



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - RENORBIO

**IDENTIFICAÇÃO DE PAINEL E PERFIL DE EXPRESSÃO DE
GENES REGULADOS PELO ONCOGENE *MYC* EM CÂNCER
GÁSTRICO**

LUANA DE OLIVEIRA LOPES

PARNAÍBA, PI
2019

LUANA DE OLIVEIRA LOPES

**IDENTIFICAÇÃO DE PAINEL E PERFIL DE EXPRESSÃO DE
GENES REGULADOS PELO ONCOGENE *MYC* EM CÂNCER
GÁSTRICO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto

PARNAÍBA, PIAUÍ

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

L864i Lopes, Luana de Oliveira
Identificação de painel e perfil de expressão de genes regulados pelo oncogene *myc* em câncer gástrico [recurso eletrônico] / Luana de Oliveira Lopes. – 2019.

1 Aquirvo em pdf.

Impresso por computador (printout).

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal: Universidade Federal do Piauí, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto.

1. Câncer Gástrico. 2. Gene *MYC*. 3. Expressão Gênica. 4. Biomarcadores.
I. Título.

CDD: 616.3

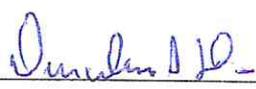
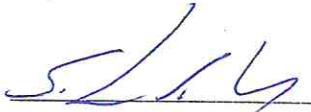
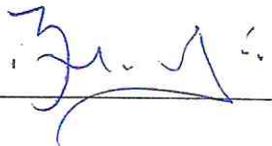
FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: LUANA DE OLIVEIRA LOPES

TÍTULO DO PROJETO: "IDENTIFICAÇÃO DE PAINEL E PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES REGULADOS PELO ONCOGENE MYC EM CÂNCER GÁSTRICO".

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Giovanni Reboucas Pinto

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Giovanni Reboucas Pinto - UFPI (Presidente)	<u>APROVADO</u>	<u></u>
Profª. Dra. Durcilene Alves da Silva - UFPI (Examinadora)	<u>Aprovada</u>	<u></u>
Prof. Dr. Silmar Silva Teixeira - UFPI (Examinador)	<u>Aprovada</u>	<u></u>
Prof. Dr. Baldomero Antonio Kato da Silva – UFPI (Examinador)	<u>APROVADA</u>	<u></u>
Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus - UFPI (Examinador)	<u>Aprovada</u>	<u></u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 28 de Junho de 2019.

HORÁRIO: 08:30h

LOCAL: Auditório Leste - Campos Ministro Reis Velloso - Parnaíba/UFPI

Dedico aos meus pais, Maria de Lourdes e Leoncio Neto, pelo amor e paciência que já dedicaram a mim, muitas vezes renunciando de seus sonhos para que os meus fossem realizados.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi fruto de trabalho árduo de muitas pessoas, todas elas iluminadas por Deus para me auxiliar nesta tarefa tão difícil. Em meio aos problemas sempre recorri a ele em primeiro lugar, Meu Salvador e Meu Protetor, então me resta agradecê-lo em primeiro lugar. Agradeço por Deus cuidar de todos os caminhos para que chegasse até aqui.

Agradeço à minha mãe Maria de Lourdes Oliveira Lopes, guerreira e fiel, por me ouvir sempre e me dar o amor maior dessa vida que me sustentou em muitas tarefas. Agradeço ao meu pai, Leoncio Neto dos Santos Lopes por sempre me dedicar parte da sua vida e de suas escolhas para que eu completasse minha caminhada pelo conhecimento. Agradeço por minha família em tudo e por tudo. Vocês são minha base e minha fortaleza! Amo vocês!

Agradeço ao meu marido, Alcemir Rogrigues Santos, sem ele talvez nem estivesse aqui. Agradeço por seu amor, seu companheirismo e todos os momentos que escolhemos compartilhar durante esse processo. Obrigada por estar sempre ao meu lado, nas noites mal dormidas, nos choros e nas produções também. Eu te amo muito! Tenho certeza que é um presente dado por Deus dado para mim, com a benção dos seus pais, Maria Eunice e Almir José, os quais também agradeço por todo apoio. Nessa minha grande e nova família também não posso deixar de agradecer a meus compadres Maxwell e Kathleen, por todo amor compartilhado e pelos momentos de relaxamento que me proporcionaram em meio às turbulências do doutorado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Giovanny Rebouças pelas orientações e conhecimento repassado em todo esse processo, desde o meu mestrado até aqui. Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rommel Burbano, por me oferecer os meios e condições para que eu pudesse realizar meu trabalho.

Agradeço aos meus amigos de trabalho, que tanto me ajudaram a finalizar essa tarefa, compartilhando ideias, trabalhos e muita empatia. Obrigada por entenderem as minhas faltas e momentos de afastamento ou reclusão e por todo incentivo. Muito obrigada à Sammya, Naiara, Leandro, Alexsandra e ao meu chefe, sempre compreensivo, Dr. Rafael de Deus.

Agradeço a todos meus demais amigos, por todo acalento que me deram, por todo apoio e compreensão. Estarão sempre no meu coração com gratidão. Obrigada pelos inúmeros conselhos, sou mais forte com vocês.

Obrigada a todos.

RESUMO

O câncer gástrico é a quarta neoplasia mais frequente no mundo. A sobrevida relativa de indivíduos acometidos pela neoplasia gástrica é ainda considerada baixa tanto para países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Este mal prognóstico deve-se principalmente pelo diagnóstico tardio que leva a poucas possibilidades de tratamento. O entendimento da carcinogênese gástrica como um processo de múltiplas etapas pode ser revelar biomarcadores capazes de atuar também no prognóstico, como diferencial para um diagnóstico adequado e precoce. A regulação gênica é essencial para a manutenção da integridade e fisiologia celular. Alterações em genes atuantes na regulação, tais como o oncogene *MYC*, são frequentemente observadas para o estabelecimento das neoplasias. Tais alterações permitem mecanismos de crescimento, proliferação, manutenção e invasividade da célula tumoral. Este trabalho tem o objetivo de investigar os genes regulados por *MYC*, de forma a estabelecer padrões de expressão gênica que guiem ferramentas para diagnóstico e prognóstico da neoplasia gástrica. Em uma primeira abordagem foi utilizada cultura de células estabelecidas a partir de pacientes com câncer gástrico do tipo metastático, para, por meio de silenciamento do gene *MYC*, Sequenciamento de Nova Geração e arranjos de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), triar um painel de genes importantes regulados por *MYC* e seus perfis de expressão gênica. Do painel de 150 genes *downregulated* associados ao oncogene *MYC* foram selecionados três genes significativamente correlacionados ao estágio de metástase à distância do câncer gástrico. Foram eles: *UXT*, *MTA2* e *CIAPINI*. Os três genes foram fortemente associados aos estágios mais avançados dessa neoplasia ($P < 0,0001$). No entanto, apenas *UXT* e *CIAPINI* puderam detectar metástases à distância em pacientes em estágios iniciais da doença ($P < 0,0001$) com alta sensibilidade (92,3% para *UXT* e 93,3% para *CIAPINI*) e especificidade (90,7% para *UXT* e 96,2% para *CIAPINI*). A alta expressão de *UXT* e *CIAPINI* também foi associada significativamente a uma baixa sobrevida global dos pacientes diagnosticados com câncer gástrico ($P < 0,0001$). O estudo conclui que o oncogene *MYC* atua regulando mais de 2000 genes em linhagem de câncer gástrico, onde pelo menos 150 genes estão associados a estágios avançados deste câncer em pacientes acometidos coma a neoplasia. Além disso, dentre eles, os genes *UXT* e *CIAPINI* podem ser utilizados para guiar o prognóstico em câncer gástrico.

PALAVRAS – CHAVE: Câncer gástrico, gene *MYC*, expressão gênica, biomarcadores

ABSTRACT

Gastric cancer is the fourth most frequent neoplasm in the world. It causes more than 14,000 deaths per year in Brazil. Most gastric cancer research focuses on countries with high incidence rates, such as Japan. As the gastric cancer neoplasia is characterized by several factors, it is increasingly necessary to improve the management of gastric cancer in Brazil with the help of additional studies and public policies. The relative survival of individuals affected by gastric neoplasia is five years, which is actually considered low for both developed and developing countries. This poor prognosis is mainly due to late diagnosis leading to few treatment possibilities. Therefore, this work aims to investigate the genes regulated by the *MYC* oncogene to establish patterns of gene expression that guide tools for diagnosis and prognosis of gastric neoplasia. We used a cell line established from patients with gastric cancer of the metastatic type for, through *MYC* gene silencing, Next Generation Sequencing and quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) arrangements, to screen a panel of important genes regulated by *MYC* and their gene expression profiles. We selected three genes regulated by the *MYC* oncogene significantly correlated to the stage of distant metastasis of gastric cancer from the panel of 150 down-regulated genes: *UXT*, *MTA2*, and *CIAPIN1*. We found all three genes strongly associated with the more advanced stages of this cancer ($P < 0.0001$). However, only *UXT* and *CIAPIN1* were able to detect distant metastases in patients with early disease ($P < 0.0001$) with high sensitivity (92.3% for *UXT* and 93.3% for *CIAPIN1*) and specificity (90.7% for *UXT* and 96.2% for *CIAPIN1*). In addition, the high expression of *UXT* and *CIAPIN1* was significantly associated with a low overall survival of patients diagnosed with gastric cancer ($P < 0.0001$). The study concludes that the *MYC* oncogene regulates thousands of genes in gastric carcinogenesis and some of these genes are associated with advanced stages of cancer, such as in individuals with distant metastases. Thus, such marker genes can be used to guide the prognosis and treatment of patients with gastric cancer.

KEYWORDS: Gastric cancer, *MYC* gene, gene expression, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia do estômago humano.....	14
Figura 2 – Cortes histológicos das partes do estômago humano normal	15
Figura 3 – Fatores que influenciam no desenvolvimento da carcinogênese gástrica.....	17
Figura 4 – Etapas de Sequenciamento de Nova Geração - RNA-Seq.....	30
Figura 5 – Volcano plot de genes diferencialmente expressos (GDEs) para a linhagem AGP01 após o silenciamento de MYC.....	39
Figura 6 – <i>Box plots</i> da expressão relativa normalizada das proteínas UXT, MTA2 e CIAPIN1 em tecido tumoral gástrico de pacientes sem metástase (M0) e com metástase detectada (M1)...	42
Figura 7 – <i>Box plots</i> da expressão relativa normalizada dos genes <i>UXT</i> , <i>MTA2</i> e <i>CIAPIN1</i> em tecido tumoral gástrico de pacientes sem metástase (M0) e com metástase detectada (M1).....	43
Figura 8 – Comparação de tecido de tumores gástricos primários de pacientes sem metástase (M0) e com metástase (M1) na detecção de proteínas UXT e CIAPIN1, por imuno-histoquímica	44
Figura 9 – Análise da curva ROC para definir o valor de corte da expressão gênica na discriminação de grupos de alta expressão e baixa expressão dos genes <i>UXT</i> e <i>CIAPIN1</i>	45
Figura 10 – Análise da sobrevida global em meses de pacientes com tumores gástricos em função da expressão gênica de <i>UXT</i> e <i>CIAPIN1</i>	45
Figura 11 – Quantificação relativa do RNAm e das proteínas codificadas pelo gene <i>UXT</i> de 213 pacientes portadores de câncer gástrico.....	65
Figura 12 – Quantificação relativa do RNAm e das proteínas codificadas pelos genes <i>CIAPIN1</i> de 213 pacientes portadores de câncer gástrico.....	66
Figura 13 – Detecção de proteínas por <i>Western blot</i> revelando o aumento da expressão dos genes <i>UXT</i> e <i>CIAPIN1</i> em tumores primários gástricos de pacientes com metástases (M1) em relação aos tumores primários gástricos de pacientes sem metástases (M0)	67
Figura 14 – Detecção de proteínas por imuno-histoquímica demonstrando o aumento da expressão de <i>UXT</i> em tumores primários gástricos de pacientes com metástases	68
Figura 15 – Detecção de proteínas por imuno-histoquímica demonstrando o aumento da expressão de <i>CIAPIN1</i> em tumores primários gástricos de pacientes com metástases.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação TNM para o estadiamento de carcinomas gástricos	26
Tabela 2 – Relação entre a expressão de mRNA de <i>UXT</i> , <i>MTA2</i> e <i>CIAPIN1</i> e as características clínico-patológicas dos pacientes	40
Tabela Suplementar 1 – Os 150 GEDs <i>downregulated</i> para o conjunto de dados de amostras silenciadas (1S) <i>versus</i> não-silenciadas (1C) da linhagem AGP01	83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Objetivos	13
<i>1.1.1 Objetivo geral</i>	13
<i>1.1.2 Objetivos específicos</i>	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Estômago	14
2.2 Câncer	15
2.3 Câncer gástrico	16
<i>2.3.1 Epidemiologia</i>	16
<i>2.3.2 Fatores epigenéticos</i>	17
<u>2.3.2.1 Metilação de DNA</u>	18
<u>2.3.2.2 Modificações nas Histonas</u>	18
<i>2.3.3 Fatores genéticos</i>	19
<u>2.3.3.1 Fatores hereditário</u>	19
<u>2.3.3.2 Fatores genéticos adquiridos</u>	20
<u>2.3.3.3 Oncogene MYC e genes regulados</u>	21
<i>2.3.4 Fatores ambientais</i>	23
<i>2.3.5 Tipos de câncer gástrico</i>	24
<i>2.3.6 Diagnóstico e prognóstico em câncer gástrico</i>	25
<u>2.3.6.1 Sequenciamento de Nova Geração</u>	28
3 CAPÍTULO 1. NOVOS MARCADORES DE PROGNÓSTICO REVELADOS POR ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMA RNA-Seq APÓS O SILENCIAMENTO DE MYC EM LINHAGEM DE CÂNCER GÁSTRICO METASTÁTICO	32
3.1 Introdução	32
3.2 Metodologia	33
<i>3.2.1 Desenho experimental</i>	33
<i>3.2.1 Linhagem celular AGP01 e silenciamento do MYC</i>	34
<i>3.2.2 Extração RNA/proteína e síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	34
<i>3.2.3 RNA-seq</i>	35
<i>3.2.4 Pacientes</i>	36

3.2.5 <i>qRT-PCR</i>	36
3.2.6 <i>Western blot</i>	37
3.2.7 <i>Imuno-histoquímica</i>	37
3.2.8 <i>Análise estatística</i>	37
3.3 Resultados	38
3.3.1 <i>Silenciamento do MYC na linhagem celular AGP01 e RNA-seq</i>	38
3.3.2 <i>Características clinicopatológicas e expressão de UXT, MTA2 e CIAPINI</i>	39
3.3.3 <i>Análise de sobrevida</i>	44
3.4 Discussão	46
4. CAPÍTULO 2. <i>KITs DE PROGNÓSTICO DE CÂNCER GÁSTRICO</i>	51
4.1 Campo da Invenção.....	51
4.2 Fundamentos da Invenção.....	51
4.3 Técnica Relacionada.....	51
4.4 Sumário da invenção	54
4.5 Breve Descrição das Figuras.....	55
4.6 Descrição Detalhada da Invenção	56
REIVINDICAÇÕES.....	61
RESUMO.....	64
ARQUIVO DE FIGURAS	65
5 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE A. Tabela Suplementar. Os 150 GDEs <i>downregulated</i> para o conjunto de dados combinados da linha celular silenciada (1S) versus não silenciada (1C) de AGP01	83
ANEXO A. Comprovante de submissão de artigo submetido à revista <i>Oncotarget</i> (ISSN 1949-2553)	91
ANEXO B. Comprovante de solicitação de patente NINTEC – Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia/ UFPI.....	92

1 INTRODUÇÃO

A estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2018) indica que até o ano de 2030 o número de mortes por câncer vai aumentar de 7.6 milhões para 13 milhões por ano. Estes dados devem refletir tanto na saúde como na economia mundial, merecendo destaque nas políticas públicas de todos os países.

Dentre as neoplasias malignas mais frequentes no mundo, o câncer gástrico (CID10 C16), representado principalmente na forma de adenocarcinoma, está entre os cinco mais incidentes. Esta doença gera cerca de 738.000 mortes por ano (OMS, 2018) e a terceira principal morte por câncer no mundo (PEREIRA et al, 2018). No Brasil, segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (2018), foi de 21.290 novos casos, sendo 13.540 homens e 7.750 mulheres, somente em 2018.

Nas últimas décadas, foi possível observar um declínio na incidência de casos de câncer gástrico, que pode ser explicado pelos avanços em saúde e nutrição, tais como diminuição nos consumos de sódio e tabaco (RUGGE; FASSAN; GRAHAM, 2015). Por outro lado, nos pacientes acometidos pela doença, a taxa mundial de sobrevida média cumulativa, cinco anos após o diagnóstico, é estimada em aproximadamente 21%. No Brasil, a taxa de sobrevida ainda é considerada baixa e está em torno de 30% dos casos. O diagnóstico tardio é ainda fator determinante no processo terapêutico e a principal causa da baixa sobrevida na população afetada (BRENNER et al., 2009).

Esforços estão sendo lançados para melhorar essas taxas de sobrevida, principalmente no que diz respeito aos fatores ambientais associados ao câncer gástrico, e melhorar diagnóstico/prognóstico por meio de um melhor entendimento da heterogeneidade genética desta neoplasia (TAN e WONG, 2013; VanCUTSEM et al., 2016). A etiologia dos carcinomas gástricos está relacionada a um conjunto de fatores genéticos e epigenéticos com variações de gênero, região e idade, que repercutem sobre suas características clínicas e biológicas. Essa complexidade motiva pesquisas avançadas em todo o mundo acerca da elucidação dos mecanismos da carcinogênese gástrica e de terapias adequadas e eficazes com menores riscos aos pacientes (WU; LIN; TSAI, 2014; TEH et al, 2015).

O prognóstico é uma etapa essencial para o direcionamento terapêutico correto durante o diagnóstico, uma vez que elucidada sobre o risco e agressividade da neoplasia. Neste sentido, é essencial a busca de biomarcadores, que possam caracterizar a doença, a fim de aprimorar e acelerar a detecção da neoplasia e/ou de características de importância prognóstica. Tais biomarcadores podem também identificar fatores determinantes para eficiência em terapia,

sob a perspectiva dos mecanismos de resistência associados alterações genéticas próprias da neoplasia. (ZHOU et al. 2015; KANDA e KODERA, 2015; CORSO e GIORDANO, 2016).

O gene *MYC* participa de uma das mais importantes vias de regulação celular, a via WNT, essencial na homeostase da célula gástrica e crítica para a eficiência da proliferação celular em tecidos com alta taxa proliferativa, como o tecido estomacal. Além de crucial para o desenvolvimento embrionário, alterações na sinalização desta via são bem conhecidas pela associação com os processos de invasão e metástase em diversos tipos de câncer. A maior correlação envolve desregulação de β -catenina (proteína relacionada a adesão célula-célula e comunicação intercelular) e sua acumulação intracelular, que provocam a ativação de fatores de transcrição de célula T, bem como ativação de genes envolvidos nos processos de metástase e invasão. Embora exista uma associação da superexpressão de *MYC* e o câncer gástrico, o seu papel funcional sobre a expressão global de outros genes em vias moleculares importantes ainda não está bem esclarecido (PANDI et al., 2014).

O oncogene *MYC* influencia aproximadamente 15% do genoma humano, por meio da sua interação com sequências E-boxes (*Enhancer Box*) e pelo recrutamento de histonas acetiltransferases. É um fator de transcrição implicado em mais de 50% das neoplasias humanas. A desregulação da expressão de *MYC* pode promover instabilidade genômica e altos níveis de sua proteína cria um ambiente mutagênico, por aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio. Em neoplasias humanas, a superexpressão de *MYC* é atribuída principalmente à amplificação gênica e às translocações cromossômicas (KHALEGHIAN et al, 2016).

Muitos estudos têm explorado a relação entre a modulação da expressão de determinados genes e seus produtos proteicos com a baixa sobrevida observada em pacientes com câncer gástrico, incluindo o gene *MYC* e demais genes a ele funcionalmente relacionados (ZHANG et al, 2016; XU et al, 2017; YOSHIDA et al, 2017; PAN et al, 2018). No entanto, as consequências das alterações no seu nível de expressão na regulação de outros genes importantes para o prognóstico ainda é pouco explorada (STAHL et al., 2015)

Dada a relevância epidemiológica da neoplasia gástrica e a importância do entendimento desta doença para os avanços técnicos e tecnológicos no diagnóstico e terapia, nossa pesquisa oferece uma abordagem na elucidação do papel de *MYC* na neoplasia gástrica, no que diz respeito ao diagnóstico/prognóstico, bem como inclui a seleção de um painel gênico baseado neste oncogene capaz de aprimorar estratégias no combate ao câncer gástrico.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo geral a triagem de genes regulados pelo oncogene *MYC* em linhagem celular de câncer gástrico *in vitro* e a avaliação do potencial de genes candidatos como biomarcadores de prognóstico de neoplasia gástrica.

1.1.2 Objetivos específicos

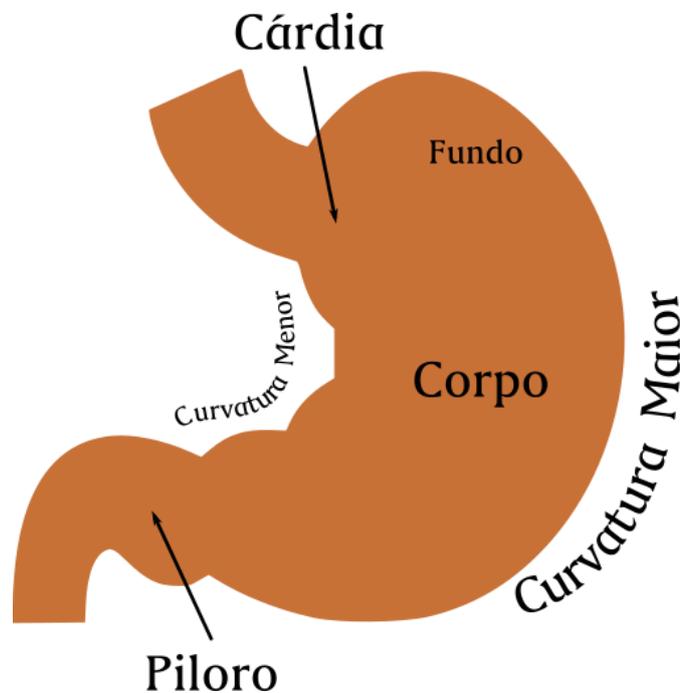
- Realizar por meio de silenciamento gênico, a triagem de genes regulados pelo oncogene *MYC* em linhagem celular de câncer gástrico do tipo metastático (AGP01);
- Comparar o perfil de expressão dos genes entre as linhagens celulares de câncer gástrico AGP01, com e sem silenciamento do gene *MYC*, por meio de Sequenciamento de Nova Geração;
- Encontrar os genes regulados pelo oncogene *MYC* candidatos a biomarcadores, por meio de métodos de bioinformática;
- Selecionar os genes candidatos a biomarcador de prognóstico da neoplasia gástrica na linhagem celular do tipo metastático AGP01.
- Validar os dados de sequenciamento dos genes de prognóstico comparando a expressão dos genes selecionados, em amostras de tecido gástrico de pacientes acometidos com a câncer gástrico, por meio de PCR em tempo real (qRT-PCR), *Western Blot* e Imuno-histoquímica;
- Comparar os perfis de expressão dos genes candidatos entre pacientes de grau metastático e não metastático;
- Elaborar e solicitar, junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial, por meio do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI, o depósito de pedido de patente, ou de certificado de adição da invenção PII107322-5, dos perfis de expressão gênica, que tenham aplicabilidade para o desenvolvimento de nova metodologia diagnóstica e prognóstica do câncer gástrico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estômago

O estômago é um órgão do sistema digestório, localizado na parte superior do abdômen, logo abaixo do diafragma. Apresenta-se em forma de foice, é composto por quatro regiões definidas por suas características histológicas ou anatômicas. São elas cárdia, fundo, corpo e piloro (Figura 1). A anatomia do estômago repercute sobre sua fisiologia e é importante na etiologia de algumas doenças a ele relacionadas (HANKIN et al, 2015).

Figura 1 – Anatomia simples do estômago humano

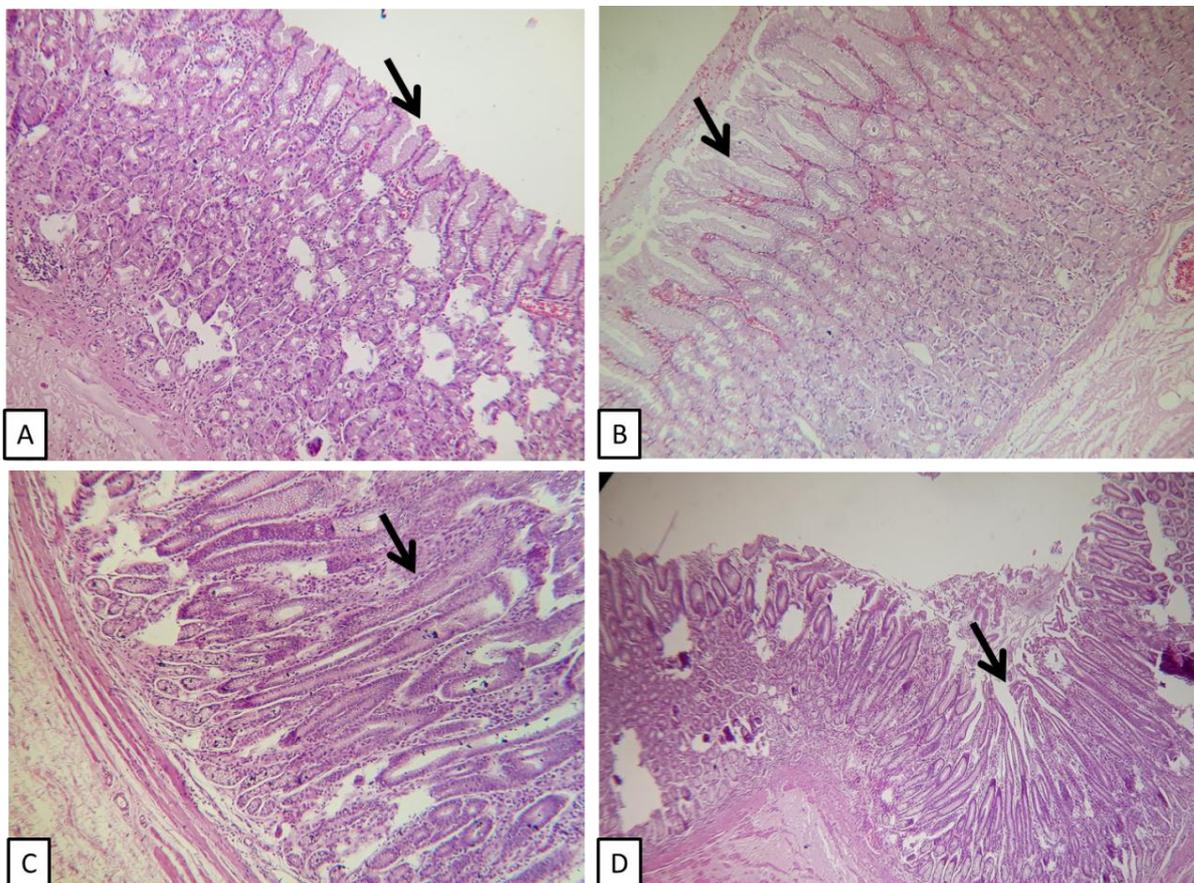


A primeira região do estômago, chamada de cárdia, é caracterizada por células secretoras de muco que formam um epitélio colunar. Este epitélio tende, por toda a extensão do estômago, a invaginar formando fossetas. Na cárdia, as fossetas são menores do que nas demais regiões (Figura 2A). Após a cárdia, encontra-se a região denominada fundo ou região fúndica caracterizada por apresentar fossetas maiores e cerca de três a sete glândulas que desembocam no fundo de cada fosseta (Figura 2B). As glândulas apresentam as células-tronco, as células mucosas do colo, as células oxínticas (ou parietais), as células zimogênicas (ou principais) e as células enteroendócrinas. Em seguida, encontra-se o corpo que não difere histologicamente da região fúndica do estômago. Nessa área, o órgão sofre duas curvaturas, a

curvatura menor (região que forma a incisura angular com o piloro) e a curvatura maior na face oposta. Abaixo do corpo e em comunicação com o intestino delgado, o estômago apresenta uma região com fossetas bastante profundas e glândulas curtas, chamada de antro ou região pilórica (piloro). (Figura 2C e 2D). Entre o piloro e o intestino há uma válvula denominada esfíncter pilórico, responsável por evitar o refluxo do bolo alimentar do intestino para o estômago (JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2017).

