

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO
DE MICRORNA DOS CARCINOMAS
GÁSTRICOS DE PACIENTES SUBMETIDOS À
QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE**

MICHELLE MACCARINI BARCELOS BALDONI

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientador: Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza
Begnami**

**Co-Orientadora: Dra Cláudia Malheiros Coutinho
Camillo**

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Baldoni, Michelle Maccarini Barcelos

Determinação do perfil de expressão de miRNA dos carcinomas gástricos de pacientes submetidos à quimioterapia neoadjuvante /

Michelle Maccarini Barcelos Baldoni - São Paulo, 2016.

100p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Descritores: 1. NEOPLASIAS GÁSTRICAS/genética. 2. MicroRNAs.
3. TERAPIA NEOADJUVANTE. 4. QUIMIOTERAPIA. 5. PERFILAÇÃO
DA EXPRESSÃO GÊNICA.

O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Aos meus dois grandes amores: meu marido Alessandro que é o meu maior orgulho e incentivador, e meu filho Gustavo que ainda cresce e se desenvolve dentro de mim, mas já é capaz de despertar os sentimentos mais lindos em nossa família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é o meu guia e que me dá de coragem para enfrentar qualquer adversidade.

À minha orientadora Dra Dirlei, pela oportunidade de realização do doutorado, pela idealização do projeto e por todo ensinamento ao longo desses anos.

À minha co-orientadora Dra Cláudia, por toda a imensurável ajuda na execução desse trabalho.

À funcionária Katia Klug, por ter sido sempre tão prestativa e solícita quando eu precisei de ajuda.

Ao Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE) pelas instalações que ofereceram condições para a realização deste doutorado.

Aos funcionários da secretaria do programa de pós-graduação da Fundação Antônio Prudente que foram sempre muito atenciosos tirando minhas dúvidas e me auxiliando no que fosse necessário.

Aos funcionários da biblioteca, principalmente à Suely Francisco, pela grandiosa ajuda na formatação deste trabalho.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (processos 2012/12542-0 e 2012/12551-9).

Ao meu marido Alessandro, por ser essa pessoa companheira que eu tanto amo. Sou eternamente grata por ter você ao meu lado para construir meus sonhos, viver tantos momentos felizes e também por ser a melhor pessoa para aliviar minhas angústias. E principalmente por ter me dado o maior presente que uma mulher pode ter na vida que é o nosso filho Gustavo.

À minha filha de quatro patas e pelos, minha cachorrinha Nutella, que enche meus dias de alegria e que já me dá noção do que é amor incondicional.

Aos meus pais Lourival (in memoriam) e Alzira que apesar das dificuldades encontradas me deram todo o suporte para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus irmãos e à todas minhas queridas tias (os) e primas (os) da família Maccarini por serem sempre tão carinhosas (os) e presentes na minha vida.

À família linda que eu ganhei quando casei, principalmente à minha sogra Leila, por todo o carinho e suporte emocional proporcionado para que eu conseguisse finalizar esse trabalho.

À todos os amigos maravilhosos que eu fiz ao longo dessa caminhada no CIPE. Muito obrigada por terem sido tão acolhedores, por me ajudarem tanto cientificamente como emocionalmente e por tornar tão prazeroso o meu ambiente de trabalho.

Às minhas amigas Juliana e Renata, minhas amorecas, pela amizade que construímos e que levarei pra sempre comigo.

À minhas amigas de adolescência e faculdade que mantenho contato fraterno constante até hoje e sei que torcem muito por mim.

RESUMO

Barcelos-Baldoni MM. **Determinação do perfil de expressão de miRNA dos carcinomas gástricos de pacientes submetidos à quimioterapia neoadjuvante.** São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado Fundação Antônio Prudente].

INTRODUÇÃO: O tratamento do carcinoma gástrico (CG) é complexo e requer recursos intensivos. Atualmente, a cirurgia é a única opção curativa disponível para o tratamento de pacientes com CG. Na última década observou-se um grande avanço no tratamento multimodal destes pacientes devido ao reconhecimento e aceitação dos efeitos benéficos da quimioterapia (QT) e/ou radioterapia neoadjuvantes. Contudo, os resultados ainda são conflitantes, uma vez que os efeitos destes tratamentos em pacientes distintos ainda não estão totalmente estabelecidos. A seleção dos pacientes com GC quimiossensíveis, para a indicação das terapias neoadjuvantes, é essencial pois evita o surgimento dos efeitos colaterais e das complicações relacionadas, os quais ainda contribuem para o atraso da realização do tratamento cirúrgico. Análises abrangentes de expressão gênica, como por exemplo as análises de expressão de microRNAs (miRNAs), tem identificado perfis de expressão gênica relevantes, associados à características como estágio e grau histológico do tumor, susceptibilidade dos pacientes à quimioterapia, agressividade tumoral clínica ou prognóstica. Podemos encontrar na literatura científica mundial, vários estudos mostrando associações entre os perfis de expressão de miRNA e os CGs. Porém, não encontramos estudos que demonstraram perfis de expressão de miRNAs em CGs associados ao grau de resposta histopatológica, de pacientes submetidos aos tratamentos neoadjuvantes.

OBJETIVOS: Determinar o perfil de expressão diferencial de miRNAs entre os CGs e às mucosas gástricas normais, relacionar os perfis de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos com as características clínicas e

histopatológicas dos CGs dos pacientes submetidos à tratamento neoadjuvante. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Foram estudadas 75 amostras de CGs, distribuídas em 3 grupos: Grupo 1 constituído por pacientes submetidos exclusivamente ao tratamento cirúrgico (23 amostras); Grupo 2 com pacientes com CGs tratados com QT neoadjuvante seguido de cirurgia (52 amostras) e Grupo 3 constituído pelo *pool* de amostras de mucosa gástrica normal (18 amostras). As etapas de triagem e determinação das expressões dos 377 miRNAs, foram realizadas por qRT-PCR através das placas TLDA (Taqman[®] Low Density Array). Os dados dos miRNAs diferencialmente expressos foram validados por qRT-PCR utilizando-se de oligonucleotídeos sequência-específicos e suas respectivas sondas. **RESULTADOS:** 109 miRNAs foram diferencialmente expressos nas comparações entre os perfis de expressão dos CG e das mucosas gástricas normais. As análises das expressões diferenciais dos miRNAs nos CGs do Grupo 1 identificaram 14 miRNAs diferencialmente expressos em relação ao óbito ocorrido nos pacientes com CGs com até 60 meses de seguimento. No Grupo 2, as análises dos perfis de expressões diferenciais dos miRNAs encontraram 9 miRNAs associados aos CGs com resposta patológica completa (0% de célula tumoral viável) em comparação aqueles sem resposta patológica (100% de células tumorais viáveis). As reações para a validação dos miRNAs diferencialmente expressos, confirmaram a hipoeexpressão do miR-16 nos CGs sem resposta patológica (100% de células tumorais viáveis) com $p = 0,04$ e $\text{fold} = -2,21$. Nos CGs com resposta patológica insatisfatória ou ausente (90% a 100% de células tumorais viáveis.) os miR 22 ($p = 0,001$, $\text{fold} = -3,41$), o miR 130a ($p = 0,035$, $\text{fold} = -1,98$) e também o miR-16 foram validados como hipoeexpressos. **CONCLUSÃO:** Este estudo demonstrou a associação da expressão de alguns miRNAs em CGs resistentes ou não responsivos ao tratamento neoadjuvante utilizado. Estes dados corroboram para o uso dos miRNAs como alvos terapêuticos para uma melhor resposta ao tratamento dos pacientes com CG.

SUMMARY

Barcelos-Baldoni MM. **[Identification of microRNA profile in gastric carcinoma patients treated with neoadjuvant chemotherapy]**. São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUCTION: The curative treatment of gastric carcinoma (GC) requires gastric resection. However, most patients are not cured by surgery treatment alone. Results of randomized controlled studies conducted to verify the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy (NC) for gastric carcinoma have suggested that this treatment is therapeutically useful for the patients instead of surgery alone. However, in some patients with apparently the same molecular and histological tumor characteristics, the objective clinical response with NC is not achieved, and this lack of response may delay curative surgery and the toxicity induced by chemotherapy may increase surgical complications. Therefore, the main challenge for improving clinical outcomes is to understand the molecular mechanisms that may play essential roles in patients' responses of GC treatments. So, predictive novel molecules identification may be crucial for correct patients' selection. Emerging evidence suggested that some microRNAs (miRNAs) can have prognostic and diagnostic value in many types of cancer. Expression levels of several miRNAs have been found to be correlated with GC prognosis and could determine the clinical response for neoadjuvant chemotherapy.

OBJECTIVES: To identify gastric carcinoma miRNA profile compared with normal gastric tissue and to analyze the relation between differential expressed miRNA with clinical features and pathological response of GC treated with neoadjuvant chemotherapy. **SAMPLES AND METHODS:** A total of 75 samples were selected from a retrospective database of A.C.Camargo Cancer Center. From these samples, 23 were GC samples of patients treated by only surgery (Group 1) and 52 GC samples of patients treated with NC (Group 2). Beside that we selected some normal gastric tissue to make a

control pool (Group 3). For trial analyses we used TLDA (Taqman[®] Low Density Array) qRT-PCR to determine the expression of 377 miRNAs. After that, validation of differentially expressed miRNAs was done by qRT-PCR using individual assays. **RESULTS:** 109 miRNAs were differentially expressed in the comparative analyses between miRNA profile of GC patients and normal gastric mucosa. The comparison between clinicopathological features and miRNA profile of Group 1 samples showed 14 differentially expressed miRNAs in GC patients death by cancer in relation to patients alive without cancer after 60 months of follow up. Furthermore, in GC samples of Group 2 were identified 9 differentially expressed miRNAs in patients with complete pathological response (0% of viable tumor cells) in relation to GCs without pathologic response (100% of viable tumor cells) for neoadjuvant chemotherapy. In the validation step of differentially expressed miRNAs, it was confirmed miR-16 downregulation in 100% of viable tumor cells samples ($p = 0,04$, fold = -2,21). Beside miR 16 ($p < 0,01$, fold = -3,11), miR 22 ($p = 0,001$, fold = -3,41) and miR 130a ($p = 0,035$, fold = -1,98) were confirmed downregulated in 90% to 100% of viable tumor cells samples. **CONCLUSION:** Our findings identified miRNAs deregulated in GC patients without tumor response when comparing with complete tumor response patients. These miRNAs are correlated to apoptosis pathways, tumor growth and drugs metabolism. These results can be useful to identify targets miRNAs and improve response tumor to neoadjuvant chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A biogênese do miRNA.....	19
Figura 2	Marcação da área tumoral de interesse na lâmina de H&E do CG.....	27
Figura 3	Dissecção manual da área tumoral selecionada dos CGs..	28
Figura 4	Seleção das amostras dos Carcinomas gástricos.....	29
Figura 5	Etapas envolvidas na extração de RNA.....	35
Figura 6	Mensuração da concentração e pureza do RNA extraído através do Nanodrop ND3.0.....	36
Figura 7	Síntese de cDNA com oligonucleotídeos <i>Stem looped</i>	37
Figura 8	Reação de pré-amplificação.....	39
Figura 9	Atividade da enzima DNA polimerase.....	42
Figura 10	<i>Heatmap</i> das expressões diferenciadas dos miRNAs dos CGs do Grupo 1 (tratamento cirúrgico) em comparação as expressões dos miRNAs das mucosas gástricas normais (Grupo 3).....	53
Figura 11	<i>Heatmap</i> das expressões diferenciadas dos miRNAs dos CGs dos pacientes com óbito associado ao câncer em relação as expressões dos miRNAs dos CGs dos pacientes vivos sem câncer.....	59

Figura 12	<i>Heatmap</i> das expressões diferenciadas dos miRNAs dos CGs dos pacientes sem resposta patológica (100% de tumor viável) ao tratamento neoadjuvante em comparação aos CGs dos pacientes com resposta patológica completa (0% de tumor viável).....	61
Figura 13	Gráfico representado por boxplots mostrando os miRNAs diferencialmente expressos nos CGs de pacientes mortos pelo câncer em relação aos CGs dos pacientes vivos e sem câncer.....	67
Figura 14	Gráficos de boxplot com as expressões diferenciadas dos miRNAs dos CGs dos pacientes que fizeram tratamento neoadjuvante em relação aos diferentes graus de resposta patológica determinados pelas porcentagens de células tumorais viáveis remanescentes.....	69
Figura 15	Gráfico de boxplot das comparações das expressões diferenciadas do miRNA-16 entre as amostras de CGs com 0% de células tumorais viáveis e dos CGs com 100% de células tumorais viáveis pós tratamento neoadjuvante..	70
Figura 16	Gráficos de boxplot das comparações das expressões diferenciadas dos miRNAs entre as amostras de CGs com 0% de células tumorais viáveis e dos CGs com 90% a 100% de células tumorais viáveis pós tratamento neoadjuvante.....	72
Figura 17	Rede de interação do miR-16 com seus alvos.....	74
Figura 18	Rede de interação do miR-22 com seus alvos.....	75
Figura 19	Rede de interação do miR-130a com seus alvos.....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Reagentes e quantidades necessárias para a reação de transcriptase reversa.....	38
Quadro 2	Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de transcriptase reversa.....	38
Quadro 3	Reagentes e quantidades necessárias para a reação de pré amplificação do cDNA total.....	40
Quadro 4	Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de pré-amplificação do cDNA total...	40
Quadro 5	Reagentes e quantidades necessárias para a amplificação do cDNA total pré-amplificado através da placa TLDA.....	43
Quadro 6	Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de amplificação do cDNA total através da placa TLDA.....	43
Quadro 7	Identificação dos oligonucleotídeos sequência-específicos utilizados e suas respectivas sondas.....	44
Quadro 8	Reagentes e quantidades necessárias para a reação de síntese de cDNA específico.....	45
Quadro 9	Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de síntese de cDNA específico.....	46
Quadro 10	Reagentes e quantidades necessárias para a reação de qRT-PCR.....	46

Quadro 11	Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de qRT-PCR.....	47
------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estadiamento (TNM) do CG, 7º edição (UICC/AJCC).....	7
Tabela 2	Estádios clínicos TNM para CG, 7º edição (UICC/AJCC).....	7
Tabela 3	Valores médios de $\Delta\Delta Ct$ e fold change dos CGs na comparação da expressão dos miRNAs com as mucosas gástricas normais.....	50
Tabela 4	Características clínico-patológicas dos 23 pacientes com CG do Grupo 1.....	55
Tabela 5	Características clínico-patológicas dos 52 pacientes com CG do Grupo 2.....	56
Tabela 6	Valores médios de $\Delta\Delta Ct$ e fold change dos miRNAs hipoexpressos no subgrupo de pacientes mortos pelo câncer em comparação aos pacientes vivos sem câncer no seguimento por 60 meses.....	58
Tabela 7	Valores médios de $\Delta\Delta Ct$ e fold change dos miRNAs hipoexpressos nos CGs de pacientes com 100% de células tumorais viáveis em comparação aos CGs dos pacientes com 0% de célula tumoral viável.....	60
Tabela 8	Valores médios de $\Delta\Delta Ct$ e fold change dos miRNAs diferencialmente expressos nos CGs do tipo difuso em comparação com aqueles de tipo intestinal de acordo com a classificação de Lauren.....	62

Tabela 9	Valores médios de $\Delta\Delta\text{Ct}$ e fold change dos miRNAs hipoexpressos nos CGS com metástase linfonodal (N1-N3) em comparação aos CGs sem metástase linfonodal (N0).....	62
Tabela 10	Valores médios de $\Delta\Delta\text{Ct}$ e fold change dos miRNAs hipoexpressos nos CGs com metástase à distância (M1) em comparação aos CGs sem metástase à distância (M0).....	63
Tabela 11	Valores médios de $\Delta\Delta\text{Ct}$ e fold change dos miRNAs hipoexpressos nos CGs localizados na região TEG em comparação aos CGs localizados nas demais regiões do estômago.....	64
Tabela 12	Distribuição dos CGs de pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante de acordo com a porcentagem de células tumorais viáveis remanescentes observadas nas análises do leito tumoral após o tratamento.....	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracil
AJCC	American Joint Committee on Cancer
BCL 2	Célula B de linfoma 2
BTG 1	B-cell translocation gene 1
CDK6	Ciclina dependente de quinase 6
cDNA	DNA complementar
CG	Carcinoma gástrico
DCF	Docetaxel, Cisplatina, 5-FU
E2F	DNA-binding transcription factors E2
EBV	Epstein-Barr Virus
ECF	Epirubicina, Cisplatina e 5-fluorouracil
ECX	Epirubicina, Cisplatina, Capecitabina
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
FFCD	Federation of the French Cancer Centres
FNLCC	Fondation Française de Cancerologie Digestive/
H&E	Hematoxilina e Eosina
HMGB1	High Mobility Group Box 1
JAK2	Janus kinase 2
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAGIC	Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy
MDR	Resistência à múltiplas drogas
miRISC	Multiprotein RNA-induced-silencing complex
MiRNAs	MicroRNAs
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NCRI	National Cancer Research Institute
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
PD-L2	Programmed cell death 1 ligand 2
PET-CT	Tomografia Computadorizada por emissão de pósitrons
P-gp	Glicoproteína P
PIK3CA	Phosphoinositide 3-kinase

pre-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primário
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, Quantitativo
QT	Quimioterapia
RHOA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ácido ribonucleído
RNAi	RNA de interferência
RNAm	RNA mensageiro
RT	Radioterapia
RX	Raio X
snRNA	Pequeno RNA Nuclear
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEG	Transição esôfago-gástrica
TLDA	Taqman Low Density Array
TNM	Tumor, Linfonodos e Metástases
TP53	Proteína tumoral 53
UICC	Union for International Cancer Control
XIAP	Proteína inibidora de apoptose ligada ao X

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Características anátomo-patológicas	2
1.3	Estadiamento patológico e clínico	6
1.4	Tratamento	8
1.5	Vias moleculares envolvidas na carcinogênese gástrica	14
1.6	MicroRNAs	16
1.7	MicroRNAs e o Carcinoma gástrico	21
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos.....	24
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	25
3.1	Casuística.....	25
3.1.1	População do estudo.....	25
3.1.2	Classificação histológica e Estadiamento dos Carcinomas gástricos	30
3.1.3	Tratamento e Seguimento clínico.....	30
3.1.4	Análise do grau de resposta patológica dos CGs operados	31
3.1.5	Aspectos éticos e Apoio financeiro.....	32
3.2	Metodologias	32
3.2.1	Microdissecção manual.....	32
3.2.2	Extração do RNA.....	32
3.2.3	Análises da concentração e integridade dos RNAs	36
3.2.4	Determinação do perfil de expressão dos microRNAs.....	37
3.2.4.1	Síntese do cDNA total.....	37
3.2.4.2	Pré-amplificação do cDNA total.....	39
3.2.4.3	Taqman Low Density Array (TLDA).....	41
3.2.5	Validação da expressão dos microRNAs.....	45
3.2.5.1	Síntese de cDNA específico.....	45
3.2.6	Reações de qRT-PCR.....	46
3.2.7	Análises estatísticas	47

4	RESULTADOS.....	49
4.1	Análises comparativas entre os perfis de expressão diferencial de miRNAs nos carcinomas gástricos e nas mucosas gástricas normais.....	49
4.2	Análises comparativas entre os dados clínico-patológicos dos CGs e os perfis de expressão diferencial de miRNAs nas placas TLDAs	54
4.2.1	Perfil de expressão diferencial de miRNAs em relação aos dados clínico-patológicos dos pacientes com CGs tratados apenas cirurgicamente.....	57
4.2.2	Perfil de expressão diferencial de miRNAs em relação aos dados clínico-patológicos dos pacientes com CGs tratados com QT neoadjuvante seguido de cirurgia.....	59
4.3	Validação dos perfis de expressões diferenciais dos miRNAs nos CG	64
4.3.1	Validação dos perfis de miRNAs diferencialmente expressos nos CGs dos pacientes vivos e sem câncer em comparação aos pacientes mortos pelo câncer do grupo de pacientes tratados apenas cirurgicamente.....	66
4.3.2	Validação dos perfis de miRNAs diferencialmente expressos em relação ao grau de resposta tumoral à terapia neoadjuvante nos CGs dos pacientes tratados com QT neoadjuvante seguido de cirurgia.....	67
4.3.2.1	miRNAs diferencialmente expressos nos CGs dos pacientes com 0% de célula tumoral viável em comparação aos CGs dos pacientes com 100% de células tumorais viáveis.....	70
4.3.2.2	miRNAs diferencialmente expressos nos CGs dos pacientes com 0% de célula tumoral viável em comparação aos CGs dos pacientes com 90% a 100% de células tumorais viáveis	71
4.4	Rede de interação entre os miRNAs validados e seus principais alvos moleculares	73
5	DISCUSSÃO	77
6	CONCLUSÕES	89
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O carcinoma gástrico (CG) é considerado altamente agressivo e letal, sendo a segunda maior causa de mortes relacionadas ao câncer no mundo (OOI et al. 2009; UEDA et al. 2010; BRENNER et al. 2011; LIU et al. 2011; WANG et al. 2011). A ocorrência do CG é mais comum na região leste da Ásia e Europa, e na América do Sul. As características clínico-patológicas e o padrão de tratamento são diferentes quando comparamos os países do Oriente com os do Ocidente. O local de acometimento no estômago também difere entre as regiões. Na Ásia, a maioria dos CGs é localizada na parte distal do estômago. Já no oeste Europeu e nos Estados Unidos, aproximadamente 50% dos CG são localizados na região do cárdia ou na junção gastresofágica (OH e BANG 2013). Ao contrário do que acontece no Japão e na Coreia, onde os protocolos para triagem e rastreamento de CG são rigorosamente seguidos e estão disponíveis à toda população, possibilitando assim o diagnóstico na fase inicial da doença em mais de 50% dos casos; nas outras partes do mundo, aproximadamente dois terços dos pacientes com CG já estão com doença local avançada no momento do diagnóstico (RAJDEV 2010; SCHUHMACHER et al. 2010; OH e BANG 2013). Estimativas indicam que a incidência do CG corresponde a 6,8% dos novos casos de câncer no mundo. Além disso, dos 952.000 novos casos de

CG estimados ao ano, 723.000 serão letais (PARKIN et al. 2005; JEMAL et al. 2011; FERLAY et al. 2015).

Dentre os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do CG estão a ingestão exagerada de sal e álcool, tabagismo e gastrite crônica relacionada ao *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Em contrapartida, o aumento do consumo de frutas e vegetais, assim como a prática de atividades físicas, protegem contra o desenvolvimento de CG (BORNSCHEIN et al. 2011). A incidência de CG tem apresentado um declínio importante nas últimas décadas, provavelmente devido à abolição de certas práticas, como por exemplo, o uso de sal para a conservação dos alimentos (WERNER et al. 2001).

1.2 CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-PATOLÓGICAS

O câncer de estômago refere-se a qualquer neoplasia maligna originada entre a junção gastroesofágica e o piloro. Aproximadamente 95% dos tumores de estômago são de origem epitelial e são designados adenocarcinomas. A classificação de Lauren descreve dois principais tipos histológicos de CGs, com características clínicas, epidemiológicas e histopatológicas distintas: o tipo intestinal e o difuso. O tipo intestinal apresenta células neoplásicas coesas, formando estruturas tubulares, tipo glandulares, que frequentemente ulceram a mucosa, enquanto que o tipo difuso é caracterizado pelo padrão infiltrativo que causa o espessamento da parede do estômago, sem a formação de uma massa (LAUREN 1965). O

tipo intestinal, mais comum em homens mais velhos nas regiões de alto risco, geralmente apresenta melhor prognóstico. Esse tipo está associado à presença de lesões pré-cancerosas como atrofia gástrica e metaplasia intestinal e é influenciado por fatores ambientais como a infecção por *H. pylori*, obesidade e fatores relacionados à dieta. O tipo difuso é mais frequente em mulheres e pacientes jovens, e está associado a pessoas de grupo sanguíneo A, indicando susceptibilidade genética (WERNER et al. 2001). Casos de carcinomas gástricos mistos que possuem componentes do tipo intestinal e do tipo difuso têm sido descritos (WERNER et al. 2001; NAGINI 2012).

