric cancer patients.

Clinicopathological features	ppGalNAc-T15 ⁽⁺⁾ n (%)	ppGalNAc-T15 ⁽⁻⁾ n (%)	P value
Age (Years)			
≥60	22 (31.42)	13 (18.57)	0.0306 ^a
<60	12 (17.14)	23 (32.85)	
Sex			
Female	10 (14.28)	14 (20)	0.4570 ^a
Male	24 (34.28)	22 (31.42)	
Surgery			
Total	25 (35.71)	15	0.0087 ^a
gastrectomy	9 (12.85)	(21.42)	
Partial		21 (30)	
gastrectomy			
Neoadjuvant treatment			
I	32 (45.71)	33 (47.14)	1.0000 ^a
III	2 (2.85)	3 (4.28)	
Surgical Staging (TNM)			
(I e II)	5 (7.14)	13 (18.57)	0.0562 ^a
(III e IV)	29 (41.42)	23 (32.85)	
Lymph node involvement			
tYES	24 (34.28)	21 (30)	0.3260 ^a
NO	10 (14.28)	15 (21.42)	
Histological grade			
GI + GII	21 (30)	13 (18.57)	0.0549 ^a
GIII	13 (18.57)	23 (32.85)	
Chemotherapy			
YES	19 (27.14)	20 (28.57)	1.0000 ^a
NO	15 (21.42)	16 (22.85)	
Radiotherapy			
YES	12 (17.14)	10 (14.28)	0.6086 ^a
NO	22 (31.42)	26 (37.14)	
Recurrence			
YES	7 (10)	9 (12.85)	0.7785 ^a
NO	27 (38.57)	27 (38.57)	

^a Fisher's exact test.

SUPPLEMENTARY FILE

Figura 1. Gráficos dos parâmetros de sobrevida para ppGalNAc-T15. (A) Gráfico Sobrevida Global em dias para ppGalNAc-T15. (B). Gráfico Tempo livre de recidiva em meses para ppGalNAc-T15.

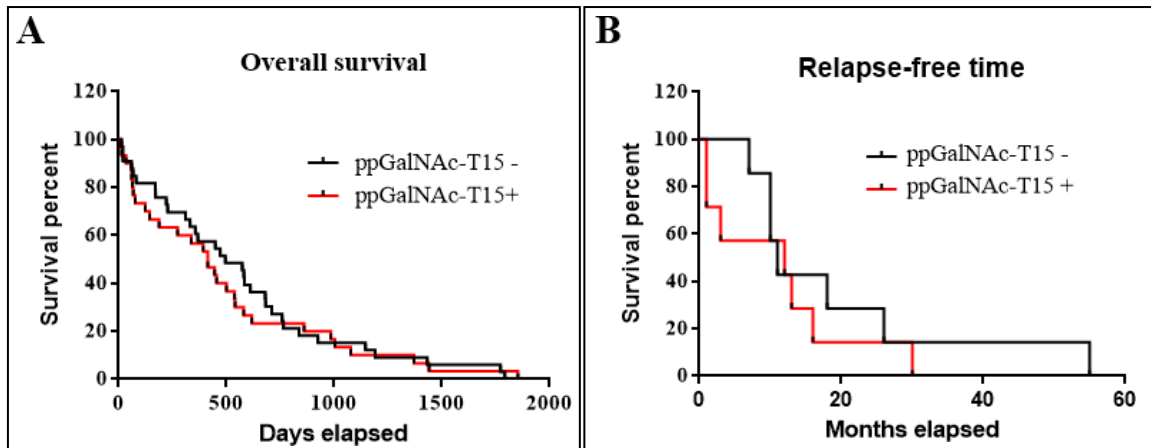
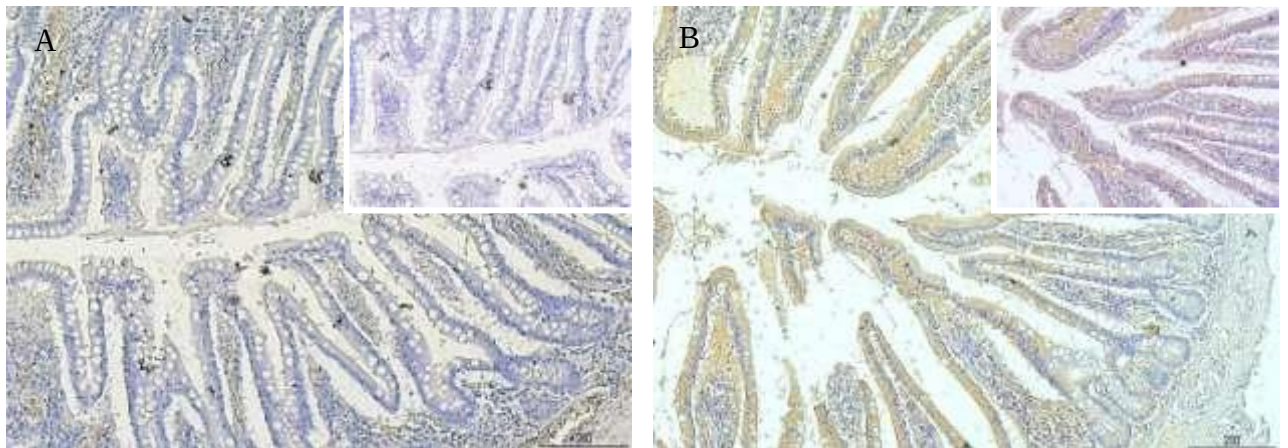


Figure 2. Controls and Non-cancer Tissue PpGalNAc-T15 Staining. Negative control (A), positive control (B).



5.2 CAPITULO 2

ASSOCIATION OF POLYPEPTIDE N-ACETYLGALACTOSAMINYL TRANSFERASE 16 WITH CLINICAL OUTCOME OF GASTRIC CANCER

Mário Sérgio de Souza Albuquerque^{*1}; Marina Ferraz Cordeiro^{*1}; Mário Rino Martins²; Antônio Felix da Silva Filho¹; Maria de Fátima Deodato de Souza¹; Michael Willames Leal Quirino¹; Luiza Rayanna Amorim Lima³; Maira Galdino da Rocha Pitta¹; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹;

1. *Laboratory of Immunomodulation and New Therapeutical Approaches, Research Centre for Therapeutic Innovation Suely Galdino (NUPIT-SG), Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.;*
2. *Hospital do Cancer de Pernambuco, Recife, PE, Brazil;*
3. *University of Pernambuco. Garanhuns, Brazil.*

Correspondence: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo; moacyr.rego@gmail.com

Laboratory of Immunomodulation and New Therapeutical Approaches, Research Centre for Therapeutic Innovation Suely Galdino (NUPIT-SG), Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil.

* Mário Sérgio de Souza Albuquerque and Marina Ferraz Cordeiro contributed equally to this work.

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is the second leading cause of cancer-related death worldwide and the lack of a molecular marker for GC remain a challenge to improve the clinical practice conducts. Alterations in glycosylation profile are reported in several cancers and involves the activity of various enzymes such as glycosyltransferases and glycosidases. Therefore, we evaluated tissue expression of polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 16 (ppGalNAc-T16). In this retrospective study, 72 paraffinized samples from primary GC patients were submitted to immunohistochemistry. The relationship between ppGalNAc-T16 immunostaining and various clinicopathological parameters and clinical outcomes were further analyzed. We found forty-two ppGalNAc-T16 positive samples. At tumor and normal areas were identified a predominant cytoplasmic and nuclear immunostaining $n=36$ and $n=33$, respectively. There were no statistical associations of experimental data with clinicopathological data. However, we found an association between ppGalNAc-T16⁽⁺⁾ group with six months higher median of relapse-free survival. with than ppGalNAc-T16⁽⁻⁾ patients ($p = 0.036$). Therefore, the tissue expression of ppGalNAc-T16 were more evidenced in cytoplasm and nuclear compartment, and here we also reported the relation between the positivity of this GT with recurrence-free survival. Once presented this relationship, further studies are needed to predict ppGalNAc-T16 as a new biomarker of gastric cancer.