No processo digestivo, o estômago é responsável por armazenar o alimento após a passagem pelo esôfago e realizar uma digestão parcial por meio de enzimas secretadas no suco gástrico (HANKIN et al, 2015).

Figura 2 – Cortes histológicos das partes do estômago humano normal



A: Cárdia (Aumento de 100X); B: Fundo e corpo (Aumento de 100X); C: Antro (Aumento de 100X); D-região do antro (Aumento 40X). Coloração Hematoxilina-Eosina. As setas mostram as fossetas gástricas.

2. 2 Câncer

Entende-se como câncer, o estado maligno de uma neoplasia, onde um conjunto de células cresce desordenada e rapidamente, com capacidade de invadir tecidos e órgãos. Seis

alterações na fisiologia celular são essenciais para que a neoplasia seja considerada maligna. São elas: autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores do crescimento, evasão da morte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão tecidual e/ou metástase (VINEIS et al., 2010).

2.3 Câncer gástrico

2.3.1 Epidemiologia

O câncer gástrico representa o quarto tipo de câncer de maior incidência no mundo. Tem uma distribuição geográfica desigual, com taxas que chegam a variar em até dez vezes entre países. As maiores taxas de incidência geralmente localizam-se na Europa Oriental e Ásia Oriental (Japão e China apresentam as maiores taxas de risco), Sul da África, América do Sul e América Central (ZHOU et al, 2016). Nessas regiões, o alto risco está correlacionado principalmente à infecção por *H. pylori*, à dieta e ao alto consumo de sal (FOCK, 2014).

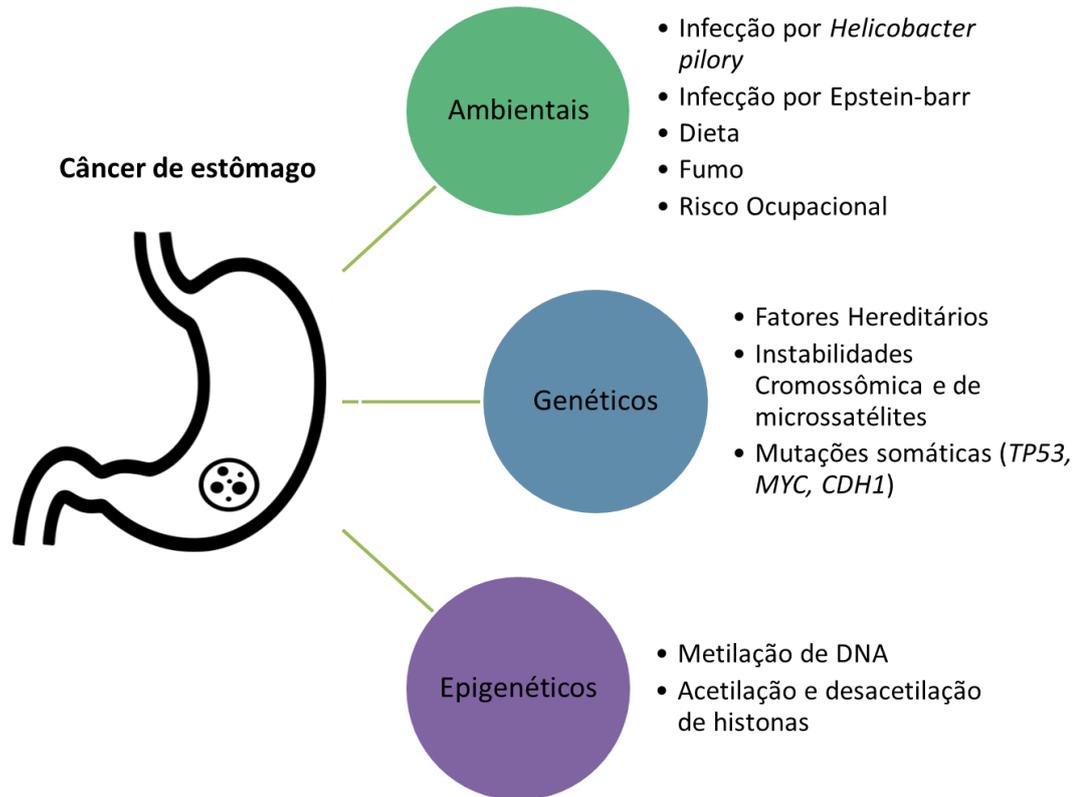
Tanto para o sexo masculino quanto para o feminino a taxa de mortalidade é alta, sendo que o câncer gástrico é a terceira causa de morte por câncer no mundo. Quanto à taxa de letalidade (taxa de mortalidade dividida pela taxa de incidência em um determinado período) o câncer gástrico apresenta mais de 74%. Esta taxa é relativamente alta quando comparado com outros cânceres de grande relevância mundial, como câncer de próstata e de mama. Em países com altos índices de incidência, a taxa de sobrevivência é maior, isso se deve tanto ao diagnóstico precoce da doença quanto a diferenças na biologia e localização dos tumores. (GUGGENHEIN e SHAH, 2013; RUGGE; FASSAN; GRAHAM, 2015).

No Brasil, o câncer gástrico apresenta uma significativa diferença entre a incidência por gênero. Está em terceiro lugar na incidência entre homens e em quinto entre as mulheres. Segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2015, o número de mortes foi de 14.264, sendo 9.132 em homens e 5.132 mulheres. Cerca de 65% dos pacientes diagnosticados tem mais de 50 anos de idade, sendo a maioria do sexo masculino na faixa etária dos 70 anos de idade. (INCA, 2015; INCA, 2018).

Apesar de a principal incidência ocorrer em países asiáticos, há uma variedade de fatores que incidem sobre as taxas de distribuição, sobrevivência e mortalidade do câncer gástrico no mundo. O acúmulo das alterações provocadas por estes fatores na mucosa do estômago desencadeia a carcinogênese gástrica. Três principais fatores atuam em conjunto

para o desenvolvimento das características do câncer gástrico. São eles: fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (CARCAS, 2014) (Figura 3).

Figura 3 – Fatores que influenciam no desenvolvimento da carcinogênese gástrica



2.3.2 Fatores epigenéticos

A epigenética pode ser definida como o estudo de alterações genéticas hereditárias, que promovem variação na expressão gênica sem, no entanto, haver alteração na sequência do DNA. Algumas dessas alterações são estabelecidas ainda nas fases iniciais do desenvolvimento embriológico e são mantidas de forma a preservar a expressão gênica normal (FU, 2015).

As alterações epigenéticas mais conhecidas do ponto de vista da carcinogênese incluem metilação de DNA, modificações de histonas e modificação por RNA não codificantes (YAN et al., 2016). No câncer gástrico, a epigenética tem um importante papel de regulação de vias ativadas nos diferentes subtipos desta neoplasia.

2.3.2.1 Metilação de DNA

A metilação é uma modificação química na qual normalmente ocorre a adição de um grupamento metil à posição C5 do anel da citosina. A enzima responsável pela catalização dessa reação é a DNA metiltransferase. O produto desse processo é a 5-metilcitidina, que corresponde a menos de 1% do genoma, e é essencial para a regulação normal da expressão gênica. Padrões irregulares de metilação de DNA estão associados ao envelhecimento e à carcinogênese (KLUTSTEIN et al, 2016).

Frequentemente, a hipermetilação de regiões marcadoras no genoma, tais como regiões CpG, está associada a perda da função de genes e a hipometilação com a superexpressão de genes-alvo. Alguns genes supressores de tumor são conhecidos alvos de metilação e inibição de função, tais como E-caderina, *MLH1*, *APC* e *p16* e genes relacionados (*p14* ou *p15*). A frequência de alterações epigenéticas e os genes alvos envolvidos podem ser diferentes do tipo de câncer (PATEL; ROY; RAVI, 2017). A hipermetilação de *p16* está frequentemente associada ao câncer gástrico do tipo intestinal, enquanto que no tipo difuso a hipermetilação é mais encontrada nas regiões promotoras dos genes *CDH1* and *RARβ* (OUE et al., 2002). Diferentes tumores tem padrões de espectro, perfil ou grupo de genes hipermetilados, que são chamados de fenótipo de ilha CpG metilado (em inglês, CIMP). CIMP tem um importante papel na progressão do câncer gástrico, mas pouco se sabe como estas regiões influenciam sobre o prognóstico dessa doença (COSTA e PACHECO, 2013; POWELL et al, 2018).

2.3.2.2 Modificações nas Histonas

A modificação de histonas é um passo essencial para a expressão gênica. As histonas são proteínas carregadas positivamente, que ao se ligarem a carga negativa do DNA, auxiliam o empacotamento da molécula no núcleo celular. Para que ocorra a expressão gênica, essas proteínas devem sofrer alterações de modo a liberar a região do DNA a ser transcrita. A acetilação de histonas é um exemplo ativador transcricional, enquanto que a metilação pode atuar tanto reprimindo como ativando a transcrição de genes (FU, 2015).

No câncer gástrico, a região promotora do gene *p21* é silenciada pela acetilação da histona H3, levando a regulação negativa de mais três genes importantes do metabolismo celular (*p16*, *CDH1* e *MLH1*) (PATEL; ROI; RAVI, 2017).

Outra alteração equivalente é a metilação de histonas no câncer gástrico. Esta modificação ocorre por meio de enzimas específicas, as metiltransferases de histonas. Tais enzimas são responsáveis pela metilação de resíduos de arginina e lisina nas histonas H3 e H4. Dessa forma podem atuar tanto no silenciamento de genes por permitir hipermetilação de regiões promotoras, como no caso de *RIZ1*, ou permitir a superexpressão de outros genes como, *BMI1* e *EZH2*. (CALCAGNO; SMITH; BURBANO, 2015).

2.3.3 Fatores genéticos

As causas genéticas que levam ao desenvolvimento do câncer gástrico podem ocorrer tanto de maneira herdada como adquirida. No entanto, a maioria dos casos não está associada a alterações genéticas hereditárias, onde somente cerca de 3% podem ser assim classificadas (KARIMI et al., 2014).

2.3.3.1 Fatores hereditários

Entre as síndromes hereditárias associadas ao câncer gástrico, a mais comum é a Síndrome de Câncer gástrico difuso hereditário (em inglês, *HDGC*). Esta síndrome está relacionada a uma mutação germinativa heterozigótica do gene que codifica a Caderina 1, também conhecida como E-Caderina (GRAZIANO; HUMAR; GUILFORD, 2003) Outra síndrome hereditária de câncer gástrico é a Polipose proximal do estômago e adenocarcinoma gástrico (em inglês, *GAPPS*) que desenvolve-se a partir de alterações nas glândulas fúndicas, mas suas alterações genéticas são pouco conhecidas. Outros tipos tumorais hereditários como câncer de colón sem polipose, síndrome de Li–Fraumeni, síndrome de Peutz–Jeghers podem também aumentar o risco de desenvolvimento do câncer gástrico (McLEAN e EL-OMAR, 2014).

Sob outro ponto de vista, a etiologia da carcinogênese gástrica adquirida pode ser entendida com uma complexa rede de alterações genéticas, moleculares e bioquímicas que, associadas a componentes ambientais, levam a desregulação da manutenção biológica do tecido gástrico. É importante frisar que o mecanismo e os componentes pelos quais essa rede atua podem variar muito, tornando o câncer gástrico tão heterogêneo quanto pouco diagnosticável nas fases iniciais. Entre as anormalidades que compõem esse conjunto podemos citar: instabilidades cromossômicas, fusão de genes, instabilidades de

microssatélites, Polimorfismos de base única (SNPs) em genes candidados e mudanças no perfil de microRNAs. (MARCOS-PINTO, 2015).

2.3.3.2 Fatores genéticos adquiridos

Erros de replicação podem ocorrer pela inserção ou deleção de pares de bases em regiões repetidas na molécula de DNA conhecidas como microssatélites, este fenômeno é chamado de instabilidade de microssatélites (IM). Geralmente estão associados a erros de reparo no momento da replicação. Muitos tipos de câncer estão associados a erros, que podem funcionar como marcadores moleculares de carcinogênese. Marcadores moleculares de IM podem ser definidos em três níveis distintos, onde IM de alto nível é representado quando há alteração no marcador em mais de 30% na neoplasia; o de baixo nível quando as mudanças são em menos de 30% e as IM estáveis, quando não há alteração em microssatélites. Na neoplasia gástrica, foi caracterizada uma frequência de 17% IM de alto nível, 14% IM de baixo nível e 69% IM estável, em um estudo italiano. Tumores gástricos com IM de alto nível progridem através de mutações em regiões repetitivas de genes envolvidos na regulação do crescimento celular (TGFbRII, IGFIIR, RIZ, TCF4, DP2), na apoptose (BAX, BCL 10, FAS, CASPASE 5, APAF 1) e em genes de reparo de DNA (hMSH6, hMSH3, MED1, RAD50, BLM, ATR, MRE11) (OTTINI et al , 2006).

No que diz respeito à instabilidade cromossômica, mais de 60% dos tumores gastrointestinais apresentam esta característica, que pode ser definida como alterações em regiões cromossômicas ou mesmo a perda destes que resultam em mudanças drásticas na composição do material genético. *TP53* é um dos genes mais importantes envolvidos na regulação do checkpoint mitótico e mutações pontuais em *TP53* são observadas em 30% - 50% dos cânceres gástricos, sendo que o *locus* p53 é alvo de perda de heterozigosidade (em inglês, LOH) em 60% dos casos. A inativação de proteínas envolvidas nos pontos de controle de danos do DNA, metabolismo cromossômico e função do centrosoma, proliferação celular, apoptose, adesão celular e na neoangiogênese também parece estar envolvido na via de instabilidade cromossômica (CIN). A progressão do câncer gástrico com CIN positiva (CIN+) é caracterizada por LOH freqüente no *locus* APC (30% -40%) e, no nível inferior (3% - 20%), por K-ras ativando mutações pontuais, especificamente nos códons 12, 13, 59 e 61 do cromossomo 5 (OTTINI et al , 2006; MALEK e ROKËN, 2017).

Além de TP53, uma importante reguladora do ciclo celular está envolvida em mais de 50% dos casos de câncer gástrico, a proteína MYC (CALCAGNO et al, 2013). A

desregulação da expressão dessa proteína está associada a sua amplificação seja por instabilidade cromossômica ou mesmo fatores epigenéticos. Estudos com silenciamento de *MYC* demonstram um papel crucial da expressão desse gene para o desenvolvimento, sobrevivência e manutenção dos padrões de células tumorais que contribuem para um maior potencial de malignidade (STAHL et al., 2015).

2.3.3.3 Oncogene *MYC* e genes regulados

c-MYC é um importante membro de uma família de genes com menor expressão em tecidos adultos e pouco estudados atualmente, como *n-MYC* e *l-MYC*. (ZHENG et al, 2017). Sua importância foi observada a partir da descoberta de um oncogene viral de aves *v-MYC*, causador de mielocitomas. Este homólogo de *v-MYC* é um proto-oncogene envolvido em vários processos regulatórios celulares. Já durante a embriogênese é largamente expresso de forma a promover a proliferação celular. Também participa da homeostase de tecidos adultos com altas taxas proliferativas, tais como epiderme e tecido intestinal (PELENGARIS et al, 2002).

MYC interliga uma série de linhas de transdução de sinal e é, portanto, um gene de expressão imediata após uma grande parte das respostas a ligações complexo-receptor. Dessa forma, encontra-se altamente regulado por uma gama de moléculas que contribuem para o bom funcionamento da atividade celular. (CONACCI-SORELL et al., 2014)

A proteína codificada por *MYC* liga-se a proteína MAX pelo domínio *carboxy-terminal basic-helix-loop-helix-zipper (bHLHZ)* formando um heterodímero capaz de ligar-se a regiões promotoras de genes alvos específicos. Um papel chave desempenhado *MYC* e *MAX* é a ativação da progressão do ciclo celular, diretamente relacionado ao crescimento e proliferação celular. Uma importante via envolvida nesse processo é a via WNT/ β -catenina que através da regulação negativa de β -catenina pela proteína supressora de tumor APC (*adenomatous polyposis coli*) atua ativando *MYC*, de modo que a perda de APC gera uma expressão constitutiva de *MYC* que está relacionada à tumorigênese (BENETATOS; VARTHOLOMATOS; HATZIMICHAEL, 2014).

Estudos revelam a importância de *MYC* para o início da atividade tumoral. As primeiras pesquisas envolvendo *MYC* e as neoplasias foram reveladas a partir da descoberta de que o gene viral aviário *vMYC* leva ao desenvolvimento de linfomas de células B por inserções retrovirais nas vizinhanças do gene *MYC*. Outros experimentos demonstraram a importância de *MYC* para o desenvolvimento da neoplasia mesmo sem a necessidade da

infecção viral, uma vez que erros na sequência do gene são primordiais para a desregulação na expressão de *MYC* (CALGAGNO et al., 2013).

Atualmente, *MYC* está relacionado a uma gama de neoplasias, que incluem não apenas de tecidos hematopoiéticos, mas também outros cânceres conhecidos como tumores dos sistemas nervoso e intestinal (CONACCI-SORRELL et al., 2014).

Pouco se sabe sobre como outros genes regulados pelo oncogene *MYC* possam estar envolvidos no câncer gástrico, bem como sobre como esses genes atuam para modular o desenvolvimento do tumor maligno em suas diferentes versões. É importante ressaltar que diferentes genes podem ser ativados para atuar em etapas diferentes do processo carcinogênico e no desenvolvimento dos tumores (YOSHIDA, 2018). Dessa forma, uma série de vias moleculares ativadas em resposta ao estabelecimento da neoplasia podem recrutar genes-chave capazes de atuar como biomarcadores de estadiamento e prognóstico dos cânceres (KHALEGHIAN et al, 2016).

O gene *UXT* (*Ubiquitously Expressed Transcript*) é predominantemente expresso no citoplasma em duas isoformas *UXT-V1* e *UXT-V2*, de acordo com o *splincing* alternativo, diferindo apenas em uma porção N-terminal. Esta molécula é capaz de reconhecer o receptor androgênico (AR) e regula resposta a genes envolvidos com essa proteína (KONG et al., 2014). Seu papel no desenvolvimento de neoplasias foi revelado devido sua relação com os mecanismos de apoptose. Apesar da isoforma *UXT-V1* atuar como inibidor da apoptose induzida por NF- κ B, a isoforma *UXT-V2* pode atuar por outras vias pró-apoptóticas em resposta a estímulos diferentes. Assim, *UXT* pode atuar em vias distintas para auxiliar no estabelecimento dos tumores. No entanto, a correlação de *UXT* e o câncer gástrico ainda não está bem esclarecida (QI et al, 2015).

CIAPIN1 (*Cytokine Induced Apoptosis Inhibitor 1*) é um regulador de vias anti-apoptóticas sem homologia com caspases ou membros da família Bcl-2. Esta molécula já foi identificada, em modelos de células B, como um efetor a jusante na via de sinalização Ras. Apesar de estar envolvido também com o desenvolvimento da hematopoese do fígado fetal, é expresso ainda em tecidos adultos e nos diferentes tecidos em diferentes quantidades (SHI et al., 2010). Tal inibidor está associado a uma grande quantidade de tipos tumorais, dentre eles câncer colo retal, renal, de ovário, mieloma e o próprio câncer gástrico. No entanto, o papel de *CIAPIN1* em diferentes tipos de câncer ainda é controverso no que diz respeito às alterações em sua expressão gênica (LI et al, 2007; HAO et al., 2009; SHI et al., 2010; WANG; PAN; LIN, 2015).

2.3.4 Fatores ambientais

Os fatores de risco ambientais associados ao câncer gástrico são importantes mediadores das transformações celulares necessárias ao desenvolvimento do tumor. Entre eles estão a dieta, o uso de álcool e tabaco, bem como a demasiada exposição à radiação. No entanto, o fator de risco ambiental mais frequentemente associado ao risco de desenvolvimento de câncer gástrico é a infecção por *Helicobacter pylori* (KARIMI et al, 2014).

H. pylori é uma bactéria espiral gram-negativa capaz de infectar a mucosa do estômago. Muitas das infecções por *H. pylori* são assintomáticas, o que prejudica o tratamento em estágios iniciais. No entanto, esta bactéria pode causar na mucosa estomacal diversas injúrias, que podem levar a gastrite crônica, úlcera péptica, linfoma associado à célula B da mucosa estomacal e adenocarcinoma gástrico. Apesar da forte associação, mesmo com uma infecção, somente uma minoria desenvolve o câncer de fato, sendo necessários outros fatores de risco concomitantes para o desenvolvimento do tumor (MARTEL et al, 2013).

O risco de infecção é maior em países menos desenvolvidos economicamente, pessoas com idades avançadas e do sexo masculino. Esta infecção está fortemente associada ao tipo intestinal de carcinoma gástrico e pouco associada ao tipo subtipo de carcinoma gástrico de cárdia (CARCAS, 2014).

O risco de câncer gástrico em fumantes pode permanecer por até 14 anos após a cessação do tabagismo. Embora os mecanismos exatos não sejam claros, é provável que a formação espécies reativas de oxigênio e aumento da apoptose podem levar a alterações pré-cancerosas no epitélio gástrico, que juntamente com outros fatores importantes para o desenvolvimento da neoplasia, culminam no câncer gástrico (LEE e DERAKHSHAN, 2013).

Em relação à dieta, o consumo de sal ou alimentos com grandes quantidades de sódio são o principal fator de efeitos adversos no organismo. Alguns estudos evidenciaram que o consumo de sal e comida salgada pode aumentar o risco de câncer gástrico em diversas populações estudadas (D'ELIA et al, 2012; KYPRIDEMOS et al, 2017). Acredita-se que os efeitos adversos de uma série de exposições dietéticas (especialmente carne e peixe curados ou salgados) estejam ligados ao modelo N-nitroso da carcinogênese gástrica. Os compostos N-nitrosos são potentes carcinógenos formados *in vivo* pela nitrosação de amidas ou amins no estômago por nitritos, um processo que é inibido pela vitamina C no suco gástrico. No estômago, os nitritos são derivados principalmente de alimentos e fontes de água, com as

proporções variando de acordo com o padrão alimentar e a fonte de água (FORMAN e BURLEY, 2006).

2.3.5 Tipos de câncer gástrico

Frequentemente, os tumores gástricos apresentam-se com carcinomas, dos quais em mais de 90% dos casos são denominados adenocarcinomas (KARIMI et al, 2014). Várias classificações foram utilizadas baseadas em diferentes sistemas para diferenciar histológica e epidemiologicamente o câncer gástrico. Atualmente, os dois principais métodos de classificação utilizados são a classificação de Lauren (1965) e o sistema TNM (*tumor-nodes-metastasis*) segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) (2016).

De acordo com Lauren (1965), é possível dividir os carcinomas gástricos em dois subtipos, distintos por suas características morfológicas, epidemiológicas e clínicas. São eles: o tipo intestinal e o tipo difuso.

O tipo intestinal, mais associado a homens e com idade avançada, geralmente é causado por processo inflamatório, precedido por infecção por *H. pylori*, que progride para uma gastrite crônica e em seguida hiperplasia ou displasia. A metaplasia geralmente acontece na menor curvatura do estômago, no entanto, pode ocorrer em outras regiões. Alterações em genes como *c-MET* e *KRAS*, concomitante a infecção por *H. pylori* podem auxiliar a progressão do tumor do tipo intestinal (PACHATHUNDIKANDI; TEGTMEYER; BACKERT, 2011; WADHWA et al., 2013).

O tipo difuso é um tipo mais agressivo de tumor de estômago. Mais invasivo e metastático este tumor desenvolve-se precocemente e não está associado a gênero. Desenvolve-se por pancreatite sem atrofia (CREW e NEUGUT, 2006). Geralmente, a etiologia deste tumor se dá pela perda da expressão de E-caderina, essencial para promover características de crescimento e invasão do carcinoma (van der POST et al. 2015)

Muitos carcinomas não podem ser classificados de acordo com Lauren por apresentar características comuns a ambos os tipos histológicos. Por esse motivo, a OMS dividiu os tumores gástricos, em tumores epiteliais e não epiteliais no que diz respeito às características morfológicas e o estadiamento. Nessa classificação, os tipos difuso e intestinal são subtipos de adenocarcinomas, mais frequente dos tipos de carcinoma gástrico, correspondendo a 95% dos casos (PARK et al, 2015).

Alguns estudos revelaram que as características morfológicas e clínicas do tumor de estômago podem estar associadas à posição da lesão na anatomia do órgão. Dessa forma,

outra classificação proposta são os tumores de cárdia e tumores não-cárdia. Tumores de cárdia são mais comuns e apresentam características mais agressivas de invasão e crescimento. Tumores não-cárdia, apesar de menos comum, apresentam um significativo crescimento entre a população e possuem melhor prognóstico (COLQUHOUN et al, 2015; ZHAO et al, 2016).

2.3.6 Diagnóstico e prognóstico em câncer gástrico

Atualmente, o diagnóstico de câncer gástrico é feito por meio de biópsia gastroscópica ou cirúrgica, analisada por patologista experiente, segundo os critérios da OMS. Somente ocorre a biópsia após avaliações iniciais que incluem desde hemograma diferencial a tomografia computadorizada de tórax, abdome e pelve. Exames clínicos seguidos da anamnese incluem a endoscopia digestiva alta e/ou o exame radiológico contrastado do estômago (ZHOU et al., 2016).

Segundo o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (2018), os carcinomas gástricos (cânceres gástricos mais frequentes) devem ser classificados de acordo com o sistema TNM (Tumor [T], linfonodo [N] e metástase [M]) que avalia três principais critérios: tamanho do tumor e invasão do tumor primário para tecidos adjacentes; invasão do tumor em linfonodos e/ou indício de metástase na região do tumor e presença de metástases à distância (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação TNM para o estadiamento de carcinomas gástricos

<i>Classificação</i>	<i>Descrição</i>
Tumor Primário (T)	<p>TX O tumor primário não pode ser avaliado</p> <p>T0 Não há evidência de tumor primário</p> <p>Tis Carcinoma in situ: tumor intra-epitelial sem invasão da lâmina própria</p> <p>T1 Tumor que invade a lâmina própria ou a submucosa.</p> <p>T2 Tumor que invade a muscular própria ou a subserosa.¹</p> <p style="padding-left: 40px;">T2a Tumor que invade a muscular própria</p> <p style="padding-left: 40px;">T2b Tumor que invade a subserosa</p> <p>T3 Tumor que penetra a serosa (peritônio visceral) sem invadir as estruturas adjacentes^{1, 2, 3}</p> <p>T4 Tumor que invade as estruturas adjacentes^{1, 2, 3}</p>
Linfonodos Regionais (N)	<p>NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados</p> <p>N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais</p> <p>N1 Metástase em 1 a 6 linfonodos regionais</p> <p>N2 Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais</p> <p>N3 Metástase em mais de 15 linfonodos regionais</p>
Metástases à distância	<p>MX A presença de metástase à distância não pode ser avaliada</p> <p>M0 Ausência de metástase à distância</p> <p>M1 Metástase à distância</p>

1. O tumor pode penetrar a muscular própria com extensão para os ligamentos gastro-cólico ou gastro-hepático ou para o omento maior ou menor, sem perfuração do peritônio visceral que cobre estas estruturas. Nesse caso, o tumor é classificado como T2b. Se existe perfuração do peritônio visceral que reveste os ligamentos gástricos ou os omentos, o tumor é classificado como T3. 2. As estruturas adjacentes ao estômago são o baço, cólon transverso, fígado, diafragma, pâncreas, parede abdominal, supra-renal, rim, intestino delgado e retroperitônio. 3. A extensão intramural para o duodeno ou esôfago é classificada pela profundidade da maior invasão em qualquer dessas localizações, inclusive o estômago. Fonte: (AJCC, 2018)

O estadiamento é um importante fator utilizado como referência para avaliar o prognóstico da doença no paciente afetado. Entende-se como prognóstico a avaliação de características essenciais dos tumores e dos pacientes que permitem avaliar a progressão tumoral e/ou risco de morte associado ao câncer (ABREU e COIFMAN, 2002). Fatores de prognósticos podem incluir, além das características microscópicas do tumor e da condição geral do paciente, uma série de alterações moleculares complexas ainda, essenciais para o entendimento do desenvolvimento do tumor e da tomada de decisão terapêutica. Por este motivo, é de extrema importância o esclarecimento precoce do prognóstico, uma vez que medidas terapêuticas podem ser tomadas mais rapidamente de modo a aumentar a sobrevivência dos pacientes, bem como impedir medidas prejudiciais (HOWLANDER et al., 2014).