A Classificação dos tumores gastrointestinais da Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece 5 tipos histológicos principais de adenocarcinomas gástricos: tubulares, papilares, mucinosos, pouco coesos (incluindo o tipo em anel de sinete) e os carcinomas mistos. O diagnóstico do subtipo de CG é baseado no padrão histológico predominante visualizado na peça cirúrgica ou biópsia. Um desses subtipos é o adenocarcinoma tubular que apresenta dilatações proeminentes e ramificações tubulares com diâmetros variados, podendo apresentar também estruturas acinares. As células tumorais individuais são colunares, cubóides ou achatadas pela mucina intraluminal. Porém, células claras também podem estar presentes. O nível de atipia citológica varia de baixo até alto grau. Adenocarcinomas tubulares com estroma proeminente linfóide são chamados de carcinomas medulares ou carcinomas com proeminente linfóide. Um outro subtipo é o adenocarcinoma papilar, que são carcinomas exofíticos bem diferenciados

com prolongamentos semelhantes a dedos alongados revestidos por células cúbicas ou cilíndricas e apoiados por núcleos de tecido conjuntivo fibrovascular. As células desse subtipo tendem a manter sua polaridade e alguns tumores apresentam diferenciações tubulares (papilotubular). O grau de atipia celular e índice mitótico variam, podendo apresentar até atipia severa. As margens deste tipo de tumoral são geralmente bem demarcadas e o tumor pode apresentar células inflamatórias crônicas e agudas. O terceiro subtipo é o adenocarcinoma mucinoso, caracterizado pela presença de mucina extracelular em mais de 50% do tumor. O quarto subtipo consiste nos carcinomas gástricos pouco coesos, compostos por células neoplásicas isoladas ou em pequenos agregados. Este subtipo é constituído por células em anel de sinete, onde mais de 50% do tumor é formado por células isoladas ou pequenos grupos de células malignas contendo mucina intracitoplasmática. As células tumorais possuem núcleos pressionados contra a membrana celular criando a aparência clássica de células em anéis de sinete devido ao citoplasma expandido, globóide e visualmente limpo. O citoplasma contém ácido de mucina e pode ser visualizado através da coloração com Alcian blue em pH 2,5. As células tumorais podem ainda apresentar núcleos centrais semelhantes à histiócitos, com pouca ou nenhuma atividade mitótica; citoplasma eosinofílico com grânulos citoplasmáticos proeminentes, pequenas células com pouca ou nenhuma mucina, e ainda núcleos anaplásicos com pouca ou nenhuma mucina. Os tumores com células em anel de sinete também podem formar

delicadas trabéculas glandulares, exibindo um arranjo sólido. Estes tipos ainda podem se apresentar de forma mista. (LAUWERS et al. 2010).

Os tipos de CGs mais comuns, correspondendo a 70% do total, são os adenocarcinomas tubular e o papilar. Carcinoma com células em anel de sinete compreendem 10% de todos os tumores (LEE et al. 2012). Em geral, o adenocarcinoma tipo intestinal é considerado ser essencialmente equivalente ao adenocarcinoma diferenciado, assim também acontece como os tipos difuso e indiferenciado (NAMIKAWA e HANAZAKI 2010). Existem também os subtipos raros como o adenoescamoso, carcinoma com estroma linfóide (carcinoma medular), adenocarcinoma hepatóide, o de células escamosas e os carcinomas indiferenciados. (WERNER et al. 2001; NAGINI 2012).

De acordo com a sua localização topográfica no estômago, o CG pode ser classificado em tumores proximais (cárdia, fundo) e distais (antro, piloro). Os tumores da parte proximal geralmente apresentam prognóstico menos favorável quando comparados aos carcinomas de outras regiões gástricas (WERNER et al. 2001). A classificação de Borrmann divide os CGs em dois tipos macroscópicos: avançados e superficiais (precoces). Os CGs avançados são estratificados em 4 tipos com padrão de crescimento distintos: polipóide (tipo I), ulcerado com bordas bem delimitadas (tipo II), ulcerado infiltrativo (tipo III) e infiltrativo difuso (tipo IV). Já os CGs superficiais (restritos à mucosa ou submucosa) são divididos em 3 tipos: polipóide (tipo I), superficial elevado (tipo IIa), superficial plano (tipo IIb), superficial deprimido (tipo IIc) e ulcerado (tipo III) (WERNER et al. 2001).

1.3 ESTADIAMENTO PATOLÓGICO E CLÍNICO

Definir o estadiamento correto do CG ao diagnóstico é imprescindível para o fornecimento de informações prognósticas confiáveis e também para o estabelecimento de informações terapêuticas comuns nos tumores que apresentam características similares quanto ao tipo histológico, diferenciação, tamanho, etc... (SANTIAGO et al. 2010). O sistema mais usado no ocidente para o planejamento do tratamento adequado no CG é o sistema TNM (*Tumor, Node, Metastasis*). Esse sistema classifica o tumor com base na profundidade microscópica de invasão tumoral (T) na parede gástrica, na quantidade de linfonodos regionais com presença de tumor (N), e na presença de metástases à distância (M). Além disso, também é usado como uma ferramenta que permite a comparação entre os resultados obtidos nos tratamentos realizados em diferentes países e/ou Instituições. Esse sistema de estadiamento para o CG foi incluído na primeira edição do *Union for International Cancer Control* (UICC) TNM em 1966. Atualmente, a 7ª edição reformulada em conjunto com a *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), vem sendo usada desde janeiro de 2010 (Tabela 1) (KWON 2011).

De acordo com as diretrizes da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) para o estadiamento do CG, o uso de técnicas variadas incluindo tomografia computadorizada de abdome; pélvis e tórax, ultrassonografia pélvica, PET (tomografia por emissão de pósitrons), PET-CT, esofagogastroduodenoscopia com biópsia, e ultrassom endoscópico devem ser utilizadas. (SEEVARATNAM et al. 2012; DIXON et al. 2014).

Tabela 1 – Estadiamento (TNM) do CG, 7º edição (UICC/AJCC).

Estadio T	Infiltração
T1a	Lâmina própria
T1b	Submucosa
T2	Muscular própria
T3	Subserosa
T4a	Serosa
T4b	Estruturas adjacentes
Estadio N	Nº de linfonodos infiltrados
N1	1-2
N2	3-6
N3a	7-15
N3b	≥ 16
Estadio M	Metástase à distância
M0	Ausente
M1	Presente

Fonte: Adaptado de SANTIAGO et al. (2010).

O estadiamento clínico (cTNM) define o prognóstico previamente ao tratamento inicial. O estadiamento patológico (pTNM) reconhece os dados da ressecção cirúrgica e da análise histológica, proporcionando um prognóstico mais preciso e selecionando os casos candidatos a tratamentos adjuvantes. O estadiamento pós-terapia inclui os dados clínicos (ycTNM) ou patológicos (ypTNM) de pacientes que receberam quimio e/ou radioterapia com a finalidade de avaliar a resposta desses tratamentos (SANTIAGO et al. 2010). A 7º edição do TNM sofreu algumas modificações nas categorias de estadiamento clínico (Tabela 2).

Tabela 2 – Estádios clínicos TNM para CG, 7º edição (UICC/AJCC).

	N0	N1	N2	N3a	N3b
T1	Ia	Ib	IIa	IIb	IIb
T2	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIa
T3	IIa	IIb	IIIa	IIIb	IIIb
T4a	IIb	IIIa	IIIb	IIIc	IIIc
T4b	IIIb	IIIb	IIIc	IIIc	IIIc

Qualquer T ou N, M1 = Estadio IV

Fonte: Adaptado de SANTIAGO et al. (2010).

1.4 TRATAMENTO

O tratamento do CG é complexo e requer recursos intensivos. As decisões entre as diferentes opções terapêuticas exigem extenso planejamento e necessita ser desenvolvida por uma equipe multidisciplinar (DIXON et al. 2014). Atualmente, a cirurgia é a única opção curativa disponível para o tratamento de pacientes com CG (UEDA et al. 2010; SEEVARATNAM et al. 2012; OH e BANG 2013). As margens cirúrgicas devem ser asseguradas quando se determina a linha de ressecção em uma gastrectomia com intenção curativa (Japanese Gastric Cancer Association 2011). Porém, dependendo do estadio, os resultados podem ser desapontadores, podendo apresentar taxas de até 85% de recorrência após a completa ressecção cirúrgica do tumor (ZHANG et al. 2011). Como já mencionado, as margens de ressecção cirúrgica são fortemente associadas com o prognóstico. Apenas as ressecções R0 (completa retirada do tumor com margens microscópicas negativas) apresentam taxas significantes de cura. Os pacientes operados com margens tumorais microscópicas (R1) ou macroscopicamente (R2) positivas possuem um prognóstico extremamente ruim (BRENNER et al. 2006). Os estudos que mostram taxas de sobrevida ruim em pacientes tratados com cirurgia isoladamente apontam para a presença de doença micro metastática ao diagnóstico, sendo que a presença de metastases tumorais à distância é a principal causa relacionada ao óbito destes pacientes (BRENNER et al. 2006). Atualmente, a principal questão relacionada ao tratamento cirúrgico dos CGs é a extensão da

dissecção linfonodal realizada. Tradicionalmente, na Coreia e no Japão, a dissecção linfonodal extensa (dissecção D2) vêm sendo empregada como padrão ouro nestas cirurgias. Já nos Estados Unidos e na Europa, a dissecção linfonodal perigástrica (dissecção D1) é ainda amplamente realizada. A extensão da dissecção linfonodal (dissecção D1 *versus* dissecção D2) tem sido comparada em muitos estudos clínicos (MRC ST01, Dutch D1D2, IGCSG-R01 e Taiwanese trial). Baseado nos resultados destes estudos a cirurgia com linfadenectomia D2 vem sendo incorporada nos Estados Unidos e Europa, e taxas de menor morbidade vem sido observada nestes pacientes (OH e BANG 2013).

Na última década, com o objetivo de melhorar os resultados nas taxas de sobrevida global dos pacientes com CG, diversas estratégias de tratamento complementares à cirurgia tem sido empregadas (MACDONALD et al. 2001, WADA et al. 2013). Diferentes protocolos de tratamento se estabeleceram em algumas regiões do mundo. MACDONALD e colaboradores (2011) mostraram que os pacientes que fizeram quimiorradioterapia adjuvante apresentaram aumento nas taxas de sobrevida livre de doença em 3 anos, e também aumento nas taxas de sobrevida global e mediana, quando comparados aqueles tratados apenas com a cirurgia. Entretanto, neste estudo, a maioria dos pacientes não foi submetida à dissecção linfonodal considerada adequada (D2) e portanto, muitos autores questionam o real benefício da quimiorradioterapia adjuvante em pacientes adequadamente operados. Apesar desses questionamentos, esse esquema de tratamento tem sido considerado como padrão em vários

centros norte-americanos de tratamento de CG. Nos países orientais, principalmente Japão, Coreia e China, o padrão de tratamento inclui a quimioterapia adjuvante à base de fluoropirimidinas, como demonstrado em estudo japonês que selecionou apenas pacientes adequadamente operados e com ressecção cirúrgica R0. Estes pacientes foram randomizados para serem tratados apenas cirurgicamente ou com quimioterapia adjuvante com S1 (preparação à base de fluoropirimidina) por 1 ano. Os pacientes que foram submetidos à quimioterapia adjuvante obtiveram maiores taxas de sobrevida livre de progressão e de sobrevida global (SASAKO et al. 2011). Mesmo com esses resultados, alguns autores ainda questionam o benefício dessa estratégia no tratamento do CG na população não oriental. Diferenças biológicas relacionadas ao comportamento do tumor e/ou ao metabolismo dos quimioterápicos poderiam explicar os benefícios encontrados nestes pacientes (SCHUHMACHER et al. 2010).

Outra abordagem terapêutica que tem sido utilizada no tratamento do CG é a quimioterapia neoadjuvante ou perioperatória. Antecipar o tratamento sistêmico à cirurgia tem como objetivo tratar de forma precoce a doença micrometastática, possibilitar a diminuição do volume tumoral permitindo maiores taxas de ressecções curativas e, sobretudo, conhecer a biologia tumoral através dos padrões de resposta tumoral obtidos com o uso da terapia neoadjuvante/perioperatória (BRENNER et al. 2006; WANG et al. 2010; HINGORANI et al. 2011).

O estudo realizado pelo *United Kingdom National Cancer Research Institute (NCRI)/Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional*

Chemotherapy (MAGIC), com 503 pacientes com CGs, foi o primeiro grande estudo clínico randomizado, fase III, a demonstrar resultados benéficos conclusivos sobre o uso de terapias pré e pós-operatória nas taxas de sobrevida dos pacientes, quando comparadas com as taxas apresentadas pelos pacientes tratados exclusivamente por cirurgia (CUNNINGHAM et al. 2006). Os pacientes deste estudo foram randomizados em 2 subgrupos: 1. aqueles tratados com cirurgia isolada ou com quimioterapia perioperatória com o esquema ECF (epirubicina, cisplatina e infusão contínua de 5-fluorouracil, 5-FU). A taxa de sobrevida global dos pacientes em 5 anos foi de 36%, contra 23% em favor da quimioterapia perioperatória. A taxa de sobrevida livre de progressão da doença também foi melhor nos pacientes tratados com terapia perioperatória (CUNNINGHAM et al. 2006; CHUA e CUNNINGHAM 2007). O estudo francês FNLCC/FFCD (*Fondation Française de Cancérologie Digestive/Federation of the French Cancer Centres*) mostrou resultados muito similares aos apresentados pelo MAGIC (sobrevida em 5 anos foi de 38% contra 24% em favor da quimioterapia perioperatória), porém nesse estudo o tratamento quimioterápico utilizado foi o esquema CF, sem epirubicina (BOIGE et al. 2007; HINGORANI et al. 2011). Ambos estudos demonstraram benefícios comuns na realização do tratamento neoadjuvante dentre eles o aumento de ressecções R0, diminuição ou queda nos estadiamentos tumorais, aumento na frequência de tumores estádios ypT0-2 e ypN0 no grupo tratado com quimioterapia, e principalmente maior tolerância ao tratamento pré-operatório (cerca de 90% dos pacientes completaram a QT pré-operatória, enquanto apenas 50% o

fizeram no pós-operatório) (COSTA JÚNIOR et al. 2013). No estudo 40954 da *European Organization for Research and Treatment of Cancer-EORTC*, os pacientes com CGs foram tratados com quimioterapias neoadjuvantes utilizando-se o esquema de cisplatina, ácido folínico e fluoracil, e os resultados mostraram aumento das taxas de ressecção tumoral completa, diminuição no tamanho tumoral e menor número de metástases linfonodais, porém não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de sobrevida global em comparação às taxas apresentadas pelos pacientes com tratamento cirúrgico exclusivo (SCHUHMACHER et al. 2010). A meta-análise realizada por LI et al. (2010), incluiu 14 estudos comparativos entre os pacientes com CG tratados com e sem QT neoadjuvante. Este estudo mostrou a diminuição do tamanho e volume tumoral, aumento nas taxas de ressecção R0 (75,2% contra 66,9%), boa tolerância dos pacientes ao uso dos quimioterápicos no período pré-operatório, apenas 8,8% dos pacientes apresentaram sintomas adversos gastrointestinais e não houve complicações mais graves, reconhecendo-se assim os efeitos positivos da terapia neoadjuvante no tratamento do CG. A quimioterapia perioperatória é o tratamento padrão realizado na maioria dos países europeus, sendo esta prática adotada também em grandes centros de tratamento oncológico no Brasil. No A.C.Camargo Cancer Center, os pacientes diagnosticados com tumores gástricos que infiltram a camada muscular (T2) ou além desta, com ou sem evidência de linfonodos positivos, são encaminhados para a avaliação do uso de tratamento perioperatório. O tratamento neoadjuvante

tem sido realizado em todos os pacientes com CG clinicamente cT3-4 ou N+ (COSTA JÚNIOR et al. 2013).

Várias pesquisas sobre este assunto vem sendo realizadas e muitas vezes os resultados obtidos são conflitantes e são atribuídos principalmente à falta de consensos bem definidos sobre as avaliações dos efeitos da QT perioperatória em relação às diferentes estratégias terapêuticas aplicadas. Sendo assim, alguns médicos ainda relutam em indicar o tratamento pré-operatório para os pacientes com CGs devido a presença de dúvidas sobre as complicações e morbidades cirúrgicas apresentadas (BRENNER et al. 2011; HINGORANI et al. 2011). Apesar dos efeitos benéficos observados em pacientes com CG respondedores à QT neoadjuvante, este tipo de tratamento é ineficaz em aproximadamente metade dos pacientes com CGs, sendo que muitos deles ainda apresentam complicações clínicas relacionadas à toxicidades das drogas. A identificação e seleção de pacientes com tumores quimiossensíveis antes do início da QT neoadjuvante é muito importante para evitar complicações clínicas e atraso inadequado do tratamento cirúrgico (YASHIRO et al. 2009). Atualmente, os dados confiáveis do efeito benéfico do tratamento neoadjuvante nas células tumorais, são obtidos apenas após o procedimento cirúrgico, quando se analisa o espécime anatomopatológico. Embora várias pesquisas *in vivo* e *in vitro* têm sido realizadas para predizer a quimiossensibilidade de cada paciente, parâmetros confiáveis ainda não foram identificados (FUKUDA et al. 2006; HÖFLER et al. 2007).

Esses achados enfatizam a necessidade de uma melhor seleção das estratégias de tratamento para cada paciente individualmente (BRENNER et al. 2011). Atualmente a escolha do tratamento é realizada de acordo com o estadiamento tumoral, ou seja, é determinado de acordo com a extensão da disseminação do tumor local (BORNSCHEIN et al. 2011). Outros fatores como idade e gênero do paciente, grau histológico do tumor, presença de extensão perineural e invasão vascular pouco acrescentam para distinguir o paciente de bom e de mau prognóstico (BANDO et al. 2004). Assim, torna-se evidente a necessidade de novos marcadores prognósticos e preditivos no tratamento de pacientes com CG (ZHANG et al. 2011; BRENNER et al. 2011; LIU et al. 2011).

1.5 VIAS MOLECULARES ENVOLVIDAS NA CARCINOGENESE GÁSTRICA

A carcinogênese gástrica consiste em um processo de múltiplas etapas iniciando-se na mucosa gástrica com gastrite, progredindo para a gastrite atrófica, metaplasia intestinal, adenoma e finalmente o CG (CORREA 1992; WANG et al. 2011). A desregulação de várias vias de sinalização celular oncogênicas, tais como a E2F (DNA-binding transcription factors E2), KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), p-53 e Wtn/ β -catenina, indicam que o CG é uma doença molecular heterogênea (OOI et al. 2009). Alguns estudos prévios demonstraram que múltiplas alterações genéticas, incluindo mutações e ampliações de oncogenes,

bem como a inativação de genes supressores de tumor, são responsáveis pelo desenvolvimento e progressão do CG (UEDA et al. 2010). Alterações em genes responsáveis por funções celulares específicas como, por exemplo, adesão celular, transdução de sinal, diferenciação, desenvolvimento e reparo do DNA também foram identificadas nos CGs (WERNER et al. 2001; KIM et al. 2011b).

Recentemente, 295 adenocarcinomas gástricos foram analisados molecularmente, como parte do projeto *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*, e de acordo com os resultados obtidos, uma classificação molecular baseada nas aberrações somáticas, no número de cópias integradas e nas mutações que caracterizam alterações genômicas em vias de sinalização conhecidas, incluindo as vias de candidatos a alvos terapêuticos; foi proposta para os CGs. Os CGs foram divididos em 4 subtipos moleculares: (1) tumores positivos para Epstein-Barr Virus (EBV) e que apresentam mutações recorrentes no gene *PIK3CA (Phosphoinositide 3-kinase)*, hipermetilação no DNA e amplificação dos genes *JAK2 (Janus kinase 2)*, *PD-L1 (Programmed cell death 1 ligand 1)* e *PD-L2 (Programmed cell death 1 ligand 2)*; (2) tumores com instabilidade de microssatélites e com altas taxas de mutação gênica, incluindo mutações em genes codificadores de proteínas de sinalização oncogênica que podem ser alvos terapêuticos; (3) tumores estáveis genomicamente, compostos predominantemente por CGs do tipo histológico difuso com mutação do gene *RHOA (Ras homolog gene family, member A)* e (4) tumores com instabilidade cromossomal, associados

à aneuploidia e amplificação focal dos receptores de tirosina kinase (Cancer Genome Atlas Research Network 2014).

As análises dos transcriptomas dos CGs identificaram genes relacionados ao estadio do tumor, metástases em linfonodos, e subtipos histológicos (KIM et al. 2011b). As análises das expressões gênicas que ocorrem nas diversas etapas da carcinogênese gástrica, desde a mucosa gástrica normal até o desenvolvimento do carcinoma invasivo pode elucidar questões sobre a carcinogênese gástrica e permitir a identificação de alvos terapêuticos específicos (LEE et al. 2005; KIM et al. 2011b).

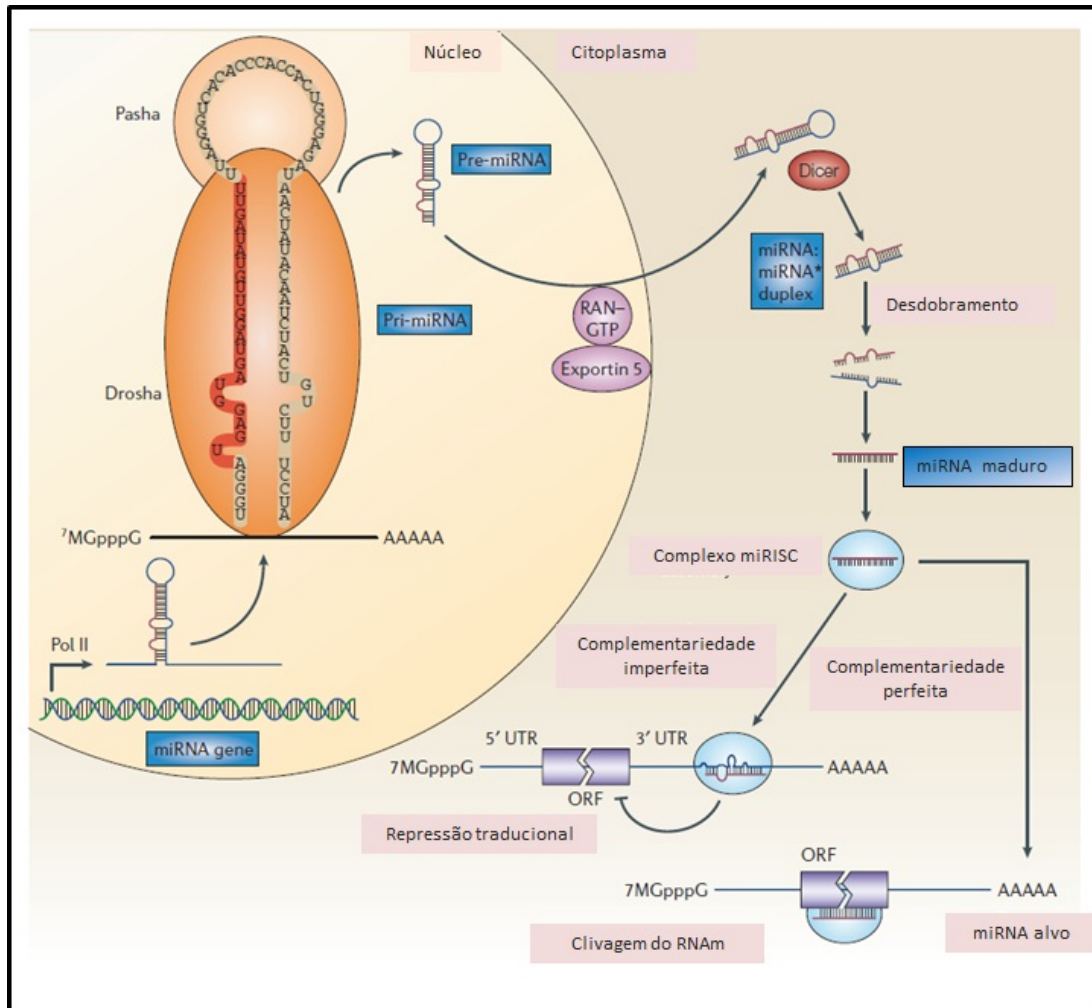
O desenvolvimento tecnológico na área diagnóstica é fundamental para a identificação dos alvos moleculares específicos da carcinogênese gástrica (BORNSCHEIN et al. 2011). Análises abrangentes das expressões gênicas e de miRNAs tem identificados genes relevantes cujo perfil de expressão está associado ao estágio do tumor, grau histológico, susceptibilidade à quimioterapia, agressividade clínica ou prognóstico (TAKENAWA et al. 2004; UEDA et al. 2010).