Keywords: biomarker, immunohistochemistry, ppGalNAc-T16.

INTRODUCTION

Cancer is a worldwide public health problem, and GC is one of the most incident neoplasms. For 2017-2018 biennium is expected the emergence of 1735.350 new cases of cancer in North America, with 319.160 cases expected to gastrointestinal tract and 26.240 newcases of GC (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

This neoplasm has aggravating features such as low survival, where 20% of the individuals affected do not recur, in part due to its complex and heterogeneous histology (DENG et al., 2012; STEWART, B. W., WILD, 2014).

GC can be classified in papillary, tubular, mucinous, mixed adenocarcinomas and undifferentiated carcinoma according to the World Health Organization (WHO) guidelines. Tumors that exhibit papillary, tubular and mucinous features has a better prognosis than mixed adenocarcinomas and undifferentiated carcinoma. Generally, the first types showed histology with gland formations and extracellular mucin, while the most aggressive are characterized by loss of cohesion, signet ring cells, and no glands (YAKIREVICH & RESNICK, 2013; SITARZ et al., 2018).

Currently, studies have been reported the existence of few biochemical and histopathological molecular markers for gastric tumors (BANG et al., 2010; MIURA et al., 2015; GU et al., 2017; FONKUOA and YEE, 2018), but many of them are still poorly used in the clinical practice of these tumors. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), widely used in breast cancer prognosis and as a therapeutic response marker is also used to managing disease and prescribing the appropriate treatment to gastric tumors. However, it has been observed that many patients do not respond to anti-HER-2 treatment due to GC heterogeneity or the development of therapy resistance (BANG et al., 2010; AZARHOOSH et al., 2017). Thus, in the attempt to identify new predictive biomarkers to GC, studies involving glycomolecules have been contributing to the identification of glycobiological markers for GC (FERREIRA et al., 2017).

Altered protein glycosylation is one of the most events leads to oncogenic transformations in several organs especially those with mucosal regions, such as gastric and intestinal cancer. Alterations on glycan profile may change several cell functions such as cell adhesion, invasion, migration and signaling, as well as host-pathogen interactions and immune recognition modulation (PINHO and REIS, 2015). Protein glycosylation occur initially by action of glycosyltransferases (GTs) and

glycosidases on sugar biosynthesis pathway. Several alterations of GTs behavior lead to development of truncated antigens and this fact has been associated with tumor progression and metastasis (GILL et al., 2013; FERREIRA et al., 2018).

One of these cancers altered glycosyltransferases is represented by polypeptides *N*-acetylgalactosaminyltransferases (ppGalNAc-Ts), that are responsible to control the initial step of mucin biosynthesis. ppGalNAc-Ts family comprehends a group of 20 different glycosyltransferases and they also catalyze the first step of *O*-glycosylation originating the Tn antigen (MEREITER et al., 2016). Some of these ppGalNAc-Ts began to be studied in breast, bladder, ovary, liver and gastric tumors. One of these isoforms is ppGalNAc-T2, that has been associated with gastric tumor progression and metastasis (HUA et al., 2012), even as ppGalNAc-T5 (HE et al., 2014) and ppGalNAc-T6 (GOMES, 2008). Recently, Liu et al. (2017) reported the prognostic role of ppGalNAc-T10 in renal adenocarcinoma and the ppGalNAc-T14 has been studied in breast cancer (WU et al., 2010), hepatocellular carcinoma (LIANG et al., 2016) and small cell lung carcinoma (KWON et al., 2015). However, the potential of ppGalNAc-T16 isoform is still poor unclear.

Thus, the discovery of new glycobiomarkers to predict diagnosis, prognosis or therapeutic approaches represents a challenge to glycobiology researchers since the lack of available studies related to these enzymes profiles in GC development. Thus, we explored the ppGalNAc-T16 potential and its possible applications as a glycobiomarker.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Gastric cancer paraffinized biopsies (n=72) were obtained from Pathology Service at Hospital do Cancer de Pernambuco (HCP) between 2013 and 2016. All samples were confirmed histopathologically and approved by the Human Research Ethics Committee of Federal University of Pernambuco in the Health Sciences Center (opinion number: 39976214.90000.5205). Clinical and pathological variables such as age, sex, surgery type, neoadjuvant treatment, lymph node involvement, histological grade, adjuvant chemotherapy, radiotherapy, relapse and death were obtained from medical charts and further associated with ppGalNAc-T16 expression.

Immunohistochemistry

Samples sections (4µm) were deparaffinized with xylene and rehydrated in decreasing concentrations of ethanol (100, 95, 80, 75%). Antigen retrieval was performed in citrate buffer (100mM, pH 6), at microwave (300W) for 30 minutes, followed by treatment with endogenous peroxidase blocking solution (3%, 30min) at room temperature. Next steps were done according to REGO et al. (2014). Briefly nonspecific sites were blocked with 1% PBS bovine serum albumin for 1 h at room temperature. Histological sections were incubated with primary antibody: ppGalNAc-T16 (CUSABIO - clone 301-558AA) (1:100) for 2 h at 37°C. The samples were incubated with biotin-free polymer (DAKO) and the peroxidase color reaction was developed by DAB-H₂O₂ (DAKO). Positive controls were performed as indicated by the antibody manufacturer (small intestine) and to the negative controls, the primary antibody was replaced with non-specific IgG (DAKO) PBS/BSA 1% solution.

Histological analysis

Histomorphological analysis was performed through analysis of two independent observers. The microphotographs were captured with an integrated image analysis system using a BIOPTICA B20 microscope coupled with a CMOS camera (2584 x 1936 resolution) with the IScapture image capture software.

Samples that showed enzyme reaction in more than 10% of the neoplastic cells regardless of intensity degree were considered positive (ppGalNAc-T16⁽⁺⁾) and those that did not present were negative (ppGalNAc-T16⁽⁻⁾). A subcellular labeling analysis was performed, and all samples were further associated with clinical and outcome parameters.

Statistical analysis

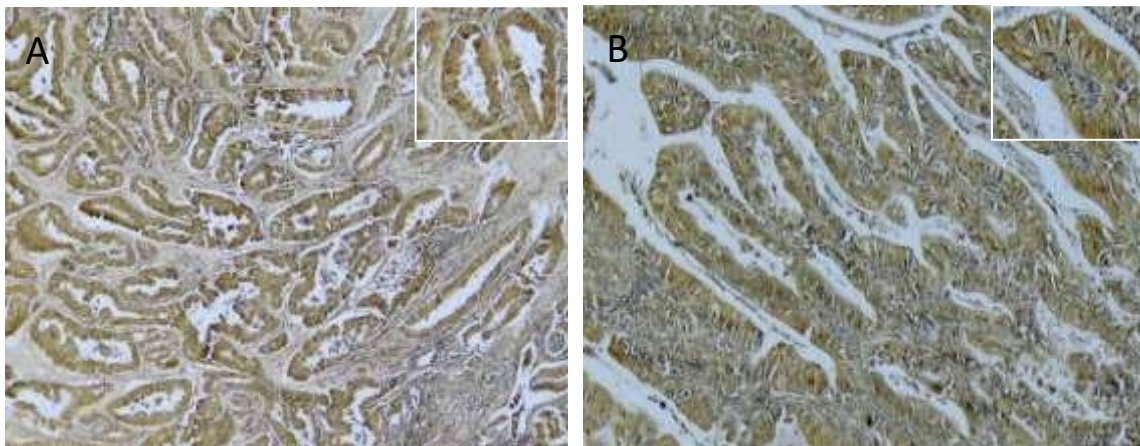
All statistical analyzes were performed on Graphpad Prism software version 6.00. The differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ after Fisher's test. To analyze the survival parameters, survival curves were used according to the log-rank method with kaplan-meyer curve.

