

VIA CANÔNICA DO WNT NO CARCINOMA GÁSTRICO

The canonical Wnt pathway in gastric carcinoma

Levindo Alves de OLIVEIRA¹, Celina Tizuko Fujiyama OSHIMA², Pedro Augusto SOFFNER³,
Marcelo de Souza SILVA², Rodrigo Rego LINS¹, Andréa Cristina de Moraes MALINVERNI², Jaques WAISBERG^{1,3}

Como citar este artigo: Oliveira LA, Oshima CTF, Soffner PA, Silva MS, Lins RR, Malinverni ACM, Waisberg J. Via canônica do wnt no carcinoma gástrico. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2019;32(1):e1414. DOI: /10.1590/0102-672020180001e1414

Trabalho realizado no ¹Programa Interdisciplinar de Ciências Cirúrgicas e ²Laboratório de Patologia Molecular e Experimental, Departamento de Patologia, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP/EPM, São Paulo, SP; ³Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil

DESCRITORES - Neoplasias Gástricas. Vias de Sinalização Wnt. Imunoistoquímica. Transdução de Sinal.

Correspondência:

Celina Tizuko Fujiyama Oshima
Email: celina.oshima@gmail.com

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

Recebido para publicação: 07/08/2018
Aceito para publicação: 25/09/2018

HEADINGS - Gastric carcinoma. Wnt signaling pathways. Immunohistochemistry. Signal transduction.

RESUMO - Racional: Acredita-se que a via Wnt é uma das mais importantes da sinalização envolvidas na carcinogênese gástrica. **Objetivos:** Analisar a expressão das proteínas das vias Wnt canônicas e não-canônicas no carcinoma gástrico e relacionar sua expressão com as variáveis clinicopatológicas. **Método:** Foram coletadas 72 amostras de carcinoma gástrico, e áreas representativas do tumor foram selecionadas para o Tissue Microarray. Imunoistoquímica foi realizada para avaliar a expressão de Wnt-5a, FZD5, GSK3 β , axina, CK1, ubiquitina, ciclina D1 e c-myc. **Resultados:** Houve diferenças significativas para a expressão de ubiquitina no citoplasma e núcleo para tumores moderadamente e bem diferenciados ($p=0,03$) e para aqueles do tipo intestinal da classificação de Lauren ($p=0,03$). A expressão negativa da proteína c-myc no citoplasma foi relacionada aos tumores intestinais de Lauren ($p=0,028$). A expressão positiva de CK1 no citoplasma das células neoplásicas foi relacionada a tumores com margens cirúrgicas livre de envolvimento neoplásico ($p=0,03$). A expressão positiva da proteína ciclina D1 foi maior nos tumores dos homens ($p=0,03$). Não houve relação da expressão positiva ou negativa das proteínas Wnt-5a e FZD5 no citoplasma ou núcleo com quaisquer variáveis clinicopatológicas. O mesmo foi observado para GSK3 β e Axin. **Conclusões:** A relação da expressão das proteínas da via canônica com as variáveis epidemiológicas e tumorais sugere sua participação na carcinogênese gástrica. Por outro lado, a ausência da relação das expressões das proteínas da via não-canônica sugere sua não participação na carcinogênese gástrica.

ABSTRACT - Background: It is believed that the Wnt pathway is one of the most important signaling involved in gastric carcinogenesis. **Aim:** To analyze the protein expression of canonical and non-canonical Wnt pathways in gastric carcinoma. **Method:** The immunohistochemistry was performed in 72 specimens of gastric carcinomas for evaluating the expression of Wnt-5a, FZD5, GSK3 β , axin, CK1, ubiquitin, cyclin D1 and c-myc. **Results:** There were significant differences for cytoplasm and nucleus ubiquitin for moderately and well differentiated tumors ($p=0.03$) and for those of the intestinal type of the Lauren classification ($p=0.03$). The absence of c-myc was related to Lauren's intestinal tumors ($p=0.03$). Expression of CK1 in the cytoplasm was related to compromised margin ($p=0.03$). Expression of cyclin D1 protein was more intense in male patients ($p=0.03$). There was no relation of the positive or negative expression of the Wnt-5a, FZD5, GSK3 and Axin with any clinicopathological variables. **Conclusion:** The canonical WNT pathway is involved in gastric carcinoma.