1.6 MICRORNAS

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA de fita simples não codificadoras de proteínas, formados por aproximadamente 22 nucleotídeos e encontrados abundantemente em células eucarióticas (MISHRA e BERTINO 2009; TSENG et al. 2011). Conhecidos como “microgerenciadores” da expressão do gene alvo, os miRNAs são

complementares a certos RNAs mensageiros (RNAs), ligando-se à região 3' não traduzida dos RNAs alvo (MISHRA e BERTINO 2009). Essa interação é crucial para a regulação pós-transcricional da expressão do gene alvo, pois o pareamento miRNA-RNA acarreta na inibição traducional ou degradação do RNA, dependendo do grau de complementariedade entre o miRNA e o seu alvo. Os miRNAs que se ligam com perfeita ou quase perfeita complementariedade à sequência de RNA codificador de proteína induz a via do RNA mediador de interferência (RNAi). Nesse caso, os transcritos de RNA são clivados pelas ribonucleases associadas aos miRNAs, chamadas de miRISC (*multiprotein RNA-induced-silencing complex*), que resulta na degradação dos RNAs alvos. Este mecanismo de silenciamento gênico mediado por miRNA é comumente encontrado em plantas, mas também tem sido encontrado em mamíferos. Entretanto, a maioria dos miRNAs de animais são conhecidos por utilizar um segundo mecanismo de regulação gênica que não envolve a clivagem do RNA alvo. Estes miRNAs exercem seus efeitos regulatórios através da ligação com imperfeita complementariedade dentro da região 3' não traduzida dos seus RNAs alvos, e eles reprimem a expressão do gene alvo pós transcricionalmente aparentemente no mesmo nível de tradução, através do complexo miRISC que é similar ou idêntico com a via mais usada pelo RNAi. Consistente com o controle traducional, miRNAs que usam esse mecanismo reduzem o nível de expressão de proteína dos seus genes alvo mas os níveis de RNA desses genes é raramente afetado (ESQUELA-KERSCHER e SLACK 2006).

De acordo com a biogênese dos miRNAs (Figura 1), eles são transcritos pela RNA polimerase II ou III inicialmente como longos RNAs precursores chamados de RNA primários (pri-miRNAs) os quais possuem uma extremidade cap 5' 7-metil guanosina e uma cauda poli-A. Os pri-miRNAs são processados no núcleo pela enzima RNase III Drosha, e pelo seu co-fator que consiste em uma proteína ligante de dupla fita de RNA: a Pasha (também conhecida como DGCR8) em um miRNA precursor (pre-miRNA) de aproximadamente 70 nucleotídeos, que se dobra em imperfeitas estruturas conhecidas como *stem-loop* (ESQUELA-KERSCHER e SLACK 2006; MALTBY et al. 2016). Nessa etapa, a Pasha é responsável por identificar o ponto exato de clivagem no pri-miRNA enquanto a Drosha catalisa essa excisão (SAYED e ABDELLATIF 2011). Os pre-miRNAs são exportados para o citoplasma pelo complexo formado pela exportina 5 e pela RAN-GTP onde são submetidos à um novo processamento onde uma dupla fita de RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos é retirada do pre-miRNA por outra enzima RNase III chamada Dicer. Subsequentemente, essa fita dupla de miRNA é incorporada pelo complexo miRISC. Dentro desse complexo apenas uma fita simples de miRNA maduro é preferencialmente retida, onde então adquire a habilidade de regular seus genes alvo negativamente (ESQUELA-KERSCHER e SLACK 2006; JUDICE et al. 2016).



Fonte: Adaptado de: ESQUELA-KERSCHER e SLACK (2006)

Figura 1 - A biogênese do miRNA. Os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II no núcleo onde são formados os pri-miRNAs. Os pri-miRNAs são processados pela Drosha e seu co-fator Pasha para liberação dos pre-miRNA precusores. A RAN-GTP e exportina transportam o pre-miRNA para o citoplasma. Subsequentemente a RNA polimerase III Dicer processa o pre-miRNA formando um miRNA transitório de fita dupla (miRNA:miRNA duplex). Esse miRNA de fita dupla é carregado até o miRISC onde a fita simples de miRNA maduro é retida no complexo. O miRNA maduro se liga às regiões complementares dos seus RNAm alvos para regular negativamente a expressão gênica em um dos dois caminhos que dependem do grau de complementariedade entre o miRNA e seu alvo. miRNAs que se ligam imperfeitamente aos seus RNAm alvos bloqueiam a expressão gênica à nível de tradução proteica (abaixo à esquerda). miRNAs que se ligam aos seus alvos com perfeita complementariedade induzem a clivagem do RNAm (abaixo à direita).

Os miRNAs são os principais reguladores negativos do processo de tradução dos RNAs e exercem essa função através de vários mecanismos. O desafio atual é identificar com acurácia os alvos que são regulados pelos miRNAs pois para entender o significado da mudança no nível de expressão de certo miRNA em indivíduos saudáveis e doentes, é essencial que se possa identificar seus RNAs alvo (SAYED e ABDELLATIF 2011). Os miRNAs se ligam aos seus alvos muitas vezes com complementariedade incompleta, o que dificulta a identificação dos genes alvo utilizando-se dos programas de busca atualmente disponíveis. Por isso os métodos computadorizados de identificação de miRNAs relacionados ao câncer vem sendo amplamente aplicados nas pesquisas como uma ferramenta útil aliada aos métodos experimentais (LI X et al. 2011). Os programas de bioinformática atuais utilizam um artifício, uma vez que os miRNAs dentro das famílias possui maior homologia na extremidade 5' do miRNA maduro. Muitos estudos indicam que a extremidade 5' do miRNA é crucial para a estabilidade e para o próprio carregamento do mesmo para dentro do complexo RISC, e que essa extremidade também é muito importante pela função biológica. Por isso, muitos algoritmos de bioinformática disponíveis utilizam a região semente ou "seed" que compreende as primeiras 2-8 bases da sequência do miRNA maduro na procura de complementariedade com a extremidade 3' de todos os genes expressos. Estudos revelam que o miRNA maduro pode ligar-se a aproximadamente 200 alvos e que esses alvos podem ter diversas funções; incluindo fatores de transcrição, fatores secretores, receptores e transportadores. Com isso, os miRNAs controlam a

expressão de aproximadamente 1/3 de todos os RNAs humanos (ESQUELA-KERSCHER e SLACK 2006; SAYED e ABDELLATIF 2011).

1.7 MICRORNAS E O CARCINOMA GÁSTRICO

Vários estudos relatam que os miRNAs estão associados ao processo de tumorigênese agindo tanto como oncogenes ou como supressores de tumor (ZHANG et al. 2011; TSENG et al. 2011). A expressão dos miRNAs ocorre normalmente em situações fisiológicas, portanto existe uma grande probabilidade de que os perfis de expressão de miRNAs observados em certos tumores possam ser utilizados como biomarcadores diagnósticos e prognósticos (BRENNER et al. 2011). Sabe-se que os miRNAs possuem papel importante em vários processos biológicos, como proliferação, invasão, metástase, controle do ciclo celular, resistência à apoptose, angiogênese e até mesmo na infecção pelo *Helicobacter pylori*. Estudos recentes sobre a função dos miRNAs tem fornecido informações relevantes sobre o seu papel como biomarcadores nos CGs (MU et al. 2015).

O papel prognóstico do perfil de expressão dos miRNAs nos CGs ainda não está totalmente estabelecido, contudo, estudos preliminares tem mostrado resultados bem animadores, uma vez que vários miRNAs associados ao CG estão sendo descobertos (WANG et al. 2008; BANDRES et al. 2009; CHEN et al. 2010; TSUKAMOTO et al. 2010; UEDA et al. 2010; CHIANG et al. 2011; ZHANG et al. 2011; LIU et al. 2011). Já foram demonstradas evidências de que os miRNAs estão associados aos

processos de proliferação, migração e invasão celular nos CGs. Por exemplo, no estudo de TSUKAMOTO et al. (2010) o perfil de expressão de 470 miRNAs em CG foi demonstrado, sendo que 33 destes miRNAs estavam regulados positivamente e outros 6 estavam regulados negativamente. Dos miRNAs regulados negativamente, o miR-375 era o mais suprimido e por isso foi considerado como candidato à miRNA supressor de tumor em CG. ZHANG et al. (2011) encontraram resultados similares, mostrando que a hiperexpressão do miR-375 juntamente com o miR-142-5p é capaz de prever o risco de recorrência do CG. Em outro estudo, CHIANG et al. (2011) demonstraram a hipoexpressão do miRNA-203 em linhagens celulares de CG e sua relação com o potencial de proliferação e invasão tumoral. Pesquisas com o miR-148a e miR-152 em CG também revelaram que a hipoexpressão desses miRNAs está relacionada com o tamanho e profundidade de invasão tumoral (CHEN et al. 2010). UEDA et al. (2010) relataram que as expressões de alguns miRNAs estão correlacionadas aos subtipos histológicos de CG, e que a baixa expressão do miR-433 e a alta expressão do miRNA-214 estão associadas com taxas de sobrevida desfavoráveis, independentes das covariáveis clínicas como profundidade de invasão tumoral, metástases linfonodais e estágio da doença.

Portanto, encontramos na literatura científica vários estudos relatando a associação entre perfis de expressão de miRNA e CGs. Estes estudos mostram desde a relação entre a expressão de miRNAs com os subtipos histológicos e tamanho do tumor, até com o aumento do risco de recorrência

e de progressão da doença (WANG et al. 2008; BANDRES et al. 2009; CHEN et al. 2010; TSUKAMOTO et al. 2010; UEDA et al. 2010; CHIANG et al. 2011; ZHANG et al. 2011; LIU et al. 2011). Porém, ainda não há descrito na literatura estudos que determinaram o perfil de expressão de miRNAs nos CGs relacionados ao grau de resposta patológica nos pacientes submetidos à tratamentos neoadjuvantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi determinar o perfil de expressão de miRNAs nos carcinomas gástricos submetidos à quimioterapia neoadjuvante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Determinar o perfil de expressão diferencial dos miRNAs dos carcinomas gástricos em comparação ao da mucosa gástrica normal;
- 2 Associar o perfil de expressão diferencial de miRNAs ao grau de resposta histopatológica dos carcinomas gástricos submetidos ao tratamento neoadjuvante;
- 3 Determinar os perfis de expressões diferenciais de miRNAs relacionados às características clínico-patológicas dos pacientes com carcinomas gástricos.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 População do estudo

A população do estudo foi constituída aleatoriamente por adenocarcinomas gástricos de pacientes diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center no período de 1998 a 2015. Foram selecionadas amostras de CGs de pacientes tratados exclusivamente com cirurgia e amostras de CGs de pacientes tratados com quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia. As amostras dos 2 grupos foram ajustadas de acordo com o estadiamento. Os critérios de inclusão utilizados para todas as amostras foram de pacientes que assinaram o termo de concordância em participar do estudo, com idade maior ou igual a 18 anos e com disponibilidade do tecido tumoral fixado em formol e emblocado em parafina tecnicamente adequado para as análises moleculares. Foram excluídos do estudo os pacientes portadores de tumores hereditários ou síndromes genéticas e aqueles previamente submetidos a tratamento quimio ou radioterápicos para outras neoplasias.

Para as análises comparativas de expressão dos miRNAs foram selecionadas amostras de mucosas gástricas histologicamente normais colhidas por via endoscópica, fixadas em formol tamponado a 10% e

emblocadas em parafina provenientes de pacientes não portadores de qualquer tipo de tumor, e que concordaram em participar do estudo.

As amostras de CGs utilizadas para as análises moleculares dos pacientes que foram tratados com quimioterapia neoadjuvante foram as colhidas por via endoscópica, previamente ao início do tratamento (sem interferência do tratamento). As análises das características histopatológicas e do grau de resposta patológica do tumor ao tratamento neoadjuvante foram realizadas nas amostras tumorais provenientes das peças cirúrgicas operadas (esôfagogastrectomias ou gastrectomias com linfadenectomias D2) fixadas em formol tamponado a 10% e emblocadas em parafina.

A seleção e o recrutamento das amostras foram realizados, de forma retrospectiva e aleatória, através das análises dos bancos de dados da Anatomia Patológica em colaboração com os departamentos de Cirurgia Abdominal, Endoscopia Digestiva e Oncologia Clínica do A.C. Camargo Cancer Center. De cada bloco tumoral selecionado foram coletados 10 cortes histológicos para a extração do RNA que viabilizou as reações de qRT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, Quantitativo) necessárias para as análises dos perfis de miRNAs.

De acordo com os critérios de inclusão e exclusão descritos, foram selecionadas aleatoriamente 153 amostras de CGs, representadas por 40 amostras de CGs (blocos de parafina e lâminas de H&E) de pacientes submetidos exclusivamente ao tratamento cirúrgico (gastrectomias) e 113 amostras de CGs de pacientes tratados com quimioterapia (QT) neoadjuvante seguida de cirurgia. É importante ressaltar que, as 113

amostras de CG utilizadas no Grupo 2 foram provenientes de biópsias endoscópicas, e portanto, colhidas antes do início do tratamento neoadjuvante. As lâminas coradas com H&E de todas as amostras selecionadas foram analisadas para identificação, classificação e marcação do tumor (Figura 2), sendo excluídas as amostras cujos blocos já não continham área tumoral mínima suficiente para a extração do RNA.

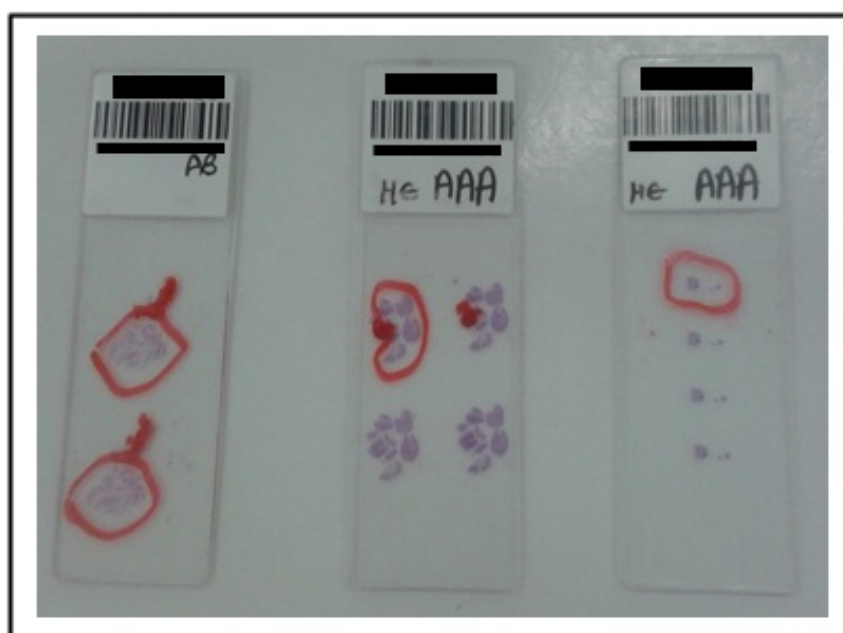


Figura 2 - Marcação da área tumoral de interesse na lâmina de H&E do CG.

Do grupo inicial de 153 amostras de CGs, 87 delas foram selecionadas para a próxima etapa, e 66 amostras foram eliminadas por material insuficiente. Com o intuito de evitar a contaminação das amostras tumorais por células da mucosa gástrica normal ou células inflamatórias, foram realizadas microdissecções manuais (*scrape*) das áreas tumorais mais

representativas sendo estes materiais submetidos à extrações dos RNAs (Figura 3).

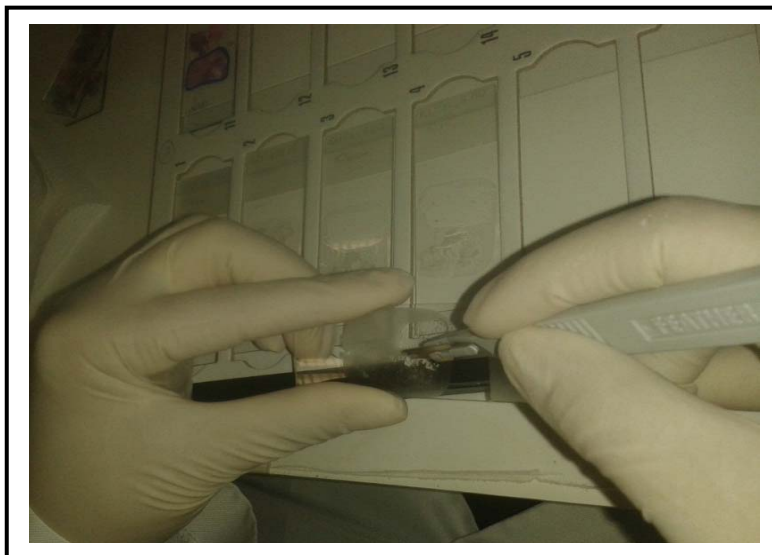


Figura 3 – Dissecção manual da área tumoral selecionada dos CGs.

O RNA total das 87 amostras selecionadas foram extraídos sendo 23 amostras pertencentes ao Grupo 1 e 64 amostras ao Grupo 2. Após as extrações, 7 amostras do Grupo 2 foram excluídas por apresentarem níveis de concentração ($<20 \text{ ng}/\mu\text{l}$) e pureza (razão $260/280 < 1,8$ e $> 2,1$) fora dos limites recomendados de acordo com as leituras realizadas no espectrofotômetro NanoDrop ND3.0 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE). Todas estas etapas podem ser visualizadas no fluxograma abaixo (Figura 4).

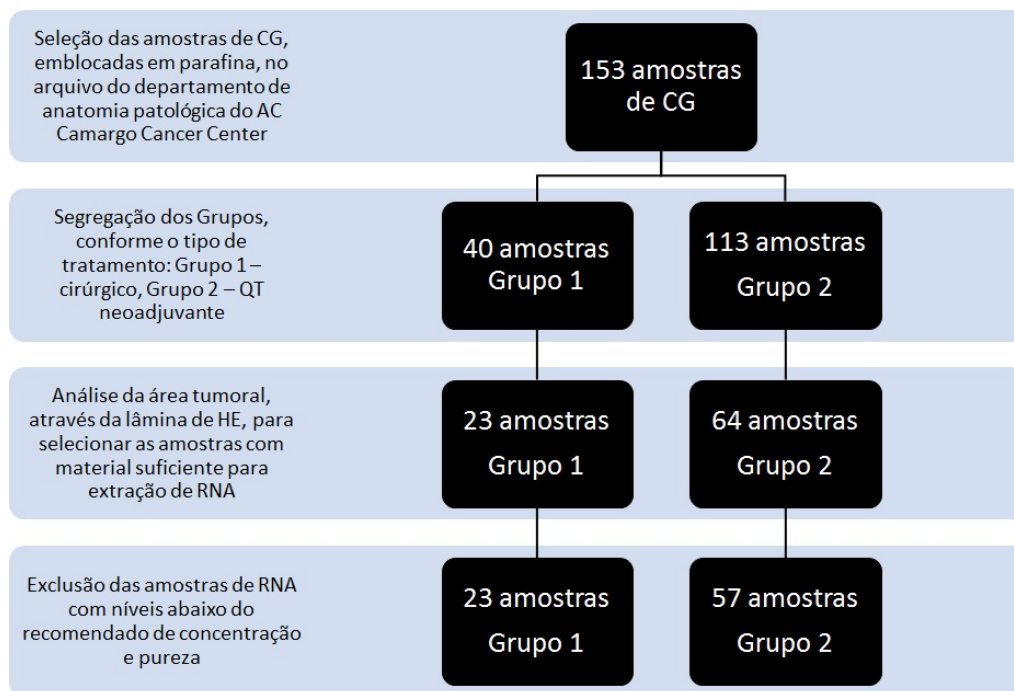


Figura 4 – Seleção das amostras dos Carcinomas gástricos.

As 18 amostras de mucosa gástrica normal, utilizadas como grupo controle, mostraram os RNAs extraídos com níveis de concentração e pureza dentro dos níveis recomendados de acordo com a mensuração do Nanodrop. Estas amostras foram agrupadas em um *pool* de amostras normais que foi utilizado em todos os experimentos realizados. A concentração de RNA necessária neste *pool* para a realização de todos os experimentos e comparações com as amostras de todos os pacientes foi determinada de acordo com a quantidade de RNA necessária para a realização da qRT-PCR nas placas TLDA (300 ng/amostra) e com os assays individuais (10 ng/miRNA alvo).

3.1.2 Classificação histológica e Estadiamento dos Carcinomas Gástricos

Todos os casos de CG selecionados foram revisados histologicamente juntamente com o patologista responsável para a confirmação do diagnóstico, classificação histológica e estadiamento. O estadiamento foi realizado de acordo com o sistema TNM preconizado pelo *American Joint Committee on Cancer-AJCC* (SANTIAGO et al. 2010), e foram utilizadas as classificações histológicas de câncer gástrico de Lauren e do grau histológico tumoral da OMS (SANTIAGO et al. 2010).

3.1.3 Tratamento e seguimento clínico

Os pacientes submetidos ao tratamento com quimioterapia neoadjuvante seguiram os protocolos pré-estabelecidos pelo departamento de Oncologia Clínica do A.C. Camargo Cancer Center que de maneira geral constam de 3 ciclos de quimioterapia com um dos esquemas: ECF (epirubicina – 50 mg/m², cisplatina – 60 mg/m² e infusão contínua de 5-FU – 200 mg/m² por dia), DCF (docetaxel – 50 mg/m², cisplatina – 60 mg/m² e infusão contínua de 5-FU- 200 mg/m² por dia) e ECX (epirubicina – 50 mg/m², cisplatina – 60 mg/m² e capecitabina – 625 mg/m² uso contínuo).

Após o término da quimioterapia os pacientes foram submetidos ao tratamento cirúrgico (esôfagogastrectomia ou gastrectomia parcial ou total com linfadenectomia D2). Os pacientes com CGs pT3-4 ou pN+ foram submetidos à esquemas de QT adjuvantes contendo um derivado de platina (Oxiplatina ou Cisplatina) e uma fluoropirimidina (5-FU ou Capecitabina).

O seguimento clínico dos pacientes que completaram seu tratamento com intuito curativo foi realizado de acordo com o protocolo médico estabelecido pelo A.C.Camargo Cancer Center: nos primeiros 2 anos os pacientes com CGs tratados são acompanhados a cada 3 meses, sendo que em cada consulta a investigação inclui: história clínica, exame físico, exames laboratoriais incluindo pesquisa de CEA e CA 19-9, exames de imagem com TC de tórax/abdome/pelve alternada com USG de abdome, raio x (RX) de tórax e endoscopia anual. Após 3-5 anos do fim do tratamento a periodicidade do seguimento passa ser a cada 6 meses, e após os 5 anos, o seguimento clínico é feito anualmente (COSTA JÚNIOR et al. 2013).

3.1.4 Análise do grau de resposta patológica dos CGs operados

A avaliação da resposta patológica tumoral ao tratamento neoadjuvante foi feita através das análises microscópicas de toda a lesão residual ou do leito tumoral da peça cirúrgica. O grau de resposta patológica foi determinado de acordo com a porcentagem de células tumorais viáveis presentes em relação à área neoplásica total ou leito tumoral, graduando-se em 5 classes: Grau 1 – neoplasia com resposta ao tratamento: Grau 1a – resposta total ao tratamento (0% de células viáveis); Grau 1b – resposta subtotal (até 10% de células viáveis); Grau 2 – resposta parcial (10% a 50% de células viáveis); Grau 3 – resposta mínima (mais de 50% de células viáveis); Grau 4 – sem resposta (100% de células viáveis) (BECKER et al. 2003).

3.1.5 Aspectos éticos e Apoio financeiro

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center sob o número 1660/12, e obteve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (2012/12542-0 e 2012/12551-9).