O câncer gástrico apresenta poucos sintomas em suas fases iniciais, o que dificulta o acompanhamento médico adequado e, geralmente, é necessária uma intervenção de emergência, uma vez que o paciente é diagnosticado em estágios avançados da doença (THE et al., 2015). Mesmo com uma gama de exames acessíveis, alguns tipos de câncer gástrico não podem ser diagnosticados em suas fases iniciais, ou não são corretamente diagnosticados por serem pouco diferenciados. O diagnóstico tardio está associado a um pior prognóstico e à diminuição das possibilidades terapêuticas (SUMIYAMA, 2017).

Algumas técnicas de imagem têm sido implantadas na melhoria do diagnóstico precoce, como a endoscopia com magnificação da imagem em banda estreita e a endocitoscopia, que permitem uma melhor visualização da área da lesão, bem como da região de permeio. No entanto, ainda não são bem estabelecidas devido aos altos custos dos equipamentos e manutenção. Ainda erros técnicos podem levar a dificuldade de distinção tecidual que deve ser associada a outros exames clínicos para um diagnóstico acurado. (CERQUETANI e BABA, 2015). Outros avanços na área de diagnóstico por imagem estão associados à detecção de fases avançadas da doença, como por exemplo, durante a busca por metástases; porém, tais procedimentos não são capazes de identificar, sozinhos, a invasão peritoneal (TAKAHASHI; SAIKAWA; KITAGAWA, 2013).

O entendimento da carcinogênese gástrica, como um processo de múltiplas etapas em que o subtipo tumoral apresenta características moleculares bem definidas é essencial para a melhoria dos dados de mortalidade, letalidade e sobrevivência associados aos carcinomas gástricos. Esta relação é de alta relevância tanto para o diagnóstico precoce, como para a terapia melhor direcionada por meio de um prognóstico adequado (TEH et al., 2015).

O diagnóstico molecular é uma ferramenta emergente no diagnóstico precoce e, bastante utilizado atualmente em casos de neoplasias pouco diferenciadas, com as quais o

diagnóstico histológico é ineficaz. Atualmente, uma série de pesquisas busca traçar o perfil molecular dos tumores por meio de biomarcadores capazes de caracterizar os padrões de carcinogênese e permitir não apenas a identificação do estabelecimento da neoplasia, mas também como ela pode evoluir de acordo com as vias moleculares afetadas (ZHOU et al. 2015; KANDA e KODERA, 2015; CORSO e GIORDANO, 2016). No entanto, uma grande parte destes estudos utilizam métodos de bioinformática não validados e não aplicáveis na prática médica de rotina.

Para o diagnóstico molecular de câncer gástrico, são frequentemente utilizados três biomarcadores: os antígenos carboidratos (CAs) 19-9 e 72-4; e o antígeno carcinoembriônico (ISHIGAMI et al., 2001). Apesar de bem estabelecidos estes marcadores apresentam baixa especificidade e sensibilidade o que facilita o resultado de falsos positivos e falsos negativos. Muitos genes são conhecidos na comunidade científica por estarem envolvidos com a neoplasia gástrica, mas a implementação dessas moléculas como marcadores na rotina hospitalar ainda é um desafio (BASS et al., 2014). Os avanços nas técnicas de detecção de material biológico e de caracterização das neoplasias têm se revelado primordiais para alcançar o desafio da busca de biomarcadores.

Atualmente, novas técnicas de análise expressão gênica em larga escala, como os microarranjos e o sequenciamento de nova geração, são responsáveis por grandes descobertas no entendimento da etiologia e caracterização dos tumores. Dessa forma, novos marcadores com grande especificidade e sensibilidade podem ser encontrados dentro de uma vasta análise do perfil de expressão do tumor, com painéis específicos de genes que também podem ser utilizados em diagnóstico e prognóstico na prática clínica (SOON; HARIHARAN; SNYDER, 2013; CHEN et al, 2017; REN et al, 2018).

Tanto o sequenciamento de nova geração quanto os microarranjos são ferramentas capazes de fornecer grande quantidade de dados em pouco tempo. Entretanto, apenas o sequenciamento de nova geração fornece dados a respeito de genes não pré-definidos na pesquisa. Além disso, permite a identificação de expressão gênica global i.e, RNAs não codificantes também podem ser quantificados e eventos como o *splicing* alternativos podem ser esclarecidos (LUTHRA et al., 2015).

2.3.6.1 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

As tecnologias de sequenciamento de nova geração foram inicialmente criadas para tornar o projeto genoma mais eficiente. Essas tecnologias foram a princípio utilizadas para

sequenciar DNA bacteriano onde, até junho de 2012, um total de 3.920 genomas bacterianos e 854 genomas eucariotos já haviam sido completamente sequenciados. Isso se deve, tanto pela rapidez na aquisição dos dados quanto, pelos menores custos da técnica quando comparado às demais ferramentas de sequenciamentos utilizadas na época (SOON, HARIHARAN, SNYDER, 2013).

O sequenciamento de nova geração (NGS) é atualmente uma importante ferramenta no entendimento de muitos tipos de doença, seja nas suas características estruturais, seja na sua etiologia, ou mesmo no seu mecanismo de ação. No que diz respeito ao câncer, esta técnica possibilitou traçar perfis inteiros de expressão gênica que possibilitam a montagem padrões que caracterizam os mais diversos tumores (PARK e KIM, 2016).

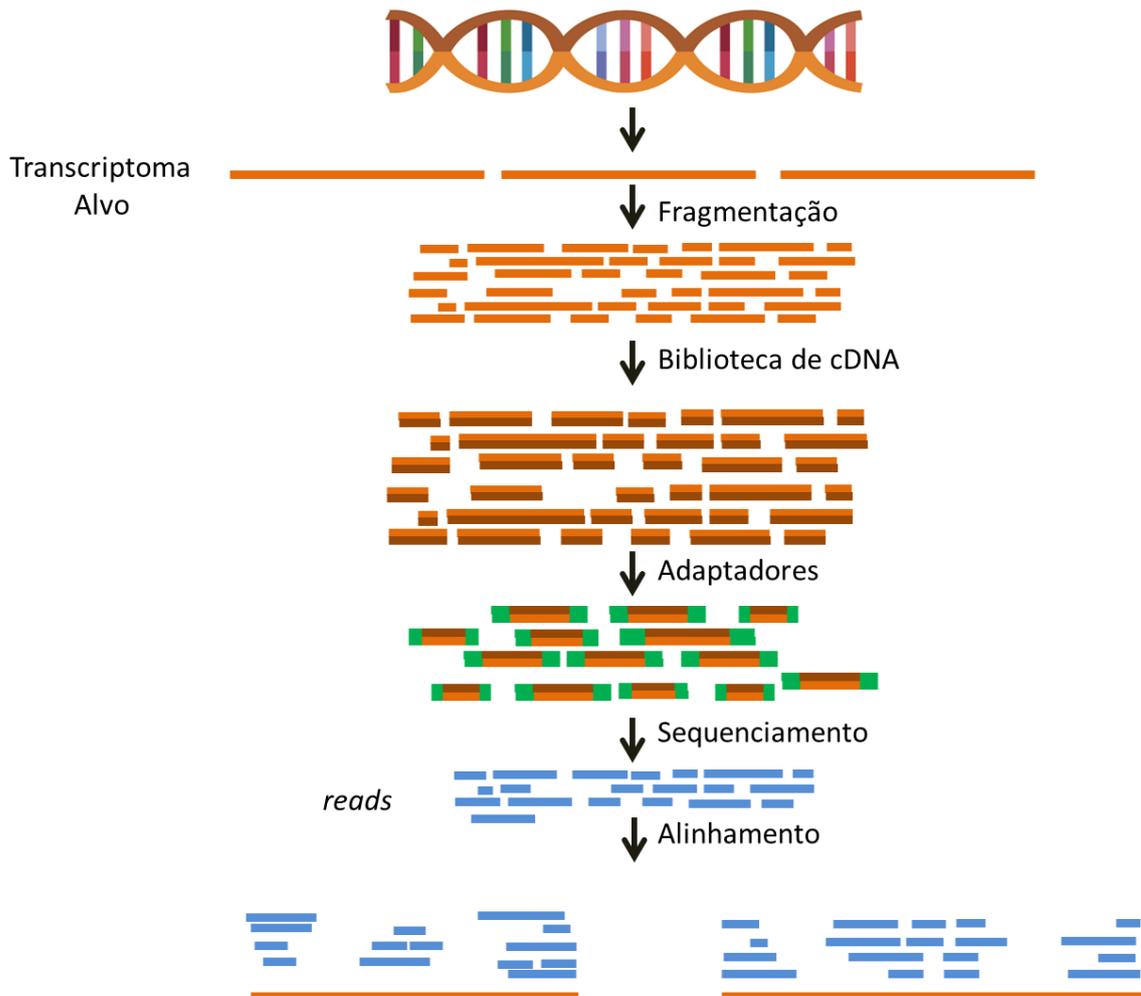
Muitas são as áreas de aplicação dos sequenciamentos de nova geração, tais como a imunoprecipitação de cromatina acoplada a *microarrays* de DNA (ChIPchip) ou sequenciamento (ChIP-seq), sequenciamento de RNA (RNAseq), genotipagem de genoma completo, remontagem de genoma, variação estrutural de genoma de larga escala, detecção de mutação e rastreio de portador, detecção de doenças hereditárias e doenças humanas complexas, preparação de bibliotecas de DNA, terminações emparelhadas e captura genômica, sequenciamento do genoma mitocondrial e genômica pessoal. Essa enorme quantidade de dados coletados auxilia em diversas áreas do campo científico e prático, como estudos de expressão gênica, polimorfismos associados a doenças, farmacogenética, perícia forense, entre outros (PAREEK et al., 2011).

As tecnologias de microarranjos foram as primeiras alternativas para os estudos de expressão gênica em larga escala (HIPPO et al., 2002; LIU et al., 2011). No entanto, além de só poderem analisar sequências conhecidas, apresentam falhas de detecção e ruídos que podem afetar a precisão dos dados. Uma alternativa recentemente elaborada é a utilização do sequenciamento de alto rendimento de RNA (RNA-Seq). Essa técnica é elaborada por meio de bibliotecas de RNA fracionado, pelas quais é possível mapear e quantificar regiões únicas do genoma, bem como a totalidade do transcriptoma com grande rendimento (WU; LIN; TSAI, 2014; PARK e KIM, 2016). Isto é importante para traçar estratégias e buscar alvos cada vez mais específicos para o tratamento do paciente em escala molecular.

Resumidamente, para este tipo de sequenciamento de alto rendimento, uma amostra de RNA total é fragmentada e convertida em cDNA. Dessa forma, estes fragmentos podem ser ligados a adaptadores que permitem o sequenciamento. Para a remontagem dos RNAs sequenciados, estes fragmentos, chamados de leituras, são alinhados a um genoma de referência, ou a um transcriptoma ou ainda, sem genoma de referência, podem montar um

mapa de escala genômica que é composto pela estrutura transcricional de uma determinada amostra (WILHELM e LANDRY, 2009) (Figura 4).

Figura 4 – Etapas de Sequenciamento de Nova Geração - RNA-Seq



Uma amostra de RNA total é fragmentada e convertida em cDNA. Os fragmentos são ligados a adaptadores que ligam as moléculas aos *beads* para o sequenciamento. As moléculas são sequenciadas em leituras ou *reads* que são então alinhados a um genoma de referência, ou a um transcriptoma ou ainda, sem genoma de referência, podem montar um mapa de escala genômica.

Esta técnica permite visualização, não apenas dos perfis de expressão genética, mas também eventos como *splicing* alternativo e mutações pontuais, bem como a identificação de moléculas não previamente identificadas, em uma dada amostra de células. Atualmente, uma gama de moléculas de RNAs não codificantes (ncRNAs) foi identificada e suas relações com a regulação de genes e na estrutura da cromatina vem sendo esclarecida (SHUKLA et al, 2018).

O Sequenciamento de RNA foi uma revolução na busca de biomarcadores, uma vez que permite a comparação fiel entre a expressão em um dado material canceroso e um normal. Mesmo com diferentes tipos de amostra é possível utilizar uma seleção de enriquecimento adequada capaz de manipular, armazenar e disponibilizar melhor os dados para torná-los mais acessíveis e com maior confiabilidade (LUTHRA et al., 2015, ZIOGAS; KYROCHRISTOS; ROUKOS, 2018).

3. Capítulo 1

NOVOS MARCADORES DE PROGNÓSTICO REVELADOS POR ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMA RNA-Seq APÓS O SILENCIAMENTO DE MYC EM LINHAGEM DE CÂNCER GÁSTRICO METASTÁTICO
Artigo submetido à revista Oncotarget (ISSN 1949-2553) (ANEXO A)

3.1 Introdução

O prognóstico é uma das etapas do diagnóstico essenciais ao direcionamento da terapia oncológica. Quanto mais cedo e mais eficaz for o diagnóstico, melhor é o prognóstico do paciente (RUGGE; FASSAN, GRAHAM, 2015). No que diz respeito ao câncer gástrico, terceira causa de morte por câncer no mundo (CLAASSEN et al, 2018), o diagnóstico precoce é dificultado principalmente pela baixa eficiência dos exames endoscópicos convencionais (LAZAR et al, 2018). Apesar dos avanços no entendimento sobre os mecanismos moleculares da carcinogênese gástrica, o diagnóstico e a avaliação prognóstica, que irão definir o sucesso terapêutico, ainda dependem de métodos histopatológicos. A maioria dos pacientes é diagnosticada em estágios avançados quando, mesmo após a ressecção cirúrgica, os tratamentos quimioterápicos tornam-se paliativos. Deste modo, a taxa de sobrevivência dos pacientes com câncer gástrico ainda é baixa e apenas 20% a 25% sobrevivem cinco anos após o diagnóstico (WU et al, 2014; ROY et al, 2016).

Pesquisas recentes têm demonstrado um importante papel de alterações moleculares típicas como promotoras de perfis genéticos que caracterizam os tumores gástricos em estágios avançados, dentre as quais destaca-se a amplificação do oncogene *MYC* (8q24) (STAHL et al, 2015; WANG et al, 2016). A proteína *MYC* influencia aproximadamente 15% dos genes do genoma humano, por meio da sua interação com sequências E-boxes (Enhancer Box) e pelo recrutamento de histonas acetiltransferases (KHALEGHIAN et al, 2016). A desregulação da expressão de *MYC* promove instabilidade genômica e a presença de altos níveis de *MYC* cria um ambiente mutagênico, por aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (VITA e HENRIKSSON, 2006; WOLF, 2015).

O uso de linhagens celulares como modelo para o estudo dos tumores é uma ferramenta útil em biologia molecular e farmacologia para elucidar características genéticas e

padrões moleculares nas neoplasias (JIANG et al, 2017). A linhagem celular AGP01 foi estabelecida e caracterizada por nosso grupo de pesquisa a partir de células de líquido ascítico de paciente com adenocarcinoma gástrico metastático. A AGP01 exhibe cariótipo com alterações cromossômicas clonais como, por exemplo, a trissomia 8, aneuploidia que resulta na amplificação do *MYC* (LEAL et al, 2009). Estudos sugerem que quanto mais avançado o estágio do câncer gástrico, maior é a expressão do *MYC* nas células tumorais. Este padrão está associado a um pior prognóstico, embora o papel funcional do *MYC* sobre a expressão global de outros genes em vias moleculares importantes ainda não esteja bem esclarecido (KHALEGHIAN et al, 2016; PANDI et al, 2014; YOSHIDA et al, 2018).

A identificação de marcadores moleculares de prognóstico, tais como genes com padrões específicos de expressão em amostras de estágio avançado, permitiria uma melhor abordagem terapêutica e, conseqüentemente, melhora na sobrevivência dos pacientes (CONACCI-SORRELL et al, 2014; TEH et al, 2015; LAZAR et al, 2018). Diante do importante papel que *MYC* parece desempenhar na progressão do câncer gástrico, o estudo dos genes por ele regulados pode fornecer valiosos candidatos a biomarcadores para estratificação do risco do câncer gástrico e escolha do tratamento. Por este motivo, o objetivo deste estudo foi avaliar o valor prognóstico e preditivo de genes candidatos regulados pelo *MYC*, selecionados a partir de sequenciamento de RNA de alto rendimento (RNA-Seq) em linhagem celular de adenocarcinoma gástrico metastático (AGP01), antes e após seu silenciamento com siRNA.

3.2 Metodologia

3.2.1 Desenho experimental

Inicialmente, nós utilizamos a linhagem celular AGP01, estabelecida a partir de células metastáticas de paciente acometido com adenocarcinoma gástrico, para avaliar o potencial de *MYC* na regulação de genes atuantes no processo de metástase em câncer gástrico. Esta linhagem é caracterizada pela amplificação de *MYC*, uma alteração genética conhecida como agente na carcinogênese. Para tanto, realizamos o silenciamento do gene *MYC* por meio de miRNAs de interferência.

A seguir, a quantificação da expressão gênica das amostras celulares foi realizada por meio de sequenciamento por semicondutor de íons (RNA-Seq) para a comparação das amostras da linhagem AGP01 com e sem silenciamento. Utilizando ferramentas de

bioinformática, encontramos os biomarcadores associados à superexpressão de *MYC*, selecionando entre os GDEs *downregulated* àqueles mais diferencialmente expressos.

Após a seleção de genes, nós avaliamos o potencial de biomarcador de prognóstico, por meio da análise da expressão gênica e proteica desses genes em pacientes acometidos com câncer gástrico. Para tanto, os níveis de expressão dos genes candidatos, foram analisados em amostras de tecido neoplásico (tumor primário) em comparação às amostras não neoplásicas desses pacientes. Os níveis de expressão gênica e proteica também foram relacionados às características clinico-patológicas dos pacientes e a sobrevida foi avaliada por até seis anos após o diagnóstico. Assim, nós avaliamos não apenas o aumento da expressão gênica, mas também a sua relação com o prognóstico dos pacientes analisados.

3.2.2 Linhagem celular AGP01 e silenciamento do *MYC*

A linhagem celular AGP01 utilizada neste estudo foi previamente estabelecida e caracteriza pelo nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, PA, Brasil, a partir de células de líquido ascítico de paciente com adenocarcinoma gástrico metastático. A AGP01 apresenta alterações cromossômicas e molecular marcantes, dentre as quais destacam-se a trissomia do cromossomo 8 e a amplificação do *MYC* (LEAL et al, 2009).

Para os ensaios de silenciamento, 1×10^5 células foram semeadas em placas de cultura de células de 12 poços. O silenciamento do gene *MYC* foi realizado por meio de três diferentes pequenos RNAs de interferência (siRNAs) específicos para este oncogene (Silencer Select siRNAs: s9129, s9130 e s9131; Thermo Fisher Scientific, USA). Para induzir e monitorar a eficiência dos siRNAs foi utilizado o *Silencer® siRNA Starter kit* (Ambion, USA). O monitoramento do mRNA do *MYC* foi feito por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) (assay ID: Hs00153408_m1; Thermo Fisher Scientific) e a avaliação do silenciamento da expressão da proteína MYC foi realizada por *Western blot*. Para avaliar a viabilidade das células após a transfecção foram realizados os testes de invasão e migração celular e do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Estes experimentos e todos os descritos a seguir foram realizados em triplicata.

3.2.3 Extração RNA/proteína e síntese de DNA complementar (cDNA)

A extração de RNA total e proteínas da linhagem celular AGP01 (com e sem silenciamento de *MYC*) foi realizada por meio do AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen, USA), segundo instruções do fabricante. A quantificação e a qualidade do RNA e das proteínas extraídas foram avaliadas no espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). A integridade do RNA foi determinada pelo número de integridade do RNA (RIN), utilizando a plataforma BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA) (FLEIGE et al, 2006). O RNA extraído foi submetido à síntese de cDNA utilizando *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems, USA), seguindo as instruções do fabricante.

3.2.4 RNA-Seq

Os transcriptomas da linhagem celular AGP01 obtidos antes e após o silenciamento do *MYC* foram avaliados por RNA-Seq e estão disponíveis no banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO), por meio dos códigos de acesso GSM2147866 e GSM2147867, respectivamente. Para a preparação de bibliotecas o RNA total de cada amostra foi tratado com DNAase-I para degradar possível contaminação com DNA. Posteriormente, o mRNA foi enriquecido utilizando Dynabeads Oligo(dt)25 (Thermo Fisher Scientific). O mRNA enriquecido foi fragmentado em fragmentos menores de 200 bps, aproximadamente, ligado a adaptadores com sequências conhecidas que eram únicas para cada amostra. As amostras foram conectadas a esferas magnéticas contendo sequências complementares para os adaptadores e em seguida, inserido em micropoços onde uma emulsão-PCR para a síntese de cDNA foi realizada (Ilustra RT-PCR Ready-To-Go Beads; GE Healthcare Lifesciences, UK). Durante a etapa de controle de qualidade, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) foi usado para qualificar e quantificar a biblioteca de amostras.

A plataforma Ion Proton™ (Thermo Fisher Scientific) foi utilizada para o RNA-Seq. As amostras foram carregadas em chip Ion Proton v2 PI, utilizando o reagente Ion PI™ 200 Sequencing Kit v3 (Thermo Fisher Scientific), e sequenciadas em uma única corrida multiplex. Os dados brutos do sequenciamento, conhecidos como leituras brutas, foram submetidos a um controle de qualidade, o qual remove resíduos de adaptadores e leituras muito pequenas. As leituras limpas foram alinhadas às sequências de referência do genoma humano (Hg19/GRCh37). As leituras alinhadas foram mapeadas e quantificadas usando o *Torrent Mapping Alignment Program* (TMAP), que suporta diferentes algoritmos de alinhamento (NING et al, 2001; LI et al, 2009; LI et al, 2010; LI et al, 2012). A seleção dos

genes diferencialmente expressos (GDEs) foi feita por meio de ferramentas de bioinformática e estatística, incluindo os níveis de expressão dos genes e análises profundas, conforme o item 3.2.9 (Análise Estatística). Três genes selecionados aleatoriamente dentre os 150 GDEs mais *downregulated* foram utilizados para validação por qRT-PCR, *Western blot* e imunohistoquímica em amostras de tecido tumoral de pacientes com câncer gástrico.

3.2.5 Pacientes

Para validação do efeito prognóstico e preditivo dos GDEs candidatos, dados clínico-patológicos e amostras tumorais foram obtidas de 213 pacientes com câncer gástrico atendidos consecutivamente no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB), da Universidade Federal do Pará, Pará, Brasil, entre janeiro de 2004 e maio de 2018. Os dados e as amostras teciduais de pacientes tratados sem quimioterapia pré-operatória foram obtidos após consentimento informado, com aprovação do Comitê de Ética do HUIBB. De cada paciente também foram coletados espécimes de tecido não neoplásico do estômago, que foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até a purificação de proteínas e ácidos nucleicos. Todas as amostras tumorais foram histologicamente diagnosticadas como adenocarcinoma gástricos e caracterizadas quanto às variáveis gênero e idade do paciente, localização do tumor, infecção por *H. pylori* (por teste rápido de urease, teste respiratório de ureia, exame histológico e PCR para detecção do fator de virulência *CagA*), infecção pelo vírus *Epstein-Barr* (por teste de hibridização *in situ*), tipo histopatológico do tumor Lauren (1965), extensão do tumor sobre os tecidos gástricos (T), presença de metástase em linfonodos (N), presença de metástases à distância (M) e estadiamento segundo o sistema TNM da American Joint Council on Cancer (AJCC) (AMIM et al, 2017).

A extração de RNA total, proteínas e síntese cDNA foram realizadas conforme metodologia descritas para a linhagem celular AGP01 e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed (Biotium, USA).

3.2.6 qRT-PCR

As reações de qRT-PCR foram realizadas usando um *StepOnePlus* Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com o *Taqman Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems), como sugerido pelo fabricante. As reações foram incubadas numa placa óptica de 96 poços a 95 °C durante 10 min, seguidas de 40 ciclos de 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 min. Os valores do ciclo limiar (Ct) foram determinados usando as configurações de

limite padrão. O gene *ACTB* (*ACTB*: 4333762F) foi selecionado como controle interno. A quantificação relativa da expressão gênica foi calculada de acordo com Livak e Schmittgen (2001). A amostra controle não neoplásica correspondente foi designada como um calibrador para cada amostra tumoral.

3.2.7 *Western blot*

A análise de *Western blot* foi realizada conforme descrito anteriormente por Tu et al. (2014). Resumidamente, as amostras de tecido de tumor primário gástrico foram processadas e aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS e submetidas à eletroforese. Em seguida, as proteínas do gel de eletroforese foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno e marcadas com os anticorpos específicos para as proteínas dos GDEs selecionados (PA5-18852; PA5-19978; PA5-59903; Thermo Fisher Scientific). A detecção dos imunocomplexos foi feita pelo método de quimioluminescência utilizando o *ECL Advance Western blotting kit* (GE Healthcare Lifesciences).

3.2.8 *Imuno-histoquímica*

A imunorreatividade das proteínas dos genes selecionados foi avaliada por imuno-histoquímica nas amostras de tecido de tumor primário gástrico parafinado. O método imuno-histoquímico adotado foi o da estreptavidina-biotina-peroxidase descrito por Hsu et al. (1981), com modificações sugeridas por Calcagno et al. (2006). O parâmetro de normalidade foi definido utilizando amostras de tecido gástrico normal (não tumoral) fixadas em formamida e incluídas em parafina, obtidas do material de rotina. Foi considerada como expressão positiva, quando a imunorreatividade foi detectada em mais de 10% das células do corte histológico.

3.2.9 *Análise estatística*

Para análise de sequenciamento de alto rendimento, o método de análise da distribuição de Poisson foi usado para rastrear GDEs entre as amostras pareadas, por meio da significância de perfis da expressão digital do gene, conforme Audic e Claverie (1997). Para selecionar os GDEs mais significantes (*downregulated e upregulated*) foram considerados os valores de \log_2 *fold change* $|\log_2(\text{FC})| \geq 1$, *false discovery rate* (FDR) $\leq 0,05$ e $P < 0,05$. Foram feitas correções do valor de P com o método de Bonferroni (ABDI, 2007) e FDR (BENJAMINI e YEKUTIELI, 2007). Para montar uma visão geral dos perfis de expressão

entre as amostras silenciadas e não silenciadas na linhagem AGP01, usando a correlação de Pearson, foi realizada a análise de agrupamento hierárquico com base no valor de expressão de todos os mRNAs dos GDEs mais significativos, usando o módulo GENE-E da ferramenta GenePattern 3.9.9. A análise da quantificação da expressão gênica por qRT-PCR e *Western blot* foi realizada por meio do *QuantStudio Flex Real-Time PCR Software* (versão 1.2.2, Thermo Fisher Scientific). O teste T de *Student* não pareado foi escolhido para avaliar as diferenças significativas.

A associação da expressão dos genes candidatos selecionados com as variáveis clínico-patológicas foi avaliada por meio de análise de variância ANOVA, seguida de teste de Tukey. Os níveis de expressão gênica foram divididos em níveis “alto” e “baixo” usando as curvas de características operacionais do receptor (ROC) com máxima verossimilhança parcial e área sob a curva ROC (AUC). A maior AUC identificou o melhor ponto de corte (*cutoff*) de nível de expressão que foi considerado para a análise de Kaplan-Meier. Os pacientes foram classificados de acordo com esse valor limite, de forma que acima do *cutoff*, o paciente foi marcado como “alta expressão” e abaixo do *cutoff* “baixa expressão”. Os pacientes que não tiveram o evento (morte) foram censurados na última data de acompanhamento ou após seis anos e três meses. A análise de Kaplan-Meier com teste de log-rank foi usada para estimar a probabilidade de sobrevivência para os grupos abaixo e acima do *cutoff* para cada gene selecionado.

As análises estatísticas foram realizadas com os programas GraphPad Prism (6.0) e R (3.0.2) e valores de $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$ e $****P < 0,0001$ foram considerados estatisticamente significantes.