INTRODUÇÃO

O carcinoma gástrico tem alta incidência global e baixa sobrevida média em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Apesar dos avanços na terapia convencional, as taxas de recorrência permanecem altas e as de sobrevida baixas^{1,7,11,12,16,17,26,30,35}.

Alterações como as mutações, deleções, inativação por vírus e bactérias e hipermetilação estão envolvidas no surgimento do câncer gástrico^{7,16,28,32}. Os genes Wnt codificam proteínas de sinalização e são encontrados nos genomas de todos os animais. A sinalização é iniciada quando os ligantes da via Wnt são ligados em um complexo que consiste de um receptor da família frizzled e um membro da família de receptores lipídicos de baixa densidade²⁴. A principal molécula da cascata é a proteína β -catenina citoplasmática cuja estabilidade é regulada pelo chamado "complexo de destruição"^{7,16,32}.

As proteínas Wnt desempenham um papel importante na embriogênese e maturação dos tecidos. Elas atuam como ligantes dos componentes da família frizzled que são receptores celulares trans-membranas. Uma vez ligados a esses receptores, as proteínas Wnt podem ativar duas vias distintas de sinalização celular: a via canônica e a via não-canônica. Várias proteínas estão envolvidas nas duas vias^{14,17,32}.

A via de sinalização Wnt, frequentemente, está envolvida na carcinogênese gástrica e várias proteínas dessa via podem estar mutadas ou expressas atipicamente em tecido tumoral gástrico. No entanto, o envolvimento e os mecanismos da via Wnt no início do câncer gástrico não estão totalmente compreendidos como no câncer colorretal^{8,32}.

Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa sugeriu que a via Wnt/ β -catenina

pode estar envolvida na carcinogênese gástrica. Lins et al.(2016)²⁴ analisaram as expressões da E-caderina, β -catenina, APC, TCF-4 e survivina em tecidos de câncer gástrico por imunistoquímica e verificaram a relação entre a expressão das proteínas e a idade dos pacientes e os aspectos anatomopatológicos do carcinoma gástrico como localização, classificação de Lauren e grau de infiltração tumoral na parede gástrica.

Para identificar outras proteínas da via Wnt nessas mesmas amostras, propusemos como objetivo deste trabalho estudar duas proteínas da via não canônica (Wnt-5a, FZD5) e seis da via canônica (GSK3 β , axina, CK1, ubiquitina, ciclina D1 e myc) e relacionarmos as suas expressões com as características epidemiológicas e anatomopatológicas da amostra do tumor.

MÉTODO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) aprovou o protocolo do estudo (Registro no 1.128.919 / 2015).

Casuística

Um total de 72 amostras de carcinoma gástrico primário (GC) foi coletado de pacientes submetidos à ressecção cirúrgica radical no Departamento de Cirurgia Geral da Faculdade de Medicina do ABC (SP) de janeiro de 2007 a dezembro de 2010. Os prontuários dos pacientes foram revisados para determinar a idade, gênero, localização anatômica, tamanho do tumor, grau histológico e presença ou ausência de invasão linfática, vascular ou neural. Os critérios de inclusão foram pacientes com idade superior a 18 anos, de ambos os gêneros, que haviam sido submetidos à gastrectomia curativa ou paliativa, sem radioterapia ou quimioterapia neoadjuvante, com exame histológico confirmando adenocarcinoma gástrico.

Construção de TMA

Blocos de TMA, também chamados de bloco receptor, foram construídos no laboratório do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo usando os blocos de parafina contendo o tecido do câncer gástrico do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina do ABC. As áreas representativas dos 72 carcinomas coradas com H&E foram selecionadas por um patologista. A área selecionada foi marcada no respectivo bloco de parafina. Um núcleo cilíndrico foi criado no bloco receptor usando o equipamento Beecher™ (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, EUA). Um cilindro de 1 mm de tecido foi extraído da área selecionada do bloco doador e foi transferido para o núcleo do bloco receptor. Novas posições centrais foram criadas no bloco receptor, separadas por frações de 1 mm, de tal forma que uma coleção de amostras de tecido foi criada seguindo o arranjo matricial.

Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada no Laboratório de Patologia Molecular Experimental I do Departamento de Patologia para avaliar a expressão das proteínas Wnt-5a, FZD5, GSK3 β , Axina, CK1, ubiquitina, ciclina D1 e c-myc, segundo Gomes et al. (2011)¹³; da Silva et al. (2013)¹⁰.

Secções de 3 μ m obtidas a partir dos blocos de TMA foram montadas em lâminas revestidas com 3-aminopropiltrimetoxissilano (Sigma), desparafinadas em xileno e reidratadas através do etanol e água. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram colocadas em tampão citrato 0,01M pH 6,0 e aquecidas em vapor por 30 min. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação das secções em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 20 min em temperatura ambiente. Após estes procedimentos, as secções foram incubadas com Wnt-5a (AF645) (1: 100) e FZD5 (AF1617) (R & D Systems, Inc, Minneapolis, MN, EUA), GSK3 β (sc-9166) (1: 200); Axin (sc-14029)

(1: 100); CK1 (sc-74582) (1: 100); Ciclina D1 (sc-8396) (1: 100); c-myc (sc-40) (1: 1000) e ubiquitina (sc-8017) (1: 150) adquirida da Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) a 4° C durante 16-18 h. As secções foram lavadas com PBS e incubadas com o sistema LSAB+HRP (Biotinylated Link Universal) (estreptavidina-HRP) (Dako North America Inc.) durante 30 min. Finalmente, a coloração foi realizada utilizando o substrato cromogênico Liquid DAB+ (Dako North America, Inc.), ligeiramente contrastado com hematoxilina de Harris e as lâminas montadas com Entellan (Sigma). Controles positivos e negativos foram incluídos para serem processados simultaneamente. O controle positivo foi representado pelo tecido de adenocarcinoma do cólon; o negativo eliminando-se o anticorpo primário.

Interpretação dos resultados da reação

Os padrões de coloração (membrana, citoplasma, núcleo) foram analisados de acordo com os critérios de distribuição e intensidade de coloração. Esta análise foi semiquantitativa. Um sistema de pontuação numérica com duas categorias foi utilizado para avaliar a expressão protéica. A intensidade da coloração foi classificada como negativa (0 ponto), fraca (1 ponto), moderada (2 pontos) e forte (3 pontos). A extensão da área de imunocoloração positiva foi classificada em menos de 10% (0 ponto), 11-25% (1 ponto), 26-50% (2 pontos) e acima de 50% (3 pontos). A intensidade da reação foi multiplicada pela extensão da coloração e os resultados foram categorizados em escore de 0 a 9. As reações com escore ≥ 4 foram consideradas positivas e as < 4 negativas^{8,32}. Para avaliar a expressão das proteínas foi utilizado o microscópio Eclipse 80i-Nikon. Áreas representativas do tecido de adenocarcinoma gástrico foram capturadas usando câmera Sony com aumento de 400X.

Análise estatística

A análise descritiva das variáveis qualitativas foi realizada pela distribuição da frequência absoluta (N) e frequência relativa (%). A comparação entre a expressão de cada proteína foi realizada pelo teste exato de Fisher e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Os dados clinicopatológicos dos pacientes com câncer gástrico estão resumidos na Tabela 1. Quarenta e cinco eram homens e 25 mulheres com idade média de 65 anos. Quarenta e seis tumores eram da região proximal e 39 maiores que 5 cm. Nenhuma margem cirúrgica comprometida foi observada em 63 casos. Invasão venosa foi identificada em 23 pacientes e linfática em 39. A invasão perineural esteve presente em 43 pacientes. Em 38 os tumores foram moderadamente ou bem diferenciados e a classificação de Lauren incluiu 49 adenocarcinomas intestinais e 21 adenocarcinomas difusos. O estadiamento TNM mostrou que mais de 50% dos pacientes estavam em estágio avançado da doença.

A Figura 1 mostra fotomicrografia dos resultados imunohistoquímicos das proteínas Wnt-5a, FZD5, GSK3 β , Axin, Ubiquitina, Ciclina D1, c-myc e CK1 em tecidos de adenocarcinoma gástrico.

A Tabela 2 mostra a presença ou ausência das proteínas Wnt-5a, FZD5, GSK3 β , Axina, CK1, Ubiquitina, Ciclina D1 e c-myc em tecidos de adenocarcinoma gástrico. Nenhuma proteína estudada mostrou marcação de membrana.

Houve diferenças significativas para a expressão de ubiquitina no citoplasma e núcleo para tumores moderadamente e bem diferenciados ($p=0,03$) e para aqueles do tipo intestinal da classificação de Lauren ($p=0,03$). A expressão negativa da proteína c-myc no citoplasma foi relacionada aos tumores intestinais de Lauren ($p=0,028$, Tabela 3). As expressões das proteínas GSK3 β , Axina e expressão nuclear de c-myc não foram relacionadas a nenhuma das variáveis clinicopatológicas. No entanto, notamos

que a expressão da proteína Axina no núcleo e no citoplasma foi maior em tumores moderadamente e bem diferenciados e aqueles do tipo intestinal de Lauren, mas sem significância estatística. A expressão positiva de CK1 no citoplasma das células neoplásicas foi relacionada aos tumores com margens cirúrgicas livre de envolvimento neoplásico ($p=0,03$). A expressão positiva da proteína ciclina D1 foi maior nos tumores dos homens ($p=0,03$), mas não foi relacionada a nenhuma outra variável clinicopatológica. Não houve relação da expressão positiva ou negativa das proteínas Wnt-5a e FZD5 no citoplasma ou núcleo com quaisquer variáveis clinicopatológicas.

TABELA 1 - Dados clinicopatológicos dos pacientes com câncer gástrico

Variáveis		n (%)
Idade	> 50	64 (90,3)
	≤ 50	7 (9,7)
Gênero	Masculino	46 (63,9)
	Feminino	26 (36,1)
Localização tumoral	Distal	26 (36,1)
	Proximal	46 (63,9)
Tamanho do tumor	> 5 cm	39 (54,9)
	≤ 5 cm	32 (45,1)
Margem comprometida	Ausente	63 (90)
	Presente	7 (10)
Invasão venosa	Ausente	46 (66,7)
	Presente	23 (33,3)
Lymphatic invasion	Ausente	30 (43,5)
	Presente	39 (56,5)
Invasão perineural	Ausente	26 (37,7)
	Presente	43 (62,3)
Grau de diferenciação	Bem/moderado	38 (55,9)
	Pouco/indiferenciado	30 (44,1)
T	0	1 (1,4)
	1	2 (4,2)
	2	17 (23,6)
	3	41 (56,9)
	4	10 (13,9)
N	0	24 (34,7)
	01/02/2003	46 (65,3)
Classificação de Lauren	Intestinal	49 (69,4)
	Difuso	21 (30,6)
	3	41 (56,9)
	4	10 (13,9)
N	0	24 (34,7)
	1/2/3	46 (65,3)
Classificação de Lauren	Intestinal	49 (69,4)
	Difuso	21 (30,6)

n=número de amostras

TABELA 2 - Dados da imunoistoquímica e patológicos

Proteína	Localização	n	Positiva (%)	Negativa (%)
Wnt-5a	Citoplasma	71	24 (33,8)	47 (66,2)
	Núcleo	72	59 (81,9)	13 (18,1)
FZD5	Citoplasma	72	2 (2,8)	70 (97,2)
GSK3β	Citoplasma	65	64 (98,5)	1 (1,5)
	Núcleo	65	65 (100)	-
Axina	Citoplasma	67	63 (94)	4 (6)
	Núcleo	67	67 (100)	-
CK1	Citoplasma	67	58 (86,6)	9 (13,4)
Ubiquitina	Citoplasma	67	62 (92,5)	5 (7,5)
	Núcleo	67	62 (92,5)	5 (7,5)
Cyclin D1	Núcleo	64	35 (64,7)	29 (45,3)
c-myc	Citoplasma	66	16 (24,2)	50 (75,8)
	Núcleo	70	30 (42,9)	40 (57,1)

n=número de amostras

TABELA 3 - Resultados da proteína ubiquitina (citoplasma/núcleo) e c-myc (citoplasma) nas amostras de adenocarcinoma gástrico

		Negativo n (%)	Positivo n (%)	p
Ubiquitina (citoplasma)				
Grau de diferenciação	bem/moderado	-	35 (100)	0,03*
	pouco/indiferenciado	4 (13,8)	25 (86,02)	
Classificação de Lauren	intestinal	1 (2,2)	45 (97,8)	0,03*
	difusa	4 (19)	14 (81)	
Ubiquitina (núcleo)				
Grau de diferenciação	bem/moderado	-	30 (100)	0,04*
	pouco/indiferenciado	4 (13,8)	25 (86,02)	
Lauren classification	intestinal	1 (2,2)	45 (97,8)	0,03*
	difusa	4(19)	14 (81)	
CK1 (citoplasma)				
Margem comprometida	ausente	6(10,2)	53(89,8)	0,03*
	presente	3(50,0)	3(50,0)	
Ciclina D1 (nuclear)				
Sexo	masculino	15(35,7)	27(64,3)	0,03*
	feminino	14(63,6)	8(36,4)	
c-myc (citoplasma)				
Classificação de Lauren	intestinal	31 (67,4)	15 (32,6)	0,03*
	difuso	19 (95)	1 (5)	

n=número de amostras; Fisher exact test*=significante

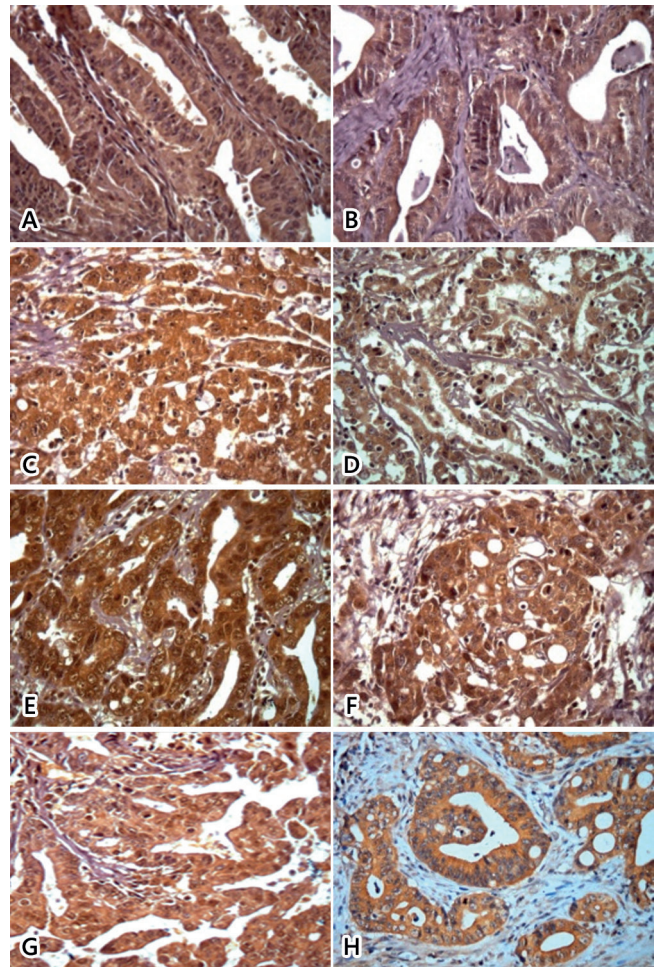


FIGURA 1 – Resultados imunoistoquímicos das proteínas: A=Wnt-5a; B=FZD5; C=GSK3β; D=axin; E=ubiquitin; F=ciclina D1; G=c-myc; H=CK1

DISCUSSÃO

A via Wnt está frequentemente envolvida na carcinogênese gástrica e a via canônica é considerada a mais importante nesta carcinogênese. No entanto, a via não-canônica também tem

sido relacionada à gênese da neoplasia gástrica^{5,8,18,32}.

A proteína Wnt-5a é considerada inibidora da via de sinalização canônica e supressora tumoral. No presente estudo, a expressão positiva de Wnt-5a e FZD5 não foi relacionada às variáveis estudadas. Com imunoistoquímica Kurayoshi et al. (2006)²² mostraram expressão anormal de Wnt-5a em 71 de 237 casos de câncer gástrico. A positividade de Wnt-5a foi correlacionada aos estágios avançados da neoplasia e com o pior prognóstico dos pacientes. Ara et al. (2016)² avaliaram a relação de Wnt-5a com laminina g2, uma proteína relacionada à adesão celular e invasão neoplásica. Os resultados sugerem que a proteína Wnt-5a está envolvida na progressão do câncer gástrico, um achado similar ao encontrado por outros autores^{15,29,33}. Zhang et al. (2015)³⁴ mostraram que a expressão positiva de Wnt-5a está relacionada com o melhor prognóstico do câncer gástrico. Por outro lado, os receptores FZD5 recebem sinais canônicos e não canônicos, sendo importantes na via Wnt. No entanto, a proteína FZD5 foi mais relacionada à via Wnt não-canônica³¹.

A GSK3 é proteína multifuncional envolvida nas vias reguladoras de células de mamíferos, incluindo a via Wnt, e faz parte do complexo de destruição da β -catenina. No presente estudo, identificamos forte expressão da proteína GSK3 β no núcleo e no citoplasma, mas não houve relação com as variáveis epidemiológicas dos pacientes e anatomopatológicas do tumor, o que também foi observado como tal por outros autores^{31,34}. Cho et al. (2010)⁹ analisaram a expressão de GSK3 β em 281 casos de carcinoma gástrico. A expressão positiva desta proteína foi relacionada aos tumores precoces, sem metástases linfonodais e sem invasão angioliñfática.

A proteína Axin é parte do complexo de destruição da β -catenina e atua como um supressor de tumor. Mutações em genes que sintetizam a Axina estão relacionadas à gênese do carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma endometrial e meduloblastoma^{20,25}. Neste estudo, a expressão da proteína Axina foi mais intensa no núcleo do que no citoplasma e foi identificada em 100% dos núcleos das células de carcinoma gástrico. A expressão citoplasmática também foi intensa e predominou em tumores moderadamente ou bem diferenciados e no tipo intestinal da classificação de Lauren²³. Kim et al. (2014)²⁰ mostraram que nove dos 45 carcinomas gástricos com instabilidade de microssatélites (MSI) tinham uma mutação frameshift da AXINA2. Pan et al. (2008)²⁷ analisaram 70 carcinomas gástricos e identificaram 7,1% de mutação no gene AXINA e concluíram que essas mutações contribuíram para a carcinogênese gástrica. Mazzone e Fearon (2014)⁴ revisaram a importância da Axina e suas variantes nos carcinomas gastrointestinais e observaram que a proteína Axina apresentou expressão fortemente positiva em células neoplásicas.

A proteína CK1 pode ser identificada na membrana celular, núcleo ou citoplasma. São conhecidos sete membros da família CK1 em humanos. CK1 epsilon foi relacionado à fosforilação da via Wnt. Existem poucos estudos avaliando a expressão da CK1 e sua relação com o aparecimento do câncer gástrico. Como parte do complexo de destruição da β -catenina, a expressão positiva desta proteína sugere que ela possa estar presente nos estágios iniciais do carcinoma gástrico^{4,21}. No presente estudo, uma forte expressão positiva da CK1 foi observada no citoplasma das células neoplásicas onde normalmente exerce sua função e não no núcleo.

A ubiquitina é responsável por rotular a proteína a ser degradada da cadeia da poliubiquitina. A regulação da concentração plasmática de β -catenina como um membro da via Wnt é realizada pelo complexo de destruição juntamente com a ubiquitina. No presente estudo, a proteína ubiquitina mostrou forte expressão tanto no núcleo como no citoplasma. Tanto no núcleo quanto no citoplasma, a expressão proteica foi significativamente maior nos tumores moderadamente ou bem diferenciados e no tipo intestinal da classificação de Lauren²³. Arici et al. (2009)³ avaliaram a expressão da proteína

ciclina D1 na mucosa gástrica e no tecido gástrico neoplásico. A expressão dela foi detectada em 72% das células do carcinoma gástrico e em 55,8% das células da mucosa gástrica. Tal descoberta sugere que a expressão da ciclina D1 aparece nas lesões gástricas iniciais e tende a permanecer com a progressão do tumor. Identificamos a expressão positiva da ciclina D1 apenas no núcleo das células neoplásicas e não houve expressão citoplasmática desta proteína. Maior número de tumores dos homens apresentou expressão positiva do que os tumores das mulheres. Apenas a expressão nuclear era esperada tendo em vista que a ciclina D1 é proteína sintetizada a partir da estimulação de β -catenina no núcleo. Esse achado sugere que a via Wnt canônica é ativada.

No presente estudo, a expressão da proteína c-MYC foi positiva no citoplasma em 24,2% e no núcleo em 42,9% dos casos. A expressão citoplasmática negativa foi significativamente mais frequente no tipo intestinal da classificação de Lauren²³. Estudos mostraram que a amplificação do gene MYC no câncer gástrico varia de 38,1% a 40%. Khaleghian et al. (2016)¹⁹ avaliaram a relação da expressão e amplificação do gene MYC com as características anatomopatológicas e biodemográficas do carcinoma gástrico. A hibridização in situ foi positiva em 43% e a expressão positiva foi identificada em 14,7% dos casos. Esses autores identificaram o aumento da expressão de MYC em tumores difusos, ao contrário de Calgano et al. (2013)⁶ que identificaram maior expressão da proteína MYC no tipo intestinal da classificação de Lauren²³. Além disso, nenhuma diferença foi encontrada na expressão da proteína MYC em relação aos estágios do tumor. Liu et al. (2014)²⁵ verificaram a presença da expressão positiva da proteína MYC em 66,3% dos tumores gástricos.

CONCLUSÃO

A relação da expressão das proteínas da via canônica com as variáveis epidemiológicas e tumorais sugere sua participação na carcinogênese gástrica. Por outro lado, a ausência da relação das expressões das proteínas da via não-canônica sugere sua não participação na carcinogênese gástrica.

REFERÊNCIAS

- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. 2003 Nov;22(53):8581-9.
- Ara H, Takagishi M, Enomoto A, Asai M, Ushida K, Asai N, et al. Role for Daple in non-canonical Wnt signaling during gastric cancer invasion and metastasis. *Cancer Sci*. 2016 Feb;107(2):133-9.
- Arici DS, Tuncer E, Ozer H, Simek G, Koyuncu A. Expression of retinoblastoma and cyclin D1 in gastric carcinoma. *Neoplasma*. 2009;56(1):63-7.
- Ayed-Guerfali DB, Hassairi B, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Expression of APC, β -catenin and E-cadherin in Tunisian patients with gastric adenocarcinoma: clinical significance. *Tumour Biol*. 2014 Mar;35(3):1775-83.
- Cai C, Zhu X. The Wnt/ β -catenin pathway regulates self-renewal of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *Mol Med Rep*. 2012 May;5(5):1191-6.
- Calcagno DQ, Freitas VM, Leal MF, de Souza CR, Demachki S, Montenegro R, et al. MYC, FBXW7 and TP53 copy number variation and expression in gastric cancer. *BMC Gastroenterol*. 2013 Sep;13:141
- Cheng XX, Wang ZC, Chen XY, Sun Y, Kong QY, Liu J, et al. Correlation of Wnt-2 expression and beta-catenin intracellular accumulation in Chinese gastric cancers: relevance with tumour dissemination. *Cancer Lett*. 2005 Jun;223(2):339-47.
- Chiurillo MA. Role of the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review. *World J Exp Med*. 2015 May;5(2):84-102.
- Cho YJ, Kim JH, Yoon J, Cho SJ, Ko YS, Park JW, et al. Constitutive activation of glycogen synthase kinase-3beta correlates with better prognosis and cyclin-dependent kinase inhibitors in human gastric cancer. *BMC Gastroenterol*. 2010 Aug;10:91.
- DA Silva LC, Forones NM, Ribeiro DA, Ihara SS, Gomes TS, Neto RA, et al. Immunoreexpression of DIABLO, AIF and cytochrome C in gastric adenocarcinoma assessed by tissue Microarray. *Anticancer Res*. 2013 Feb;33(2):647-53.