3.2 METODOLOGIAS

3.2.1 Microdissecção manual

De todas as amostras selecionadas (mucosa gástrica normal ou tumoral) foram coletados 20 cortes histológicos de 5 µm de espessura da área de interesse a partir dos blocos de parafina correspondentes. Após as análises microscópicas das lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para identificação e marcação da área tumoral foi possível a realização da microdissecção manual (técnica conhecida como *scrape*) das lâminas previamente cortadas, garantindo a extração do material genético apenas das células de interesse. As áreas tumorais ou de mucosa gástrica normal dos cortes histológicos foram então microdissecadas com bisturi cirúrgico descartável, e o material armazenado em tubo tipo eppendorf à temperatura de - 80°C.

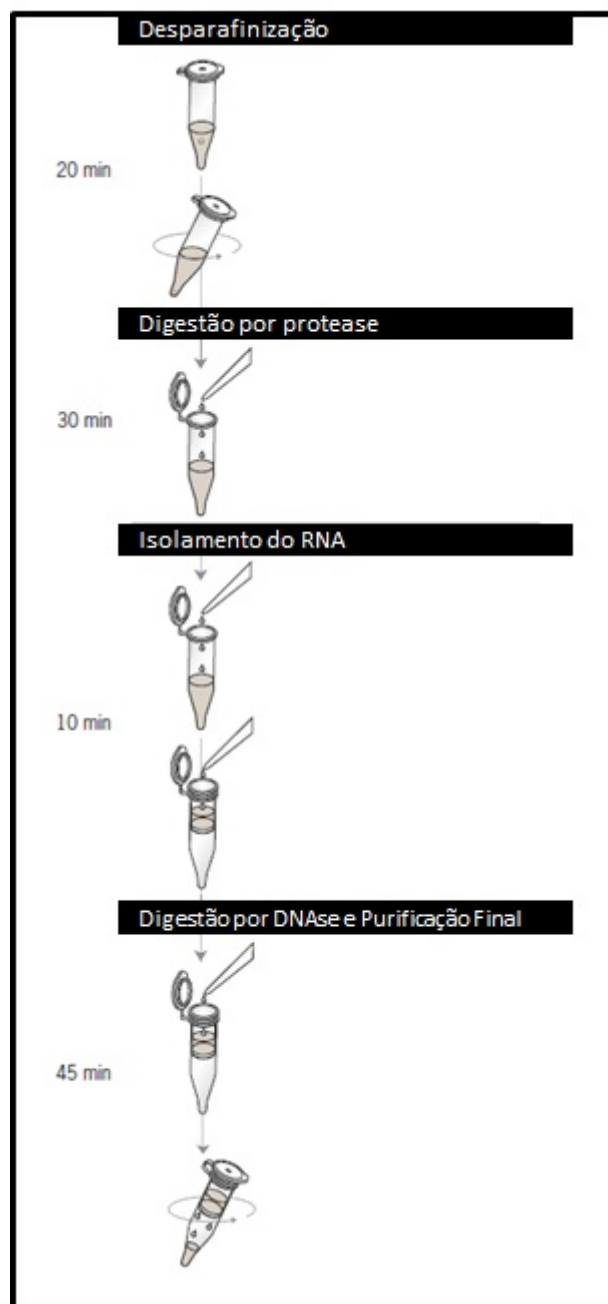
3.2.2 Extração do RNA

As extrações de RNA de todas as amostras (tumorais e não neoplásicas) foram realizadas com o uso do *kit RecoverAll Total Nucleic Acid*

Isolation for FFPE Samples (Ambion – Applied Biosystems, Austin, TX) que possibilita a extração de material genético de amostras parafinadas e previamente fixadas com formaldeído. A escolha deste *kit* foi feita devido ao desempenho superior demonstrado nas análises de expressão de miRNAs em material parafinado (DOLESHAL et al. 2008).

Para remover completamente a parafina do tecido tumoral após a microdissecção manual, foi adicionado 1 ml de xilol 100% (Allkimia, Brasil) e incubado por 3 min em termobloco a 50°C. Para a formação do pellet contendo o material genético no fundo do tubo, a fim de possibilitar o descarte do xilol sobrenadante, foi feita a centrifugação por 3 min a 14.000 rpm. Com o objetivo de remover o xilol das amostras e acelerar a secagem do pellet foram realizadas duas lavagens adicionando 1 ml de álcool 100% (Merck, Brasil) e centrifugando por 3 min a 14.000 rpm. Ao final das centrifugações o sobrenadante foi descartado. Para remover o etanol residual foi realizada uma centrifugação à vácuo por 10 min a 37°C. Com o pellet livre de resíduos foi adicionado 200 µl de Digestion Buffer, 4 µl de Protease e incubado em termobloco por 15 min a 50°C e 15 min a 80°C. Para iniciar o processo de isolamento do RNA foi feito uma mistura com 240 µl de Isolation Aditive e 550 µl de etanol 100%. Os 790 µl dessa mistura foram adicionados no tubo contendo a amostra de tecido. Todo o volume contendo a mistura de reagentes e a amostra foi colocado em um tubo com uma coluna de filtro e centrifugado a 10.000 rpm por 30 seg. Todo o volume que passou pelo filtro foi descartado e o filtro reinserido no tubo vazio. A seguir foram realizadas duas lavagens com 700 µl da solução Wash 1 e 500

μl da Wash 2/3, ambas seguidas de centrifugação por 30 seg. a 10.000 rpm e descartando o conteúdo do tubo e mantendo a coluna de filtro. Para encerrar a etapa de lavagens foi realizada uma última centrifugação, desta vez sem reagentes, para remoção do fluido residual presente no filtro e novamente descartando o líquido e mantendo o filtro. Para o tratamento da amostra com DNase foi adicionado bem no centro do filtro 60 μl de uma mistura de: 6 μl de DNase buffer e 4 μl de DNase e 50 μl de água livre de nuclease (Sigma-Aldrich, EUA), incubando 30 min. à temperatura ambiente. Dando prosseguimento ao protocolo, foi adicionado novamente 700 μl de Wash 1 na coluna de filtro. Após um minuto, o tubo foi centrifugado por 30 seg. a 10.000 rpm e descartado o líquido. Foram realizadas mais duas lavagens com 500 μl de Wash 2/3, novamente centrifugando por 30 seg. a 10.000 rpm. Foi realizada uma última centrifugação sem reagente a 10.000 rpm por 1 min. para remover o fluido residual do filtro. A última etapa foi a eluição do RNA. Para essa etapa, o filtro foi transferido para um tubo novo e foi adicionado 20 μl de água livre de nucleasse. Após um minuto o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por mais 1 min. Por fim o filtro foi descartado e o tubo contendo o RNA eluído foi armazenado a -80°C . O Fluxograma (Figura 5) ilustra resumidamente os procedimentos e o tempo gasto nas extrações de RNA.

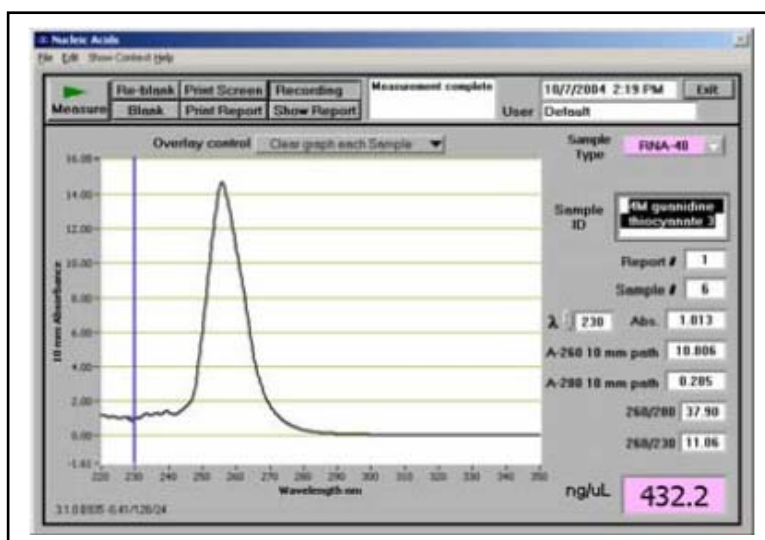


Fonte: Adaptado de: *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit Protocol*, Ambion.

Figura 5 - Etapas envolvidas na extração de RNA.

3.2.3 Análises da Concentração e Integridade dos RNAs

A concentração da solução de RNA foi mensurada através do espectrofotômetro NanoDrop ND3.0 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE) utilizando 1,5 µl de amostra e verificando a absorbância em 260nm (Figura 6). A taxa de absorbância do RNA A_{260}/A_{280} funciona como seu indicador de pureza, sendo que taxas de RNA de boa qualidade ficam entre 1,8–2,1. A taxa de absorbância do RNA A_{260}/A_{280} menor que 1,8 significa que há contaminação da amostra com fenol, proteína ou outros contaminantes com absorbância em 280 nm.



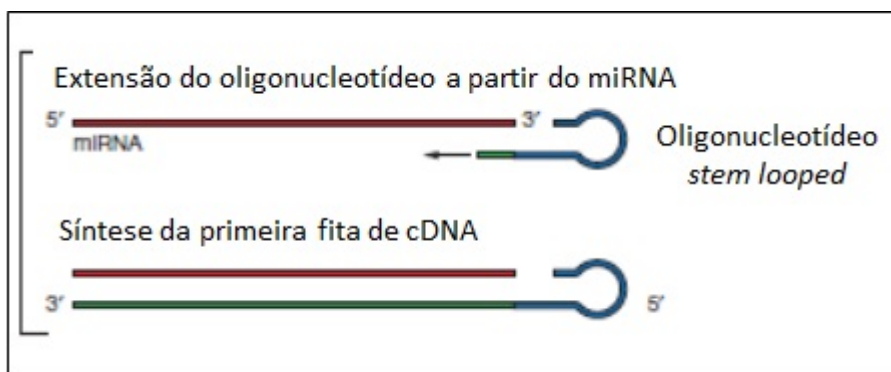
Fonte: NanoDrop® Technical Support Bulletin.

Figura 6 - Mensuração da concentração e pureza do RNA extraído através do Nanodrop ND3.0.

3.2.4 Determinação do perfil de expressão dos microRNAs

3.2.4.1 Síntese de cDNA total.

A síntese de DNA complementar (cDNA) total foi realizada de acordo com o protocolo *Megaplex™ Pools for microRNA Expression Analysis* (Applied Biosystems) que possibilita a detecção e quantificação de 380 miRNAs por amostra. Seguindo esse protocolo usamos o Megaplex RT Primers (Pool A) que consiste em um conjunto predefinido composto por 380 oligonucleotídeos *stem-looped reverse-transcription* (Figura 7) que são específicos para a síntese de cDNA a partir de miRNAs maduros.



Fonte: Adaptado de: *Megaplex™ Pools protocol*. Applied Biosystems®.

Figura 7 - Síntese de cDNA com oligonucleotídeos *Stem looped*.

Após o descongelamento e centrifugação rápida, foram adicionados alguns reagentes no tubo tipo eppendorf de 0,5 µl para constituir o mix de RT utilizando-se de capela de fluxo laminar, conforme mostra o Quadro 1.

Quadro 1 - Reagentes e quantidades necessárias para a reação de transcriptase reversa.

Mix para reação RT	Volume para uma amostra (µl)
Oligonucleotídeos Megaplex RT (10x)	0.8
dNTPs com dTTP (100mM)	0.2
Enzima <i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i> (50 U/µl)	1.5
Tampão RT 10X	0.8
MgCl ₂ (25mM)	0.9
Inibidor de RNase (20 U/µl)	0.1
Água livre de nucleasse	0.2
Total	4.5

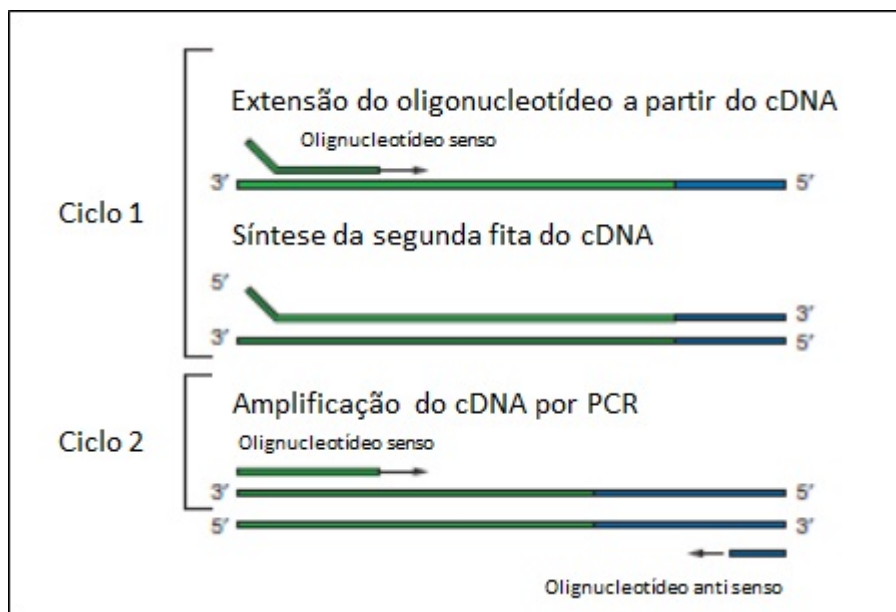
Os reagentes acima foram homogeneizados por inversão e centrifugados rapidamente. Foram então adicionados 4,5 µl do mix para RT com 3 µl de cada amostra (com concentração de 300 ng) em tubo de 0,2 µl. Nas amostras mais concentradas foi necessário adicionar água q.s.p. 3 µl, e para as amostras mais diluídas foi realizada secagem em centrífuga à vácuo até chegar na quantidade de 3 µl. Após a incubação por 5 min. em gelo, os tubos foram colocados em termociclador Veriti – 9700 Max Mode (Applied Biosystems) com as programações de temperatura e tempo descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de transcriptase reversa.

Estágio	Temperatura	Tempo
40 ciclos	16 °C	2 min
	42 °C	1 min
	50 °C	1 seg
Hold	85 °C	5 min
Hold	4 °C	∞

3.2.4.2 Pré-amplificação do cDNA total

Nessa etapa foi realizada a pré-amplificação específica do cDNA total (Figura 8) afim de aprimorar as análises das expressões de miRNAs realizadas posteriormente.



Fonte: Adaptado de: *Megaplex™ Pools protocol*. Applied Biosystems®.

Figura 8 - Reação de pré-amplificação.

Após descongelamento e centrifugação rápida, foram adicionados alguns reagentes, utilizando-se de capela de fluxo laminar, em tubo tipo eppendorf de 0,5 µl para constituir o Mix de pré-amplificação do cDNA total (Quadro 3).

Quadro 3 - Reagentes e quantidades necessárias para a reação de pré-amplificação do cDNA total.

Componentes do Mix para Reação de Pré-Amplificação	Volume para uma amostra (µl)
TaqMan PreAmp Master Mix (2x)	12.5
Oligonucleotídeos Megaplex PreAmp Pool A (10x)	2.5
Água livre de nuclease	7.5
Total	22.5

Os reagentes do Mix foram homogeneizados por inversão e centrifugados rapidamente. Foram adicionados em um tubo tipo eppendorf de 0,2 µL: 22,5 µl de mix e 2,5 µl de pool de cDNA de cada amostra. Após a incubação de 5 min. em gelo, os tubos foram colocados em termociclador Veriti – 9700 Max Mode (Applied Biosystems) com a programação visualizada no Quadro 4.

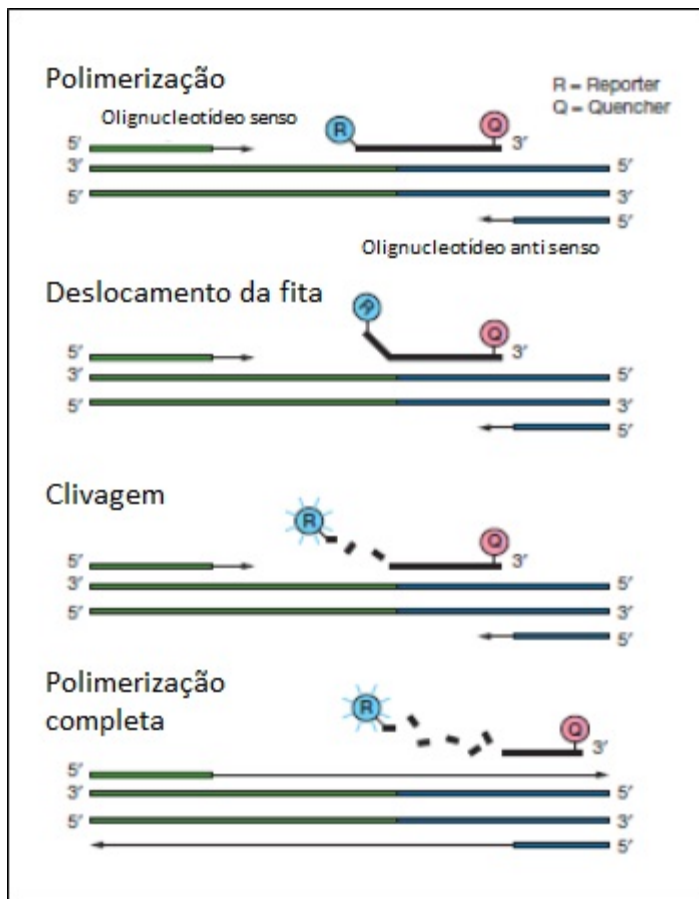
Quadro 4 - Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de pré-amplificação do cDNA total.

Estágio	Temperatura	Tempo
Hold	95 °C	10 min
Hold	55 °C	2 min
Hold	72 °C	2 min
12 ciclos	95 °C	15 seg
	60 °C	4 min
Hold	99,9 °C	10 min
Hold	4 °C	∞

O cDNA total pré-amplificado foi armazenado em freezer-20°C por no máximo uma semana.

3.2.4.3 TaqMan® Low Density Array (TLDA)

A reação para determinação dos perfis de expressão dos miRNAs foi realizada com a metodologia *TaqMan® Human MicroRNA Array*. Nessa etapa ocorreu a amplificação do *pool* de cDNA pré-amplificado através de oligonucleotídeos sequência-específicos e das sondas presentes na placa TLDA. As sondas hibridizam-se especificamente à sua sequência complementar, sendo que essa hibridização fica entre o local de ligação dos oligonucleotídeos *sense* e *antisense*. Cada sonda contém dois marcadores: o *reporter* (marcador fluorescente FAMTM) ligado na extremidade 5' e o *quencher* ligado na extremidade 3'. Como a sonda está intacta, a proximidade com o *quencher* faz com que o marcador *reporter* fique silenciado. Quando a DNA polimerase estende o oligonucleotídeo ligado à amostra de cDNA, ocorre a quebra da sonda hibridizada, separando o *quencher* do *reporter*, aumentando a fluorescência do *reporter*. O conjunto desses sinais fluorescentes gerados indica o nível de expressão dos miRNAs nas reações de PCR, detectando a presença do alvo em tempo real (Figura 9).



Fonte: Adaptado de: *Megaplex™ Pools protocol*. Applied Biosystems®.

Figura 9 - Atividade da enzima DNA polimerase.

Cada array (placa TLDA, *Pool A*) contém 377 miRNAs (funcionalmente definidos e amplamente expressos) e 7 controles. Os miRNAs avaliados estão indexados no Sanger miRBase v14 (disponível em: <http://www.mirbase.org/>).

Após colocar os reagentes e as amostras devidamente homogeneizados no gelo, foram adicionados os reagentes mostrados no Quadro 5 em tubo tipo eppendorf de 1,5 µl.

Quadro 5 - Reagentes e quantidades necessárias para a amplificação do cDNA total através da placa TLDA.

Reagentes	Volume para uma placa TLDA (μL)
TaqMan Universal PCR Master Mix, sem AmpErase com UNG, 2x	450
cDNA pré-amplificado (10x)	9
Água livre de nuclease	441
Total	900

O tubo contendo a solução descrita acima foi homogeneizado por inversão e centrifugado rapidamente para o carregamento da placa. Foram preenchidos todos os poços da placa TLDA através dos 8 canais de carregamento. Em seguida foi realizada centrifugação à 1200 rpm por 1 minuto, por duas vezes. Após selar a placa, ela foi inserida no aparelho 7900HT *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) para a realização da ciclagem descrita no Quadro 6.

Quadro 6 - Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de amplificação do cDNA total através da placa TLDA.

Estágio	Temperatura	Tempo
Hold	48 °C	30 min
Hold	95 °C	10 min
40 Ciclos	95 °C	15 seg
	60 °C	1 min

Os resultados foram analisados pelo *software RQ Manager 1.2* (Applied Biosystems). O nível de expressão dos miRNAs foi quantificado relativamente à expressão de um miRNA controle e também foi normalizado de acordo com um snRNA (*small nuclear RNA*) calibrador. O resultado final

(RQ ou fold) foi expresso como um aumento ou diminuição da expressão de um miRNA em n-vezes quando comparado ao controle e ao calibrador, da seguinte forma $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct$ é a diferença entre valor ΔCt do CG e do tecido gástrico normal – calibrador ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{miRNA \text{ Carcinoma gástrico}} - \Delta Ct_{snRNA \text{ calibrador}}$), e o ΔCt é a diferença entre o valor de Ct do CG e do controle ($\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{miRNA \text{ controle}}$). Foi utilizado como calibrador endógeno o snRNU6.

Dentre os miRNAs diferencialmente expressos obtidos a partir dos resultados com os experimentos em placa TLDA, foram selecionados 9 para as reações de validação. Os oligonucleotídeos sequência-específicos desses miRNAs e suas respectivas sondas, além do calibrador endógeno, estão descritos no Quadro 7.

Quadro 7 - Identificação dos oligonucleotídeos sequência-específicos utilizados e suas respectivas sondas.

Nome do assay	Assay ID (Applied Biosystems®)
hsa-miR-16-5p	000391
hsa-miR-22-3p	000398
hsa-miR-130a-3p	000454
hsa-miR-152-3p	000475
hsa-miR-214-3p	002306
hsa-miR-320a	002277
hsa-miR-532-3p	002355
hsa-miR-744-5p	002324
hsa-miR-451a	001141
U6-snRNA	001973

3.2.5 Validação da expressão dos miRNAs

3.2.5.1 Síntese do cDNA específico

A reação de síntese do cDNA específico para cada miRNA na etapa de validação foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados no manual *TaqMan[®] MicroRNA Assays* (Applied Biosystems). Foi realizada a pipetagem da quantidade necessária para 10 ng de RNA para todas as amostras e adicionado água q.s.p. 9,16 μ l. Para o mix de RT os reagentes foram descongelados e submetidos à centrifugação rápida antes de serem adicionados em tubo tipo eppendorf de 0,5 μ l, utilizando-se de capela de fluxo laminar, conforme as quantidades indicadas no Quadro 8.

Quadro 8 - Reagentes e quantidades necessárias para a reação de síntese de cDNA específico.

Mix para reação RT	Volume para uma amostra (μ l)
100mM dNTPs (with dTTP)	0,15
Enzima <i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i> (50 U/ μ l)	1,0
Tampão RT 10x	1,5
Inibidor de RNase (20 U/ μ l)	0,19
Oligonucleotídeo RT	3,0
Total	5,84

Em seguida foi adicionado em cada tubo contendo 9,16 μ l das amostras e água, 5,84 μ l de mix para reação RT, incubado 5 min. no gelo e colocado no termociclador seguindo as condições descritas no Quadro 9.

Quadro 9 - Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de síntese de cDNA específico.

Estágio	Temperatura	Tempo
Ciclos (1 ciclo)	16 °C	30'
	42 °C	30'
	85 °C	5'
Hold	4 °C	∞

As amostras de cDNA obtidas foram armazenadas em freezer - 20°C.

3.2.6 Reações de qRT-PCR

Para as reações de qRT-PCR os cDNAs foram descongelados, homogeneizados e colocados no gelo. Para a constituição do mix de PCR, os reagentes também foram descongelados e submetidos à centrifugação rápida. Foram então adicionados em tubo tipo eppendorf de 1,5 µl utilizando-se de capela de fluxo laminar, conforme as quantidades indicadas no Quadro 10.

Quadro 10 - Reagentes e quantidades necessárias para a reação de qRT-PCR.

Reagentes	Volume para um Array (placa)
TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase with UNG, 2x	10,0
cDNA sample (10x)	-
TaqMan Assay	1,0
Nuclease free-water	7,67
Total	18,67

Em seguida, a placa contendo 96 poços foi montada com a adição de 18,67 μ l de Master Mix e 1,33 μ l de cDNA, totalizando 20 μ l em cada poço.

Após a selagem e centrifugação da placa, a mesma foi inserida no aparelho 7900HT *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) para a realização da ciclagem descrita no Quadro 11.

Quadro 11 - Programação de temperaturas e tempos das ciclagens necessárias para a reação de qRT-PCR.

Estágio	Temperatura	Tempo
Hold	95 °C	10'
40 ciclos	95 °C	15''
	60 °C	60''

Os resultados das expressões dos miRNAs foram analisados utilizando-se o *software RQ Manager 1.2* (Applied Biosystems).

3.2.7 Análises Estatísticas

Para as análises das expressões diferenciais dos miRNAs foi utilizado o programa TMeV versão 4.4.1 (<http://www.tm4.org>), onde aplicou-se o teste estatístico paramétrico teste t, com 1000 permutações e p-value de 0,05. A identificação dos miRNAs diferencialmente expressos foi realizada em diferentes grupos formados de acordo com características clínico-patológicas: diferenciação tumoral (Pouco *versus* Moderado), classificação de Lauren (Difuso *versus* Intestinal), localização tumoral (Estômago *versus* Transição esôfagogástrica), metástase à distância (M1 *versus* M0), metástase linfonodal (N1-N3 *versus* N0), seguimento clínico (Óbito *versus*

Vivo) e % de tumor viável na peça operatória (100% *versus* 0%). Após a realização dos testes, foi calculado o *fold change*, onde os valores negativos significam miRNAs hiporregulados e os valores positivos miRNAs hiperregulados nos grupos supracitados. Com os miRNAs que apresentaram diferenças de expressões foi feito um cluster hierárquico com suporte – utilizando a métrica de distância de correlação de Pearson - complete linkage (TMeV) (SAEED et al. 2006). Nestas análises, pode-se visualizar se o padrão de expressão dos miRNAs (hipo ou hiperexpressos), possuem poder de separar um grupo de outro em cada comparação.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE OS PERFIS DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE miRNAS NOS CARCINOMAS GÁSTRICOS E NAS MUCOSAS GÁSTRICAS NORMAIS

As análises comparativas entre os perfis de expressão dos miRNAs dos CGs e da mucosa gástrica normal foram realizadas com as amostras do Grupo 1 (CG com tratamento cirúrgico) e do Grupo 3 (tecido gástrico normal).

Foram observados 109 miRNAs diferencialmente expressos. A maioria dos miRNAs estavam hipoexpressos nos CGs em relação ao tecido normal (Tabela 3), apenas 9 miRNAs estavam hiperexpressos nos CGs em relação ao grupo controle. A Figura 10 ilustra o dendograma gerado pelas análises supervisionadas dos miRNAs diferencialmente expressos nos CGs.

Tabela 3 - Valores médios de $\Delta\Delta Ct$ e fold change dos CGs na comparação da expressão dos miRNAs com as mucosas gástricas normais.

MiRNAs	$\Delta\Delta Ct$ Mucosa gástrica normal	$\Delta\Delta Ct$ Carcinoma gástrico	Fold 2	Valor de p
miR-375	-0,01	3,84	14,4	<0,001
RNU44	0,00	2,03	4,08	0,001
miR-532-5p	0,01	1,98	3,92	0,045
miR-148a	0,00	1,83	3,57	0,003
miR-99b	-0,01	1,39	2,64	0,027
miR-135a	0,00	1,25	2,37	0,003
miR-532-3p	0,00	1,16	2,24	0,023
miR-30c	-0,01	1,13	2,19	0,024
miR-495	0,00	0,87	1,84	0,031
miR-125a-5p	-0,01	-0,96	-1,94	0,045
miR-20a	0,00	-1,33	-2,52	0,047
let-7d	-0,01	-1,42	-2,67	0,017
miR-19b	-0,01	-1,43	-2,68	0,01
miR-19a	-0,01	-1,49	-2,81	0,017
miR-221	0,00	-1,54	-2,9	0,012
miR-140-5p	-0,01	-1,54	-2,9	0,022
miR-192	0,01	-1,61	-3,07	0,007
miR-185	0,00	-1,64	-3,12	0,009
miR-141	0,00	-1,65	-3,13	0,023
miR-20b	-0,01	-1,72	-3,27	0,009
let-7b	-0,01	-1,73	-3,31	0,017
miR-186	-0,01	-1,79	-3,43	0,004
miR-28-3p	-0,01	-1,80	-3,45	<0,001
miR-143	0,00	-1,81	-3,51	0,006
miR-25	-0,01	-1,86	-3,61	<0,001
miR-24	0,00	-1,92	-3,78	<0,001
miR-191	-0,01	-2,00	-3,98	<0,001
miR-548b-5p	0,67	-1,34	-4,02	0,034
miR-152	0,00	-2,04	-4,1	<0,001
miR-410	0,16	-1,89	-4,11	0,021
miR-93	0,00	-2,07	-4,2	0,001
miR-142-5p	-0,01	-2,10	-4,27	0,023
miR-218	-0,01	-2,14	-4,39	<0,001
miR-376a	0,00	-2,18	-4,55	0,002
miR-744	0,00	-2,19	-4,55	<0,001
miR-16	-0,01	-2,20	-4,57	<0,001
miR-134	0,00	-2,22	-4,67	0,01
miR-590-5p	-0,01	-2,24	-4,7	0,008
miR-18a	0,00	-2,25	-4,75	<0,001

Cont/Tabela 3

MiRNAs	$\Delta\Delta Ct$ Mucosa gástrica normal	$\Delta\Delta Ct$ Carcinoma gástrico	Fold [2]	Valor de p
miR-126	-0,01	-2,27	-4,8	<0,001
miR-492	0,03	-2,24	-4,82	0,029
miR-214	0,00	-2,33	-5,01	<0,001
miR-222	-0,01	-2,34	-5,04	<0,001
miR-18b	0,00	-2,35	-5,08	0,025
miR-339-3p	-0,01	-2,46	-5,49	<0,001
miR-27b	-0,01	-2,47	-5,52	<0,001
miR-301a	0,00	-2,48	-5,58	0,01
miR-548d-5p	0,39	-2,15	-5,8	0,043
miR-210	-0,01	-2,57	-5,89	0,002
miR-345	0,00	-2,58	-5,94	<0,001
miR-652	-0,01	-2,58	-5,96	<0,001
miR-324-5p	-0,01	-2,60	-6,04	<0,001
miR-518d-3p	-0,01	-2,62	-6,1	<0,001
miR-28-5p	-0,01	-2,64	-6,21	<0,001
miR-106a	-0,01	-2,64	-6,21	<0,001
miR-17	0,00	-2,65	-6,26	<0,001
miR-489	0,00	-2,66	-6,29	0,001
miR-671-3p	0,41	-2,27	-6,4	0,014
miR-106b	0,00	-2,71	-6,51	<0,001
miR-142-3p	0,00	-2,78	-6,88	<0,001
miR-886	0,02	-2,77	-6,88	<0,001
miR-146a	0,02	-2,76	-6,89	<0,001
miR-150	0,00	-2,80	-6,96	<0,001
miR-125b	0,00	-2,88	-7,33	<0,001
miR-324-3p	-0,01	-2,89	-7,38	<0,001
miR-301b	0,05	-2,86	-7,51	0,011
miR-29c	0,01	-2,95	-7,76	0,001
miR-672	0,01	-2,98	-7,97	0,003
miR-135b	0,09	-2,91	-7,99	0,046
miR-21	0,00	-3,02	-8,12	<0,001
miR-320	-0,01	-3,04	-8,18	<0,001
miR-223	-0,01	-3,05	-8,27	<0,001
miR-708	-0,01	-3,08	-8,43	<0,001
miR-373	0,22	-2,87	-8,47	0,008

Cont/Tabela 3

MiRNAs	$\Delta\Delta Ct$ Mucosa gástrica normal	$\Delta\Delta Ct$ Carcinoma gástrico	Fold [2]	Valor de p
miR-199a-3p	0,00	-3,09	-8,53	<0,001
miR-215	0,01	-3,08	-8,54	<0,001
miR-509-5p	0,18	-2,99	-9,01	0,018
miR-224	0,32	-2,88	-9,21	0,033
miR-331-3p	0,07	-3,20	-9,65	<0,001
miR-302a	0,19	-3,09	-9,75	0,033
miR-184	0,41	-3,02	-10,8	0,005
miR-181a	0,05	-3,40	-11	<0,001
miR-520f	0,54	-3,01	-11,7	0,006
miR-302c	0,00	-3,63	-12,3	0,003
miR-576-3p	0,02	-3,66	-12,8	0,003
miR-872	0,00	-3,70	-13	<0,001
miR-34a	0,00	-3,71	-13,1	<0,001
miR-29a	-0,01	-3,74	-13,3	<0,001
miR-155	-0,01	-3,75	-13,4	<0,001
miR-628-5p	0,00	-3,76	-13,6	<0,001
miR-454	0,00	-3,79	-13,8	<0,001
miR-520b	0,00	-3,79	-13,9	0,001
miR-483-5p	0,00	-3,85	-14,4	<0,001
miR-337-5p	0,52	-3,59	-17,2	0,023
miR-486	0,02	-4,16	-18,1	0,003
miR-374a	0,21	-3,98	-18,3	0,026
miR-523	0,00	-4,20	-18,4	<0,001
miR-331-5p	0,01	-4,21	-18,6	<0,001
miR-146b	0,00	-4,25	-19,1	<0,001
miR-27a	0,07	-4,35	-21,3	<0,001
miR-517b	0,01	-4,43	-21,7	<0,001
miR-618	0,00	-4,49	-22,4	<0,001
miR-29b	0,00	-4,53	-23,1	<0,001
let-7c	0,03	-4,51	-23,2	<0,001
miR-589	0,26	-4,48	-26,7	0,027
miR-202	0,00	-4,84	-28,6	<0,001
miR-494	0,00	-5,04	-33	<0,001
miR-518f	0,01	-5,22	-37,6	<0,001
miR-886	0,01	-5,45	-43,8	<0,001

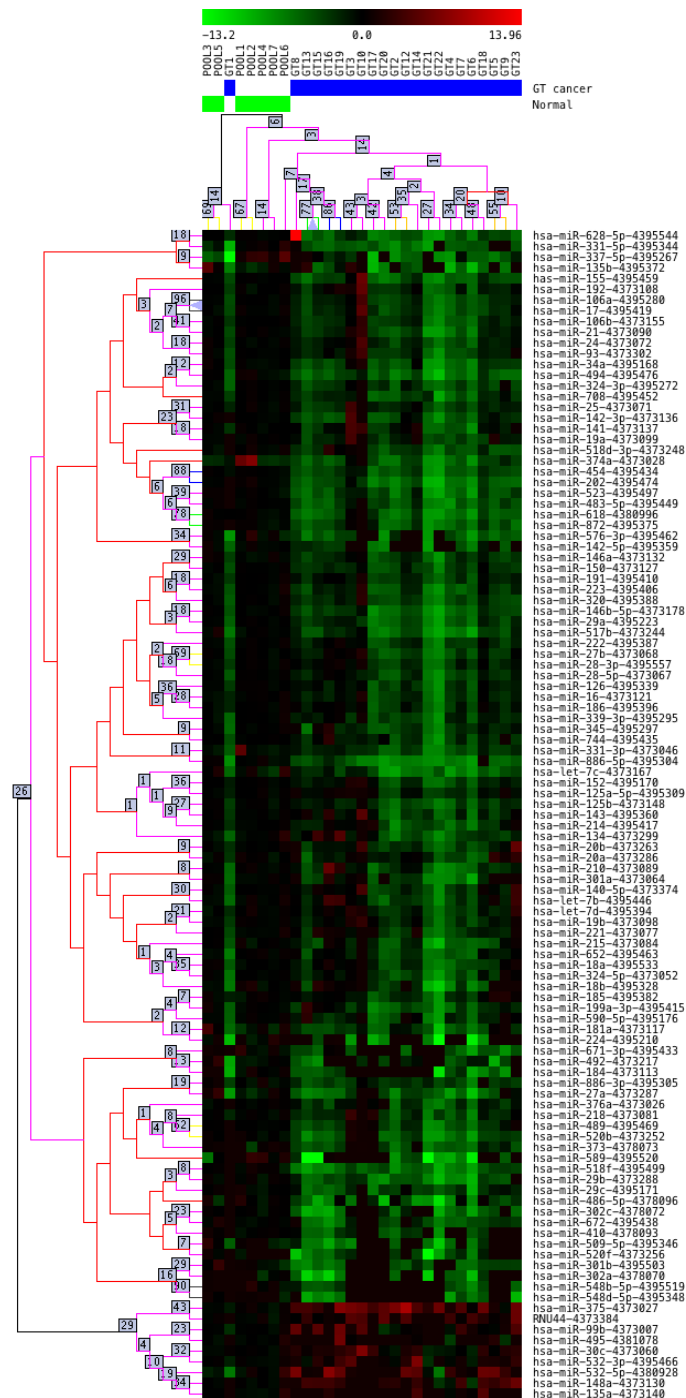


Figura 10 - *Heatmap* das expressões diferenciadas dos miRNAs dos CGs do Grupo 1 (tratamento cirúrgico) em comparação as expressões dos miRNAs das mucosas gástricas normais (Grupo 3). Os miRNAs estão representados nas linhas e as amostras nas colunas. As amostras do Grupo 1 estão agrupadas à direita da figura e as amostras do Grupo 3, à esquerda. Os valores utilizados foram os de $\Delta\Delta Ct$. A barra da expressão em cores está demonstrada acima, onde verde significa que o valor de expressão do miRNA foi mais baixo que a média de expressão dentre os grupos, e vermelho significa valor de expressão mais alto. Os quadrados numerados acima e na lateral esquerda representam o suporte (de 0% até 100%) entre os nós do heatmap.

4.2 ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E OS PERFIS DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE miRNAS NAS PLACAS TLDA

Foram realizadas as reações de qRT-PCR em placas TLDA com as 23 amostras de CGs do Grupo 1, 57 amostras de CGs do Grupo 2 e com o *pool* de amostras de mucosa gástrica normais do Grupo 3. Cinco amostras de CGs do Grupo 2 foram excluídas uma vez que não mostraram amplificações dos miRNAs utilizados como controles endógenos. Portanto, as análises comparativas dos perfis de expressão de miRNAs foram realizadas com as 76 amostras representadas por 23 amostras de CGs do Grupo 1, 52 amostras de CGs do Grupo 2 e o *pool* das amostras de mucosa gástrica normal do Grupo 3.

Para as análises comparativas dos dados clínico-patológicos com os perfis de expressão de miRNAs dos CGs, os dados clínico-patológicos dos 23 pacientes do Grupo 1 e dos 52 pacientes do Grupo 2 foram coletados e estão organizados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Características clínico-patológicas dos 23 pacientes com CG do Grupo 1.

Variáveis clínico-patológicas	n (%)
<u>Gênero</u>	
Feminino	4 (17,4)
Masculino	19 (82,6)
<u>Idade (anos)</u>	
≥ 65	13 (56,5)
< 65	10 (43,4)
<u>Classificação de Lauren</u>	
Difuso	10 (43,8)
Intestinal	10 (43,8)
Misto	3 (12,4)
<u>Diferenciação histológica</u>	
Pouco	13 (56,5)
Moderado	10 (43,5)
<u>Localização</u>	
TEG/Cárdia	8 (34,8)
Estômago	15 (65,2)
<u>Tamanho (cm)</u>	
≥ 5	17 (73,9)
< 5	6 (26,1)
<u>Metástase linfonodal</u>	
Ausente (N0)	1 (4,3)
Presente (N1-N3)	22 (95,7)
<u>Metástase à distância</u>	
Ausente (M0)	19 (82,6)
Presente (M1)	4 (17,4)
<u>Estadiamento Clínico</u>	
I-II	9 (39,1)
III-IV	14 (60,9)
<u>Margem cirúrgica</u>	
Livre	17 (73,9)
Comprometida	6 (26,1)
<u>Invasões vasculares ou perineurais</u>	
Ausente	9 (39,1)
Presente	14 (60,9)
<u>Status clínico em 60 meses</u>	
Vivo sem câncer	3 (13,0)
Vivo com câncer	5 (21,8)
Óbito pelo câncer	9 (39,1)
Óbito outras causas	6 (26,1)

TEG: transição esôfagogastrica

Tabela 5 - Características clínico-patológicas dos 52 pacientes com CG do Grupo 2.

Variáveis clínico-patológicas	n (%)
<u>Gênero</u>	
Feminino	20 (38,5)
Masculino	32 (61,5)
<u>Idade (anos)</u>	
≥ 65	12 (23,1)
< 65	40 (76,9)
<u>Classificação de Lauren</u>	
Difuso	23 (44,2)
Intestinal	25 (48,1)
Misto	4 (7,7)
<u>Diferenciação histológica</u>	
Pouco	27 (51,9)
Moderado	25 (48,1)
<u>Localização</u>	
TEG/Cárdia	16 (30,8)
Estômago	36 (69,2)
<u>Tamanho (cm)</u>	
≥ 5	28 (53,8)
< 5	24 (46,2)
<u>Metástase linfonodal</u>	
Ausente (N0)	28 (53,8)
Presente (N1-N3)	24 (46,2)
<u>Metástase à distância</u>	
Ausente (M0)	37 (71,2)
Presente (M1)	15 (28,8)
<u>Estadiamento Clínico</u>	
I-II	7 (13,5)
III-IV	45 (86,5)
<u>Margem cirúrgica</u>	
Livre	52 (100,0)
Comprometida	0 (0,0)
<u>Invasão (vascular ou perineural)</u>	
Ausente	25 (47,4)
Presente	27 (52,6)
<u>Resposta linfonodal pós QT</u>	
Ausente	23 (44,2)
Presente	29 (55,8)
<u>Necrose</u>	
Ausente	33 (63,5)
Presente	19 (36,5)

Cont/ Tabela 5

Variáveis clínico-patológicas	n (%)
<u>Fibrose</u>	
Presente	47 (87,7)
Ausente	5 (12,3)
<u>Infiltrado inflamatório</u>	
Ausente	12 (23,1)
Presente	40 (76,9)
<u>Seguimento</u>	
Vivo sem câncer	33 (63,5)
Vivo com câncer	13 (25,0)
Morte pelo câncer	6 (11,5)
<u>% de tumor viável</u>	
0%	4 (7,7)
0,1-25%	14 (26,9)
25,1%-50%	10 (19,2)
50,1%-75%	14 (26,9)
75,1%-99%	6 (11,6)
100%	4 (7,7)

TEG: transição esôfago-gástrica.

4.2.1 Perfil de expressão diferencial de miRNAs em relação aos dados clínico-patológicos dos pacientes com CGs tratados apenas cirurgicamente

Dentre todas as comparações realizadas entre as variáveis clínico-patológicas e o perfil de expressão diferencial de miRNA dos pacientes com CGs tratados apenas cirurgicamente, a única variável com diferença estatisticamente significativa foi o status clínico dos pacientes no seguimento por 60 meses. Conforme pode ser observado na Tabela 6, foram identificados 14 miRNAs hiporegulados nas amostras dos pacientes mortos pelo câncer em relação às amostras dos pacientes vivos sem câncer. A

Figura 11 mostra a distribuição das amostras desse subgrupo em relação aos miRNAs diferencialmente expressos.

Tabela 6 - Valores médios de $\Delta\Delta Ct$ e fold change dos miRNAs hipoexpressos no subgrupo de pacientes mortos pelo câncer em comparação aos pacientes vivos sem câncer no seguimento por 60 meses.

MiRNAs	$\Delta\Delta Ct$		Fold 2	Valor de p
	Vivos sem câncer	Mortos pelo câncer		
miR-106a	1.55	-0.57	-4.35	0,033
miR-152	2.89	2.46	-1.34	0,022
miR-28-5p	2.83	2.21	-1.54	0,038
miR-30b	2.30	1.56	-1.67	0,041
miR-30c	2.22	1.49	-1.66	0,049
miR-320	2.13	1.21	-1.89	0,013
miR-34a	2.50	1.32	-2.26	0,038
miR-494	2.65	2.08	-1.48	0,014
miR-221	3.43	2.66	-1.69	< 0,001
miR-532-3p	3.61	3.09	-1.43	0,022
miR-95	3.52	3.25	-1.20	0,025
miR-18b	3.86	3.09	-1.70	0,009
miR-224	4.04	3.47	-1.48	< 0,001
miR-519a	3.95	3.64	-1.24	< 0,001

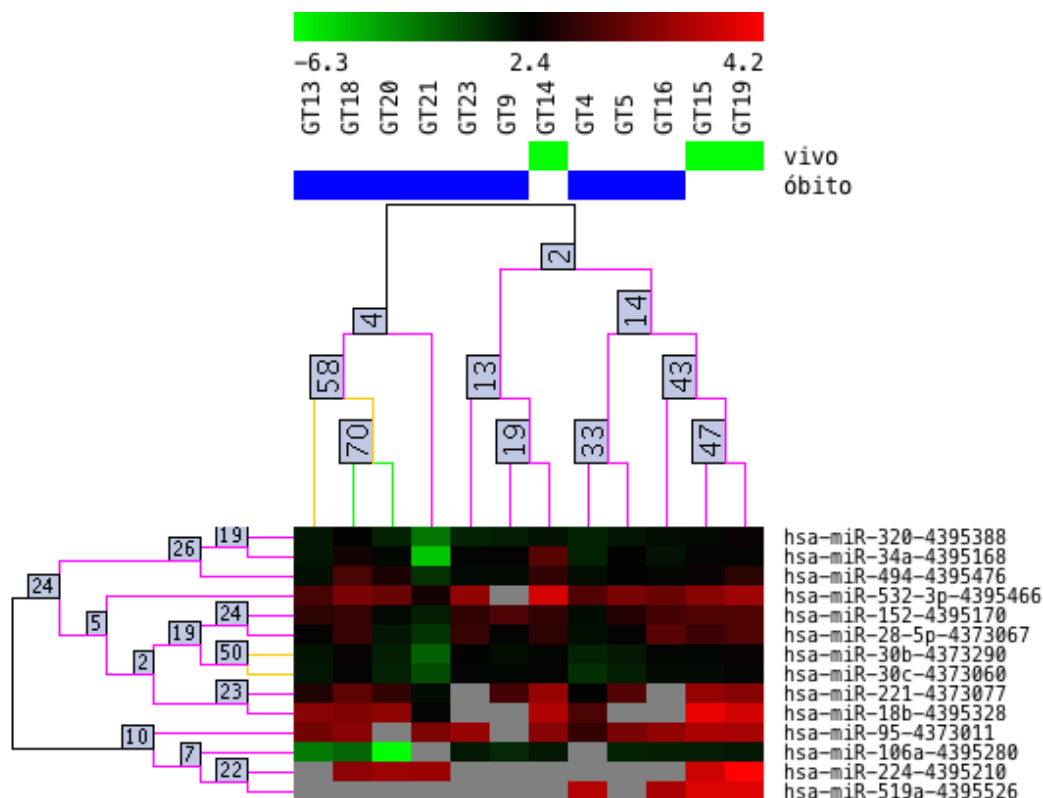


Figura 11 - Heatmap das expressões diferenciadas dos miRNAs dos CGs dos pacientes com óbito associado ao câncer em relação as expressões dos miRNAs dos CGs dos pacientes vivos sem câncer. Os miRNAs estão demonstrados nas linhas e as amostras nas colunas. Os valores utilizados foram os de $\Delta\Delta Ct$. A barra da expressão em cores está demonstrada acima, onde verde significa que o valor de expressão do miRNA foi mais baixo que a média de expressão dentre os grupos, e vermelho significa valor de expressão mais alto. Os quadrados numerados acima e na lateral esquerda representam o suporte (de 0% até 100%) entre os nós do heatmap.

4.2.2 Perfil de expressão diferencial de miRNAs em relação dados clínico-patológicos dos pacientes com CGs tratados com QT neoadjuvante seguido de cirurgia

Primeiramente, as comparações das expressões diferenciais dos miRNAs foram realizadas entre os grupos de CGs com diferentes porcentagens de células tumorais viáveis pós-tratamento neoadjuvante subagrupando as amostras de acordo com a % de células tumorais viáveis

da seguinte maneira: 0% *versus* (vs) 100%, 0%-25% vs 75%-100% e 0%-50% vs 51%-100% de tumor viável. Apenas o grupo 0% vs 100% de células tumorais viáveis apresentou perfil de expressão diferencial de miRNAs estatisticamente significativo. Foram identificados 9 miRNAs hiporregulados nas amostras com 100% em relação às amostras com 0% de célula tumoral viável (Tabela 7). Os 9 miRNAs foram agrupados hierarquicamente em relação às amostras, como pode ser visualizado na Figura 12.

Tabela 7 - Valores médios de $\Delta\Delta Ct$ e fold change dos miRNAs hipoexpressos nos CGs de pacientes com 100% de células tumorais viáveis em comparação aos CGs dos pacientes com 0% de célula tumoral viável.

MiRNAs	$\Delta\Delta Ct$ 0% tumor viável	$\Delta\Delta Ct$ 100% tumor viável	Fold 2	Valor de p
miR-532-3p	3,37	3,16	-1,16	0,019
miR-744	3,23	2,98	-1,19	0,024
miR-130a	3,77	3,49	-1,22	<0,001
miR-320	2,81	2,47	-1,26	<0,001
miR-22	3,35	2,99	-1,28	<0,001
miR-152	3,42	3,01	-1,32	0,005
miR-16	2,90	2,46	-1,35	0,006
miR-451	3,28	2,80	-1,40	0,006
miR-214	3,47	2,93	-1,45	<0,001

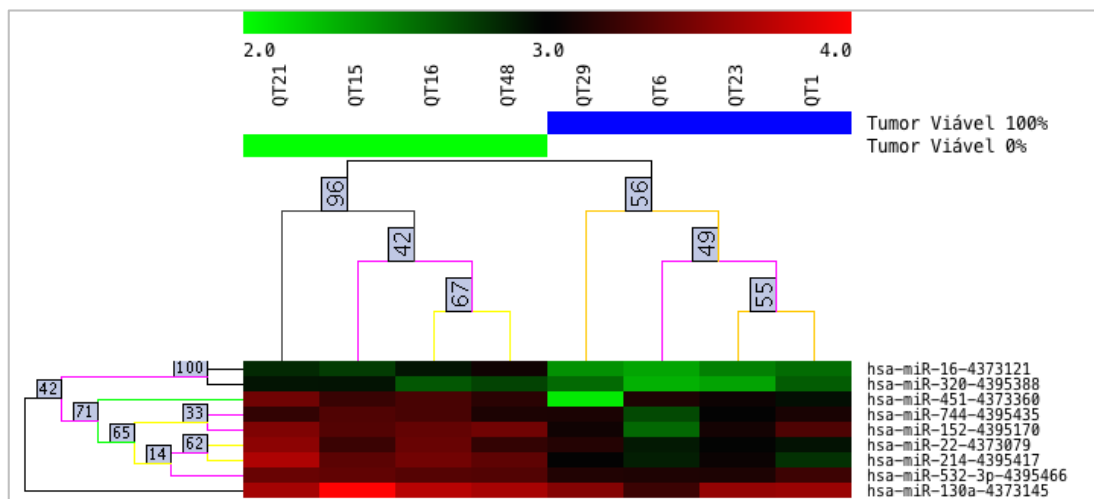


Figura 12 - *Heatmap* das expressões diferenciadas dos miRNAs dos CGs dos pacientes sem resposta patológica (100% de tumor viável) ao tratamento neoadjuvante em comparação aos CGs dos pacientes com resposta patológica completa (0% de tumor viável). Os miRNAs estão demonstrados nas linhas e as amostras nas colunas. Os valores utilizados foram os de $\Delta\Delta Ct$. A barra da expressão em cores está demonstrada acima, onde verde significa que o valor de expressão do miRNA foi mais baixo que a média de expressão dentre os grupos, e vermelho significa valor de expressão mais alto. Os quadrados numerados acima e na lateral esquerda representam o suporte (de 0% até 100%) entre os nós do heatmap.

As comparações dos perfis de expressão dos miRNAs dos CGs tratados com QT neoadjuvante seguida de cirurgia também foram realizadas entre os subtipos histológicos de CG conforme as classificações de Lauren e os graus de diferenciação histológica da OMS. Quanto aos graus de diferenciação histológica, as análises comparativas identificaram apenas o miR-379 hiperexpresso com fold change de 1,13 e $p = 0,033$ no subgrupo de pacientes com tumores moderadamente diferenciados em relação aos pouco diferenciados. Já conforme mostra a Tabela 8, foram identificados 3 miRNAs hiperexpressos (miR-494, miR-130b e miR-629) e 2 hipoexpressos (miR-451

e miR-495) no subgrupo de pacientes com carcinoma do tipo difuso em comparação aos carcinomas do tipo intestinal.

Tabela 8 - Valores médios de $\Delta\Delta Ct$ e fold change dos miRNAs diferencialmente expressos nos CGs do tipo difuso em comparação com aqueles de tipo intestinal de acordo com a classificação de Lauren.

MiRNAs	$\Delta\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	Fold 2	Valor de p
	Intestinal	Difuso		
miR-494	3,35	3,56	1,15	0,033
miR-451	3,27	2,90	-1,29	0,013
miR-130b	3,57	3,73	1,12	0,049
miR-495	3,82	3,71	-1,08	0,038
miR-629	3,78	4,12	1,27	0,035

Realizamos as análises comparativas entre o perfil de expressão dos miRNAs e a presença de metástases linfonodais. Foram identificados 4 miRNAs hipoexpressos (miR-22, miR-214, miR-337-5p e miR 133a) nos pacientes com metástases linfonodais (N1-N3) em relação aos pacientes sem metástases em linfonodos (N0). Estes dados podem ser vistos na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores médios de $\Delta\Delta Ct$ e fold change dos miRNAs hipoexpressos nos CGs com metástase linfonodal (N1-N3) versus sem comparação aos CGs sem metástase linfonodal (N0).

MiRNAs	$\Delta\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	Fold 2	Valor de p
	N0	N1-N3		
miR-22	3,24	3,11	-1,09	0,018
miR-214	3,31	3,05	-1,20	0,007
miR-337-5p	3,78	3,56	-1,17	0,031
miR-133a	3,77	3,64	-1,09	0,02

As análises dos perfis de expressão de miRNAs no subgrupo dos pacientes que não apresentaram metástases à distância em comparação com aqueles com metástases à distância, identificaram 3 miRNAs hipoexpressos (miR-126, miR-452 e miR-139-5p) nos CGs com metástases a distância. As informações detalhadas desses miRNAs podem ser visualizadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores médios de $\Delta\Delta Ct$ e fold change dos miRNAs hipoexpressos nos CGs com metástase à distância (M1) em comparação aos CGs sem metástase à distância (M0).

MiRNAs	$\Delta\Delta Ct$ M0	$\Delta\Delta Ct$ M1	Fold 2	Valor de p
miR-126	2,00	1,67	-1,26	0,045
miR-452	3,80	3,67	-1,10	0,02
miR-139-5p	3,74	3,60	-1,10	0,038

A localização do tumor no estômago é um dos fatores mais discutidos na área clínica por apresentar diferenças nas condutas terapêuticas. As análises comparativas entre os perfis de expressão dos miRNAs foram realizadas nos CGs localizados no estômago versus os CGs localizados na transição esofagogástrica (TEG)/cardia. Conforme mostra a Tabela 11, foram identificados 10 miRNAs hipoexpressos nos pacientes com tumor localizados na TEG em relação aos tumores localizados no estômago.

Tabela 11 - Valores médios de $\Delta\Delta Ct$ e fold change dos miRNAs hipoexpressos nos CGs localizados na região TEG em comparação aos CGs localizados nas demais regiões do estômago.

MiRNAs	$\Delta\Delta Ct$ Estômago	$\Delta\Delta Ct$ TEG	Fold 2	Valor de p
miR-454	3,02	2,84	-0,88	0,024
miR-429	3,39	3,14	-0,84	<0,001
miR-196b	3,51	3,28	-0,85	0,031
let-7c	3,60	3,41	-0,87	0,006
miR-9	3,55	3,17	-0,77	0,019
miR-501-5p	3,79	3,46	-0,80	0,024
miR-361-5p	4,01	3,79	-0,86	0,017
miR-590-5p	3,84	3,62	-0,86	0,042
miR-505	3,93	3,72	-0,87	0,015
miR-107	4,05	3,85	-0,87	0,011

As comparações dos perfis de expressão dos miRNAs foram também realizadas entre os subgrupos de pacientes que evoluíram com óbito ou estavam vivos após 60 meses de seguimento clínico. Apenas o miR-139-5p foi identificado como hipoexpresso nos pacientes que morreram devido à doença em relação aos pacientes vivos sem câncer, com valor de fold change de -2,35 e valor de p = 0,03.

4.3 VALIDAÇÃO DOS PERFIS DE EXPRESSÕES DIFERENCIAIS DOS miRNAs NOS CGs

O principal resultado das análises dos perfis de expressões diferenciais dos miRNAs nos CGs tratados com QT neoadjuvante seguido de cirurgia foi a identificação de miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com CGs que foram a óbito em relação aqueles que estavam vivos, sem doença, após o seguimento de 60 meses. Nos CGs deste grupo, foram encontradas diferenças no perfil de expressão dos miRNAs nos CGs com resposta

patológica completa (0% de célula tumoral viável) em relação aos CGs sem resposta patológica (100% de células tumorais viáveis). Para a validação destes resultados, novas amostras de CGs foram incluídas. No Grupo de CGs tratados exclusivamente com cirurgia foram adicionadas 18 novas amostras de CGs, sendo 9 amostras de pacientes vivos sem doença e 9 amostras de pacientes com CGs que evoluíram para óbito em até 60 meses de seguimento. A casuística final utilizada para a validação dos resultados neste Grupo de CGs foi composta por 30 pacientes, sendo 12 amostras de pacientes vivos sem doença e 18 amostras de pacientes mortos pela doença.

No grupo dos pacientes com CGs tratados com QT neoadjuvante seguida de cirurgia, foram incluídas 8 novas amostras de CGs com 0% de célula tumoral viável e apenas 2 novas amostras com 100% de células tumorais viáveis. Com o intuito de aumentar o número de casos de ambos os subgrupos decidimos incluir 3 amostras de CGs com 1% de células tumorais viáveis e 7 amostras de CGs com mais de 90% de células tumorais viáveis. Portanto o número total de casos deste grupo utilizados para a validação dos resultados foi de 28 CGs, distribuídos de acordo com a porcentagem de células tumorais viáveis (Tabela 12).

Tabela 12 - Distribuição dos CGs de pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante de acordo com a porcentagem de células tumorais viáveis remanescentes observadas na análise do leito tumoral após o tratamento.

Grupo 2 – Tratamento Neoadjuvante	n=28 (%)
0% célula tumoral viável	12 (26,3)
1% célula tumoral viável	3 (7,9)
> 90% células tumorais viáveis	7 (18,4)
100% células tumorais viáveis	6 (13,2)

4.3.1 Validação dos perfis de miRNAs diferencialmente expressos nos CGs dos pacientes vivos e sem câncer em comparação aos pacientes mortos pelo câncer no grupo de pacientes tratados apenas cirurgicamente

Após uma triagem dos resultados obtidos com as placas TLDA, 3 miRNAs foram escolhidos para a etapa de validação: miR-152, miR-320 e miR-532. A escolha destes microRNAs diferencialmente expressos para validação foi feita após a pesquisa na literatura das vias de metabolização e resposta aos quimioterápicos associadas diretamente a estes miRNAs. Outro dado importante para esta escolha foi que estes mesmos 3 miRNAs também estão hiporregulados nas amostras dos pacientes do Grupo tratados com Qt neoadjuvante seguida de cirurgia com CGs que apresentavam 100% de células tumorais viáveis após o tratamento neoadjuvante, justamente nos dois grupos que indicam ausência de resposta aos tratamentos submetidos.

Como pode ser observado na Figura 13, apesar dos 3 miRNAs apresentarem uma tendência de hiporregulação nas amostras dos CGs dos pacientes mortos pelo câncer em relação às amostras de CGs dos pacientes

vivos e sem câncer, estes resultados não foram estatisticamente significativos.

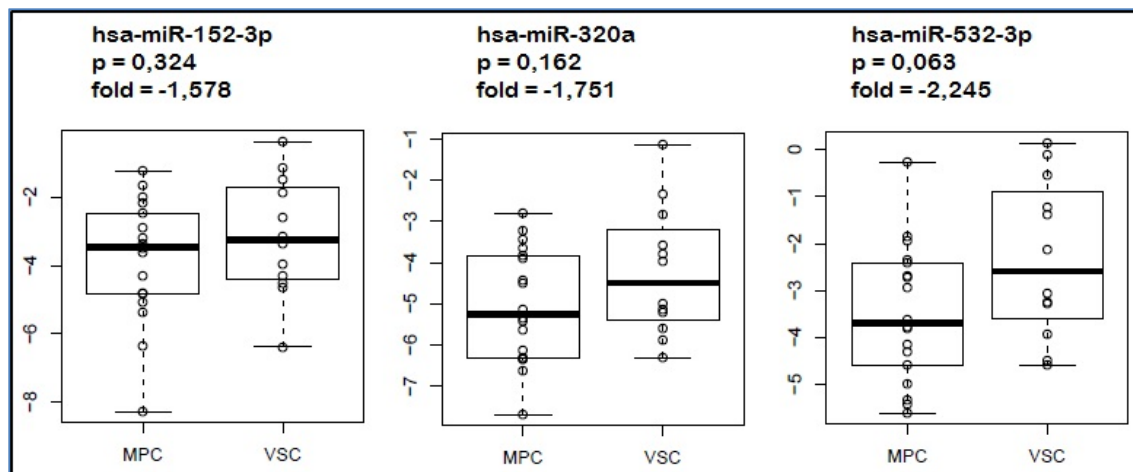


Figura 13 - Gráficos representado por boxplots mostrando os miRNAs diferencialmente expressos nos CGs dos pacientes mortos pelo câncer em relação aos CGs dos pacientes vivos e sem câncer. Os gráficos mostram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as expressões dos microRNAs e os grupos de CGs. MPC = Mortos pelo câncer, VSC = Vivos e sem câncer.

4.3.2 Validação dos perfis de miRNAs diferencialmente expressos em relação ao grau de resposta tumoral à terapia neoadjuvante nos CGs dos pacientes tratados com QT neoadjuvante seguida de cirurgia

Primeiramente realizamos uma análise para observar o nível de expressão dos 9 miRNAs nas amostras com diferentes porcentagens de células tumorais viáveis (0%, 1%, <90% e 100%) presentes na peça cirúrgica após o tratamento neoadjuvante (Figura 14). Com essa análise observamos que a expressão dos miRNAs das amostras com 1% de células tumorais viáveis era mais próximo do nível de expressão das amostras com 90% e 100% do que das amostras com 0% de célula tumoral viável. Foi

observado também que não houve diferença estatisticamente significativa entre o nível de expressão dos miRNAs nas amostras com 90% em relação às amostras com 100% de células tumorais viáveis ($p > 0,05$). Por esse motivo foi decidido excluir as amostras com 1% de células tumorais viáveis das próximas análises.

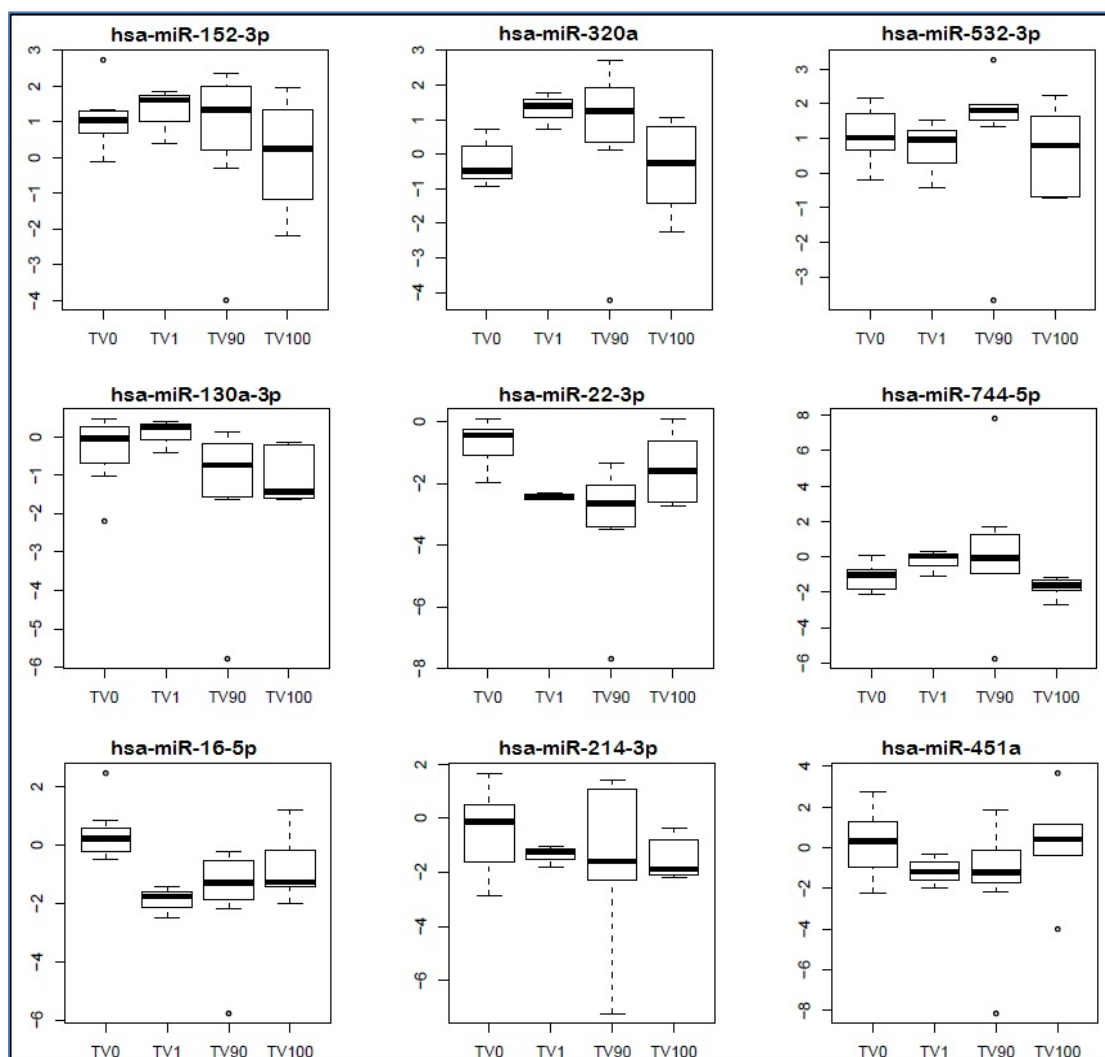


Figura 14 - Gráficos de boxplot com as expressões diferenciadas dos miRNAs dos CGs dos pacientes que fizeram tratamento neoadjuvante em relação aos diferentes graus de resposta patológica determinado pelas porcentagens de células tumorais viáveis remanescentes. Os gráficos mostram que não houveram diferenças estatisticamente significativas entre as expressões dos microRNAs na comparação entre as amostras com 90% e 100% de células tumorais viáveis. Também houve semelhanças nos níveis de expressões das amostras com 1% de células tumorais viáveis e os outros grupos de tumores. TV0 = 0% de células tumorais viáveis, TV1 = 1% de células tumorais viáveis, TV90 = 90% de células tumorais viáveis, TV100 = 100% de células tumorais viáveis.

4.3.2.1 miRNAs diferencialmente expressos nos CGs dos pacientes com 0% de célula tumoral viável em comparação aos CGs dos pacientes com 100% de células tumorais viáveis

A comparação dos níveis de expressões dos miRNAs entre as amostras com 0% de célula tumoral viável e as amostras com 100% de células tumorais viáveis nas peças cirúrgicas pós tratamento neoadjuvante evidenciou a hipoexpressão do miR-16 nas amostra com 100% de células tumorais viáveis ($p = 0,04$ e $fold\ change = -2,21$). A Figura 15 mostra o Boxplot dessas comparações.

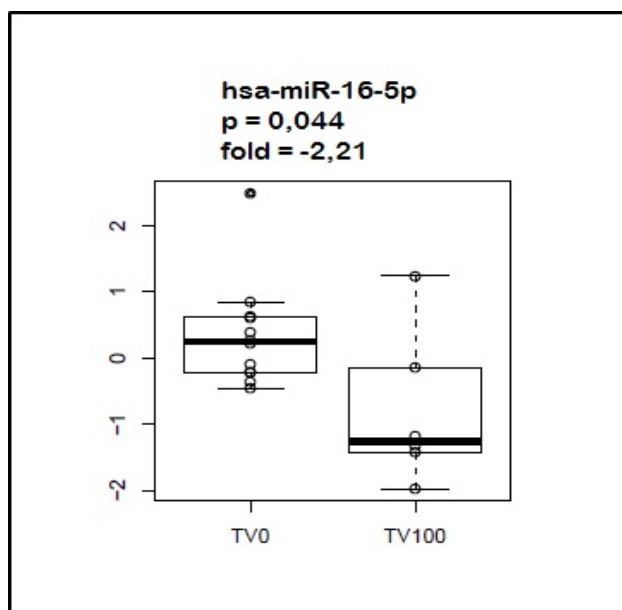


Figura 15 - Gráfico de boxplot das comparações das expressões diferenciadas do miRNA-16 entre as amostras de CGs com 0% de células tumorais viáveis e dos CGs com 100% de células tumorais viáveis pós tratamento neoadjuvante. O miR-16 apresentou-se hiporregulado nas amostras de CGs com 100% de células tumorais viáveis. TV0 = 0% de células tumorais viáveis, TV100 = 100% de células tumorais viáveis.

4.3.2.2 miRNAs diferencialmente expressos nos CGs dos pacientes com 0% de célula tumoral viável em comparação aos CGs dos pacientes com 90% a 100% de células tumorais viáveis

Nas análises de validação utilizando os assays individuais dos 9 miRNAs diferencialmente expressos encontrados na comparação dos níveis de expressão dos miRNAs entre as amostras com 0% de célula tumoral viável e os CGs com 90% a 100% de células tumorais viáveis demonstrou resultados estatisticamente significativos nas expressões de 3 miRNAs: miR-16 ($p < 0,001$ e *fold change* = -3,11), miR-22 ($p = 0,001$ e *fold change* = -3,41) e miR-130a ($p = 0,035$ e *fold change* = -1,98). Os 3 miRNAs apresentaram-se hiporregulados nas amostras com 90% a 100% de células tumorais viáveis (Figura 16).

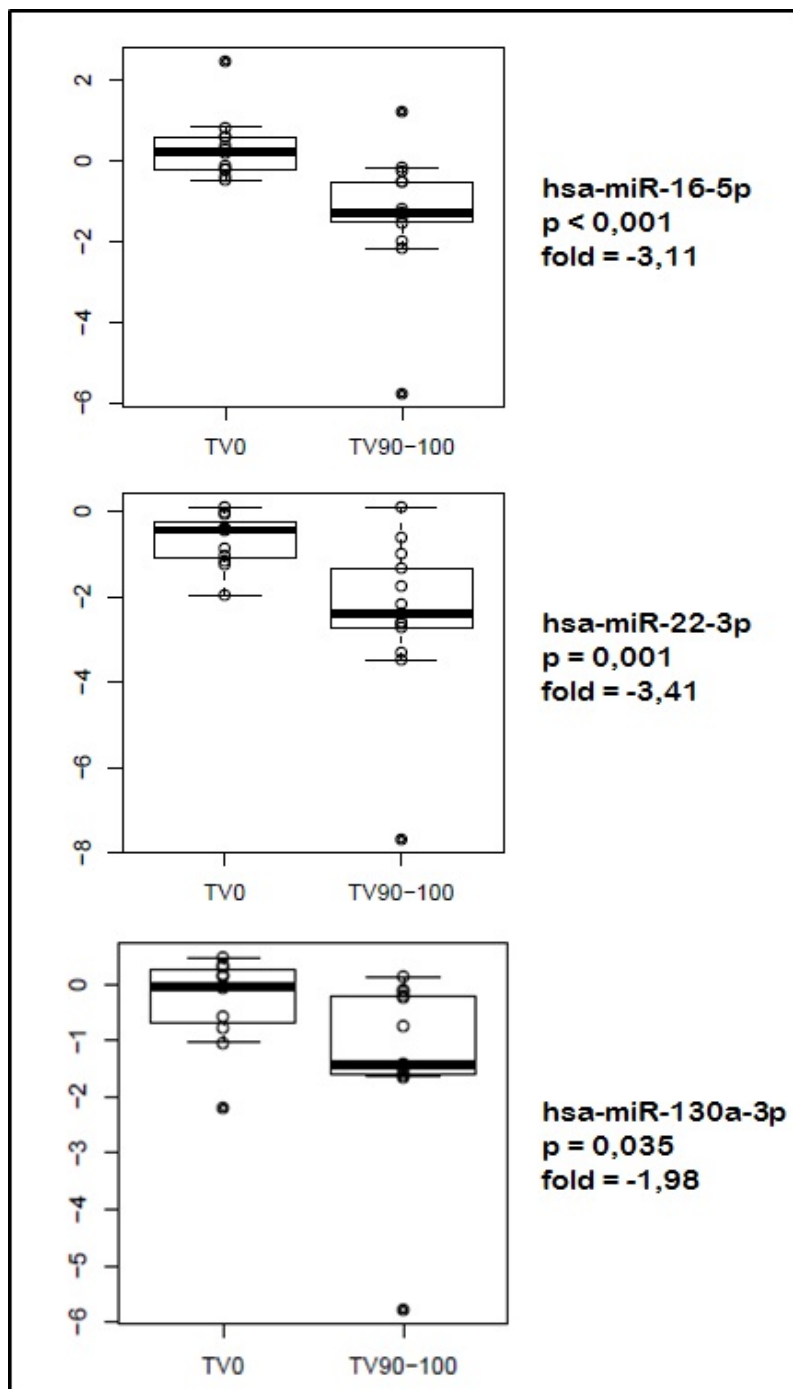
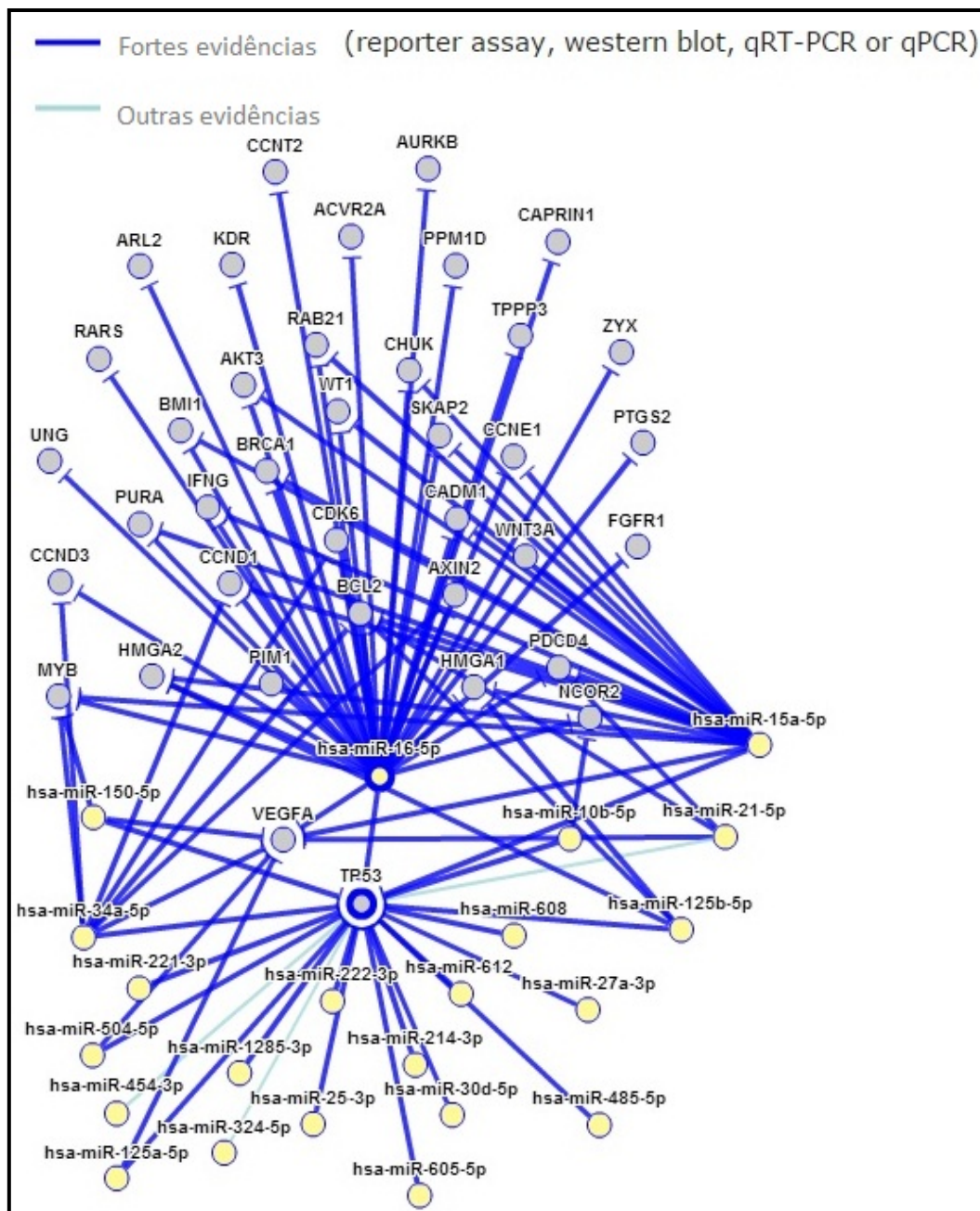


Figura 16 - Gráficos de boxplot das comparações das expressões diferenciadas dos miRNAs entre as amostras de CGs com 0% de células tumorais viáveis e dos CGs com 90% a 100% de células tumorais viáveis pós tratamento neoadjuvante. Os 3 miRNAs estavam hiporegulados nas amostras de CGs com 90% a 100% de células tumorais viáveis. TV0 = 0% de células tumorais viáveis, TV90-100 = 90% até 100% de células tumorais viáveis.

4.4 REDE DE INTERAÇÃO ENTRE OS miRNAS VALIDADOS E SEUS PRINCIPAIS ALVOS MOLECULARES

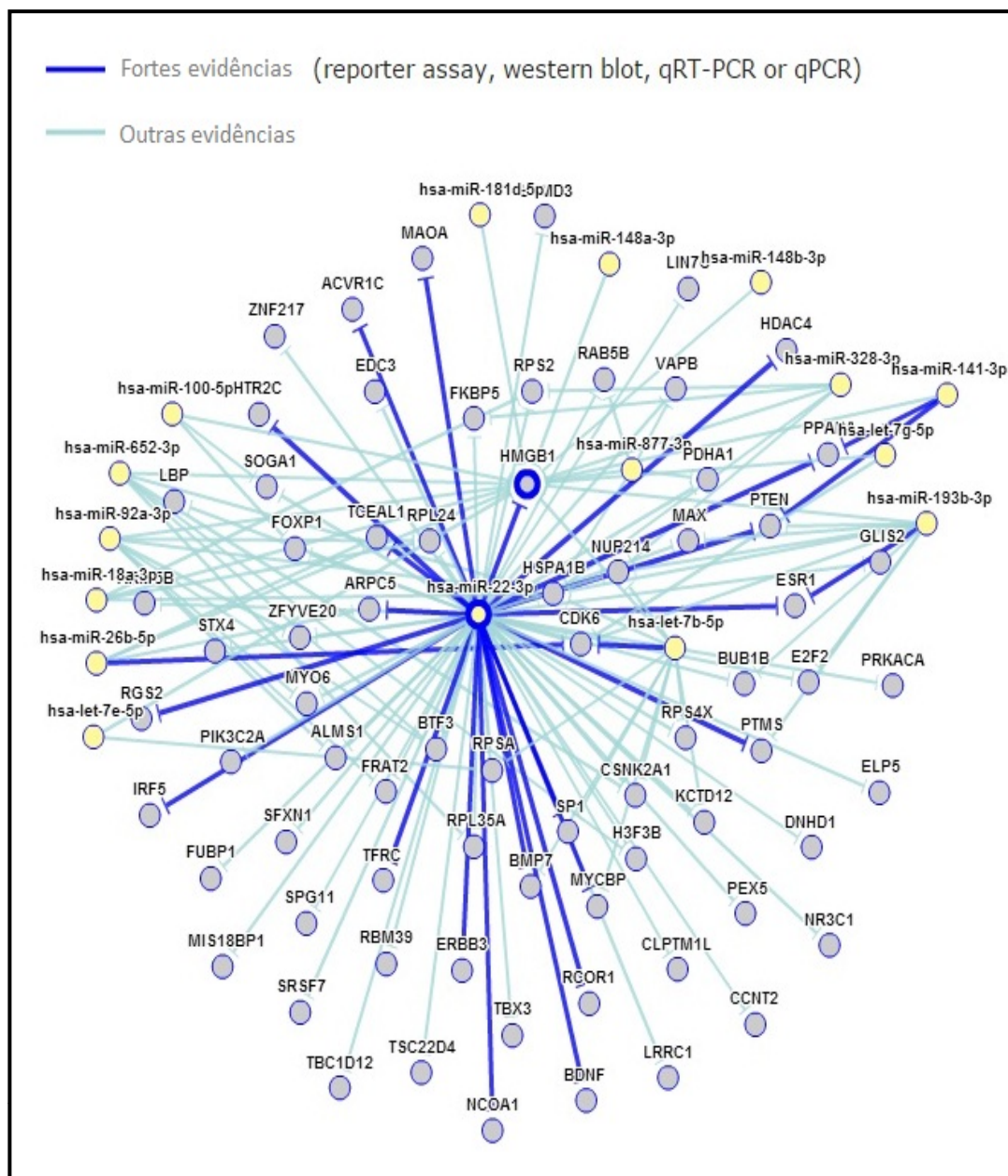
A pesquisa dos principais mecanismos moleculares e genes regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos em relação aos graus de resposta patológica nos CGs foi feita de duas maneiras: 1. através da pesquisa bibliográfica dos estudos previamente publicados na literatura nos quais os genes relacionados aos miRNAs foram validados experimentalmente e, 2. através da plataforma disponível no site miRTarBase (<http://www.mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>) procurando por genes alvos preditos.

Como pode ser observado nas Figuras 17, 18 e 19 a rede de interação entre os miRNAs e seus alvos. Observa-se que esta interação é extremamente complexa pois envolve muitas moléculas associadas aos processos de inibição da expressão dos RNAs direta e indiretamente. Mas mesmo diante deste cenário complexo podemos destacar a interação dos miRNAs hipoexpressos nos casos de CG com pouca ou nenhuma resposta ao tratamento neoadjuvante com RNAs de genes que são relacionados à baixa resposta à quimioterapia como o BCL 2, Ciclina D1 (CCND1), TP53, PTEN, HMGB1, CDK6, XIAP e MET.



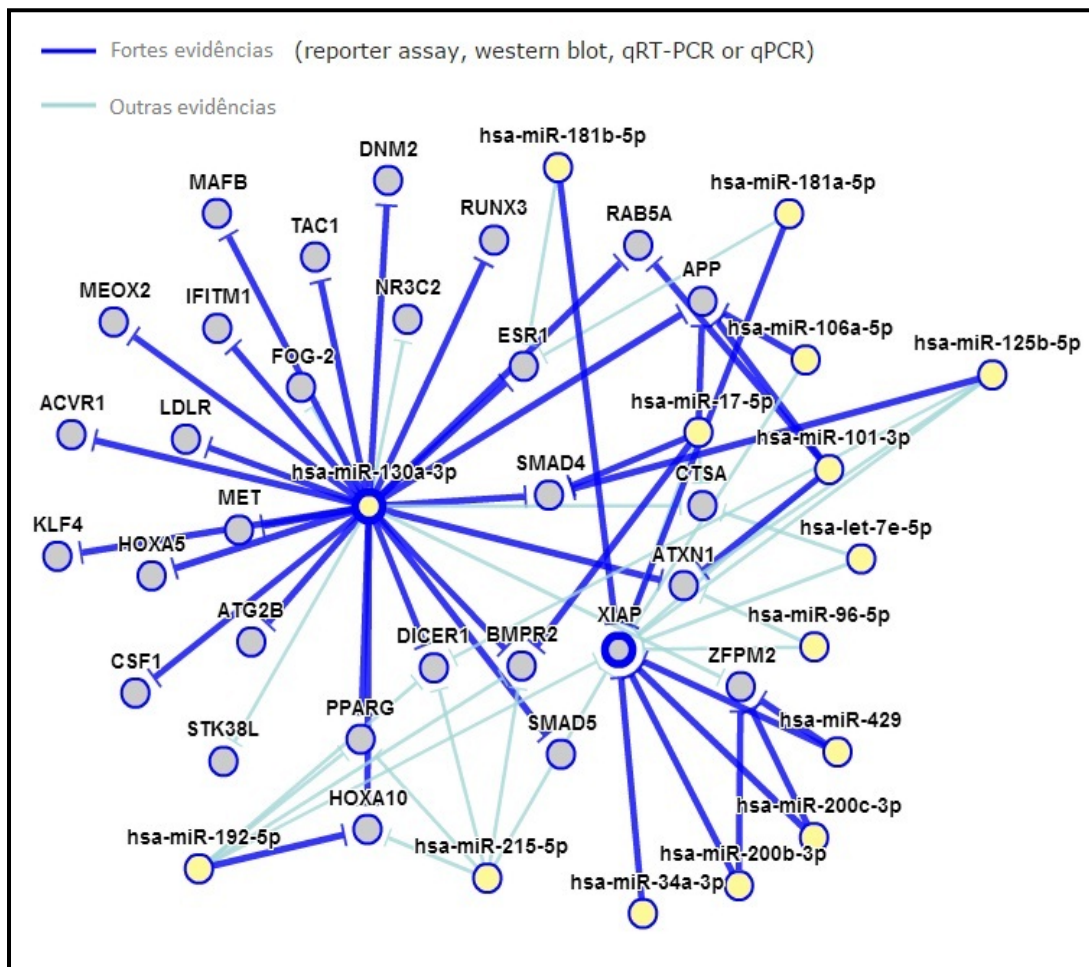
Fonte: Adaptado de: <http://www.mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>

Figura 17 - Rede de interação do miR-16 com seus alvos. O miR-16 está representado mais ao centro da figura (hsa-miR-16-5p). As linhas azuis escuro representam interações comprovadas por experimentos mais robustos, enquanto que as linhas azuis clara representam interações comprovadas por experimentos menos robustos.



Fonte: Adaptado de: <http://www.mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>

Figura 18 - Rede de interação do miR-22 com seus alvos. O miR-22 está representado mais ao centro da figura (hsa-miR-22-3p). As linhas azuis escuro representam interações comprovadas por experimentos mais robustos, enquanto que as linhas azuis clara representam interações comprovadas por experimentos menos robustos.



Fonte: Adaptado de: <http://www.mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>

Figura 19 - Rede de interação do miR-130a com seus alvos. O miR-130a está representado mais ao centro da figura (hsa-miR-130a-3p). As linhas azuis escuro representam interações comprovadas por experimentos mais robustos, enquanto que as linhas azuis clara representam interações comprovadas por experimentos menos robustos.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi realizada de forma retrospectiva uma pesquisa para avaliar a diferença de expressão de miRNAs entre as amostras parafinadas de CG de pacientes respondedores ou não respondedores aos esquemas de quimioterapia neoadjuvante utilizados atualmente. Paralelamente também foram realizadas as análises das expressões dos miRNAs em CG de pacientes tratados exclusivamente com cirurgia, esquema de tratamento comumente utilizado antes dos estudos dos benefícios advindos do uso das terapias neoadjuvantes.

A quimioterapia neoadjuvante tornou-se a principal opção terapêutica no tratamento dos CGs localmente avançados em muitos centros especializados em tratamento oncológico. A exposição do quimioterápico ao tecido tumoral alvo antes do procedimento cirúrgico apresenta grandes vantagens como a melhor absorção e distribuição dos medicamentos por via vascular, uma vez que a vasculatura ainda está preservada e a drenagem vascular é mais eficiente, e também por contribuir para a queda do estadiamento do tumor, proporcionando diminuição da massa tumoral, permitindo assim a ressecção cirúrgica deste. A exposição das células tumorais às drogas utilizadas na QT pré-operatória permite testar a quimiosensibilidade tumoral associado ao efeito citotóxico da medicação. Além disso, os pacientes toleram mais os efeitos citotóxicos relacionados ao tratamento antes da cirurgia do que no período pós-cirúrgico. Entretanto, a

falta de resposta tumoral às terapias neoadjuvantes pode atrasar a realização da cirurgia e a toxicidade induzida pela quimioterapia pode aumentar as complicações pós-cirúrgicas dos pacientes (LI et al. 2010). Diante destas situações, a determinação de fatores capazes de prever a resposta tumoral ao pré-tratamento pode poupar os pacientes pouco respondedores de serem expostos a tratamentos agressivos dos quais eles não se beneficiariam. Até o momento, não existem metodologias diagnósticas não invasíveis capazes de determinar o grau de resposta ou a regressão tumoral completa clínica ou patológica durante ou após o tratamento. Por isso muitos marcadores moleculares têm sido estudados com o intuito de determinar marcadores preditivos de resposta terapêutica nos CGs (KHEIRELSEID et al. 2013). Uma vez que as técnicas de histopatologia disponíveis não conseguem identificar os pacientes com CG que responderão ao tratamento neoadjuvante, as análises das expressões dos miRNAs tumorais podem aumentar as chances de sucesso desta seleção.

Os miRNAs exercem funções importantes em diversos processos biológicos normais como diferenciação celular e estabilização fenotípica. Além disso, essas moléculas estão envolvidas nos mecanismos de crescimento tumoral e de resposta à quimioterapia. A extensão do envolvimento dos miRNAs nos processos de resistência à drogas ainda não está totalmente elucidado, mas estudos prévios identificaram RNAs mensageiros alvos de miRNAs que estão envolvidos nos mecanismos de

sensibilização e resistência, sugerindo que novos alvos terapêuticos possam representar novas opções de tratamento (POULIOT et al. 2012).

Neste estudo encontramos 9 miRNAs (miR-16, miR-22, miR-130, miR-152, miR-214, miR-320a, miR-532, miR-744 e miR-451) hipoexpressos nos CGs dos pacientes sem resposta tumoral à terapia e, após pesquisas na literatura observamos que vários destes miRNAs estão associados às vias moleculares de apoptose, crescimento tumoral e metabolismo de drogas (BRONISZ et al. 2011; TIAN et al. 2011; SUKAWA et al. 2014). Vale ressaltar que um dos parâmetros utilizados para avaliar a eficácia da terapia neoadjuvante é através das análises das respostas histológicas, através da determinação da porcentagem de células tumorais viáveis remanescentes na peça tumoral examinada pós-tratamento (MANSOUR et al. 2007). Neste estudo, apesar do pequeno número de casos estudados, as análises estatísticas identificaram a expressão diferencial de alguns miRNAs. Estes dados permitiram identificar subgrupos de CGs com grau de resposta distinto em relação às expressões destes miRNAs.

Dados prévios descritos na literatura mostram que vários miRNAs hiporegulados nas amostras do nosso estudo, estão de alguma forma envolvidos em processos moleculares que resultaram em resistência celular aos quimioterápicos. Tem sido demonstrado que em alguns pacientes com CG, a falta de adesão à terapia está ligada à resistência à múltiplas drogas (MDR) que acontece de forma intrínseca ou adquirida após o ciclo inicial de tratamento quimioterápico. Inicialmente, acreditava-se que a MDR resultava de alterações moleculares que inibiam a interação entre o fármaco e seu

receptor, representada pela super expressão de bombas de efluxo de drogas como a P-glicoproteína (P-gp, produto do gene MDR1) ou de detoxificadores intracelulares como os antioxidantes (como por exemplo, a glutathione). Mais recentemente, outros fatores que atuam mais abaixo na via de processamento dos fármacos têm sido apontados como importantes papéis no desenvolvimento de MDR, tais como o aumento da atividade dos genes de reparo do DNA, alteração dos pontos de checagem do ciclo celular, aumento no metabolismo de drogas, defeitos na via apoptótica, entre outros. Os mecanismos de MDR em CG têm sido muito estudados, mas ainda não estão muito caracterizados. Evidências sugerem que os mecanismos responsáveis pela MDR em CG são multifacetados e extremamente interligados (XIA et al. 2008; WANG et al. 2013).

Os estudos realizados em linhagem de células de carcinomas gástricos e resistentes à quimioterápicos mostraram a presença de mecanismos de defesa celular que resultam em um fenótipo altamente complexo que confere resistência por reduzir a apoptose, hiper-regular os mecanismos de reparo à dano no DNA, alterando *checkpoints* do ciclo celular, e desregulação da montagem do citoesqueleto. Essas alterações resultam no redirecionamento dos transportadores de fármacos para longe da superfície celular (POULIOT et al. 2012).

Semelhante aos nossos resultados, a desregulação do miR-16 foi demonstrada em outros estudos com tumores malignos, sendo este miRNA descrito como supressor tumoral e consistentemente hiporregulado nas

células de leucemia linfocítica crônica, câncer de pulmão não pequenas células, adenomas pituitários e CG (MA et al. 2013).

Já em relação aos trabalhos semelhantes ao presente estudo, um dos estudos encontrados é o de XIA et al. (2008), no qual foram utilizadas células de CG moduladas para serem MDR. Neste estudo, foi demonstrado que o miR-16 sob a condição específica de resistência estava hiporregulado e concluíram que a modulação da expressão desse miRNA pode alterar a sensibilidade dessas células aos fármacos quimioterápicos. Eles ainda demonstraram que o miR-16 regula diretamente a expressão da proteína BCL-2 que é conhecida como reguladora da via mitocondrial da apoptose. Sendo assim, o miR-16 regulando a expressão de BCL-2 pode modular a suscetibilidade das células tumorais à apoptose induzida pela quimioterapia. KIM et al. (2011a) avaliaram a resposta tumoral dos CGs tratados com quimioterapia de acordo com o tempo de progressão tumoral e identificaram o miR-16 hiperregulado nos CGs quimiossensíveis.

Outros estudos prévios também mostraram resultados que associaram a expressão do miR-16 ao grau de resposta tumoral à terapia realizada em outros tipos de tumores. POULIOT et al. (2012) através de estudos com células de carcinoma epidermóide demonstraram que a diminuição dos níveis de expressão de miR-16 acarreta resistência celular ao quimioterápico cisplatina. Além disso, identificaram como genes alvo as quinases WEE1 e CHK1 que são responsáveis pelo checkpoint na fase G2-M do ciclo celular. Com a inibição desse checkpoint, as células tumorais

tornam-se sensíveis aos fármacos que causam o dano ao DNA, como por exemplo, a cisplatina.

O estudo realizado com células de carcinomas coloretais demonstrou como alvo do miR-16 o gene survivina. A survivina pertence a uma família de genes inibidores de apoptose e está relacionada à múltiplas funções essenciais como divisão celular, mecanismos de checkpoint de integridade genômica e apoptose. Além disso, este estudo também demonstrou a relação do miR-16 com o p53, uma proteína nuclear essencial para o controle do ciclo celular, reparo do DNA e indução de apoptose sob condições de estresse. O estudo afirma que o p53 reprime a expressão de survivina através da hiper-regulação do miR-16 (MA et al. 2013). Ainda com células de carcinoma coloretal, outros pesquisadores analisaram o perfil de expressão de miRNA, e observaram que o miR-16 é um dos miRNAs preditores de resposta completa ao tratamento quimioterápico neoadjuvante (KHEIRELSEID et al. 2013).