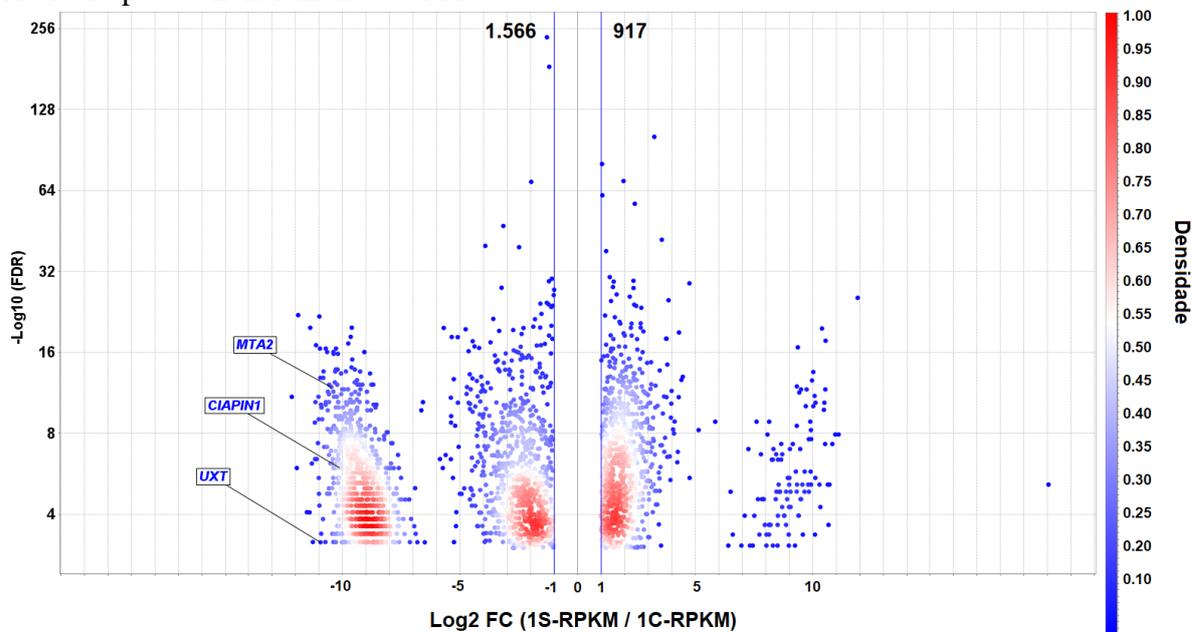
3.3 Resultados

3.3.1 Silenciamento do MYC na linhagem celular AGP01 e RNA-seq

O silenciamento de *MYC* na linhagem celular AGP01 resultou em diminuição de 73% na sua expressão relativa em comparação à expressão de *MYC* nas células não silenciadas. Aproximadamente 11 e 13 milhões de leituras de RNA-seq foram geradas para as células AGP01 *MYC* não-silenciadas e *MYC*-silenciadas, respectivamente, e revelaram um total de 2.483 GDEs, dos quais 917 foram *upregulated* e 1.566 *downregulated* em consequência do silenciamento de *MYC*. Os genes *downregulated* representam genes cuja superexpressão na linhagem AGP01 é influenciada, direta ou indiretamente, pelos altos níveis de *MYC* que

caracterizam essa linhagem de câncer gástrico metastático. Visto que a amplificação de *MYC* é um evento recorrente em pacientes com câncer gástrico, é razoável inferir que tais genes também podem estar superexpressos nos tecidos tumorais destes pacientes. Neste sentido, selecionamos aleatoriamente três dentre os 150 genes mais *downregulated* após silenciamento de *MYC* (APÊNDICE A), para avaliar seu valor prognóstico e preditivo em amostras clínicas de câncer gástrico. Os genes selecionados foram o *UXT* (*ubiquitously expressed prefoldin like chaperone*), *MTA2* (*metastasis associated 1 family member 2*) e *CIAPINI* (*cytokine induced apoptosis inhibitor 1*) (Figura 5).

Figura 5 – Volcano plot de genes diferencialmente expressos (GDEs) para a linhagem AGP01 após o silenciamento de *MYC*



Uma comparação direta entre células *MYC*-silenciadas e células *MYC* não-silenciadas está indicada. $-\text{Log}_{10}(\text{FDR}) \leq 0,05$ (eixo Y) e o ponto de corte $|\text{Log}_2(\text{FC})| \geq 1$ (eixo X) mostram os pontos em azul, indicando os GDEs *downregulated* (lado esquerdo) e *upregulated* (lado direito). Os genes *UXT*, *CIAPINI* e *MTA2* são destacados dentro dos genes significativamente *downregulated*. O gráfico do vulcão foi obtido a partir do teste Audic-Claverie. A densidade foi calculada para visualizar a sobreposição de genes (pontos em vermelho). RPKM: Reads per kilo base per million mapped reads.

3.3.2 Características clinicopatológicas e expressão de *UXT*, *MTA2* e *CIAPINI*

As médias de expressão do mRNA dos genes *UXT*, *MTA2* e *CIAPINI* nos tecidos tumorais de pacientes com diferentes características clinicopatológicas são mostradas na Tabela 2. A expressão dos três genes foi significativamente maior nas variáveis: invasão da

serosa positiva (T3/T4) (*UXT*: $1,784 \pm 0,656$; *MTA2*: $2,034 \pm 0,375$; *CIAPINI*: $1,888 \pm 0,547$, **** $P < 0,0001$), Metástase linfonodal positiva (N1) (*UXT*: $1,123 \pm 0,112$; *MTA2*: $1,871 \pm 0,462$; *CIAPINI*: $1,875 \pm 0,592$, **** $P < 0,0001$) e metástase à distância positiva (M1) (*UXT*: $2,010 \pm 0,482$; *MTA2*: $2,016 \pm 0,462$; *CIAPINI*: $2,292 \pm 0,452$, **** $P < 0,0001$). Estes resultados sugerem que os genes selecionados têm forte correlação com estágios avançados da neoplasia gástrica e, conseqüentemente, com pior prognóstico. A expressão de *MTA2* também foi maior em pacientes com idade ≥ 61 anos ($1,880 \pm 0,433$, * $P = 0,024$) e com câncer gástrico do tipo intestinal ($1,898 \pm 0,451$, ** $P = 0,005$).

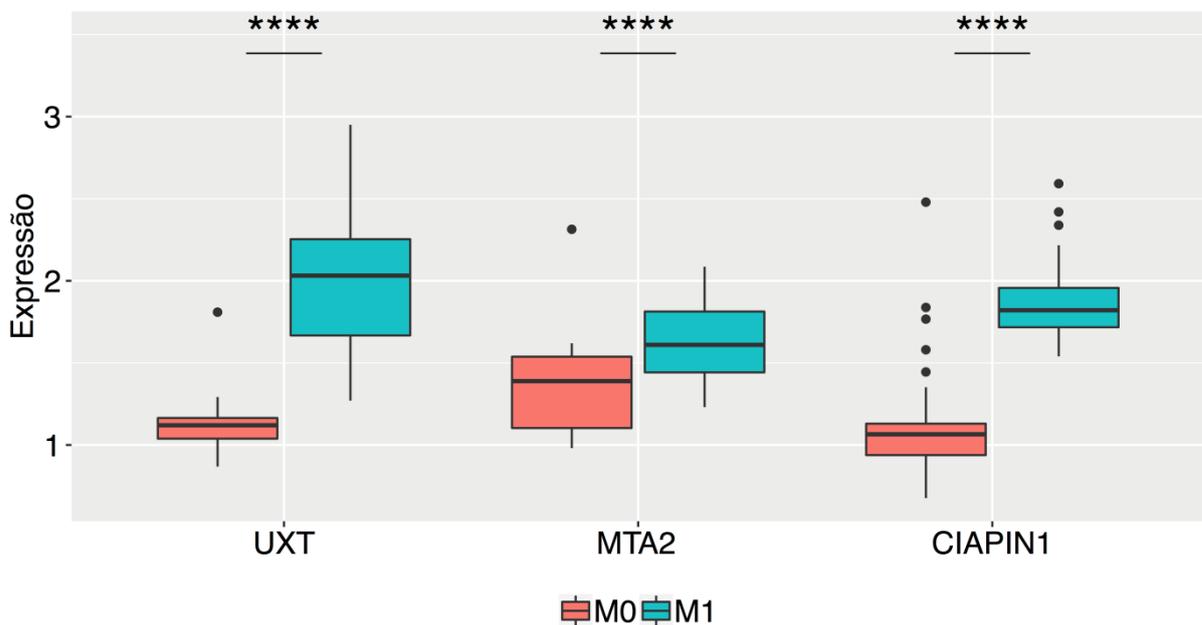
Tabela 2 – Relação entre a expressão de mRNA de *UXT*, *MTA2* e *CIAPINI* e as características clínico-patológicas dos pacientes

Variáveis	n, 213 (%)	<i>UXT</i>			<i>MTA2</i>			<i>CIAPINI</i>		
		Média ± DP	F	P	Média ± DP	F		Média ± DP	F	P
Gênero										
Masculino	133 (62,4%)	1,566 ± 0,559	1,185	0,277	1,811 ± 0,450	0,002	0,957	1,788 ± 0,592	0,542	0,462
Feminino	80 (37,6%)	1,651 ± 0,528			1,814 ± 0,509			1,850 ± 0,592		
Idade (anos)										
≥61	113 (53,1%)	1,600 ± 0,524	0,004	0,946	1,880 ± 0,433	5,135	0,024*	1,858 ± 0,618	1,496	0,222
<61	100 (46,9%)	1,595 ± 0,576			1,735 ± 0,503			1,759 ± 0,558		
Localização do Tumor										
Cárdia	64 (30,0%)	1,615 ± 0,547	0,087	0,767	1,789 ± 0,497	0,216	0,642	1,840 ± 0,624	0,209	0,647
Não-cárdia	149 (70,0%)	1,591 ± 0,550			1,822 ± 0,462			1,799 ± 0,578		
Tipo histológico										
Difuso	103 (48,4%)	1,634 ± 0,601	0,846	0,358	1,720 ± 0,479	7,714	0,005*	1,800 ± 0,606	0,066	0,796
Intestinal	110 (51,6%)	1,565 ± 0,493			1,898 ± 0,451			1,821 ± 0,580		
Invasão da serosa (T)										
T1/T2	68 (31,9%)	1,511 ± 0,467	12,037	<0,0001****	1,338 ± 0,262	190,215	<0,0001****	1,647 ± 0,650	7,975	<0,0001****
T3/T4	145 (68,1%)	1,784 ± 0,656			2,034 ± 0,375			1,888 ± 0,547		
Metástase linfonodal (N)										
Negativa	23 (10,8%)	1,123 ± 0,112	21,238	<0,0001****	1,326 ± 0,187	31,180	<0,0001****	1,282 ± 0,179	22,780	<0,0001****
Positiva	190 (89,2%)	1,656 ± 0,552			1,871 ± 0,462			1,875 ± 0,592		
Metástase à distância (M)										
M0	108 (50,7%)	1,198 ± 0,203	258,523	<0,0001****	1,613 ± 0,392	47,119	<0,0001****	1,344 ± 0,216	383,538	<0,0001****
M1	105 (49,3%)	2,010 ± 0,482			2,016 ± 0,462			2,292 ± 0,452		
TNM stage										
I + II	42 (19,7%)	1,266 ± 0,210	21,026	<0,0001****	1,306 ± 0,220	83,330	<0,0001****	1,266 ± 0,220	55,912	<0,0001****
III + IV	171 (80,3%)	1,680 ± 0,574			1,936 ± 0,433			1,945 ± 0,577		
Infecção por <i>H. pylori</i>										
Negativa	23 (10,8%)	1,639 ± 0,623	0,140	0,708	1,790 ± 0,487	0,0576	0,810	1,710 ± 0,526	0,752	0,386
Positiva	190 (89,2%)	1,593 ± 0,540			1,815 ± 0,471			1,824 ± 0,599		
<i>CagA</i>^a										
Negativa	73 (34,3%)	1,611 ± 0,555	0,058	0,809	1,749 ± 0,477	1,972	0,161	1,714 ± 0,478	3,016	0,083
Positiva	140 (65,7%)	1,591 ± 0,546			1,845 ± 0,468			1,862 ± 0,638		
Infecção por EBV										
Negativa	178 (83,6%)	1,583 ± 0,559	0,835	0,361	1,808 ± 0,474	0,069	0,793	1,786 ± 0,594	1,934	0,165
Positiva	35 (16,4%)	1,676 ± 0,486			1,831 ± 0,469			1,938 ± 0,567		

^a*CagA*, fator de virulência detectado em pacientes com infecção por *H. pylori*; EBV, *Epstein-Barr virus*; TNM, O Sistema de Estadiamento TNM é baseado no tamanho do tumor primário (T), presença de metástases linfonodais (N), e presença de metástases à distância (M). DP, desvio padrão. P: P value *P < 0,05; ****P < 0,0001; F: F value

Não pudemos deixar de notar, a expressão demasiadamente alta dos três genes selecionados em pacientes M1, quando comparados com os pacientes M0 (aumento de 67,8% para *UXT*, 25% para *MTA2* e 70,5% para *CIAPIN1*), dados corroborados pela análise de expressão proteica (**** $P < 0,0001$) (Figura 6) – o que demonstra o potencial dos genes selecionados na detecção de metástases à distância em amostras de tumor primário de câncer gástrico, tanto por meio de seus mRNAs quanto de suas proteínas.

Figura 6 – Box plots da expressão relativa normalizada das proteínas *UXT*, *MTA2* e *CIAPIN1* em tecido tumoral gástrico de pacientes sem metástase (M0) e com metástase detectada (M1)



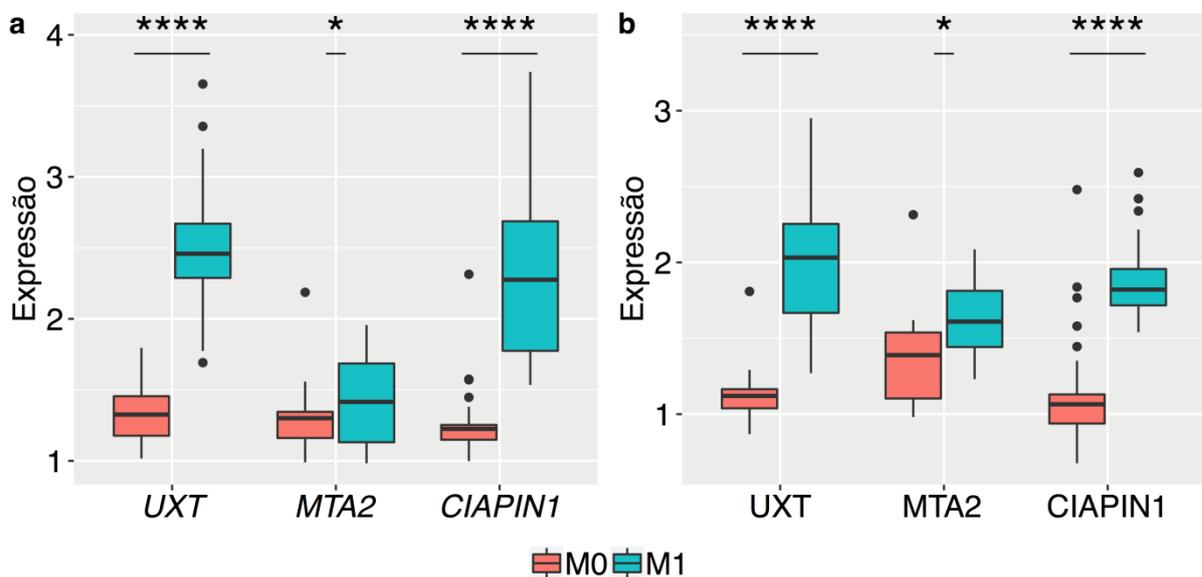
As caixas foram desenhadas estendendo-se do 75° percentil ao 25° percentil. A linha horizontal dentro da caixa representa valores medianos. As linhas verticais acima e abaixo da caixa delineiam os valores máximo e o mínimo, e os pontos indicam *outliers*. (**** $P < 0,0001$).

A fim de avaliarmos o potencial dos genes *UXT*, *MTA2* e *CIAPIN1* na predição de metástases à distância nas fases iniciais da carcinogênese gástrica, procedemos a análise dos seus perfis de expressão de mRNA e proteína entre amostras M0 versus M1, considerando apenas os pacientes sem invasão da serosa (T1 e T2) e sem metástase linfonodal (N0) (n = 68). Na população estudada, não foram relatadas amostras N0 que fossem ao mesmo tempo M1, motivo pelo qual apenas os pacientes que possuíam classificação do tumor primário T1 e T2 puderam ser efetivamente comparados.

A Figura 7 demonstra que, enquanto que a diferença de expressão do mRNA e da proteína *MTA2* é baixa ($*P < 0,05$), a diferença na expressão dos genes *UXT* e *CIAPIN1*, e de

suas proteínas é extremamente significativa ($****P < 0,0001$), na comparação dos grupos M0 e M1 em estágios iniciais da carcinogênese gástrica. Isso sugere que a expressão desses dois genes pode ser considerada para predição de metástase à distância já em fases iniciais da doença. Por outro lado, o gene *MTA2* parece estar associado à progressão da doença e à ocorrência de metástase em fase avançada. Por este motivo, para as análises seguintes foram considerados apenas os genes *UXT* e *CIAPIN1*.

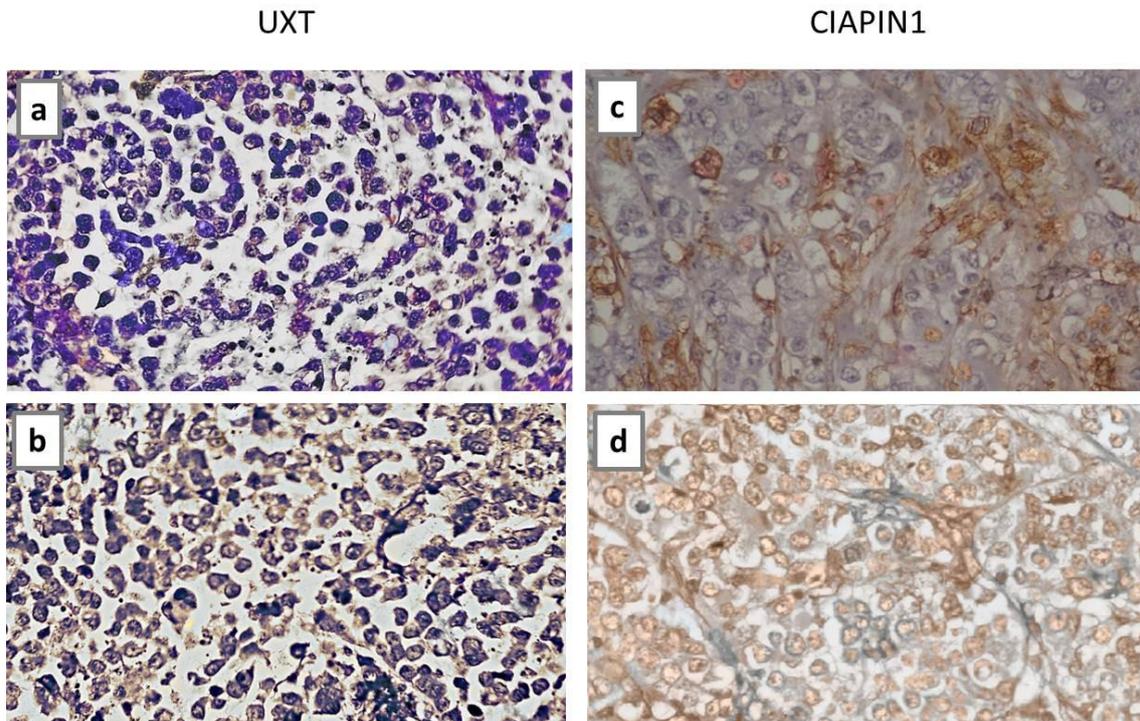
Figura 7 – *Box plots* da expressão relativa normalizada dos genes *UXT*, *MTA2* e *CIAPIN1* em tecido tumoral gástrico de pacientes sem metástase (M0) e com metástase detectada (M1)



Os níveis de expressão dos três genes foram validados por qRT-PCR e *Western blot* em 68 pacientes sem invasão serosa (T1 e T2). Aumento extremamente significativo na expressão de mRNA (a) e proteínas (b) de UXT e CIAPIN1 quando comparados os pacientes M0 e M1 ($**** P < 0,0001$). O teste T produziu um valor de *P* mais elevado para diferenças médias de expressão de mRNA e proteína de MTA2, quando comparado aos outros genes ($*P = 0,03$ e $*P = 0,01$, respectivamente). As caixas foram desenhadas estendendo-se do 75º percentil ao 25º percentil. A linha horizontal dentro da caixa representa a mediana. As linhas verticais acima e abaixo da caixa delineiam os valores máximo e mínimo, e os pontos mostram os *outliers*.

A Figura 8 mostra os resultados dos ensaios de imuno-histoquímica, a partir dos quais se observa uma diferença estatisticamente significativa ($*P < 0,05$) na marcação com anticorpo anti-UXT e anti-CIAPIN1 em amostras de tecido gástrico de pacientes M0, comparada com amostras de pacientes M1.

Figura 8 – Comparação de tecido de tumores gástricos primários de pacientes sem metástase (M0) e com metástase (M1) na detecção de proteínas UXT e CIAPIN1, por imunohistoquímica



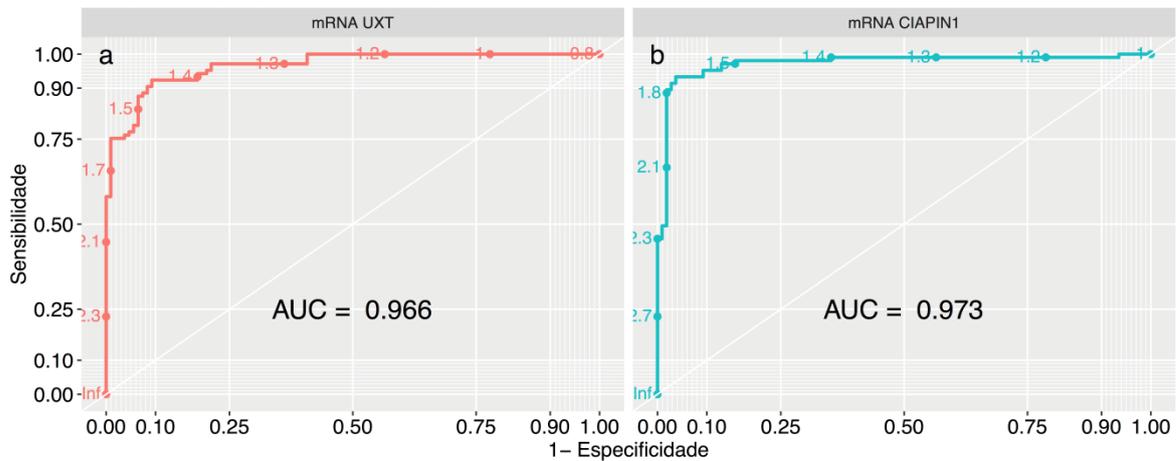
A: Amostra negativa para proteína UXT (M0). B: A imunomarcção detecta a expressão citoplasmática da UXT (M1), cor marrom. C: Amostra negativa para proteína CIAPIN1 (M0). D: Detecção de proteínas CIAPIN1 no núcleo da célula (M1), cor marrom. Mais de 10% de células foram coradas positivamente ($*P < 0,05$) (Aumento, x400).

3.3.3 Análise de sobrevida

Utilizamos análise de sobrevida para avaliar a contribuição da alta expressão de *UXT* e *CIAPIN1* na sobrevida global dos 213 pacientes estudados.

Primeiramente, utilizamos análise de curva ROC para selecionar os grupos em alta e baixa expressão de *UXT* e *CIAPIN1* (Figura 9). O valor de *cutoff* para *UXT* foi de 50% a mais de expressão, ou seja, um valor normalizado de 1.5 e de *CIAPIN1* foi de 70% a mais de expressão ou um valor normalizado de 1.7. O *cutoff* foi escolhido como ponto de maior AUC. Para *UXT* esse valor representa AUC = 0.966; Sensibilidade = 92.3%, Especificidade = 90.7% e para *CIAPIN1* AUC = 0.973; Sensibilidade = 93.3%, Especificidade = 96.2%.

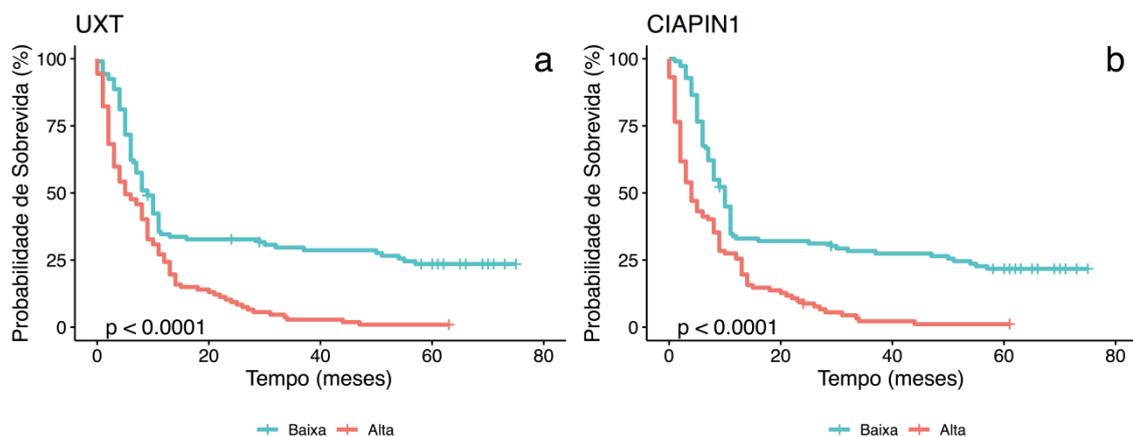
Figura 9 – Análise da curva ROC para definir o valor de corte da expressão gênica na discriminação de grupos de alta expressão e baixa expressão dos genes *UXT* e *CIAPINI*



A: *UXT* (AUC = 0,966) e 1,7 para B: *CIAPINI* (AUC = 0,973). ROC, característica de operação do receptor

Utilizando o *cutoff* de expressão dos genes *UXT* e *CIAPINI*, os pacientes foram classificados em alta e baixa expressão. Assim, pacientes que obtiveram expressão $\geq 1,5$ para *UXT* e $\geq 1,7$ para *CIAPINI* foram classificados com “alta expressão” e abaixo desses valores como “baixa expressão”. A análise de sobrevida utilizando Kaplan-Meier demonstrou uma diminuição da probabilidade de sobrevida no grupo de pacientes com alta expressão de *UXT* e *CIAPINI*. Logo no primeiro ano após o diagnóstico há uma queda extremamente significativa na sobrevida global dos pacientes com alta expressão de ambos os genes (**** $P < 0,0001$) (Figura 10). Os dados sugerem que a alta expressão *UXT* e/ou *CIAPINI* contribuem para a diminuição da sobrevida global dos pacientes, revelando um pior prognóstico.

Figura 10 – Análise da sobrevida global em meses de pacientes com tumores gástricos em função da expressão gênica de *UXT* e *CIAPINI*



A: Alta expressão expressão gênica $\geq 1,5$ para *UXT*; B: Alta expressão expressão gênica $\geq 1,7$ para *CIAPINI*; linha vermelha) versus baixa expressão (expressão gênica $< 1,5$ para *UXT* e $< 1,7$ para *CIAPINI*; linha azul) foi extremamente associada a uma menor probabilidade de sobrevivência (**** $P < 0,0001$)

3.4 Discussão

O câncer gástrico é uma neoplasia de elevada incidência no mundo e a heterogeneidade de suas características, bem como seus diversos mecanismos de tumorigênese, tornam seu diagnóstico e análise de prognóstico etapas difíceis e demoradas. É consenso que grande parte das neoplasias gástricas se dá pelo acúmulo de fatores de risco genéticos, epigenéticos e ambientais (SITARZ et al, 2018). Dentre os fatores de risco genéticos para o desenvolvimento da neoplasia gástrica, destaca-se a amplificação do gene *MYC*. Em estudos anteriores, nosso grupo demonstrou forte associação desta alteração genética com os adenocarcinomas gástricos do tipo intestinal (CALCAGNO et al, 2006; LEAL et al, 2009). *MYC* está envolvido em uma série de eventos no status normal das células, que incluem regulação do ciclo celular, adesão e crescimento celular, biogênese de ribossomos, síntese proteica e função mitocondrial (CALCAGNO et al, 2009; SILVA et al, 2010)

A desregulação de *MYC* provoca aneuploidias, por meio de instabilidade gênômica e indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MIN et al, 2017). A amplificação de *MYC* também pode alterar diferentes vias biológicas em favor da iniciação e progressão de diferentes tipos de câncer gástrico, como demonstrado previamente por nosso grupo (ROCHA e ROCHA, 2011). Outros estudos também já demonstraram que alterações em vias metabólicas decorrentes de diferentes mutações em genes críticos são importantes para a gênese do câncer gástrico (JIANG et al, 2017; MAUÉS et al, 2018) . A utilização de um modelo que conserve características da população de interesse facilita a busca de biomarcadores direcionados (LEAL et al, 2009, SHAH et al, 2011). Neste estudo, utilizamos uma linhagem de câncer gástrico, estabelecida a partir de líquido ascítico de adenocarcinoma gástrico. A linhagem celular AGP01 é caracterizada pela amplificação de *MYC* e representa um modelo do tipo metastático de câncer gástrico.