RESULTS

Immunohistochemical analysis of ppGalNAc-T16 on gastric cancer

We first investigated tissue expression of ppGalNAc-T16 in samples of GC patients. Were observed tubular (Figure 1A), papillary (Figure 1B), mucin delimited regions (Figure 1C) and poorly cohesive lesions (Figure 1D) with tubular adenocarcinoma as predominant type of GC in our samples. Poorly cohesive and mucinous lesions frequently exhibited signet ring cells without ppGalNAc-T16 reaction. Immunohistochemical detection of ppGalNAc-T16 was found in 42 samples (58.33%). These samples presented individual subcellular staining or combinations of nuclear (Figure 2a), nucleolar (Figure 2b), perinuclear (Figure 2c), cytoplasmic (Figure 2d) and plasm membrane immunostaining (Figure 2e). The subcellular evaluation revealed that the ppGalNAc-T16 immunostaining was predominantly found at cytoplasm (n=36) and nuclear (n=33) compartment. Thirty GC samples (41.67%) exhibited normal gastric glands areas. Figure 3 A and B shows negative and positive controls, respectively. At twenty-five samples of this 30-normal gastric tissue, we found expression with cytoplasmic staining predominantly at basal portion and producing cells (Figure 3C and 3D).

Figure 1. PpGalNAc-T16 Immunohistochemistry of Gastric Cancer Histological Classification. Tubular lesion (A), papillary region (B), delimited mucin area (C) and poorly cohesive adenocarcinoma (D). 40X and 200X magnification.



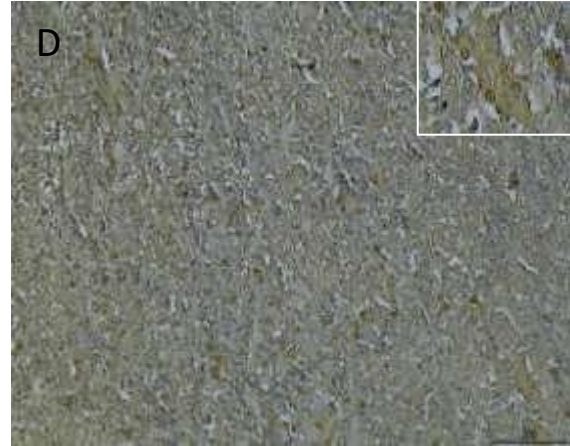
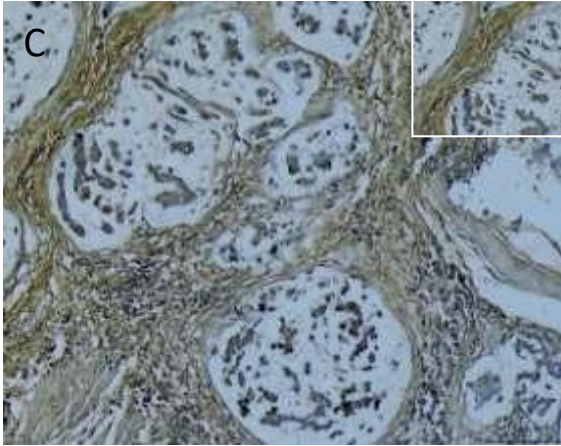


Figure 2. Subcellular immunohistochemical expression of ppGalNAc-T16 in gastric adenocarcinoma. (a) nuclear, (b) nucleolar (c) perinuclear, (d) cytoplasmic and (e) plasma membrane labeling. Left image at 400x magnification. Right image at 100x magnification.

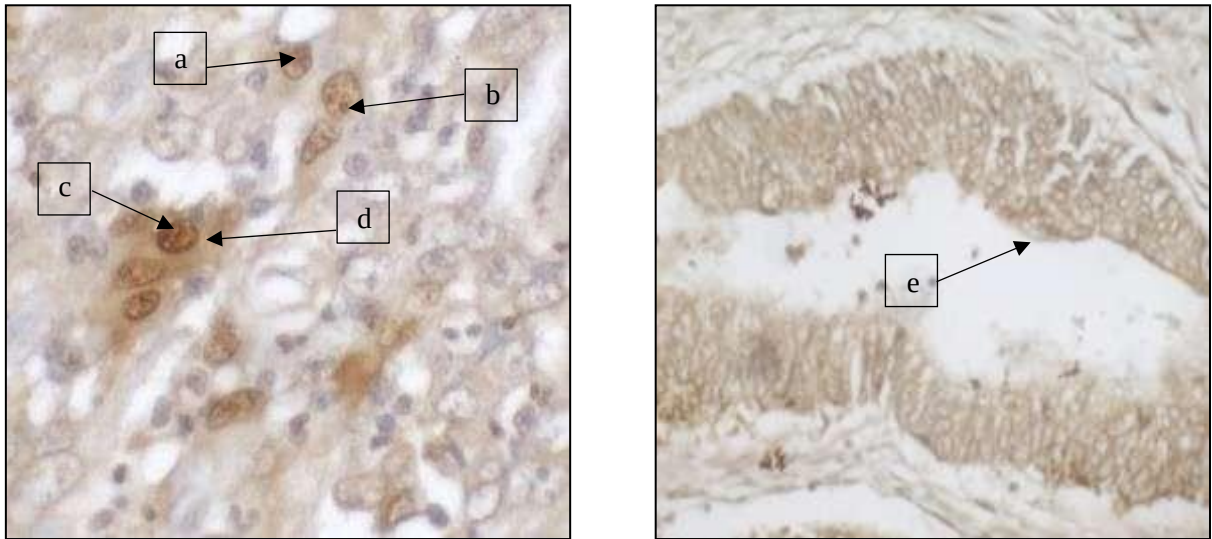
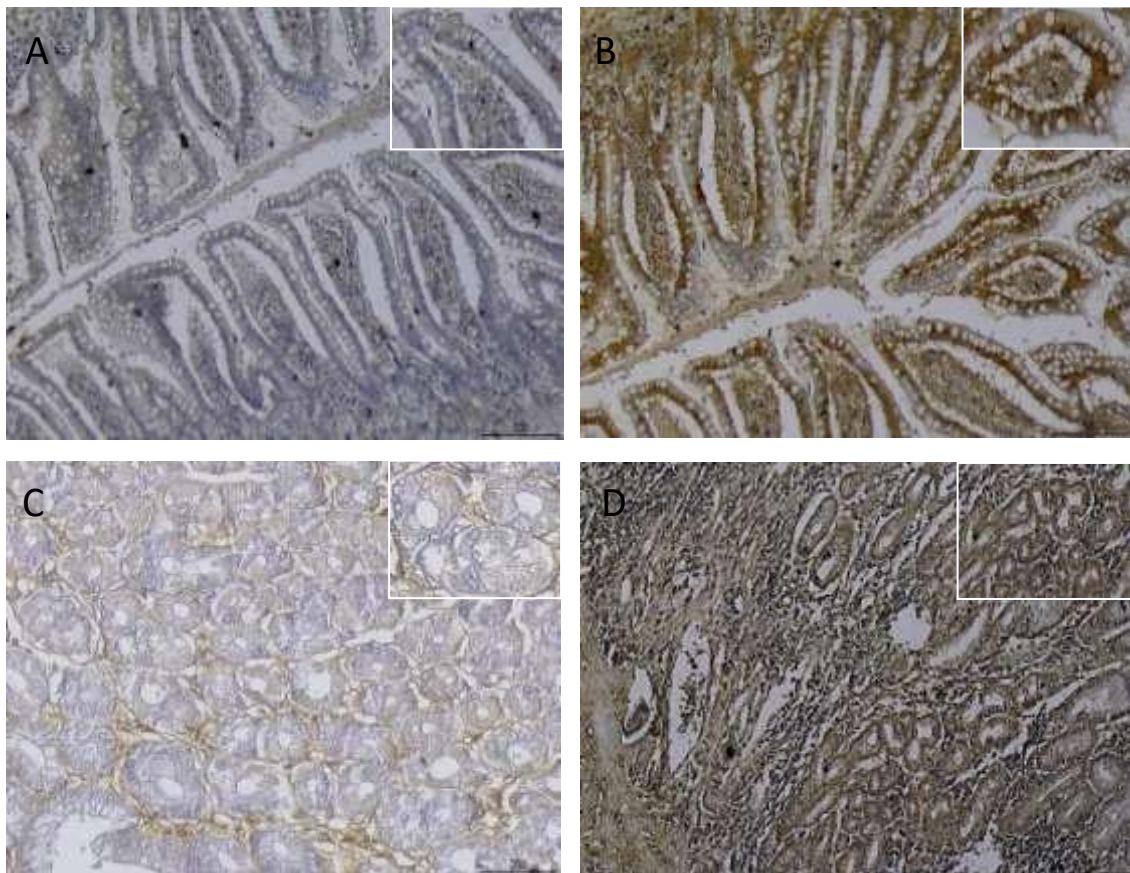


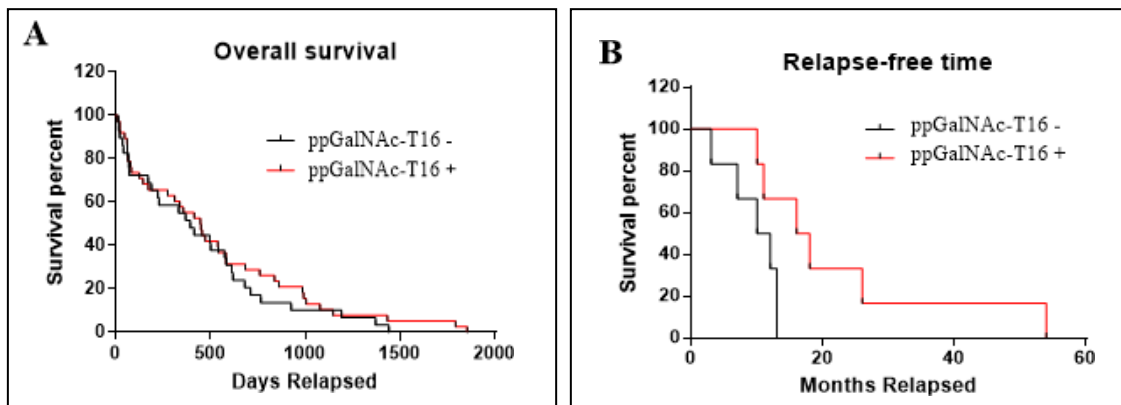
Figure 3. Control samples of gastric cancer for ppGalNAc-T16 immunostaining. Negative (A) and positive (B) controls in normal gastric mucosa. Normal gastric glands exhibit positive ppGalNAc-T16 immunostaining (C and D).



Expression of ppGalNAc-T16 is associated with clinical outcome

We also evaluated the association of ppGalNAc-T16 expression with clinicopathological features. After statistical analysis ppGalNAc-T16 expression do not showed association with any analyzed parameters (Supplementary table 1) and overall survivor (Figure 4A), however in relation to relapse free-time, it can be observed that the negative enzyme group presents medianrecurrence 6 months lower (44 weeks) than the positive group (68 weeks) ($p= 0.0364$) (Figure4B).

Figure 4. Association of ppGalNAc-T16 expression with overall survival (A) and relapse free-time (B) of gastric cancer patients. For overall survival, the ppGalNAc-T16⁽⁺⁾ group presented median in days of 447.5 days and 393 days to negative one. ppGalNAc-T16⁽⁺⁾ patients showed a median about 17 months and ppGalNAc-T16⁽⁻⁾ group showed median of 11 months to relapse-free time.



DISCUSSION

Several cellular types with distinct morphological features are found in GC lesions (SITARZ et al., 2018). Tubular lesions were the most frequent type found in our samples. These lesions had an irregularly distended tubular form, branching or fused tubule of distinct sizes, besides presenting mucus in intraluminal regions, abortive glands, necrotic debris in the gland lumens and several other features. We also found papillary adenocarcinoma in our analyzed samples. Some features are particular of this lesion as the finger-like projections on the mucosal surface, lined with neoplastic columnar cells which surround a fibrovascular core besides tubular and micropapillary components (HUANG; ZOU, 2017). Mucinous and poorly cohesive carcinomas are usually composing with a mixture of signet ring cells and other cells types as producing cells, poorly differentiated cells, lymphocytes and other ones. Mucinous adenocarcinoma comprehends prominent glandular formation and abundant extracellular mucin deposition (LIN et al., 2017). Poorly cohesive adenocarcinoma is composed by poorly differentiated cells without gland formations and often contains signet ring tumor cells (YAKIREVICH & RESNICK, 2013).

These adenocarcinomas are originates from a sequential accumulation of genetic and molecular alterations to gastric epithelium, but the carcinogenesis mechanism remains unclear. Moreover, a greater number of distinct cellular phenomena including altered protein glycosylation and other factors, contributes to promoting initiation, progression, invasion and metastasis of GC (BINAK et al., 2016; MEREITER et al., 2016). Alterations in protein glycosylation profile can interfere on normal molecular functions such as cell-cell recognition, communication, and adhesion, leading to malignant features establishment (HAUSELMANN and BORSIG, 2014). The overexpression and exposure of short, truncated O-glycans is a common event observed in GC and, efforts on identification of promissory glycomolecules are current found in literature (FERREIRA et al., 2017). Thus, we provided the initial step to predicta possible GT that acts as glycobiomarker on GC.

There are 20 GTs isoforms that are already been reported in literature and some of them have a certain similarity with other isoforms. Taking as example the ppGalNAc-T16, is described that it presents 49% and 53% of sequence similarity with ppGalNAc-T2 and ppGalNAc-T14, respectively (WANG et al., 2003; RAMAN et al., 2012). However, these GTs has different specifics substrates affinities, besides are differentially expressed in cells and the diversity of isoenzymes in a given cell can conduct the production of own O-glycoproteins (KONG et al., 2015).

Our results showed ppGalNAc-T16 expression in the greater number of analyzed samples including normal and neoplastic tissues, but it was high expressed in GC lesions. ppGalNAc-T16 was described to be low expressed in normal gastric mucosa, bone marrow and placenta when compared with its expression at the brain and heart (BENNET et al., 2012; FAGERBERG et al., 2014). Moreover, as previously discussed, glycosyltransferases, present different expression profiles during carcinogenesis, when associated with their normal counterparts (PINHO and REIS, 2015; FERREIRA et al., 2017).

We also found a predominant cytoplasmic and nuclear immunostaining by ppGalNAc-T16 in GC samples and in some GC lesions we identified plasmic membrane, perinuclear and nucleolar reaction. According to Gill et al. (2010) in normal conditions this enzyme is widely located in the lumen of Golgi apparatus, but during carcinogenesis they observed a different location of studied ppGalNAc-Ts. They found that these GTs are strongly redistributed from Golgi to endoplasmic reticulum (ER) in Hela cells (cervical cancer). The ER redistribution occurred with all the members of the GalNAc-T family tested, including ppGalNAc-T1, ppGalNAc-T2 and ppGalNAc-T3 (GILL et al., 2010). Therefore, considering ppGalNAc-T16 sequence similarity with ppGalNAc-T2 and Gill and contributors findings, the perinuclear expression founded at this work probably appear to be an immunoreaction in ER of gastric cancer cells. However, the translocation of ppGalNAc-Ts from cytoplasm to nucleus and the mechanisms that leads the cells to this phenotype, remains unclear.