11. Estimativa 2016: incidências do câncer no Brasil [database on the Internet]. 2016 [cited. Available from: <http://www.inca.gov.br/dncc>.
12. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base International Agency for Research on Cancer; 2013.
13. Gomes TS, Oshima CT, Segreto HR, Barrazueta LM, Costa HO, Lima FO, et al. The extrinsic apoptotic signaling pathway in gastric adenocarcinomas assessed by tissue microarray. *Pathol Res Pract*. 2011 Oct;207(10):613-7.
14. Habas R. Canonical Wnt signaling: an unexpected new player. *Dev Cell*. 2006 Aug;11(2):138-9.
15. Hanaki H, Yamamoto H, Sakane H, Matsumoto S, Ohdan H, Sato A, et al. An anti-Wnt5a antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells in vivo by inhibiting receptor-mediated endocytosis. *Mol Cancer Ther*. 2012 Feb;11(2):298-307.
16. Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer*. 1999 Dec;35(14):1986-2002.
17. Ilyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol*. 2005 Jan;205(2):130-44.
18. Ishimoto T, Oshima H, Oshima M, Kai K, Torii R, Masuko T, et al. CD44+ slow-cycling tumor cell expansion is triggered by cooperative actions of Wnt and prostaglandin E2 in gastric tumorigenesis. *Cancer Sci*. 2010 Mar;101(3):673-8.
19. Khaleghian M, Jahanzad I, Shakoori A, Emami Razavi A, Azimi C. Association Between Amplification and Expression of C-MYC Gene and Clinicopathological Characteristics of Stomach Cancer. *Iran Red Crescent Med J*. 2016 Feb;18(2):e21221.
20. Kim S, Lee J, Hong ME, Do IG, Kang SY, Ha SY, et al. High-throughput sequencing and copy number variation detection using formalin fixed embedded tissue in metastatic gastric cancer. *PLoS One*. 2014;9(11):e111693.
21. Knippschild U, Wolff S, Giamas G, Brockschmidt C, Wittau M, Würfl PU, et al. The role of the casein kinase 1 (CK1) family in different signaling pathways linked to cancer development. *Onkologie*. 2005 Oct;28(10):508-14.
22. Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, et al. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res*. 2006 Nov;66(21):10439-48.
23. Lauren P. The Two Histological Main Types Of Gastric Carcinoma: Diffuse And So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt At A Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.
24. Lins RR, Oshima CT, Oliveira LA, Silva MS, Mader AM, Waisberg J. Expression of e-cadherin and wnt pathway proteins betacatenin, apc, tcf-4 and survivin in gastric adenocarcinoma: clinical and pathological implication. *Arq Bras Cir Dig*. 2016 Nov-Dec;29(4):227-31.
25. Liu X, Yu H, Cai H, Wang Y. Expression of CD24, p21, p53, and c-myc in alpha-fetoprotein-producing gastric cancer: Correlation with clinicopathologic characteristics and survival. *J Surg Oncol*. 2014 Jun;109(8):859-64.
26. Ooi CH, Ivanova T, Wu J, Lee M, Tan IB, Tao J, et al. Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer. *PLoS Genet*. 2009 Oct;5(10):e1000676.
27. Pan KF, Liu WG, Zhang L, You WC, Lu YY. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2008 Mar;14(10):1570-4.
28. Pereira MA, Ramos MFKP, Dias AR, Yagi OK, Faraj SF, Zilberstein B, et al. Detection of occult lymph node tumor cells in node-negative gastric cancer patients. *Arq Bras Cir Dig*. 2017 Jan-Mar;30(1):30-4.
29. Shojima K, Sato A, Hanaki H, Tsujimoto I, Nakamura M, Hattori K, et al. Wnt5a promotes cancer cell invasion and proliferation by receptor-mediated endocytosis-dependent and -independent mechanisms, respectively. *Sci Rep*. 2015 Jan;5:8042.
30. van der Woude CJ, Kleibeuker JH, Tiebosch AT, Homan M, Beuving A, Jansen PL, et al. Diffuse and intestinal type gastric carcinomas differ in their expression of apoptosis related proteins. *J Clin Pathol*. 2003 Sep;56(9):699-702.
31. Vider BZ, Zimber A, Chastre E, Prevot S, Gespach C, Estlein D, et al. Evidence for the involvement of the Wnt 2 gene in human colorectal cancer. *Oncogene*. 1996 Jan;12(1):153-8.
32. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*. 2012 Feb;142(2):219-32.
33. Yamamoto H, Kitadai Y, Oue N, Ohdan H, Yasui W, Kikuchi A. Laminin gamma2 mediates Wnt5a-induced invasion of gastric cancer cells. *Gastroenterology*. 2009 Jul;137(1):242-52. e1-6.
34. Zhang Y, Du J, Zheng J, Liu J, Xu R, Shen T, et al. EGF-reduced Wnt5a transcription induces epithelial-mesenchymal transition via Arf6-ERK signaling in gastric cancer cells. *Oncotarget*. 2015 Mar;6(9):7244-61.
35. Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Miwa S, et al. Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray. *J Clin Pathol*. 2007 Mar;60(3):273-7.