Após o silenciamento de *MYC* na linhagem celular AGP01, nós selecionamos os genes downregulated *UXT*, *MTA2* e *CIAPINI* e investigamos seu potencial como biomarcadores de metástase em pacientes com neoplasia gástrica. É reconhecido que a predição de metástases é um bom indicador para direcionamento da terapia oncológica, com significativo impacto na sobrevivência dos pacientes (CHEN et al, 2014; HUR et al, 2017). Atualmente, vários marcadores de metástase têm sido sugeridos para o câncer gástrico, em virtude da alta mortalidade desta neoplasia (XIA et al, 2016; LIN et al, 2018; EVANS et al, 2016). No entanto, uma grande parte desses marcadores são RNAs não codificantes, com limitações técnicas para a sua detecção na pesquisa e na prática médica de rotina. Por outro lado, alterações em genes

codificadores de proteínas, incluindo mutações pontuais, deleção e fusão gênica (e suas consequentes alterações na expressão de genes), são, em geral, fáceis de detectar e prever (PARISI et al 2017).

Neste estudo, a análise dos níveis de expressão dos genes *UXT*, *MTA2* e *CIAPINI*, avaliada em amostras de tecido tumoral primário de pacientes com câncer gástrico com diferentes características clinicopatológicas, revelou um aumento extremamente significativo ($****P < 0,0001$) na expressão destes genes nos pacientes com estágios mais avançados da neoplasia (i.e., como invasão da serosa, metástase linfonodal e metástases à distância). A superexpressão de *UXT* e *CIAPINI* em tumores e em células de câncer de mama já foi descrita na literatura, enquanto que a superexpressão *MTA2* foi relacionada ao crescimento celular e formação de colônias em células de câncer gástrico (SCHROER et al, 1999; COBURN et al, 2018; WANG et al, 2015; ZHOU et al, 2015).

No entanto, nosso estudo também mostrou que a superexpressão de *MTA2* foi significativamente mais pronunciada nos tecidos tumorais de pacientes com idades ≥ 61 anos e em tumores gástricos do tipo intestinal. Consideramos que estes achados diminuem a especificidade do *MTA2* como biomarcador de evolução tumoral, uma vez que sua expressão se correlacionou com característica não indicativa de metástase. De fato, sabe-se que idade avançada é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico (ROY et al, 2016), no entanto, tumores gástricos do subtipo difuso são mais relacionados a um pior prognóstico, comparados aos do tipo intestinal (CROW et al, 2006; COLQUHOUN et al, 2015; ZHAO et al, 2016). Em contrapartida, nossos resultados indicam que a análise da superexpressão de *UXT* e *CIAPINI* pode ser realizada em pacientes com diferentes características clínico-patológicas, para avaliar a possibilidade de progressão metastática.

Sensibilidade e especificidade são dois parâmetros essenciais quando se estuda biomarcadores para uma possível aplicação clínica (EVANS et al, 2016). Neste sentido, nós demonstramos também que a superexpressão dos genes *UXT* e *CIAPINI*, e de suas proteínas, é evento marcante em tumores primários em fases iniciais da neoplasia gástrica. No entanto, a alta expressão de *MTA2* parece se consolidar fortemente somente em estágios avançados da carcinogênese gástrica, demonstrando ser consequência e não causa da progressão tumoral. De fato, como seu próprio nome sugere, *metastasis tumor associated (MTA) 2* é uma proteína mais associada à expansão e estabelecimento de metástase, do que à sua promoção. *MTA2* está ligada à regulação da reorganização do citoesqueleto, por meio de modulação da via de sinalização Rho, bem como a via de adesão focal, de modo a promover motilidade e invasividade das células tumorais (COVINGTON e FUQUA, 2014).

Nós observamos também uma diminuição extremamente significativa na sobrevida dos pacientes com alta expressão de *UXT* e *CIAPINI*, quando comparados aos pacientes com baixa expressão desses genes. Além disso, sugerimos que a eficiência de *UXT* e de *CIAPINI* em verificar a ocorrência de metástases em estágios precoces de câncer gástrico pode ser atestada pela alta sensibilidade (92,3% para *UXT* e 93,3% para *CIAPINI*) e especificidade (90,7% para *UXT* e 96,2% para *CIAPINI*) desses genes na curva ROC.

Muitos estudos têm explorado a relação entre a modulação da expressão de determinados genes e seus produtos proteicos com a baixa sobrevida observada em pacientes com câncer gástrico (ZHANG et al, 2016; XU et al, 2017; YOSHIDA et al, 2017; PAN et al, 2018), incluindo o gene *MYC* e demais genes a ele funcionalmente relacionados (KRESS et al, 2015; KHALEGHIAN et al, 2016). No presente estudo demonstramos evidências de que os genes *UXT* e *CIAPINI* são capazes de detectar, independentemente, tanto em nível de mRNA quanto em nível proteico, a alta possibilidade de metástases à distância ainda em fases precoces da doença, servindo de auxílio no diagnóstico precoce que aumenta as probabilidades de sobrevida dos pacientes.

CIAPINI, também conhecida como anamorsina, é uma proteína com atividade metabólica, expressa ubiquamente, porém de forma diferencial, em tecidos adultos e fetais (LI et al, 2007). Esta proteína parece desempenhar papel importante para o desenvolvimento do câncer. *CIAPINI* é fator anti-apoptótico, sem relação com as moléculas reguladoras de apoptose, como as da família Bcl2, caspases e trasdutoras de sinal. É um efetor à jusante da via de sinalização receptor citocina quinase - Ras- na linhagem celular Ba/F3 pro-B de rato (LI et al, 2007; LI et al, 2008).

O gene regulado por *MYC*, *CIAPINI*, tem um papel controverso na literatura para diferentes tipos de tumores. Neste estudo, nós revelamos que a superexpressão de *CIAPINI* foi fortemente associada à ocorrência de metástases à distância e à diminuição da sobrevida global de pacientes com câncer gástrico após o diagnóstico. Esses dados corroboram com os de Shi et al (2010), de que superexpressão de *CIAPINI* está associada a um pior prognóstico de câncer colorretal. Por outro lado, em outras linhagens celulares de câncer gástrico (SGC7901 e MKN45) foi demonstrado que a redução na expressão de *CIAPINI* foi relacionada à proliferação celular e estabelecimento do tumor (NAKASATO et al, 1984). Entretanto, ambas as linhagens mencionadas, embora estabelecidas a partir de tipos metastáticos de adenocarcinoma gástrico (LONG-BAO et al, 1993), não possuem amplificação do oncogene *MYC* (WANG et al, 2017), que é característica marcante da linhagem AGP01 utilizada no presente estudo. A amplificação de *MYC* é um fator fortemente

associado ao pior prognóstico do câncer gástrico, notadamente em tumores do tipo intestinal e de início tardio (LEAL et al, 2016).

Outro estudo com a linhagem SGC7901 de câncer gástrico demonstrou que o silenciamento de *CIAPINI* inibiu proliferação celular e angiogênese (YAN et al, 2009), sugerindo que este gene esteja relacionado à iniciação da vascularização do tumor. De fato, *MYC* é promotor de recrutamento de proteínas que promovem a angiogênese, principalmente em tecidos tumorais de proliferação rápida. O processo de tumorigênese envolve a geração de massa tumoral com deficiência de oxigênio (hipóxia), o que desencadeia uma série de expressões gênicas a jusante, que influenciam a transformação celular do endotélio e do microambiente tumoral (ZHAO et al, 2016). *CIAPIN1* pode, portanto, estar sendo recrutado por *MYC* para a manutenção dessas células, garantindo inibição da apoptose como mecanismo alternativo. Estudo recente revelou que este gene está relacionado à inibição de apoptose induzida por hipóxia em cardiomiócitos (ZHANG et al, 2018).

Além disso, os estudos em linhagens de câncer gástrico realizados por Hao et al. (2006) revelaram que a superexpressão de *CIAPINI* também pode estar associada a resistência a múltiplas drogas. Mais recentemente, Wang e colaboradores (2015) sugeriram a utilização deste gene como alvo em terapia gênica contra câncer de mama, visto que a expressão deste gene também se mostrou correlacionada com pior prognóstico em virtude de estar associado com resistência ao tratamento.

Quanto a *UXT*, são escassas as informações sobre seu potencial em promover metástase, sobretudo em câncer gástrico. *UXT* é uma chaperona, que atua interagindo com *NFκB*, para induzir a transcrição de genes que atuam na anti-apoptose, sobrevivência celular e invasão celular (SUN et al, 2007). Esta proteína pode ser encontrada em grande quantidade tanto no núcleo quanto no citoplasma, interagindo com proteínas do citoesqueleto. *UXT* foi encontrada na região do centrossomo celular, sendo recrutada também para a divisão e essencial para viabilidade celular. Há evidências de que sua expressão está associada à tumores de bexiga, mama, tireoide e ovário ovário (ZHAO et al, 2005; Sanchez-Morgan et al, 2017).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que uma das vias mais alteradas pelo silenciamento de *MYC* na linhagem de câncer gástrico metastático AGP01 é a via de sinalização Notch (MAUES et al, 2018). Para a iniciação de alguns tumores, esta via está ligada a via *PI3K-Akt*. Esta interação parece mediar a sobrevivência em diversas células, de modo que há uma regulação positiva de *MYC* como um componente essencial do processo cooperativo de transformação maligna. Em conjunto, essas informações sugerem um papel

para a sinalização na via Notch desregulada na condução da transformação maligna do epitélio gástrico. Também já foi reportada anteriormente, uma alta expressão de *UXT* regulando a angiogênese pela via Notch (LUO et al, 2003; MALIEKAL et al, 2008; PORTA et al, 2014; ZHOU et al, 2015). *UXT* pode estar atuando de modo a integrar estas duas vias, sendo regulado pelo oncogene *MYC* e coativando fatores de transformação das células gástricas para permitir os mecanismos necessários à invasão dos tumores.

Em conclusão, este estudo mostrou que a linhagem AGP01 tem grande potencial como modelo de superexpressão de *MYC* para a condução de estudos sobre câncer gástrico do tipo metastático. Nossos resultados revelaram um amplo painel de genes cuja superexpressão está direta ou indiretamente associado à amplificação de *MYC* (150 dos quais estão listados na Tabela Suplementar 1), os quais podem ser explorados como fortes candidatos a biomarcadores de diagnóstico e prognóstico de câncer gástrico em estudos posteriores. No presente estudo, a superexpressão dos genes *UXT* e *CIAPINI* foi significativamente associada ao fenótipo metastático de câncer gástrico, mesmo em pacientes em estágios iniciais da doença. Esses dados sugerem que a análise de expressão de *UXT* e *CIAPINI* pode atuar como ferramenta clínica preditiva de metástases e/ou de um pior prognóstico. Em adição, nós demonstramos que a superexpressão do gene *MTA2* é indicadora de metástase dependente da progressão neoplásica, além de estar associada a outros fatores clínicos não indicativos de metástase. Finalmente, nossos dados mostraram que expressão de *UXT* e *CIAPINI* pode ser detectada em tumor primário e por diferentes técnicas moleculares, auxiliando a determinação de prognóstico pela predição de metástases à distância de maneira minimamente invasiva.

4. Capítulo 2

KITs DE PROGNÓSTICO DE CÂNCER GÁSTRICO

*Patente submetida ao NINTEC – Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia/ UFPI
(Anexo B)*

4.1 Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se aos genes marcadores de prognóstico de câncer gástrico *Ubiquitously Expressed Prefoldin Like Chaperone (UXT)* e *Cytokine Induced Apoptosis Inhibitor 1 (CIAPINI)*, incluindo dispositivos e processos baseados na análise da expressão gênica e proteica desses marcadores, visando sua aplicação nas metodologias de diagnóstico molecular e suporte aos estudos relacionados aos referidos genes, ao câncer gástrico e a suas metástases.

4.2 Fundamentos da Invenção

[002] A presente invenção está caracterizada pelo uso de técnicas de biologia molecular, como a utilização de sondas de hibridização específicas no sistema da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real e a detecção de proteínas, para a quantificação da expressão dos genes *UXT* e *CIAPINI*, comparada com um controle de tecido de câncer gástrico não metastático, para prever a ocorrência de câncer gástrico do tipo metastático doença.

4.3 Técnica Relacionada

[003] O câncer gástrico é assintomático nos primeiros estágios, o que diminui a taxa de sobrevivência, após o diagnóstico da doença, em cinco anos, de 74% para cerca de 30 a 20%. Neste sentido, um diagnóstico precoce e preciso é crucial para aumentar as chances de cura.

[004] A etiologia dos carcinomas gástricos está relacionada a um conjunto de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (com variações de gênero, região e idade), que repercutem sobre suas características clínicas e biológicas. Essa complexidade motiva pesquisas avançadas em todo o mundo acerca da elucidação dos mecanismos da carcinogênese gástrica e de terapias adequadas e eficazes com menores riscos aos pacientes (CORSO, S; GIORDANO, S. How Can Gastric Cancer Molecular Profiling Guide Future

Therapies? **Trends in Molecular Medicine**, Vol. 22, No. 7, 2016). Por esse motivo, é essencial a procura por biomarcadores, que detenham grande capacidade de atuar não só no diagnóstico, mas também na avaliação do prognóstico, aprimorando e acelerando a detecção da neoplasia e, por consequência, aumentando as chances de sobrevivência dos pacientes, além de cinco anos. Tais biomarcadores podem também identificar fatores determinantes para alta eficiência em terapia, a fim de aprimorar o tratamento sob a perspectiva do desenvolvimento e progressão da neoplasia.

[005] Atualmente, o diagnóstico de câncer gástrico é feito por meio de biópsia gastroscópica ou cirúrgica, analisada por patologista experiente, segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS). Somente ocorre a biópsia após avaliações iniciais que incluem desde hemograma a tomografia computadorizada de tórax, abdome e pelve. Exames clínicos seguidos da anamnese incluem a endoscopia digestiva alta e/ou o exame radiológico contrastado do estômago.

[006] Convencionalmente, são utilizadas observações anatômicas (o grau de invasão de células cancerosas e o número de linfonodos metastáticos) para prever o prognóstico de pacientes com câncer gástrico. No entanto, a variação entre pacientes e a intervenção do julgamento subjetivo do médico são limitações para a predição exata do prognóstico.

[007] Mesmo com uma gama de exames acessíveis, alguns tipos de câncer gástrico não podem ser diagnosticados em suas fases iniciais, ou não são corretamente diagnosticados por serem pouco diferenciados. O diagnóstico tardio está associado a um pior prognóstico e à diminuição das possibilidades terapêuticas (ZHOU, Y.; ABEL, G. A.; HAMILTON, W.; PRITCHARDJONES, K.; GROSS, C. P.; WALTER, F. M.; RENZI, C.; JOHNSON, S.; MCPHAIL, S.; ELLISSBROOKES, L.; LYRATZOPOULOS, G. Diagnosis of cancer as an emergency: a critical review of current evidence. *Nature Reviews Clinical Oncology*. v. 14, n. 1, p. 45-56, 2016.). O câncer gástrico apresenta poucos sintomas em suas fases iniciais, o que dificulta o acompanhamento médico adequado e geralmente é necessária uma intervenção de emergência, uma vez que o paciente é diagnosticado em níveis avançados da doença.

[008] Algumas técnicas de imagem têm sido implantadas na melhoria do diagnóstico precoce, como a endoscopia com amplificação da imagem em banda estreita e a endocitoscopia, que permitem uma melhor visualização da área da lesão, bem como da região de permeio. No entanto, ainda não são bem estabelecidas, devido aos altos custos de manutenção dos equipamentos. Outros avanços na área de diagnóstico por imagem estão

associados à detecção de fases avançadas da doença, como por exemplo durante a busca por metástases, mas poucos são capazes de identificar sozinho invasão peritoneal, por exemplo (JAPANESE GASTRIC CANCER ASSOCIATION, Gastric Cancer (2017) 20: 1. <https://doi.org/10.1007/s10120-016-0622-4>). Alternativas que levem percepção do avanço da doença em um curto espaço de tempo são necessárias, pois um bom prognóstico é capaz de aumentar e melhorar as possibilidades no tratamento, como também de elevar a taxa de sobrevivência para a população afetada.

[009] Diversos estudos estão em busca de novas formas de diagnosticar precocemente de forma a proporcionar um melhor e mais rápido tratamento para o paciente. O diagnóstico molecular é uma ferramenta emergente no diagnóstico precoce e bastante utilizado atualmente em casos de neoplasias pouco diferenciadas, com as quais o diagnóstico histológico é ineficaz. Atualmente, uma série de pesquisas busca traçar o perfil molecular dos tumores por meio de biomarcadores capazes de caracterizar os padrões de carcinogênese e permitir não apenas a identificação do estabelecimento da neoplasia, mas também como ela pode evoluir para o avanço da doença no paciente.

[010] Para o diagnóstico molecular de câncer gástrico, são frequentemente utilizados três biomarcadores: os antígenos carboidratos (CAs) 19-9 e 72-4; e o antígeno carcinoembrionário. Entretanto, apesar de bem estabelecidos estes marcadores apresentam baixa especificidade e sensibilidade o que gera resultados falsos positivos. Muitos marcadores são conhecidos na comunidade científica por estarem envolvidos com a neoplasia gástrica, mas a implementação dessas moléculas na prática médica de rotina ainda é de difícil acesso.

[011] Novos marcadores com grande especificidade e sensibilidade são necessários para melhorar o grau de confiabilidade dos exames clínicos. Os avanços nas técnicas de detecção desse material biológico e de caracterização das neoplasias têm se revelado primordiais para alcançar esse desafio.

[012] Métodos moleculares evidenciam a origem da patologia uma vez que permitem maior acurácia e diminuem as chances de erros de associação. Estudos moleculares relacionados a busca de biomarcadores em câncer gástrico são bem conhecidos na arte. As patentes US20130065836, US20120028269, US20130337449, US20120135881 e US20130071857 referem-se a marcadores moleculares em câncer gástrico que podem ser utilizados para a detecção de câncer. No entanto, a invenção aqui abordada não contempla os

marcadores utilizados para tais invenções. Além disso, a invenção propõe a utilização de apenas dois marcadores capazes de prever a ocorrência de metástases.

[013] A patente US20130337449 refere-se a uma combinação de valores de expressão gênica de doze genes para formular um grau de expressão que equivale ao prognóstico do paciente acometido com câncer gástrico. Na presente invenção, apenas dois genes são capazes de prever o prognóstico do paciente com grande eficiência. Com a utilização da invenção aqui proposta é possível tanto reduzir os custos, quanto reduzir a chance de ocorrer falsos positivos.

[014] A patente PI0412725-0 refere-se a um conjunto de marcadores moleculares utilizados como marcadores de detecção. No entanto, não contempla nenhum dos genes aqui referidos como marcadores. Tal invenção também não contempla de que forma e quais são os marcadores capazes de prever o prognóstico, o que torna o presente modelo mais simples e menos oneroso.

[015] A patente PI0010558-9 refere-se a método diagnóstico e prognóstico de câncer, mas somente por pacientes que foram acometidos primeiramente a uma infecção por *Helicobacter pylori*, restringindo sua utilização. A presente invenção aborda todos os tipos de câncer gástrico, inclusive aqueles que não tiveram causa associada a fatores ambientais ou acometidos por infecção de Vírus Epstein-Barr.

[016] Portanto, a presente invenção oferece uma ferramenta fundamental à produção de método inovador de avaliação de prognóstico, com confiabilidade e acurácia, a partir de uma amostra de tecido gástrico para análise de expressão gênica ou proteica de apenas dois genes, *UXT* e *CIAPINI*.

4.4 Sumário da invenção

[017] O objetivo desta invenção é fornecer marcadores de prognóstico de câncer gástrico, compreendendo a expressão dos genes *UXT* e *CIAPINI* (em conjunto ou separadamente) em um kit de diagnóstico molecular por meio de amostras de mRNA e/ou proteína.

[018] Os marcadores da presente invenção estão significativamente associados com o tipo de câncer gástrico metastático (M1), revelando alta expressão gênica e proteica, quando comparado com a amostra controle (M0) (Figuras 11-15).

[019] Em outro aspecto da invenção, compreende ainda o método de predição de neoplasia gástrica de grau metastático, por meio de kits para medir o nível de expressão de RNAm e de proteína associada aos dois genes marcadores.

[020] A presente invenção refere-se ao termo “prognóstico” como a expectativa da progressão da doença no indivíduo. Dessa forma, refere-se aqui como prognóstico positivo e prognóstico negativo onde, o prognóstico positivo é aquele onde não há expectativa de progressão da doença e, o prognóstico negativo inclui o desenvolvimento da doença a estágios mais avançados, tais como recorrência, crescimento de tumores, metástases e mortalidade por resistência a fármacos. Além disso, o prognóstico positivo inclui a remissão da doença e/ou melhoria, tal como regressão tumoral ou estabilização.

[021] Tal como aqui utilizado, o termo "predizer" refere-se a direcionar sobre o desenvolvimento médico e, para o objetivo da presente invenção, direcionar o desenvolvimento da doença (progressão da doença, melhoria, recorrência, crescimento tumoral, resistência a determinados fármacos) dos pacientes que foram diagnosticados com a neoplasia gástrica.

4.5 Breve Descrição das Figuras

[022] Figura 11. Quantificação relativa do RNAm e das proteínas codificadas pelo gene *UXT* de 213 pacientes portadores de câncer gástrico. M0, tumor primário sem metástase. M1, tumor primário com metástase. A Figura 11A representa a expressão gênica diferencial de *UXT* e *CIAPIN1*, respectivamente, em amostras de pacientes em estágio metastático (M1), quando como parado com pacientes em estágio não metastático (M0). A figura 11B representa a expressão proteica diferencial em amostras de pacientes em estágio metastático (M1), quando comparado com pacientes em estágio não metastático (M0). São mostrados valores de $***P < 0,001$ para a expressão diferencial de M0 quando comparado com M1.

[023] Figura 12. Quantificação relativa do RNAm e das proteínas codificadas pelos genes *CIAPIN1* de 213 pacientes portadores de câncer gástrico. M0, tumor primário sem metástase. M1, tumor primário com metástase. A figura 12A representa a expressão gênica diferencial de *UXT* e *CIAPIN1*, respectivamente, em amostras de pacientes em estágio metastático (M1), quando comparado com pacientes em estágio não metastático (M0). A figura 12B representa a expressão proteica diferencial em amostras de pacientes em estágio

metastático (M1), quando como parado com pacientes em estágio não metastático (M0). São mostrados valores de $***P < 0,001$ para a expressão diferencial de M0 quando comparado com M1.

[024] Figura 13. Detecção de proteínas por *Western blot* revelando o aumento da expressão dos genes *UXT* e *CIAPINI* em tumores primários gástricos de pacientes com metástases (M1) em relação aos tumores primários gástricos de pacientes sem metástases (M0).

[025] Figura 14. Detecção de proteínas por imuno-histoquímica demonstrando o aumento da expressão de *UXT* em tumores primários gástricos de pacientes com metástases. A- M0, tumor primário sem metástase. B-M1, tumor primário com metástase.

[026] Figura 15. Detecção de proteínas por imuno-histoquímica demonstrando o aumento da expressão de *CIAPINI* em tumores primários gástricos de pacientes com metástases. A- M0, tumor primário sem metástase. B- M1, tumor primário com metástase.

4.6 Descrição Detalhada da Invenção

[027] O estadiamento é um importante fator utilizado como referência para avaliar o prognóstico da doença no paciente afetado. Entende-se como prognóstico a avaliação de características essenciais dos tumores e dos pacientes que permitem avaliar a progressão tumoral e/ou risco de morte associado ao câncer. Fatores de prognósticos podem incluir, além das características microscópicas do tumor e da condição geral do paciente, uma série de alterações moleculares complexas ainda não esclarecidas, essenciais para o entendimento do desenvolvimento do tumor e da tomada de decisão terapêutica. Por este motivo, é de extrema importância o esclarecimento precoce do prognóstico, uma vez que medidas terapêuticas podem ser tomadas mais rapidamente de modo a melhorar a sobrevida dos pacientes, bem como impedir medidas prejudiciais.

[028] A presente invenção inclui uma ferramenta de direcionamento de prognóstico, a qual inclui a utilização de Kits que possibilitam a avaliação da expressão de dois marcadores, os genes *UXT* e *CIAPINI* e suas respectivas proteínas, para predizer o prognóstico de neoplasia gástrica.

[029] Os inventores realizaram análise de expressão gênica e de expressão proteica com métodos de biologia molecular, para encontrar os marcadores relacionados nessa

invenção.

[030] Tal como na Figura 12, os pacientes com expressão significativamente aumentada de *UXT* e *CIAPINI* correspondem aos estágios T2N3M1, T3N3M1, T4N2M1, todos metastáticos.

[031] A presente invenção pode ser aplicada seguindo o seguinte processo:

- a) Obter a amostra de material biológico;
- b) Extrair RNAm da amostra;
- c) Produzir cDNA;
- d) Quantificar a expressão de RNAm dos marcadores para prever o prognóstico do câncer gástrico por meio de PCR em tempo real, em uma amostra tumoral recolhida de um paciente com esta malignidade;
- e) Comparar o nível de expressão obtido no passo d) com o nível de expressão dos dois biomarcadores em uma amostra de cDNA de um *pool* de 10 pacientes acometidos com neoplasia gástrica em estágio não metastático (M0), onde um valor de corte acima de 1.5 determina um prognóstico de metástases.

[032] Os presentes inventores extraíram RNAm a partir de tecido de tumor a fresco de câncer gástrico e este, por sua vez, foi transcrito inversamente utilizando o Sistema de Transcrição Reversa de acordo com o protocolo do fabricante (A3500, Promega, EUA). O (cDNA) foi então amplificado por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) utilizando sondas adquiridas como produtos de ensaios de expressão gênica inventoriados (Thermo Fisher Scientific, EUA) em um instrumento de PCR Real-Time 7500 Fast (Fisher Scientific, EUA). O gene Beta-actina (*ACTB*) foi selecionado como controle interno. Todas as qRT-PCRs foram realizadas em triplicata, tanto para os genes alvo (*UXT*: Hs00188238_m1; *CIAPINI*: Hs00938899_m1) como para o controle interno (*ACTB*: 4333762F). O teste T foi utilizado para investigar as possíveis associações entre o gene RNAm e variáveis categóricas, tais como imunorreatividade e características clínico-patológicas. Uma associação entre variáveis categóricas foi analisada pelo teste χ^2 . $P \leq 0,05$ foi considerado significativo (Figuras 11 e 12).

[033] Sob outro aspecto, a presente invenção pode ser aplicada ainda seguindo o seguinte processo:

- a) Obter a amostra de material biológico;

- b) Extrair as proteínas ou preparar de lâminas histológicas;
- c) Quantificar a expressão de proteínas dos biomarcadores por meio de contagem de células positivas para prever o prognóstico do câncer gástrico, em uma amostra tumoral recolhida de um paciente com esta malignidade;
- d) Comparar do nível de expressão obtido no passo c) com o nível de expressão dos dois biomarcadores em uma amostra de tecido gástrico de acometido pela neoplasia em estágio metastático, onde a detecção de 10% de marcação indica prognóstico de metástases.

[034] Os presentes inventores utilizaram o método de *Western blot* para avaliar a imunorreatividade de proteínas. Nesse método, após a coleta de tecido gástrico, as amostras de tecido foram inicialmente então lisadas em tampão de lise gelado. Proteína reduzida (25 µg) de cada amostra foi separada por 12,5% de sódio homogêneo eletroforese em gel de Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide (SDS-PAGE) e membrana electroblotted onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrana de polifluoreto de vinilideno (PVDF) (Hybond-P; GE Healthcare, EUA). A membrana de PVDF foi bloqueada com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,1% de Tween 20 e 5% de leite com baixo teor de gordura e incubado durante a noite a 4 °C com os anticorpos primários correspondentes: anti-UXT (PA5-18852; ; Life Technologies, EUA), anti-CIAPIN1 (PA5-59903; Life Technologies, EUA), e anti-ACTB (Ac-15; Life Technologies, EUA). Depois de lavagem extensa, um conjugado secundário à peroxidase o anticorpo foi adicionado durante 1 h à temperatura ambiente. As bandas imunorreativas foram visualizadas usando o Reagente de Western blotting Luminol, e as imagens foram adquirida usando um sistema de imagem digital ImageQuant 350 (GE Healthcare, Suécia). ACTB foi usado como um controle de referência. (Figura 13)

[035] Para avaliar a imunorreatividade de UXT e CIAPIN1, os presentes inventores utilizaram anticorpos primários comercialmente disponíveis. O método imuno-histoquímico adotado foi o da estreptavidina-biotina-peroxidase. (HSU, S. M.; RAINE L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* v. 29, n. 11, p. 1349-53, 1981). Neste caso, mais de 50% das células foram marcadas com o anticorpo anti-UXT e Anti-CIAPIN1 nas amostras de pacientes com câncer gástrico metastático. (Figuras 14 e 15)

[036] Na presente invenção, os agentes utilizados para medir os níveis de expressão devem incluir iniciador e sonda direcionados aos genes *UXT* e *CIAPIN1* e/ou anticorpos

direcionados às suas respectivas proteínas. Para isso, a presente invenção conta com um kit de avaliação do nível de expressão gênica, aqui definido como KIT A, e um kit de avaliação do nível de expressão proteica, aqui definido como KIT B.

