

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**

CAROLLINE FONTES ALVES MARIANO

**Análise da fusão dos genes CLDN18-ARGHGAP26 no adenocarcinoma gástrico pós
neodjuvância e sua correlação com expressão imuno-histoquímica das proteínas
ARHGAP26, CLAUDINA 18, E-CADERINA em associação com aspectos clínicos-
patológicos**

Ribeirão Preto

2023

CAROLLINE FONTES ALVES MARIANO

Versão corrigida

A versão original encontra-se disponível no Departamento de Patologia e Medicina Legal e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Análise da fusão dos genes CLDN18-ARGHGAP26 no adenocarcinoma gástrico pós neodjuvância e sua correlação com expressão imuno-histoquímica das proteínas ARHGAP26, CLAUDINA 18, E-CADERINA em associação com aspectos clínicos-patológicos

Tese apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Patologia

Opção: Patologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Mariângela Ottoboni Brunaldi

Ribeirão Preto

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Mariano, Caroline Fontes Alves.

Análise da fusão dos genes CLDN18-ARGHGAP26 no adenocarcinoma gástrico pós neoadjuvância e sua correlação com expressão imuno-histoquímica das proteínas ARHGAP26, CLAUDINA 18, E-CADERINA em associação com aspectos clínicos-patológicos/ Caroline Fontes Alves Mariano. - Ribeirão Preto, SP. 2023.

p.118: il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Patologia Experimental.

Orientador: Brunaldi, Mariângela Ottoboni.

1. Adenocarcinoma Gástrico 2.Neoadjuvância 3.Imuno-histoquímica
2. Fusão gênica 5.CLDN18- ARGHGAP26, 5.E-caderina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolline Fontes Alves Mariano

Análise da fusão dos genes CLDN18-ARGHGAP26 no adenocarcinoma gástrico pós neodjuvância e sua correlação com expressão imuno-histoquímica das proteínas ARHGAP26, CLAUDINA 18, E-CADERINA em associação com aspectos clínicos-patológicos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Patologia Experimental

Aprovada em:

Banca Examinadora

Profa. Dra Mariângela Ottoboni Brunaldi

Instituição: FMRP-USP

Prof. Dr. Rafael Kemp

Instituição: FMRP-USP

Profa. Dra. Naira Zambelli Ramalho

Instituição: FMRP/USP

Profa. Dra. Andressa Duarte

Instituição: FMRP/USP

Dedico este trabalho à minha mãe, pelo apoio incondicional em todos momentos difíceis e toda minha trajetória acadêmica e sempre me ensinando os valores da honestidade, respeito, humildade e integridade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por este trabalho, o maior orientador da minha vida. Ele nunca me abandonou nos momentos de necessidade.

Agradeço à minha mãe Oclésia Alves dos Santos por dedicar sua vida inteiramente a mim, por estar ao meu lado me apoiando em todos os meus projetos de vida, inclusive durante todo o Doutorado.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Mariângela Ottoboni Brunaldi por todo seu incentivo e paciência durante cada etapa desta pesquisa, pelas valiosas e incontáveis horas dedicadas ao projeto, por todo seu conhecimento passado à mim juntamente com sua alegria e atenção em todos os momentos. Sua motivação foi essencial para a conclusão desta Tese.

Agradeço a todos os professores que me influenciaram na minha trajetória. Em especial à Prof. Dr. Fernando Chahud, que graças ao seu aceite como meu orientador de Mestrado me proporcionou a oportunidade de ingressar à pesquisa.

Às secretárias do Departamento de Patologia, Camila de Luca Zambonini, Neide Terezinha Gonçalves e Rosângela Mazzucato C. de Paiva, pela disponibilidade e eficiência.

Agradeço ao Felipe Denipotte Coelho por todo auxílio em todos os momentos e horários. Por todas as dúvidas sanadas, sempre disposto a ajudar em qualquer intercorrência e trabalhando com muita eficiência, competência e propriedade.

Agradeço a todos os técnicos e técnicas do Departamento de Patologia e Medicina Legal por todo apoio, carinho e também por toda amizade construída durante esses 8 anos de vida acadêmica, em especial à Mônica, Deise, Laura, Márcia, Elaine e Toninho.

A Ana Rocha pela realização da imuno-histoquímica e os cortes e preparo das lâminas de TMA's, e por toda sua dedicação, esmero, profissionalismo.

Ao Prof. Dr. José Sebastião dos Santos, ao Prof. Dr. Ajith Kumar Sankarankutty e à Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, do Departamento de Cirurgia e Anatomia, pelo importante apoio, pelas sugestões na elaboração da pesquisa, pela concessão das amostras do Biorrepositório e disponibilização da estrutura, recursos e pessoal do Laboratório de Biologia Molecular.

A Fermino Sanches Lizarte Neto, Rogério Lenotti Zuliani, Leticia Passi Turra e Cláudia Tarcila Gomes Sares, do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia, pela dedicação, paciência e disponibilidade.

Também ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior e a Greice Andreotti de Molfetta, do Centro de Medicina Genômica, indispensáveis à consecução deste estudo.

Aos oficiais administrativos responsáveis pelo Arquivo do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da FMRPUSP, César Alberto Brigato Júnior e Décio Antônio Barrionovo Filho, atenciosos e prestativos.

Ao meu colega de pós-graduação Joel Del Bel Pádua, por toda sua participação e todo apoio durante todas as fases deste trabalho.

Agradeço imensamente aos amigos do Departamento de Patologia, por todos os momentos maravilhosos vividos, por todos os conhecimentos divididos, por toda ajuda e suporte. Em especial ao Frederico, Glauce, Andressa, Jéssica, Lucas, Patrícia, Maiara, Janaína, Julia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

“Embora o sexo a que pertenço seja considerado fraco, você me verá como uma rocha, que não se inclina para nenhum vento.”

Rainha Elizabeth II

RESUMO

MARIANO, C.F.A. **Análise da fusão dos genes CLDN18-ARGHGAP26 no adenocarcinoma gástrico pós neoadjuvância e sua correlação com expressão imuno-histoquímica das proteínas ARHGAP26, CLAUDINA 18, E-CADERINA em associação com aspectos clínicos-patológicos.** Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Univeridade de São Paulo, 2023.

O câncer gástrico (CG) constitui uma importante causa de incidência e de óbitos no mundo, sendo o adenocarcinoma (AG), o tipo mais comum de câncer gástrico. Estudos moleculares os categorizam em quatro subtipos genômicos: instabilidade cromossômica, instabilidade de microssatélites, vírus Epstein- Barr positivos e genomicamente estáveis (GS). O subtipo GS apresenta mutações específicas, em especial a do gene *RHOA* e a fusão gênica *CLDN18- ARHGAP26*, que resultam em prejuízo da integridade epitelial, maior invasividade de células tumorais, sendo mais observados no AG de tipo difuso. Trata-se de um estudo caso-controle, retrospectivo e longitudinal, baseado na análise da taxa de fusão gênica *CLDN18-ARHGAP26* em correlação a estudo imuno-histoquímico para a avaliação da expressão das proteínas Claudina 18, ARHGAP26 e E-caderina em amostras de adenocarcinoma gástrico com e sem neoadjuvância, oriundos de peças cirúrgicas de gastrectomia realizadas entre 2008 e 2017. Para o estudo molecular foram selecionadas 78 amostras congeladas de AG, armazenadas no Biorrepositório do Serviço de Cirurgia e Endoscopia Digestiva do HCFMRP-USP, submetidas à microtomia e avaliação do percentual de tecido tumoral representado nas amostras. O estudo imuno-histoquímico dessa mesma população foi realizado a partir dos blocos de parafina arquivados no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Quarenta e três amostras congeladas de AG (11 neoadjuvantes) exibiam boa representatividade tumoral para estudo molecular, sendo realizada extração inicial de RNA, seguido da amplificação por RT-qPCR e sequenciamento de DNA. Não foi detectado padrão de fusão gênica. O estudo imuno-histoquímico para avaliação da expressão das proteínas ARHGAP26 e da E-caderina no AGs mostrou um padrão de expressão preservada em cerca de 90% dos casos de CG. Detectou-se expressão diminuída da proteína Claudina 18 em 78% dos casos, em especial nos casos de tipo intestinal (100%). Observou-se uma correlação

fraca entre as proteínas ARHGAP26-CLDN18. Não se observou associação estatisticamente significativa entre as expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26, Claudina 18, E-caderina e variáveis clínicas (sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico e estágio clínico). Não se detectou associação estatisticamente significativa entre os tipos de tratamento recebido pelo paciente e as expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina. Observou-se uma associação entre a regressão tumoral pós-neoadjuvância e as expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26 e E-caderina. Os tempos de sobrevida global e livre de doença foram maiores nos pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante em comparação com o adjuvante. Nosso trabalho ressalta a importância da claudina 18 como indicador prognóstico relacionado a progressão de doença no adenocarcinoma gástrico e sugere a sua utilização nos métodos de rotina diagnóstica histopatológica permitindo identificar pacientes de risco para avaliação molecular complementar e um tratamento alvo mais específico.

Palavras-chaves: Adenocarcinoma Gástrico, Neoadjuvância, Imuno-histoquímica, Fusão gênica, *CLDN18- ARHGAP26*, E-caderina.

ABSTRACT

MARIANO, C.F.A. **Analysis of CLDN18-ARHGAP26 gene fusion in gastric adenocarcinoma after neoadjuvant therapy and its correlation with immunohistochemical expression of ARHGAP26, CLAUDIN 18, E-CADHERIN proteins in association with clinical-pathological aspects.** Doctoral Thesis, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2023.

Gastric cancer (GC) is an important cause of incidence and death worldwide, with adenocarcinoma (AG) being the most common type of gastric cancer. Molecular studies categorize them into four genomic subtypes: chromosomal instability, microsatellite instability, Epstein-Barr virus positive and genomically stable (GS). The GS subtype presents specific mutations, especially in the RHOA gene and the CLDN18-ARHGAP26 gene fusion, which result in impaired epithelial integrity, greater invasiveness of tumor cells, being more observed in diffuse AG. This is a case-control, retrospective and longitudinal study, based on the analysis of the CLDN18-ARHGAP26 gene fusion rate in correlation with an immunohistochemical study to evaluate the expression of the proteins Claudin 18, ARHGAP26 and E-cadherin in samples of gastric adenocarcinoma with and without neoadjuvant treatment, originating from gastrectomy surgical specimens performed between 2008 and 2017. For the molecular study, 78 frozen samples of AG were selected, stored in the Biorepository of the Digestive Surgery and Endoscopy Service of HCFMRP-USP, subjected to microtomy and evaluation of the percentage of tumor tissue represented in the samples. The immunohistochemical study of this same population was carried out using paraffin blocks archived at the Pathology Service of the Hospital das Clínicas of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo. Forty-three frozen AG samples (11 neoadjuvants) exhibited good tumor representation for molecular study, with initial RNA extraction being performed, followed by amplification by RT-qPCR and DNA sequencing. No gene fusion pattern was detected. The immunohistochemical study to evaluate the expression of ARHGAP26 and E-cadherin proteins in AGs showed a preserved expression pattern in approximately 90% of GC cases. Decreased expression of the Claudin 18 protein was detected in 78% of cases, especially in intestinal-type cases (100%). A weak correlation was observed between ARHGAP26-CLDN18 proteins. No statistically

significant association was observed between the immunohistochemical expressions of the proteins ARHGAP26, Claudin 18, E-cadherin and clinical variables (overall survival, disease-free survival, histological type and clinical stage). No statistically significant association was detected between the types of treatment received by the patient and the immunohistochemical expressions of ARHGAP26, Claudin 18 and E-cadherin proteins. An association was observed between post-neoadjuvant tumor regression and immunohistochemical expressions of ARHGAP26 and E-cadherin proteins. Overall and disease-free survival times were longer in patients undergoing neoadjuvant treatment compared to adjuvant treatment. Our work highlights the importance of claudin 18 as a prognostic indicator related to disease progression in gastric adenocarcinoma and suggests its use in routine histopathological diagnostic methods, allowing to identify patients at risk for complementary molecular assessment and more specific targeted treatment.

Keywords: Gastric adenocarcinoma, Neoadjuvant, Immunohistochemistry, Gene fusion, CLDN18-ARGHGAP26, E-cadherin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes.....	21
Figura 2: Regulação do RhoA GTPase and vários fatores de transcrição na via RhoA.....	27
Figura 3: Demonstra como GEFs, GAPs e GDIs regulam o ciclo da via de sinalização Rho GTPase e os comportamentos celulares associados. <i>GEF</i> - fatores de troca de nucleotídeos de guanina ; <i>GAP GTPase</i> - proteína ativadora; <i>GDI Rho GDP</i> - inibidor de dissociação de GDP de proteínas Rho	31
Figura 4: O diagrama sintetiza o nível de expressão e padrão de ARHGAP26 em diferentes cânceres humanos (amarelo), possíveis problemas clínicos (verde) e questões a serem resolvidas (roxo)..	32
Figura 5: Representação esquemática da adesão celular na Claudina-18.	33
Figura 6: Representação esquemática da fusão gênica CLDN18-ARHGAP26.....	36
Figura 7: A CLDN18-ARHGAP26 intermedia a desintegração epitelial, levando possivelmente a vazamento de H + no estômago, e a fusão pode contribuir para a invasão quando a célula é transformada.	37
Figura 8: Estrutura e função do complexo E-caderina-catenina (<i>Adherens Junctions</i>).	39
Figura 9: Controle positivos das reações imuno-histoquímicas: A- E-caderina -Marcação de membrana (seta preta), 400X; B- Claudina 18 - Marcação de membrana (seta preta), 400X; C- ARHGAP 26 - Marcação citoplasmática (seta preta), 400X.....	55
Figura 10: A- Carcinoma gástrico de tipo difuso com presença de células em anel de sinete (seta vermelha), 200X; B- Carcinoma gástrico de tipo difuso com células em anel de sinete (seta vermelha) com sinais de resposta pobre (R3) a neoadjuvância com ulceração na superfície da lesão, 200X; C- Carcinoma gástrico de tipo difuso com células em anel de sinete (seta vermelha) com sinais de resposta quase completa (R1) a neoadjuvância com fibrose (seta preta) ao redor de células neoplásicas viáveis residuais, 200X.	76
Figura 11: - Linhas 1, 2 e 3 mostrando que não houve amplificação das fusões.	77
Figura 12: Resultado da amplificação do controle endógeno GAPDH revelando boa qualidade do RNA e da síntese de cDNA das amostras que apresentaram amplificação.....	78
Figura 13: Fusão gênica 1.....	78
Figura 14: Fusão 2 e 3.	79

Figura 15. Imuno-histoquímica para ARHGAP-26 nos adenocarcinomas gástricos. A: Marcação citoplasmática positiva em mucosa gástrica não neoplásica (setas pretas), 400x. B: Marcação citoplasmática (setas pretas) em adenocarcinoma pouco diferenciado, 400X; Ausência de expressão citoplasmática em adenocarcinoma difuso (setas pretas, 400x.....	84
Figura 16. Imuno-histoquímica para Claudina-18 nos adenocarcinomas gástricos. A: Mucosa gástrica não neoplásica - expressão de membrana preservada (setas pretas), 400x. B: expressão de membrana diminuída (setas pretas), 400x; C: perda da expressão de membrana, (setas pretas), 400x.	86
Figura 17: Imuno-histoquímica para E-caderina nos adenocarcinomas gástricos. A: Marcação de membrana (seta preta) em mucosa gástrica não neoplásica, 400X; B: Expressão preservada em membrana (seta preta) em adenocarcinoma difuso, 400X; C- Perda da expressão (seta preta) em adenocarcinoma difuso, 400X.....	88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição dos tipos histológicos na população de estudo.	61
Gráfico 2: Distribuição de frequências do tipo e grau histológico do sexo feminino.	65
Gráfico 3: Distribuição de frequências do tipo e grau histológico do masculino.....	65
Gráfico 4: Distribuição dos tipos de tratamento para o tipo histológico difuso.....	66
Gráfico 5: Distribuição dos tipos de tratamento para o tipo histológico misto:.....	66
Gráfico 6: Distribuição dos tipos de tratamento para o tipo histológico intestinal:	67
Gráfico 7: Estádio clínico – local da lesão: Antro - Tratamento adjuvante	69
Gráfico 8: Estádio clínico – local da lesão: Antro - Tratamento neoadjuvante.....	69
Gráfico 9: Estádio clínico – local da lesão: Corpo - Tratamento adjuvante.....	70
Gráfico 10: Estádio clínico – local da lesão: Corpo - Tratamento neoadjuvante	70
Gráfico 11: Grau de regressão tumoral pós Neoadjuvancia. Gráfico A.....	71
Gráfico12: Grau de regressão tumoral pós Neoadjuvancia. Gráfico B	72
Gráfico 13: Grau de regressão tumoral pós Neoadjuvancia. Gráfico C.	72
Gráfico 14: Sobrevida Global da doença (meses) nos grupos de pacientes, com tratamento adjuvante e com tratamento Neoadjuvante.....	74
Gráfico 15: Sobrevida livre da doença (meses) nos grupos de pacientes, com tratamento adjuvante e neoadjuvante.....	75
Gráfico 16: Claudina-18: E-caderina – Perda de expressão.	81
Gráfico 17: Claudina-18: E-caderina – Expressão preservada (2/3+).....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Benefícios e riscos da quimioterapia neoadjuvante.	42
Tabela 2: Estadiamento patológico pTNM.....	48
Tabela 3: Grupos prognósticos do Câncer gástrico.....	49
Tabela 4: Grupos prognósticos do câncer gástrico pós-neoadjuvância (ypTNM)	50
Tabela 5: Graduação patológica de regressão tumoral (RYAN <i>et al.</i> ,2005).....	51
Tabela 6: Anticorpos utilizados para as reações imuno-histoquímicas.....	53
Tabela 7: Para validação das reações da fusão gênica.....	57
Tabela 8. Estatística descritiva das variáveis: Idade do paciente no dia da cirurgia, sobrevida global (dias) e sobrevida livre de doença (dias).	60
Tabela 9: Características histopatológicas da população de estudo baseadas no tipo tumoral e suas relações com estadiamento patológico pT (tumor), pN (metástases linfonodais locorregionais), estágio clínico e tratamentos adjuvante e neoadjuvante.....	62
Tabela 10: Esquemas terapêuticos do tratamento adjuvante.....	63
Tabela 11. Distribuição de frequências do Tipo histológico, Grau Histológico conforme o tipo de tratamento e o Sexo do Paciente.....	64
Tabela 12: Distribuição de frequências do tipo de tratamento de acordo ao local da lesão e estágio clínico.	68
Tabela 13: Distribuição de frequências dos pacientes de acordo ao grau histológico, o estágio clínico e o grau de regressão tumoral pós-neoadjuvância.....	71
Tabela 14: Média e o desvio padrão dos tempos de sobrevida nos grupos de resposta ao tratamento neoadjuvante segundo protocolo de graduação patológica de regressão tumoral (RYAN <i>et al.</i> 2005, modificado).....	73
Tabela 15: Distribuição de frequências dos pacientes e as expressões imuno-histoquímicas ARHGAP26, claudina e E-caderina.....	80
Tabela 16: Distribuição dos casos segundo o tipo histológico relacionado ao padrão de expressão imuno-histoquímica das proteínas E-caderina, Claudina 18 e ARHGAP26.....	82
Tabela 17: Características dos pacientes do estudo de acordo com o grau de Regressão Tumoral Pós Neoadjuvância considerando as variáveis: expressões imuno-histoquímicas das	

proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina, sobrevida global, tipo histológico, grau histológico e estágio clínico.	83
Tabela 18: Características dos pacientes do estudo de acordo com a expressão da proteína Claudina 18 considerando as variáveis: ARHGAP26, E-caderina, sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico e estágio clínico.....	85
Tabela 19: Características dos pacientes de acordo com a expressão imuno-histoquímica da proteína E-caderina considerando as variáveis: expressões imuno-histoquímicas das proteínas Claudina 18 e ARHGAP26; sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico e estágio clínico.....	87
Tabela 20: Coeficiente de Correlação de Spearman entre as variáveis ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina.	89
Tabela 21: Características dos pacientes de acordo com o grau de regressão tumoral pós neoadjuvância considerando as variáveis: sobrevida global, sobrevida livre de doença, expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina; tipo histológico, grau histológico e estágio clínico.	90
Tabela 22: Características dos pacientes de acordo com o grau de Regressão Tumoral Pós Neoadjuvância considerando as variáveis: sobrevida global, sobrevida livre de doença, expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina; tipo histológico, grau histológico e estágio clínico.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACRG – Asian Cancer Research Group

ARHGAP26 (Rho GTPase Activating Protein 26)

ARID1A - AT-rich interactive domain-containing protein 1^a

AJCC - American Joint Committee on Cancer

CG – câncer gástrico

CLDN18- claudina-18

CGD- câncer gástrico difuso

cDNA- DNA complementar

CDH1 – caderina 1 (E-caderina, caderina epitelial)

DAB- diaminobenzidina

DNA - ácido desoxirribonucleico

D.P. - desvio-padrão

EBV - vírus Epstein-Barr

ECX - epirrubicina, cisplatina, capecitabina

EOX - epirrubicina, oxaliplatina, capecitabina

EMT- transição epitélio mesenquimal

FAK- quinase de adesão focal

GRAF- regulador GTPase associado à quinase de adesão focal

GAPDH- proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GTP- guanosina trifosfato

GDP- guanosina difosfato

H&E- hematoxilina e eosina

HCFMRP-USP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo

H. pylori - Helicobacter pylori

IARC - International Agency for Research on Cancer

INCA - Instituto Nacional de Câncer

MEC – matriz extracelular

OMS- Organização Mundial de Saúde

PD-L1- Programmed Cell Death 1

PIK3ca- fosfatidilinositol 3-quinase

RNA- ácido ribonucleico

RHOA (membro A da família do gene homólogo RAS)

ROCK- Rho-associated protein kinase

r - coeficiente de correlação de postos de Spearman

RT-PCR- reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase

SERPAT - Serviço de Patologia do HCFMRP-USP

SPSS- Statistical Package for the Social Science

TP53- gene da proteína tumoral 53

TCGA - The Cancer Genome Atlas

TMA - tissue microarray

TME- micro ambiente tumoral

TJ- junção de oclusão celular

UICC- Union for International Cancer Control

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.2	Câncer gástrico no brasil	20
1.3	Etiopatogenia	22
1.3.1	Aspectos epidemiológicos	22
1.3.2	Infecção pelo <i>Helicobacter pylori</i>	22
1.4	Classificação histológica dos adenocarcinomas gástricos	23
1.5	Classificação molecular do Câncer Gástrico.....	24
1.6	Proteínas RAS e RHO	25
1.7	Rhoa GTPases	26
1.8	Mutação da proteína RHOA	28
1.9	Proteínas ROCKs.....	29
1.10	Proteínas ativadoras de RhoGTPase (ARHGAP) e o câncer gástrico.....	29
1.11	ARHGAP-26 - Proteína ativadora de RhoA GTPase 26 e o câncer gástrico.....	30
2	Claudina e suas funções	32
2.1	Claudina-18 (CLDN-18) no câncer gástrico	34
2.2	Fusão dos genes CLAUDINA-18 E ARHGAP-26 (CLDN18-ARHGAP26).....	34
3	Aspectos gerais da e-caderina (CDH1).....	38
3.1	Estrutura e função do complexo E-Cadherin-catenin (Adherens Junction).	39
3.1	E-caderina e tumorigenese.....	40
3.2	CLDN18–ARHGAP26 e E-CADERINA.....	40
4	TRATAMENTO.....	41
4.1	Tratamento neoadjuvante	41
5	OBJETIVO GERAL	44
6	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	44
7	HIPÓTESE	45
8	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
8.1	Delineamento do estudo	46
9	Casuística	46
9.1	Descrição da população a ser estudada	46

9.2 Critérios de inclusão.....	46
9.3 Critérios de exclusão	47
10 Revisão histopatológica.....	47
10.1 Efeitos do tratamento neoadjuvante	50
11 Análise de prontuários	51
11.1 Drogas utilizadas na neoadjuvância	52
11.2 Esquemas de tratamentos neoadjuvantes:.....	52
12 METODOLOGIA.....	53
12.1 Confeção dos TMAs	53
12.2 Imuno-histoquímica.....	53
12.3 Critérios de avaliação da imuno-histoquímica	54
12.3.1 E-caderina.....	54
12.3.2 Claudina 18:.....	54
12.3.3 ARHGAP26.....	54
12.4 Microdissecção tumoral.....	55
12.5 Extração de RNA.....	55
12.6 Síntese de DNA complementar (cDNA) para mRNA.....	56
12.7 RT-PCR para a fusão <i>CLDN18-ARHGAP26</i>	56
13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
14 RESULTADOS	59
14.1 Características gerais da população.....	59
14.2 Características histopatológicas e tratamentos quimioterápicos	61
14.3 Análise da fusão gênica <i>CLD18-ARHGAP26</i>	76
14.4 Avaliação da expressão imuno-histoquímica das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina na população do estudo.....	79
15 DISCUSSÃO	94
16 CONCLUSÕES.....	103
17 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
ANEXO	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do câncer gástrico

O câncer gástrico (CG) constitui uma importante causa de incidência e de óbitos no mundo. Em 2020, foi responsável por, aproximadamente, 1,1 milhão de casos novos e 769 mil óbitos, ocupando o sexto lugar em incidência (5,6%) e o terceiro em mortalidade (7,7%), dentre os cânceres. Foi o quarto tipo mais frequente entre os homens (7,1%), e o sétimo entre as mulheres. Para mortalidade, ocupou o quarto lugar no sexo masculino (9,1%) e quinto no feminino (6%)(BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2018; RAWLA & BARSOUK, 2019; INCA, 2023).

O adenocarcinoma, é o tipo mais comum de câncer gástrico, presente em 95% dos casos, acometendo principalmente homens com idade de 60 a 70 anos (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2018, INCA, 2023).

1.2 Câncer gástrico no Brasil

No Brasil, segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para os anos de 2023 a 2025, estima-se prevalência anual de 21.480 casos novos, sendo 13.340 em homens e 8.140 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 12,63 casos novos a cada 100 mil homens e 7,36 a cada 100 mil mulheres e além disso cerca de 65% dos pacientes diagnosticados com câncer de estômago têm mais de 50 anos, com pico de incidência verificado entre homens com idade aproximada de 70 anos (INCA, 2023).

Excetuando os tumores de pele não melanoma, o câncer gástrico ocupa a quinta posição dentre os tipos de câncer mais frequentes. As taxas de incidência mais elevadas são observadas na Região Sul, para ambos os sexos. Em homens é o segundo mais frequente na Região Norte (11,75/100 mil), o terceiro Região Nordeste (10,63/100 mil), Nas Regiões Sul (15,02 por 100 mil) e Centro-oeste (10,20 por 100 mil), é o quarto mais frequente e na Região Sudeste, é o quinto mais frequente (12,58 por 100 mil). (INCA, 2023). E para as mulheres, é o quinto mais frequente nas Regiões Sul (8,41 por 100 mil) e Norte (6,53 por 100 mil). Nas Regiões Nordeste

(7,46 por 100 mil) e Centro-oeste (6,68 por 100 mil), ocupa a sexta posição. Na Região Sudeste (7,25 por 100 mil), ocupa a oitava posição (INCA,2023), como ilustrado na figura 1 abaixo:

Figura 1: Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes.

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.760	26,5%	Homens	Mulheres	Mama feminina	2.410	22,4%
Estômago	1.200	11,5%			Colo do útero	1.980	18,4%
Traqueia, brônquio e pulmão	880	8,5%			Cólon e reto	740	6,9%
Cólon e reto	690	6,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	650	6,0%
Cavidade oral	440	4,2%			Estômago	630	5,9%
Leucemias	440	4,2%			Leucemias	350	3,3%
Fígado	430	4,1%			Ovário	340	3,2%
Sistema nervoso central	320	3,1%			Fígado	320	3,0%
Esôfago	270	2,6%			Glândula tireoide	320	3,0%
Laringe	260	2,5%			Sistema nervoso central	270	2,5%

Fonte: Adaptado INCA, 2023.

Em termos de mortalidade no Brasil, no ano de 2017, foram registrados cerca de 9.206 óbitos de câncer de estômago em homens e 5.107 óbitos em mulheres, com risco respectivamente, de 9,12/100 mil e de 4,93/100 mil (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014). Os óbitos verificados no país, em 2018, foram 15.111, sendo 9.387 em homens (8%) e 5.374 mulheres (5%). Assim, a mortalidade por esse tipo de câncer também se destaca, aparecendo em quarto lugar entre homens e em sexto entre as mulheres (INCA, 2022). Em 2020, ocorreram 13.850 óbitos por câncer gástrico, correspondendo a 6,54 mortes a cada 100 mil brasileiros. Entre os homens, foram 8.772 óbitos, equivalendo a 8,47 mortes a cada 100 mil homens e entre as mulheres, ocorreram 5.078 óbitos, o equivalente a 4,69 mortes a cada 100 mil mulheres (INCA,2023).

1.3 Etiopatogenia

1.3.1 Aspectos epidemiológicos

O câncer gástrico é uma doença heterogênea e multifatorial, cujos fatores de risco incluem: infecção gástrica pelo *H. pylori*; idade avançada e gênero masculino; hábitos de vida como dieta pobre em produtos de origem vegetal, alto teor de sal (alimentos em conserva de sal), ingestão de compostos N-nitrosos, tabagismo, dieta pobre em vitamina A e C, déficit de alimentos refrigerados e água potável contaminada, obesidade, aumento do consumo de calorias, refluxo gastroesofágico, exposição às drogas como ao tabaco; associação às doenças como gastrite crônica atrófica, gastrite hipertrófica gigante e hereditariedade, como neoplasia gástrica e polipose adenomatosa familiar estão associados a um risco elevado do CG (VALENZUELA *et al.*, 2015; ZILBERSTEIN, 2013)

1.3.2 Infecção pelo *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é uma bactéria espiralada, gram-negativa, microaerófila, cujo habitat é a mucosa gástrica (GM) (RAWLA & BARSOUK, 2019).

Estudos epidemiológicos mostram que 2%-3% das dos indivíduos infectados pelo *H.pylori* desenvolvem adenocarcinoma gástrico, 0,1% linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (linfoma Malt). Estima-se que 50% da população humana mundial esteja cronicamente colonizada por *H. pylori*, e cerca de 15% das pessoas infectadas desenvolvem úlceras gástricas. No entanto, mesmo quando a infecção é assintomática, a infecção por *H. pylori* pode levar à úlcera péptica e ao câncer gástrico. (ALIPOUR, 2021)

O *H. pylori* difere de outras bactérias em vários aspectos, principalmente por sua capacidade de suportar por muito tempo, condições desfavoráveis a outros microrganismos (BRITO *et al.*, 2019).