Outro estudo que mostrou a associação do miR-16 com a resistência tumoral à terapia foi realizado com células de mesotelioma pleural maligno. Esse tumor é caracterizado por episódios frequentes de recorrência e de resistência à terapia, que tem sido associados à heterogeneidade tumoral e hiperregulação global de múltiplos genes envolvidos no metabolismo, proliferação e inibição da apoptose. Além de constatar a hiporregulação do miR-16 nesse tipo tumoral, eles constataram que a reexpressão do mesmo está ligada a ressensibilização tumoral aos agentes quimioterápicos (REID et al. 2013).

CAI et al. (2012) estudaram osteossarcomas e também descreveram que o miR-16 induz a apoptose através da parada do ciclo celular. Ainda nesse mesmo estudo, mecanismos regulatórios pós transcricionais associados à expressão do gene ciclina D1 mostrou interação direta com o miR-16, concluindo que esse miRNA suprime a expressão de ciclina D1 à níveis proteicos, apontando uma estratégia terapêutica potencial para inibir a proliferação celular dos osteosarcomas.

No nosso estudo, além da hiporregulação do miR-16, foram encontrados também o miR-22 e o miR-130a hiporregulados nas amostras dos CGs que apresentaram alta porcentagem de células tumorais viáveis nas análises pós tratamento, caracterizando a presença de resistência destas células à terapia neoadjuvante utilizada.

WANG et al. (2013) demonstraram em seu estudo uma forte associação entre a hipoexpressão do miR-22 e a evolução clínica associada ao pior prognóstico nos CGs. Em outro estudo, os pesquisadores demonstraram, aumento da expressão do CD151, uma proteína transmembrana envolvida na migração e invasão tumoral que é um dos alvos do miR-16, em carcinomas gástricos com pior prognóstico (SADEJ et al. 2014; WANG et al. 2014).

Um dos primeiros estudos relatando a atividade supressora tumoral do miR-22 foi descrito por LI J et al. (2011). Neste estudo com células de carcinoma colorretal, foi observado a superexpressão do miR-22 nas células tumorais e demonstrada a sua participação nos processos de proliferação, apoptose e sobrevivência celular. Os autores concluíram que o miR-22

superexpresso diminui a proliferação e sobrevivência das células de carcinoma colorretal com p53 mutado. Isso ocorre porque a mutação do p53 leva à hiperregulação do PTEN que culminará na elevação dos níveis de caspase-3.

Um resultado muito interessante foi descrito por TANG et al. (2013) que testaram a atividade antitumoral do composto dialil dissulfeto (DAD), que possui propriedades antioxidante e indutora de apoptose em células de CG em relação ao perfil de expressão de miRNAs tumorais. Primeiramente, eles descreveram níveis elevados de expressão do miR-22 nas células gástricas normais quando comparados às células tumorais. Após o tratamento das células tumorais com DAD eles encontraram elevações dos níveis de miR-22 que resultou na eficiência do tratamento, com consequente diminuição do tamanho tumoral. Estes autores também demonstraram que o gene pró-tumoral WNT-1 era alvo do miR-22. Através de imuno-histoquímica comprovaram a inibição do gene WNT-1 após o reestabelecimento dos níveis de miR-22 pós-tratamento com o DDA em CGs.

Outros estudos relataram a associação entre a expressão do miR-22 e o processo de autofagia (GUO et al. 2014; LI et al. 2014). Sabe-se que a autofagia é um processo regulado pela via de degradação lisossomal ajudando a manter o balanço entre síntese, degradação e subsequente reciclagem dos produtos celulares, sendo fortemente associada ao desenvolvimento do câncer e à resistência à terapia. O estudo foi realizado com amostras de osteosarcomas, cujo protocolo de tratamento quimioterápico é muito semelhante ao utilizado nos pacientes com CG

(cisplatina, doxirubicina e metotrexato), e mostraram que o miR-22 sensibiliza as células de osteosarcomas durante o tratamento quimioterápico. Isso acontece pois o miR-22 atua inibindo a expressão da proteína HMGB-1 (*High-mobility group box 1*) que possui importante papel durante o processo de autofagia.

Ainda relacionado ao controle da autofagia, ZHANG et al. (2015) descreveram o papel do miR-22 como inibidor desse processo celular e promotor da apoptose ao aumentar a sensibilidade de células de carcinomas colorretais (*in vivo e in vitro*) ao tratamento com 5-fluoracil. Eles ainda descreveram nesse estudo o BTG 1 (*B-cell translocation gene 1*) como alvo do miR-22 e promotor do processo de autofagia.

Semelhante ao observado no nosso estudo, outros estudos com diversas neoplasias malignas também relataram a associação entre a baixa expressão do miR-130a e a resistência aos tratamentos quimioterápicos, assim como a sua atuação como supressor tumoral (HUMMEL et al. 2010; VAN JAARVELD et al. 2010; ZHOU et al. 2014; PAN et al. 2015).

Através das análises por qRT-PCR, o estudo de ZHANG et al. (2013) mostrou pela primeira vez que o miR-130a encontra-se significativamente hiporregulado em células de câncer de ovário resistentes à cisplatina. Vale ressaltar que a cisplatina é um quimioterápico de primeira linha utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, inclusive para o CG. Além disso, eles confirmaram que o potente inibidor de caspases e da apoptose: o XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*), é um alvo direto do miR-130a causando assim alterações na apoptose induzida pela cisplatina. Neste estudo, quando os

níveis do miR-130a foram reestabelecidos, as células de câncer de ovário resistentes aumentaram a quimiossensibilidade à cisplatina. Eles também encontraram que a hiporregulação do miR-130a está associada com o aumento da expressão do M-CSF, uma característica comum de doença agressiva e de quimiorresistência em câncer de ovário.

Outro estudo interessante foi realizado com amostras de carcinomas de pulmão não pequenas células, que geralmente apresentam prognóstico muito ruim, em grande parte devido ao desenvolvimento de resistência celular à terapia. Por esse motivo, o agente anticâncer TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), um membro da família TNF capaz de induzir especificamente a morte de células tumorais enquanto possui atividade limitada ou quase nula em células normais, vem sendo testado nas células deste tipo de tumor. De acordo com os resultados encontrados, o miR-130a foi capaz de aumentar a sensibilidade das células do carcinoma pulmonar não pequenas células resistentes ao TRAIL. Este mecanismo tem sido associado à ativação do gene MET, que é alvo do miR-130a, conhecido oncogene capaz de induzir a migração celular e a invasão através da ativação da via PI3K/AKT (ACUNZO et al. 2012).

OUYANG et al. (2014) relataram a hipoexpressão do miR-130a em linhagem celular de amostras de carcinomas mamários triplo negativos. Foi observado que a expressão deste miRNA diminuiu após o tratamento da células com a doxirubicina e que, inversamente; quando os níveis deste miRNA são reestabelecidos, a sensibilidade celular ao quimioterápico aumenta. Neste trabalho também foram demonstrados como alvos do miR-

130a, a MAPK que pode promover proliferação celular endotelial dos vasos e angiogênese do tumor, o ULK2 e o GMFB, que são genes relacionados com a autofagia e a proliferação celular, respectivamente. Assim, concluíram que o miR-130a pode ser um marcador relacionado à resistência celular aos quimioterápicos.

Outro estudo que avaliou os níveis de expressão dos miRNAs em carcinomas de próstata, demonstrou que os níveis de expressão do miR-130a estavam diminuídos nas células de câncer de próstata resistentes à castração e também ao tratamento com paclitaxel. Quando os níveis de expressão deste miRNA eram reestabelecidos, a via de sinalização apoptótica era ativada através da ativação da caspase 8 e então ocorria o aumento da sensibilidade celular ao paclitaxel. Os resultados deste estudo apontaram como alvo direto do miR-130a o gene SLAIN1 (*SLAIN motif-containing protein 1*) o qual regula a dinâmica dos microtúbulos, e como alvo indireto o CAV2 (*caveolin-2*) que está envolvido em vários processos celulares importantes, inclusive na cascata de transdução de sinal (FUJITA et al. 2015).

Atualmente, a maioria dos estudos tem como objetivo principal determinar o papel da expressão de miRNAs desregulados no câncer. A análise do perfil de expressão de miRNAs é promissor para a caracterização tumoral, podendo revelar potenciais marcadores diagnósticos e prognósticos das neoplasias malignas. Outros estudos que avaliam a reposição ou o bloqueio de miRNAs específicos podem contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento destas neoplasias (XIA et al. 2008). Em

nosso estudo, encontramos a desregulação de alguns miRNAs, que parecem estar associados aos CGs que mostraram resistência aos esquemas de terapia neoadjuvante utilizados atualmente. Nossos dados apontam evidências de que os miRNAs podem ser utilizados como potenciais alvos para a sensibilização das células tumorais à quimioterapia.

6 CONCLUSÕES

- 109 miRNAs são diferencialmente expressos na comparação entre os carcinomas gástricos e a mucosa gástrica normal, sendo 9 miRNAs hiperexpressos e 100 miRNAs hipoexpressos nos carcinomas gástricos.
- Foram identificados 9 miRNAs hiporregulados nos carcinomas gástricos sem resposta patológica (100% de célula tumoral viável) ao tratamento neoadjuvante em comparação aos carcinomas gástricos com resposta patológica completa (0% de célula tumoral viável). O miR-16 foi validado como hipoexpresso nas amostras de carcinomas gástricos sem resposta patológica.
- 14 miRNAs estão hiporregulados nas amostras dos carcinomas gástricos de pacientes mortos pelo câncer em relação às amostras dos carcinomas gástricos dos pacientes vivos e sem câncer.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acunzo M, Visone R, Romano G, et al. miR-130a targets MET and induces TRAIL sensitivity in NSCLC by downregulating miR 221 & miR 222. **Oncogene** 2012; 31:634-42.

Bando E, Kojima N, Kawamura T, Takahashi S, Fukushima N, Yonemura Y. Prognostic value of age and sex in early gastric cancer. **Br J Surg** 2004; 91:1197-201.

Bandres E, Bitarte N, Arias F, et al. MicroRNA-451 regulates macrophage e migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. **Clin Cancer Res** 2009; 15:2281-90.

Becker K, Mueller JD, Schulmacher C, et al. Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. **Cancer** 2003; 98:1521-30.

Boige V, Pignon J, Saint-Aubert B, et al. Final results of a randomized trial comparing preoperative 5-fluorouracil/cisplatin to surgery alone in adenocarcinoma of stomach and lower oesophagus (ASLE): FNLCC ACCORD07-FFCD 9703 trial [abstract]. **J Clin Oncol** 2007; 25:4510. [Presented at 51st Annual Meeting 2015 ASCO Annual Meeting; May 29-June; Chicago-III]

Bornschein J, Rokkas T, Selgrad M, Malfertheiner P. Gastric cancer: clinical aspects, epidemiology and molecular background. **Helicobacter** 2011; 16:45-52.

Brenner B, Shah MA, Karpeh MS, et al. A phase II trial of neoadjuvant cisplatin–fluorouracil followed by postoperative intraperitoneal floxuridine–leucovorin in patients with locally advanced gastric cancer. **Ann Oncol** 2006; 17:1404-11.

Brenner B, Hoshen MB, Purim O, et al. MicroRNA as a potential prognostic factor in cancer gastric. **World J Gastroenterol** 2011; 17:3976-85.

Bronisz A, Godlewski J, Wallace JA, et al. Reprogramming of the tumour microenvironment by stromal PTEN-regulated miR-320. **Nat Cell Biol** 2011; 14:159-67.

Cai CK, Zhao GY, Tiao LY, et al. miR-15a and miR16 downregulate CCND1 and induce apoptosis and cell cycle arrest in osteosarcoma. **Oncol Rep** 2012; 28:1764-70.

Chen Y, Song Y, Wang Z, et al. Altered expression of mir-148a and mir-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. **J Gastrointest Surg** 2010; 14:1170-9.

Chiang Y, Song Y, Wang Z, et al. Aberrant expression of mir-203 and its clinical significance in gastric and colorectal cancers. **J Gastrointest Surg** 2011; 15:63-70.

Chua YJ, Cunningham D. The UK NCRI MAGIC trial of perioperative chemotherapy resectable gastric cancer: implications for clinical practice. **Ann Surg Oncol** 2007; 14:2687-90.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature** 2014; 513:202-9.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. **Cancer Res** 1992; 52:9735-40.

Costa Júnior WL, Farias IC, Ribeiro HSC, et al. Adenocarcinoma gástrico. In: Coimbra FJF, Diniz AL, Ribeiro HSC, Costa Júnior WL, Godoy AL, Farias IC, editores. **Câncer do aparelho digestivo alto – rotinas do departamento de cirurgia abdominal do A.C.Camargo Cancer Center**. São Paulo: Atheneu; 2013. p.30-41.

Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. **N Engl J Med** 2006; 355:11-20.

Dixon M, Cardoso R, Tinmouth J, et al. What studies are appropriate and necessary for staging gastric adenocarcinoma? Results of an international RAND/UCLA expert panel. **Gastric Cancer** 2014; 17:377-82.

Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, et al. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **J Mol Diagn** 2008; 10:203-11.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:259-69.

Fujita Y, Kojima T, Kawakami K, et al. miR-130a activates apoptotic signaling through activation of caspase-8 in taxane-resistance prostate cancer cells. **Prostate** 2015; 75:1568-78.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer** 2015; 136:E359-E386.

Fukuda H, Takiguchi N, Koda K, Oda K, Seike K, Miyazaki M. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase are related to histopathological effects of 5-fluorouracil and cisplatinneoadjuvant chemotherapy for primary gastric cancer patients. **Cancer Invest** 2006; 24:235-41.

Guo S, Bai R, Liu W, et al. miR-22 inhibits osteosarcoma cell proliferation and migration by targeting HMGB1 and inhibiting HMGB1-mediated autophagy. **Tumor Biol** 2014; 35:7025-34.

Hingorani M, Crosby T, Maraveyas A, Dixit S, Bateman A, Roy R. Neoadjuvant chemoradiotherapy for resectable oesophageal and gastro-oesophageal junction cancer: Do we need another randomised trial? **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 2011; 23:696-705.

Höfler H, Langer R, Ott K, Keller G. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in carcinomas of the upper gastrointestinal tract. **Recent Results Cancer Res** 2007; 176:33-6.

Hummel R, Hussey DJ, Haier J. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types. **Eur J Cancer** 2010; 46:298-311.

Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2010 (ver. 3). **Gastric Cancer** 2011; 14:113-23.

Judice CC, Bourgard C, Kayano AC, Albrecht L, Costa FT. MicroRNAs in the host-apicomplexan parasites interactions: a review of immunopathological aspects. **Front Cell Infect Microbiol** 2016; 6:5.

Kheirelseid EAH, Miller N, Chang KH. miRNA expressions in rectal cancer as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy. **Int J Colorectal Dis** 2013; 28:247-60.

Kim CH, Kim HK, Reting RL, et al. miRNA signature associated with outcome of gastric cancer patients following chemotherapy. **BMC Med Genomics** 2011a; 4:79.

Kim H, Eun JW, Lee H, et al. Gene expression changes in patient-matched gastric normal mucosa, adenomas, and carcinomas. **Exp Mol Pathol** 2011b; 90:201-9.

Kwon SJ. Evaluation of the 7th UICC TNM staging system of gastric cancer. **J Gastric Cancer** 2011; 11:78-85.

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

Lauwers GY, Carneiro F, Graham DY, et al. Gastric carcinoma. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. **WHO classification of tumours of the digestive system**. Lyon: IARC; 2010. p.48-58.

Lee CH, Bang SH, Lee SK, Song KY, Lee IC. Gene expression profiling reveals sequential changes in gastric tubular adenoma and carcinoma in situ. **World J Gastroenterol** 2005; 11:1937-45.

Lee HH, Song KY, Park CH, et al. Undifferentiated-type gastric adenocarcinoma: prognostic impact of three histological types. **World J Surg Oncol** 2012; 10:254.

Li J, Zhang Y, Zhao J, Kong F, Chen Y. Overexpression of miR-22 reverses paclitaxel-induced chemoresistance through activation of PTEN signaling in p53-mutated colon cancer cells. **Mol Cell Biochem** 2011; 357:31-8.

Li W, Qin J, Sun YH, Liu TS. Neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer: A meta-analysis. **World J Gastroenterol** 2010; 16:5621-8.

Li X, Wang Q, Zheng Y, et al. Prioritizing human cancer microRNAs based on genes functional consistency between microRNA and cancer. **Nucleic Acids Res** 2011; 39:e153.

Li X, Wang S, Chen Y, Liu G, Yang X. miR 22 targets the 3`UTR of HMGB1 and inhibits the HMGB1-associated autophagy in osteosarcoma cells during chemotherapy. **Tumor Biol** 2014; 35:6021-8.

Liu R, Zhang C, Hu Z, et al. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. **Eur J Cancer** 2011; 47:784-91.

Ma Q, Wang X, Li Z, et al. microRNA-16 represses colorectal cancer cell growth in vitro by regulating the p53/surviving signaling pathway. **Oncol Rep** 2013; 29:1652-8.

Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. **N Engl J Med** 2001; 345:725-30.

Maltby S, Plank M, Tay HL, Collison A, Foster PS. Targeting microRNA function in respiratory diseases: mini-review. **Front Physiol** 2016; 7:21.

Mansour JC, Tang L, Shah M, et al. Does graded histologic response after neoadjuvant chemotherapy predict survival for completely resected gastric cancer? **Ann Surg Oncol** 2007; 14:3412-8.

Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. **Pharmacogenomics** 2009; 10:399-416.

Mu YP, Sun WJ, Lu CW, et al. MicroRNA may serve as emerging molecular biomarkers for diagnosis and prognostic assessment or as targets for therapy in gastric cancer. **Asian Pac J Cancer Prev** 2015; 16:4813-20.

Nagini S. Carcinoma of the stomach: a review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World J Gastrointest Oncol** 2012; 4:156-69.

Namikawa T, Hanazaki K. Mucin phenotype of gastric cancer and clinicopathology of gastric-type differentiated adenocarcinoma. **World J Gastroenterol** 2010; 16:4634-9.

Oh DY, Bang YJ. Adjuvant and neoadjuvant therapy for gastric cancer. **Curr Treat Options Oncol** 2013; 14:311-20.

Ooi CH, Ivanova T, Wu J, et al. Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer. **PLoS Genet** 2009; 5:e1000676.

Pan Y, Wang R, Zhang F, et al. MicroRNA-130a inhibits cell proliferation, invasion and migration in human breast cancer by targeting the RAB5A. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:384-93.

Ouyang M, Li Y, Ye S, et al. MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer. **PLoS One** 2014; 9:e96228.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin** 2005; 55:74-108.

Pouliot LM, Chen YC, Bai J. Cisplatin sensitivity mediated by WEE1 and CHK1 is mediated by miR-155 and the miR-15 family. **Cancer Res** 2012; 72:5945-55.

Rajdev L. Treatment options for surgically resectable gastric cancer. **Curr Treat Options Oncol** 2010; 11:14-23.

Reid G, Pel ME, Kirschner MB, et al. Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. **Ann Oncol** 2013; 24:3128-35.

Sadej R, Grudowska A, Turkzyc L, Kordec R, Romanska HM. CD151 in cancer progression and metastasis: a complex scenario. **Lab Invest** 2014; 94:41-51.

Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, et al. TM4 microarray software suite. **Methods in Enzymol** 2006; 411:134-93.

Santiago JM, Sasako M, Osorio J. TNM-7th edition 2009 (UICC/AJCC) and Japanese Classification 2010 in Gastric Cancer. Towards simplicity and standardisation in the management of gastric cancer. **Cir Esp** 2011; 89:275-81.

Sasako M, Sakuramoto S, Katai H, et al. Five-year outcomes randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer. **J Clin Oncol** 2011; 29:4387-93.

Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. **Physiol Rev** 2011; 91:827-87.

Schuhmacher C, Gretschel S, Lordick F, et al. Neoadjuvant chemotherapy compared with surgery alone for locally advanced cancer of the stomach and cardia European organization for research and treatment of cancer randomized trial 40954. **J Clin Oncol** 2010; 28:5210-8.

Seevaratnam R, Cardoso R, McGregor C, et al. How useful is preoperative imaging for tumor, node, metastasis (TNM) staging of gastric cancer? A meta-analysis. **Gastric Cancer** 2012; 15:S3-S18.

Sukawa Y, Yamamoto H, Nosho K, et al. HER2 expression and PI3K-Akt pathway alterations in gastric cancer. **Digestion**. 2014; 89:12-7.

Takenawa H, Kurosaki M, Enomoto N, et al. Differential gene-expression profiles associated with gastric adenoma. **Br J Cancer** 2004; 90:216-23.

Tang H, Kong Y, Guo J, et al. Diallyl disulfide suppresses proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer through Wnt-1 signalling pathway by up-regulation of miR-200b and miR 22. **Cancer Lett** 2013; 340:72-81.

Tian Y, Nan Y, Han L, et al. MicroRNA miR-451 downregulates the PI3K/AKT pathway through CAB39 in human glioma. **Int J Oncol** 2011; 40:1105-12.

Tseng CW, Lin CC, Chen CN, Huang HC, Juan HF. Integrative network analysis reveals active microRNAs and their functions in gastric cancer. **BMC Sys Biol** 2011; 5:99.

Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, et al. MicroRNA-375 Is Downregulated in Gastric Carcinomas and Regulates Cell Survival by Targeting PDK1 and 14-3-3 z. **Cancer Res** 2010; 70:2339-49.

Ueda T, Volinia S, Okumura H, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. **Lancet Oncol** 2010; 11:136-46.

van Jaarsveld MT, Helleman J, Berns EM, Wiemer EA. MicroRNAs in ovarian cancer biology and therapy resistance. **Int J Biochem Cell Biol** 2010; 42:1282-90.

Wada T, Kunisaki C, Hasegawa S, et al. Factors predictive of recurrence after surgery for gastric cancer followed by adjuvant S-1 chemotherapy. **Anticancer Res** 2013; 33:1747-51.

Wang T, Ong CW, Shi J, et al. Sequential expression of putative stem cell markers in gastric carcinogenesis. **Br J Cancer** 2011; 105:658-65.

Wang W, Li F, Zhang Y et al. Reduced expression of miR-22 in gastric cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis. **Diagn Pathol** 2013; 8:102.

Wang X, Yu H, Lu X, Zhang P, Wang M, Hu Y. miR-22 suppresses the proliferation and invasion of gastric cancer cells by inhibiting CD151. **Biochem Biophys Res Commun** 2014; 445:175-9.

Wang Z, He YL, Cai SR, et al. Expression and prognostic impact of PRL-3 in lymph node metastasis of gastric cancer: Its molecular mechanism was investigated using artificial microRNA interference. **Int J Cancer** 2008; 123:1439-47.

Werner M, Becker KF, Hofler GKH. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. **J Cancer Res Clin Oncol** 2001; 127:207-16.

Yashiro M, Inoue T, Nishioka N, Matsuoka T, Boland CR. Allelic imbalance at p53 and microsatellite instability are predictive markers for resistance to chemotherapy in gastric carcinoma. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:2926-35.

Xia L, Zhang D, Du R, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. **Int J Cancer** 2008; 123:372-9.

Zhang H, Tang J, Li C, et al. MiR-22 regulates 5-FU sensitivity by inhibiting autophagy and promoting apoptosis in colorectal cancer cells. **Cancer Lett** 2015; 356:781-90.

Zhang X, Yan Z, Zhang J, et al. Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. **Ann Oncol** 2011; 22:2257-66.

Zhang X, Huang L, Zhao Y, Tan W. Downregulation of miR-130a contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells by targeting X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) directly. **Acta Biochim Biophys Sin** 2013; 45:995-1001.

Zhou X, Chen J, Tang W. The molecular mechanism of HOTAIR in tumorigenesis, metastasis and drug resistance. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)** 2014; 46:1011-5.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 15 de agosto de 2012.

A

Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami.

Aluna: Michelle Maccarini Barcelos (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1660/12

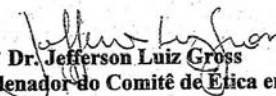
“Determinação do Perfil de Expressão de microRNA dos Carcinomas Gástricos de Pacientes Submetidos à Quimioterapia Neoadjuvante”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 26/06/2012, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 10/04/2012, **aprovaram** a realização do projeto do estudo em referência, versão 1 – datado de 08 de março de 2012 e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,



Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1