[037] Tal como aqui utilizado, o termo "iniciador" refere-se à sequência de ácido nucleico, como a sequência de ácido nucleico com o grupo 3' hidroxila livre, que pode formar um par de bases com um modelo complementar e funciona como o ponto de partida para a cópia de um modelo. Na presente invenção, o prognóstico do câncer gástrico pode ser predito através realização de amplificação por qRT-PCR utilizando sondas de hibridização específicas para a sequência gênica do marcador da presente invenção. As condições de PCR e o comprimento das sondas iniciadoras podem ser modificados com base nos termos conhecidos na arte.

[038] Tal como aqui utilizado, o termo "sonda" refere-se ao fragmento de ácido nucleico tal como DNA que permite a ligação específica com a sequência do RNAm de interesse e pode determinar a presença de RNAm específico devido a marcação prévia. A sonda pode ser preparada na forma de oligonucleotídeo de cadeia simples. Na presente invenção, o prognóstico do câncer gástrico pode ser previsto através de técnica de hibridização conhecida na arte.

[039] Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo" refere-se a uma molécula de proteína específica dirigida aos epítomos de outra molécula alvo. Para o objetivo da presente invenção, o anticorpo refere-se ao anticorpo que se liga especificamente ao marcador da presente invenção e pode ser preparado por métodos convencionais a partir da proteína, que é codificada pelo gene marcador, obtida por clonagem de cada gene no Vetor de expressão de forma convencional - em que está incluído um peptídeo parcial que pode ser feito a partir da proteína.

[040] Na presente invenção, o nível de expressão do marcador para prever o prognóstico do câncer gástrico pode ser determinado pela identificação do nível de expressão do RNAm dos genes marcadores, quando comparado com amostra controle ou ainda pela expressão proteica dos marcadores em uma determinada amostra quando comparada com os devidos controles. Os métodos de análise para este processo são, mas não se limitam a: qRT-PCR e imuno-histoquímica. Podendo também serem utilizados métodos de sequenciamento de nova geração, *Western blot*, imunofluorescência, imunocitoquímica e espectrometria de massa.

[041] Para o KIT A, de preferência, o método de análise é qRT-PCR.

[042] Para o KIT B, de preferência, o método de análise é imuno-histoquímica.

[043] De preferência, a amostra biológica é o tecido gástrico tumoral.

[044] De acordo com a presente invenção, a amostra, no entanto, não se limita ao tecido gástrico tumoral. Alguns estudos evidenciam que células tumorais circulantes estejam nas fases iniciais da neoplasia gástrica ocupando o sistema sanguíneo e linfático. Dessa forma, para a presente invenção a amostra pode incluir sangue total, soro ou plasma. (KANG, H.M.; KIM, G. H.; JEON, H.K.; KIM, D.H.; JEON, T.Y.; PARK, D. Y.; JEONG, H.; CHUN, W. J.; KIM, M.H; PARK, J.; LIM, M.; KIM, T.H.; CHO, Y. K. Circulating tumor cells detected by lab-on-a-disc: Role in early diagnosis of gastric cancer. PLoS One, v. 29, n. 12(6), p. e0180251, 2017.)

[045] O KIT A da presente invenção é um kit de qRT-PCR. Nesse caso o kit compreende não somente os iniciadores e sondas para os genes marcadores, como também os reagentes e elementos necessários à realização da técnica.

[046] O KIT A da presente invenção inclui, para além de cada par de iniciadores que são específicos para o gene marcador, sondas de hibridização, tubo de ensaio ou outro recipiente apropriado, solução tampão de reação, desoxi-nucleótideos (dNTPs), Taq-polimerase e transcriptase reversa, DNAase, Inibidor de RNase, e água ultrapura e estéril.

[044] Como outro aspecto, a presente invenção oferece um kit de prognóstico do câncer gástrico compreendendo um agente para medir o nível de expressão de proteínas dos dois biomarcadores aqui referidos (KIT B).

[045] O KIT B da presente invenção é um kit de imuno-histoquímica. Nesse caso o kit compreende anticorpo primário e secundário para a proteínas UXT e CIAPIN1, tampões de recuperação antigênica, tampões de Lavagem, peróxido de Hidrogênio, soro bovino fetal.

REIVINDICAÇÕES

- 1. Kit de prognóstico de câncer gástrico**, caracterizado por compreender a expressão dos genes *UXT* e/ou *CIAPINI* como biomarcadores preditores de metástase de câncer gástrico.
- 2. Kit de prognóstico de câncer gástrico**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender a expressão gênica de *UXT* e/ou *CIAPINI*, preferencialmente em PCR em tempo real (KIT A).
- 3. Kit de prognóstico de câncer gástrico**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender a expressão proteica de *UXT* e *CIAPINI*, em preferencialmente em imunohistoquímica (KIT B).
- 4. Kit de prognóstico de câncer gástrico**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, caracterizado por compreender a expressão gênica ou proteica de *UXT* e *CIAPINI*, preferencialmente em qRT-PCR e/ou imunohistoquímica, ou por métodos de sequenciamento de nova geração, *Western blot*, imunofluorescência, imunocitoquímica e espectrometria de massa.
- 5. Kit de prognóstico de câncer gástrico**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender: reagentes de detecção e amplificação de ácido nucléico para os genes *UXT* e/ou *CIAPINI*.
- 6. Kit de prognóstico de câncer gástrico**, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 5, caracterizado por compreender reagentes de RT-PCR, solução tampão de reação, desoxinucleótidos (dNTPs), Taq-polimerase e transcriptase reversa, DNAase, Inibidor de RNase, água ultrapura e estéril, iniciadores e sondas previamente preparados em placa para os genes *UXT* e/ou *CIAPINI*.
- 7. Kit de prognóstico de câncer gástrico**, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 6, caracterizado por compreender iniciadores e sondas previamente produzidos por métodos convencionais.
- 8. Kit prognóstico de câncer gástrico**, de acordo com as reivindicações 1, 3 e 4, caracterizado por compreender anticorpo primário e secundário para proteínas *UXT*, tampões de recuperação antigênica, tampões de lavagem, peróxido de hidrogênio, soro bovino fetal.

9. Kit de prognóstico de câncer gástrico, de acordo com as reivindicações 1, 3 e 4, caracterizado por compreender anticorpo primário e secundário para a proteínas CIAPIN1, tampões de recuperação antigênica, tampões de lavagem, peróxido de hidrogênio, soro bovino fetal.

10. Kit de prognóstico de câncer gástrico, de acordo com as reivindicações 2, 5 e 6, caracterizado por consistir na expressão dos genes *UXT* e *CIAPIN1*, como biomarcadores de prognóstico em câncer gástrico, seguindo o uso de acordo com o seguinte processo:

- a) Obter a amostra de material biológico;
- b) Extrair o RNA da amostra;
- c) Produzir cDNA;
- d) Obter o nível de expressão de RNAm dos marcadores para prever o prognóstico do câncer gástrico numa amostra tumoral recolhida de um paciente com câncer gástrico;
- e) Comparar o nível de expressão obtido no passo d) com o nível de expressão dos marcadores em um tecido gástrico em estágio não metastático (M0).

11. Kit de prognóstico de câncer gástrico, de acordo com as reivindicações 3, 8 e 9, caracterizado por consistir na expressão de proteínas *UXT* e *CIAPIN1*, como biomarcadores de prognóstico em câncer gástrico, seguindo o uso de acordo com o seguinte processo:

- a) Obter amostra de material biológico
- b) Preparar de lâminas histológicas
- c) Obter a marcação das proteínas *UXT* e/ou *CIAPIN1* para prever o prognóstico do câncer gástrico numa amostra tumoral recolhida de um paciente com câncer gástrico;
- d) Comparar o nível de expressão obtido no passo c) com o nível de expressão dos marcadores em um tecido gástrico neoplásico em estágio não metastático (M0).

12. Kit de prognóstico de câncer gástrico, de acordo com as reivindicações 10 e 11, caracterizado por consistir na expressão de *UXT* (gene) ou *UXT* (proteína) indicar a presença e/ou risco de câncer gástrico do tipo metastático.

13. Kit de prognóstico de câncer gástrico, de acordo com as reivindicações 10 e 11, caracterizado por consistir na expressão de *CIAPIN1* (gene) ou *CIAPIN1* (proteína) indicar a presença e/ou risco de câncer gástrico do tipo metastático.

14. Kit de prognóstico de câncer gástrico, de acordo com as reivindicações 1, 2, 5, 6, 10, 12 e 13, caracterizado por compreender a combinação do Kit de expressão gênica dos biomarcadores *UXT* e *CIAPIN1*.

15. Kit de prognóstico de câncer gástrico, de acordo com as reivindicações 1, 3, 4, 8, 9, 11, 12 e 13, caracterizado por compreender a combinação do Kit de expressão proteica dos biomarcadores *UXT* e *CIAPIN1*.

16. Kit de prognóstico de câncer gástrico, de acordo com as reivindicações 1 a 15, caracterizado por compreender a combinação do Kit de expressão gênica (KIT A) e proteica (KIT B) dos biomarcadores *UXT* e/ou *CIAPIN1*.

RESUMO

KITs DE PROGNÓSTICO DE CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico é a quarta neoplasia mais frequente no mundo, causando mais 700.000 mortes por ano no mundo. A maior parte das pesquisas voltadas para o estudo do câncer gástrico concentra-se em países com altas taxas de incidência, como o Japão. Estudos e políticas públicas são cada vez mais necessários para estabelecer um melhor manejo do câncer gástrico no Brasil uma vez que esta neoplasia é caracterizada por diversos fatores. A sobrevida relativa de indivíduos acometidos pela neoplasia gástrica é de cinco anos, sendo considerada baixa tanto para países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Este mal prognóstico deve-se principalmente pelo diagnóstico tardio que leva a poucas possibilidades de tratamento. A presente invenção refere-se a dois biomarcadores preditores de câncer gástrico do tipo metastático e a composição de kits de prognóstico de malignidades do estômago que compreende metodologias e agentes de quantificação do nível de expressão dos genes *UXT* e *CIAPINI* e suas respectivas proteínas. De acordo com a presente invenção, é possível aferir a respeito do prognóstico de câncer gástrico para o direcionamento do tratamento do câncer gástrico em estágios iniciais da doença.

FIGURA 11

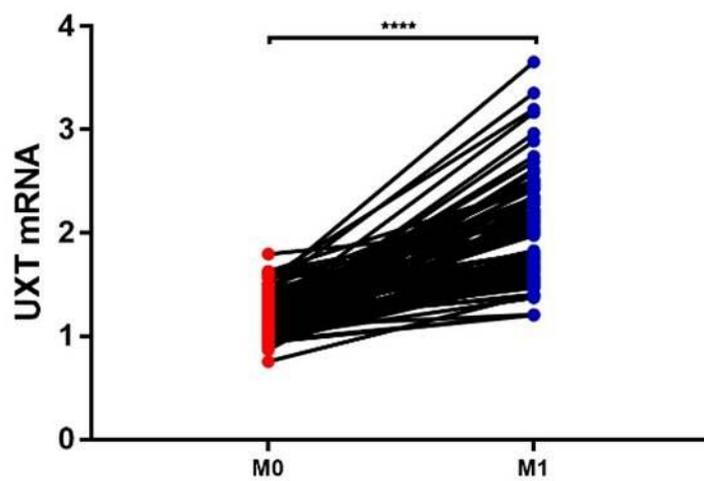
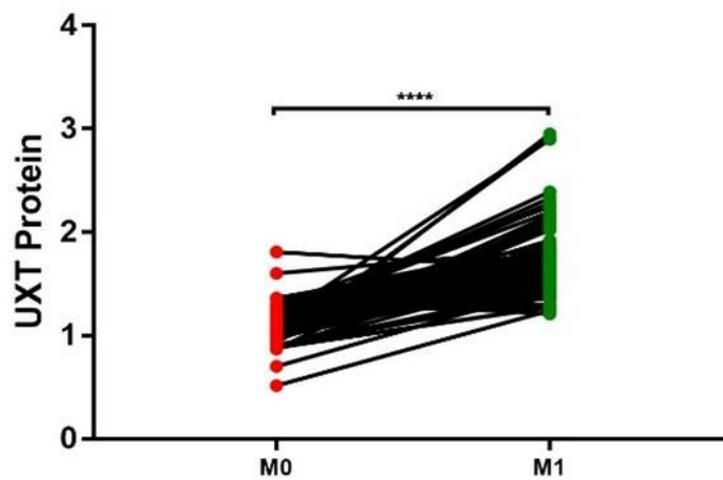
A**B**

FIGURA 12

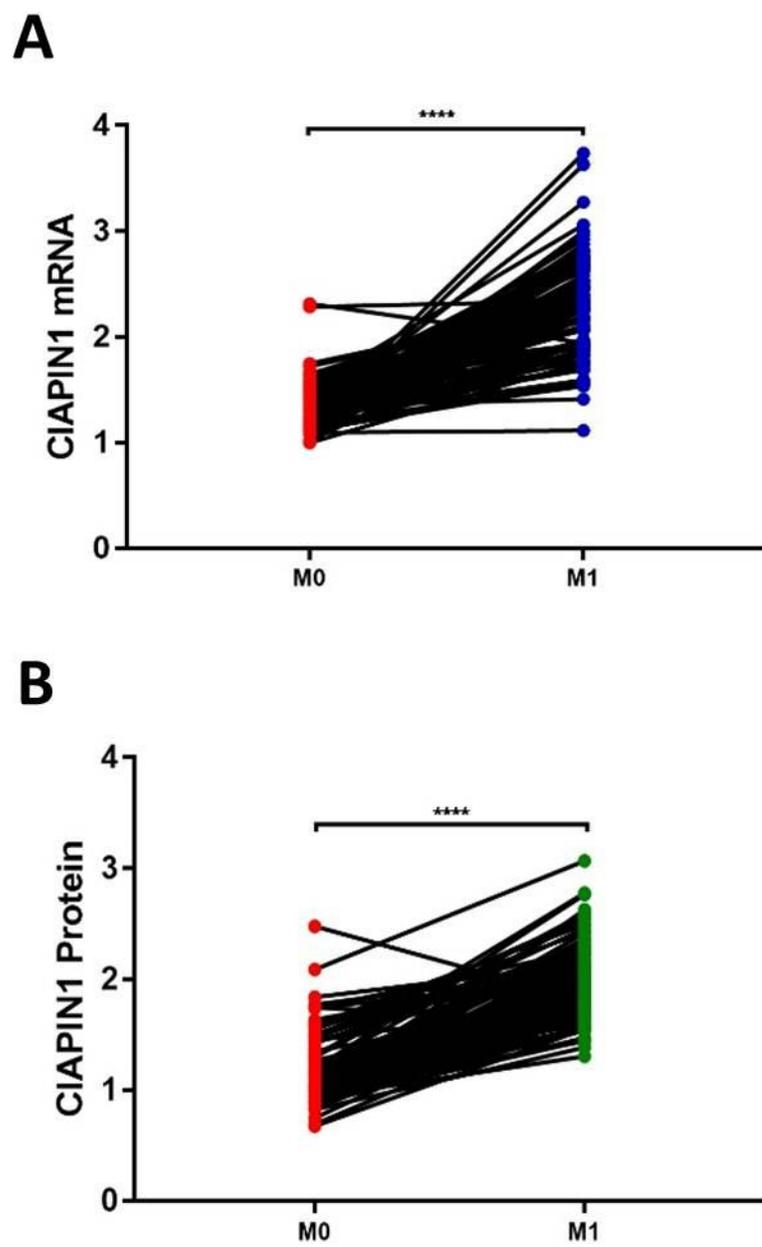


FIGURA 13

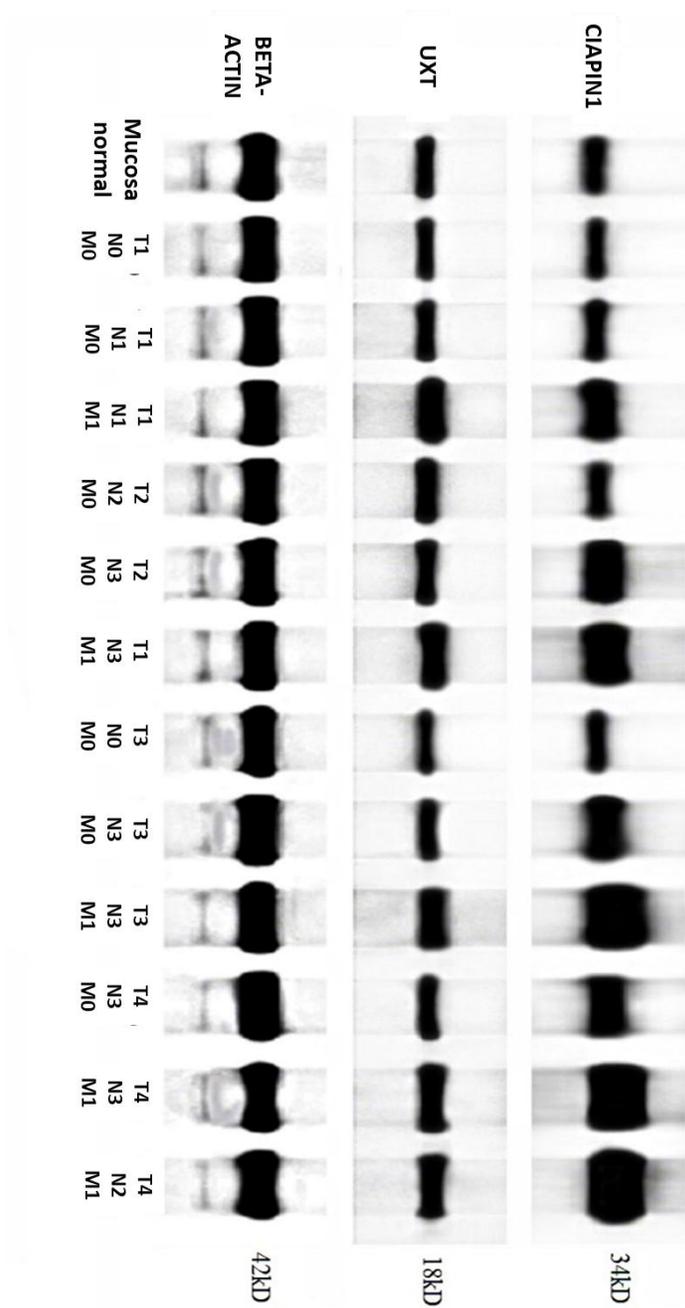


FIGURA 14

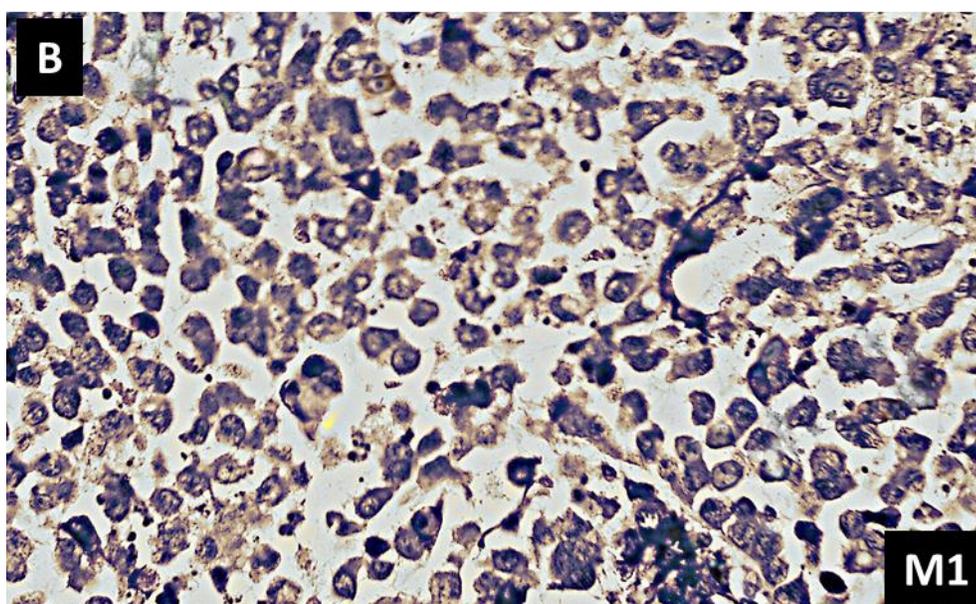
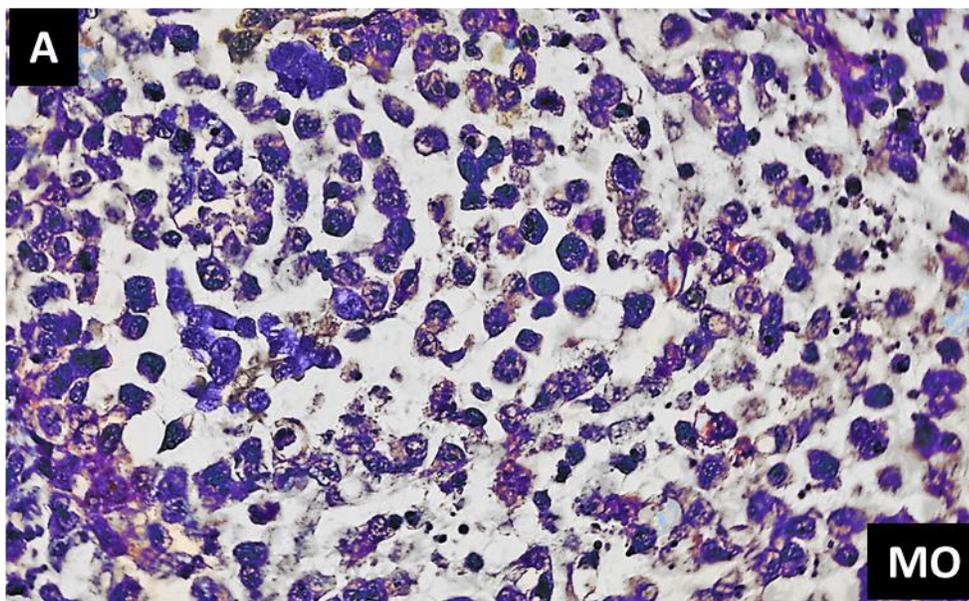
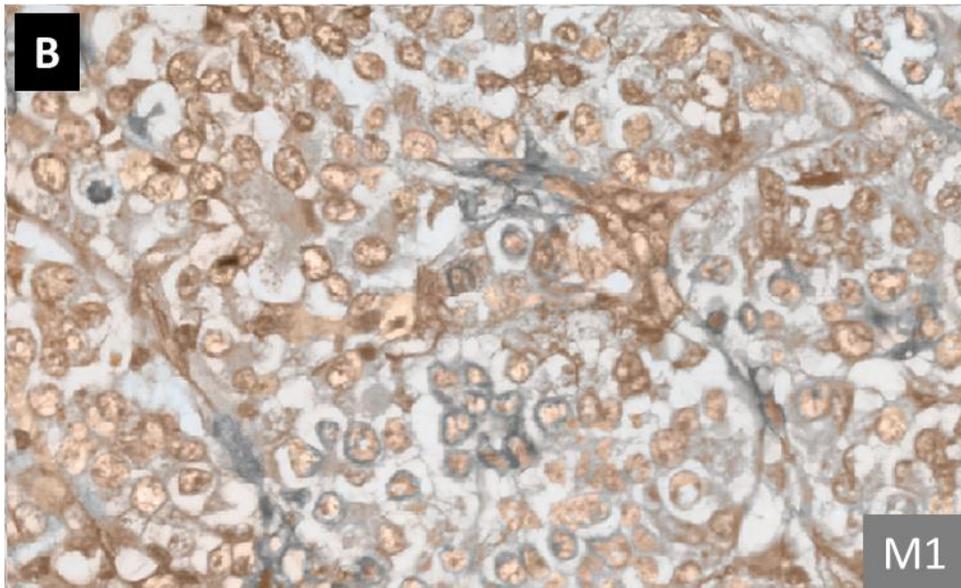
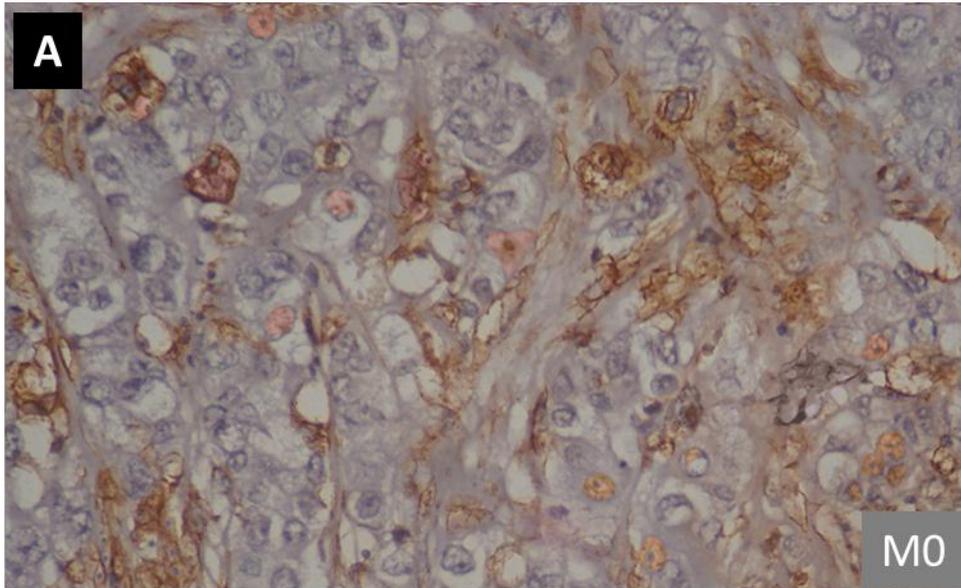


FIGURA 15



5 CONCLUSÃO

Nossos resultados revelaram um amplo painel de genes cuja superexpressão está direta ou indiretamente associado à amplificação de *MYC*, os quais podem ser explorados como fortes candidatos a biomarcadores de diagnóstico e prognóstico de câncer gástrico em estudos posteriores. Este estudo demonstrou que o papel do oncogene *MYC* é de suma importância para o estabelecimento da carcinogênese gástrica do tipo metastática por regular mais de 2000 genes cruciais para o avanço da neoplasia no indivíduo, sendo pelo menos 150 deles correlacionados a um prognóstico preditivo de metástases. Além disso, a linhagem AGP01 demonstrou excelentes resultados como modelo de superexpressão de *MYC* para a condução de estudos sobre câncer gástrico do tipo metastático.

Alterações nos níveis de expressão de genes regulados por *MYC* também foram reveladas entre os diferentes estágios da neoplasia. No presente estudo, a superexpressão dos genes *UXT* e *CIAPINI* foi significativamente relacionada ao fenótipo metastático de câncer gástrico, mesmo em pacientes em estágios iniciais da doença. Esses dados sugerem que a análise de expressão de *UXT* e *CIAPINI* pode atuar como ferramenta clínica preditiva de metástases e/ou de um pior prognóstico. O gene *MTA2*, no entanto, tem uma superexpressão indicadora de metástase dependente da progressão neoplásica ou de uma fase mais avançada da neoplasia, quando o prognóstico já é indicativo de agressividade. Além disso, a superexpressão de *MTA2* está associada a outros fatores clínicos não indicativos de metástase, motivos pelos quais, a análise de expressão desse gene não é um bom indicador de predição de metástase.

Finalmente, nossos dados mostraram que expressão de *UXT* e *CIAPINI* pode ser detectada em tumor primário e por diferentes técnicas moleculares, auxiliando a determinação de prognóstico pela predição de metástases à distância de maneira minimamente invasiva. Dessa forma, nós sugerimos a utilização de uma ferramenta composta por dois Kits de investigação da expressão dos genes marcadores de pior prognóstico. Assim, esta pesquisa contribui tanto para o esclarecimento de eventos da neoplasia gástrica, como contribui para o direcionamento adequado de terapia a pacientes com câncer gástrico.