De acordo com a hipótese de Correa, a atrofia do corpo gástrico após infecção por *H. pylori*, que resulta em aumento do pH estomacal, pode evoluir para metaplasia intestinal, displasia e CG, e pode, parcialmente, explicar o tipo intestinal CG. A patogenicidade do cancer gástrico de tipo difuso permanece pouco conhecida e indefinida. No entanto, anormalidades

genéticas nos fatores de adesão celular, como E-caderina e atividades celulares que causam integridade e fisiologia celular prejudicadas, têm sido documentadas como fatores contribuintes. Nos últimos anos, a infecção por *H. pylori* também tem sido associada ao desenvolvimento de câncer gástrico do tipo difuso (CORREA, 1992; ASSUMPÇÃO et al., 2018)

A infecção por *H. pylori* é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como causa do câncer gástrico não cárdia, independentemente da classificação do subtipo de Lauren. No entanto, a sua erradicação parece reduzir o risco de câncer gástrico (CROEW, 2019), incluindo a diminuição incidência de tumores metacrônicos em pacientes que foram efetivamente tratados após a ressecção endoscópica de câncer gástrico precoce (CHOI et al., 2018) e também entre pacientes com história familiar de câncer gástrico (CHOI et al., 2020).

Há relatos controversos sobre esse tema (ASSUMPÇÃO et al., 2019) em especial, o risco de GC tipo difuso. Take e colaboradores (2020) demonstraram um risco aumentado de câncer gástrico do tipo difuso dez anos mesmo após a erradicação do *H. pylori*, mostrando a necessidade de manter o acompanhamento endoscópico (Take et al., 2020).

1.4 Classificação histológica dos adenocarcinomas gástricos

A classificação histológica dos adenocarcinomas gástricos proposta pelo patologista finlandês Pekka Laurén em 1965, divide o CG em dois tipos histológicos principais: intestinal e difuso. Cerca de 85% a 90% se enquadram nessas categorias (FENOGLIO-PREISER *et al.*, 2000).

O tipo intestinal, de aspecto análogo aos adenocarcinomas colorretais, caracteriza-se pela coesão celular e pela tendência à formação de estruturas glandulares bem definidas, de arquitetura tubular ou vilosa. O tipo difuso caracteriza-se por células pouco coesas, isoladas ou em pequenos grupamentos. As formações glandulares são muito mal definidas ou ausentes, caracterizando-se pela presença de células neoplásicas isoladas embebidas por estroma desmoplásico que penetram a parede gástrica (LAURÉN, 1965, FENOGLIO-PREISER *et al.*, 2000). A presença das células em anel de sinete é comum neste tipo de neoplasia (CARNEIRO *et al.*, 2019).

Os demais adenocarcinomas gástricos que não se enquadram nos padrões intestinal e difuso de Laurén são separados em dois grupos adicionais: os indeterminados e os mistos

(CARNEIRO *et al.*, 2019). Sendo indeterminados, os inclassificáveis por serem muito pouco diferenciados, e o misto, assim denominado, por serem tumores que possuem áreas difusas e intestinais em proporções semelhantes (LAUWERS *et al.*, 2010, CARNEIRO *et al.*, 2019). Portanto, os casos em que as características de um tipo sejam apenas focais devem ser classificados pelo padrão predominante.

1.5 Classificação molecular do Câncer Gástrico

O câncer é reconhecido como doença genética desde o início dos anos 1900 resultante de mutações hereditárias, aleatórias ou induzidas pelo ambiente (DYER & ABRAMSON; 2009).

A alteração genética e sua influência nas vias de sinalização celular tornaram-se focos de pesquisa em biologia tumoral (MUELLER, 2015).

A primeira classificação molecular abrangente para o CG foi realizada por um grupo de pesquisadores de Singapura em 2013, que identificaram três tipos principais baseados na expressão genômica, sendo denominados: proliferativo (alta instabilidade genômica e mutação *TP53*), metabólico (mais sensível a terapia 5-FU) e o mesenquimal (tumores semelhantes a células-tronco sensíveis aos inibidores da via *PIK3CA-mTOR*) (GARATTINI *et al.*, 2017).

Logo em seguida, o grupo de pesquisa *The cancer genome atlas (TCGA)* categorizou o câncer gástrico em quatro subtipos genômicos: cânceres vírus Epstein-Barr (EBV) positivos (9% dos CG com mutação frequente *PIK3CA* [fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa] e expressão aumentada de *PD-L1/PD-L2* [*programmed death-1 (PD-1)/L2*]; tumores com instabilidade de microssatélites (22% dos casos e hipermutado); instabilidade cromossômica (50% dos casos, predominantemente juncional, mutação *TP53* com ativação RTK[tirosina quinases receptoras]- RAS) e os genomicamente estáveis (GE) (20%, presença de mutação na motilidade e nas moléculas de adesão) (LI *et al.*, 2017).

Ao mesmo tempo, um grupo asiático de pesquisa do câncer (*Asian Cancer Research Group – ACRG*), propôs uma nova classificação molecular dividindo o CG em: subgrupo mesenquimal (transição epitélio-mesenquima), subgrupo instabilidade de microssatélite e subgrupos - estabilidade de microssatélites *TP53* positivos e *TP53* negativos (LI *et al.*, 2017).

Essas novas classificações criaram um novo paradigma na caracterização biológica do câncer e permitem a identificação de subgrupos genômicos para caracterizações moleculares, epigenéticas e funcionais, com vista, a melhores tratamentos e novas terapias-alvo.

Contudo, mesmo com os avanços nos estudos moleculares e no tratamento do CG, a sobrevida e o prognóstico continuam sombrios na doença avançada, sobretudo nos cânceres de padrão difuso. Esse particular subtipo, categorizado como genômicamente estável, com igual prevalência entre os sexos e de localização distal, apresenta inativação recorrente de *CDHI*, mutações *RHOA* e *ARDIA*, além de translocação recorrente da translocação intercromossômica entre Claudina 18 (*CLDN18*) e *ARHGAP26* (*Rho GTPase Activating Protein 26*), implicadas na motilidade celular (FERLAY *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2017).

Curiosamente, os GC difusos (CGD), caracterizados por fenótipo maligno e diferenciação estromal, frequentemente apresentam mutações de ganho de função do *RHOA*, em cerca de 14-25% dos casos (LAUREN, 1965; GARATTINI *et al.*, 2017)

O *RHOA* (membro A da família do gene homólogo RAS) pertence à família da *RHO GTPase*, implicada na regulação da organização do citoesqueleto, adesão celular, tráfico de membrana intracelular, transcrição gênica, apoptose e progressão do ciclo celular; além disso, ativa o *STAT 3* para promover a tumorigênese (GARATTINI *et al.*, 2017).

A recorrente translocação intercromossômica entre a *CLDN18* (estrutura de adesão das junções celulares) e a *ARHGAP26* resultando na fusão do gene *CLDN18-ARGHGAP26*, ocorre primariamente no CG GE, são mutuamente exclusivas com a mutação *RHOA* (GARATTINI *et al.*, 2017)

Portanto, considera-se que a fusão da *CLDN18-ARGHGAP26* contribui para o desenvolvimento de CG difuso pela perda de *CLDN18* e ganho de funções de *ARGHGAP26* (SHU *et al.*, 2018).

1.6 Proteínas RAS e RHO

A subfamília Rho GTPase é um membro da pequena família de proteínas de ligação a GTP pertencente à Ras integrando: RhoA, Cdc42 e Rac1/2, com função de realizar várias funções biológicas, como citocinese, motilidade celular, desenvolvimento de tecidos, regulação da morfologia, em conjunto com a regulação da transcrição e produção de espécies reativas de

oxigênio (ROS) e tumorigênese (MACK & GEORGIU, 2014; FUNAHASHI *et al.*, 2014; SCHAEFER A & CHANNING D, 2022).

Estudos recentes também sugerem seu potencial papel na modulação do microambiente tumoral (TME) de cânceres. Embora a superexpressão de RhoA tenha sido frequentemente reconhecida em vários tipos de câncer, no câncer gástrico tem sido significativamente associada a um prognóstico ruim (HUANG *et al.*, 2015; (KAKIUCHI *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2017).

1.7 Rhoa GTPases

O *RHOA* GTPase foi inicialmente descrito como um oncogene, cuja superexpressão ativada induz transformação maligna e formação de tumor *in vivo* (ORGAZ *et al.*, 2014).

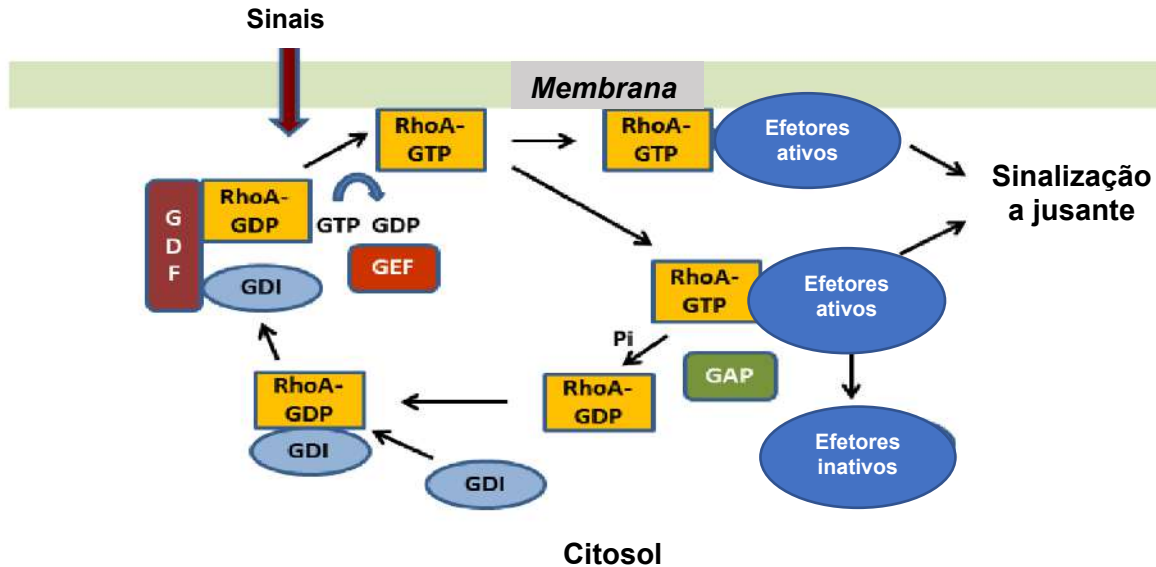
RHOA circula entre a forma inativa ligada a GDP e a forma ativa ligada a GTP sob o controle de proteínas reguladoras como fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) e proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) (OLSON & JULIAN, 2014 ;BORA & SHRIVASTAVA, 2017). Os inibidores de dissociação de nucleotídeos de guanina (GDIs), protegem as Rho GTPases da degradação, sendo inativados pela hidrólise de GTP, catalisada por proteínas ativadoras de GTPase (GAPS) (BUCHSBAUM, 2007 ; BOS *et al.*, (2007).

Essas proteínas reguladoras induzem alterações no *RHOA* permitindo a ligação a substratos chamados de proteínas efetoras, uma delas é a proteína quinase associada ao Rho - ROCK. O RhoGdi, membro mais bem caracterizado da família Rho, quando expresso e capaz de interagir com várias *RHO* GTPases, incluindo *RHOA*, *RHOC*, *RAC1*, *RAC2* e *CDC42*) (SUN *et al.*, 2015; O'CONNOR & CHEN, 2013; TÖNGES *et al.*, 2011; PANTARELLI & WELCH, 2018).

Contudo, existem GEFs e GAPs específicos para Rho GTPases, que são regulados por um conjunto de estímulos capazes de controlar a atividade Rho para diversos processos celulares (SUN *et al.*, 2015).

Para realizar ativação da Rho GTPases, os GEFs não podem atuar de modo direto no complexo Rho GTPases-RhoGDI, precisam primeiro ser dissociadas do RhoGDI. Esta separação é realizada pelo fator de deslocamento GDI-GDF. Uma vez que uma Rho GTPase está ligada ao GTP, ela geralmente está associada à membrana plasmática da célula por meio do seu grupo prenil (PANTARELLI & WELCH, 2018), como podemos observar na figura 2 abaixo:

Figura 2: Regulação do RhoA GTPase and vários fatores de transcrição na via RhoA Regulação da atividade RhoA. O RhoA-GDP inativo liga-se ao RhoGDI no citosol. Para que o RhoA seja ativado, o GDF permite que o GEF incorpore GTP ao RhoA. O RhoA-GTP ativo está localizado na membrana ou no citosol, onde se liga a proteínas efetoras, como ROCK. A atividade GAP acelera a inativação de RhoA catalisando a hidrólise de GTP em GDP e Pi. As proteínas efetoras, que são ativadas pelo RhoA-GTP, transmitem os sinais RhoA para os componentes a jusante, alterando assim as funções celulares. (Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathwa (KIM *et al.*, 2018).



Na forma ativa (GTP), as GTPases reconhecem proteínas alvo, chamadas de efetoras, sendo capazes de gerar uma resposta celular, ativando vias específicas de sinalização, interagindo com o domínio C-terminal do ROCK, até que, ocorra a hidrólise de GTP fazendo com que essa proteína retorne ao estado inativo (GDP) (MARTIN & DENK-LOBNIG, 2019).

As proteínas quinases associadas a Rho – ROCK pertencem a uma família de serina / treonina quinases moduladas por interações com Rho GTPases para promover a geração de força contrátil mediada por actina-miosina por fosforilação de uma variedade de proteínas alvo a jusante; assim, controlando a motilidade celular e as metástases (AMIN *et al.* 2013).

Ainda possui a função de adesão celular induzida por Rho, sendo um complexo multiproteico de integrina e proteínas relacionadas, que é agrupado pela força dos feixes de

actino-miosina ligados a esse complexo e servindo como adesão à matriz extracelular (MEC). Sendo assim, a formação de adesão induzida por Rho facilita a adesão celular à MEC, aumentando a avidéz da integrina. (NOBES & HALL, 1995; HODGE & RIDLEY, 2016).

Portanto, os reguladores Rho GTPase, GEFs e Rho positivos são classificados pró-oncogênicos e pró-crescimento, enquanto reguladores negativos como Rho GAPs são considerados supressores de tumores (COOK *et al.*, 2014).

1.8 Mutação da proteína RHOA

No nível celular, Rho GTPases têm emergido como reguladores chave da adesão celular, migração, trânsito endocítico, citocinese, transcrição gênica e proliferação celular através de controle do remodelamento do citoesqueleto actina e outras respostas celulares aos estímulos externos (HALL, 1998; FUKATA *et al.*, 2003; RAFTOPOULOU *et al.*, 2004)

Uma desregulação de Rho GTPases está diretamente relacionada a uma variedade de doenças, incluindo vários tipos de câncer. Pode-se dizer que a superexpressão, mutação ou atividade regulada diferencialmente do RhoA implica no desenvolvimento da carcinogênese, sendo provocada transcricionalmente e a regulação diferencial da atividade de Rho ocorre por modificações pós-transducionais (RÖCKEN *et al.*, 2016).

Logo, a expressão do nível de RhoA é regulada no nível transcricional e em vários micro-RNAs (miRs). A partir dessas alterações, a RhoA, por sua vez, altera a transcrição de múltiplos genes-alvo envolvidos em diversos processos fisiológicos, particularmente aqueles relevantes para a carcinogênese (RÖCKEN *et al.*, 2016).

A mutação do RHOA foi detectada em cânceres gástricos do tipo difuso, em 14-25% dos casos, raramente vista em outros tipos de cânceres gástricos (KAKIUCHI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014).

Desta forma, essas mutações estão associadas a uma diferenciação celular deficiente, padrões de crescimento díspares e falta de coesão celular, que são características de DGC (AMIN *et al.*, 2016; BOLAND & YURGELUN, 2017; FARIED *et al.*, 2007; FERLAY *et al.*, 2019). Isso sugere que o RHOA desregulado tenha funções que podem contribuir para a característica patológica deste subtipo de câncer gástrico.

1.9 Proteínas ROCKs

As proteínas Rho integradas as quinases (ROCKs) são as efetoras mais bem caracterizadas das proteínas Rho. São ligadas a uma forma ativada de Rho e participam da organização do citoesqueleto de actina, no desenvolvimento das fibras de estresse e junção celular. Estão associadas à patogênese e progressão de tumores humanos (KAMAI *et al.*, 2003).

A inibição da proteína ROCK tem sido apontada em várias condições fisiopatológicas humanas, tais como doenças cardiovasculares e renais a doenças fibróticas (RICKER *et al.*, 2016).

Essa proteína apresenta um papel importante com múltiplas funções através da fosforilação de um substrato específico, incluindo a regulação da contração celular, motilidade, morfologia, polaridade, divisão celular e expressão gênica. Existem dois membros de Rho-quinase, são eles: ROCK1 ou ROCK2, referenciados como Rho-quinase (AMANO *et al.*, 2010; (RICKER *et al.*, 2016).).

Estudos mostram que o aumento da expressão de Rho e a expressão ROCK, estão relacionados com a invasão tumoral e metástase (BO *et al.*, 2015).

Segundo Komers (2011), a via de sinalização ROCK cumpre papéis cruciais em várias doenças humanas e é considerado um alvo importante para o tratamento dessas patologias (KOMERS, 2011).

1.10 Proteínas ativadoras de RhoGTPase (ARHGAP) e o câncer gástrico

A alteração genética das proteínas ativadoras de Rho GTPase (ARHGAP) e GTPase RhoA é uma marca registrada do câncer gástrico do tipo difuso (KOMATSU *et al.*, 2022; FARIED *et al.*, 2007; KAMAI *et al.*, 2003; PAN *et al.*, 2004; PORTER *et al.*, 2016).

De acordo com Xu *et al.* (2012), a inibição da via de sinalização RhoA / ROCK desempenha um papel importante na apoptose das células cancerígenas gástricas.

Além disso, o RhoGdi está envolvido no desenvolvimento e na metástase do câncer gástrico, podendo vir a representar um marcador útil de progressão tumoral (HARDING & THEODORESCU; 2010).

Entre as várias modificações genômicas que ocorrem no CG, a mutação *RHOA* desempenha um papel crítico no desenvolvimento e progressão do câncer, regulando a organização da actina, migração celular, citocinese e o ciclo celular (HARDING & THEODORESCU; 2010).

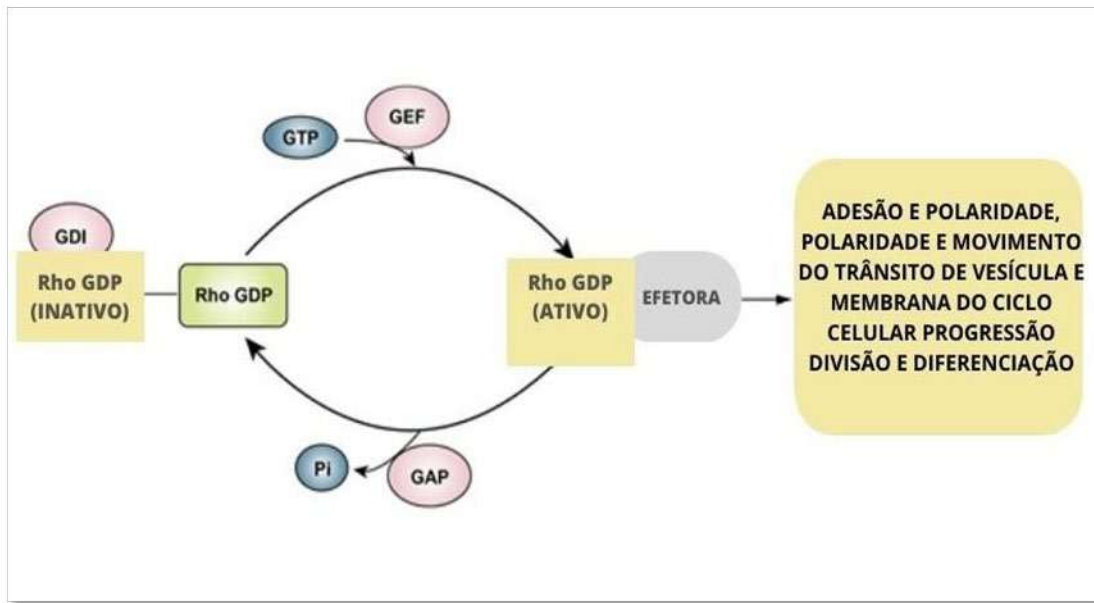
1.11 ARHGAP-26 - Proteína ativadora de RhoA GTPase 26 e o câncer gástrico

A proteína ativadora de Rho GTPase 26 (ARHGAP26) é um regulador negativo da família Rho que converte a pequena proteína de ligação a GTP RhoA (GTP-RhoA) em sua forma inativa ligada a GDP e é um gene supressor de tumor associado ao crescimento celular e migração, afetando a adesão das células à matriz extracelular ((KAKIUCHI *et al.*, 2014 , WANG *et al.*, 2014; OHTA *et al.*; 2016; XURI *et al.*, 2019).

Ela foi descoberta inicialmente em tecidos de aves por Hildebrand e colaboradores em 1996, quando estudaram a quinase de adesão focal (FAK) na sinalização mediada por integrina. Assim, esta proteína foi primeiramente denominada como regulador GTPase associado à FAK (GRAF) (HILDEBRAND *et al.*, 1996). Por ser uma proteína ativadora de GTPase (GAP), ARHGAP-26 aumenta a hidrólise de GTPases e converte GTPases de uma forma ativa para uma forma inativa, inibindo assim a transdução de sinalização (TAYLOR *et al.*, 1999).

A figura 3 ilustra o ciclo de ligação e hidrólise- GTP e funções de sinalização da Rho GTPases envolvendo células.

Figura 3: Demonstra como GEFs, GAPs e GDIs regulam o ciclo da via de sinalização Rho GTPase e os comportamentos celulares associados. *GEF* - fatores de troca de nucleotídeos de guanina ; *GAP GTPase*- proteína ativadora; *GDI Rho GDP* - inibidor de dissociação de GDP de proteínas Rho .



Fonte- Adaptada de ZHANG *et al.*, 2021

ARHGAP26 está localizado no interior da citomembrana e regula a proliferação celular, apoptose a nível translacional (JARIUS *et al.*, 2013, JING *et al.*, 2022)

Vários estudos apontam que a expressão e a relação do ARHGAP26 na tumorigênese e progressão tumoral não são similares em diferentes tipos de tumores, sendo significativamente diminuída na leucemia mielóide aguda e crônica, no câncer de ovário também (CHEN *et al.*, 2019).

Em contrapartida, a atividade do fator de transcrição de ARHGAP26 é significativamente aumentada e a expressão de ARHGAP26 é regulada positivamente no câncer de próstata (LI *et al.*, 2013). No câncer gástrico, o *ARHGAP26* é fundido com o gene claudina-18 (*CLDN18*), e a proteína de fusão anormal regula o desenvolvimento do câncer gástrico (SHU *et al.*, 2018).

A figura 4 sumariza o papel de ARHGAP26 em cânceres humanos.

Figura 4: O diagrama sintetiza o nível de expressão e padrão de ARHGAP26 em diferentes cânceres humanos (amarelo), possíveis problemas clínicos (verde) e questões a serem resolvidas (roxo).



Fonte- Adaptado Zhang *et al.*, 2021

2 Claudina e suas funções

Claudinas foram inicialmente descritas por Tsukita & Furuse (1998), como principais componentes das junções de oclusão celular (TJ - 'tight junctions') (SINGH *et al.*, 2017), sendo parte integrante da estrutura e função da adesão celular, composta por pelo menos 27 membros (SINGH & DHAWAN, 2013).

São componentes críticos da barreira epitelial paracelular, incluindo a proteção do tecido gástrico da ação ácida do seu lúmen (DAVENPORT, 1972a, 1972b, 1975). Alterações desta função de barreira pode causar inflamação crônica (JOVOV *et al.*, 2007; SANDERS *et al.*, 1985), um fator de risco para o desenvolvimento de GC (VANNELLA *et al.*, 2012)

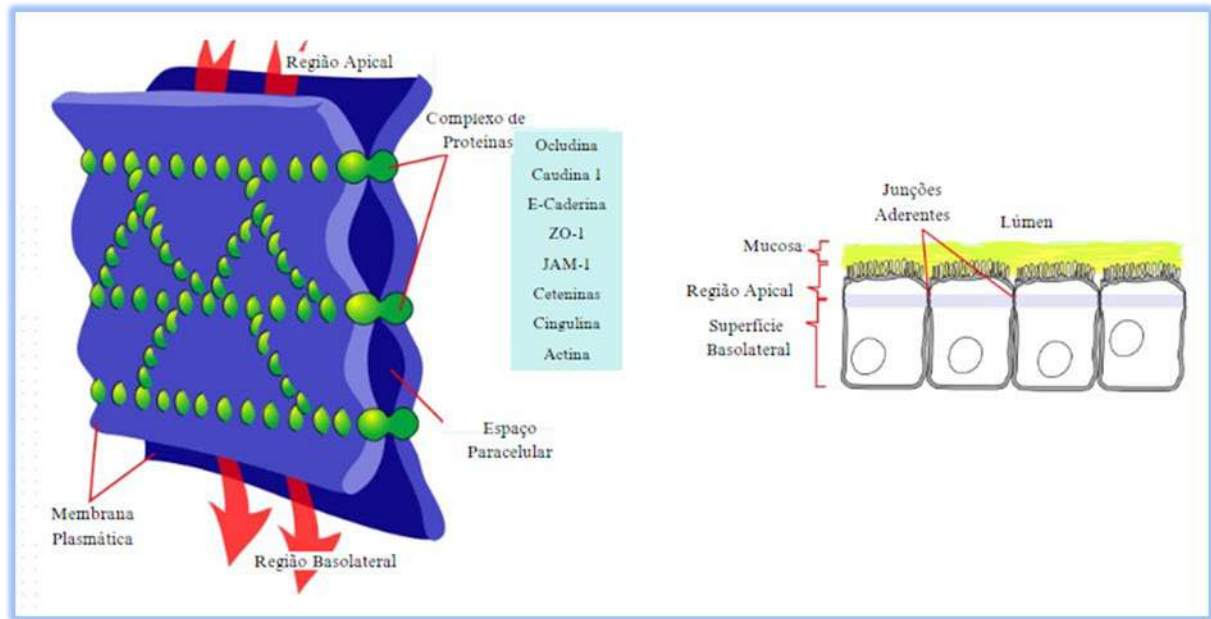
Suas funcionalidades, segundo Krause e colaboradores (2015), incluem:

- Manutenção da polaridade celular;
- Adesão célula-célula;
- Função barreira;
- Permeabilidade paracelular seletiva.

As claudinas são geralmente altamente expressas nos tecidos cancerosos dependendo do tipo de câncer e do tipo de claudina, embora sua redução ou perda de função devido a fosforilação promova a transição epitélio-mesenquima, metastases e infiltração (HASHIMOTO & OSHIMA, 2022).

A figura número 5 ilustra o mecanismo das junções celulares através da Claudina.

Figura 5: Representação esquemática da adesão celular na Claudina-18.



Fonte: Adaptada de https://en.wikipedia.org/wiki/Tight_junction

A Claudina possui estruturas complexas e dinâmicas, que incluem uma série de proteínas juncionais capazes de cruzar a bicamada lipídica celular e se ligarem à porção extracelular na célula adjacente. Funcionalmente, essas junções celulares ou oclusivas regulam a passagem paracelular de íons, solutos e água. Exercem ainda a função de barreira semipermeável entre o domínio apical e basolateral, mantendo a polaridade celular e bloqueando a livre difusão de proteínas, lipídeos, produtos patogênicos, dentre outros. Possuem quatro domínios transmembranares, com os terminais amina e carboxilo no citoplasma (HASHIMOTO & OSHIMA, 2022).

2.1 Claudina-18 (CLDN-18) no câncer gástrico

A proteína claudina 18 é especificamente expressa no CG e no estômago normal, em comparação com outros cânceres e tecidos, tornando-a um potencial alvo terapêutico (HASHIMOTO & OSHIMA, 2022).

O gene *CLDN18* humano possui duas variantes de splicing, que codificam duas isoformas de proteínas, variante 1 de splicing CLDN18 (CLDN18.1) e variante 2 de splicing CLDN18 (CLDN18.2) (HASHIMOTO & OSHIMA, 2022).

CLDN18.1 é especificamente expresso em tecidos pulmonares normais e cancerosos, e CLDN18.2 é expresso em tecidos gástricos normais e em tecidos de câncer gástrico, pancreático, esofágico e pulmonar (SAHIN *et al.*, 2008; OSANAI *et al.*, 2017).

Na mucosa gástrica normal, a CLDN18 é encontrada no epitélio foveolar, em células imaturas e no epitélio glandular. Na metaplasia intestinal, está diminuída ou ausente no epitélio metaplásico. (SHINOZAKI *et al.*, 2009).

A regulação negativa da CLDN18 ocorre durante a metaplasia intestinal na cascata de Pelayo Correa, um processo multifatorial e multifatorial de carcinogênese gástrica (CORREA, 1992; CORREA, 2007).

A expressão da CLDN18 nos GCs têm diferentes funções biológicas na dependência da sua regulação (*down regulated* ou *up regulated*), desta forma, encontra-se altamente expresso em tecidos gástricos normais, e com baixa expressão em 57,5% dos GCs, especialmente em 73,7% dos fenótipos intestinais (SANADA *et al.*, 2006).

2.2 Fusão dos genes CLAUDINA-18 E ARHGAP-26 (CLDN18-ARHGAP26)

As fusões de genes ocorrem em vários tipos diferentes de câncer, surgindo como resultado de rearranjos genômicos, incluindo: inversões cromossômicas, deleções intersticiais, duplicações ou translocações, e podem impulsionar o desenvolvimento e a progressão do câncer (STRANSKY *et al.*, 2014).

