

# EXPRESSÃO DA E-CADERINA E DAS PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT BETACATENINA, APC, TCF-4 E SURVIVINA NO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO: IMPLICAÇÕES CLÍNICA E PATOLÓGICA

*Expression of E-cadherin and Wnt pathway proteins betacatenin, APC, TCF-4 and survivin in gastric adenocarcinoma: clinical and pathological implication*

Rodrigo Rego **LINS**<sup>1</sup>, Celina Tizuko Fujiyama **OSHIMA**<sup>2</sup>, Levindo Alves de **OLIVEIRA**<sup>1</sup>,  
Marcelo Souza **SILVA**<sup>2</sup>, Ana Maria Amaral Antonio **MADER**<sup>3</sup>, Jaques **WAISBERG**<sup>1</sup>

Trabalho realizado no <sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciência Cirúrgica Interdisciplinar, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo, SP; <sup>2</sup>Departamento de Patologia, UNIFESP, São Paulo, SP e <sup>3</sup>Disciplina de Patologia, Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil

**DESCRIPTORES** - Via de sinalização Wnt. Beta catenina. Neoplasias gástricas. Caderinas. Imunoistoquímica

## Correspondência:

Rodrigo Rego Lins  
E-mail: rodrigoregolins@hotmail.com e rodrigolins@icloud.com

Fonte de financiamento: não há  
Conflito de interesse: não há

Recebido para publicação: 14/04/2016  
Aceito para publicação: 02/08/2016

**HEADINGS** - Wnt signaling pathway. Beta catenin. Stomach neoplasms. Cadherins. Immunohistochemistry

**RESUMO - Racional:** O câncer gástrico encontra-se entre as principais neoplasias malignas do mundo sendo o quinto mais incidente e o terceiro em relação ao índice de mortalidade. Acredita-se que a via Wnt/betacatenina esteja ativada em 30-50% desses tumores, porém a desregulação dela ainda não está completamente esclarecida. **Objetivo:** Avaliar a imunoexpressão das proteínas E-caderina, betacatenina, APC, TCF-4 e survivina em tecidos de adenocarcinoma gástrico e correlacioná-las com as variáveis clínicas dos doentes e anatomopatológicas do tumor. **Método:** Foram coletados os dados clínicos e anatomopatológicos dos prontuários de 71 doentes com adenocarcinoma gástrico submetidos à gastrectomia. O material obtido na operação foi submetido à análise imunoistoquímica e a frequência da expressão de cada proteína pôde ser analisada de acordo com a sua localização na célula e relacionada com as variáveis clinicopatológicas. **Resultados:** A graduação percentual da expressão e da localização das proteínas foi a seguinte: E-caderina em 3% na membrana; betacatenina em 23,4% no citoplasma e 3,1% no núcleo; APC em 94,6% no citoplasma; TCF-4 em 19,4% no núcleo; e survivina em 93,9% no núcleo. Houve relação entre expressão da proteína E-caderina com a idade mais avançada ( $p=0,007$ ); betacatenina com tumores <5 cm de diâmetro ( $p=0,041$ ); APC com tumores proximais ( $p=0,047$ ); e TCF-4 com tipo difuso da classificação de Lauren ( $p=0,017$ ) e com o grau de penetração tumoral ( $p=0,002$ ). **Conclusão:** A via Wnt/betacatenina não está envolvida na carcinogênese gástrica. Porém, a frequência elevada de survivina permite sugerir que outras vias sinalizadoras devam estar envolvidas na transformação do tecido gástrico.

**ABSTRACT - Background:** Gastric cancer is the fifth most frequent cancer and the third most common cause of cancer-related deaths worldwide. It has been reported that Wnt/ betacatenin pathway is activated in 30-50% of these tumors. However, the deregulation of this pathway has not been fully elucidated. **Aim:** To determine the expression of E-cadherin, betacatenin, APC, TCF-4 and survivin proteins in gastric adenocarcinoma tissues and correlate with clinical and pathological parameters. **Method:** Seventy-one patients with gastric adenocarcinoma undergoing gastrectomy were enrolled. The expression of E-cadherin, betacatenin, APC, TCF-4 and survivin proteins was detected by immunohistochemistry and related to the clinical and pathological parameters. **Results:** The expression rates of E-cadherin in the membrane was 3%; betacatenin in the cytoplasm and nucleus were 23,4% and 3,1% respectively; APC in the cytoplasm was 94,6%; TCF-4 in the nucleus was 19,4%; and survivin in the nucleus 93,9%. The expression rate of E-cadherin was correlated with older patients ( $p=0,007$ ), while betacatenin with tumors <5 cm ( $p=0,041$ ) and APC with proximal tumors ( $p=0,047$ ). Moreover, the expression of TCF-4 was significantly higher in the diffuse type ( $p=0,017$ ) and T4 tumors ( $p=0,002$ ). **Conclusion:** The Wnt/betacatenin is not involved in gastric carcinogenesis. However, the high frequency of survivin allows to suggest that other signaling pathways must be involved in the transformation of gastric tissue.

## INTRODUÇÃO

O câncer gástrico (CG) encontra-se entre as principais neoplasias malignas do mundo e ocupa a quinta posição em relação à incidência e a terceira em relação ao índice de mortalidade<sup>11</sup>. Mais de 70% dos casos ocorreram em países em desenvolvimento e as estimativas brasileiras para o ano de 2016 realizadas pelo Instituto Nacional do Câncer são de 20.520 novos casos<sup>14</sup>.

A ressecção cirúrgica é o tratamento curativo de escolha; porém, aproximadamente 75% dos doentes diagnosticados com CG apresentam doença em estágio avançado, necessitando além de tratamento cirúrgico do uso de quimioterápicos<sup>5</sup>. Apesar das recentes aquisições nos métodos diagnósticos, nas técnicas operatórias e nos avanços no tratamento radioquimioterápico e terapia focal, os índices de recorrência seguem elevados em torno de 50% dos casos<sup>16</sup>. Além disso, o prognóstico dos doentes com CG avançado segue ruim com sobrevida média de 12 meses nos países ocidentais<sup>28</sup>.

A melhor compreensão sobre os mecanismos patogênicos e as diferentes vias de sinalização é fundamental para melhoria dos métodos diagnósticos, tratamentos e prognóstico do CG. A progressão em doença invasiva ocorre por um processo complexo multifatorial devido alterações genéticas e epigenéticas que acometem diversas vias de sinalização,

dentre elas a via Wnt/betacatenina<sup>15</sup>.

A via Wnt é complexa envolvida tanto no desenvolvimento embrionário e nos mecanismos de homeostase de células adultas quanto no processo de tumorigênese<sup>8</sup>. Sua atividade depende da concentração citoplasmática da betacatenina que normalmente se mantém baixa devido à sua degradação mediada pelo complexo multiprotéico de destruição formado pela axina, adenomatose polipose coli (APC), glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK 2beta) e caseína quinase 1 (CK 1)<sup>17</sup>. Além disso, a betacatenina é também detectada na membrana da célula ligada a proteína transmembrana E-caderina, formando um complexo responsável pela adesão célula/célula nos tecidos epiteliais<sup>13</sup>. Sabe-se que a perda na expressão da E-caderina é responsável pelo aumento da migração celular favorecendo o surgimento de metástases<sup>9</sup>.

A ativação da via ocorre com a ligação da proteína Wnt ao complexo composto pelo receptor Frizzled e pelos correceptores Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (Fzd/LRP) iniciando a cascata de sinalização atraindo as proteínas disheveled e axina para a membrana desconfigurando o complexo de destruição. Com isso a betacatenina não fosforilada se acumula no citoplasma, transloca para o núcleo e se liga ao complexo proteico T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) iniciando a transcrição de genes alvo, dentre eles a survivina<sup>25</sup>.

Diversos estudos mostram que a sinalização aberrante da via Wnt é responsável pelo desenvolvimento de diversas neoplasias, dentre elas o CG<sup>2,7,22</sup>. O acúmulo de betacatenina no núcleo, visto em 50% dos casos é um importante marcador da ativação desta via<sup>6</sup>. Entretanto, os mecanismos que promovem a desregulação da via Wnt no CG ainda não estão completamente esclarecidos<sup>10</sup>.

Para estudar a influência da via Wnt no CG, tem este trabalho o objetivo de avaliar a imunexpressão das proteínas E-caderina, betacatenina, APC, TCF-4 e survivina em tecidos de adenocarcinoma gástrico e correlacioná-las com as variáveis clínicas dos doentes e as anatomopatológicas do tumor.

## MÉTODOS

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal São Paulo, São Paulo, Brasil sob o número 834.176.

### Pacientes

Foram selecionados 74 doentes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico operados no Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo da Faculdade de Medicina do ABC (Santo André, SP), no período de janeiro de 2007 até dezembro de 2010. Os prontuários foram revisados para o levantamento dos dados clínicos (idade e gênero) e anatomopatológicos (localização e tamanho do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação tumoral, grau de penetração tumoral - pT, acometimento linfonodal - pN e invasão vascular, linfática e/ou perineural). Os critérios de inclusão foram doentes com idade igual ou maior a 18 anos, de ambos os gêneros, com o diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma gástrico ressecado com intenção curativa ou paliativa e não submetidos ao tratamento neoadjuvante com radioterapia e/ou quimioterapia. Foram excluídos três cujos blocos de parafina continham tecidos em condições inadequadas para o processamento de análise histopatológica e imunistoquímica.

### Construção do TMA (Tissue Microarray)

Foi realizada a confecção do bloco de TMA, também chamado de bloco receptor, no Laboratório do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para isso, foram utilizados os blocos de parafina contendo o tecido de adenocarcinoma gástrico. Esses blocos, também chamados de blocos doadores, foram selecionados do arquivo de blocos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina do ABC.

Inicialmente, foram obtidos cortes histológicos de 4

mm de cada bloco doador que, após serem corados por H&E, foram analisados por um patologista que selecionou uma área representativa do tumor que foi marcada no "bloco doador" com caneta de marcação permanente e que serviu de guia para a punção e retirada dos fragmentos tumorais. Após a marcação, utilizando o equipamento BeecherT (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA), cada bloco doador foi puncionado para a retirada de um fragmento cilíndrico medindo 1,0 mm de diâmetro que foi transferido para o bloco receptor. Foi então confeccionado um único bloco receptor e como controle de localização foi adicionado uma amostra de tecido renal.

### Imunistoquímica

Foi realizada no Laboratório de Patologia Molecular Experimental I do Departamento de Patologia da UNIFESP/EPM para a avaliação da imunexpressão das proteínas E-caderina, betacatenina, APC, TCF-4 e survivina.

Secções convencionais de 3 µm foram obtidas dos blocos de TMA e montadas em lâminas pré-tratadas com 3-aminopropylsilano (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA). As secções foram desparafinizadas de acordo com a seguinte sequência: três banhos sucessivos de 10 min cada em xilol; dois banhos em álcool absoluto com 5 min cada, finalizando-se com uma lavagem em água corrente. A recuperação antigênica foi realizada colocando-se as lâminas em tampão citrato 0,01 M, pH 6,0 e aquecida em panela a vapor durante 30 min. A peroxidase endógena foi bloqueada pela utilização de peróxido de hidrogênio a 3% em quatro banhos sucessivos de 5 min cada, perfazendo um tempo total de 20 min. A cada etapa do procedimento houve uma lavagem das lâminas com PBS (tampão fosfato pH 7,4). As secções foram incubadas com E-caderina (H-108 sc-7870, diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); betacatenina (E5 sc-7963, diluição 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); APC (C-20 sc-896, diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); TCF-4 (H-125 sc-13027, diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); e survivina (FL-142 sc-10811, diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) por 16-18 h em câmara úmida a 40 °C. Após término do período de incubação, as secções foram lavadas com PBS (três banhos de 5 min cada) e incubadas com o anticorpo secundário biotilado e estreptavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB+ System-HRP, Dako, Glostrup, DEN), em etapas de 30 min cada.

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

O padrão de positividade para E-caderina (membrana e citoplasma) betacatenina (membrana, citoplasma, núcleo), APC (citoplasma e núcleo), TCF-4 (citoplasma e núcleo), survivina (citoplasma e núcleo) foram anotados. Como controle positivo das reações foi utilizado corte histológico de adenocarcinoma de cólon comprovadamente positivo para as proteínas estudadas.

### Interpretação dos resultados das reações

A avaliação das reações foi realizada por dois pesquisadores independentes e cegados quanto às características clínicas dos doentes e aspectos morfológicos dos tumores. Foi realizado um consenso quando resultados divergiam entre os pesquisadores. A análise foi semiquantitativa e os resultados foram categorizados de acordo com a intensidade das reações e a extensão da coloração. A intensidade da reação foi classificada como negativa (0 ponto), fraca (1 ponto), moderada (2 pontos) e forte (3 pontos). A extensão da área positiva de imunocoloração foi classificada em menos de 10% (0 ponto), de 11-25% (1 ponto), de 26-50% (2 pontos) e acima de 50% (3 pontos). A intensidade da reação foi multiplicada pela extensão da coloração e os resultados categorizados em escores de 0 a 9. As reações com escore maior ou igual que 4 foram consideradas como positivas e as com escore menor que 4 negativas.

**Análise estatística**

Análise descritiva das variáveis qualitativas foi feita pela distribuição de frequência absoluta (n) e relativa (%) e das variáveis quantitativas por média, desvio-padrão (dp), e dos valores mínimo e máximo. Para avaliação da média de idade dos doentes foi utilizado o teste Mann-Whitney. A comparação entre a imunoposição (positiva ou negativa) de cada marcador (E-caderina, betacatenina, APC, TCF-4 e survivina) de acordo com o local analisado (membrana, citoplasma e/ou núcleo) e as variáveis clínicas dos doentes e morfológicas do tumor foi avaliada pelo teste exato de Fisher. O risco de expressão positiva de cada marcador na membrana, no citoplasma e/ou no núcleo, em cada variável clínica do paciente e morfológica do tumor foi avaliada pelo odds-ratio. Em todas as comparações, considerou-se como significativa as probabilidades associadas aos testes menores que 0,05.

**RESULTADOS**

Dos 71 doentes com adenocarcinoma gástrico analisados, 64,8% eram homens e 60,6% tinham idade superior a 60 anos.

As variáveis morfológicas dos adenocarcinomas gástricos são mostradas na Tabela 1. Verificou-se que 63,4% dos tumores se localizavam na região proximal e que 54,3% das neoplasias apresentavam diâmetro maior que 5 cm. Em relação ao grau de diferenciação celular, 55,9% eram bem ou moderadamente diferenciados, 69% eram do tipo intestinal e a presença de invasão venosa, linfática e perineural foi encontrada em 33,3%, 56,5% e 62,3% dos casos, respectivamente.

**TABELA 1 - Variáveis morfológicas do adenocarcinoma gástrico**

Parâmetros morfológicos		n (%)
Localização	Distal	26 (36,6)
	Proximal	45 (63,4)
Diâmetro	< 5 cm	32 (45,7)
	> 5 cm	38 (54,3)
Classificação de Lauren	Intestinal	49 (69)
	Difuso	22 (31)
Grau de diferenciação	Moderado + bem diferenciado	38 (55,9)
	Pouco + indiferenciado	30 (44,1)
pT	0 + 1 + 2	20 (28,1)
	3	41 (57,7)
	4	10 (14,1)
pN	0	25 (35,2)
	1+2+3	46 (64,8)
Invasão vascular	Ausente	46 (66,7)
	Presente	23 (33,3)
Invasão linfática	Ausente	30 (43,5)
	Presente	39 (56,5)
Invasão neural	Ausente	26 (37,7)
	Presente	43 (62,3)

n = número de casos

A frequência da imunoposição das proteínas estudadas foi: E-caderina em 3% na membrana; betacatenina em 29,7% na membrana, 23,4% no citoplasma e 3,1% no núcleo; APC em 94,6% no citoplasma; TCF-4 em 19,4% no núcleo; e survivina em 93,9% no núcleo (Tabela 2).

A relação entre os parâmetros clinicopatológicos e imunoposição positiva das proteínas está exposta na Tabela 3. Em relação à expressão da betacatenina na membrana, notou-se número maior de mulheres no grupo dos tumores com positividade para a betacatenina do que quando a expressão da betacatenina foi negativa (p=0,024). No grupo de tumores betacatenina positivo, observou-se 3,78 vezes mais chance destes tumores acometerem mulheres do que homens (p=0,018 [1,23 -11,65]). Quanto à expressão da betacatenina no citoplasma, observou-se número maior de tumores <5 cm no grupo com expressão positiva de betacatenina do que no grupo com expressão negativa (p=0,041). Analisando apenas o grupo de tumores com expressão positiva de betacatenina, observou-se 3,65 vezes

mais chance destes tumores serem <5 cm do que >5 cm (p=0,034 [1,07-12,42]). No núcleo, não foi observada nenhuma associação significativa entre a betacatenina e as variáveis clinicopatológicas analisadas. Sobre a APC no citoplasma, notou-se que todos os tumores proximais apresentaram sua expressão positiva (p=0,047). Em relação a TCF-4 no núcleo, observou-se associação da sua expressão positiva com o grau de penetração tumoral na parede gástrica (pT, p=0,002), e os tumores com expressão positiva apresentaram 12 vezes mais chance de serem pT4 (p=0,003 [1,79-80,61]) e 10,5 vezes mais de serem do grupo pT0+1+2 (p=0,002 [1,91-57,59]) do que serem pT3. Além disso, notou-se a associação com os tumores do tipo difuso (p=0,017) e os tumores com expressão positiva de TCF-4, apresentaram 5,05 vezes mais chance de serem do tipo difuso de Lauren do que do tipo intestinal (p=0,009 [1,40-10,14]). Por fim, pôde-se considerar que houve tendência da associação entre a expressão positiva da survivina e os tumores do tipo intestinal de Lauren (p=0,091), pois os tumores com expressão positiva da survivina no núcleo e/ou citoplasma, apresentaram 7,33 vezes mais chance de serem do tipo intestinal de Lauren do que difuso (p= 0,050 [0,71 a 75,27]).

**TABELA 2 - Frequência da imunoposição positiva ou negativa das proteínas E-caderina, betacatenina, APC, TCF-4 e survivina nos tecidos de adenocarcinoma gástrico**

Proteínas	Localização	Negativo n (%)	Positivo n (%)
		E-caderina	Membrana
Betacatenina	Citoplasma	24 (36,4)	42 (63,6)
	Membrana	45 (70,3)	19 (29,7)
APC	Citoplasma	49 (76,6)	15 (23,4)
	Núcleo	62 (96,9)	2 (3,1)
TCF-4	Citoplasma	3 (5,1)	56 (94,6)
	Núcleo	6 (10,2)	53 (89,8%)
Survivina	Citoplasma	50 (74,6)	17 (25,4)
	Núcleo	54 (80,6)	13 (19,4)
Survivina	Citoplasma	4 (6,1)	62 (93,9)
	Núcleo	4 (6,1)	62 (93,9)

n= número de casos

**DISCUSSÃO**

No presente estudo encontrou-se a expressão positiva da E-caderina na membrana em apenas 3% dos casos sem relação com os parâmetros analisados. Este resultado é inferior ao descrito na literatura que varia entre 32-60,9% e demonstra relação com os tumores de alto grau e com acometimento linfonodal<sup>18,20</sup>. Entretanto, no citoplasma, evidenciou-se a E-caderina expressa positivamente em 63,6% dos casos. Dessa forma, uma hipótese que pode justificar essa diferença é que a maioria desses estudos realizou análise conjunta da expressão da E-caderina na membrana e no citoplasma.

Apesar da baixa prevalência da E-caderina na membrana, encontrou-se a presença da betacatenina na membrana em 29,7% dos casos sendo mais prevalente no gênero feminino. Grabsch et al. relataram a presença da betacatenina em 13,5% dos casos e perceberam associação de 93,2% entre a ausência simultânea da betacatenina e da E-caderina na membrana. Já Guerfali et al. encontraram prevalência de 61,3% e relataram que os casos em que havia a perda da expressão na membrana da betacatenina e da E-caderina estavam associados aos tumores pouco diferenciados.

No citoplasma, encontrou-se a expressão positiva da betacatenina e da APC em 23,4% e 94% dos casos respectivamente. A betacatenina teve relação com os tumores menores que 5 cm e todos os tumores proximais apresentaram expressão positiva da APC. O resultado obtido em relação a APC foi maior do que o encontrado por Ayed-Guerfali et al. (68,7%) que diferentemente, não mostrou nenhuma relação com os dados clinicopatológicos por eles estudados. O achado da presente casuística sugere que a expressão da proteína APC não estaria envolvida na carcinogênese do CG, pois provavelmente sua função estaria preservada não

**TABELA 3** - Relação entre os parâmetros clinicopatológicos e imunoposição positiva da E-caderina, betacatenina, APC, TCF-4 e sobrevivência nos pacientes com CG

Parâmetros		E-Cad.	Betacat.	Betacat.	Betacat.	APC Citopl.	TCF-4	Survivina
		Memb.n(%)	Memb.n (%)	Citopl.n(%)	Núcleo n(%)	n(%)	Núcleo n(%)	Núcleo n(%)
Gênero	Masculino	0 (0)	8 (42,1)	7 (46,7)	1 (50%)	37 (66,1)	11 (84,6)	41 (66,1)
	Feminino	2 (100)	11 (57,9)	8 (53,3)	1 (50%)	19 (33,9)	2 (15,4)	21 (33,9)
	Valor de p*	0,098	0,024	0,098	1,000	1,000	0,192	0,606
Idade (anos)	<60	0 (0)	8 (42,1)	6 (40)	0 (0)	18 (32,1)	7 (53,8)	23 (37,1)
	>60	2 (100)	11 (57,9)	9 (60)	2 (100)	38 (67,9)	6 (46,2)	39 (62,9)
	Valor de p**	0,515	0,574	0,764	0,532	0,263	0,209	0,292
Localização	Distal	0 (0)	6 (31,6)	3 (20)	0 (0%)	19 (33,9)	6 (46,2)	22 (35,5)
	Proximal	2 (100)	13 (68,4)	12 (80)	2 (100%)	37 (66,1)	7 (53,8)	40 (64,5)
	Valor de p*	0,530	0,778	0,220	0,532	0,047	0,521	0,618
Tamanho (cm)	<5	2 (100)	9 (50)	10 (66,7)	1 (50%)	23 (41,8)	8 (61,5)	29 (47,5)
	>5	0 (0)	9 (50)	5 (33,3)	1 (50%)	32 (58,2)	5 (38,5)	32 (52,5)
	Valor de p*	0,195	0,576	0,041	1,000	1,000	0,227	0,122
Classif.Lauren	Intestinal	2 (100)	7 (36,8)	12 (80)	2 (100%)	39 (69,6)	5 (38,5)	44 (71)
	Difuso	0 (0)	12 (63,2)	3 (20)	0 (0%)	17 (30,4)	8 (61,5)	18 (29)
	Valor de p*	1,000	0,564	0,525	1,000	0,287	0,017	0,091
Grau Diferenciação	Mod-Bem	2 (100)	13 (76,5)	11 (73,3)	2 (100%)	31 (58,5)	6 (46,2)	35 (58,3)
	Pouco-ind.	0 (0)	4 (23,5)	4 (26,7)	0 (0%)	22 (41,5)	7 (53,8)	25 (41,7)
	Valor de p*	0,492	0,085	0,230	0,503	0,571	0,365	0,082
pT	0 + 1 + 2	0 (0)	6 (31,6)	5 (33,4)	1 (50%)	13 (23,2)	7 (53,9)	16 (25,8)
	3	2 (100)	11 (57,9)	8 (53,3)	0 (0%)	35 (62,5)	2 (15,4)	36 (58,1)
	4	0 (0)	2 (10,5)	2 (13,3)	1 (50%)	8 (14,3)	4 (30,8)	10 (16,1)
pN	0	0 (0)	7 (36,8)	5 (33,3)	1 (50%)	19 (33,9)	5 (38,5)	21 (33,9)
	1+2+3	2 (100)	12 (63,2)	10 (66,7)	1 (50%)	37 (66,1)	8 (61,5)	41 (66,1)
	Valor de p*	1,000	0,564	1,000	0,531	0,287	1,000	0,298
Invasão vascular	Ausente	1 (50)	13 (72,2)	11 (73,3)	2 (100%)	35 (64,8)	8 (61,5)	39 (65)
	Presente	1 (50)	5 (27,8)	4 (26,7)	0 (0%)	19 (35,2)	5 (38,5)	21 (35)
	Valor de p*	1,000	0,561	0,541	0,535	0,544	0,742	0,614
Invasão linfática	Ausente	1 (50)	9 (50)	7 (46,7)	1 (50%)	23 (42,6)	5 (38,5)	24 (40)
	Presente	1 (50)	9 (50)	8 (53,3)	1 (50%)	31 (57,4)	8 (61,5)	36 (60)
	Valor de p*	1,000	0,265	0,548	1,000	0,576	0,759	1,000
Invasão neural	Ausente	0 (0)	9 (50)	6 (40)	1 (50%)	20 (37)	5 (38,5)	22 (36,7)
	Presente	2 (100)	9 (50)	9 (60)	1 (50%)	34 (63)	8 (61,5)	38 (63,3)
	Valor de p*	0,542	0,265	1,000	1,000	0,553	1,000	1,000

E-cad.=E-caderina; Betacat.=betacatenina; APC=adenomatous polyposis coli; TCF-4=T-cell factor; Memb.=membrana; Citopl.=citoplasma; n=número de casos; dp=desvio-padrão; Classif.=classificação; Mod-Bem=moderado/bem diferenciado; Pouco-ind.=pouco diferenciado/indiferenciado; \*=teste exato de Fisher;\*\*=teste de Mann-Whitney

alterando o funcionamento do complexo de degradação, mantendo assim a betacatenina no citoplasma em níveis fisiológicos.

No núcleo, encontrou-se a expressão da betacatenina em dois doentes (3,1% dos casos), sem nenhuma relação significativa com os parâmetros analisados, porém eles apresentavam CG do tipo intestinal pela classificação de Lauren. Ayed-Guerfali et al. obtiveram praticamente a mesma prevalência (3,75%), e utilizando um critério baseado no padrão de expressão da betacatenina que considerou anormal os casos em que ela não estava expressa ou estava expressa principalmente no núcleo e/ou citoplasma, demonstraram a relação entre o padrão anormal e os doentes nos estádios III e IV e com metástase linfonodal. Miyazawa et al. também encontraram a expressão da betacatenina somente nos CG do tipo intestinal e Grabsch et al. analisando 401 adenocarcinomas gástricos observaram que 6,5% deles tinham betacatenina fortemente expressa no núcleo e estavam associados com os CG do tipo intestinal de Lauren. Entretanto, grande parte dos autores, relataram prevalência maior da betacatenina no CG, como por exemplo Ohene-Abuakwa et al. de 34%, Woo et al. 27%, e Yu et al. 15,1%. A variação encontrada entre os resultados provavelmente ocorre devido aos diferentes métodos e critérios de análise utilizados, além da discrepância existente entre o tamanho amostral de cada estudo. Apesar disso, a maioria desses estudos pôde demonstrar correlação entre a expressão celular da betacatenina e algum parâmetro clinicopatológico, ressaltando a importância da betacatenina no processo de tumorigênese do CG. Entretanto, os mecanismos moleculares subjacentes que conduzem à ativação da via de sinalização mediada pela betacatenina ainda necessitam ser esclarecidos.

Em relação à proteína TCF-4, o presente estudo apresentou expressão positiva no núcleo em 19,4% dos casos, valores abaixo dos relatados por Yu et al. que foram de 86,5% no núcleo. Essa diferença provavelmente se justifica pois utilizou-se aqui um critério mais rigoroso que só considerou a expressão positiva quando o escore obtido pelo produto da intensidade e da área era maior ou igual a 4, enquanto estes autores consideraram positiva

os diferentes de zero. Além disso, observou-se relação entre a expressão da proteína TCF-4 nuclear com os adenocarcinomas com grau T4 de penetração na parede gástrica e do tipo difuso de Lauren, enquanto Yu et al. descreveram relação com os CG do tipo intestinal. Sabe-se que o TCF-4 nuclear apresenta papel fundamental na última etapa da via de sinalização canônica Wnt ao interagir com a betacatenina nuclear e desencadear a transcrição dos genes alvos<sup>25</sup>. Sendo assim, a baixa frequência da imunoposição positiva no núcleo da TCF-4 e da betacatenina encontrada na presente casuística, sugere que a via canônica não estaria envolvida na carcinogênese gástrica.

A sobrevivência consiste num dos alvos genéticos da via Wnt e tem sua expressão aumentada pela betacatenina<sup>4</sup>. Porém, no presente estudo não encontrou-se relação entre a expressão da sobrevivência e da betacatenina, tanto no núcleo quanto no citoplasma. Na presente série a proteína sobrevivência apresentou imunoposição positiva tanto no núcleo quanto no citoplasma em 93,9% dos casos, e como em Lu et al., mostrou ter relação com os tumores do tipo intestinal de Lauren. Seu mecanismo de regulação molecular ainda não está bem definido e há controvérsias na literatura em relação à sua expressão no CG. Song et al. analisaram 157 pacientes com CG no estágio III e encontraram a sobrevivência expressa no núcleo em 40,1% dos casos com predominância dos tumores maiores que 5 cm. Os doentes com imunoposição negativa da sobrevivência, apresentaram sobrevivência significativamente maior<sup>24</sup>. Bury et al. encontraram a sobrevivência expressa em 73,17% dos doentes e mostraram que os carcinomas sem expressão de sobrevivência apresentavam menor incidência de metástase à distância e sobrevivência maior em 1, 2 e 3 anos. Shintani et al. relataram a presença de sobrevivência no citoplasma em 35% dos casos e no núcleo em 49% deles. Além disso, encontraram relação entre a expressão nuclear da sobrevivência e os tumores gástricos moderados/bem diferenciados. Com os resultados encontrados nesse estudo, pode-se reforçar a importância da sobrevivência na carcinogênese do CG e sugerir a possibilidade dela estar sendo estimulada por

outra via que não a Wnt/betacatenina.

Sabe-se que a avaliação imunoistoquímica oferece várias vantagens mas existe consciência das limitações desta abordagem. Alterações na imunocoloração não são nem totalmente sensíveis nem específicas para alterações na expressão de proteína. Além disso, a imunoistoquímica não fornece informação direta sobre o mecanismo preciso da função alterada da proteína. Estudos que examinem os eventos genéticos e epigenéticos subjacente às alterações e detectados por imunocoloração são necessários. Entretanto, no presente estudo, a baixa frequência da imunoexpressão positiva da E-caderina na membrana, sem o consequente acúmulo da betacatenina no citoplasma e/ou no núcleo, sugere que o efeito da proteína E-caderina não induz a ativação da via Wnt dependente da betacatenina. Além disso, a alta frequência da imunoexpressão positiva da proteína APC no citoplasma associada à baixa frequência da imunoexpressão positiva da betacatenina, tanto no citoplasma quanto no núcleo, sugerem a baixa prevalência de mutação do gene APC no CG e que a degradação via ubiquitinação da betacatenina estaria ocorrendo normalmente. Por fim, a alta frequência da imunoexpressão da survivina no núcleo associado a baixa frequência da imunoexpressão positiva no núcleo da betacatenina e da TCF-4, sugerem que a via canônica não estaria ativada no CG, havendo provavelmente uma outra via paralela sendo responsável pela produção da survivina.

Esses resultados poderão contribuir para o melhor entendimento desta via de sinalização na carcinogênese gástrica e apontar possíveis alvos, como a diminuição da expressão do gene da survivina, para o desenvolvimento de drogas para o tratamento do CG.

## CONCLUSÃO

A via WNT/beta catenina não está envolvida na carcinogênese gástrica. No entanto, a frequência elevada de survivina permite sugerir que outras vias sinalizadoras devam estar envolvidas na transformação do tecido gástrico.

## REFERÊNCIAS

1. Ayed-Guerfali D Ben, Hassairi B, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Expression of APC,  $\beta$ -catenin and E-cadherin in Tunisian patients with gastric adenocarcinoma: clinical significance. *Tumour Biol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 Oct 2];35(3):1775-83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24197976>
2. Brown AM. Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle? *Breast Cancer Res* [Internet]. 2001 [cited 2016 Jun 4];3(6):351-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11737884>
3. Bury J, Szumilo J, Dabrowski A, Ciechanski A, Sliwinska J, Wallner G. Vascular endothelial growth factor and survivin immunostaining in gastric adenocarcinoma. *Pol Przegl Chir* [Internet]. 2012 Jul [cited 2016 Jun 2];84(7):341-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22935455>
4. Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *J Cancer* [Internet]. Ivyspring International Publisher; 2016 [cited 2016 Oct 6];7(3):314-23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26918045>
5. Cheng J, Fan X-M. Role of cyclooxygenase-2 in gastric cancer development and progression. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2013 Nov 14 [cited 2014 Oct 2];19(42):7361-8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3831217&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Cheng X-X, Wang Z-C, Chen X-Y, Sun Y, Kong Q-Y, Liu J, et al. Correlation of Wnt-2 expression and beta-catenin intracellular accumulation in Chinese gastric cancers: relevance with tumour dissemination. *Cancer Lett* [Internet]. 2005 Jun 8 [cited 2016 May 12];223(2):339-47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15896469>
7. Chesire DR, Isaacs WB. Beta-catenin signaling in prostate cancer: an early perspective. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2003 Dec [cited 2016 Jun 4];10(4):537-60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14713266>
8. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* [Internet]. 2006 Nov 3 [cited 2016 May 12];127(3):469-80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17081971>
9. Cobanoglu U, Ersoz S, Turgutalp H, Reis A, Ozoran Y. Correlation of E-cadherin expression with clinicopathological parameters in breast carcinoma. *Saudi Med J* [Internet]. 2004 Aug [cited 2016 May 12];25(8):1024-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15322592>
10. Deng Y-Z, Yao F, Li J-J, Mao Z-F, Hu P-T, Long L-Y, et al. RACK1 suppresses gastric tumorigenesis by stabilizing the  $\beta$ -catenin destruction complex. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 Apr [cited 2014 Jul 3];142(4):812-823. e15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240482>
11. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2016 May 5];136(5):E359-86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842>
12. Grabsch H, Takeno S, Noguchi T, Hommel G, Gabbert HE, Mueller W. Different patterns of beta-catenin expression in gastric carcinomas: relationship with clinicopathological parameters and prognostic outcome. *Histopathology* [Internet]. 2001 Aug [cited 2016 Jun 1];39(2):141-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11493330>
13. Gumbiner BM. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* [Internet]. 2000 Feb 7 [cited 2016 May 12];148(3):399-404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10662767>
14. INCA. Estimativas 2016: Incidências do câncer no Brasil [Internet]. 2016. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>
15. Jang B-G, Kim WH. Molecular pathology of gastric carcinoma. *Pathobiology* [Internet]. 2011 [cited 2016 May 12];78(6):302-10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22104201>
16. Kattan MW, Karpeh MS, Mazumdar M, Brennan MF. Postoperative nomogram for disease-specific survival after an R0 resection for gastric carcinoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2003 Oct 1 [cited 2016 May 12];21(19):3647-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14512396>
17. Kimelman D, Xu W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* [Internet]. 2006 Dec 4 [cited 2016 May 12];25(57):7482-91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143292>
18. Li N, Deng W, Ma J, Wei B, Guo K, Shen W, et al. Prognostic evaluation of Nanog, Oct4, Sox2, PCNA, Ki67 and E-cadherin expression in gastric cancer. *Med Oncol* [Internet]. 2014;32(1). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12032-014-0433-6>
19. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res*. 1998;58(9):1808-12.
20. Man G, Wei L, Haiming W, Guanjun W. The distinct expression patterns of claudin-10, -14, -17 and E-cadherin between adjacent non-neoplastic tissues and gastric cancer tissues. *Diagn Pathol* [Internet]. 2013;8(1):205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24325792>
21. Miyazawa K, Iwaya K, Kuroda M, Harada M, Serizawa H, Koyanagi Y, et al. Nuclear accumulation of beta-catenin in intestinal-type gastric carcinoma: correlation with early tumor invasion. *Virchows Arch an Int J Pathol* [Internet]. 2000;437(5):508-13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11147171>
22. Ohene-Abuakwa Y, Noda M, Perenyi M, Kobayashi N, Kashima K, Hattori T, et al. Expression of the E-cadherin/catenin (a-,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -) complex correlates with the macroscopic appearance of early gastric cancer. *J Pathol*. 2000;192(4):433-9.
23. Shintani M, Sangawa A, Yamao N, Kamoshida S. Smac/DIABLO expression in human gastrointestinal carcinoma: Association with clinicopathological parameters and survivin expression. *Oncol Lett*. 2014;8(6):2581-6.
24. Song KY, Jung CK, Park WS, Park CH. Expression of the antiapoptosis gene survivin predicts poor prognosis of stage III gastric adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2009;39(5):290-6.
25. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 Feb [cited 2014 Oct 2];142(2):219-32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3285553&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
26. Woo DK, Kim HS, Lee HS, Kang YH, Yang HK, Kim WH. Altered expression and mutation of B-catenin gene in gastric carcinomas and cell lines. *Int J Cancer*. 2001;95(2):108-13.
27. Yu X-W, Xu Q, Xu Y, Gong Y-H, Yuan Y. Expression of the E-cadherin/ $\beta$ -catenin/tcf-4 pathway in gastric diseases with relation to Helicobacter pylori infection: clinical and pathological implications. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2014 Jan;15(1):215-20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24528029>
28. Zeng W, Zhu J, Shan L, Han Z, Aexiding P, Quhai A, et al. The clinicopathological significance of CDH1 in gastric cancer: a meta-analysis and systematic review. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:2149-57.