REFERÊNCIAS

- ABDI H. **The Bonferroni and Šidák corrections for multiple comparisons.** In Encyclopedia of Measurement and Statistics. Thousand Oaks: Sage. Ed. N Salkind;. pp. 103–7, 2007.
- ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer de mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2002, v. 48, n. 1, p. 113-131, 2002.
- AMIN, M.B., EDGE, S., GREENE, F., BYRD, D.R., BROOKLAND, R.K., WASHINGTON, M.K., et al. (8th edition). Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017. Available from: <http://www.springer.com/us/book/9783319406176#aboutBook>.
- ASSOCIAÇÃO JAPONESA DE CÂNCER GÁSTRICO. Japanese gastric cancer treatment guidelines. **Gastric Cancer**, v. 20, n. 1, p.1-19, 2018.
- AUDIC S, CLAVERIE J. The Significance of Digital Gene Expression Profiles. doi:doi:10.1101/gr.7.10.986, 1997.
- BASS, A. J. et al. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature**. v. 513, n. 11, p. 202-209, 2014.
- BENETATOS, L.; VARTHOLOMATOS, G.; HATZIMICHAEL, E. Polycomb group proteins and MYC: the cancer connection. **Cellular and Molecular Life Sciences**.v. 71, n. 2, pp 257–269, 2014.
- BENJAMINI Y, YEKUTIELI D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. **The Annals of Statistics**. v.29, p. 1165–1188, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria nacional de assistência à saúde. Instituto Nacional do câncer [INCA]. **Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil**, Rio de janeiro, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria nacional de assistência à saúde. Instituto Nacional do câncer [INCA]. **Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil**, Rio de janeiro, 2018.
- BRENNER H; ROTHENBACHER D; ARNDT V. Epidemiology of stomach cancer. **Methods Mol Biol**, v. 472, p. 467-477, 2009.
- CARCAS, L.P. Gastric cancer review. *Journal of Carcinogenesis*. v. 13, n.14, 2014.
- CALCAGNO, D. Q.; LEAL, M.F.; SEABRA, A. D.; KHAYAT, A. S.; CHEN, E. S.; DEMACHKI, S.; ASSUMPÇÃO, P. P.; FARIA, M. R. G. et al. Interrelationship between chromosome 8 aneuploidy, c-MYC amplification and increased expression in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. **BMC Gastroenterology**. v. 13, n. 141, p. 1-10, 2006.

CALCAGNO, D. Q.; FREITAS, V. M.; LEAL, M. F.; SOUZA, C. R. T.; DEMACHKI, S.; MONTENEGRO, R.; ASSUMPÇÃO, P.P.; KHAYAT, A. S.; SMITH, M. A. C; SANTOS, A. K. C. R.; BURBANO, R. M. R. MYC, FBXW7 and TP53 copy number variation and expression in Gastric Cancer. **BMC Gastroenterology**, v. 13, n. 141, 2013.

CALCAGNO, D. Q., SMITH, M. A. C; BURBANO, R. R. Cancer Type-Specific Epigenetic Changes: Gastric Cancer. **Methods Mol Biol**. v. 1238, n. 1, p.79-101, 2015.

CERQUETANI, S; BABA, E. Adenomas ou Pólipos Serrilhados Sésseis de Cólon. **Revista SOBED**. v. 28, n.1, p. 32-38, 2015.

CHEN, J.; LI, Y.; ZHENG, Q.; BAO, C.; HE, J.; CHEN, B. et al. Circular RNA profile identifies circPVT1 as a proliferative factor and prognostic marker in gastric cancer. **Cancer Lett**. v.388, p. 208-219, 2017.

CHEN, Q.; GE, X.; ZHANG, Y.; XIA, H.; YUAN, D.; TANG, Q.; CHEN, L.; PANG, X.; LENG, W.; BI, F. Plasma miR-122 and miR-192 as potential novel biomarkers for the early detection of distant metastasis of gastric cancer. **Oncology Reports**. v. 31, p.1863-1870, 2014.

CLAASSEN, Y. H. M.; HARTGRINK, H. H.; DIKKEN J. L.; DE STEUR, W. O.; VAN SANDICK, J. W.; VAN GRIEKEN, N. C. T. et al. Surgical morbidity and mortality after neoadjuvant chemotherapy in the CRITICS gastric cancer trial. **European Journal of surgical oncology**. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.02.004>, 2018.

COBURN, N.; COSBY, R.; KLEIN, L.; KNIGHT, G.; MALTHANER, R.; MAMAZZA, J. et al. Staging and surgical approaches in gastric cancer: A systematic review. **Cancer Treatment Reviews**. v. 63, p.104–115, 2014.

COLQUHOUN, A.; ARNOLD, M.; FERLAY, J.; GOODMAN, K. J.; FORMAN, D.; SOERJOMATARAM, I. Global patterns of cardia and non-cardia gastric cancer incidence in 2012. **Gut**. v. 64, p. 1881–1888, 2015

CONACCI-SORRELL, M.; MCFERRIN, L.; EISENMAN, R. N. An Overview of MYC and Its Interactome. **Cold Spring Harb Perspect Med**. V. 4, n. a014357, p. 1-23, 2014.

CORSO, S.; GIORDANO, S. How can gastric cancer molecular profiling guide future therapies? **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 7, p. 534-544, 2016.

COSTA, E. B. O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 125-136, 2013.

COVINGTON, K. R.; FUQUA, S. A. W. Role of MTA2 in human cancer. **Cancer Metastasis Rev**. v. 33, p. 921–928, 2014.

CREW, K. D.; NEUGUT, A. I. Epidemiology of gastric cancer. **World J Gastroenterol.** v. 21, n. 12(3), p. 354-362, 2006.

DANG, C. V. MYC on the path to cancer. **Cell**, v. 149, n. 1, p. 22-35, 2012.

D'ELIA, L.; ROSSI, G.; IPPOLITO, R.; CAPPUCCIO, F. P.; STRAZZULLO, P. Habitual salt intake and risk of gastric cancer: a meta-analysis of prospective studies. **Clin Nutr.** v. 31, n. 4, p. 489-98, 2012.

EVANS, J. R.; FENG, F. Y.; CHINNAIYAN, A. M. The bright side of dark matter: lncRNAs in cancer. *The Journal of Clinical Investigation.* v. 126, p. 2775-2782, 2016.

FLEIGE, S.; WALF, V.; HUCH, S.; PRGOMET, C.; SEHM, J.; PFAFFL, M. W. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. **Biotechnol Lett**, 2006. 28:1601–1613.

FOCK, K. M. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. **Aliment Pharmacol Ther.** v.40, n. 1, p. 250–260, 2014.

FORMAN, D. BURLEY, V. J. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.** v. 20, n. 4, p. 633-649, 2006.

FU, D. G. Epigenetic alterations in gastric cancer (Review). **Molecular Medicine Reports.** v. 12, n.1, p. 3223-3230, 2015.

GRAZIANO, F.; HUMAR, B.; GUILFORD, P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. **Ann Oncol.** v. 14, n. 12, p. 1705-1713, 2003.

GUGGENHEIM, D. E.; SHAH, M. A. Gastric Cancer Epidemiology and Risk Factors. **Journal of Surgical Oncology.** v. 107, n. 1; p. 230–236, 2013.

HANKIN, M.H.; MORSE, D.E.; BENNETT-CLARKE, C.A. **Anatomia clínica. Uma abordagem por estudos de casos.** Artmed AMGH Editora Ltda: Porto Alegre: 2015. 432p.

HAO, Z.; LI, X.; QIAO, T.; DU, R.; ZHANG, G.; FAN, D. Subcellular Localization of CIAPIN1. **J Histochem Cytochem.** v.54, n. 12, p.1437–1444, 2006.

HAO, Z; LI, X.; QIAO, T.; LI, S.; LV, Y.; FAN, D. Downregulated expression of CIAPIN1 may contribute to gastric carcinogenesis by accelerating cell proliferation and promoting cell cycle progression. **Cancer Biol Ther.** V. 8, n.11, p. 1064-70, 2009.

HIPPO, Y.; TANIGUCHI, H.; TSUTSUMI, S.; MACHIDA, N.; CHONG, J.; FUKAYAMA, M.; KODAMA, T.; ABURATANI, H. Global Gene Expression Analysis of Gastric Cancer by Oligonucleotide Microarrays. **Cancer Research,** v. 62, n. 1, p. 233–240, 2002.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 75, p.734, 1981

HOWLADER, N.; MARIOTTO, A. B.; WOLOSHIN, S.; SCHWARTZ, L. M. Providing Clinicians and Patients With Actual Prognosis: Cancer in the Context of Competing Causes of Death. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, n. 49, v. 1, p. 255-264, 2014.

HUR, K.; TOIYAMA, Y.; OKUGAWA, Y.; IDE, S.; IMAOKA, H.; BOLAND, C. R.; GOEL, A. Circulating microRNA-203 predicts prognosis and metastasis in human colorectal cancer. v. 66, p. 654–665, 2017.

ISHIGAMI, S.; NATSUGOE, S.; HOKITA, S.; CHE, X.; TOKUDA, K.; NAKAJO, A et al. Clinical importance of preoperative carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 levels in gastric cancer. **J Clin Gastroenterol**. v. 32, n. 1, p. 41-44, 2001.

JIANG, B.; LI, S.; JIANG, Z.; SHAO, P. Gastric cancer associated genes identified by an integrative analysis of gene expression data. **BioMed Research International**.doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/7259097>, 2017.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017

KHALEGHIAN M, JAHANZAD I, SHAKOORI A, RAZAVI AE, AZIMI C. Association Between Amplification and Expression of C-MYC Gene and Clinicopathological Characteristics of Stomach Cancer. **Iran Red Crescent Med J**. v.18, n. 2, p.e21221-e21231, 2016.

KANDA, M.; KODERA, Y. Recent advances in the molecular diagnostics of gastric cancer. **World J Gastroenterol** . v. 21; n. 34, p. 9838-9852, 2015.

KANG, H.M.; KIM, G. H.; JEON, H.K.; KIM, D.H.; JEON, T.Y.; PARK, D. Y.; JEONG, H.; CHUN, W. J.; KIM, M.H; PARK, J.; LIM, M.; KIM, T.H.; CHO, Y. K. Circulating tumor cells detected by lab-on-a-disc: Role in early diagnosis of gastric cancer. **PLoS One**, v. 29, n. 12(6), p. e0180251, 2017.

KARIMI, P.; ISLAMI, F.; ANANDASABAPATHY, S.; FREEDMAN, N. D.; KAMANGAR, F. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. **Cancer Epidemiol Biomarkers**. v. 23, n. 5, p. 700–713, 2014.

KLUTSTEIN, M.; NEJMAN, D.; GREENFIELD, R.; CEDAR, H. DNA Methylation in Cancer and Aging. **Cancer Res**. v.76, n. 12, p. 3446-50, 2016.

KONG, X; MA, S; GUO, J.; MA, Y; HU, Y; WANG, J; ZHENG, Y. Ubiquitously expressed transcript is a novel interacting protein of protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 2. **Molecular Medicine Reports**, v.11, n.1, p. 2443-2448, 2015.

KRESS, T. R.; SABÒ, A.; AMATI, B. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. **Nature Reviews Cancer**. v. 15, p. 593-607, 2015.

KYPRIDEMOS, C.; GUZMAN-CASTILLO, M1.; HYSENI, L1.; HICKEY, GL.; BANDOSZ, P.; BUCHAN, I.; CAPEWELL, S.; O'FLAHERTY, M. Estimated reductions in cardiovascular and gastric cancer disease burden through salt policies in England: an IMPACTNCD microsimulation study. **BMJ Open**. v. 24, n.7(1), p. e013791, 2017.

LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 64, n. 1, p.31-49, 1965.

LAZAR D. C.; AVRAM, M. F.; ROMASAN, Y.; CORNIANU M, TABAN S, GOLDIS A. Prognostic significance of tumor immune microenvironment and immunotherapy: Novel insights and future perspectives in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*. v. 24, n. 32, p. 3583-3616, 2018.

LEAL, M. F.; MARTINS, D. O.; NASCIMENTO, J. L.; DA SILVA, C. E.; VITA LAMARÃO M. F.; CALCAGNO, D. Q.; KHAYAT, A. S.; ASSUMPÇÃO, P. P.; CABRAL, I. R.; DE ARRUDA CARDOSO SMITH M, BURBANO R. R. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genet Cytogenet**. 2009; 195:85-91.

LEAL, M. F.; RIBEIRO, H. F.; REY, J. A.; PINTO, G. R.; SMITH, M. C.; MOREIRA-NUNES, C. A.; ASSUMPÇÃO, P. P.; LAMARÃO, L. M.; CALCAGNO, D. Q.; MONTENEGRO, R. C.; BURBANO, R. R. YWHAE silencing induces cell proliferation, invasion and migration through the up-regulation of CDC25B and MYC in gastric cancer cells: new insights about YWHAE role in the tumor development and metastasis process. **OncoTarget**. AOP:1-18, 2016.

LEE, Y. Y.; DERAKHSHAN, M. H. Environmental and lifestyle risk factors of gastric cancer. **Arch Iran Med**. v. 16, n. 6, p. 358-365, 2013.

LI, X.; HONG, L.; ZHAO, Y.; JIN, H.; FAN, R.; DU, R.; XIA, L.; LUO, G.; FAN, D. A new apoptosis inhibitor, CIAPIN1 (cytokine-induced apoptosis inhibitor 1), mediates multidrug resistance in leukemia cells by regulating MDR-1, Bcl-2, and Bax. **Biochem Cell Biol**. V. 85, n. 6, p. 741-50, 2007.

LI, X.; HAO, Z.; FAN, R.; ZOU, X.; JIN, H.; PAN, Y.; HE, L.; DU, R.; GAO, L.; LIU, D.; FAN, D. CIAPIN1 inhibits gastric cancer cell proliferation and cell cycle progression by downregulating CyclinD1 and upregulating P27. **Cancer Biol Ther**. v. 6, p. 10, p. 1539-1545, 2007.

LI, X.; FAN, R.; ZOU, X.; HONG, L.; GAO, L.; JIN, H. et al. Fan Reversal of Multidrug Resistance of Gastric Cancer Cells by Downregulation of CIAPIN1 with CIAPIN1 siRNA. **Molecular Biology**; v. 42, p. 91–97, 2008.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**. doi:10.1093/bioinformatics/btp324, 2009.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**. doi:10.1093/bioinformatics/btp698, 2010.

LI, H. Exploring single-sample snp and indel calling with whole-genome de novo assembly. **Bioinformatics**. doi:10.1093/bioinformatics/bts280, 2012.

LI, X; HAO, Z; FAN, R; ZOU, X; JIN, H; PAN, Y; HE, L; DU, R; GAO, L; LIU, D; FAN, D. CIAPIN1 inhibits gastric cancer cell proliferation and cell cycle progression by downregulating CyclinD1 and upregulating P27. **Cancer Biol Ther**. V.6, n. 10 p. 1539-45, 2007.

LIN, M.; SONG, H.; DING, X. Long non-coding RNAs involved in metastasis of gastric cancer. **World J Gastroenterol**. v. 24, n. 33, p. 3724-3737, 2018.

LIU, Y.; PATEL, S.; NIBBE, R.; MAXWELL, S.; CHOWDHURY, S.; KOYUTURK, M.; ZHU, X.; LARKIN, E. K.; BUXBAUM, S. G.; PUNJABI, N. M.; GHARIB, S. A.; REDLINE, S.; CHANCE, M. R. Systems biology analyses of gene expression and genome wide association study data in obstructive sleep apnea. **Pac Symp Biocomput**. p. 14–25, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**. doi:http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262, 2001.

LONG-BAO, W.; BO-WEN, Q.; YAN-XING, X. Establishment of Human Gastric Cancer Cell Line (SGC· 7901) **Intraperitoneally Transplantable in Nude Mice**. In: Recent Advances in Management of Digestive Cancers. Springer-Verlag Tokyo. Doi: 10.1007/978-4-431-68252-3_114, 1993.

LUO, J.; MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. **Cancer Cell**. V. 4, p. 257-262, 2003.

LUTHRA, R.; CHEN, H.; ROY-CHOWDHURI, S.; SINGH, R. Next-Generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics of Cancer: Advantages and Challenges. **Cancers**, v. 7, n. 1, p. 2023–2036, 2015.

MALEKI, S. S.; ROCKEN, C. Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology. **Neoplasia**. v. 19, n. 5, p. 412-420, 2017.

MALIEKAL, T. T.; BAJAJ, J.; GIRI, V.; SUBRAMANYAM, D.; KRISHNA, S. The role of Notch signaling in human cervical cancer: implications for solid tumors. **Oncogene**. V. 27, n. 38, p. 5110-5114, 2008.

MARCOS-PINTO, R. Genetic Variations and Gastric Cancer Risk. **GE Port J Gastroenterol**. v. 22, n. 4, p. 135-136, 2015.

MARTEL, C.; FORMAN, D.; PLUMMER, M. Gastric Cancer: Epidemiology and Risk Factors. **Gastroenterol Clin N Am**, v. 42, n.1, p. 219–240, 2013.

MAUÉS JHS, RIBEIRO HF, PINTO GR, LOPES LO, LAMARÃO LM, PESSOA CMF, MOREIRA-NUNES CFA, CARVALHO RM, ASSUMPCÃO PP, REY JÁ, BURBANO RMR. Gastric cancer cell lines have different MYC-regulated expression patterns but share a common core of altered genes. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**. <https://doi.org/10.1155/2018/5804376>, 2018.

MCLEAN, M. H.; EL-OMAR, E. M. Genetics of gastric cancer. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.** v. 11, p.664–674, 2014.

MIN, L.; ZHAO, Y.; ZHU, S.; QIU, X.; CHENG, R.; XING, J.; SHAO, L.; GUO, S.; ZHANG, S. Integrated analysis identifies molecular signatures and specific prognostic factors for different gastric cancer subtypes. **Translational Oncology**. v. 10, p. 99–107, 2017.

NAKASATO, F.; SAKAMOTO, H.; MORI, M.; HAYASHI, K.; AIMOSATO, Y.; NISHI, M. et al. Amplification of the c-MYC oncogene in human stomach cancers. **Gann**. v. 75, p. 737-742, 1984.

PORTA, C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. **Frontiers in Oncology**. v. 4, n. 64, p. 1-11, 2014.

NING, Z.; NING, Z.; COX, A. J.; COX, A. J.; MULLIKIN, J. C et al. SSAHA: A Fast Search Method for Large DNA Databases. **Genome Res**. doi:10.1101/gr.194201.1, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **World health statistics 2018**. Genebra: WHO, 2018.

OTTINI, L.; FALCHETTI, M.; LUPI, R.; RIZZOLO, P.; AGNESE, V.; COLUCCI, G.; BAZAN, V.; RUSSO, A. Patterns of genomic instability in gastric cancer: clinical implications and perspectives. **Annals of Oncology**, v. 17, n. 7, p.97–102, 2006.

QUE N.; MOTOSHITA, J.; YOKOZAKI, H.; HAYASHI, K.; TAHARA, E.; TAHARA, K.; MATSUSAKI, K. YASUI, W. Distinct promoter hypermethylation of p16INK4a, CDH1, and RAR-beta in intestinal, diffuse–adherent, and diffuse–scattered type gastric carcinomas. **Pathol**; v. 198, p. 55–59, 2002.

PACHATHUNDIKANDI, S. K.; TEGTMEYER, N.; BACKERT, S. Signal transduction of *Helicobacter pylori* during interaction with host cell protein receptors of epithelial and immune cells. **Gut Microbes** v. 4, n. 6, p. 454–474, 2013.

PAIK, S. M. et al. Cessionário original Samsung Life Public Welfare Foundation. **Marker for predicting gastric cancer prognosis and method for predicting gastric cancer prognosis using the same**. US20130337449. 13.12.2011.

PAN, H.; LI, T.; JIANG, Y.; PAN, C.; DING, Y.; HUANG, Z.; YU, H.; KONG, D. Overexpression of Circular RNA ciRS-7 Abrogates the Tumor Suppressive Effect of miR-7 on Gastric Cancer via PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**. V. 119, p. 440–446, 2018.

PANDI, N. S.; MANIMUTHU, M.; HARUNIPRYIA, P.; MURUGESAN, M.; ASHA, G.V.; RAGENDRAN, S. *In silico* analysis of expression pattern of a Wnt/ β -catenin responsive gene ANLN in gastric cancer, **Gene**, v. 545, p. 23–29, 2014.

PAREEK, C. S.; SMO CZYNSKI, R.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **J Appl Genetics**, v. 52, n. 1, p. 413–435, 2011.

PARISI A, REIM D, BORGHI F, NGUYEN NT, QI F, CORATTI A. Minimally invasive surgery for gastric cancer: A comparison between robotic, laparoscopic and open surgery. **World J Gastroenterol**. v. 23, n. 13, p. 2376-2384, 2017.

PARK, D. J.; THOMAS, N. J.; YOON, C.; YOON, S. S. Vascular Endothelial Growth Factor A Inhibition in Gastric Cancer. **Gastric Cancer**. v. 18, p. 33–42, 2015.

PATEL, T. N.; ROY, S.; RAVI, R. Gastric cancer and related epigenetic alterations. **ecancer**. v. 714, n. 11, p. 1-13, 2017.

PELENGARIS, S.; KHAN, M.; EVAN, J. c-MYC: More than just a matter of life and death. **Nature Reviews**. v. 2, p. 764-773, 2002.

PEREIRA, M. A.; RAMOS, M. F. K. P.; FARAJ, S. F.; DIAS, A. R.; YAGI, O. K.; ZILBERSTEIN, B.; CECCONELLO, I.; ALVES, V. A. F.; MELLO, E. S.; RIBEIRO JR, U. Clinicopathological and prognostic features of Epstein-Barr virus infection, microsatellite instability, and PD-L1 expression in gastric cancer. **J Surg Oncol**. v.1; p.1–11, 2018.

PORTA C, PAGLINO C, MOSCA A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. **Frontiers in Oncology**. v. 4, n. 64, p. 1-11, 2014.

POWELL, A. G. M. T.; SOUL, S.; CHRISTIAN, A.; LEWIS, W. G. Meta-analysis of the prognostic value of CpG island methylator phenotype in gastric cancer. **BJS**; v. 105, p. e61–e68, 2018.

QI, M.; GANAPATHY, S.; ZENG, W.; ZHANG, J; LITTLE, J. B.; YUAN, Z. UXT, a novel MDMX-binding protein, promotes glycolysis by mitigating p53-mediated restriction of NF- κ B activity. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 174584-17593, 2015.

REN, S.; RIVARD, C. J.; YU, H.; GENOVA, C.; ROZENBOOM, L.; GAO, D et al. A miRNA panel predicts sensitivity of FGFR inhibitor in lung cancer cell lines. **Clin Lung Cancer**. v. 19, n. 5, p. 450–456, 2018.

ROCHA, C. A. M.; ROCHA, S. M. M. MYC gene amplification in gastric adenocarcinoma. **Academic Journal of Cancer Research**. v. 4, n. 1, p. 18-23, 2011.

ROY, R. K.; HOPPE, M. M.; SRIVASTAVA, S.; SAMANTA, A.; SHARMA, N.; TAN, K. T. et al. CEACAM6 is upregulated by *Helicobacter pylori* CagA and is a biomarker for early gastric cancer. **Oncotarget**. v. 3, p. 55290-301, 2016.

RUGGE, M.; FASSAN, M.; GRAHAM, D. Y. Epidemiology of Gastric Cancer. **Gastric cancer**. doi: 10.1007/978-3-319-15826-6_2, 2015.

SÁNCHEZ-MORGAN, N.; KIRSCH, K. H.; TRACKMAN, P. C.; SONENSHEIN, G. E. UXT Is a LOX-PP Interacting Protein That Modulates Estrogen Receptor Alpha Activity in Breast Cancer Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**. V. 118, p. 2347–2356, 2017.

SCHROER, A., SCHNEIDER, S., ROPERS, H., AND NOTHWANG, H. Cloning and characterization of UXT, a novel gene in human Xp11, which is widely and abundantly expressed in tumor tissue. **Genomics**. v.56, p. 340–343, 1999.

SHAH, M. A.; KHANIN, R.; TANG, L.; JANJIGIAN, Y. Y.; KLIMSTRA, D. S.; GERDES, H.; KELSEN, D. P. Molecular Classification of Gastric Cancer: A New Paradigm. **Clinical Cancer Research**. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2203, 2011.

SILVA, T. C. R.; LIMA, P. D. L.; BAHIA, M.; KHAYAT, A. S.; BEZERRA, F. S.; ANDRADE-NETO, M.; SEABRA, A. D.; PONTES, T. B.; MORAES, M. O.; MONTENEGRO, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; PINTO, G. R.; BURBANO, R. R. Pisosterol induces interphase arrest in HL60 cells with C-MYC amplification. **Human & Experimental Toxicology**, v. 29, p. 235-240, 2010.

SITARZ R, SKIERUCHA M, MIELKO J. OFFERHAUS GJA, MACIEJEWSKI R, POLKOWSKI WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. **Cancer Management and Research**; v. 10, p. 239–248, 2018.

STAHL, P.; SEESCHAAF, C.; LEBOK, P.; KUTUP, A.; BOCKHORN, M.; IZBICKI, K. R.; BOKEMEYER, C.; SIMON, R.; SAUTER, G.; MARX, A. H. Heterogeneity of amplification of HER2, EGFR, CCND1 and MYC in gastric cancer. **BMC Gastroenterology**, v. 15, n. 7, p. 1-13, 2015.

SHI, H.; ZHOU, Y.; LIU, H.; CHEN, C.; LI, S.; LI, N.; LI, X.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; WANG, W.; ZHAO, Q. Expression of CIAPIN1 in human colorectal cancer and its correlation with prognosis. **BMC Cancer**. v. 10:477, 2010.

SHUKLA, C. J.; MCCORKINDALE, A. L.; GERHARDINGER, C.; KORTHAUER, K. D.; CABILI M. N.; SHECHNER, D. M. et al. High-throughput identification of RNA nuclear enrichment sequences. **The EMBO Journal**. v. 37, p. e98452, 2018.

SOON, W. W.; HARIHARAN, M.; SNYDER, M. P. High-throughput sequencing for biology and medicine. **Molecular Systems Biology**. v. 9; n. 640, p. 1-14, 2013.

SUMIYAMA, K. Past and current trends in endoscopic diagnosis for early stage gastric cancer in Japan. **Gastric Cancer**. v. 20 (Suppl 1), p. S20–S27, 2017.

SUN, S.; TANG, Y.; LOU, X.; ZHU, L.; YANG, K.; ZHANG, B.; SHI, H.; WANG, C. UXT is a novel and essential cofactor in the NF-kappaB transcriptional enhanceosome. **The Journal of Cell Biology**. v. 178, n. 2, p. 231–244, 2007.

TAKAHASHI, T.; SAIKAWA, Y.; KITAGAWA, Y. Gastric Cancer: Current Status of Diagnosis and Treatment. **Cancers**, v. 5, n. 1, p. 48–63, 2013.

TAN, V. P. Y.; WONG, B. C.Y. Gastric Cancer Chemoprevention: The Current Evidence. **Gastroenterol Clin N Am**, v. 42, p. 299–316, 2013.

TU, W. B.; HELANDER, S.; PILSTÅL, R.; HICKMAN, K. A.; LOURENCO, C. et al. Biochimica et Biophysica Acta Myc and its interactors take shape. **BBA - Gene Regul Mech**. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.06.002>, 2014.

TEH, J. L.; TAN, J. R.; LAU, L. J. F.; SAXENA, N.; SALIM A.; TAY, A. et al. Longer examination time improves detection of gastric cancer during diagnostic upper gastrointestinal endoscopy. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**. v.13, p. 480–487, 2015.

UPPAL, D. S.; POWELL, S. M. Genetics/Genomics/Proteomics of Gastric Adenocarcinoma. **Gastroenterol Clin N Am**, v. 42, p. 241–260, 2013.

VAN CUTSEM, E.; SAGAERT, X.; TOPAL, B.; HAUSTERMANS, K.; PRENEN, H. Gastric cancer. **Lancet**. v. 388, p. 2654–64, 2016.

VAN DER POST, R. S.; VOGELAAR, I. P.; CARNEIRO, F.; GUILFORD, P.; HUNTSMAN, D.; HOOGERBRUGGE, N.; CALDAS, C.; CHELCUN, K. E. et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. **Med Genet**, v. 52, n. 1, p. 361–374, 2015.

VINEIS, P.; SCHATZKIN, A.; POTTER, J. D. Models of carcinogenesis: an overview. **Carcinogenesis**, v.31, n.10, p.1703–1709, 2010.

VITA, M, HENRIKSSON, M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. **Seminars in Cancer Biology**. v. 16, p. 318–330, 2006.

WANG, X. M.; GAO, S. J.; GUO, X. F.; SUN, W. J.; YAN, Z. Q.; WANG, W. X. et al. CIAPIN1 gene silencing enhances chemosensitivity in a drug-resistant animal model in vivo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 47, n. 4, p. 273–278, 2014.

WANG, X.; PAN, J.; LI, J. Cytokine-induced apoptosis inhibitor 1 inhibits the growth and proliferation of multiple myeloma. **Molecular Medicine Reports**. v.12, n.1, p. 2056–2062, 2015.