O câncer gástrico difuso está associado a uma translocação intercromossômica entre CLDN18 e ARHGAP (o gene que codifica a proteína ativadora de Rho GTPase [RhoGAP], que

contribuiu para a organização dos citoesqueletos de actina e microtúbulos), resultando na geração de uma proteína de fusão contendo o domínio RhoGAP com função prejudicada de CLDN18 e RhoGAP (KIM *et al.*, 2020)

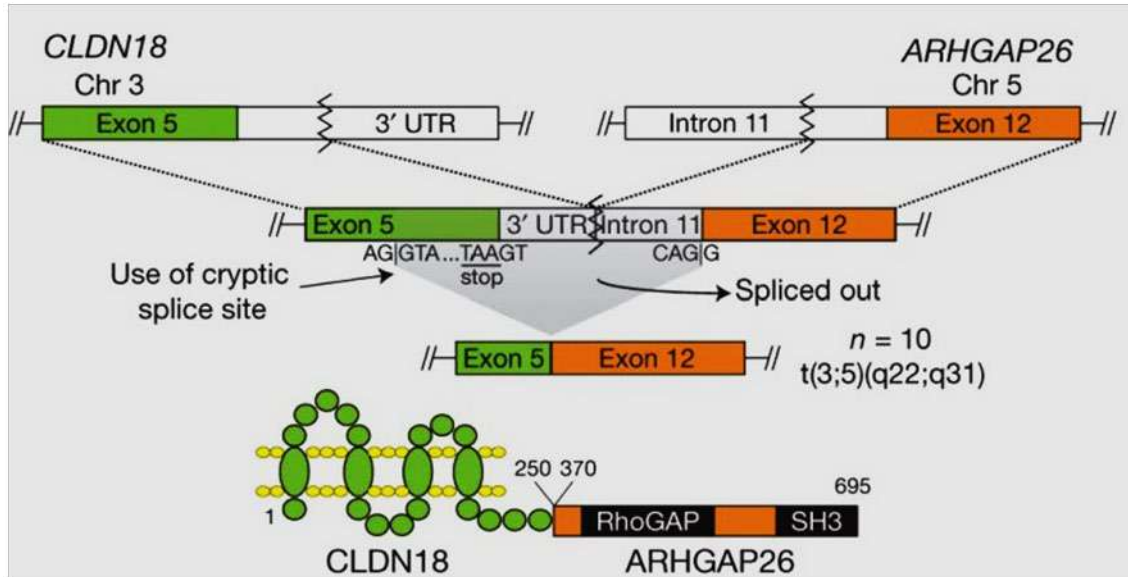
O gene de fusão CLDN18-ARHGAP é formado por rearranjos cromossômicos dos genes CLDN18 e ARHGAP, principalmente fusões CLDN18-ARHGAP26 e CLDN18-ARHGAP6. CLDN18-ARHGAP26/6 contém uma região de codificação quase completa de CLDN18 e o domínio conservado de ARHGAP26/6. Funcionalmente, o gene CLDN18 codifica a proteína claudina-18, que forma junções oclusivas (*tight junctions*) nas células epiteliais. A proteína de fusão CLDN18-ARHGAP pode romper a estrutura da proteína CLDN18 de tipo selvagem, o que pode afetar a adesão de células cancerígenas. O gene ARHGAP26 codifica a proteína ARHGAP26, membro da Rho GTPase que ativa a proteína, também conhecida como regulador GTPase associado à quinase de adesão focal (GRAF). O GRAF não apenas regula a atividade das proteínas da família RHOGAP (AMIN *et al.*, 2016), mas também coordena a remodelação da membrana, necessária para a via endocítica CLIC/GEEC (Via endocítica independente de clatrina mediada por transportadores primários tubulovesiculares não revestidos chamados transportadores independentes de clatrina (CLICs) que surgem diretamente da membrana plasmática e depois amadurecem em compartimentos endocíticos precoces tubulares chamados compartimentos enriquecidos com proteína ancorada em glicosilfosfolinositol (GPI-AP) (GEECs)) (LUNDMARK *et al.*, 2008).

Regev e colaboradores (2017), sugeriram que a proteína GRAF pode desempenhar um papel na manutenção do fenótipo epitelial normal, cuja depleção pode induzir a um processo semelhante à transição epitelial-mesenquimal (EMT) relacionado à transformação neoplásica (REGEV *et al.*, 2017).

Para as proteínas de fusão de CLDN18-ARHGAP, o grande segmento de ARHGAP se funde ao terminal carboxil de CLDN18 e retém o domínio GAP do terminal carboxi, o que pode afetar a regulação do ARHGAP da via RHOA e/ou o fenótipo epitelial de células de câncer gástrico. Estudos apontaram que a fusão CLDN18-ARHGAP26 em células cancerosas pode aumentar sua capacidade de migração e invasão (YAO *et al.*, 2015), o que pode explicar em parte os estágios avançados do tumor em pacientes positivos à fusão CLDN18-ARHGAP. (ZHANG *et al.*, 2020)

A figura 6 ilustra o papel da fusão gênica no câncer gástrico.

Figura 6: Representação esquemática da fusão gênica CLDN18-ARHGAP26.

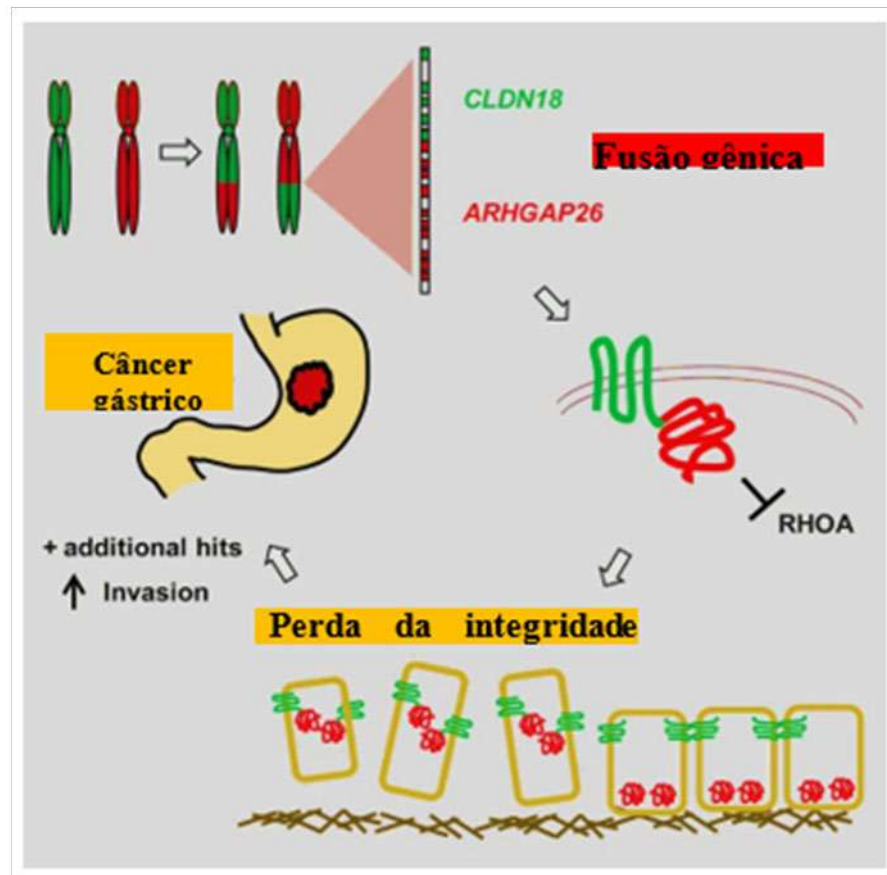


Fonte: Adaptado Zhang *et al.*, 2021

Na figura 6 acima, o gene *CLDN18* se funde com o gene *ARHGAP26*, que inicia a translação da fusão das proteínas CLDN18-ARHGAP26 no *cryptic splice site* (mutação no sítio de splicing). A CLDN18-ARHGAP26 contém domínios transmembranas da CLDN18; domínios GAP e SH3 do ARHGAP26. *CLDN18*, *claudins 18*; *ARHGAP26*, *RhoA GTPase-activating protein 26*; *GAP GTPase-activating protein*, *SH3 src homology 3*, *UTR untranslated region*.

A figura 7 ilustra o papel da fusão gênica no câncer gástrico.

Figura 7: A CLDN18-ARHGAP26 intermedia a desintegração epitelial, levando possivelmente a vazamento de H⁺ no estômago, e a fusão pode contribuir para a invasão quando a célula é transformada.



Fonte: Adaptada de Yao *et al.*, 2015

As frequências dessas fusões entre os cânceres gástricos foram descritas em apenas duas coortes e identificadas em 14,8% entre os tipos de cânceres gástricos genômica e estáveis (GS) em um estudo conduzido pelo The Cancer Grupo Genoma Atlas (TCGA), e 3,0% entre 100 cânceres gástricos analisados por Yao *et al.* Portanto, a exata frequência da fusão permanece incerta e precisa ser avaliada em uma grande coorte independente de cânceres (Tanaka *et al.*, 2018).

Tanaka e colaboradores (2018), realizaram um estudo em 254 casos de cânceres gástricos (172 difuso e 82 intestinal), identificando 26 casos positivos de fusão gênica CLDN18-ARHGAP26, sendo 22 difusos (12,8%) e os demais intestinais. Observaram que pacientes com CG fusão positiva, tendem a ter tumores com maior diâmetro, maior número de linfonodos, mais metástases distantes do que os cânceres gástricos sem as fusões, piores taxas de sobrevivência e mostram resistência à quimioterapia à base de oxaliplatina / fluoropirimidinas. Nesse estudo realizaram ainda a análise da expressão imuno-histoquímica das proteínas E-caderina, claudina

18 e ARHGAP26 e notaram que quase todos os casos positivos para fusão CLDN18-ARHGAP26 expressavam CLDN18, cerca da metade dos quais expressavam ARHGAP26 na membrana, o que provavelmente reflete a necessidade de atividade do promotor CLDN18 para expressão da proteína de fusão em células tumorais. Além disso, retiam a expressão da E-caderina, diferentemente dos casos fusão negativa (TANAKA et al., 2018).

Diante do exposto, fica claro que a detecção dessas mutações e fusões gênicas para adequada caracterização molecular do CGD, é fator *sine qua non* no direcionamento do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas específicas que visem melhoras na sobrevida global e qualidade de vida dos pacientes.

3 Aspectos gerais da e-caderina (CDH1)

A E-caderina pertence a uma família de glicoproteínas transmembranares altamente conservadas denominadas caderinas, cuja função é auxiliar na adesão celular dependente de cálcio para formar tecidos organizados, formando um complexo com outro conjunto de proteínas citosólicas – as cateninas (SHENOY, 2019).

É codificada pelo gene *CDH1*, gene supressor de tumor, localizado no cromossomo 16q22.1. (SHENOY, 2019; BLAIR et al., 2020). A perda da expressão da E-caderina está intimamente relacionada aos cânceres gástricos esporádicos e genéticos, e a mutação do *CDH1* é uma das principais causas dessa perda da expressão (ZHAO et al., 2021). Alta frequência de mutações em múltiplos sítios do *CDH1* é um dos fatores de risco no desenvolvimento do câncer gástrico difuso hereditário (ZHAO et al., 2021).

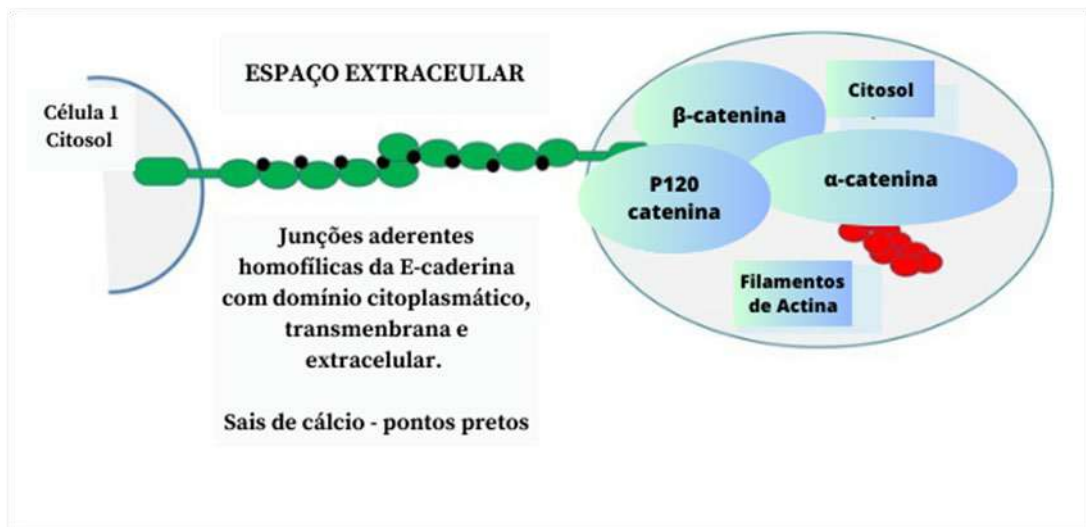
Cerca de 50% a 80% dos cânceres gástricos difusos têm diminuição ou perda da expressão da E-caderina. Os cânceres gástricos difusos com mutação do *CDH1* têm características fenotípicas mais agressivas, com menor grau de diferenciação celular, alto índice de proliferação celular pelo Ki67, metástases linfonodais, mutação do p53 e positividade para o Her-2 (ZHAO et al., 2021). Desta forma, a avaliação dos níveis da proteína E-caderina e das alterações do gene *CDH1* podem oferecer perspectivas promissoras no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer gástrico (ZHAO et al., 2021).

3.1 Estrutura e função do complexo E-Cadherin-catenin (Adherens Junction).

A glicoproteína E-caderina consiste de três domínios estruturais: um domínio transmembrana que liga o domínio citosólico ao domínio extracelular dependente de cálcio, consistindo em cinco repetições em tandem (todos os domínios são representados em cor verde e os pontos em bloco representam íons de cálcio). O domínio extracelular é composto por cinco repetições de caderina e contém quatro sítios de ligação de cálcio, que mediará a função de adesão da E-caderina (SHENOY, 2019).

Liga-se à molécula de caderina homofílica das células adjacentes e essa adesão requer íons de cálcio que atuam em uma dobradiça e impedem que o domínio se flexione e lhe confere rigidez. A cauda citoplasmática da proteína E-caderina interage com os filamentos do citoesqueleto: actina através de um conjunto de proteínas adaptadoras chamadas cateninas (β -catenina, α -catenina e p120 catenina). O domínio intracelular interage com α -, β -catenina and outros membros da família catenina. Esta estrutura fornece a estabilidade e arquitetura celular e também inibe a motilidade celular individual, como mostrado da figura 8 abaixo:

Figura 8: Estrutura e função do complexo E-caderina-catenina (*Adherens Junctions*).



Fonte: Adaptado Shenoy, 2019. – β -catenina

A proteína E-caderina é essencial para vias de sinalização fisiológica, como a: proliferação celular, manutenção da adesão celular, polaridade celular e transição epitélio-

mesenquimal, e sua desregulação leva à proliferação tumoral, invasão, migração e metástase (GALL & FRAMPTON, 2013; MENDONSA & GUMBINER, 2018; SHENOY, 2019).

3.1 E-caderina e tumorigenese

A E-caderina desempenha papel importante na adesão das células epiteliais e a perda de sua função é um dos principais contribuintes para a progressão do câncer (BIRCHMEIER & BEHRENS, 1994, THIERY, 2002, JEANES *et al.*, 2008).

A expressão anormal tem um impacto significativo na interação entre células, levando à destruição do equilíbrio dinâmico dos tecidos epiteliais, tornando mais fácil para as células adquirirem mobilidade e invasividade, tornando os tumores mais propensos à infiltração e a metástase (BRUNER E DERKSEN, 2018; NA *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2021). (ZHAO *et al.*, 2021).

A expressão diminuída de E-caderina tem sido relatada como marca registrada do processo celular denominado transição epitélio-mesenquimal (EMT), na qual a célula perde sua capacidade de adesão célula-célula e polaridade apical, levando a alterações na inibição da perda de contato, alterações na migração celular e nas interações da matriz, resultando em tumorigênese (XING *et al.*, 2013; USHIKU *et al.*, 2016; BERX & VAN ROY, 2009; ZHAO *et al.*, 2021).

Em geral, a função do gene E-caderina pode ser alterada nos níveis genéticos e epigenéticos, porém a expressão reduzida de caderina se dá principalmente por meio de alterações epigenéticas em vários níveis, incluindo metilação do promotor (TAN *et al.*, 2015) e modificações de histonas (SHAH *et al.*, 2014).

3.2 CLDN18–ARHGAP26 e E-CADERINA

O cancer gástrico de tipo difuso é uma neoplasia epitelial maligna pouco diferenciada caracterizada por um padrão morfológico de células pouco coesas, decorrente da interrupção das junções intercelulares e pela falta de moléculas de adesão, o que predispõe ao crescimento tumoral e a invasividade (KIM *et al.*, 2020).

Logo, a perda do sistema de adesão celular resulta na disseminação tumoral, desencadeando o remodelamento do citoesqueleto de actina, levando ao desenvolvimento do fenótipo mesenquimal (KIM *et al.*, 2020). Neste contexto, a E-caderina e Claudina 18, importantes moléculas de adesão celular passam a ter fundamental importância na iniciação da tumorigênese e na sua disseminação. Além disso, estudos *in vitro* (YAO *et al.*, 2015) reportam que linhagens celulares fusão CLDN18–ARHGAP26 positivas mostram propriedades de barreira comprometida, redução da adesividade celular e aumento da invasividade.

Assim, fica claro a necessidade de novos estudos que caracterizem os aspectos de fusão gênica *CLDN18-ARHGAP26* em cânceres gástricos com e sem neoadjuvância, não só molecularmente, mas também através de métodos de detecção de expressão de proteínas (imunohistoquímica) para nortear a avaliação de resposta terapêutica, delinear novas estratégias de tratamento e determinar prognósticos.

4 TRATAMENTO

De acordo com Kumar e colaboradores (2022), a modalidade de tratamento do câncer gástrico depende do estadiamento pré-operatório preciso. O tratamento pode ser por meio de ressecção endoscópica para doença mucosa superficial limitada (< T1b, N0), ressecção cirúrgica inicial com linfadenectomia (< T3, qualquer N), quimioterapia neoadjuvante (> T2) , quimioterapia adjuvante (> T1N1 ou > T3N0). Uso de radioterapia, ou radioterapia combinada com lesões ressecáveis ou terapia sistêmica paliativa para aqueles com doença metastática ou irressecável localmente avançada (T4, qualquer N ou M1) (KUMAR *et al.*, 2022)

4.1 Tratamento neoadjuvante

Na última década, uma abordagem multimodal do GC foi sugerida com a adoção do tratamento neoadjuvante (pré-operatório ou perioperatório). Com base na teoria de que esse tratamento pode reduzir o volume do tumor, melhorar a taxa de ressecção R0 e eliminar micro metástases, a quimioterapia neoadjuvante foi introduzida nas diretrizes nacionais de muitos países (SCHUHMACHER *et al.*, 2010; YCHOU *et al.*, 2011; TONETO & VIOLA, 2018).

A investigação da eficácia e dos possíveis usos da quimioterapia em pacientes com CG avançado deram início no final da década de 1970, mas os primeiros resultados encorajadores foram relatados no início dos anos 90 (PLUKKER *et al.*, 1991).

Atualmente, a quimioterapia neoadjuvante é o tratamento padrão para o GC avançado, e muitos estudos comprovaram que esse método melhora a sobrevida quando comparada com a cirurgia isolada (CASCINU *et al.*, 2004; YCHOU *et al.*, 2011).

A quimioterapia neoadjuvante (NAC) possui riscos e benefícios em comparação com relação a quimioterapia pós-operatória, como descrito na tabela 1 a seguir:

Tabela 1 - Benefícios e riscos da quimioterapia neoadjuvante.

VANTAGENS	POSSÍVEIS DESVANTAGENS
Melhor liberação da droga no tumor e tecidos vizinhos através da circulação sanguínea e linfática intacta	Ausência de resposta ao tratamento
Redução das dimensões do tumor permitindo aumento da possibilidade de ressecção completa R0	Atraso na Cirurgia definitiva
Tratamento precoce de micrometástases sistêmicas	Piora do estado geral de desempenho
Diminuição da contaminação da cavidade peritoneal (efeito de “esterilização tumoral” das células neoplásicas)	Reação fibrótica peritumoral relacionada à quimioterapia
Avaliação da quimiossensibilidade para quimioterapia adjuvante	Aumento das complicações devido à toxicidade do tratamento
Melhor tolerabilidade do que quimioterapia pós-operatória	Progressão da doença (leva a doença inoperável)

Fonte: Toneto &Viola, 2018.

Diante do exposto, este estudo se justifica pela necessidade de novos estudos que caracterizem os aspectos de fusão gênica *CLDN18-ARHGAP26* em cânceres gástricos com e sem neoadjuvância, para avaliação de resposta terapêutica, delineamento de novas estratégias de tratamento e sua correlação com a expressão imuno-histoquímica das proteínas E-caderina, claudina 18 e ARHGAP26, que possam ser utilizados nos métodos de rotina diagnóstica

histopatológica indicando alterações que permitam identificar pacientes para uma avaliação molecular complementar.

5 OBJETIVO GERAL

Correlacionar a taxa de fusão CLDN18-ARHGAP26 no Adenocarcinoma gástrico à resposta ao tratamento neoadjuvante associado a expressão imuno-histoquímica das proteínas ARHGAP26, Claudina-18, e E-caderina e aos aspectos clínico-patológicos.

6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Correlacionar a taxa de fusão gênica CLDN18-ARHGAP26 em adenocarcinomas gástricos com resposta à neoadjuvância prévia em análise comparativa com adenocarcinomas gástricos sem tratamento prévio;

Correlacionar os achados da fusão gênica à expressão imuno-histoquímica das proteínas ARHGAP26, Claudina-18 e E-caderina com os dados clínico-patológicos, sobrevida global e livre de doença e estadiamento patológico.

7 HIPÓTESE

O tratamento quimioterápico neoadjuvante reduz a taxa da fusão gênica CLDN18-ARHGAP26 no Adenocarcinoma gástrico, assim como altera a expressão imuno-histoquímica das proteínas Claudina-18, ARHGAP-26 e E-caderina, com repercussão nos aspectos clínico-patológicos e melhora da sobrevida global e livre de doença.

8 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), Processo HCRP N°. 10295/2018 (ANEXO A).

8.1 Delineamento do estudo

Este é um estudo caso-controle, retrospectivo e longitudinal, baseado na análise da taxa de fusão gênica CLDN18-ARHGAP26 realizada através de estudo molecular em correlação à estudo imuno-histoquímico para a avaliação da expressão das proteínas Claudina 18, ARHGAP26 e E-caderina em amostras de adenocarcinoma gástrico com e sem neoadjuvância, provenientes de peças cirúrgicas de gastrectomia total ou subtotal.

9 Casuística

9.1 Descrição da população a ser estudada

Foram selecionadas setenta e oito amostras congeladas de adenocarcinomas gástricos. Trinta e nove casos corresponderam a amostras de adenocarcinomas com tratamento neoadjuvante (pré-cirúrgico) e os demais com tratamento cirúrgico e adjuvância posterior. As amostras foram conservadas e armazenadas no Biorrepositório do Serviço de Cirurgia e Endoscopia Digestiva do HCFMRP-USP, sob supervisão do Prof. Dr. José Sebastião dos Santos, com diagnóstico histopatológico prévio, com seus respectivos blocos de parafina e lâminas arquivados no Serviço de Patologia (SERPAT) do HCFMRP-USP, referentes ao período de 2008 a 2017.

9.2 Critérios de inclusão

Foram incluídos CG com e sem tratamento neoadjuvante, de padrões histológicos intestinal, difuso e misto, de acordo a classificação de Lauren, provenientes de gastrectomia subtotal e total; que infiltraram a parede gástrica a partir da muscular da mucosa, camada

muscular própria podendo estender-se à serosa e órgãos adjacentes, compreendendo os estádios clínicos I, IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC e IV segundo os critérios de estadiamento patológico e grupos prognósticos preconizados pela UICC (UNION FOR INTERNATIONAL CANCER CONTROL, 2017);(SUNAKAWA & LENZ, 2015) submetidos à cirurgia no HCFMRP-USP no período de 2008 a 2017.

9.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes que evoluíram a óbito nos primeiros trinta dias do pós-operatório.

Foram excluídos os casos cujos blocos de parafina disponíveis não tivessem representação neoplásica adequada.

Foram excluídos amostras com ausência de tumor após análise microscópica em cortes de congelação avaliada pelo Patologista.

Foram excluídos adenocarcinomas que tivessem sido considerados, de acordo com o laudo anatomopatológico, oriundos do esôfago com extensão ao estômago.

10 Revisão histopatológica

Foi realizada revisão histológica e todos os casos revisados foram classificados de acordo com a classificação de Lauren (1965) em tipos intestinal, difuso e misto (LAURÉN, 1965; LAUWERS *et al.*, 2010).

O estadiamento patológico foi realizado de acordo com a 8ª edição da classificação TNM da UICC (GOSPODAROWICZ *et al.*, 2017), com o sistema de classificação T (tumor primário) N (linfonodos regionais) M (metástases à distância); avaliação dos grupos prognósticos sem e com neoadjuvância (UICC (UNION FOR INTERNATIONAL CANCER CONTROL, 2017);(SUNAKAWA & LENZ 2015; Manual de Laudos Histopatológicos – Sociedade Brasileira de Patologia, 2019), são descritos abaixo:

Tabela 2: Estadiamento patológico pTNM.

<p><i>T – Tumor primário</i></p> <p>pTx – Não disponível</p> <p>pT0 – Sem evidência de tumor primário</p> <p>pTis – Carcinoma in situ (incluindo displasia de alto grau): neoplasia intraepitelial sem invasão da lâmina própria</p> <p>pT1 – O tumor invade a lâmina própria, a muscular da mucosa ou submucosa</p> <p>pT1a – O tumor invade a lâmina própria ou muscular da mucosa</p> <p>pT1b – O tumor invade a submucosa</p>
<p>pT2 – O tumor invade a camada muscular própria</p>
<p>pT3 – O tumor penetra o tecido conectivo subseroso, sem invasão do peritônio visceral ou estruturas adjacentes</p>
<p>pT4 – O tumor invade a serosa (peritônio visceral) ou estruturas adjacentes</p> <p>pT4a – O tumor invade a serosa (peritônio visceral)</p> <p>pT4b – O tumor invade estruturas adjacentes</p>

Fonte: AJCC 8th Edition, Manual de Laudos Histopatológicos – Sociedade Brasileira de Patologia, 2019.

<p><i>N – Linfonodos regionais</i></p> <p>pNx – Não disponíveis</p> <p>pN0 – Metástase linfonodal não identificada</p> <p>pN1 – Metástases em 1 ou 2 linfonodos perigástricos</p> <p>pN2 – Metástases em 3 a 6 linfonodos (peritônio visceral)</p> <p>pN3 – Metástases em mais de 6 linfonodos</p> <p>pN3a – Metástases em 7 a 15 linfonodos regionais</p> <p>pN3b – Metástases em mais de 15 linfonodos regionais</p>
--

<p><i>M – Metástase a distância</i></p> <p>M0 – Não identificada</p> <p>M1 – Presente</p>

Grupos prognósticos do Câncer gástrico:

Tabela 3: Grupos prognósticos do Câncer gástrico.

Grupo	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
IIIA	T4a	N0	M0
	T4b	N0	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3a	M0
IIIB	T4b	N1 ou N2	M0
	T4a	N3a	M0
	T3	N3a	M0
	T1 ou T2	N3b	M0
IIIC	T4b	N3a ou N3b	M0
	T4a	N3b	M0
	T3	N3b	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Manual de Laudos Histopatológicos – Sociedade Brasileira de Patologia, 2019.

Tabela 4: Grupos prognósticos do câncer gástrico pós-neoadjuvância (ypTNM)

Grupo	T	N	M
I	T1 ou T2	N0	M0
	T1	N1	M0
II	T1	N2 ou N3	M0
	T2	N1 ou N2	M0
	T3	N0 ou N1	M0
	T4a	N0	M0
III	T2	N3	M0
	T3	N2 ou N3	M0
	T4a	N1 à N3	M0
	T4b	Qualquer N	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Manual de Laudos Histopatológicos – Sociedade Brasileira de Patologia, 2019.

10.1 Efeitos do tratamento neoadjuvante

A resposta patológica de regressão tumoral à terapia neoadjuvante é apontada como importante fator prognóstico. Para sua avaliação, utilizamos as recomendações propostas pelo The

American Joint Committee on Cancer/College of American Pathologists (AJCC/CAP), que demonstrou boa reprodutibilidade interobservador e encontra-se discriminada na tabela abaixo:

Tabela 5: Graduação patológica de regressão tumoral (RYAN *et al.*,2005).

Escore 0	resposta completa – ausência de células neoplásicas viáveis
Escore 1	resposta quase completa – células neoplásicas isoladas ou em pequenos grupos
Escore 2	resposta parcial- neoplasia residual com sinais evidentes de regressão tumoral, porém com mais que células isoladas ou raros pequenos agrupamentos de células neoplásicas
Escore 3	ausência de resposta ou resposta pobre- extenso tumor residual sem evidências de evidente regressão tumoral.

Fonte: Ryan *et al.*, 2005; <https://documents.cap.org/documents/Stomach>.

As evidências histológicas de regressão tumoral incluíram: necrose, fibrose, calcificação, depósitos de hemossiderina, histiócitos xantomatosos, erosões e úlceras. Lagos acelulares de mucina não foram considerados neoplasia residual., conforme preconizado pelo AJCC/CAP, 2018.

11 Análise de prontuários

Foram obtidas as seguintes informações a partir da análise dos prontuários dos pacientes: sexo; idade, local da lesão; presença de metástase; tratamento adjuvante; tratamento neoadjuvante; ocorrência de recidiva; sobrevida global a partir da cirurgia; sobrevida livre de doença , estadiamento patológico e óbitos.

A sobrevida global de cada um dos pacientes foi calculada como a diferença entre a data que o paciente fez a cirurgia e a data quando o paciente foi a óbito. Quando o paciente perdeu o

seguimento clínico, foi calculada a diferença entre a data que o paciente fez a cirurgia e a data do último dia de seguimento clínico.

A sobrevida livre de doença foi calculada como a diferença entre a data que o paciente fez a cirurgia e a data do diagnóstico da recidiva.

Dezesseis pacientes com metástase e/ou comprometimento de órgãos adjacentes na cirurgia, foram excluídos das análises de sobrevida, considerando-se que o tratamento cirúrgico não foi curativo.

11.1 Drogas utilizadas na neoadjuvância

- 5-fluorouracil (5-FU)
- Capecitabina – cepecit
- Leucovorin – leuco
- Epirubicina- epirrubi
- Cisplatina – cisplat
- RTX – Radioterapia
- QTX – Quimioterapia

11.2 Esquemas de tratamentos neoadjuvantes:

- ECX - epirubicina, cisplatina e capecitabina
- EOX - epirubicina, oxaliplatina e capecitabina.

12 METODOLOGIA

12.1 Confeção dos TMAs

Para composição dos microarranjos teciduais (*tissue microarrays*, TMAs) foram confeccionados blocos de parafina, retirando-se amostras tumorais dos blocos de parafina doadores com agulhas de 2mm de calibre. Foram obtidas duas amostras representativas da neoplasia no fronte de invasão, em duas áreas diferentes considerando-se a heterogeneidade intrínseca tumoral

12.2 Imuno-histoquímica

Os TMAs, foram submetidos a microtomia utilizando-se cortes de 4µm de espessura, que foram estendidos em lâminas silanizadas. Realizou-se a desparafinização das lâminas com banhos sucessivos de xilol e álcool, e a recuperação antigênica com os tampões especificados na tabela abaixo (TABELA 1). Após a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas com os anticorpos anti-claudina 18; anti-ARHGAP26 e anti-E-caderina CDH1, em temperatura ambiente overnight. Foi usado o kit de detecção livre de biotina Reveal (Biogen). Os cortes foram incubados com solução de diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. Foram contra corados com hematoxilina de Harris e montados com lamínulas com Entellan (Merck).

Tabela 6: Anticorpos utilizados para as reações imuno-histoquímicas

Anticorpo	Fabricante	Código	Tipo	Recuperação antigênica	Diluição
CLAUDIN-18	Invitrogen	38-8000	Policlonal de coelho	CITRATO, pH 6,0	1:300
ARHGAP-26	Atlas antibodies	HPA035107	Policlonal de coelho	EDTA, pH 9,0	1:200
E-CADERINA	Thermo Fisher	HECD-1	Policlonal de coelho	EDTA, pH 8,0	1:1000

12.3 Critérios de avaliação da imuno-histoquímica

12.3.1 E-caderina

A expressão da proteína e-caderina observada em membrana celular, graduada em três graus (PEREIRA *et al.*, 2021), conforme descrito abaixo:

- Escores 0 e 1 (expressão citoplasmática) - perda completa da expressão;
- Escore 2 - Marcação citoplasmática e de membrana – expressão normal preservada,
- Escore 3 - Marcação de membrana – expressão normal preservada.

Para análise estatística os casos escore 2 e 3 foram considerados como expressão preservada.

12.3.2 Claudina 18:

A imunomarcagem da CLDN-18 foi observada nas células neoplásicas ao nível das membranas lateral e apical das células glandulares e ocasionalmente em toda a circunferência das células infiltrativas (TANAKA *et al.*, 2018).

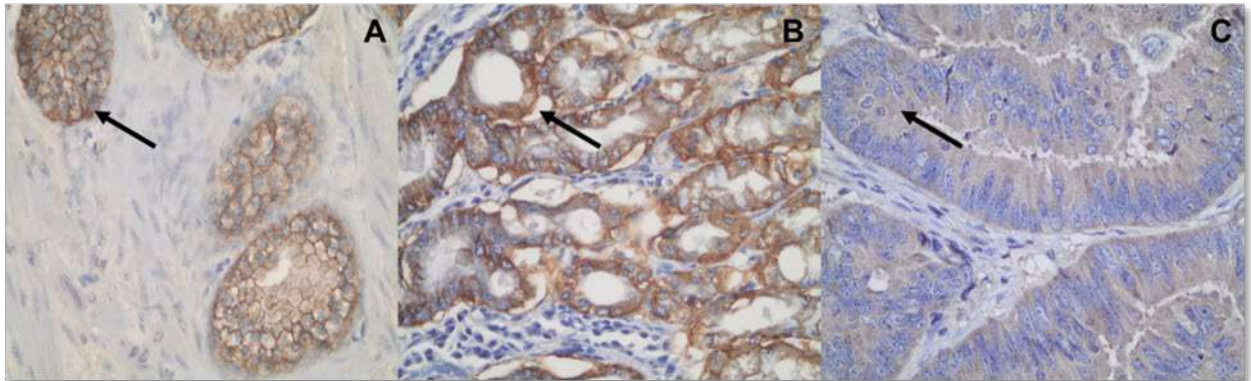
A marcação foi considerada preservada se pelo menos 50% das células neoplásicas estavam marcadas. Quando menos de 50% das células neoplásicas estavam marcadas, a imunexpressão foi considerada reduzida e quando não detectada a marcação foi denominada como ausência de expressão (JUN *et al.*, 2014).

12.3.3 ARHGAP26

A análise da expressão imuno-histoquímica do ARHGAP26 será feita de maneira qualitativa: presente e ausente. Normalmente, observa-se imuno-marcagem citoplasmática em células normais e células neoplásicas malignas (Tanaka *et al.*, 2018). Também foram consideradas as marcações em membranas.

A figura 9 apresenta os controlos positivos utilizados para as reações.

Figura 9: Fotomicrografias dos controles positivos das reações imuno-histoquímicas: A- E-caderina -Marcação de membrana (seta preta), 400X; B- Claudina 18 - Marcação de membrana (seta preta), 400X; C- ARHGAP 26 - Marcação citoplasmática (seta preta), 400X.



12.4 Microdissecção tumoral

As amostras congeladas de Adenocarcinoma gástrico acondicionadas a -80°C foram submetidas a microtomia em criostato a -30°C , sendo obtidos cortes histológicos de $4\mu\text{m}$, estendidos em lâminas de vidro esmerilhada, que foram coradas pelo método de coloração de Hematoxilina e eosina (H&E).

Foi realizada análise histológica, com circunscrição da área tumoral que foi avaliada em percentual da neoplasia na amostra, sendo elegíveis as amostras que continham uma representação tumoral $\geq 30\%$ da área total do corte histológico.

A seguir, foi realizada a extração tumoral manual das amostras congeladas, mantidas em resfriamento que foram acondicionadas em eppendorf e enviadas para extração de RNA e c-DNA.

12.5 Extração de RNA

Às amostras congeladas foram adicionados $250\mu\text{l}$ de PBS (*phosphate-buffered saline*) e $750\mu\text{l}$ de Trizol® (Invitrogen, EUA). Os fragmentos de tecido foram homogeneizados com a

utilização de um aparelho chamado Politron® e posteriormente transferidos para um tubo *eppendorf* de 1,5 mL. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foram acrescentados 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -20°C por pelo menos 12 horas. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Acrescentou-se, então, 1000µl de etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 15 minutos, a 14.000 rpm. A fase superior foi desprezada e o precipitado seco dissolvido com água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) por pelo menos 15 minutos. Esse material foi, em seguida, identificado e armazenado a -80°C.

Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi, ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA. Também utilizamos um equipamento chamado Thermo Scientific NanoDrop 2000, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2µl. Além da concentração, este aparelho nos forneceu valores de uma razão referentes à integridade das amostras (razão 260/280).

12.6 Síntese de DNA complementar (cDNA) para mRNA

Foi realizada a transcrição reversa utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do gene, a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial (Applied Biosystems) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de acordo com as instruções do fabricante. Para cada 500ng RNA, será adicionado 2,5µl de RT Buffer; seguido de 1,0µl de dNTP's; 2,5µl Random Primers e 1,25µl da enzima MultiScribe™, completando com água DEPC o volume final de 20µl. As amostras foram levadas para um termociclador por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C e resfriadas a 4°C, posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer -20°C. Antes de utilizar o cDNA sintetizado na reação de PCR em tempo real, foi realizada uma diluição 1:10 em água DEPC

12.7 RT-PCR para a fusão *CLDN18-ARHGAP26*

A identificação e avaliação semi-quantitativa da fusão *CLDN18- ARHGAP26* será realizada por RT-PCR como descrito a seguir: A dupla fita de cDNA será sintetizada usando o kit High Capacity cDNA RT (ThermoFisher) de acordo com as instruções do fabricante e 2 mg de RNA total. CLDN18 exon 5/ARHGAP26 exon 12 (Fw1 primer: 5'-TTGGGTCCAACACCAAAAAC-3', Rv1 primer: 5'-TCTGGCTGTCTTTGTTTCGAG-3', produto de 87bp), CLDN18 exon 5/ARHGAP26 exon 10 (Fw1, Rv2 primer: 5'-TGCTTCCACATCAAAGCAAA-3', produto de 146 bp) e CLDN18 exon 5-ARHGAP6 exon 2 (Fw2 primer: 5'- GCCACAGTGTTCCTACAAG-3', Rv3 primer: 5'-CTGACATGCTGTTCCAGGTG-3', produto de 135bp). Os primers para GAPDH forward: 5'-CAACGGATTTGGTCGTATTGG-3', reverse: 5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA-3', produto de 72 bp), serão usados para avaliar a qualidade do cDNA. A temperatura média de anelamento dos primers será inicialmente de 52°C. O gene constitutivo da β -actina será usado como controle interno.

O produto da amplificação avaliado por eletroforese em gel 1,4% de agarose preparada em tampão TEB 1X (sol. estoque 50X: 242 g tris-base; 57,1 mL ácido acético glacial; 100 mL 0,5 M EDTA pH 8,0; para 1 L de solução) revelado com brometo de etídeo, após corrida de eletroforese de 6 volts/cm e visualizados sob luz UV em aparelho Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (BioRAD).

Para validação (controle positivo) das reações da fusão gênica foi realizada RT-PCR utilizando par de primer do gene endógeno GAPDH, tamanho do amplicon para cDNA: 550 pb, temperatura de anelamento: 55°C, conforme especificado abaixo:

Tabela 7: Para validação das reações da fusão gênica.

GAPDH-F	INVITROGEN	TTAGCACCCCTGGCCAAGG
GAPDH-R	INVITROGEN	TTACTCCTTGGAGGCCATG

13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas, os pacientes foram organizados em dois grupos conforme a aplicação ou não de tratamento neoadjuvante, cada um dos grupos estava formado por 39 pacientes.

Foram aplicados o teste T, os testes Qui Quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher, considerando um nível de significância de 0.05.

As análises estatísticas foram realizadas usando o software SPSS (*Statistical Package for the Social Science*).

14 RESULTADOS

14.1 Características gerais da população

A população geral por 78 pacientes, sendo 29.5% (N= 23) pertencentes ao sexo feminino e 70.5% (N = 55) ao sexo masculino. No grupo de pacientes do sexo feminino, a idade media foi de 60.17 ± 14.14 anos, com variação de 22 anos a 79 anos. No grupo de pacientes do sexo masculino, a idade media foi de 61.36 ± 11.59 anos, com variação de 42 anos a 88 anos.

O tempo médio de sobrevida global foi de 1497.10 ± 1234.01 dias, a grande maioria deles com uma sobrevida global de 2591 dias. O menor tempo de sobrevida global foi de 15 dias e o maior de 4202 dias. 25% dos tempos de sobrevida global foram menores ou iguais do que 356 dias e maiores que 2546 dias.

O tempo médio de sobrevida livre de doença dos pacientes foi de 1435.18 ± 1243.82 dias, a maioria deles com uma sobrevida livre da doença de 2591 dias. O menor tempo de sobrevida livre de doença foi de 15 dias e o maior foi de 4202 dias. 25% dos tempos de sobrevida livre de doença foram menores ou iguais do que 339 dias e maiores do que 2591 dias, conforme discriminado na tabela 8.

Tabela 8. Estatística descritiva das variáveis: Idade do paciente no dia da cirurgia, sobrevida global (dias) e sobrevida livre de doença (dias).

	Idade do paciente no dia da Cirurgia	Sobrevida global (dias)	Sobrevida livre de doença (dias)
Média	61.01	1497.10	1435.18
Mediana	60.00	1238.00	743.00
Moda	57 ^a	2591	2591
Desvio padrão	12.320	1234.011	1243.825
Mínima	22	15	15
Máxima	88	4202	4202
Percentis	54.00	356.25	339.00
5			
	71.25	2546.00	2591.00
5			

Na tabela 8 observa-se que os tempos de sobrevida (global e livre da doença) tiveram valores similares ou iguais em algumas de suas medidas descritivas. Nota-se ainda que a diferença entre o valor da média nos tempos foi de aproximadamente 63 dias. Ambos grupos tiveram três medidas descritivas iguais, o tempo de sobrevida mais frequente (2591 dias), o tempo menor de sobrevida dos pacientes em ambos grupos (15 dias) e o maior tempo de sobrevida em ambos grupos (4202 dias).

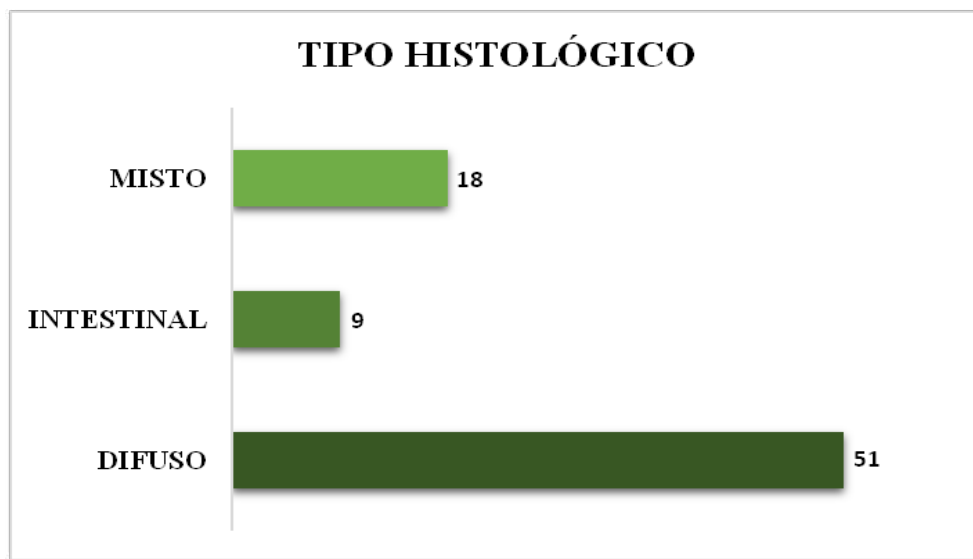
O desvio padrão é alto nos valores de ambos tempos de sobrevida, isto devido à heterogeneidade nos tempos decorridos desde que o paciente fez a cirurgia. Dentro de cada grupo observamos pacientes com valores de sobrevida menores do que um mês e pacientes com valores de sobrevida de 4202 dias.

14.2 Características histopatológicas e tratamentos quimioterápicos

Foram avaliados 78 casos de adenocarcinoma gástrico classificados como difuso, misto e intestinal segundo a classificação de Laurén, conforme discriminados no gráfico 1.

O gráfico 1 mostra a distribuição dos tipos histológicos na população de estudo:

Gráfico 1: Distribuição dos tipos histológicos na população de estudo.



A população de estudo foi subdividida em dois grupos (N= 39) de acordo com o tipo do tratamento quimioterápico administrado, com e sem neoadjuvância denominados neoadjuvantes e adjuvantes para melhor apresentação dos achados e correlação com dados clínico-patológicos, estadiamento patológico e clínico.

Tabela 9: Características histopatológicas da população de estudo baseadas no tipo tumoral e suas relações com estadiamento patológico pT (tumor), pN (metástases linfonodais locorregionais), estágio clínico e tratamentos adjuvante e neoadjuvante.

	Difusos	Intestinais	Mistos	Adjuvante (PC)**	Neoadjuvante (Pré-C)***
Características clinicopatológicas na população total e por tipo histológico. Total	51 (65,38%)	9 (11,53%)	18 (23,07%)	39 (50%)	39 (50%)
pT					
pT1	6 (7,69%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,28%)	5 (6,41%)
pT2	8 (10,25%)	1 (1,28%)	9 (11,53%)	5 (6,41%)	11 (14,10%)
pT3	14 (17,94%)	5 (6,41%)	6 (7,69%)	12 (15,38%)	13 (16,66%)
pT4	19 (24,35%)	6 (7,69%)	5 (6,41%)	21 (26,92%)	10 (12,82%)
Metástase linfonodal*	37 (47,43%)	5 (6,41%)	8 (10,25%)	30 (38,46%)	20 (25,64%)
Estádio I/II	22 (28,20%)	4 (5,12%)	9 (11,53%)	13 (16,66%)	26 (33,33%)
III/IV	29 (37,01%)	5 (6,41%)	9 (11,53%)	26 (33,33%)	13 (16,66%)

*Ausência de metástases linfonodais locorreionais em 27 casos. ** PC – pós-cirúrgico. *** Pré-C- pré-cirúrgico

Observamos na tabela acima que os casos de tipo histológico difuso catalogados segundo o sistema de classificação pTNM (AJCC, 8ª edição), foram classificadas principalmente como pT4 (N=19), que tem como característica a infiltração neoplásica de toda a espessura da parede gástrica atingindo a serosa (peritônio visceral) catalogados como pT4a e se invadir órgãos adjacentes como pT4b.

Nos casos de tipos intestinais notamos leve predomínio de pT4 (N=6), seguidos pelos pT3 (N=0%) que representam as neoplasias que invadem o tecido conectivo subseroso sem atingir o peritônio visceral ou órgãos adjacentes.

As neoplasias gástricas classificadas como pT3 e pT4 são consideradas como tumores avançados.

Em relação aos casos de tipo misto houve um predomínio de tumores classificados como pT2 (N=9), caracterizados pela infiltração neoplásica atingindo até a camada muscular própria gástrica.

A análise dos casos baseados nos tipos de tratamentos mostra predomínio de tumores gástricos pT4 (N=21) no adjuvante e pT3 (N=13) nos neoadjuvantes.

Em relação a metástases linfonodais locorreionais observamos um percentual maior de casos (47,43%) nos tumores difusos e nos casos com tratamento adjuvante (38,46%).

Ao analisarmos o estágio clínico notamos que o grupo dos CG difusos apresentaram estágio clínico mais avançado (III/IV). Em relação ao grupo com neoadjuvância notamos predomínio de estágio clínico (I/II) com menor comprometimento linfonodal.

Importante ressaltar que todos os pacientes do tratamento neoadjuvante (N=39) receberam o mesmo esquema terapêutico ECX (epirrubicina, cisplatina, capecitabina).

Os 39 pacientes que receberam tratamento adjuvante foram tratados com diferentes combinações de drogas, alguns com radioterapia associada, conforme discriminado na tabela 10.

Tabela 10: Esquemas terapêuticos do tratamento neoadjuvante.

capecitabina
capecitabina e Radioterpia
capecitabina, cisplatina, docetaxel
capecitabina, cisplatina, docetaxel, irinotecano
capecitabina, cisplatina, docetaxel, radioterapia
capecitabina, cisplatina, paclitaxel
capecitabina, oxaliplatina (paliativa)
epirrubicina, cisplatina, capecitabina
epirrubicina, cisplatina, capecitabina
epirrubicina, cisplatina, capecitabina, radioterapia
FLOX (fluorouracil, leucovorin, oxaliplatina)
fluorouracil, leucovorin
fluorouracil, leucovorin, oxaliplatina
fluorouracil, leucovorin, radioterapia
MacDonald (fluorouracil, leucovorin, radioterapia)
MacDonald, OXA + capecitabina
oxaliplatina, capecitabina
quimioterapia
quimioterapia + radioterapia
quimioterapia
quimioterapia paliativa
quimioterapia + radioterapia

O grupo que recebeu tratamento quimioterápico neoadjuvante, estava formado por pacientes com uma idade média de 59.74 ± 11.021 anos, de ambos sexos, 38.46% (N = 15) do sexo feminino e 61.53% (N = 24) do sexo masculino.

O grupo adjuvante (pós-cirúrgico), estava formado por pacientes com uma idade média de 68.28 ± 13.52 anos, de ambos sexos, 20.5% (N = 8) do sexo feminino e 79.48% (N = 31) do sexo masculino.

A tabela 11 apresenta as frequências dos pacientes de acordo com sexo, características histopatológicas e o tipo de tratamento.

Tabela 11. Distribuição de frequências do Tipo histológico, Grau Histológico conforme o tipo de tratamento e o Sexo do Paciente.

Sexo do Paciente	Tratamento	Grau Histológico	Tipo histológico			Total
			Difuso	Intestinal	Misto	
Feminino	Adjuvante	2	0	1	1	2
		3	6	0	0	6
	Neoadjuvante	2	1		0	1
		3	11		3	14
Masculino	Adjuvante	1	0	1	0	1
		2	0	5	1	6
		3	20	1	3	24
	Neoadjuvante	2	0	1	3	4
3		13	0	7	20	

Como detalhado na tabela acima, no grupo de pacientes do sexo feminino que recebeu tratamento adjuvante constitui-se por:

Gráfico 2: Distribuição de frequências do tipo e grau histológico do sexo feminino.

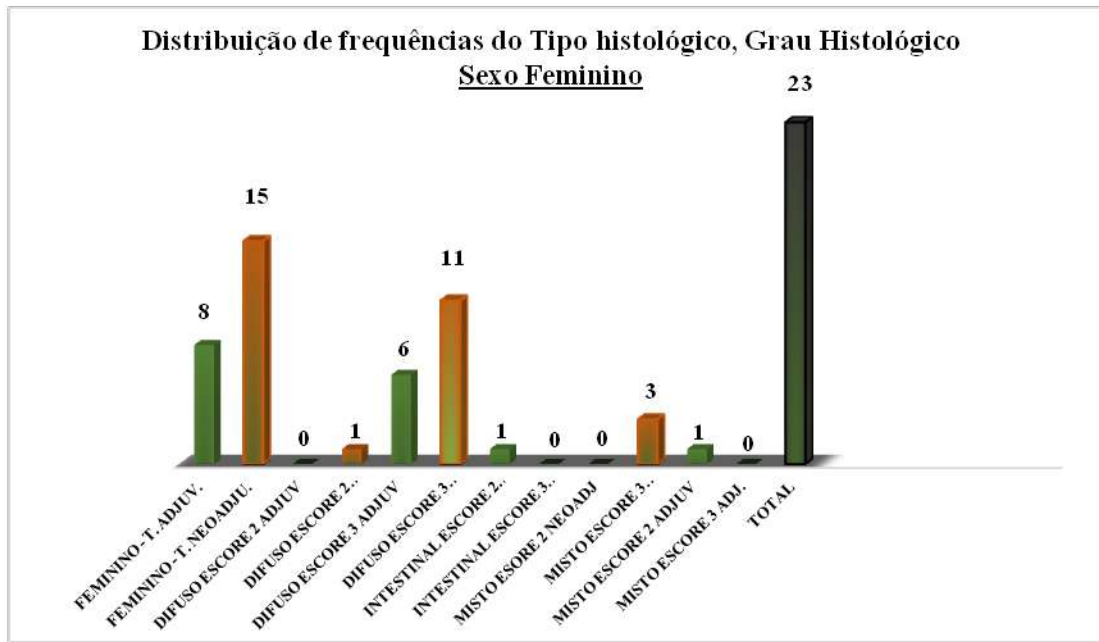
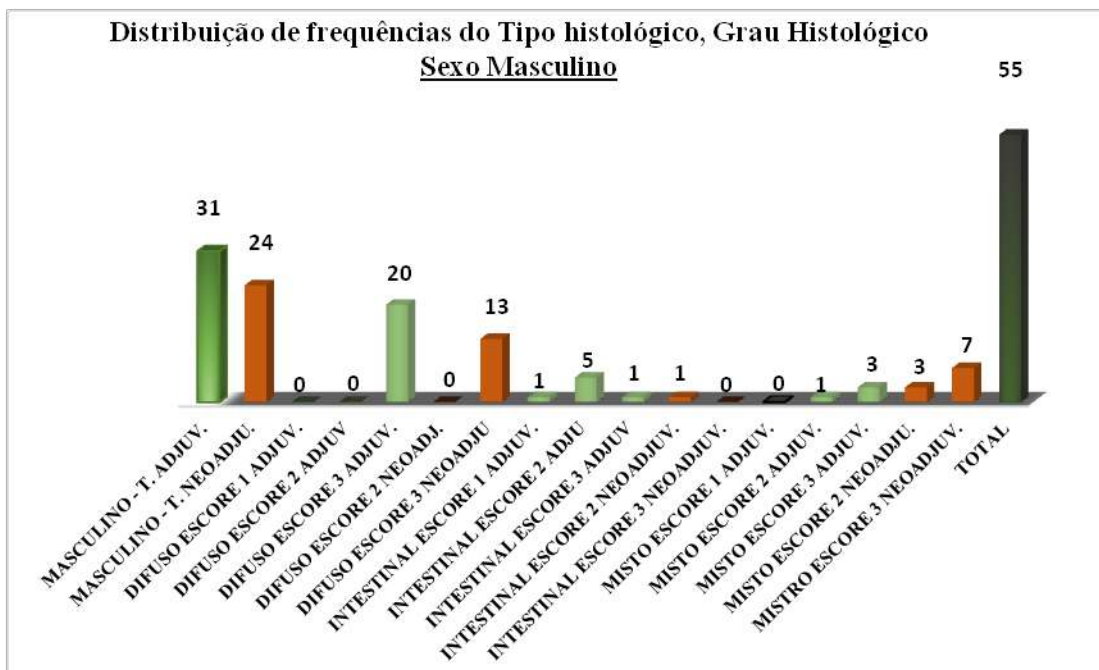


Gráfico 3: Distribuição de frequências do tipo e grau histológico do masculino.



Os gráficos 4, 5 e 6 mostram a frequência dos tipos histológicos (difuso, misto e intestinal) baseados nos tipos de tratamento.

Gráfico 4: Distribuição dos tipos de tratamento para o tipo histológico difuso.

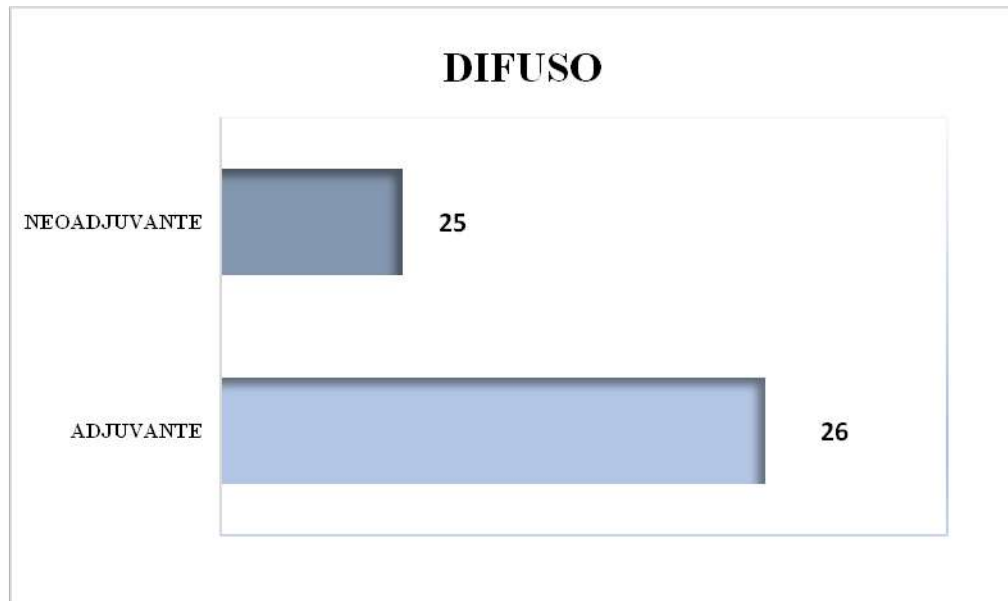


Gráfico 5: Distribuição dos tipos de tratamento para o tipo histológico misto:

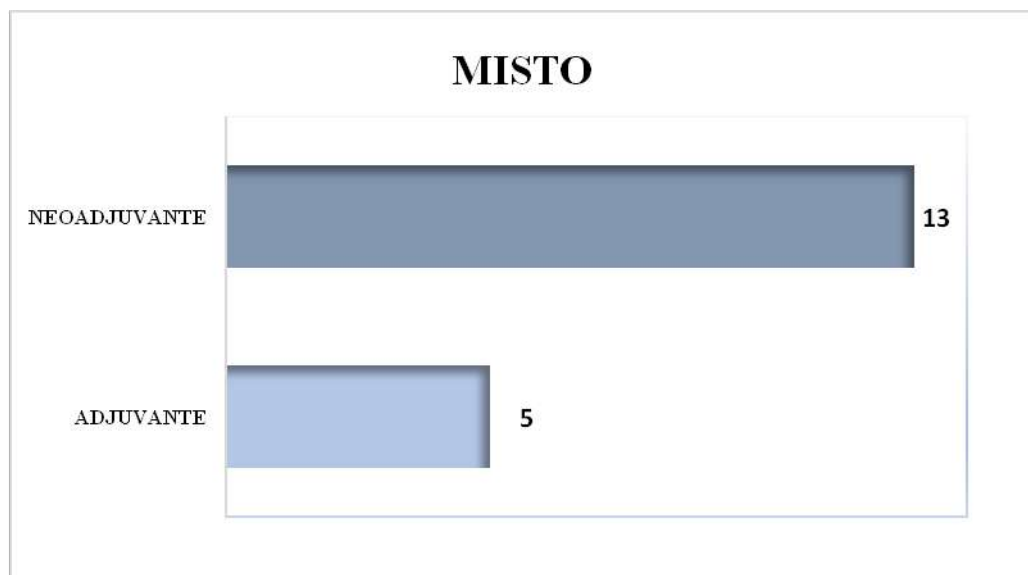
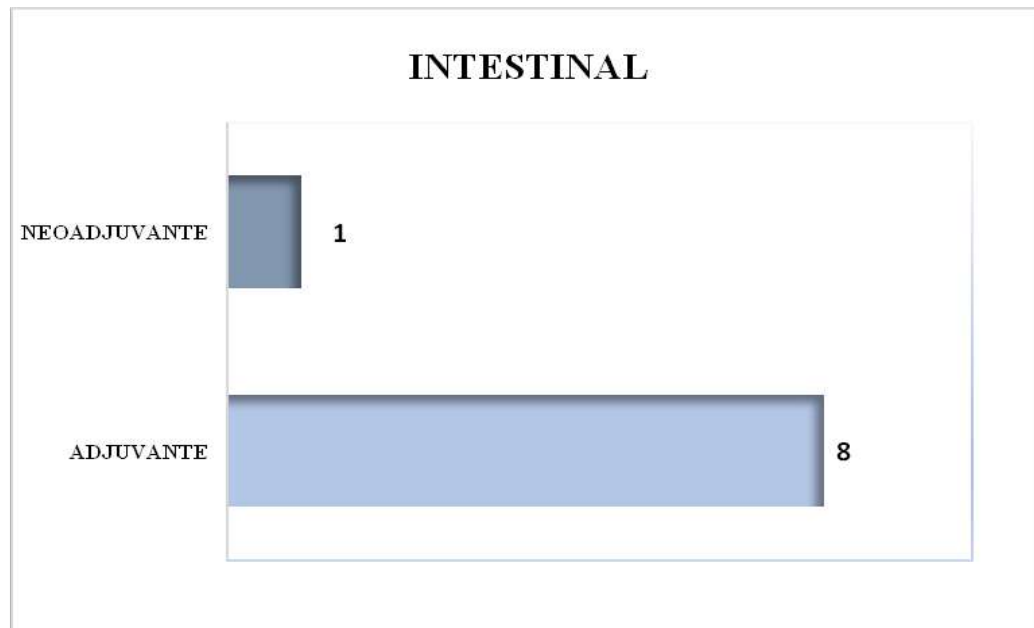


Gráfico 6: Distribuição dos tipos de tratamento para o tipo histológico intestinal:



A Tabela 12 apresenta a distribuição de frequências dos pacientes que tiveram a lesão em um único local (antro, cárdia, corpo ou piloro), o estágio clínico da lesão e o tratamento que recebeu o paciente (adjuvante ou neoadjuvante).

Tabela 12: Distribuição de frequências do tipo de tratamento de acordo ao local da lesão e estágio clínico.

Local da Lesão			Tratamento		Total
			Adjuvante	Neoadjuvante	
Antro	Estádio Clínico	I	0	4	4
		IB	3	0	3
		II	0	5	5
		IIA	1	1	2
		III	0	5	5
		IIIA	3	0	3
		IIIB	2	0	2
		IIIC	2	0	2
Cárdia	Estádio Clínico	I	0	1	1
		II	0	1	1
		III	0	3	3
		IIIB	1	0	1
Corpo	Estádio Clínico	I	0	4	4
		II	0	1	1
		IIA	3	0	3
		IIB	1	0	1
		III	0	6	6
		IIIA	2	0	2
		IIIB	1	0	1
		IIIC	1	0	1
Píloro	Estádio Clínico	I	0	1	1
		IIIB	1	0	1

Na tabela acima observa-se que do total de pacientes que apresentaram lesão em um único local do estômago, 56.41% (N = 22) receberam tratamento adjuvante e 82.05% (N=32) receberam tratamento neoadjuvante. Como ilustrado nos graficos 7, 8, 9 e 10 a seguir:

Gráfico 7: Estádio clínico – local da lesão: Antro - Tratamento adjuvante

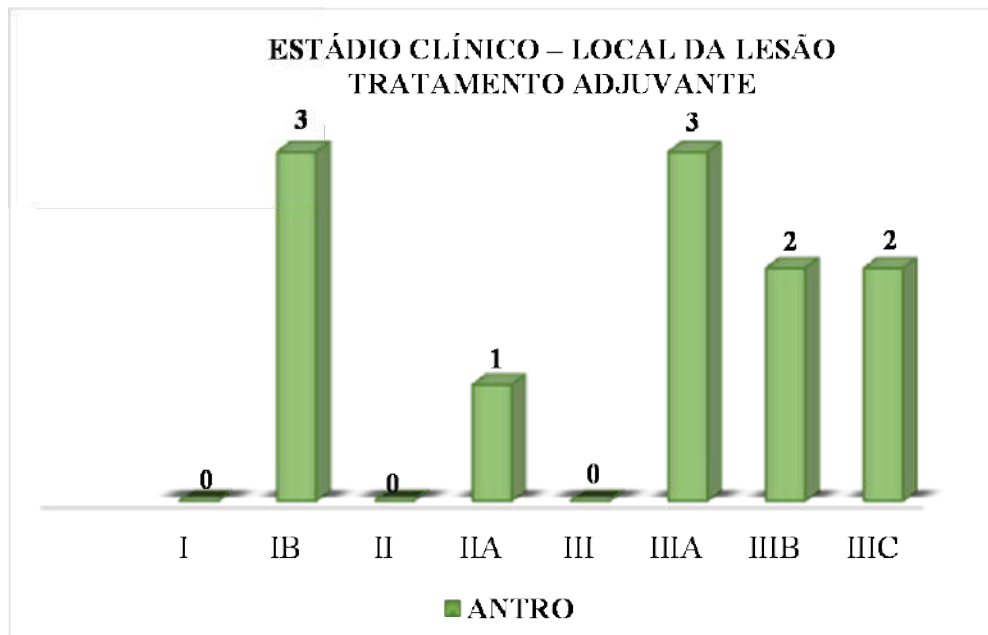


Gráfico 8: Estádio clínico – local da lesão: Antro - Tratamento neoadjuvante

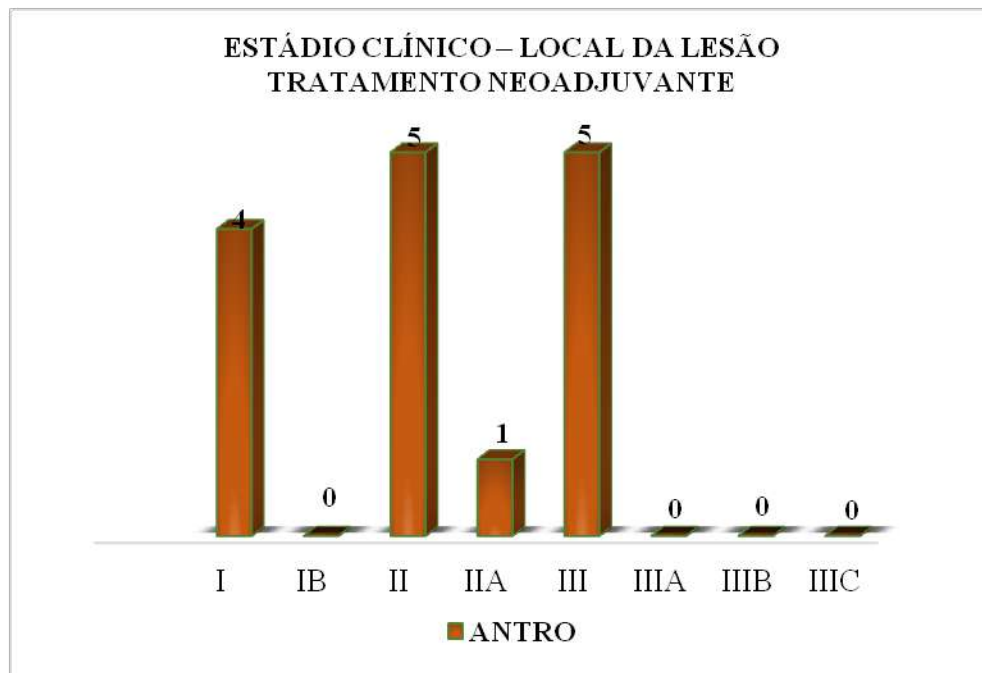


Gráfico 9: Estádio clínico – local da lesão: Corpo - Tratamento adjuvante

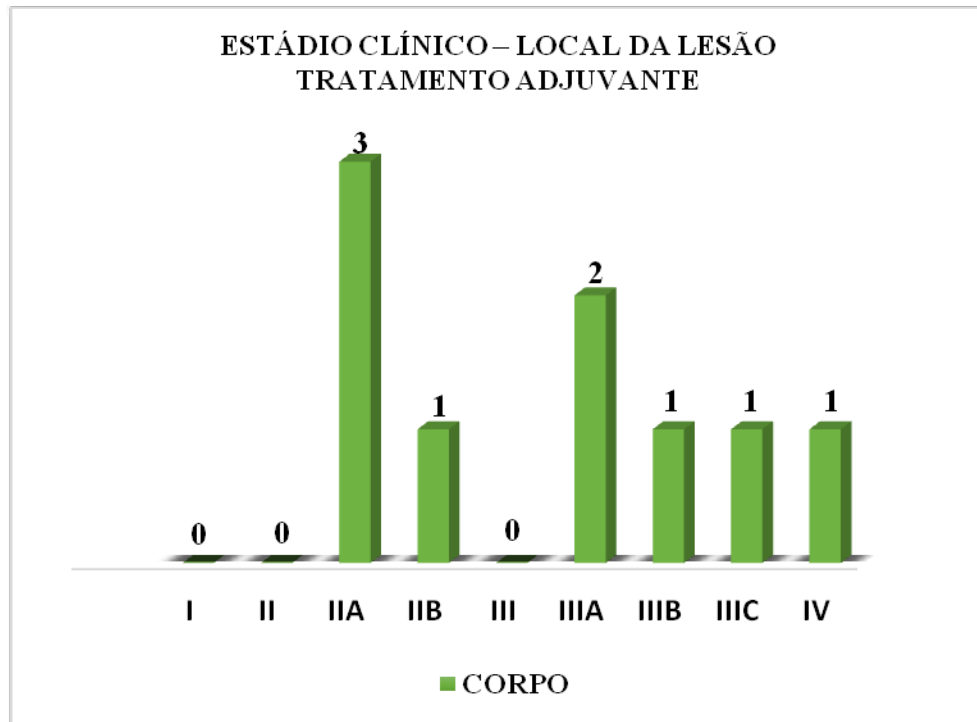


Gráfico 10: Estádio clínico – local da lesão: Corpo - Tratamento neoadjuvante

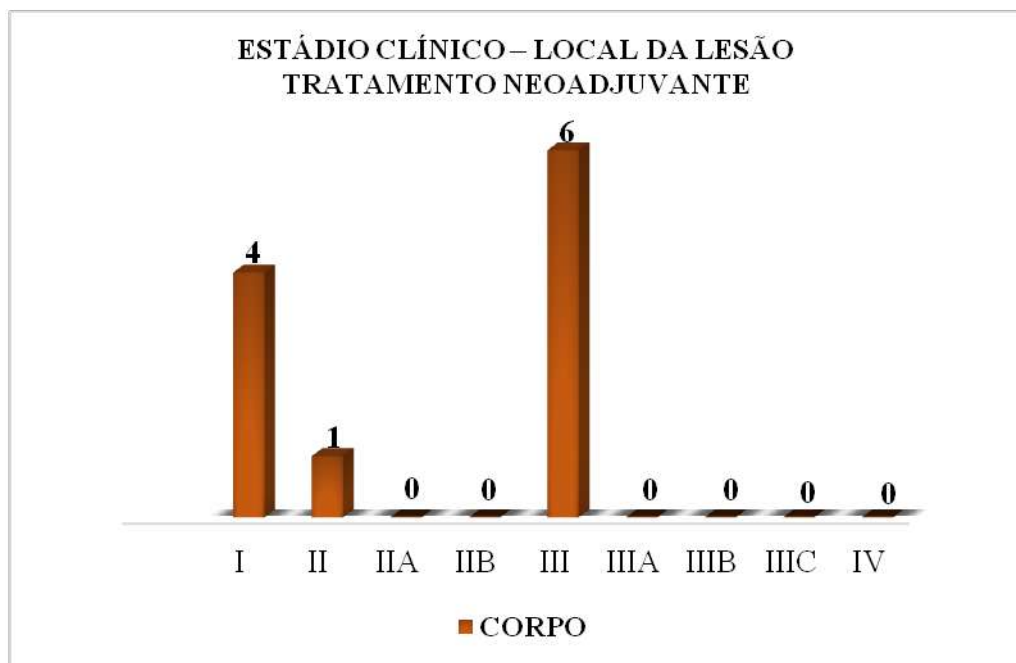


Tabela 13: Distribuição de frequências dos pacientes de acordo ao grau histológico, o estágio clínico e o grau de regressão tumoral pós-neoadjuvância.

Grau Histológico		Grau De Regressão Tumoral Pós Neoadjuvancia			Total	
		Resposta Quase Completa	Resposta Parcial	Ausência de Resposta ou Resposta Pobre		
2	Estádio Clínico	I		0	1	
		IIA		0	1	
		III		1	2	3
3	Estádio Clínico	I	1	4	5	10
		II	2	2	6	10
		III	1	3	9	13
		IIIC	0	0	1	1

Na tabela 13 observa-se que dentre os 39 pacientes da amostra que receberam tratamento neoadjuvante:

Gráfico 11: Grau de regressão tumoral pós Neoadjuvancia. GH – grau histológico. Gráfico A

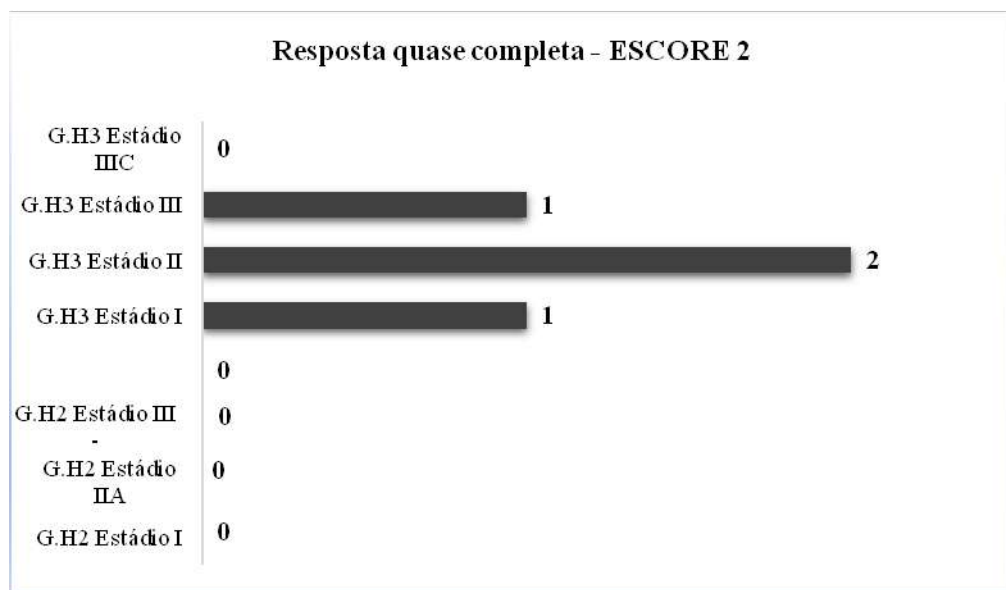


Gráfico 12: Grau de regressão tumoral pós Neoadjuvancia. GH – grau histológico. Gráfico B:

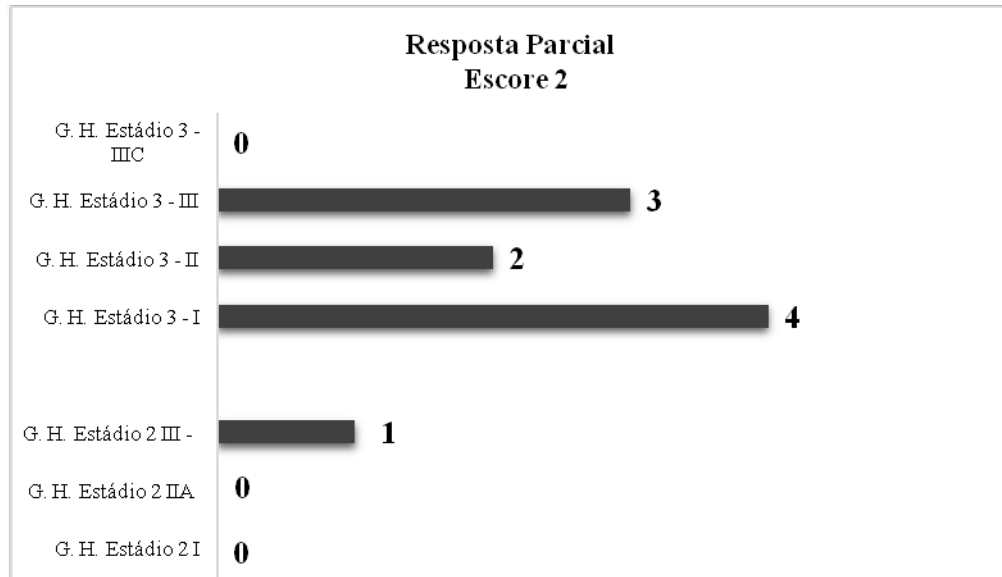
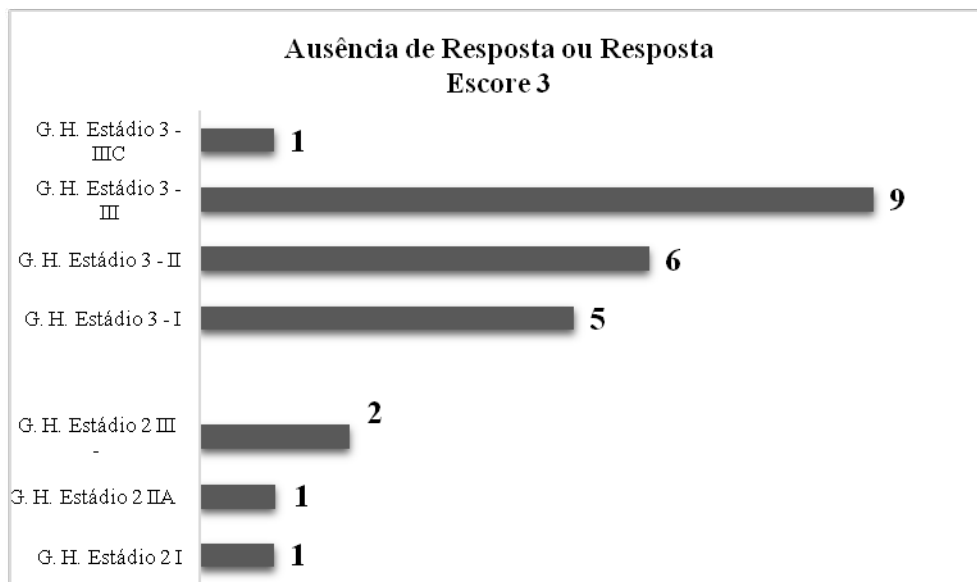


Gráfico 13: Grau de regressão tumoral pós Neoadjuvancia. GH – grau histológico. Gráfico C:



Na tabela 14 se apresenta a média e o desvio padrão dos tempos de sobrevida nos grupos de resposta ao tratamento neoadjuvante.

Tabela 14: Média e o desvio padrão dos tempos de sobrevida nos grupos de resposta ao tratamento neoadjuvante segundo protocolo de graduação patológica de regressão tumoral (RYAN *et al.* 2005, modificado).

		Média	Desvio padrão
Sobrevida global do paciente (dias)	Resposta Quase Completa	1437.33	1.437.622
	Resposta Parcial	1740.67	1.152.735
	Ausência de Resposta ou Resposta Pobre	2141.00	1.082.334
Sobrevida livre de doença (dias)	Resposta Quase Completa	1397.33	1.451.468
	Resposta Parcial	1659.67	1.131.840
	Ausência de Resposta ou Resposta Pobre	2008.15	1.194.003

Em cada um dos grupos de pacientes observando-se os seguintes aspectos:

- A média de sobrevida global dos pacientes que tiveram resposta quase completa (escore 1) foi de 1437.33 ± 1437.622 , os que tiveram resposta parcial (escore 2) 1740.67 ± 1152.735 e os que tiveram ausência de resposta ou resposta pobre (escore 3) 2141.00 ± 1082.334 . Sendo a média deste último grupo a maior.

- A média de sobrevida livre de doença dos pacientes que tiveram resposta quase completa (escore 1) foi de 1397.33 ± 1451.468 , os que tiveram resposta parcial (escore 2) 1659.67 ± 1131.840 e os que tiveram ausência de resposta ou resposta pobre (escore 3) 2008.15 ± 1194.003 . Sendo a média deste último grupo a maior.

É importante ressaltar que:

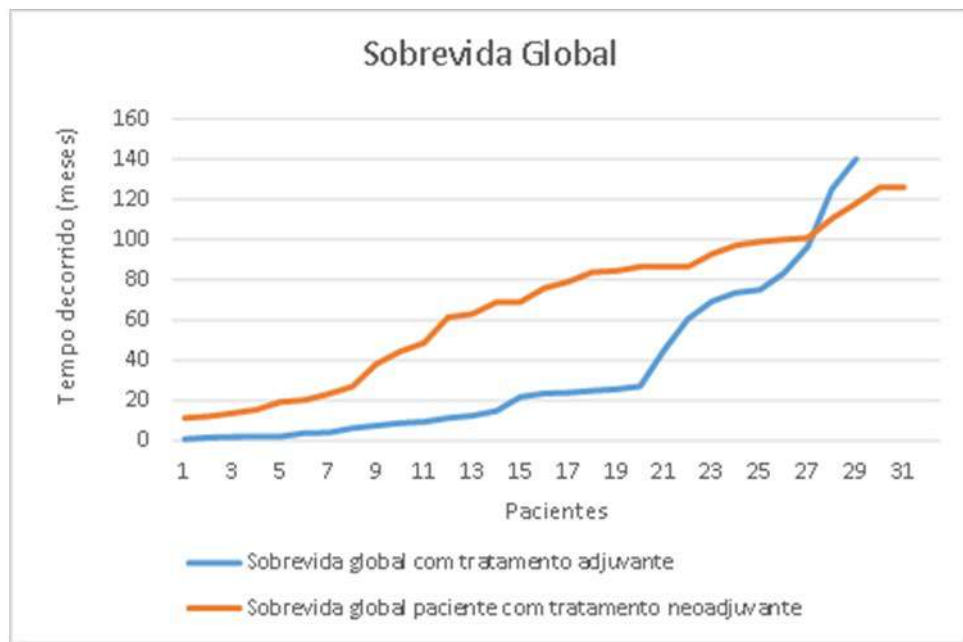
- Dezesesseis (16) pacientes foram excluídos dos cálculos de sobrevida por apresentarem metástases no tempo da cirurgia. Essa exclusão diminui o tamanho de cada grupo, o adjuvante a 30 e o neoadjuvante a 32.

No caso do efeito do tipo de tratamento recebido pelo paciente e o tempo de sobrevida global do paciente, o teste T para igualdade de médias, demonstra que existem diferenças estatisticamente significativas ($t_{(60)}=-3.302$; $p=0.002$), entre elas, o tipo de tratamento tem efeito nas médias do tempo de sobrevida global do paciente, entre os pacientes de cada um dos grupos de tratamento, observando-se uma diferença de 961.70 dias, sendo maior a média do tempo de sobrevida livre de doença no grupo de pacientes com tratamento neoadjuvante.

No caso do efeito do tipo de tratamento recebido pelo paciente e o tempo de sobrevida livre de doença do paciente, o teste T para igualdade de médias demonstra que existem diferenças estatísticas observando-se uma diferença de 863.242 dias, sendo maior a média do tempo de sobrevida livre de doença no grupo de pacientes com tratamento neoadjuvante.

O gráfico 14 apresenta as curvas de sobrevida global nos grupos de pacientes, com tratamento adjuvante e neoadjuvante.

Gráfico 14: Sobrevida Global da doença (meses) nos grupos de pacientes, com tratamento adjuvante e com tratamento Neoadjuvante.



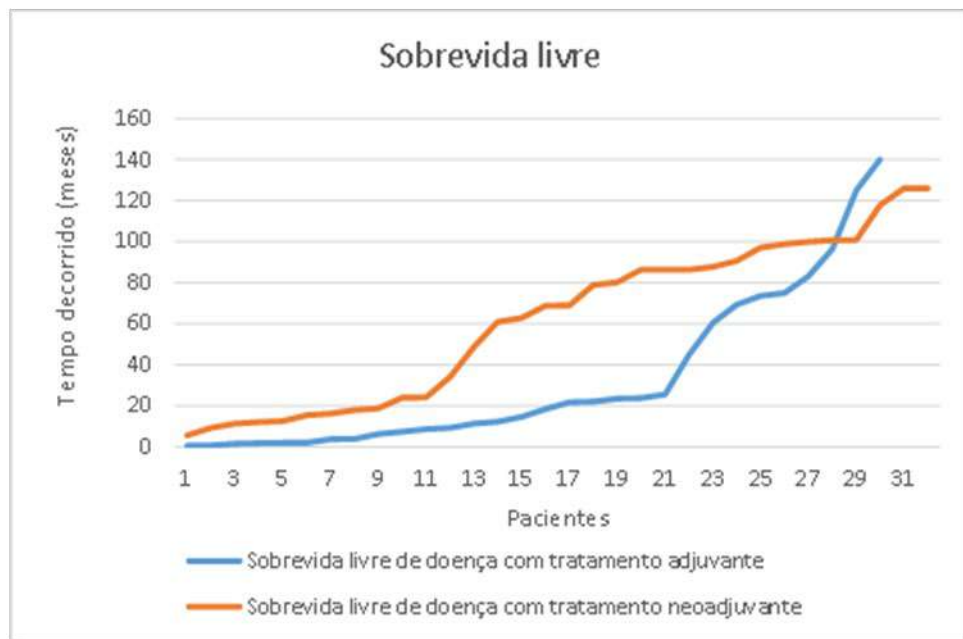
No gráfico observa-se que existem diferenças entre as curvas de sobrevida global dos pacientes correspondentes a cada um dos grupos. Os tempos de sobrevida global da doença dos

pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante, na maioria dos casos, são maiores aos tempos de sobrevida global dos pacientes submetidos ao tratamento adjuvante. De modo que, em geral, os pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante apresentam uma sobrevida global da doença superior àqueles pacientes com tratamento adjuvante.

As diferenças entre as curvas são mantidas em quase todos os casos, com exceção de dois, que correspondem a pacientes que receberam tratamento neoadjuvante, cuja sobrevida global é menor quando se compara com os pacientes que receberam tratamento adjuvante. São estes os pacientes que atingiram maior sobrevida global.

O gráfico 15 apresenta as curvas de sobrevida livre da doença nos grupos de pacientes, com tratamento adjuvante e neoadjuvante.

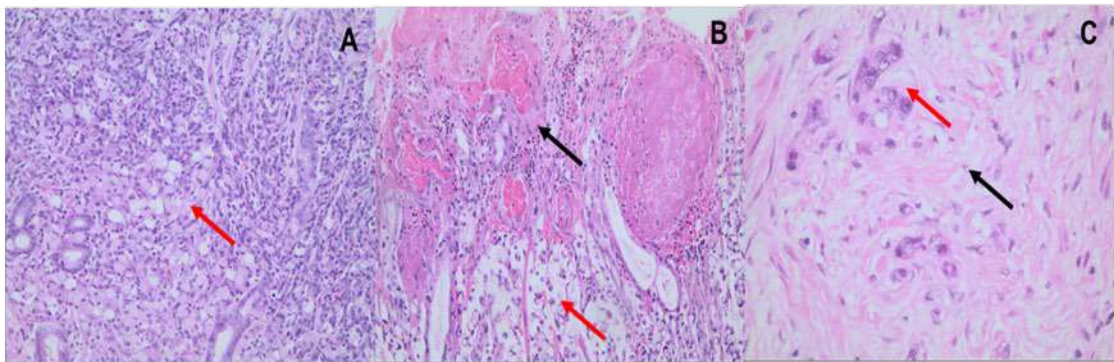
Gráfico 15: Sobrevida livre da doença (meses) nos grupos de pacientes, com tratamento adjuvante e neoadjuvante.



As diferenças entre as curvas são mantidas em quase todos os casos, com exceção de dois, que correspondem a pacientes que receberam tratamento neoadjuvante, cuja sobrevida livre da doença é menor quando se compara com os pacientes que receberam tratamento adjuvante. Estes são os pacientes com maior sobrevida livre da doença.

A figura 10 mostra um caso de Carcinoma gástrico de tipo difuso (células em anel de sinete) sem tratamento neoadjuvante prévio e dois casos com diferentes graus de regressão tumoral em resposta ao tratamento neoadjuvante.

Figura 10: Fotomicrografias: A- Carcinoma gástrico de tipo difuso com presença de células em anel de sinete (seta vermelha), 200X; B- Carcinoma gástrico de tipo difuso com células em anel de sinete (seta vermelha) com sinais de resposta pobre (R3) a neoadjuvância com ulceração na superfície da lesão, 200X; C- Carcinoma gástrico de tipo difuso com células em anel de sinete (seta vermelha) com sinais de resposta quase completa (R1) a neoadjuvância com fibrose (seta preta) ao redor de células neoplásicas viáveis residuais, 200X.



14.3 Análise da fusão gênica CLD18-ARHGAP26

A análise da fusão gênica CLD18-ARHGAP26 foi realizada através de reações de PCR em 43 amostras de adenocarcinoma gástrico, sendo 30 do tipo difuso, 7 do tipo misto e 6 do tipo intestinal. sendo que 11 pacientes receberam tratamento neoadjuvante e 32 tratamento adjuvante.

Destes, 23 pacientes do sexo masculino e 7 do sexo feminino exibiam adenocarcinoma de tipo difuso. O tipo histológico misto foi observado somente em 7 pacientes do sexo masculino, não sendo observado em pacientes femininos. O tipo intestinal foi observado em 1 caso do sexo feminino e em 5 do sexo masculino.

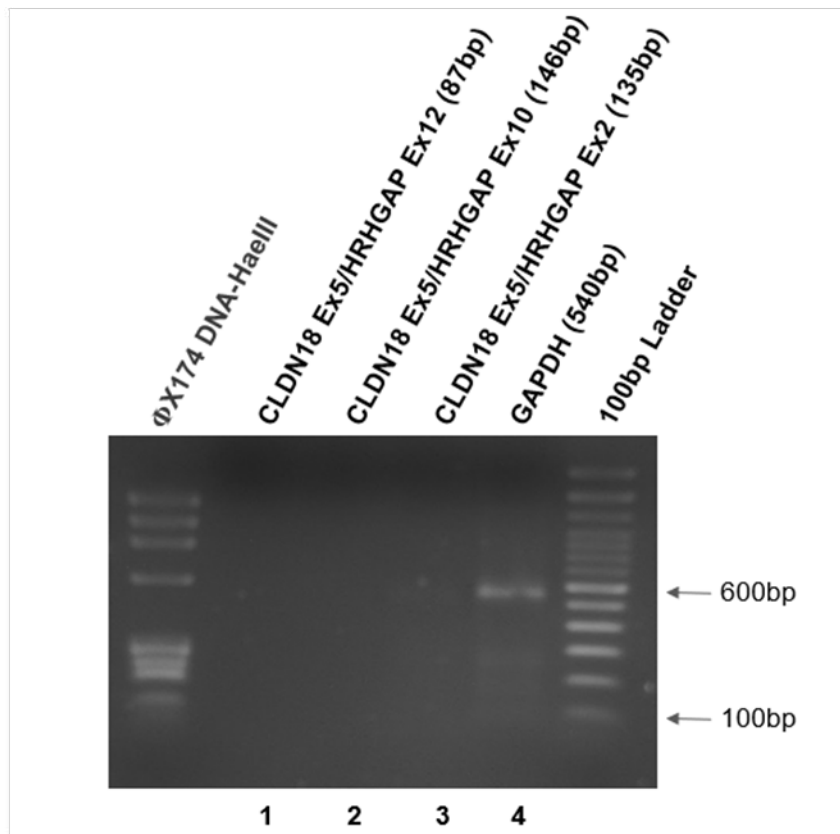
Os 11 pacientes que receberam tratamento neoadjuvante, exibiram predomínio do tipo difuso (7 casos), os demais 4 do tipo histológico misto.

A análise molecular da fusão gênica CLD18-ARHGAP26 não foi realizada em 35 casos devido a ausência ou escassez de tecido tumoral nas amostras.

Não foi detectado padrão de fusão gênica nas 43 amostras avaliadas.

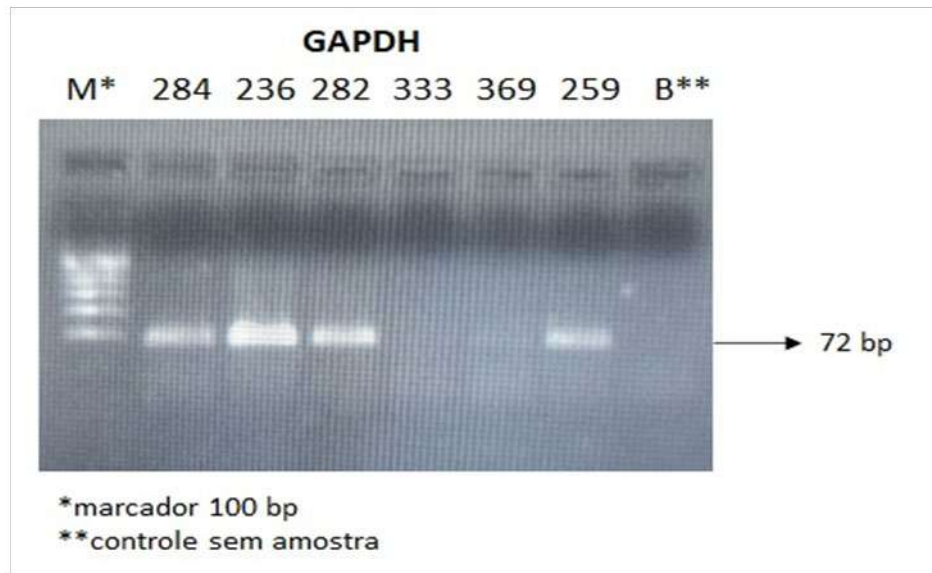
Na figura 11 observamos o Gel de agarose a 2% mostrando o resultado obtido para a amostra 236 sendo que o mesmo resultado foi observado para todas as amostras estudadas.

Figura 11: - Linhas 1, 2 e 3 mostrando que não houve amplificação das fusões.



Linha 4 mostrando amplificação do controle endógeno GAPDH no tamanho esperado (540 pb) o que significa que tanto o RNA quanto o cDNA estão com boa qualidade.

A figura 12 apresenta o resultado da amplificação do controle endógeno GAPDH revelando boa qualidade do RNA e da síntese de cDNA das amostras que apresentaram amplificação.



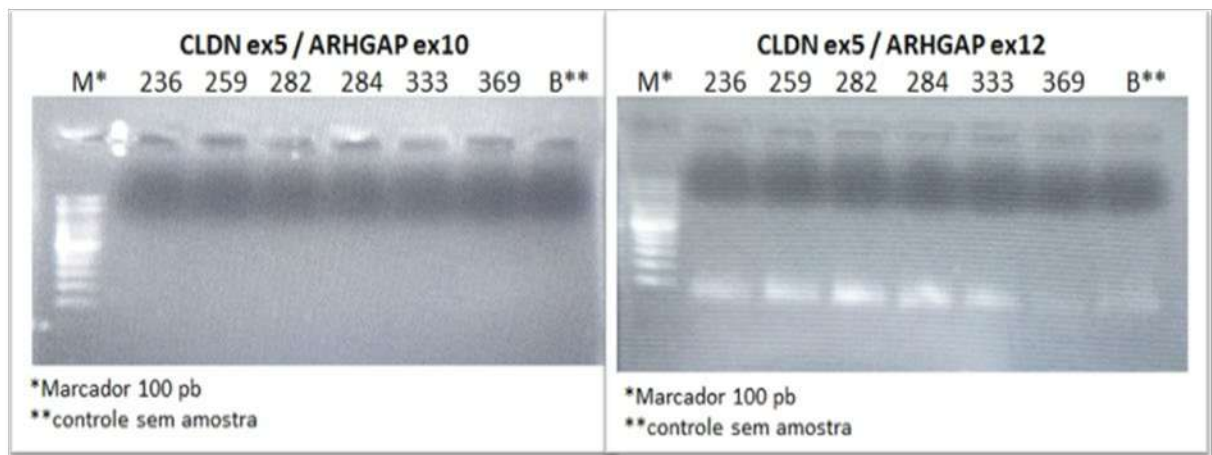
Na mesma figura observamos que para as amostras 333 e 369, a amplificação foi muito fraca mostrando que estas duas amostras estão com baixa qualidade do RNA e da síntese de cDNA .

Figura 13: Fusão gênica 1.



Na figura 13 não houve amplificação da fusão CLDN exon 5 e ARHGAP exon 2 em nenhuma amostra avaliada pois não detectamos a banda de 100 pb correspondente ao tamanho do amplicon esperado para esta fusão.

Figura 14: Fusão 2 e 3.



Como observado acima, assim como na fusão 1, também não houve amplificação da Fusão 2 = CLDN exon 5 e ARHGAP exon 10 e Fusão 3 = CLDN exon 5 e ARHGAP exon 12 para nenhuma amostra avaliada pois não foram detectados a banda de 100 pb correspondente ao tamanho do amplicon esperado para esta fusão.

14.4 Avaliação da expressão imuno-histoquímica das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina na população do estudo.

Foram realizadas análises das expressões imuno-histoquímicas da proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina em todas as 78 amostras que compunham a população do estudo.

Observamos expressões em citoplasma (ARHGAP26) e em membranas (Claudina 18 e E-caderina)

A tabela 15 apresenta a distribuição de frequências dos pacientes e as expressões imuno-histoquímicas ARHGAP26, claudina 18 e E-caderina

Tabela 15: Distribuição de frequências dos pacientes e as expressões imuno-histoquímicas ARHGAP26, claudina e E-caderina.

		Claudina 18 (membrana)			Total
		Ausência de Expressão	Expressão diminuída	Expressão Preservada.	
E-caderina (membrana):					
Perda de Expressão	ARHGAP26 (citoplasma)	Ausência de Expressão	0	2	2
		Presença de Marcação	2	0	2
Expressão Preservada (2/3+)	ARHGAP26 (citoplasma)	Ausência de Expressão	1	7	10
		Presença de Marcação	1	53	64

Na tabela 15 nota-se os seguintes aspectos:

Gráfico 16: Claudina-18: E-caderina – Perda de expressão.

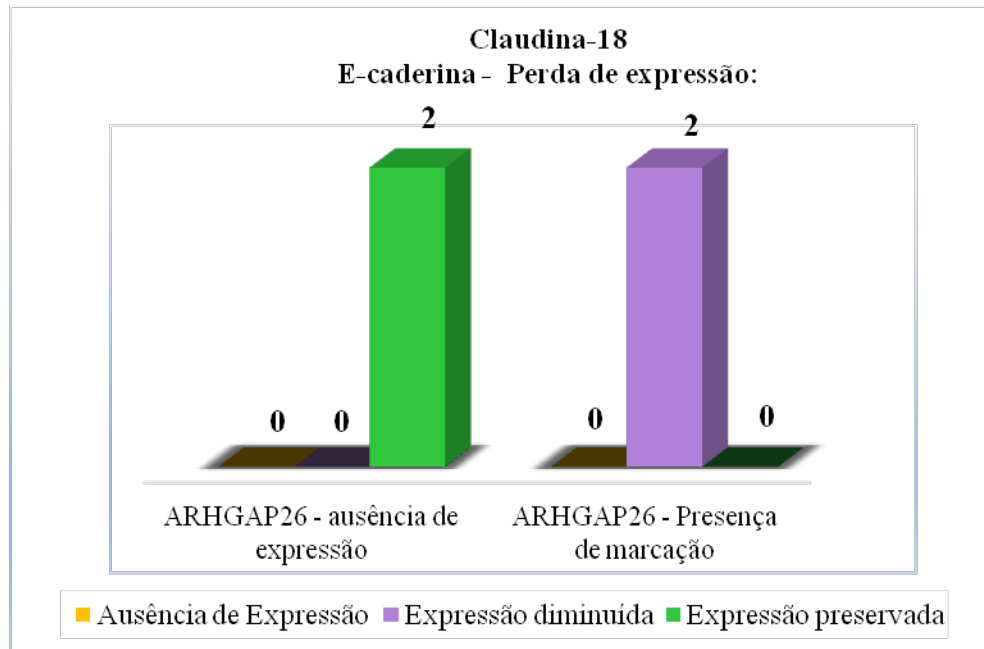
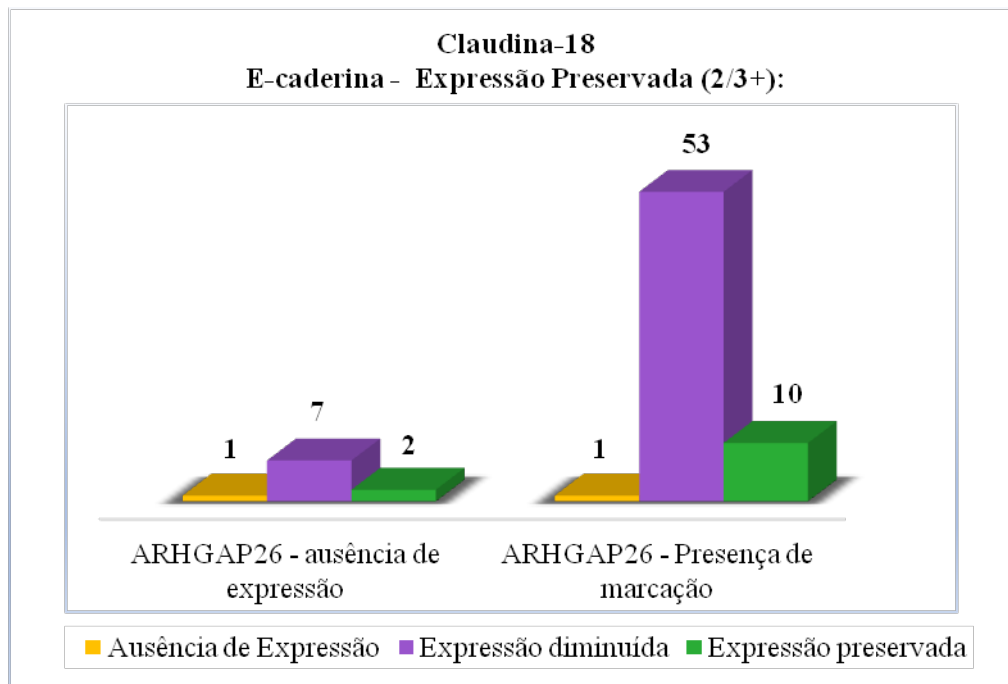


Gráfico 17: Claudina-18: E-caderina – Expressão preservada (2/3+).



A tabela 16 nos mostra a frequência de distribuição dos casos segundo o tipo histológico relacionado ao padrão de expressão imuno-histoquímica das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina.

Tabela 16: Distribuição dos casos segundo o tipo histológico relacionado ao padrão de expressão imuno-histoquímica das proteínas E-caderina, Claudina 18 e ARHGAP26.

N total = 78 casos	DIFUSO (N= 51)	INTESTINAL(N= 18)	MISTO (N= 9)
ARHGAP26			
Ausência de expressão	10	1(11.11%)	1(5.55%)
Presença de expressão	(19.60%)	8(88.89%)	17(94.44%)
	41(80.39%)		
Claudina 18			
Ausência de expressão	2(3.9%)	0 (0%)	0 (0%)
Expressão diminuída	40(78%)	9(100%)	13(72%)
Expressão preservada	9(18%)	0 (0%)	5(28%)
E-Caderina			
Perda da expressão	3(6%)	0 (0%)	1(6%)
Expressão preservada	48(94%)	9(100%)	17(94%)

Destacamos na tabela acima, a expressão imuno-histoquímica da proteína Claudina 18 na população de estudo.

Na tabela 17 se apresentam as características dos pacientes de acordo com o grau de regressão tumoral aconsiderando as variáveis: sobrevida global, sobrevida livre de doença, expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina, tipo histológico e estágio clínico.

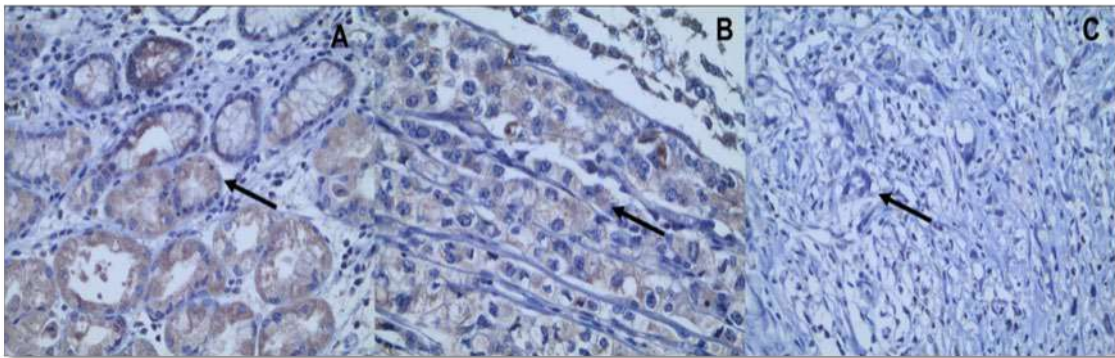
Tabela 17: Características dos pacientes do estudo de acordo com o grau de Regressão Tumoral Pós Neoadjuância considerando as variáveis: expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina, sobrevida global, tipo histológico, grau histológico e estágio clínico.

ARHGAP26				
		Ausência de Expressão	Presença de Marcação	P_valor
		12(15.38 %)	78(84.62 %)	
Claudina 18	Ausência de Expressão	1(50%)	1(50%)	0.079 ^a
	Expressão diminuída	7(11.29%)	55(88.70%)	
	Expressão Preservada.	4(28.57%)	10(71.42%)	
E-Caderina	Perda de Expressão	2 (50%)	2(50%)	0.110 ^a
	Expressão Preservada (2/3+)	10(13.51%)	64(86.49)	
Sobrevida Global		2043.11±1207.893	1336.55±1232.815	0.171 ^b
Sobrevida livre de doença,		2016.00±1213.981	1336.55±1232.815	0.150 ^b
Tipo Histológico,	Difuso	10 (19.60%)	41(80.39%)	0.506 ^a
	Intestinal	1(11.11%)	8(88.89 %)	
	Misto	1(5.55%)	17(94.44%)	
Estádio Clínico	I	2(18.18%)	9(81.8%)	0.345 ^a
	IB	1(25%)	3(75%)	
	II	4(40%)	6(60%)	
	IIA	0	5(100%)	
	IIB	0	5(100%)	
	III	2(12.5%)	14(87.5%)	
	IIIA	1(8.33%)	11(91.66%)	
	IIIB	0	8(100%)	
	IIIC	2(33.33%)	4(66.67%)	
	IV	0	1(100%)	

Não se observou associação estatisticamente significativa ($p_{\text{valor}} > 0.05$) entre a expressão imuno-histoquímica da proteína ARHGAP26 e as variáveis: Claudina 18, E-caderina, sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico e estágio clínico.

A figura 15 ilustra os padrões de expressão imuno-histoquímica da proteína ARHGAP-26 em adenocarcinomas gástricos da população de estudo

Figura 15. Fotomicrografias do estudo imuno-histoquímico para ARHGAP-26 nos adenocarcinomas gástricos. A: Marcação citoplasmática positiva em mucosa gástrica não neoplásica (setas pretas), 400x. B: Marcação citoplasmática (setas pretas) em adenocarcinoma pouco diferenciado, 400X; Ausência de expressão citoplasmática em adenocarcinoma difuso (setas pretas, 400x).



Não se observou associação estatisticamente significativa ($p_{\text{valor}} > 0.05$) entre a expressão imuno-histoquímica da proteína ARHGAP26 e as variáveis: Claudina 18, E-caderina, sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico e estágio clínico.

A tabela 18 apresenta as características dos pacientes do estudo de acordo com a expressão da proteína Claudina 18 considerando as variáveis: ARHGAP26, E-caderina, sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico e estágio clínico.

Tabela 18: Características dos pacientes do estudo de acordo com a expressão da proteína Claudina 18 considerando as variáveis: ARHGAP26, E-caderina, sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico e estágio clínico

Claudina-18

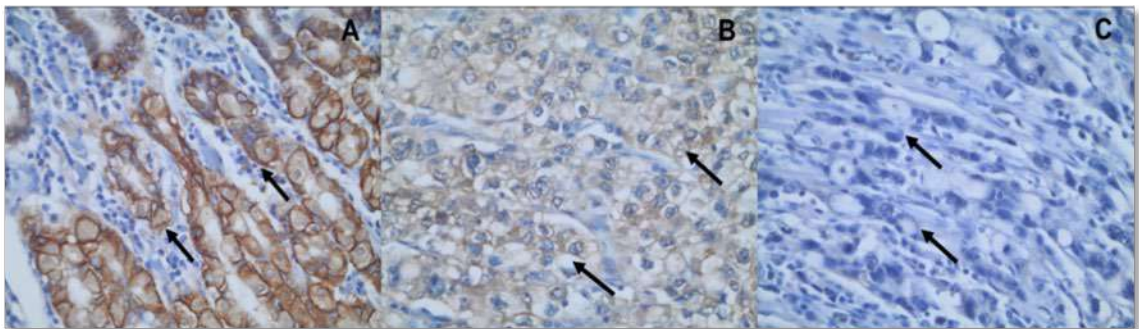
		Ausência de Expressão 2(%)	Expressão diminuída 62(%)	Expressão Preservada 14(%)	TOTAL
ARHGAP26	Ausência de Expressão	1(9%)	7(64%)	4(36%)	0.079 ^a
	Presença de Marcação	1(2%)	55(83%)	10(15%)	
E-caderina	Perda de Expressão	0	2(50%)	2(50%)	0.238 ^a
	Expressão Preservada (2/3+)	2(2.7%)	60(81%)	12(16%)	
Sobrevida Global		2002.00±2515.886	1269.50±1175.865	1928.36±1283.984	0.256 ^b
Sobrevida Livre de Doença,		2002.00±2515.886	1269.50±1175.865	1898.57±1268.321	0.207 ^b
Tipo Histológico,	Difuso	2(3.9%)	40(78%)	9(18%)	0.444
	Intestinal	0	9(100%)	0	
	Misto	0	13(72%)	5(28%)	
Estádio Clínico	I	0	4(36%)	7(64%)	0.029 ^a
	IB	0	3(75%)	1(25%)	
	II	1(10%)	7(70%)	2(20%)	
	IIA	0	5(100%)	0	
	IIB	0	5(100%)	0	
	III	0	15(93%)	1(7%)	
	IIIA	0	10(83%)	2(17%)	
	IIIB	1(12.5%)	6(75%)	1(12.5%)	
	IIIC	0	6	0	
	IV	0	1(100%)	0	

Na tabela acima observa-se que não existe associação estatisticamente significativa (p valor > 0.05) entre a proteína Claudina 18 e as variáveis, ARHGAP26, E-caderina, sobrevida global, sobrevida livre de doença e tipo histológico.

Na mesma tabela nota-se que existe associação estatisticamente significativa (p valor < 0.05) ao aplicar o teste exato de Fisher, entre a proteína Claudina 18 e o Estádio Clínico Estádio Clínico ($X^2(18)=28.165$; $p=0.029$).

A figura 16 mostra os padrões de expressão imuno-histoquímica da proteína Claudina 18 em adenocarcinomas gástricos da população de estudo.

Figura 16. Fotomicrografias do estudo imuno-histoquímico para Claudina-18 nos adenocarcinomas gástricos. A: Mucosa gástrica não neoplásica - expressão de membrana preservada (setas pretas), 400x. B: expressão de membrana diminuída (setas pretas), 400x; C: perda da expressão de membrana, (setas pretas), 400x.



Na tabela 19 se apresentam as características dos pacientes de acordo com a expressão imuno-histoquímica da proteína E-caderina considerando as variáveis: expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26 e Claudina 18; sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico e estágio clínico.

Tabela 19: Características dos pacientes de acordo com a expressão imuno-histoquímica da proteína E-caderina considerando as variáveis: expressões imuno-histoquímicas das proteínas Claudina 18 e ARHGAP26; sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico e estágio clínico.

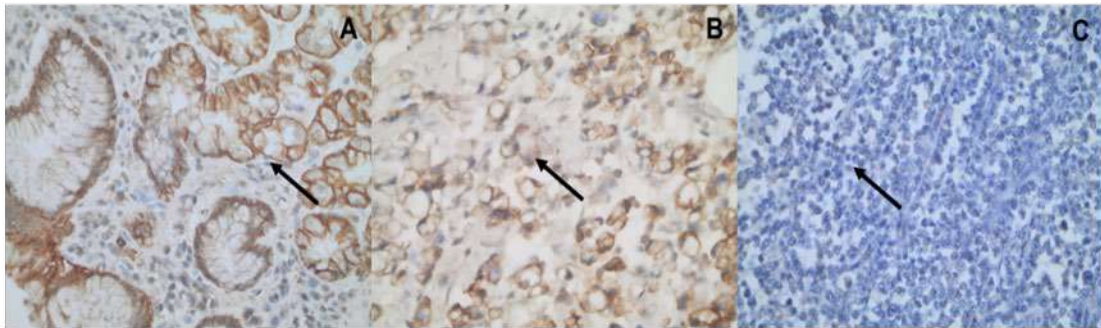
E-caderina

		Perda de Expressão	Expressão Preservada (2/3+)	
		4(%)	74(%)	
Claudina 18	Ausência de Expressão	0(%)	2(100%)	0.238
	Expressão diminuída	2(3%)	60(97%)	
	Expressão Preservada.	2(14%)	12(86%)	
ARHGAP26	Ausência de Expressão	2(17%)	10(83%)	0.110
	Presença de Marcação	2(3%)	64(97%)	
Sobrevida Global				
Sobrevida Livre de Doença,				
Tipo histológico,	Difuso	3(6%)	48(94%)	0.758 ^b
	Intestinal	0	9(100%)	
	Misto	1(6%)	17(94%)	
Estádio Clínico	I	1(100%)		0.436
	IB	0	4(100%)	
	II	2(20%)	8(80%)	
	IIA	0	5(100%)	
	IIB	0	5(100%)	
	III	0	16(100%)	
	IIIA	0	12(100%)	
	IIIB	1(13%)	7(87%)	
	IIIC	0	6(100%)	
	IV	0	1(100%)	

Não se observou associação estatisticamente significativa ($p_{\text{valor}} > 0.05$) entre a expressão imuno-histoquímica da proteína E-caderina e as variáveis: expressões imuno-histoquímicas das proteínas Claudina 18 e ARHGAP26; sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico e estágio clínico.

A figura 17 mostra os padrões de expressão imuno-histoquímica da proteína E-caderina em adenocarcinomas gástricos da população de estudo.

Figura 17: Fotomicrografias do estudo imuno-histoquímico para E-caderina nos adenocarcinomas gástricos. A: Marcação de membrana (seta preta) em mucosa gástrica não neoplásica, 400X; B: Expressão preservada em membrana (seta preta) em adenocarcinoma difuso, 400X; C- Perda da expressão (seta preta) em adenocarcinoma difuso, 400X.



A tabela 20 apresenta o valor do coeficiente de correlação de Spearman para cada uma das variáveis ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina.

Tabela 20: Coeficiente de Correlação de Spearman entre as variáveis ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina.

		ARGHGAP26 (citoplasma)	Claudina 18 (membrana)	E-caderina (membrana):
ARGHGAP26 (citoplasma)	Coeficiente de correlação	1.000	-.108	.223*
	Sig. (2-tailed)	.	.347	.050
	N	78	78	78
Claudina 18 (membrana)	Coeficiente de correlação	-.108	1.000	-.191
	Sig. (2-tailed)	.347	.	.093
	N	78	78	78
E-caderina (membrana):	Coeficiente de correlação	.223*	-.191	1.000
	Sig. (2-tailed)	.050	.093	.
	N	78	78	78

Os dados acima mostram que o coeficiente de Spearman mostrou que há uma correlação positiva e fraca, entre as variáveis ARGHGAP26 e Claudina 18, os valores de ambas variáveis dependem entre eles e aumentam ao mesmo tempo ($\rho = 0.223$; $p < 0.001$).

Na tabela 21 se apresentam as características dos pacientes de acordo o tipo de tratamento recebido pelo paciente, considerando as variáveis: sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico, estágio clínico, expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARGHGAP26, Claudina 18 e E-caderina.

Tabela 21: Características dos pacientes de acordo com o grau de regressão tumoral pós neoadjuvância considerando as variáveis: sobrevida global, sobrevida livre de doença, expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARGHGAP26, Claudina 18 e E-caderina; tipo histológico, grau histológico e estágio clínico.

		Regressão Tumoral Pós Neoadjuvancia			P valor
		Resposta Quase Completa 9.37 % (N = 5)	Resposta Parcial 28.12 % (N =9)l	Ausência de Resposta ou Resposta Pobre 62.5 % (N = 20)	
Sobrevida Global		1397.33±1451.468	1659.67±1131.840	2008.15±1194.003	0.483 ^a
Sobrevida Livre da doença		1437.33±1437.62	1740.6 ±1152.735	2141.00±1082.334	0.610 ^a
ARHGAP26	Ausência de Expressão	3 (37.5%)	4 (50%)	1 (12.5%)	0.001 ^b
	Presença de Marcação	1 (3.22%)	6 (19.35%)	24 (77.41%)	
Claudina 18	Ausência de Expressão	0	0	1 (100%)	0.326 ^b
	Expressão diminuída	2(7.14%)	6(21.42%)	20(%)	
	Expressão Preservada.	2(20%)	4(40%)	4(40%)	
Tipo Histológico	Difuso	4(16 %)	7(28 %)	14(56%)	0.157 ^b
	Intestinal	0	1	0	
	Misto	0(%)	2(15.38%)	11(84.61%)	
Estádio clínico	I	1(9.09%)	4(36.36%)	6(54.54%)	0.920 ^b
	II	2(20%)	2(20%)	6(60%)	
	IIA	0	0	1(100%)	
	III	1(6.25%)	4(25%)	11(65.75%)	
	IIIC	0	0	1(100%)	

Nessa tabela não se observou associação estatisticamente significativa (p valor > 0.05) entre o tipo de tratamento recebido pelo paciente e as variáveis: expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina.

Notam-se ainda as seguintes associações estatisticamente significativas (p _valor < 0.05), ao ser aplicado o teste exato de Fisher:

- Associação entre o tipo de tratamento recebido pelo paciente e o tipo histológico ($X^2_{(2)}=9.020$; $p=0.010$).

- Associação entre o tipo de tratamento recebido pelo paciente e o estágio clínico ($X^2_{(60)}=71.467$; $p=0.000$).

Além disso, identificam-se diferenças estatisticamente significativas (p valor < 0.05) entre o tipo de tratamento recebido pelo paciente e os tempos de sobrevida dos pacientes, tanto o tempo de sobrevida global como o tempo de sobrevida livre da doença.

Na tabela 22 se apresentam as características dos pacientes de acordo com o grau de regressão tumoral considerando as variáveis: sobrevida global, sobrevida livre de doença, expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina, tipo histológico e estágio clínico.

Tabela 22: Características dos pacientes de acordo com o grau de Regressão Tumoral Pós Neoadjuvância considerando as variáveis: sobrevida global, sobrevida livre de doença, expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina; tipo histológico, grau histológico e estágio clínico.

Regressão Tumoral Pós Neoadjuvancia					
		Resposta Quase Completa escore 2	Resposta Parcial escore 2	Ausência de Resposta ou Resposta Pobre Escore 3	P valor
		9.37 % (N = 5)	28.12 % (N =9)	62.5 % (N = 20)	
Sobrevida Global		1397.33±1451.468	1659.67±1131.840	2008.15±1194.003	0.483 ^a
Sobrevida Livre da doença		1437.33±1437.62	1740.6 ±1152.735	2141.00±1082.334	0.610 ^a
ARHGAP26	Ausência de Expressão	3 (37.5%)	4 (50%)	1 (12.5%)	0.001 ^b
	Presença de Marcação	1 (3.22%)	6 (19.35%)	24 (77.41%)	
Claudina 18	Ausência de Expressão	0	0	1 (100%)	0.326 ^b
	Expressão diminuída	2(7.14%)	6(21.42%)	20(%)	
	Expressão Preservada.	2(20%)	4(40%)	4(40%)	
E-caderina	Perda de Expressão	2(66.6 %)	0	1(33.33 %)	0.003 ^b
	Expressão Preservada (2/3+)	2(5.55 %)	10(27.77%)	24(66.66 %)	
Tipo Histológico	Difuso	4(16 %)	7(28 %)	14(56%)	0.157 ^b
	Intestinal	0	1	0	
	Misto	0(0%)	2(15.38%)	11(84.61%)	
Grau Histológico	2	0	1(20 %)	4(80%)	0.642 ^b
	3	4(11.76%)	9(26.47%)	21(61.76%)	
Estádio clínico	I	1(9.09%)	4(36.36%)	6(54.54%)	0.920 ^b
	II	2(20%)	2(20%)	6(60%)	
	IIA	0	0	1(100%)	
	III	1(6.25%)	4(25%)	11(65.75%)	
	IIIC	0	0	1(100%)	

Não existe associação estatisticamente significativa (p valor > 0.05) entre a regressão tumoral pós neoadjuvância e as variáveis: sobrevida global, sobrevida livre da doença, claudina 18, tipo histológico, grau histológico e estágio clínico.

Nessa mesma tabela observam-se as seguintes associações estatisticamente significativas (p _valor < 0.05), ao ser aplicado o teste exato de Fisher:

- Associação entre a regressão tumoral pós neoadjuvância e a expressão imunohistoquímica da proteína ARHGAP26 ($X^2_{(2)}=13.793$; $p=0.001$).
- Associação entre a regressão tumoral pós neoadjuvância e a expressão imunohistoquímica da proteína E-caderina ($X^2_{(2)}=11.397$; $p=0.003$).

15 DISCUSSÃO

O câncer gástrico (CG) é uma das neoplasias malignas mais comuns em todo o mundo e é a sexta principal causa de morte relacionada ao câncer. É uma doença multifatorial, onde tanto fatores ambientais quanto genéticos podem ter impacto em sua ocorrência e desenvolvimento (MACHLOWSKA *et al.*, 2020).

A presente população de estudo constitui-se por 78 pacientes com predomínio absoluto do sexo masculino com 55 casos (70.5%) e a idade média foi de 61.36 ± 11.59 anos. Foram 23 casos (29.5%) do sexo feminino com idade média foi de 60.17 ± 14.14 anos. Tais aspectos são similares aos descritos na literatura, onde se observa uma taxa de incidência de cerca de 2 vezes mais frequente no sexo masculino, com variações entre os países (MORGAN *et al.*, 2020).

As neoplasias gástricas como lesão única localizaram-se preferencialmente no antro gástrico (26 casos, 1 com invasão do pâncreas), seguido pelo corpo (20 casos), cárdia (6 casos) e piloro (2 casos).

A localização topográfica das neoplasias gástricas varia geograficamente conforme a incidência. Em regiões de alta incidência (Ásia, América do Sul e Central; Europa Oriental) cerca de 80% dos casos são distais, ocorrendo no corpo gástrico, antro e/ou piloro, com relativa predominância pela localização antro-pilórica, conforme observado na nossa casuística. No norte da Europa, incluindo o Reino Unido e Estados Unidos, 50%-60% estão localizados na cárdia e/ou fundo. No Japão, a incidência do CG proximal vem crescendo com cerca de 18%-22% de todos os casos (WHO, 2019).

A classificação japonesa de câncer gástrico (2011) divide as neoplasias em proximal e distal (ZHANG *et al.*, 2021 ; XUE *et al.*, 2021). Os cânceres proximais estão centrados na cárdia ou fundo gástrico, já os distais localizados no corpo, antro ou piloro (XUE, *et al.*, 2021).

No presente estudo onze casos apresentavam comprometimento tanto do corpo quanto do antro gástrico; da mesma forma, 8 casos se estendiam do antro à região pilórica; 2 casos com extensão fundo e corpo (1 caso com invasão do pâncreas); 1 caso comprometendo cárdia, corpo e antro; 2 casos com comprometimento do corpo gástrico se estendendo além dos limites gástricos atingindo baço (1 caso) e pâncreas (1 caso). Independentemente das neoplasias localizarem em um segmento específico gástrico ou com extensão com infiltração por contiguidade de outros segmentos, observou-se na nossa casuística predomínio dos cânceres distais presente em 81% dos

casos, em concordância com os achados de Yu e colaboradores (2018) com 80,6% dos casos localizados distalmente (YU *et al.*, 2018) Em relação a infiltração neoplásica por extensão direta a órgãos adjacentes, têm sido descrita principalmente nas neoplasias avançadas, o comprometimento do pâncreas, cólon transverso, hilo hepático, parede abdominal e esôfago, conforme observado em nosso estudo (FENOGLIO-PREISER, 2008).

Em relação aos tipos histológicos têm sido descritos na literatura, uma incidência predominante do tipo intestinal (60%) seguido pelo difuso observado em 30% dos casos (FENOGLIO-PREISER, 2008, ANSARI *et al.*, 2018).

No nosso estudo, o tipo histológico difuso (51 casos) foi predominante, seguido pelo misto (18) e intestinal (9). Tal fato se deveu ao nosso critério de seleção dos casos considerando que a frequência da fusão gênica é observada principalmente no tipo difuso (YAO *et al.*, 2015)

O câncer gástrico de tipo difuso ou pouco diferenciado tem como característica a perda da adesão intercelular que lhe confere um padrão de crescimento infiltrativo difuso através do estroma com marcada desmoplasia, sendo frequentemente acompanhado de células em anel de sinete, por vezes sendo o padrão predominante (LAUWERS *et al.*, 2010). São classificados como de alto grau (G3) devido a pouca diferenciação celular, compostos por células isoladas e em pequenos ninhos pouco coesas, com raras formações glandulares (LAUWERS *et al.*, 2010).

Cerca de cinquenta casos de tipo difuso foram classificados como de alto grau (G3), e um caso catalogado com grau 2(G2) por exibir uma variação no padrão de diferenciação celular, com presença de formações glandulares (cerca de 40% da neoplasia) porém com predomínio de células pouco coesas difusas. Tais aspectos são consistentes com os descritos por Lauwers e colaboradores, que descrevem o câncer gástrico como uma neoplasia com marcada heterogeneidade arquitetural e a nível celular refletindo na combinação de células de padrões foveolares, intestinal e de tipo endócrino na mesma neoplasia (LAUWERS *et al.*, 2010).

Em relação aos nove casos de CG intestinal observamos uma variação no padrão de diferenciação composto por casos bem diferenciado (1 caso), moderadamente diferenciado (sete casos) e um pouco diferenciado, com predomínio do grau 2. Usualmente, as neoplasias de padrão intestinal exibem um padrão de crescimento mais coeso com formações de estruturas tubulares e arquitetura glandular bem definida, lhes conferindo um grau mais baixo quando comparado as de tipo difuso, tais achados seguem o padrão de heterogeneidade intrínseca tumoral descritos por Lauwers e colaboradores (LAUWERS *et al.*, 2010).

As neoplasias gástricas de tipo misto exibem formações tubulares como aquelas vistas no tipo intestinal com áreas de células pouco coesas do tipo difuso em proporções equivalentes. Foram observados dezoito casos de CG de tipo misto no nosso estudo, sendo treze classificados como grau 3 (G3) e cinco como grau 2 (G2). A variação no grau histológico foi devido à variação do padrão de crescimento com presença de células neoplásicas isoladas e em ninhos infiltrando a parede gástrica predominando nos casos G3, seguindo a mesma tendência de heterogeneidade arquitetural descrita anteriormente por Lauwers e colaboradores ((LAUWERS *et al.*, 2010).

O tempo médio de sobrevida global da população de estudo foi de 1497.10 ± 1234.01 dias, a grande maioria deles com uma sobrevida global de 2591 dias, equivalendo a aproximadamente 7 anos.

O tempo médio de sobrevida livre de doença dos pacientes foi de 1435.18 ± 1243.82 dias, a maioria deles com uma sobrevida livre da doença de 2591 dias, o mesmo observado na sobrevida global.

Observamos uma taxa de sobrevida global e livre de doença elevada nos 62 pacientes avaliados.

Os presentes achados são discordantes da literatura, melhor observado quando comparado a estudo retrospectivo realizado por Cormedi e colaboradores (2018), constituído por 294 pacientes com câncer gástrico, agrupados segundo faixa etária: jovens (40 anos; N=71), idoso (41 a 65anos; N=129) e idoso (> 66 anos; N=94), submetidos a cirurgia seguida de quimioterapia (30% a 35,5% dos casos), com uma sobrevida global mediana entre todos os pacientes de 16 meses, taxa de sobrevida global não significativamente diferente entre as idades e ausência de diferenças significativas na taxa de sobrevida livre de doença (CORMEDI *et al.*, 2018).

De modo similar, estudo retrospectivo de 4789 pacientes, realizado por Lee e colaboradores, submetidos a ressecção curativa (R0) no período de 1986 – 1995, baseado no estágio clínico revelam taxa de sobrevida em 5 anos foi de 93% no estágio IA, 84% no IB, 68% no II, 51% no IIA, 31% no IIB e de 18% no IV (LEE *et al.*, 2001).

O presente estudo observou que os pacientes submetidos à cirurgia seguida de tratamento quimioterápico adjuvante exibiam principalmente estádios IB e IIA com sobrevida global e livre de doença de aproximadamente 7 anos, diferentemente do descrito por Cormedi e colaboradores (2018) que observou sobrevida global mediana de 16 meses.

O fator que provavelmente influenciou esses achados foi principalmente a exclusão 16 pacientes dos cálculos de sobrevida que apresentavam, no tempo cirúrgico, extensão da doença a órgãos adjacentes ou mesmo metástases à distância. Desse total, 9 pacientes haviam sido submetidos à tratamento adjuvante e 7 neoadjuvante. A opção pela exclusão destes pacientes se deveu ao fato de não apresentarem sobrevida livre de doença.

Em relação ao tratamento neoadjuvante notamos que a média de sobrevida global em pacientes que tiveram resposta quase completa (escore 1) foi de 1437.33 ± 1437.622 , os que tiveram resposta parcial (escore 2) 1740.67 ± 1152.735 e os que tiveram ausência de resposta ou resposta pobre (escore 3) 2141.00 ± 1082.334 .

A média de sobrevida livre de doença dos pacientes que tiveram resposta quase completa (escore 1) foi de 1397.33 ± 1451.468 , os que tiveram resposta parcial (escore 2) 1659.67 ± 1131.840 e os que tiveram ausência de resposta ou resposta pobre (escore 3) 2008.15 ± 1194.003 .

Os achados do presente estudo são divergentes aos descritos na literatura, principalmente quando comparamos pacientes com ausência de resposta ou resposta pobre à neoadjuvância com média de sobrevida livre de doença maior aos de resposta quase completa e parcial aos do estudo realizado por Coimbra e colaboradores (2019). Este estudo constituiu-se por 239 pacientes submetidos à neoadjuvância com taxas de sobrevida global em 5 anos de 88,9% para os pacientes com resposta patológica completa (escore 0), 95,2% para doença em estágio 1, 67,2% para doença em estágio 2, 33,6% para doença em estágio 3 e 4,4% para doença em estágio 4.

Acreditamos que principal fator que interferiu nos dados de sobrevida na população com tratamento neoadjuvante foi a exclusão de cinco pacientes com ausência de resposta ou resposta pobre (escore 3) das análises de sobrevida por exibirem extensão da doença à órgãos adjacentes e/ ou metástase à distância no tempo da cirurgia.

Importante salientar que todos os pacientes receberam o mesmo esquema terapêutico neoadjuvante ECX.

No presente estudo observamos que os tempos de sobrevida global e livre de doença são maiores nos pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante em comparação com o adjuvante. Tais achados estão em concordância com os descritos por Coimbra e colaboradores, que relatam esses benefícios na terapia quimioterápica neoadjuvante (COIMBRA *et al.*, 2020).

A análise da fusão gênica CLD18-ARHGAP26 foi realizada através de reações de PCR em 43 amostras de adenocarcinoma gástrico, sendo 30 do tipo difuso, 7 do tipo misto e 6 do tipo intestinal, sendo que 11 pacientes receberam tratamento neoadjuvante e 32 tratamentos adjuvantes.

O padrão de fusão gênica não foi detectado nestas amostras.

O fator limitante no nosso estudo foi a escassez de tecido tumoral (<30% de representação tumoral) representado nas amostras congeladas de CG. Realizamos a microdissecção tumoral em mais de uma amostra tumoral, porém não obtivemos sucesso nesta representação.

As frequências dessas fusões nos cânceres gástricos foram descritas em apenas duas coortes e identificadas em 14,8% entre os tipos de cânceres gástricos genomicamente estáveis (GS) em um estudo conduzido pelo The Cancer Grupo Genoma Atlas (TCGA), e 3,0% entre 100 cânceres gástricos analisados por Yao *et al.*, 2015.

Importante salientar que pacientes com CG fusão positiva, tendem a ter tumores com maior diâmetro, maior número de linfonodos, mais metástases distantes piores taxas de sobrevida e mostram resistência à quimioterapia do que os cânceres gástricos sem as fusões, segundo descrito por Tanaka e colaboradores (2018) (TANAKA *et al.*, 2018). Tais aspectos não puderam ser avaliados no nosso estudo devido a ausência de detecção da fusão gênica.

Dados de literatura apontam fusões gênicas CDNL18-ARHGAP26 e mutações RHOA predominantes nos CG difusos, critério de seleção na nossa casuística (TANAKA *et al.*, 2018).

Desta forma, embora a frequência da fusão gênica seja baixa, somente uma análise de uma coorte maior permitirá uma avaliação mais minuciosa e fidedigna na detecção deste padrão assim como a possível alteração de sua taxa na neoadjuvância.

O padrão de marcação imuno-histoquímica visto em membrana ou citoplasma da célula, foi compatível com a localização celular já conhecida e descrita das três proteínas avaliadas, sendo eles, citoplasma para ARHGAP26, membrana para Claudina-18 e membrana para E-caderina 1, detectados nesse estudo em concordância com estudos de Tanaka e colaboradores (2018) e Pereira e colaboradores (2022) (TANAKA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2022).

A análise da expressão das proteínas no presente estudo mostrou expressão preservada de ARHGAP26 na maioria dos casos (citoplasma em 84,6%), assim como da E-caderina

(membrana em 94,8% dos casos) e expressão diminuída da Claudina 18 em grande parcela da população (membrana em 79%), analisando todos os tipos histológicos.

ARHGAP26 está localizado no interior da citomembrana, regulando a proliferação celular, apoptose a nível translacional (JARIUS *et al.*, 2013, JING *et al.*, 2022). Usualmente é expresso no citoplasma de células teciduais normais e em células tumorais, conforme observado em nosso estudo (TANAKA *et al.*, 2018).

A expressão diminuída de ARHGAP26 foi observada em 15,38% dos casos, em dissonância com os achados descritos por Tanaka e colaboradores (2018) que observaram a expressão citoplasmática preservada da proteína nas células tumorais e células normais em sua população de estudo de câncer gástrico difuso tanto fusão positiva como negativa (TANAKA *et al.*, 2018). Fatores que podem ter influenciado nas análises das reações e diferentes resultados entre os estudos referem-se as variações na metodologia, diferentes clones dos anticorpos, entre outros (PEREIRA *et al.*, 2022). Além disso, é importante considerar que vários estudos apontam que a expressão e a relação do ARHGAP26 na tumorigênese e progressão tumoral não são similares em diferentes tipos de tumores, sendo significamente diminuída na leucemia mielóide aguda e crônica, no câncer de ovário também (CHEN *et al.*, 2019).

Não observamos a expressão em membrana do ARHGAP26, conforme descrita por Tanaka e colaboradores (2018) em casos positivos para fusão gênica, provavelmente pela ausência desse achado nos nossos casos avaliados, embora tenhamos detectado uma correlação fraca entre as duas proteínas (ARHGAP26-CLDN18) (TANAKA *et al.*, 2018).

Para um completo entendimento do padrão de expressão citoplasmática do ARHGAP26 e a sua detecção de expressão em membrana faz se necessário um estudo mais amplo.

Em relação a E-caderina notamos expressão preservada em membrana em 94,8 % e diminuída em 5,2% dos casos. Os presentes achados são consistentes com os descritos da literatura e em consonância com os descritos em estudo de Pereira e colaboradores (2022) que mostrou expressão preservada da E-caderina em cerca de 90% dos casos (N=173) e em correlação com expressão diminuída de Claudina 18, respectivamente (PEREIRA *et al.*, 2022).

A expressão diminuída de E-caderina tem sido relatada como marca registrada do processo celular denominado transição epitélio-mesenquimal (EMT), na qual a célula perde sua capacidade de adesão célula-célula e polaridade apical, levando a alterações na inibição da perda

de contato, alterações na migração celular e nas interações da matriz, resultando em tumorigênese (XING *et al.*, 2013; USHIKU *et al.*, 2016; BERX & VAN ROY, 2009; ZHAO *et al.*, 2021).

Estudos prévios têm mostrado um prognóstico melhor em pacientes E-caderina positivos do que naqueles negativos (ZHAO *et al.*, 2021).

Foi detectada expressão diminuída de Claudina 18 em 79% dos casos, sendo vista em 78% dos casos dos adenocarcinomas de tipo difuso, em 100% dos casos intestinais e 72% dos casos mistos. Tais achados estão em consonância com os descritos por Oshima e colaboradores (2013) no quesito da expressão diminuída de claudina 18 no CG e aos de Sanada e colaboradores (2006) em relação a baixa expressão especialmente nos fenótipos intestinais (OSHIMA *et al.*, 2013; SANADA *et al.*, 2006).

No estudo de Oshima e colaboradores (2013) foi realizada análise dos padrões de expressão de claudina-18 em 75 casos de câncer gástrico precoce no fronte de invasão e na mucosa gástrica circunjacente. Observaram que a claudina-18 estava significativamente reduzida no câncer gástrico em comparação com a mucosa gástrica normal circundante ou metaplasia intestinal. Concluíram que a regulação negativa da claudina-18 está associada ao potencial proliferativo no fronte invasivo do câncer gástrico, sugerindo que tem um papel fundamental na sua progressão e invasão (OSHIMA *et al.*, 2013).

Sanada e colaboradores (2006) relataram que a expressão da CLDN18 nos GCs tem diferentes funções biológicas na dependência da sua regulação (*down regulated* ou *up regulated*), e encontra-se altamente expressa em tecidos gástricos normais, e com baixa expressão em 57,5% dos GCs, especialmente em 73,7% dos fenótipos intestinais (SANADA *et al.*, 2006), de modo similar ao observado no presente estudo.

Em relação ao tratamento neoadjuvante, a expressão diminuída da Claudina 18 foi observada em 20 pacientes que apresentavam ausência de resposta/resposta pobre ao tratamento neoadjuvante, 6 casos com resposta parcial e 2 casos de resposta quase completa. Diferentemente dos achados descritos por Kim e colaboradores (2020), onde não foi detectada diferença significativa entre grupos com resposta completa/parcial e em outros grupos (doença estável/doença progressiva), nossos dados apontam para um percentual maior de expressão diminuída da claudina 18 nos casos de menor resposta a neoadjuvância com extenso tumor residual que exibem um potencial de invasividade maior que os demais (KIM *et al.*, 2020).

Neste estudo realizado por Kim e colaboradores (2020) foi investigado a resposta tumoral à quimioterapia de primeira linha à base de platina baseado na expressão imunofluorescência *two-plex* e análise de dados quantitativos de escores H de 77 pacientes com CG difuso metastático. Dos 77 pacientes, 54 tinham uma lesão mensurável. Os níveis de CLDN18.2 não foram significativamente diferentes entre a resposta completa/resposta parcial e em outros grupos (doença estável/ doença progressiva) (51.75 vs. 32.01, $P=0.052$) (KIM et al., 2020).

O fator limitante no nosso estudo foi o número limitado de casos. Desta forma, uma análise em uma coorte maior possa clarear esses achados.

A Claudina 18 tem sido apontada como importante alvo terapêutico no tratamento do CGs (HASHIMOTO *et al.*, 2022). Os nossos achados vão de encontro a esses relatos da literatura reforçando a importância da expressão da Claudina 18 como marcador de progressão e invasão tumoral, assim como, na terapia-alvo (HASHIMOTO *et al.*, 2022).

Não se observou associação estatisticamente significativa entre a expressão imunohistoquímica das expressões das proteínas ARHGAP26, Claudina 18, E-caderina e variáveis clínicas (sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico e estágio clínico).

No câncer gástrico, ARHGAP26 está fundido com o gene claudina-18 (CLDN18), portanto a sua associação a variáveis clínico-patológicas está vinculada a fusão gênica, não detectada no presente material. Em relação à claudina 18 e diferentemente dos nossos achados, estudo realizado por Pellino e colaboradores (2021) correlacionou a expressão de CLDN18 no CG a idade <70 ($p = 0,0035$), *status* positivo para EBV ($p = 0,002$), estágio alto (III, IV) no momento do diagnóstico ($p = 0,003$), envolvimento peritoneal ($p < 0,001$) e menor incidência de metástases hepáticas ($p = 0,013$) (PELLINO *et al.*, 2021). Também não observaram associação com a sobrevida global, de modo similar a nossa avaliação (PELLINO *et al.*, 2021).

Em relação a E-caderina, nossos achados são discordantes com estudo realizado por Torabizadeh e colaboradores (2017), que correlacionaram a expressão anormal da E-caderina ao estadiamento patológico, tipo tumoral, profundidade de invasão tumoral, metástase linfonodal regional e idade, segundo avaliação de (Torabizadeh *et al.*, 2017).

O fator que provavelmente influenciou os nossos achados foi o número limitado de casos. Desta forma, uma análise em uma coorte maior possa elucidar tais aspectos.

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre o tipo de tratamento recebido pelo paciente e as expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina. Além disso, foi detectada associação entre a regressão tumoral pós neoadjuvância e as expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26 e E-caderina. Não encontramos na literatura, dados que possam ser comparados a esses achados (GERVASO *et al.*, 2021; SANDO *et al.*, 2023; QUÉRO *et al.*, 2015).

O nosso estudo ressalta a importância da Claudina 18 como um marcador de progressão e invasão tumoral, assim como, na terapia-alvo. Porém faz-se necessários novos estudos que possibilitem o entendimento das relações e interações dessas proteínas no CG avançado, assim como a sua relação com a fusão gênica em uma população que reflita a nossa realidade e nos possibilite traçar estratégias para um melhor tratamento dos nossos pacientes.

16 CONCLUSÕES

Não detectou-se padrão de fusão gênica Claudina 18-ARHGAP26 na nossa população de estudo.

Os tempos de sobrevida global e livre de doença foram maiores nos pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante em comparação com o adjuvante.

O estudo imuno-histoquímico para avaliação da expressão das proteínas ARHGAP26 e da E-caderina mostrou um padrão de expressão preservada em cerca de 90% dos casos de CG.

Detectou-se baixa expressão da proteína Claudina 18 em 78% dos casos, em especial nos casos de tipo intestinal (100%).

Observou-se uma correlação fraca entre as proteínas ARHGAP26-CLDN18.

Não se observou associação estatisticamente significativa entre as expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26, Claudina 18, E-caderina e variáveis clínicas (sobrevida global, sobrevida livre de doença, tipo histológico e estágio clínico).

Não se observou associação estatisticamente significativa entre o tipo de tratamento recebido pelo paciente e as expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26, Claudina 18 e E-caderina.

Observou-se associação entre a regressão tumoral pós neoadjuvância e a expressões imuno-histoquímicas das proteínas ARHGAP26 e E-caderina.

Nosso trabalho ressalta a importância da claudina 18 como indicador prognóstico relacionado a progressão de doença no adenocarcinoma gástrico e sugere a sua utilização nos métodos de rotina diagnóstica histopatológica permitindo identificar pacientes de risco para avaliação molecular complementar e um tratamento alvo mais específico.

17 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM J. B. Vesteyinn, T. Ilya, S *et al.* **Comprehensive Molecular Characterization of Gastric Adenocarcinoma.** *Nature*. 2014 Sep 11;513(7517):202-9.

ALIPOUR M. **Molecular Mechanism of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer.** *J Gastrointest Cancer*. 2021 Mar;52(1):23-30.

AMANO, M. *et al.* **A proteomic approach for comprehensively screening substrates of protein kinases such as Rho-kinase.** *PLoS One*, v. 5, n. 1, p. e8704, Jan 2010. ISSN 1932- 6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20090853> >.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC). 8th Edition. Published
AMIN E, Dubey BN, Zhang SC, Gremer L, Dvorsky R, Moll JM, Taha MS, Nagel- Steger L, Piekorz RP, Somlyo AV, Ahmadian MR. **Rho-kinase: regulation, (dys)function, and inhibition.** *Biol Chem*. 2013 Nov;394(11):1399-410.

AMIN E, Jaiswal M, Derewenda U, Reis K, Nouri K, Koessmeier KT, *et al.* **Deciphering the molecular and functional basis of RHOGAP family proteins: a systematic approach toward selective inactivation of RHO family proteins.** *J Biol Chem*. (2016) 291:20353–203.

ANSARI S, Gantuya B, Tuan VP, Yamaoka Y. **Diffuse Gastric Cancer: A Summary of Analogous Contributing Factors for Its Molecular Pathogenicity.** *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 16;19(8):2424.

ARNOLD *et al.*, 2013, K.M. Arnold, Z.M, Goeckeler, R.B. Wysolmerski.

ASSUMPÇÃO PP, Araújo TMT, de Assumpção PB, Barra WF, *et al.* **Suicide journey of H. pylori through gastric carcinogenesis: the role of non-H. pylori microbiome and potential consequences for clinical practice.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(9):1591–7).

ASSUMPÇÃO PP, Barra WF, Ishak G, Coelho LGV, Coimbra FJF, Freitas HC, Dias-Neto E, Camargo MC, Szklo M. **The diffuse-type gastric cancer epidemiology enigma.** *BMC Gastroenterol*. 2020 Jul 13;20(1):223. Ansari S, Gantuya B, Tuan VP, Yamaoka Y. Diffuse Gastric Cancer: A Summary of Analogous Contributing Factors for Its Molecular Pathogenicity. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 16;19(8):2424. *Biochim. Biophys. Acta*, 1198 (1994), pp. 11-26.

BIRCHMEIER, W, Behrens, J. **Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness.**

BISWAS K. H. (2020). **Molecular Mobility-Mediated Regulation of E-Cadherin Adhesion.** *Trends Biochem. Sci*. 45 (2), 163–173. 10.1016/j.tibs.2019.10.012 .

BLAIR V. R., McLeod M., Carneiro F., Coit D. G., D'Addario J. L., van Dieren J. M., *et al.* (2020). **Hereditary Diffuse Gastric Cancer: Updated Clinical Practice Guidelines.** *Lancet Oncol*. 21 (8), e386–e397. 10.1016/S1470-2045(20)30219-9.

BO S, Brian E, Zheng X, Barry K, Andrei K, Yanyan B, Feng Q, Urao Norifumi, Deane M, and Xiaoping D. **The interaction of Gα13 with integrin β1 mediates cell migration by dynamic regulation of RhoA.** Published Online:26 Aug 2015 <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-05-0274>.

BOLAND C.R., Yurgelun M.B. **Historical Perspective on Familial Gastric Cancer.** *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;3:192–200.

BORA I, Shrivastava N. **ABCs of RhoGTPases indicating potential role as oncotargets.** *J Cancer Res Ther.* 2017 Jan-Mar;13(1):2-8. doi: 10.4103/0973-1482.204878.

BOS, J. L., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). **GEFs and GAPs: Critical elements in the control of small G proteins.** *Cell*, 129(5), 865–877.

BRAY F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** *CA Cancer J Clin* 2018;68:394-424.

BRITO BB, da Silva FAF, Soares AS, Pereira VA, Santos MLC, Sampaio MM, Neves PHM, de Melo FF. **Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection.** *World J Gastroenterol.* 2019;25:5578–5589.

BUCHSBAUM, R. J. (2007). **Rho activation at a glance.** *Journal of Cell Science*, 120(Pt 7), 1149–1152.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK: Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 2014; 513: 202–9.

CARNEIRO, Fátima *et al.* **Gastric Adenocarcinoma. In: WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD. WHO classification of tumours: digestive system tumours. Lyon: IARC, 2019.**

CASCINU S, Scartozzi M, Labianca R, Catalano V, Silva RR, Barni S, Zaniboni A, D'Angelo A, Salvagni S, Martignoni G, *et al.* **High curative resection rate with weekly cisplatin, 5-fluorouracil, epidoxorubicin, 6S-leucovorin, glutathione, and filgastrim in patients with locally advanced, unresectable gastric cancer: a report from the Italian Group for the Study of Digestive Tract Cancer (GISCAD)** *Br J Cancer.* Br J Cancer. 2004 Apr 19;90(8):1521-5.

CHEN, A. H. Beetham, M.A. Black, R. Priya, B.J. Telford, J. Guest, *et al.* **E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition.** *BMC Cancer*, 14 (2014), p. 552.

CHOI IJ, Kim CG, Lee JY, Kim YI, Kook MC, Park B, Joo J. **Family history of gastric Cancer and helicobacter pylori treatment.** *N Engl J Med.* 2020;382(5): 427–36).

CHOI IJ, Kook MC, Kim YI, *et al.* **Helicobacter pylori therapy for the prevention of Metachronous gastric Cancer.** *N Engl J Med.* 2018;378(12): 1085–95)

COIMBRA FJF, da Costa WL Jr. **ASO Author Reflections: High-Quality Perioperative and Surgical Therapy: The Impact of Tumor Response in Survival.** *Ann Surg Oncol.* 2020 Dec;27(Suppl 3):729-730. doi: 10.1245/s10434-019-07959-8. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32661857.

COOK, D., Rossman, K. & Der, C. **Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease.** *Oncogene* 33, 4021–4035 (2014). <https://doi.org/10.1038/onc.2013.362>.

CORMEDI MCV, Katayama MLH, Guindalini RSC, Faraj SF, Folgueira MAAK. **Survival and prognosis of young adults with gastric cancer.** *Clinics (Sao Paulo).* 2018 Sep 21;73(suppl 1):e651s. doi: 10.6061/clinics/2018/e651s.

CORREA, P. **Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process—First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention.** *Cancer Res.* 1992, 52, 6735–6740.

CORREA, P.; Houghton, J. **Carcinogenesis of Helicobacter Pylori.** *Gastroenterology* 2007, 133, 659–672

COVOS FHC, Ferreira FMF, Navarro PF, David PM, Freitas WR Jr, Malheiros CA. **Câncer gástrico avançado: complicação pós operatória: discussão de caso.** *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo.* 2011; 56:145-9.

CROWE SE. **Helicobacter pylori infection.** *N Engl J Med.* 2019;380(12):1158–65).

DIEKMANN, D. *et al.* **BCR encodes a GTPase-activating protein for p21rac.** *Nature* 351.

DOHERTY G.J, Lundmark R. **GRAF1-dependent endocytosis.** *Biochem Soc Trans.* 2009 Oct;37(Pt 5):1061-5.

DYER M.A., Abramson D.H. **Mutations and cancer: one or two historical perspectives?** *Lancet Oncol.*, 10 (8) (2009), p. 834.

FARIED A, Faried LS, Usman N, Kato H, Kuwano H. **Clinical and prognostic significance of RhoA and RhoC gene expression in esophageal squamous cell carcinoma.** *Ann Surg Oncol.* 2007 Dec;14(12):3593-601. Epub 2007 Sep 25.

FENOGLIO-PREISER, C; NOFFSINGER, AE; STEMMERMANN, GN; LANTZ, PE, ISAACSON, PG. **GASTROINTESTINAL PATHOLOGY: AN ATLAS AND TEXT.** 3^oedition, Lippincott Williams&Wilkins, 2008.

FERLAY J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin D.M, Piñeros M, Znaor A, Bray F. **Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods.** *Int J Cancer.* 2019 Apr 15;144(8):1941-1953. doi: 10.1002/ijc.31937. Epub 2018 Dec 6. PMID: 30350310 DOI: 10.1002/ijc.31937.

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* 2015 Mar 1; 136(5): E359-86.

FUNAHASHI Y, Namba T, Nakamuta S, Kaibuchi K. **Neuronal polarization in vivo: Growing in a complex environment.** *Current Opinion in Neurobiology.* Volume 27, August 2014, Pages 215-223.

GARATTINI, S. K, Basile, D. Cattaneo, M. Fanotto, V. Ongaro, E. Bonotto, M. Negri, F. V. Berenato R. Ermacora, P. Cardellino, G. G. Giovannoni, M. Pella, N. Antonuzzo, M. S. L. Silvestris, N. G. F. Aprile G. **Molecular classifications of gastric cancers: Novel insights and possible future applications.** *World J Gastrointest Oncol.* 2017 May 15; 9(5): 194–208.

GERVASO L, Pellicori S, Cella CA, Bagnardi V, Lordick F, Fazio N. **Biomarker evaluation in radically resectable locally advanced gastric cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: an evidence reappraisal.** *Ther Adv Med Oncol.* 2021 Sep 1;13:17588359211029559.

HALL A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509–14; Fukata M, Nakagawa M, Kaibuchi K. **Roles of Rho-family GTPases in cell polarization and directional migration.** *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:590–7; Raftopoulos M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 2004;265:23–32.

HARDING MA1, Theodorescu D. **RhoGDI signaling provides targets for cancer therapy.** *Eur J Cancer.* 2010 May;46(7):1252-9.

HASHIMOTO I, Oshima T. **Claudins and Gastric Cancer: An Overview.** *Cancers (Basel).* 2022 Jan 7;14(2):290. doi: 10.3390/cancers14020290.

HAYASHI D, Tamura , Tanaka H., *et al.* **Deficiency of Claudin-18 Causes Paracellular H⁺ Leakage, Up-regulation of Interleukin-1 β , and Atrophic Gastritis in Mice.** *Gastroenterology.* Volume 142, Issue 2, February 2012, Pages 292-304

HODGE R.G, Ridley A.J. **Regulating Rho GTPases and their regulators.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* volume 17, pages496–510(2016).

HOLLESTELLE, J.K. Peeters, M. Smid, M. Timmermans, L.C. Verhoog, P.J. Westenend, *et al.* **Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast câncer.** *Breast Cancer Res. Treat.,* 138 (2013), pp. 47-57.

HONG, J.Y. JY An , J. Lee , *et ai.* **Claudin 18.2 expression in various tumor types and its role as a potential target in advanced gastric cancer.** *Transl Cancer Res ,* 9 (5) (2020).

HUANG KH, Lan YT, Chen MH, Chao Y, Lo SS, Li AF, Wu CW, Chiou SH, Yang MH, Shyr YM, Fang WL. **The correlation between RhoA expression and clinicopathological characteristics in gastric cancer patients after curative surgery.** *World J Surg.* 2015; 39:2289–99. 10.1007/s00268-015-3095-4.

IARC (International Agency for Research on Cancer) — **World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases.** 1965-2020 — All Rights Reserved.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2019: incidência de câncer no Brasil.** José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2019. 120 p. : il. color.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA; 2020.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA; 2022.

ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12855641>>.

ITARU Hashimoto, Oshima Takashi · **Claudins and Gastric Cancer: An Overview.** *Cancers (Basel).* 2022 Jan; 14(2): 290. Published online 2022 Jan 7. doi: 10.3390/cancers14020290.

JAE-GYU Kim,Rokibul Islam,Jung Y. Cho,Hwalrim Jeong,Kim-Cuong Cap,Yohan Park,Abu J. Hossain,Jae-Bong Park. **Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway.** First published: 29 January 2018. <https://doi.org/10.1002/jcp.26487>.

JÄGER T, Neureiter D, Urbas R, Klieser E, Hitzl W, Emmanuel K, Dinnewitzer A. **Applicability of American Joint Committee on Cancer and College of American Pathologists Regression Grading System in Rectal Cancer.** *Dis Colon Rectum.* 2017 Aug;60(8):815-826.

JAPANESE GASTRIC CANCER ASSOCIATION. **Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition.** *Gastric Cancer* 2011;14:101–12.

JING LI, Xuwei ZHENG, Jianguang JIA , Bo XIE , Chensong ZHANG , Hu WANG, Hongbo LI, Jiachi MA. **CLDN18-ARHGAP26 function in gastric cancer and be a new therapeutic target by ABCG2 and ABCB1 pathway.** *Food Sci. Technol, Campinas*, v42, e54821, 2022.

JUN, K. H., Kim, J. H., Jung, J. H., Choi, H. J. & Chin, H. M. **Expression of claudin- 7 and loss of claudin-18 correlate with poor prognosis in gastric câncer.** *Int. J. Surg.* 12, 156–162 (2014).

JUN, K.-H.; Kim, J.-H.; Jung, J.-H.; Choi, H.-J.; Chin, H.-M. **Expression of Claudin-7 and Loss of Claudin-18 Correlate with Poor Prognosis in Gastric Cancer.** *Int. J. Surg.* 2014, 12, 156–162.

KAKIUCHI M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S. **Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma.** *Nat Genet.* 2014 Jun;46(6):583-7. doi: 10.1038/ng.2984. Epub 2014 May 11. PMID: 24816255.

KALLURI R., Weinberg R.A. **The basics of epithelial–mesenchymal transition.** *J. Clin. Invest.* 2009;119:1420–1428.

KAMAI, T. *et al.* **Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer.** *Clin Cancer Res*, v. 9, n. 7, p. 2632-41, Jul 2003.

KELLEY JR, Duggan JM. **Gastric cancer epidemiology and risk factors.** *J Clin Epidemiol.* 2003;56:1–9.

KIM SR, Shin K, Park JM, Lee HH, Song KY, Lee SH, Kim B, Kim SY, Seo J, Kim JO, Roh SY, Kim IH. **Clinical Significance of CLDN18.2 Expression in Metastatic Diffuse-Type Gastric Cancer.** *J Gastric Cancer.* 2020 Dec;20(4):408-420.

KOMATSU M, Ichikawa H, Chiwaki F, Sakamoto H, Komatsuzaki R, Asaumi M, Tsunoyama K, Fukagawa T, Matsushita H, Boku N, Matsusaki K, Takeshita F, Yoshida T, Sasaki H. **ARHGAP-RhoA signaling provokes homotypic adhesion-triggered cell death of metastasized diffuse-type gastric cancer.** *Oncogene.* 2022 Sep 20.

KRAUSE G, Protze J, Piontek J. **Assembly and function of claudins: Structure- function relationships based on homology models and crystal structures.** May 2015 *Seminars in Cell and Developmental Biology* 42. DOI:10.1016/j.semcd.2015.04.010.

KUMAR S, Kumar N, Deo S, Bhorawal S, Mandal A, Sharma A, Pathy S, Das P, Thulkar S, Bhatnagar S. **Patterns of Multimodality Management of Gastric Cancer-Single Institutional Experience of 372 Cases From a Tertiary Care Center in North India.** *Front Oncol.* 2022 May 2;12:877493. doi: 10.3389/fonc.2022.877493.

LACAL, J. *et al.* **Bacterial chemotaxis towards aromatic hydrocarbons in Pseudomonas.** *Environ Microbiol.* Jul;13(7):1733-44. 2011.

LASSERE M.N. **The Biomarker-Surrogacy Evaluation Schema: a review of the biomarker-surrogate literature and a proposal for a criterion-based, quantitative, multidimensional hierarchical levels of evidence schema for evaluating the status of biomarkers as surrogate endpoints.** *Stat Methods Med Res.* 2008 Jun; 17(3):303-40.

LAUREN, P. **The two histological main types of gastric adenocarcinoma: diffuse and so-called intestinal-type adenocarcinoma. An attempt at a histo-clinical classification.** *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965; 64:31-49.

LAUWERS G.Y., Mullen J.T., Schreiber K.E.C., Chung D.C. **Familial Gastric Cancers.** *Pathol. Case Rev.* 2014;19:66–73.

LAUWERS, G. Y. *et al.* **WHO classification of tumours of the digestive system.** Lyon: IARC, 2010.

LI, S. Yali , G. Baohong, X. **Expressions of Ras Homolog Gene Family, Member A (RhoA) and Cyclooxygenase-2 (COX-2) Proteins in Early Gastric Cancer and Their Role in the Development of Gastric Cancer.** e-ISSN 1643-3750 © Med Sci Monit, 2017; 23: 2979-2984.

LIM S.H., Kwon J.-W., Kim N., Kim G.H., Kang J.M., Park M.J., Yim J.Y., Kim H.U., Baik G.H., Seo G.S., *et al.* **Prevalence and risk factors of Helicobacter pylori infection in Korea: Nationwide multicenter study over 13 years.** *BMC Gastroenterol.* 2013;13:104.

Loss of focal adhesion kinase enhances endothelial barrier function and increases focal adhesions *Microcirculation*, 20 (2013), pp. 637-649.

LUNDMARK R, Doherty GJ, Howes MT, Cortese K, Vallis Y, Parton RG, *et al.* The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Curr Biol.* (2008) 18:1802–18MARTIN A.C, Denk-Lobnig M. **Modular regulation of Rho family GTPases in development.** *Small GTPases.* 2019 Mar;10(2):122-129. doi: 10.1080/21541248.2017.1294234. Epub 2017 Mar 17. MUELLER K.L. Cancer immunology and immunotherapy. Realizing the promise. Introduction. *Science*, 348 (6230) (2015), pp. 54-55.

MA Y, S. Semba, R.I. Khan, H. Bochimoto, T. Watanabe, M. Fujiya, Y. Kohgo, Y. Liu, T. **Taniguchi. Focal adhesion kinase regulates intestinal epithelial barrier function via redistribution of tight junction.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1832 (2013), pp. 151-159

MACHLOWSKA J, Baj J, Sitarz M, Maciejewski R, Sitarz R. **Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies.** *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 4;21(11):4012.

MACK N.A, Georgiou M. **The interdependence of the Rho GTPases and apicobasal cell polarity.** *Small GTPases.* 2014;5(2):10. doi: 10.4161/21541248.2014.973768.

MANSOUR JC, Tang L, Shah M, *et al.* **Does graded histologic response after neoadjuvant chemotherapy predict survival for completely resected gastric cancer?** *Ann Surg Oncol.* 2007;14(12):3412-3418.

MENDONSA A. M., Na T.-Y., Gumbiner B. M. (2018). **E-cadherin in Contact Inhibition and Cancer.** *Oncogene* 37 (35), 4769–4780.

MORGAN E, Arnold M, Camargo C, Gini A, Kunzmann, Matsuda T *et al.* **The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study.** Open Access Published: April 21,2022 DOI:<https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101404>. ARTICLES| VOLUME 47, 101404, MAY 01, 2022.

MURPHY G, Pfeiffer R, Camargo MC, Rabkin C.S. **Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location.** *Gastroenterology.* 2009 Sep;137(3):824-33.

NAKAYAMA I, Shinozaki E, Sakata S, Yamamoto N, Fujisaki J, Muramatsu Y, Hirota T, Takeuchi K, Takahashi S, Yamaguchi K, Noda T (2019) **Enrichment of CLDN18-ARHGAP fusion gene in gastric cancers in young adults.** *Cancer Sci* 110:1352–1363.

NAM S, Kim JH, Lee DH. RHOA in Gastric Cancer: Functional Roles and Therapeutic Potential. *Front Genet.* 2019 May 15;10:438. Review.

NEWTON A. D., Datta J., Loaiza-Bonilla A., Karakousis G. C., Roses R. E., **Neoadjuvant therapy for gastric cancer: Current evidence and future directions.** *J. Gastrointest. Oncol.* 6, 534–543 (2015).

NIETO M.A., Huang R.Y.-J., Jackson R.A., Thiery J.P. **EMT: 2016.** *Cell.* 2016;166:21–45.

NIIMI, T.; Nagashima, K.; Ward, J.M.; Minoo, P.; Zimonjic, D.B.; Popescu, N.C.; Kimura, S. **Claudin-18, a Novel Downstream Target Gene for the T/EBP/NKX2.1 Homeodomain Transcription Factor, Encodes Lung- and Stomach-Specific Isoforms through. Alternative Splicing.** *Mol. Cell Biol.* 2001, 21, 7380–739.

NOBES and Hall, 1995. C.D. Nobes, A. Hall. **Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.** *Cell*, 81 (1995), pp. 53-62.

O'CONNOR K, CHEN M. **Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion.** *Small GTPases.* 2013 Jul 1; 4(3): 141–147.

OHTA K, Goto H, Matsumoto Y, Yumine N, Tsurudome M, Nishio M. **Grafl controls the growth of human parainfluenza virus type 2 through inactivation of RhoA signaling.** *J Virol* 90:9394–9405. doi:10.1128/JVI.01471-16. 2016.

OLSON M.F, Julian L. **Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions.** *Small GTPases.* 2014; 5():e29846. Online:1 Jun 2017. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0102>

ORGAZ J.R, Herraiz C., Sanz-Moreno V.. **Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells.** *Small GTPases*, 5 (2014), p. e29019.

OSHIMA T, Shan J, Okugawa T, Chen X, Hori K, Tomita T, Fukui H, Watari J, Miwa H. **Down-regulation of claudin-18 is associated with the proliferative and invasive potential of gastric cancer at the invasive front.** *PLoS One.* 2013 Sep 20;8(9):e74757.

PAN Y, Bi F, Liu N, Xue Y, Yao X, Zheng Y, Fan D. **Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Mar 12;315(3):686-91.

PANTARELLI C, WELCH HCE. **Rac-GTPases and Rac-GEFs in neutrophil adhesion, migration and recruitment.** *Eur J Clin Invest.* 2018 Nov;48 Suppl 2:e12939. doi: 10.1111/eci.12939. Epub 2018 May 11.

PELLINO A, Brignola S, Riello E, Niero M, Murgioni S, Guido M, Nappo F, Businello G, Sbaraglia M, Bergamo F, Spolverato G, Pucciarelli S, Merigliano S, Pilati P, Cavallin F, Realdon S, Farinati F, Dei Tos AP, Zagonel V, Lonardi S, Loupakis F, Fassan M. **Association of CLDN18 Protein Expression with Clinicopathological Features and Prognosis in Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Adenocarcinomas.** *J Pers Med.* 2021 Oct 26;11(11):1095.

PEREIRA MA, Ramos MFKP, Dias AR, Cardili L, Ribeiro RRE, de Castria TB, Zilberstein B, Nahas SC, Ribeiro U Jr, de Mello ES. **RhoA, Claudin 18, and c-MET in Gastric Cancer: Clinicopathological Characteristics and Prognostic Significance in Curative Resected Patients.** *Med Sci (Basel)*. 2021 Dec 29;10(1):4.

PINHEIRO H., Oliveira C., Seruca R., Carneiro F. **Hereditary diffuse gastric cancer—Pathophysiology and clinical management.** *Best Pr. Res. Clin. Gastroenterol.* 2014;28:1055–1068. doi: 10.1016/j.bpg.2014.09.007.

PLUKKER J.T, Mulder N.H, Sleijfer D.T, Grond J, Verschueren R.C. **Chemotherapy and surgery for locally advanced cancer of the cardia and fundus: phase II study with methotrexate and 5 fluorouracil.** *Br J Surg.* 1991 Aug;78(8):955-8.

PORTER, A. P., Papaioannou, A., & Malliri, A. (2016). **Deregulation of Rho GTPases in cancer.** *Small GTPases*, 7(3), 123– 138.

QUÉRO L, Guillelm S, Hennequin C. **Neoadjuvant or adjuvant therapy for gastric cancer.** *World J Gastrointest Oncol.* 2015 Aug 15;7(8):102-10.

RAWLA, Prashanth; BARSOUK, Adam. **Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention.** *Przeglad gastroenterologiczny*, v. 14, n. 1, p. 26, 2019.

REGEV M, Sabanay H, Kartvelishvily E, Kam Z, Bershadsky AD. **Involvement of Rho GAP GRAF1 in maintenance of epithelial phenotype.** *Cell Adh Migr.* (2017) 11:367–367.

REVISTA DA ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA. **Câncer no Brasil: presente e futuro.** Print version ISSN 0104-4230 On-line version ISSN 1806-9282. *Rev. Assoc. Med. Bras.* vol.50 no.1 São Paulo 2004.

RICKER E, Chowdhury L, Yi W, Pernis AB. **The RhoA-ROCK pathway in the regulation of T and B cell responses.** *F1000Res.* 2016 Sep 12;5. pii: F1000 Faculty Rev-2295. eCollection 2016.

RÖCKEN C, Behrens HM, Böger C, Krüger S. **Clinicopathological characteristics of RHOA mutations in a Central European gastric cancer cohort.** *J Clin Pathol.* 2016 Jan;69(1):70-5. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202980. Epub 2015 Aug 6.

ROHATGI PR, Mansfield PF, Crane CH, *et al.* **Surgical pathology stage by American Joint Commission on Cancer criteria predicts patient survival after preoperative chemoradiation for localized gastric carcinoma.** *Cancer.* 2006;107(7):1475-1482.

RYAN R, Gibbons D, Hyland JMP, *et al.* **Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer.** *Histopathology.* 2005;47:141-146.

SAHIN, U., Schuler, M., Richly, H., Bauer, S., Krilova, A., Dechow, T. *et al.* **A phase I dose-escalation study of IMAB362 (Zolbetuximab) in patients with advanced gastric and gastro-oesophageal junction cancer.** *Eur. J. Cancer* 100, 17–26 (2018).

SAHIN, U.; Koslowski, M.; Dhaene, K.; Usener, D.; Brandenburg, G.; Seitz, G.; Huber, C.; Türeci, O. Claudin-18 Splice Variant 2 Is a Pan-Cancer Target Suitable for Therapeutic Antibody Development. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14, 7624–7634. 38. Shinozaki, A.; Ushiku, T.; Morikawa, T.; Hino, R.; Sakatani, T.; Uozaki, H.; Fukayama, M. **Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma: A Distinct Carcinoma of Gastric Phenotype by Claudin Expression Profiling.** *J. Histochem. Cytochem.* 2009, 57, 775–785.

SANADA, Y., Oue, N., Mitani, Y., Yoshida, K., Nakayama, H. & Yasui, W. **Down- regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype.** *J. Pathol.* 208, 633–642 (2006).

SANDO AD, Fougner R, Røyset ES, Dai HY, Grønbech JE, Bringeland EA. **Response Evaluation after Neoadjuvant Chemotherapy for Resectable Gastric Cancer.** *Cancers (Basel).* 2023 Apr 15;15(8):2318.

SATO Y, Okamoto K, Kawaguchi T, Nakamura F, Miyamoto H, Takayama T. **Treatment Response Predictors of Neoadjuvant Therapy for Locally Advanced Gastric Cancer: Current Status and Future Perspectives.** *Biomedicines.* 2022 Jul 6;10(7):1614.

SAWYERS CL, Van 't Veer LJ. **Reliable and effective diagnostics are keys to accelerating personalized cancer medicine and transforming cancer care: a policy statement from the american association for cancer research.** *Clin Cancer Res.* 2014 Oct 1; 20(19):4978-81.

SCHAEFER, A. Channing, D. **RHOA takes the RHOad less traveled to câncer.** *Volume 8, Issue 8, August 2022, Pages 655-669.* <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.04.005>.

SCHUHMACHER C, Gretschel S, Lordick F, Reichardt P, Hohenberger W, Eisenberger CF, Haag C, Mauer ME, Hasan B, Welch J, *et al.* **Neoadjuvant chemotherapy compared with surgery alone for locally advanced cancer of the stomach and cardia: European Organisation for Research and Treatment of Cancer randomized trial.** 40954. *J Clin Oncol.* 2010;28:5210–5218.

SHAH, P, Y. Gau, G. Sabnis. **Histone deacetylase inhibitor entinostat reverses epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells by reversing the repression of E-cadherin.** *Breast Cancer Res. Treat.,* 143 (2014), pp. 99-111.

SHENOY S. **CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics, Molecular Mechanisms and Guidelines for Management.** *Cancer Manag Res.* 2019 Dec 13;11:10477-10486.

SHINOZAKI A, Ushiku T, Morikawa T, *et al.* **Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinoma: A Distinct Carcinoma of Gastric Phenotype by Claudin Expression Profiling.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2009;57(8):775-785.

SHIVA Kumar R. Mukkamalla; Alejandro Recio-Boiles; Hani M. Babiker. Gastric Cancer. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. 2022 Jul 10. PMID: 29083746. Bookshelf ID: NBK459142 JEANES, A. Gottardi, A.C. Yap, A.S. **Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression?** *Oncogene,* 27 (2008), pp. 6920-6929.

SHU Y, Zhang W, Hou Q, Zhao L, Zhang S, Zhou J, Song X, Zhang Y, Jiang D, Chen X, Wang P, Xia X, Liao F, Yin D, Chen X, Zhou X, Zhang D, Yin S, Yang K, Liu J, Fu L, Zhang L, Wang Y, Zhang J, An Y, Cheng H, Zheng B, Sun H, Zhao Y, Wang Y, Xie D, Ouyang L, Wang P, Zhang W, Qiu M, Fu X, Dai L, He G, Yang H, Cheng W, Yang L, Liu B, Li W, Dong B, Zhou Z, Wei Y, Peng Y, Xu H, Hu J (2018) **Prognostic significance of frequent CLDN18-ARHGAP26/6 fusion in gastric signet-ring cell cancer.** *Nat Commun* 9:2447.

SINGH A.B, Dhawan P. **Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact.** *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Jun; 42():58-65. *Eur J Cell Biol.* 2013 Oct-Nov; 92(10-11):303-15. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Jun; 42():3-12.

SINGH A.B, Sharma A, Dhawan P. **Claudin family of proteins and cancer: an overview.** J Oncol. 2010; 2010():541957.

SINGH P., Toom S., Huang Y. **Anti-Claudin 18.2 Antibody as New Targeted Therapy for Advanced Gastric Cancer.** J. Hematol. Oncol. 2017;10:105. doi: 10.1186/s13045-017-0473.

SINGH, P., Toom, S. & Huang, Y. **Anti-claudin 18.2 antibody as new targeted therapy for advanced gastric cancer.** J. Hematol. Oncol. 10, 105 (2017). J Cancer Res Ther. 2017 Jan-Mar; 13(1):2-8. Eur J Cell Biol. 2013 Oct-Nov; 92(10-11):303-15.

SONG L, Guo Y, Xu B. **Expressions of Ras Homolog Gene Family, Member A (RhoA) and Cyclooxygenase-2 (COX-2) Proteins in Early Gastric Cancer and Their Role in the Development of Gastric Cancer.** Med Sci Monit. 2017 Jun 18;23:2979-2984).

STRANSKY, N., Cerami, E., Schalm, S., Kim, J. L. & Lengauer, C. **The landscape of kinase fusions in cancer.** Nat. Commun. 5, 4846 (2014).

SUN K, Duan X, Cai H, Liu X, Yang Y, Li M, Zhang X & Wang J. **Curcumin inhibits LPA-induced invasion by attenuating RhoA/ROCK/MMPs pathway in MCF7 breast cancer cells.** Clinical and Experimental Medicine volume 16, pages 37– 47(2016).

SUNAKAWA, Y. Lenz, H. J. **Molecular classification of gastric adenocarcinoma: translating new insights from the cancer genome atlas research network.** Curr Treat Options Oncol. 2015 Apr;16(4):17.

TAKE S, Mizuno M, Ishiki K, *et al.* **Risk of gastric cancer in the second decade of follow-up after helicobacter pylori eradication.** J Gastroenterol. 2020;55(3): 281–8.

TAN, E.J, K. Kahata, O. Idas, S. Thuault, C.H. Heldin, A. Moustakas **The high mobility group A2 protein epigenetically silences the Cdh1 gene during epithelial-to-mesenchymal transition.**

TANAKA A, Ishikawa S, Ushiku T, Yamazawa S, *et al.* **Frequent CLDN18-ARHGAP fusion in highly metastatic diffuse-type gastric cancer with relatively early onset.** Oncotarget. 2018 Jun 29; 9(50): 29336–29350.

TANAKA, A. Ishikawa, S. Ushiku, T. Yamazawa, S. Katoh, H. Hayashi, A. Kunita, A. and Fukayama, M. **Frequent CLDN18-ARHGAP fusion in highly metastatic diffuse-type gastric cancer with relatively early onset.** Oncotarget. 2018 Jun 29; 9(50): 29336–29350.

TATSUNO K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S. **Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma.** Nature Genetics volume 46, pages583–587(2014).

TCHERKEZIAN J, Lamarche-Vane N. **Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins.** Biol Cell. 2007 Feb;99(2):67-86.

THIERY, J.P. **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression** Nat. Rev. Cancer, 2 (2002), pp. 442-454.

TONETO MG, Viola L. **Current status of the multidisciplinary treatment of gastric adenocarcinoma.** ABCD Arq Bras Cir Dig. 2018;31(2):e1373.

- TÖNGES, L., Koch, J. C., Bähr, M., and Lingor, P. (2011a). **ROCKing regeneration: Rho kinase inhibition as molecular target for neurorestoration.** *Front. Mol. Neurosci.* 4:39. doi: 10.3389/fnmol.2011.00039.
- TORABIZADEH Z, Nosrati A, Sajadi Saravi SN, Yazdani Charati J, Janbabai G. **Evaluation of E-cadherin Expression in Gastric Cancer and Its Correlation with Clinicopathologic Parameters.** *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2017 Apr 1;11(2):158-164.
- TÜRECI, O.; Koslowski, M.; Helftenbein, G.; Castle, J.; Rohde, C.; Dhaene, K.; Seitz, G.; Sahin, U. **Claudin-18 Gene Structure, Regulation, and Expression Is Evolutionary Conserved in Mammals.** *Gene* 2011, 481, 83–92.
- TURNER J.R., Buschmann M.M., Romero-Calvo I., Sailer A., Shen L. **The Role of Molecular Remodeling in Differential Regulation of Tight Junction Permeability.** *Semin. Cell Dev. Biol.* 2014;36:204–212.
- UICC. Union for International Cancer Control. **TNM classification of malignant tumours.** 2017 8^a edition. TNM - 8^a edição, 2017.
- VALENZUELA MA, Canales J, Corvalán AH, Quest AF. **Helicobacter pylori- induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis.** *World J Gastroenterol.*2015;21(45):12742-12756.
- VOGELSTEIN B, Papadopoulos N, Velculescu V.E, Zhou S, Diaz L.A Jr, Kinzler KW. **Cancer genome landscapes.** *Science.* 2013 Mar 29;339(6127):1546-58.
- WANG K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HH, Shi ST, Siu HC, Deng S, Chu KM, Law S, Chan KH, Chan AS, Tsui Wy, Ho SL, Chan AK, Man JL, Foglizzo V, Ng MK, Chan AS, Ching YP, Cheng GH, Xie T, Fernandez J, Li VS, Clevers H, Rejto PA, Mao M, Leung SY. **Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer.** *Nat Genet.* 2014 Jun; 46(6):573- 82.
- WANG N, Zhanga R, Shui-Jing Wanga, Chun-Ling Zhanga, Li-BinMaoaChun- YuZhuangaYan *et al.* **Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial differentiation from mesenchymal stem cells via Rho/myocardin-related transcription factor-A signaling pathway.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* Volume 45, Issue 7, July 2013, Pages 1447-1456.
- WOLDU SL, Hutchinson RC, Krabbe LM, Sanli O, Margulis V. **The Rho GTPase signalling pathway in urothelial carcinoma.** *Nat Rev Urol.* 2018 Feb; 15(2):83-91.
- XING, X. Y.B. Tang, G. Yuan, Y. Wang, J. Wang, Y. Yang, *et al.* **The prognostic value of E-cadherin in gastric cancer: a meta-analysis.** *Int. J. Cancer,* 132 (2013), pp. 2589-2596.
- XU X.T, Song Q.B, Yao Y, *et al.* **Inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway promotes the apoptosis of gastric cancer cells.** *Hepatogastroenterology.* 2012;59:2523–26.
- XUE J, Yang H, Huang S, Zhou T, Zhang X, Zu G. **Comparison of the overall survival of proximal and distal gastric cancer after gastrectomy: a systematic review and meta-analysis.** *World J Surg Oncol.* 2021 Jan 19;19(1):17.
- XURI Chen, Shaoyun Chen, Yao Li, Yanling Gao, Shuying Huang, Hongping Li, Yuanfang Zhu. **SMURF1-mediated ubiquitination of ARHGAP26 promotes ovarian cancer cell invasion and migration.** *Exp Mol Med.* 2019 Apr; 51(4): 46.
- YANG H, Hong D, Cho SY, Park YS, Ko WR, Kim JH, Hur H, Lee J, Kim SJ, Kwon SY, Lee JH, Park DY, Song KS, Chang H, Ryu MH, Cho KS, Kang JW, Kook MC, Thiessen N, He A, Mungall A, Han SU, Kim HK (2018).

RhoGAP domain-containing fusions and PPAPDC1A fusions are recurrent and prognostic in diffuse gastric cancer. *Nat Commun* 9:4439.

YANG L., Wang J., Li J., Zhang H., Guo S., Yan M. **Identification of serum biomarkers for gastric cancer diagnosis using a human proteome microarray.** *Mol Cell Proteomics*. 2016;15:614–623.

YAO F, Kausalya JP, Sia YY, Teo AS, Lee WH, Ong AG, Zhang Z, Tan JH, Li G, Bertrand D, Liu X, Poh HM, Guan P, *et al.* **Recurrent fusion genes in gastric cancer: CLDN18-ARHGAP26 induces loss of epithelial integrity.** *Cell Reports*. 2015;12:272–85.

YCHOU M, Boige V, Pignon JP, Conroy T, Bouché O, Lebreton G, Ducourtieux M, Bedenne L, Fabre JM, Saint-Aubert B, *et al.* **Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial.** *J Clin Oncol*. 2011;29:1715–1721.

YOSHIHARA, K. *et al.* **The landscape and therapeutic relevance of cancer-associated transcript fusions.** *Oncogene*. 2015 Sep 10;34(37):4845-54.

YU X, Hu F, Li C, Yao Q, Zhang H, Xue Y. **Clinicopathologic characteristics and prognosis of proximal and distal gastric cancer.** *Onco Targets Ther*. 2018;11:1037-1044.

ZHANG L, Zhou A, Zhu S, Min L, Liu S, Li P, Zhang S. **The role of GTPase-activating protein ARHGAP26 in human cancers.** *Mol Cell Biochem*. 2022 Jan;477(1):319-326 ZHANG WH, Zhang SY, Hou QQ, Qin Y, Chen XZ, Zhou ZG, Shu Y, Xu H, Hu JK. **The Significance of the CLDN18-ARHGAP Fusion Gene in Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis.** *Front Oncol*. 2020 Sep 2;10:1214.

ZHANG Y, Zhang PS, Rong ZY, Huang C. **One stomach, two subtypes of carcinoma—the differences between distal and proximal gastric cancer.** *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2021 Nov 15;9(6):489-504.

ZHAO H, Hu H, Chen B, Xu W, Zhao J, Huang C, Xing Y, Lv H, Nie C, Wang J, He Y, Wang SQ, Chen XB. **Overview on the Role of E-Cadherin in Gastric Cancer: Dysregulation and Clinical Implications.** *Front Mol Biosci*. 2021 Jul 30;8:689139.

18 ANEXO

Anexo A. Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética do HCFMRP-USP.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	
Ofício nº 2369/2018 CEP/MGV		
RIBEIRÃO PRETO, 29 DE AGOSTO DE 2018		
PREZADAS SENHORAS,		
<p>O TRABALHO INTITULADO "ANÁLISE DA FUSÃO DOS GENES CLDN18-ARGHGAP26 NO CÂNCER GÁSTRICO AVANÇADO PÓS NEODJUVÂNCIA", FOI ANALISADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA, EM SUA 475ª REUNIÃO ORDINÁRIA REALIZADA EM 27/08/2018 E ENQUADRADO NA CATEGORIA: <u>APROVADO</u>, BEM COMO A SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, DE ACORDO COM O PROCESSO HCRP Nº 10295/2018.</p> <p>ESTE COMITÊ SEGUE INTEGRALMENTE A CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE HARMONIZAÇÃO DE BOAS PRÁTICAS CLÍNICAS (IGH-GCP), BEM COMO A RESOLUÇÃO Nº 466/12 CNS/MS.</p> <p><u>LEMBRAMOS QUE DEVEM SER APRESENTADOS A ESTE CEP, O RELATÓRIO PARCIAL E O RELATÓRIO FINAL DA PESQUISA.</u></p> <p>ATENCIOSAMENTE,</p>		
 DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP		
Ilustríssimas Senhoras DR. MARIÂNGELA OTTOBONI BRUNALDI (ORIENTADORA) CAROLINE FONTES ALVES MARIANO Depto. de Patologia e Medicina Legal		
<hr/> <small> HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Campus Universitário - Monte Alegre 14049-900 Ribeirão Preto - SP Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP FWA 0302733.1115-00002160 e Registro PSI/CONEP nº 5440 (16)3502-2229cep@hcrp.usp.br www.hcrp.usp.br </small>		