Additionally, we showed a significant association of ppGalNAc-T16 positive samples and relapse free-time of GC where the individuals that expressed this GT had more 6 months until of relapse. Alteration on expression profile of O-glycans are also associated with clinicopathological variables, such as lymph node metastasis, tumor stage and recurrence in gastric and colorectal cancer (FERREIRA et al., 2017). Gu et al. (2004) identified, by immunohistochemistry and western blotting analysis, a significant association between the low expression of ppGalNAc-T3 and early recurrence after evaluation of 148 lung cancer biopsies. Freire et al., (2006) in order to detect disseminated breast cancer cells in 61 bone marrow aspirates using ppGalNAc-T6 mRNA expression, revealed that the group without lymph node involvement the disease recurrence was observed in the majority of breast cancer patients who showed ppGalNAc-T6 mRNA-positive bone marrow aspirates. Interestingly, these two GTs, GalNAc-T3 and GalNAc-T6, have almost identical

substrate specificities on a small peptide panel (BENNETT, HASSAN, MANDEL et al., 1999; KONG et al., 2015). Moreover, most of studies about GTs specific substrates are limited due to its ability to express active

homogeneous recombinant enzymes and by the limited number of various acceptor peptides described based on O-glycoproteins and O-glycosites (BENNETT et al., 2012; KONG et al., 2015). Kong et al. (2015) have identified that GalNAc-T16 and GalNAc-T14 showed more restricted substrate specificities compared to GalNAc-T2 and with other GTs families. Thus, the divergences found in this work with related studies can be explained by the fact that there are differences in affinity of specific substrate.

CONCLUSION

Regarding ppGalNAc-T16 expression in gastric lesions we identified a higher relapse-free time when patients presenting positivity to this GT. This result indicating that ppGalNAc-T16 has a certain prognostic value to these patients. Further studies should be conducted to better predict the prognostic value of ppGalNAc-T16 in gastric cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thanks to CNPq, CAPES and FACEPE, for the financial support and Therapeutic Innovation Post Graduate Program of Federal University of Pernambuco for supporting this work.

6. DISCUSSÃO

Os adenocarcinomas CG se originam através de uma série de alterações genéticas e moleculares no epitélio gástrico, mas o mecanismo de carcinogênese permanece incompreendido. Nas lesões do CG podemos encontrar diferentes tipos de arquitetura celular com características morfológicas distintas: como as lesões tubulares, papilares, mucosas e pouco coesas (BINAK et al., 2016; MEREITER et al., 2016; SITARZ et al., 2018).

A imunomarcção da ppGalNAc-T15 foi mais prevalente em lesões coesas que possuíam arranjos celulares papilares e tubulares, que possuem um prognóstico mais brando em relação as outras lesões encontradas pouco coesas. Já a imunomarcção da ppGalNAc-T16 foi relativamente mais uniforme marcando todos os tipos de lesões desde as mais coesas até as indiferenciadas.

As lesões tubulares apresentam-se com uma forma tubular irregular e distendida, pode ser caracterizada por túbulo ramificado ou fundido de tamanhos distintos, além de apresentar muco nas regiões intraluminal, detritos necróticos e várias outras características. Em relação as lesões papilares, algumas características são específicas desta lesão, como as projeções em forma de dedo na superfície da mucosa, alinhadas com células colunares neoplásicas que cercam um núcleo fibrovascular além de componentes tubulares e micropapilares (HUANG; ZOU, 2017).

Já as lesões mucosas e pouco coesas são geralmente mais agressivas e evidencia uma mistura de células de anel de sinete e outros tipos de células como células produtoras, células mal diferenciadas, linfócitos e outros. A principal diferença entre estes dois tipos de lesão, compreende a formação glandular proeminente e a deposição abundante de mucina extracelular, formando bolsões de deposição mucina (LIN et al., 2017; YAKIREVICH e RESNICK, 2013).

Alterações no perfil de glicosilação de proteínas podem interferir em funções moleculares normais, como o reconhecimento, a comunicação e a adesão celular, levando ao estabelecimento de características malignas (HAUSELMANN e BORSIG, 2014). Além disso, através de fenômenos celulares distintos, incluindo a glicosilação proteica alterada, que contribuem para a promoção da iniciação, progressão, invasão e metástase de GC (BINAK et al., 2016; MEREITER et al., 2016).

Um evento comum observado em CG é superexpressão e a exposição de O-glicanos curtos e truncados, onde os esforços na identificação de glicomoléculas promissoras, como é o caso das ppGalNAc-Ts, são encontrados atualmente na literatura. Entretanto são necessários mais estudos para identificar a participação de moléculas envolvidas no processo de oncogênese (FERREIRA et al., 2017).

O primeiro relato da atividade da família das PpGalNAc-Ts foi realizado por Hennebicq e colaboradores (1998) em tumores gástricos através de experimentos como eletroforese capilar e espectrometria de massa, onde analisaram o número de resíduos de GalNAc ligados aos peptídeos e sua atividade como enzima transferase, observando que as glândulas gástricas normais apresentavam maior atividade enzimática em relação ao tecido neoplásico.

A expressão ppGalNAc-Ts têm diferentes afinidades de substratos específicos, além deserem diferencialmente expressos em células e sua diversidade de isoenzimas em uma determinada célula pode conduzir a produção de O-glicoproteínas próprias contribuindo diretamente para sua homeostase (BENNETT et al., 2012; KONG et al., 2015). Contudo, o uso das isoformas ppGalNAc-T15 e T16 como possível biomarcador e alvo terapêutico para câncer gástrico ainda não está claro.

Os genes GALNT de acordo com sua homologia, podem ser agrupados em subfamílias. Bennett e colaboradores (2012) pesquisaram todos os genes da GALNT, identificando também as subfamílias adicionais constituídas por GALNT1 / T13, GALNT2 / T14 / T16, GALNT7 / T10 / T17, GALNT4 / T12, GALNT8 / T9 / T18 / T19 e GALNT11 / T20. A classificação dessas subfamílias baseou-se nas características predominantes de cada agrupamento em relação a sua especificidade peptídica.

Destes, dois genes, GALNT5 e T15, não mostram uma relação significativa com as subfamílias. Estes dois genes possuíam características distintas do restante das isoformas da família e, portanto, não se agruparam em subfamílias na análise filogenética por possuir regiões intrônicas singulares (BENNETT et al., 2012). Cheng, L em seu estudo sugeriu que a ppGalNAc-T12 possui maior grau de homologia com a ppGalNAc-T15 ao comparar com as outras isoformas da mesma família.

Neste trabalho foi observado que a expressão da ppGalNAc-T15 apresentou padrão de marcação citoplasmática geral, e em porcentagens menores, marcações nucleares, perinucleares e de membrana plasmática presente em aproximadamente

metade das amostras de GC. Ao observar a imunoreatividade desta enzima no tecido gástrico normal adjacente ao neoplásico, foi revelado o mesmo perfil citoplasmático, mas restrito à porção basal das glândulas gástricas. Além disso, a marcação positiva da ppGalNAc-T15 foi associada com os seguintes parâmetros clínicos: idade, tipo da cirurgia realizada, estadiamento cirúrgico e grau histológico.

Shin Yun e colaboradores (2016) relataram o mesmo padrão de marcação para ppGalNAc-T2. Entre os 20 genes analisados, apenas GALNT2 e GALNT8 foram altamente expressos nas glândulas gástricas normais, restringido à porção basal das glândulas gástricas, semelhante ao nosso estudo. Através dos ensaios de invasão/migração e modelo de metástases in vivo, eles sugerem que a GALNT2 possui um papel de supressão tumoral das células GCA (linhagem gástrica representativa), que por sua vez, fornece novos direcionamentos sobre o significado da O-glicosilação na progressão destas células. Da mesma forma, resultados semelhantes foram encontrados por Dong e colaboradores (2012) que utilizaram outra linhagem de câncer gástrico, SGC7901, e provaram o papel anti-proliferativo e anti-metastático de ppGalNAc-T15.

A idade foi um fator importante analisado neste estudo. Os pacientes que apresentaram expressão para ppGalNAc-T15 possuíam idade superior a 60 anos em relação ao grupo sem expressão de ppGalNAc-T15. Algumas proteínas que funcionam como biomarcadores são importantes na regulação do metabolismo, resistência ao estresse e envelhecimento. É provável que a ppGalNAc-T15 esteja relacionada a um importante processo de antienvelhecimento através de uma possível regulação do metabolismo, reduzindo o dano celular relacionado ao estresse. Esta hipótese, no entanto, precisa de experiências adicionais para elucidar o mecanismo detalhado.

Em contrapartida, os pacientes que expressaram ppGalNAc-T15 em tumores gástricos positivos foram submetidos a procedimentos cirúrgicos mais extensos, o que pode estar associado a um comportamento agressivo. Esses resultados diferem dos relacionados ao ppGalNAc-T2, cuja expressão foi menor nas amostras de câncer gástrico. Isto é possivelmente devido a diferenças nas propriedades de proteínas cinéticas e de proteção.

Assim como a ppGalNAc-T15 possui uma certa semelhança com outras isoformas, é descrito que a ppGalNAc-T16 apresenta 49% e 53% de similaridade de sequência com ppGalNAc-T2 e ppGalNAc-T14, respectivamente (WANG et al., 2003; RAMAN et al., 2012). Alguns estudos mostraram que a ppGalNAc-T16 é pouco

expressa na mucosa gástrica normal, medula óssea e placenta quando comparado com a expressão no cérebro e coração (BENNET et al., 2012; FAGERBERG et al., 2014)

Neste estudo, a marcação da expressão tecidual foi positiva para ppGalNAc-T16 em várias amostras analisadas, incluindo tecidos normais e neoplásicos, porém foi mais expressa em lesões de GC.

Além disso, as glicosiltransferases, apresentam diferentes perfis de expressão durante a carcinogênese, quando associadas às suas homólogas normais (PINHO e REIS, 2015; FERREIRA et al., 2017).

Foi encontrado neste estudo, em sua maioria, imunomarcação citoplasmática e nuclear para ppGalNAc-T16, além de marcação em menor quantidade na membrana plasmática, perinuclear e nucleolar nas amostras de GC. Gill e colaboradores (2010) em seus estudos mostraram que, em condições normais, esta enzima está amplamente localizada no lúmen do aparelho de Golgi, porém durante a carcinogênese observaram uma localização semelhante ao apresentado pela ppGalNAc-T16 nas amostras estudadas e que diferem do seu sítio fisiológico.

Esta mudança de localização ocorreu com todos os membros da família ppGalNAc-Ts testados, incluindo ppGalNAc-T1, ppGalNAc-T2 e ppGalNAc-T3. Considerando a homologia de ppGalNAc-T16 com ppGalNAc-T2 e o estudo de Gill et al. (2010). A expressão perinuclear apresentada neste trabalho provavelmente parece ser uma translocação do citoplasma para o núcleo e os mecanismos que conduzem as células para este fenótipo, precisam ser mais estudados.

As amostras positivas de ppGalNAc-T16 mostraram uma associação significativa em relação ao tempo livre de recidiva do GC, onde os indivíduos que expressaram esta marcação tiveram mais 6 meses até o reaparecimento da doença. A expressão alterada de O-glicanos também está associada a variáveis clínicas patológicas, como metástases nos linfonodos, estágio tumoral e recorrência no câncer gástrico e colorretal (FERREIRA et al., 2017).

Em concordância Gu e colaboradores (2004) avaliaram por imunohistoquímica e Western blotting, uma associação significativa entre a baixa expressão de ppGalNAc-T3 e recorrência precoce da doença após avaliação de 148 biópsias de câncer de pulmão.

Além disso, a maioria dos estudos sobre substratos específicos das ppGalNAc-Ts são limitados devido à sua capacidade de expressar enzimas recombinantes homogêneas ativas e pelo número limitado de vários peptídeos aceitantes descritos com base em glicoproteínas O e O-glicosídeos (BENNET et al., 2012; KONG et al., 2015).

Kong e colaboradores (2015) identificaram que as isoformas ppGalNAc-T16 e T14 mostraram especificidades de substrato mais restritas em comparação com ppGalNAc-T2 e com outras enzimas de sua família. Assim, as divergências encontradas neste trabalho com estudos relacionados, podem ser explicadas pelo fato de existirem diferenças na afinidade do substrato específico.

7. CONCLUSÃO

- A expressão tecidual das ppGalNAc-T15 em amostras de tumores gástricos, do total de 70 pacientes, 33 foram positivas. Já para ppGalNAc-T16 do total de 72 amostras, 42 foram positivas.
- Foram encontradas marcações nucleares, nucleolares, perinucleares, citoplasmáticas e membrana plasmática das ppGalNAc-T15 e T16. A marcação mais prevalente na isoforma T15 foi a citoplasmática e a mais prevalente na isoforma T16 foi a citoplasmática e nuclear;
- Foi encontrada associação do padrão de expressão tecidual das ppGalNAc-T15 com Idade e tipo de cirurgia. Também houve limite de significância para o Estadiamento cirúrgico. Não foi encontrada nenhuma associação do padrão de expressão tecidual das ppGalNAc-T16 com os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes;
- Não foi encontrada nenhuma associação entre a expressão de ppGalNAc-T15 os parâmetros de sobrevivência (Sobrevida Global, Sobrevida Livre da Doença) do câncer gástrico. Contudo, foi encontrada associação entre a expressão de ppGalNAc-T16 com o parâmetro de sobrevivência Sobrevida Livre da Doença do câncer gástrico.
- Diante dos resultados encontrados pode-se dizer que o objetivo do estudo possui um potencial como biomarcador, mas serão necessários mais estudos para avaliar seu comportamento frente ao câncer gástrico.

8. PERSPECTIVAS

- Analisar a expressão diferencial da E-caderina em relação as ppGalNAc-Ts testadas, assim como a sua análise qualitativa e análise estatística.
- Analisar quantitativamente a expressão diferencial das ppGalNAc-T5 e T16 através da contagem de células positivas marcadas em cinco campos aleatórios e o percentual de células marcadas.

9. REFERÊNCIAS

- 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**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 325-330, 2013.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Treatment & Survivorship Facts & Figures 2016-2017. **American Cancer Society**, [s. l.], p. 44, 2016.
- ANTONIO, San. Che Moradiot He Rap Y Plus Surgery for Gastric Adenocarcinoma Chemoradiotherapy After Surgery Compared With Surgery Alone for Adenocarcinoma of the Stomach or Gastroesophageal Junction. **English Journal**, [s. l.], v. 345, n. 10, p. 725-730, 2001.
- BASS, Adam J. et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature**, [s. l.], v. 513, n. 7517, p. 202-209, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature13480>>
- BENNETT, Eric P. et al. Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. **Glycobiology**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 736-756, 2012.
- BENNUN, Sandra V. et al. Systems Glycobiology: Integrating Glycogenomics, Glycoproteomics, Glycomics, and Other 'Omics Data Sets to Characterize Cellular Glycosylation Processes. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 428, n. 16, p. 3337-3352, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.005>>
- BERLTH, Felix et al. Pathohistological classification systems in gastric cancer: Diagnostic relevance and prognostic value. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 20, n. 19, p. 5679-5684, 2014.
- BEROIS, Nora et al. UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-6 as a new immunohistochemical breast cancer marker. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 317-28, 2006. Disponível em: <<http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1369/jhc.5A6783.2005>>

BEROIS, Nora et al. ppGalNAc-T13: a new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma. **Clinical chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 9, p. 1701-12, 2006. b. Disponível em:

<<http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2006.067975>>

BEROIS, Nora et al. GALNT9 gene expression is a prognostic marker in neuroblastomapatients. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 225-233, 2013.

BOHLE, Wolfram; SCHEIDIG, Alexander; ZOLLER, Wolfram G. Endosonographic tumorstaging for treatment decision in resectable gastric cancer. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 135-139, 2011.

COLA, Carlos Bernardo et al. Tratamento cirúrgico do câncer gástrico em pacientes jovens :experiência de 05 anos no INCA. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 135-141, 2005. Disponível em:

<http://www.inca.gov.br/rbc/n_51/v02/pdf/artigo5.pdf>

CUNNINGHAM, David et al. Perioperative Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Cancer. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 355, n. 1, p. 11-20, 2006. Disponível em:

<<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1513750>>

DENG, Niantao et al. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancerreveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. **Gut**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 673-84, 2012.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22315472>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3322587>>

DING, Ming-xia et al. ppGalNAc T1 as a potential novel marker for human bladder cancer.**Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 5653-7, 2012.Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23317233>>

DUARTE, Henrique et al. Mucin-Type O-Glycosylation in Gastric Carcinogenesis. **Biomolecules**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 33, 2016. Disponível em:

<<http://www.mdpi.com/2218-273X/6/3/33>>

EL-MENYAR, Ayman; MEKKODATHIL, Ahammed; AL-THANI, Hassan. Diagnosis and management of gastrointestinal stromal tumors: An up-to-date literature review. **Journal of cancer research and therapeutics**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 889-900, 2017.

FREIRE, Teresa et al. UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetyl galactosaminyltransferase 6 (ppGalNAc-T6) mRNA as a potential new marker for detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 119, n. 6, p. 1383-1388, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.21959>>

FUNAKOSHI, Yoko; SUZUKI, Tadashi. Glycobiology in the cytosol: The bitter side of a sweet world. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1790, n. 2, p. 81-94, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.09.009>>

GILL, Anthony J. Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient neoplasia. **Histopathology**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 106-116, 2018.

GOMES, Joana et al. Expression of UDP-N-acetyl-D-galactosamine: Polypeptide N-acetyl galactosaminyltransferase-6 in Gastric Mucosa, Intestinal Metaplasia, and Gastric Carcinoma. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 79-86, 2008. Disponível em: <<http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1369/jhc.2008.952283>>

GULLEY, Margaret L. Genomic assays for Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. **Experimental & molecular medicine**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. e134, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emm.2014.93>>

GUO, Yan et al. Polypeptide N-acetyl galactosaminyltransferase-6 expression in gastric cancer. **OncoTargets and Therapy**, [s. l.], v. Volume 10, p. 3337-3344, 2017. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/polypeptide-n-acetyl-galactosaminyltransferase-6-expression-in-gastric-peer-reviewed-article-OTT>>

GURZU, Simona et al. Immunohistochemical features and staging of early gastric cancer. **Archives of Medical Science**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 1373-1382, 2017. Disponível em: <<https://www.termedia.pl/doi/10.5114/aoms.2016.58665>>

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>

HARADA, Yoshikazu et al. Strong expression of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 independently predicts shortened disease-free survival in patients with early stage oral squamous cell carcinoma. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p.1357-1368, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-3928-7>>

HASSANI, Zahra et al. Phostine PST3.1a Targets MGAT5 and Inhibits Glioblastoma- Initiating Cell Invasiveness and Proliferation. **Molecular Cancer Research**, [s. l.], v. 15, n.10, p. 1376-1387, 2017. Disponível em: <<http://mcr.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1541-7786.MCR-17-0120>>

HE, H. et al. Clinical significance of polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase-5 (GalNAc-T5) expression in patients with gastric cancer. **British journal of cancer**, [s. l.], v.110, n. 8, p. 2021-9, 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bjc201493>>

HO, V. K. Y. et al. Adjuvant Chemoradiotherapy for Non-Pretreated Gastric Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 3647-3657, 2017.

HOLLINGSWORTH, Michael A.; SWANSON, Benjamin J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 45-60, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1251>>

HUA, DONG et al. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 regulates cellular metastasis-associated behavior in gastric cancer. **International Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 1267-1274, 2012. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2012.1130>>

HUANG, Miao-Juei et al. Knockdown of GALNT1 suppresses malignant phenotype of hepatocellular carcinoma by suppressing EGFR signaling.

Oncotarget, [s. l.], v. 6, n. 8, p.5650-65, 2015. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4467392&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

HUSSAIN, Muhammad Ramzan Manwar; HOESSLI, Daniel C.; FANG, Min. N-acetylgalactosaminyltransferases in cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 33, p.

54067-54081,2 2016. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27322213><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5288242>>

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. **International Agency for Research on Cancer (IARC) IARC Press 69372 Lyon, France Research on Cancer (IARC) 69372 Lyon, France**, [s. l.], p. 307, 2000. Disponível em:

<<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11829087&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/C02A82F1-823F-4021-94A7-4D1CE0C4214D>>

JOHNSON, Jenny L. et al. The regulatory power of glycans and their binding partners in immunity. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 290-298, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.01.006>>

JU, Tongzhong et al. Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human diseasemarkers. **Proteomics - Clinical Applications**, [s. l.], v. 7, n. 9-10, p. 618-631, 2013.

KELLY, S. et al. A systematic review of the staging performance of endoscopic ultrasound in gastro-oesophageal carcinoma. **Gut**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 534-539, 2001.

KONG, Yun et al. Probing polypeptide GalNAc-transferase isoform substrate specificities by in vitro analysis. **Glycobiology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 55-65, 2015.

KWON, Ok-Seon et al. GalNAc-T14 promotes metastasis through Wnt dependent HOXB9 expression in lung adenocarcinoma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 39, p. 41916-28, 2015. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/abstract/6019>>

LI, Qiang et al. Feasibility and safety comparison of laparoscopyassisted versus open gastrectomy for advanced gastric carcinoma with D2 lymphadenectomy. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 323-328, 2016.

LIANG, Kung-Hao et al. GALNT14 genotype effectively predicts the therapeutic response in unresectable hepatocellular carcinoma treated with transcatheter arterial chemoembolization. **Pharmacogenomics**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 353-366, 2016. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pgs.15.179>>

LIBISCH, M. G. et al. GALNT11 as a new molecular marker in chronic lymphocytic leukemia. **Gene**, [s. l.], v. 533, n. 1, p. 270-279, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.052>>

LIN, Xiandong et al. Molecular classification and prediction in gastric cancer. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 13, p. 448-458, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2001037015000367>>

LIU, Li et al. Prognostic role of N-Acetylgalactosaminyltransferase 10 in metastatic renal cell carcinoma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 14995-15003, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28122358>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5362461><http://www.oncotarget.com/abstract/14786>>

LIU, Xuechao et al. Prognostic significance of Epstein-Barr virus infection in gastric cancer: a meta-analysis. **BMC cancer**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 782, 2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4619309&tool=pmcentrez&render_type=abstract>

MA, Junli et al. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. **Oncology letters**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 2959-2964, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27123046>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4840723>>

MANUSCRIPT, Author. in Cancer Therapeutics. **Acta histochemica**, [s. l.], v. 113, n. 3, p. 236-247, 2011.

MARIANO, Marilena De et al. Identification of GALNT14 predisposition gene as a novel neuroblastoma. [s. l.], v. 6, n. 28, p. 1-12, 2015.

MATTAR, R. et al. Preoperative serum levels of CA 72-4, CEA, CA 19-9, and alpha-fetoprotein in patients with gastric cancer. **Rev Hosp.Clin.Fac.Med.Sao Paulo**, [s. l.], v. 57,n. 3, p. 89-92, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia. **Ministério Da Saúde**, [s. l.], v. 1, p. 356, 2014. Disponível em: <<http://old.cremerj.org.br/publicacoes/148.PDF>>

MOTOSHIMA, Shigenobu et al. Prognostic implications of HER2 heterogeneity gastric cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 9262-9272, 2018. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/24265>>

MURAKAMI, Midori et al. Expression of Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase-6in Epithelial Ovarian Carcinoma. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 37, n. 7, p. 3911-3915, 2017. Disponível em: <<http://ar.iiarjournals.org/content/37/7/3911.abstract>>

NG, John; LEE, Percy. The Role of Radiotherapy in Localized Esophageal and Gastric Cancer. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 453-468,2017. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2017.01.005>>

NIV, Yaron. Helicobacter pylori and gastric mucin expression: A systematic review andmeta-analysis. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 21, n. 31, p. 9430, 2015. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i31/9430.htm>>

NOGIMORI, Kenichi et al. Increased expression levels of ppGalNAc-T13 in lung cancers: Significance in the prognostic diagnosis. **International Journal of Oncology**, [s. l.], p. 1369-1376, 2016. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2016.3638>>

OBSTETRICALS, Departments et al. Expression of N-Acetylgalactosaminyltransferase-6 IsRelated to Expression of Cell Adhesion Molecules in Endometrial Cancer. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 37, n. 7, p. 3905-3910, 2017. Disponível em: <<http://ar.iiarjournals.org/content/37/7/3905.abstract>>

OK, Kyung-sun et al. Magnifying Endoscopy with Narrow Band Imaging of Early Gastric Cancer: Correlation with Histopathology and Mucin Phenotype. **Gut and liver**,

[s. l.], v. 10, n. 4, p. 532-41, 2016. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27021504>>

PATANI, Neill; JIANG, Wen; MOKBEL, Kefah. Prognostic utility o
glycosyltransferase expression in breast cancer. **Cancer genomics &
proteomics**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 333-40, 2008. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287074>>

PENG, Rui-Qing et al. MicroRNA-214 Suppresses Growth and Invasiveness of
Cervical Cancer Cells by Targeting UDP- N -acetyl- α -d-galactosamine: Polypeptide
N - Acetylgalactosaminyltransferase 7. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v.
287, n. 17, p.14301-14309, 2012. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399294>%5Cn<http://www.jbc.org/content/287/17/14301.full.pdf>>

PINTO, Carlos Eduardo et al. Câncer gástrico precoce: revisão de 47 casos do
instituto nacional de câncer nos últimos cinco anos. **Revista do Colégio Brasileiro
de Cirurgiões**, [s.l.], v. 28, n. 3, p. 161-164, 2001. Disponível em:
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-
69912001000300002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69912001000300002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>

PLATOFF, Rebecca M. et al. Recurrent Gastrointestinal Stromal Tumors in the
Imatinib Mesylate Era: Treatment Strategies for an Incurable Disease. **Case
Reports in Oncological Medicine**, [s. l.], v. 2017, p. 1-8, 2017. Disponível em:
<<https://www.hindawi.com/journals/crionm/2017/8349090/>>

PULI, Srinivas-Reddy et al. How good is endoscopic ultrasound for TNM staging of
gastric cancers? A meta-analysis and systematic review. **World journal of
gastroenterology**, [s. l.], v. 14, n. 25, p. 4011-9, 2008. Disponível em:
<[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2725340&tool=pmcentrez&rend
ertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2725340&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)>

QUIÑONES, J.; PORTANOVA, M.; YABAR, A. Relación entre Tipo Histológico y
la Localización del Adenocarcinoma Gástrico en el Hospital Rebagliati. **Rev.
Gastroenterol. Perú**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 139-145, 2011.

ROGAR, Marija. Single Nucleotide Polymorphisms of the Chromosome Segregation
Genes Involved in the Development of Gastric Cancer. [s. l.], 2016.

SANDOVAL-BÓRQUEZ, Alejandra et al. Noncoding Genomics in Gastric Cancer and the Gastric Precancerous Cascade: Pathogenesis and Biomarkers. **Disease Markers**, [s. l.], v. 2015, 2015.

SATHERLEY, Lucy K. et al. Tumour suppressor genes in gastric carcinogenesis: an up-to-date review of genetic and epigenetic changes in the development of gastric adenocarcinoma. **Translational Gastrointestinal Cancer**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 294-307, 2015. Disponível em: <<http://tgc.amegroups.com/article/view/6997/7779>>

SEGUÍ, Nuria et al. GALNT12 is Not a Major Contributor of Familial Colorectal Cancer Type X. **Human Mutation**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 50-52, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/humu.22454>>

SHETA, Razan et al. A metabolic labeling approach for glycoproteomic analysis reveals altered glycoprotein expression upon GALNT3 knockdown in ovarian cancer cells. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 145, n. 3, p. 91-102, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28299348>>

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer Statistics , 2017. [s.l.], v. 0, n. 0, p. 1-24, 2017.

SILVA-FILHO, Antônio F. et al. Glycobiology modifications in intratumoral hypoxia: The breathless side of glycans interaction. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 41, n.5, p. 1801-1829, 2017.

SMALLEY, Stephen R. et al. Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: A phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 30, n. 19, p. 2327-2333, 2012.

SMYTH, E. C. et al. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 27, n. suppl_5, p. v38-v49, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdw350>>

SONG, Zheyu et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer. **Tumor Biology**, [s.l.], v. 39, n. 7, 2017.

STEWART, B. W., WILD, C. P. World Cancer Report 2014. **World Health Organization**, [s. l.], 2014.

TABAK, Lawrence A. The role of mucin-type O-glycans in eukaryotic development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 616-621, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952110000352>>

TANIGUCHI, Naoyuki; KIZUKA, Yasuhiko. Glycans and Cancer. In: **Advances in Cancer Research**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2015. v. 126p. 11-51.

TARHAN, Yunus Emre et al. Morphological Changes, Cadherin Switching, and Growth Suppression in Pancreatic Cancer by GALNT6 Knockdown. **Neoplasia (United States)**, [s.l.], v. 18, n. 5, p. 265-272, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2016.03.005>>

TILL, Jacob E.; YOON, Sam S.; RYEOM, Sandra. E-cadherin and K-ras: implications of a newly developed model of gastric cancer. **Oncoscience**, [s. l.], v. 4, n. November, p. 162-163, 2017. Disponível em: <<http://impactjournals.com/oncoscience/index.php?pii=379>>

TONETO, Marcelo Garcia. Estado atual do tratamento cirúrgico do adenocarcinoma gástrico avançado. **Rev AMRIGS**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 81-86, 2012. Disponível em: <http://www.amrigs.com.br/revista/56-1/0000095683-16_965.pdf>

TOPAZ, Orit et al. Absence of intraepidermal glycosyltransferase ppGalNac-T3 expression in familial tumoral calcinosis. **The American Journal of dermatopathology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 211-5, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15900124>>

VALENTINI, Vincenzo et al. Survival after radiotherapy in gastric cancer: Systematic review and meta-analysis. **Radiotherapy and Oncology**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 176-183, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.014>>

WANG, Guodong et al. Loss of Barx1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through up-regulating MGAT5 and MMP9 expression and indicates poor prognosis. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 42, p. 71867-71880, 2017. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/18288>>

WANG, Ranran et al. The mucin-type glycosylating enzyme polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 promotes the migration of ovarian cancer by modifying mucin 13. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 667-676, 2013.

WEN, Rong. Polymorphisms in mucin genes in the development of gastric cancer. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 328, 2015. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1948-5204/full/v7/i11/328.htm>>

WU, Chen et al. N-Acetylgalactosaminyltransferase-14 as a potential biomarker for breast cancer by immunohistochemistry. **BMC cancer**, [s. l.], v. 10, p. 123, 2010.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2873381&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

WU, Shiliang. regulation of the invasion and metastasis of human glioma cells by polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], p. 1299-1305, 2011. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2011.569>>

YCHOU, Marc et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: An FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 29, n. 13, p. 1715-1721, 2011.

ZONG, Liang et al. Feasibility of laparoscopic gastrectomy for elderly gastric cancer patients: meta-analysis of non-randomized controlled studies. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 31, p. 51878-51887, 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28402960>&5Cn<http://www.oncotarget.com/abstract/16691>>