WANG, J.; XU, H.; WANG, Q.; ZHANG, H.; LIN, Y.; ZHANG, H et al. CIAPIN1 targets Na^+/H^+ exchanger 1 to mediate MDA-MB-231 cells' metastasis through regulation of MMPs via ERK1/2 signaling pathway. **Experimental Cell Research**. v. 333, p. 60-72, 2015.

WANG, F.; ZHANG, D.; MAO, J.; KE, X.; ZHANG, R.; YIN, C. et al. Morusin inhibits cell proliferation and tumor growth by down-regulating c-Myc in human gastric cancer. **Oncotarget**. V. 8, n. 34, p. 57187–57200, 2017.

WANG, X.; LIU, Y.; LIU, D.; QIAN, Z.; DONG, Z.; SUN, Y. et al Recurrent amplification of *MYC* and *TNFRSF11B* in 8q24 is associated with poor survival in patients with gastric cancer. **Gastric Cancer**. v. 19, p. 116–127, 2016.

WADHWA, R.; SONG, S., LEE, J-S.; YAO, Y.; WEI, Q.; AJANI, J. A. Gastric Cancer: Molecular and Clinical Dimensions. **Nat Rev Clin Oncol**. v. 10, n. 11, p. 643–655, 2013.

WILHELM, B. T.; LANDRY, J. RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. **Methods**. v. 48, p. 249–257, 2009.

WOLF, E.; LIN, C. Y.; EILERS, M.; LEVENS, D. L. Taming of the beast: Shaping Myc-dependent amplification. **Trends in Cell Biology**. 2015; 25(4): 241–248.

WU, H.; LIN, W.; TSAI, K. Advances in molecular biomarkers for gastric cancer: miRNAs as emerging novel cancer markers. **Expert reviews in molecular medicine**. v. 16, n. 1, p. 1-18, 2014.

XIA, H.; CHEN, Q.; CHEN, Y.; GE, X.; LENG.; TANG, Q. et al. The lncRNA MALAT1 is a novel biomarker for gastric cancer metastasis. **Oncotarget**. v. 35, p. 56209-56218, 2016.

XU, M.; WANG, Y.; WENG, W.; WEI, P.; QI, P.; ZHANG, Q. et al. A positive feedback loop of lncRNA-PVT1 and FOXM1 facilitates gastric cancer growth and invasion. **Clinical Cancer Research**. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0742, 2017.

YAN, W.; HERMAN, J. G.; GUO, M. Epigenome-based personalized medicine in human cancer. **Epigenomics**, v. 8, n.1, p. 119–133, 2016.

YAN K, HE L, CHENG W, JI Z, ZHAO B, HUI X, CAO S, et al. Inhibiting gastric cancer-associated angiogenesis by CIAPIN1 siRNA. **Cancer Biology & Therapy**. V. 8, n. 11, p. 1058-1063, 2009.

YOSHIDA GJ. Emerging roles of Myc in stem cell biology and novel tumor therapies. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. v. 37, p. 173-93, 2018.

YOSHIDA S, YAMASHITA S, NIWA T, MORI A, ITO S, ICHINOSE M, USHIJIMA T. Epigenetic inactivation of FAT4 contributes to gastric field cancerization. **Gastric Cancer**; v. 20, p. 136–145, 2017.

ZIOGAS, D. E; KYROCHRISTOS, I. D.; ROUKOS, D. H. Next-generation sequencing: from conventional applications to breakthrough genomic analyses and precision oncology. **Expert Review of Medical Devices**, v. 15, n. 1, p. 1-3, 2018.

ZHAO H, WANG Q, ZHANG H, LIU Q, DU X, RICHTER M, GREENE MI. UXT is a novel centrosomal protein essential for cell viability. **Molecular Biology of the Cell**. v.16, p. 5857–5865, 2005.

ZHAO, J.; ZHAO, J.; DU, F.; ZHANG, Y.; SHEN, G.; ZHU, H. et al. Cardia and Non-Cardia gastric cancer have similar stage-for-stage prognoses after r0 resection: a large-scale, multicenter study in china. **J Gastrointest Surg**. v. 20, p. 700–707, 2016.

ZHANG E, HE X, YIN D, HAN L, QIU M, XU T, et al. Increased expression of long noncoding RNA TUG1 predicts a poor prognosis of gastric cancer and regulates cell proliferation by epigenetically silencing of p57. **Cell Death and Disease**. doi:10.1038/cddis.2015.356, 2016.

ZHANG Y, FANG J, MA H. Inhibition of miR-182-5p protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis by 1 targeting CIAPIN1. **Biochem Cell Biol**. V. 96, n. 5, p. 646-654, 2018.

ZHENG, K.; CUBERO, F. J.; NEVZOROVA, Y. A. c-MYC-Making Liver Sick: Role of c-MYC in Hepatic Cell Function, Homeostasis and Disease. **Genes** (Basel). v. 19, n. 8(4), 2017.

ZHENG, X.; FAN, L.; ZHOU, P.; MA, H.; HUANG, S.; YU, D.; ZHAO, L.; YANG, S.; LIU, J.; HUANG, A.; CAI, C.; DAI, X.; ZHANG, C. Detection of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in gastric cancer. **Translational Oncology**. v. 10, n. 3, p. 431–441, 2017.

ZHOU, X.; YIN, C.; DANG, Y.; YE, F.; ZHANG, G. Identification of the long noncoding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer. **Nature: Scientific Reports**. v. 5, n. 11516, p 1-10, 2015.

ZHOU C, JI J, CAI Q, SHI M, CHEN X, YU Y, et al. MTA2 enhances colony formation and tumor growth of gastric cancer cells through IL-11. **BMC Cancer**. v.15, p. 343-353, 2015.

ZHOU, Y.; ABEL, G. A.; HAMILTON, W.; PRITCHARDJONES, K.; GROSS, C. P.; WALTER, F. M.; RENZI, C.; JOHNSON, S.; MCPHAIL, S.; ELLISSBROOKES, L.; LYRATZOPOULOS, G. Diagnosis of cancer as an emergency: a critical review of current evidence. **Nature Reviews Clinical Oncology**. v. 14, n. 1, p. 45-56, 2016.

APÊNDICE A

Tabela suplementar 1 – Os 150 GEDs *downregulated* para o conjunto de dados de amostras silenciadas (1S) *versus* não-silenciadas (1C) da linhagem AGP01

Símbolo	Gene ID	Log ₂ F _C	P	FDR	Descrição
<i>EIF3K</i>	27335	-12,166	2,46E-13	1,14E-11	<i>eukaryotic translation initiation factor 3. subunit K</i>
<i>RPL36AL</i>	6166	-11,954	8,40E-08	1,12E-06	<i>ribosomal protein L36a-like</i>
<i>KARS</i>	3735	-11,896	3,43E-25	9,90E-23	<i>lysyl-tRNA synthetase</i>
<i>SEC61B</i>	10952	-11,525	1,08E-05	8,35E-05	<i>Sec61 beta subunit</i>
<i>SNRPG</i>	6637	-11,413	1,08E-05	8,47E-05	<i>small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G</i>
<i>TADA3</i>	10474	-11,382	8,07E-23	1,74E-20	<i>transcriptional adaptor 3</i>
<i>BAX</i>	581	-11,314	4,58E-08	6,58E-07	<i>BCL2-associated X protein</i>
<i>NOP10</i>	55505	-11,270	0,000121	0,000692	<i>NOP10 ribonucleoprotein</i>
<i>IDH3B</i>	3420	-11,185	5,79E-11	1,65E-09	<i>isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta</i>
<i>PSMA6</i>	5687	-11,176	2,50E-08	3,78E-07	<i>proteasome (prosome. macropain) subunit. alpha type. 6</i>
<i>CTDNEP1</i>	23399	-11,162	8,29E-13	3,49E-11	<i>CTD nuclear envelope phosphatase 1</i>
<i>CAPZA1</i>	829	-11,137	6,38E-20	9,47E-18	<i>capping protein (actin filament) muscle Z-line. alpha 1</i>
<i>DCTPP1</i>	79077	-11,104	2,50E-08	3,79E-07	<i>dCTP pyrophosphatase 1</i>
<i>EIF3M</i>	10480	-11,053	2,20E-09	4,34E-08	<i>eukaryotic translation initiation factor 3. subunit M</i>
<i>NOP58</i>	51602	-11,032	2,46E-13	1,14E-11	<i>NOP58 ribonucleoprotein</i>
<i>TWF2</i>	11344	-11,021	3,16E-	9,38E-	<i>twinfilin actin-binding protein 2</i>

			11	10	
<i>SNRPA1</i>	6627	-11,019	2,83E-07	3,40E-06	<i>small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'</i>
<i>LOC101060301</i>	1.01E+08	-11,010	1,74E-06	1,70E-05	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 4</i>
<i>PSMA5</i>	5686	-10,995	6,30E-25	1,75E-22	<i>proteasome (prosome. macropain) subunit. alpha type. 5</i>
<i>NHP2</i>	55651	-10,992	5,87E-06	4,84E-05	<i>NHP2 ribonucleoprotein</i>
<i>FAM60A</i>	58516	-10,967	2,15E-19	2,93E-17	<i>family with sequence similarity 60. member A</i>
<i>LUC7L3</i>	51747	-10,952	1,92E-15	1,35E-13	<i>LUC7-like 3 (S. cerevisiae)</i>
<i>UXT</i>	8409	-10,945	0,000121	0,000706	<i>ubiquitously-expressed. prefoldin-like chaperone</i>
<i>GPS1</i>	2873	-10,925	1,52E-12	5,91E-11	<i>G protein pathway suppressor 1</i>
<i>NDUFA2</i>	4695	-10,916	6,64E-05	0,000406	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex. 2. 8kDa</i>
<i>JUND</i>	3727	-10,898	2,79E-12	1,03E-10	<i>jun D proto-oncogene</i>
<i>BZW2</i>	28969	-10,872	3,16E-11	9,37E-10	<i>basic leucine zipper and W2 domains 2</i>
<i>PSMB6</i>	5694	-10,840	1,97E-05	0,000143	<i>proteasome (prosome. macropain) subunit. beta type. 6</i>
<i>POMGNT1</i>	55624	-10,826	1,92E-15	1,35E-13	<i>protein O-linked mannose N-acetylglucosaminyltransferase 1 (beta 1.2-)</i>
<i>HTATSF1</i>	27336	-10,818	3,11E-16	2,56E-14	<i>HIV-1 Tat specific factor 1</i>
<i>IDH3G</i>	3421	-10,788	4,04E-09	7,47E-08	<i>isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) gamma</i>
<i>POP5</i>	51367	-10,738	0,000121	0,000693	<i>processing of precursor 5. ribonuclease P/MRP subunit (S. cerevisiae)</i>
<i>EI24</i>	9538	-10,726	1,52E-12	5,87E-11	<i>etoposide induced 2.4</i>
<i>IARS2</i>	55699	-10,723	2,15E-19	2,90E-17	<i>isoleucyl-tRNA synthetase 2. mitochondrial</i>
<i>CLPX</i>	10845	-10,717	8,29E-13	3,46E-11	<i>caseinolytic mitochondrial matrix peptidase chaperone subunit</i>
<i>TIMM17A</i>	10440	-10,668	4,04E-	7,49E-	<i>translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast)</i>

			09	08	
<i>DGKZ</i>	8525	-10,662	7,22E-19	8,90E-17	<i>diacylglycerol kinase. zeta</i>
<i>SDHB</i>	6390	-10,660	1,74E-06	1,67E-05	<i>succinate dehydrogenase complex. subunit B. iron sulfur (Ip)</i>
<i>CTNBL1</i>	56259	-10,642	1,95E-10	4,94E-09	<i>catenin. beta like 1</i>
<i>SLC39A7</i>	7922	-10,638	5,11E-12	1,78E-10	<i>solute carrier family 39 (zinc transporter). member 7</i>
<i>DGKA</i>	1606	-10,632	7,32E-14	3,72E-12	<i>diacylglycerol kinase. alpha 80kDa</i>
<i>DTD2</i>	112487	-10,589	1,34E-13	6,45E-12	<i>D-tyrosyl-tRNA deacylase 2 (putative)</i>
<i>TAF9</i>	6880	-10,584	9,51E-07	9,98E-06	<i>TAF9 RNA polymerase II. TATA box binding protein (TBP)-associated factor. 32kDa</i>
<i>SMYD5</i>	10322	-10,584	8,29E-13	3,43E-11	<i>SMYD family member 5</i>
<i>GMPR2</i>	51292	-10,583	1,36E-08	2,22E-07	<i>guanosine monophosphate reductase 2</i>
<i>ANAPC7</i>	51434	-10,575	1,19E-14	7,34E-13	<i>anaphase promoting complex subunit 7</i>
<i>EMC2</i>	9694	-10,563	1,74E-06	1,69E-05	<i>ER membrane protein complex subunit 2</i>
<i>RBM42</i>	79171	-10,523	4,58E-08	6,49E-07	<i>RNA binding motif protein 42</i>
<i>MAP2K3</i>	5606	-10,511	3,57E-10	8,47E-09	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 3</i>
<i>ZCRB1</i>	85437	-10,496	7,42E-09	1,28E-07	<i>zinc finger CCHC-type and RNA binding motif 1</i>
<i>VPS4A</i>	27183	-10,489	1,95E-10	4,96E-09	<i>vacuolar protein sorting 4 homolog A (S. cerevisiae)</i>
<i>MTA2</i>	9219	-10,482	2,18E-14	1,25E-12	<i>metastasis associated 1 family. member 2</i>
<i>HPRT1</i>	3251	-10,449	9,51E-07	9,87E-06	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
<i>SMARCB1</i>	6598	-10,442	4,58E-08	6,57E-07	<i>SWI/SNF related. matrix associated. actin dependent regulator of chromatin. subfamily b. member 1</i>
<i>ATP5D</i>	513	-10,441	6,64E-05	0,000408	<i>ATP synthase. H+ transporting. mitochondrial F1 complex. delta subunit</i>
<i>UBXN6</i>	80700	-10,423	2,50E-	3,80E-	<i>UBX domain protein 6</i>

			08	07	
<i>KAT8</i>	84148	-10,407	2,83E-07	3,42E-06	<i>K(lysine) acetyltransferase 8</i>
<i>NDUFAF3</i>	25915	-10,399	0,000121	0,000695	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I. assembly factor 3</i>
<i>TRPC4AP</i>	26133	-10,397	7,32E-14	3,70E-12	<i>transient receptor potential cation channel. subfamily C. member 4 associated protein</i>
<i>OLA1</i>	29789	-10,396	7,22E-19	8,98E-17	<i>Obg-like ATPase 1</i>
<i>CCNB2</i>	9133	-10,391	5,18E-07	5,85E-06	<i>cyclin B2</i>
<i>SCP2</i>	6342	-10,387	8,40E-08	1,12E-06	<i>sterol carrier protein 2</i>
<i>MCMBP</i>	79892	-10,384	1,33E-18	1,56E-16	<i>minichromosome maintenance complex binding protein</i>
<i>PTDSS2</i>	81490	-10,375	1,06E-10	2,90E-09	<i>phosphatidylserine synthase 2</i>
<i>GPR15</i>	2838	-10,375	1,08E-05	8,38E-05	<i>G protein-coupled receptor 15</i>
<i>CAV2</i>	858	-10,370	2,46E-13	1,13E-11	<i>caveolin 2</i>
<i>NAA20</i>	51126	-10,341	6,64E-05	0,000412	<i>N(alpha)-acetyltransferase 20. NatB catalytic subunit</i>
<i>ACBD3</i>	64746	-10,336	6,47E-15	4,12E-13	<i>acyl-CoA binding domain containing 3</i>
<i>UCHL5</i>	51377	-10,335	8,40E-08	1,13E-06	<i>ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5</i>
<i>SAMD4B</i>	55095	-10,316	3,11E-16	2,57E-14	<i>sterile alpha motif domain containing 4B</i>
<i>GMPS</i>	8833	-10,314	1,95E-10	4,90E-09	<i>guanine monphosphate synthase</i>
<i>NR1H2</i>	7376	-10,302	7,42E-09	1,29E-07	<i>nuclear receptor subfamily 1. group H. member 2</i>
<i>ZC3H14</i>	79882	-10,298	1,70E-16	1,49E-14	<i>zinc finger CCCH-type containing 14</i>
<i>SETP18</i>	646817	-10,295	0,000121	0,0007	<i>SET-like protein</i>
<i>HNRNPA3P1</i>	10151	-10,295	2,79E-12	1,02E-10	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 pseudogene 1</i>
<i>MTHFD1L</i>	25902	-10,295	1,72E-	5,34E-	<i>methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like</i>

			11	10	
<i>EDC4</i>	23644	-10,286	2,15E-19	2,88E-17	<i>enhancer of mRNA decapping 4</i>
<i>COG8</i>	84342	-10,284	1,95E-10	4,89E-09	<i>component of oligomeric golgi complex 8</i>
<i>MRPS2</i>	51116	-10,283	1,74E-06	1,67E-05	<i>mitochondrial ribosomal protein S2</i>
<i>ACTL6A</i>	86	-10,269	4,58E-08	6,48E-07	<i>actin-like 6A</i>
<i>THOC6</i>	79228	-10,255	5,87E-06	4,92E-05	<i>THO complex 6 homolog (Drosophila)</i>
<i>MRPL13</i>	28998	-10,254	6,64E-05	0,000406	<i>mitochondrial ribosomal protein L13</i>
<i>CEBPZ</i>	10153	-10,251	2,46E-13	1,14E-11	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). zeta</i>
<i>TIPARP</i>	25976	-10,231	1,19E-14	7,25E-13	<i>TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase</i>
<i>RAP1B</i>	5908	-10,229	2,50E-08	3,78E-07	<i>RAP1B. member of RAS oncogene family</i>
<i>CSNK2B</i>	1460	-10,228	6,64E-05	0,000409	<i>casein kinase 2. beta polypeptide</i>
<i>NTS</i>	4922	-10,224	3,62E-05	0,000236	<i>neurotensin</i>
<i>SCAP</i>	22937	-10,220	1,70E-16	1,48E-14	<i>SREBF chaperone</i>
<i>PJA2</i>	9867	-10,207	1,33E-18	1,57E-16	<i>praja ring finger 2. E3 ubiquitin protein ligase</i>
<i>ZNF259</i>	8882	-10,204	2,83E-07	3,39E-06	<i>ZPR1 zinc finger</i>
<i>MED15</i>	51586	-10,202	8,29E-13	3,44E-11	<i>mediator complex subunit 15</i>
<i>EXOC6B</i>	23233	-10,201	3,57E-10	8,45E-09	<i>exocyst complex component 6B</i>
<i>SPR</i>	6697	-10,197	5,87E-06	4,86E-05	<i>sepiapterin reductase (7,8-dihydrobiopterin:NADP+ oxidoreductase)</i>
<i>PPIL1</i>	51645	-10,197	5,18E-07	5,81E-06	<i>peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 1</i>
<i>CHTOP</i>	26097	-10,191	1,36E-08	2,22E-07	<i>chromatin target of PRMT1</i>
<i>TMEM43</i>	79188	-10,189	8,29E-	3,51E-	<i>transmembrane protein 43</i>

			13	11	
<i>POCIA</i>	25886	-10,180	2,50E-08	3,84E-07	<i>POC1 centriolar protein A</i>
<i>ABHD17A</i>	81926	-10,176	3,20E-06	2,83E-05	<i>abhydrolase domain containing 17A</i>
<i>RNPEPL1</i>	57140	-10,170	1,72E-11	5,36E-10	<i>arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)-like 1</i>
<i>CDK5RAP3</i>	80279	-10,168	8,40E-08	1,13E-06	<i>CDK5 regulatory subunit associated protein 3</i>
<i>ATP5F1</i>	515	-10,167	4,58E-08	6,54E-07	<i>ATP synthase. H+ transporting. mitochondrial Fo complex. subunit B1</i>
<i>PGM2</i>	55276	-10,167	2,79E-12	1,03E-10	<i>phosphoglucomutase 2</i>
<i>CNIH4</i>	29097	-10,165	3,62E-05	0,000242	<i>cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 4</i>
<i>ARL8B</i>	55207	-10,164	3,16E-11	9,42E-10	<i>ADP-ribosylation factor-like 8B</i>
<i>CEBPD</i>	1052	-10,157	3,62E-05	0,000241	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). delta</i>
<i>BCAS2</i>	10286	-10,156	3,62E-05	0,000237	<i>breast carcinoma amplified sequence 2</i>
<i>AIMP1</i>	9255	-10,150	1,20E-09	2,50E-08	<i>aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1</i>
<i>HAT1</i>	8520	-10,149	1,74E-06	1,68E-05	<i>histone acetyltransferase 1</i>
<i>ZFPL1</i>	7542	-10,148	1,97E-05	0,000143	<i>zinc finger protein-like 1</i>
<i>TOM1</i>	10043	-10,146	4,04E-09	7,51E-08	<i>target of myb1 (chicken)</i>
<i>PDZD11</i>	51248	-10,144	6,64E-05	0,000412	<i>PDZ domain containing 11</i>
<i>SSB</i>	6741	-10,144	1,74E-06	1,68E-05	<i>Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)</i>
<i>MRPL4</i>	51073	-10,138	3,20E-06	2,85E-05	<i>mitochondrial ribosomal protein L4</i>
<i>CIAPIN1</i>	57019	-10,133	8,40E-08	1,13E-06	<i>cytokine induced apoptosis inhibitor 1</i>
<i>COPZ1</i>	22818	-10,132	2,83E-07	3,38E-06	<i>coatomer protein complex. subunit zeta 1</i>
<i>DHCR7</i>	1717	-10,116	1,20E-	2,48E-	<i>7-dehydrocholesterol reductase</i>

			09	08	
<i>PRPS2</i>	5634	-10,108	2,20E-09	4,33E-08	<i>phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2</i>
<i>PRKAR2A</i>	5576	-10,105	7,42E-09	1,29E-07	<i>protein kinase. cAMP-dependent. regulatory. type II. alpha</i>
<i>WDR75</i>	84128	-10,105	6,55E-10	1,45E-08	<i>WD repeat domain 75</i>
<i>RABGGTB</i>	5876	-10,103	3,20E-06	2,85E-05	<i>Rab geranylgeranyltransferase. beta subunit</i>
<i>CDC23</i>	8697	-10,092	1,72E-11	5,37E-10	<i>cell division cycle 23</i>
<i>GOLPH3</i>	64083	-10,092	1,20E-09	2,47E-08	<i>golgi phosphoprotein 3 (coat-protein)</i>
<i>PRMT7</i>	54496	-10,086	7,42E-09	1,29E-07	<i>protein arginine methyltransferase 7</i>
<i>KLHDC4</i>	54758	-10,072	9,51E-07	9,96E-06	<i>kelch domain containing 4</i>
<i>HMGCR</i>	3156	-10,069	5,71E-16	4,43E-14	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase</i>
<i>PAPD7</i>	11044	-10,062	1,34E-13	6,41E-12	<i>PAP associated domain containing 7</i>
<i>BRAF</i>	673	-10,048	3,57E-10	8,44E-09	<i>B-Raf proto-oncogene. serine/threonine kinase</i>
<i>PIN4</i>	5303	-10,046	6,64E-05	0,000412	<i>peptidylprolyl cis/trans isomerase. NIMA-interacting 4</i>
<i>LPCAT3</i>	10162	-10,046	4,58E-08	6,50E-07	<i>lysophosphatidylcholine acyltransferase 3</i>
<i>CDC42EP1</i>	11135	-10,034	8,40E-08	1,12E-06	<i>CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1</i>
<i>SDF2</i>	6388	-10,031	6,64E-05	0,000409	<i>stromal cell-derived factor 2</i>
<i>SLC30A9</i>	10463	-10,029	3,16E-11	9,35E-10	<i>solute carrier family 30 (zinc transporter). member 9</i>
<i>RHOG</i>	391	-10,027	6,64E-05	0,000411	<i>ras homolog family member G</i>
<i>DDX19B</i>	11269	-10,024	3,20E-06	2,88E-05	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 19B</i>
<i>MID1</i>	4281	-10,023	3,99E-14	2,16E-12	<i>midline 1</i>
<i>IER3</i>	8870	-10,021	0,00012	0,00070	<i>immediate early response 3</i>

<i>RRP1</i>	8568	-9,998	3,20E-06	2,82E-05	<i>ribosomal RNA processing 1</i>
<i>ODF2</i>	4957	-9,984	2,20E-09	4,36E-08	<i>outer dense fiber of sperm tails 2</i>
<i>COQ9</i>	57017	-9,983	5,87E-06	4,86E-05	<i>coenzyme Q9</i>
<i>LIG3</i>	3980	-9,982	2,79E-12	1,03E-10	<i>ligase III. DNA. ATP-dependent</i>
<i>ACAA1</i>	30	-9,980	3,20E-06	2,86E-05	<i>acetyl-CoA acyltransferase 1</i>
<i>RRP9</i>	9136	-9,968	1,97E-05	0,000143	<i>ribosomal RNA processing 9. small subunit (SSU) processome component. homolog (yeast)</i>
<i>CISD1</i>	55847	-9,968	2,83E-07	3,41E-06	<i>CDGSH iron sulfur domain 1</i>
<i>MRPL2</i>	51069	-9,967	0,000121	0,000694	<i>mitochondrial ribosomal protein L2</i>
<i>AGK</i>	55750	-9,964	1,20E-09	2,49E-08	<i>acylglycerol kinase</i>
<i>RGL2</i>	5863	-9,962	1,95E-10	4,98E-09	<i>ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 2</i>
<i>PORCN</i>	64840	-9,953	1,74E-06	1,68E-05	<i>porcupine homolog (Drosophila)</i>
<i>MSH2</i>	4436	-9,951	1,95E-10	4,90E-09	<i>mutS homolog 2</i>
<i>TEX30</i>	93081	-9,945	0,000121	0,000695	<i>testis expressed 30</i>

Gene ID, número de identificação do gene $|\log_2(\text{FC})| \geq 1$ FDR ≤ 0.001 ; $P < 0,05$



Giovanny Pinto <pintogr@gmail.com>

047673 Receipt of New Paper by oncotarget

1 mensagem

editorialoffice@oncotarget.com <editorialoffice@oncotarget.com>

13 de maio de 2019 22:19

Responder a: editorialoffice@oncotarget.com

Para: pintogr@gmail.com

Cc: pintogr@gmail.com, luanalopes.ufpi@gmail.com, hygorfernandes@ufpi.edu.br, fknyoshioka@gmail.com, sevzoo@yahoo.com.br, alcemir@prp.uespi.br, jerseymaues@gmail.com, hferreiraribeiro@gmail.com, jreyh@salud.madrid.org, psoares19@hotmail.com, rommel@ufpa.br

Dear Giovanny Pinto,

On May 13, 2019, Oncotarget Journal received your manuscript entitled "New prognostic markers revealed by RNA-Seq transcriptome analysis after MYC silencing in a metastatic gastric cancer cell line" by Luana Lopes, Hygor Ferreira-Fernandes, France Yoshioka, Severino Sousa Júnior, Alcemir Santos, Jersey Maues, Helem Ribeiro, Juan Rey, Paulo Soares, Rommel Burbano, and Giovanny Pinto.

Your manuscript has been assigned the Paper #: 047673.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<https://oncotarget.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A2JC3UcS1A5BDyZ2F2A9ftdt4pxePfHewxNSKD5Lv5BVQZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Please e-mail us if your paper was peer-reviewed in another journals and you submitted previous peer-reviews with rebuttal.

If your submission is accepted, please note that the the publisher will contact you thereafter with the required author agreement form and bill form. For more information about publication fees, please visit the For Authors page on our website, www.oncotarget.com, and/or the Author Information page on <https://oncotarget.msubmit.net/cgi-bin/main.plex>

Sincerely,
Staff
Oncotarget Journal

This email message may contain legally privileged and/or confidential information. If you are not the intended recipient(s), you are hereby notified that any disclosure, copying, distribution, or use of this email message is prohibited. If you have received this message in error, please notify the sender immediately by e-mail and delete this email message from your computer. Thank you.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA - PROPESQ
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC, órgão da Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, DECLARA para as finalidades de direito, a requerimento de LUANA DE OLIVEIRA LOPES – Doutoranda (nome e qualificação do(a) Requerente), que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE, com data de entrada neste órgão em 30/10/2017, cujo título denomina-se **MÉTODO DE PROGNÓSTICO DE CÂNCER GÁSTRICO**, do qual a solicitante participa como inventor(a), e que está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

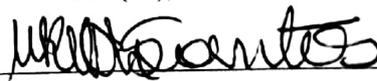
Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (IN 031/13 e LPI 9.279/96 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 31/10/2017.



Prof.ª Dr.ª Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI