



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS  
MÉDICAS

**ANÁLISE DAS PROTEÍNAS RELACIONADAS A  
FORMAÇÃO DE METÁSTASE EM LINHAGENS DE  
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.**

Tárik Olívar de Nunes Valente

BELÉM - PA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS  
MÉDICAS

**ANÁLISE DAS PROTEÍNAS RELACIONADAS A  
FORMAÇÃO DE METÁSTASE EM LINHAGENS DE  
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.**

Autor: Tárík Olívar de Nunes Valente

Orientador: Prof. Dr. André Salim Khayat

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Queiroz Calcagno

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

BELÉM - PA

2014

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### ANÁLISE DAS PROTEÍNAS RELACIONADAS A FORMAÇÃO DE METÁSTASE EM LINHAGENS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.

Tárik Olívar de Nunes Valente

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### BANCA EXAMINADORA

1º EXAMINADOR: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Paulo Pimentel Assumpção – UFPA**

2º EXAMINADOR: \_\_\_\_\_

**Profª. Drª. Samia Demachki - UFPA**

3º EXAMINADOR: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro – UFPA.**

SUPLENTE: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano – UFPA.**

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS**

Instituto Nacional do Câncer - INCA

Universidade Federal do Pará - UFPA

*“O que faz andar o barco não é a vela enfunada,  
mas o vento que não se vê.”*

*(Platão).*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pelo dom da vida e por me dar saúde, na certeza que usarei seus ensinamentos em prol de meus pacientes.

A minha família, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência, meus pais Ismaelino e Neuma, e principalmente a minha esposa Liliane, e minhas filhas Isabela e Natália Valente, que pela tenra idade, ainda não conseguem entender a ausência paterna.

A meu mestre e amigo Paulo Assumpção, eterno professor que me inspirou os caminhos da cirurgia digestiva e participa da banca examinadora deste trabalho.

Aos amigos André Khayat, Aline Seabra e Danielle Calcagno, verdadeiros pesquisadores e comprometidos com o ensino, que muito me ajudaram e incentivaram neste trabalho, pois sem eles seria impossível a realização deste estudo.

Aos amigos André Oliveira, André Oti, Edson Yasojima, Helder Ikegami, Henrique Oti e Pedro Hage, pelas coberturas nas visitas e cirurgias no hospital que trabalhamos, sempre prontos a ajudar na minha ausência justificada pela realização deste trabalho.

A equipe do Instituto Nacional do Câncer – INCA, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay.

**SUMÁRIO**

	pág.
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Considerações gerais	13
1.2 Classificação histológica do adenocarcinoma gástrico	14
1.3 Carcinomatose	19
1.4 Linhagens Celulares	20
1.5 Múltiplos passos da metástase	21
1.6 Proteômica	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Amostras	26
3.2 Análise proteômica	26
3.2.1 Extração e preparação das proteínas	26
3.2.2 Condições da cromatografia líquida de alta performance 2D Nanoultra (UPLC) em conjunto com nanoESI-MS <sup>E</sup> (MudPIT)	26
3.2.3 Base de dados de pesquisa e quantificação	28
4 RESULTADOS	29
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO	43
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	45

## RESUMO

O câncer gástrico representa um grave problema de saúde pública mundial. A alta incidência de tumores avançados com baixa sobrevida pelas metástases, sobretudo no norte do país, nos fez realizar o estudo comparativo das linhagens de adenocarcinomas gástricos metastáticos (AGP01) com adenocarcinomas gástricos sem metástases (ACP02) através da avaliação proteômica da via de mobilidade celular, que possam ter relação com a formação dessas metástases. Foi realizado estudo proteômico das linhagens AGP01 e ACP02 através da técnica da cromatografia líquida de alta performance *2D Nanoultra* (UPLC) em conjunto com *nanoESI-MS<sup>E</sup>* (*MudPIT*) e análise funcional das proteínas diferencialmente expressas no programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA). Observamos 19 proteínas com aumento da expressão na linhagem AGP01 em relação a ACP02, as quais apresentam relação com movimento, organização e morfologia celular, onde podemos sugerir que as proteínas ACTB, ANXA1, LGALS1, IQGAP1, EZR, MSN, MYH9 e S100A11, de acordo com nossos achados e corroborados pela literatura pesquisada, tem associação com a metástase de adenocarcinomas gástricos. Outras proteínas se mostraram em forte expressão em nosso estudo, mas na literatura pesquisada sua expressão tem relação com as vias de disseminação apenas de outros tumores, como: mama (RAB5C), pulmão (PLS1 e CAP1), reto (ACTN1) e GIST (SYNE2). Conflitantes com nosso estudo, as expressões das proteínas CAPZA1, FLNA e FLNC, foram observadas na literatura como um inibidor de avanço tumoral, enquanto que as expressão das proteínas MYL6, MYL6B, e ACTN2, aparecem pela primeira vez como tendo relação com a mobilidade celular, invasão e metástase em câncer.

## ABSTRACT

Gastric cancer is a serious public health problem worldwide. The high incidence of advanced tumors with poor survival by metastasis, especially in the north, made us realize the comparative study of strains of metastatic gastric adenocarcinoma (AGP01) with gastric adenocarcinoma without metastasis (ACP02) by proteomic evaluation of cell motility that may be related to the formation of these metastasis. Proteomic study was conducted strains AGP01 and ACP02 through the technique of high performance liquid chromatography 2D Nanoultra (UPLC) together with nanoESI - (MS<sup>E</sup> mudpit) and functional analysis of differentially expressed proteins in the Ingenuity Pathways Analysis (IPA) software. We observed 19 proteins with increased expression in AGP01 lineage regarding ACP02, which are related to movement, organization and cell morphology, where we suggest that ACTB, ANXA1, LGALS1, IQGAP1, EZR, MSN, MYH9 and S100A11 proteins, according to our findings and supported by the research literature is associated with metastasis of gastric adenocarcinomas. Other proteins showed strong expression in our study, but its expression in the research literature is related to the dissemination routes only other tumors, such as breast (RAB5C), lung (PLS1 and CAP1), rectum (ACTN1) and GIST (SYNE2). Conflicting with our study, the expressions of CAPZA1, FLNA and FLNC protein, were observed in the literature as an inhibitor of tumor advancement, where the expression of MYL6, MYL6B and ACTN2 proteins first appear as being related to cell motility, invasion and metastasis in cancer.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

	Pág.
Figura 1 - Aspecto microscópico dos tipos histológicos de Laurén (HE).	16
Figura 2 - Esquema da cascata de metástase.	23
Figura 3 – Extração das proteínas	26
Figura 4 - <i>2D Nanoultra</i> (UPLC) em conjunto com <i>nanoESI-MS<sup>E</sup></i> ( <i>MudPIT</i> )	28
Figura 5 - Número de proteínas expressas nas duas linhagens	30
Figura 6 - As vias encontradas e a percentagem, respectiva, de proteínas em níveis aumentados que estão envolvidas.	31
Figura 7 - Esquema da via de interação das proteínas aumentadas em AGP01.	34

**LISTA DE TABELAS**

	Pág.
Tabela 1 - Classificação do TNM patológico.	17
Tabela 2 - Grupamento por grupos de prognóstico	18
Tabela 3 - Proteínas superexpressas na linhagem AGP01 que estão envolvidas.	31

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

OMS - Organização Mundial da Saúde  
INCA - Instituto Nacional do Câncer  
CG - Câncer Gástrico  
HE - hematoxilina-eosina  
AJCC - American Joint Committee on Cancer  
UICC - Union Internationale contre Le Cancer  
CP - Carcinomatose peritoneal  
ACTB - Actina citoplasmática 1  
ACTN1 - Actina alfa 1  
ACTN2 - Actina alfa 2  
ANXA1 - Anexina A1  
CAP1 - Proteína associada a adenililciclase 1- subunidade alfa  
CAPZA1 - Actina F  
EZR - Ezrin  
FLNA - Filamina A  
FLNC - Filamina C  
IQGAP1 - Proteína semelhante a ativadora de Ras GTPase  
LGALS1 - Galectina 1  
MSN - Moesina  
MYH9 - Miosina 9  
MYL6 - Polipeptideo 6 da cadeia leve da miosina  
MYLB - Cadeia leve 6B da miosina  
PLS1 - Plastina 1  
RAB5C - Proteína Rab 5C relacionada a Ras  
S100A11 - proteína S100A11  
SYNE2 - Nesprina 2

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

O câncer representa um grave problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, pode-se esperar 27 milhões de casos novos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas anualmente com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda (INCA, 2013).

Entre todos os diferentes tipos de câncer que afetam o homem, o câncer gástrico (CID10 - C16) ocupa a quarta posição quanto ao tipo tumoral mais frequente e constitui a segunda maior causa de morte por câncer no mundo (JEMAL *et al.*, 2011). Apesar de dados estatísticos revelarem um declínio na incidência de câncer gástrico em países em desenvolvimento, a maior parte dos casos ainda concentra-se em países desse grupo, como o Brasil. A epidemiologia do câncer gástrico assim como sua localização dentro do estômago são heterogêneas e é evidente que um dos seus fatores de risco mais relevantes é a infecção com a bactéria *Helicobacter pylori* (DE MARTEL *et al.*, 2013). Sua etiologia é multifatorial, sendo os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento, divididos em três categorias: meio ambiente, nutricional e fatores genéticos (MINCIS, 2009).

A associação da infecção por *H. pylori* com o câncer gástrico é bem estabelecida, mais de 80% dos casos de CG são atribuídos à infecção causada por essa bactéria (ANDO *et al.*, 2006; HAMAJIMA *et al.*, 2006; ROCCO e NARDONE, 2007). Em 1994, a Agência internacional de Pesquisa em Câncer classificou o *H. Pylori* como carcinógeno tipo I para câncer de estômago (IARC, 2013).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 20.000 casos novos para o ano de 2014, sendo o quarto tipo de câncer mais frequente entre homens e o quinto entre mulheres. Na região norte do país, o câncer gástrico é o segundo tipo de tumor mais incidente entre homens (11 casos/100 mil habitantes) e terceiro entre mulheres (6 casos/100 mil habitantes) (INCA, 2013).

O Estado do Pará apresenta elevada incidência de câncer gástrico e essa neoplasia ocupa a segunda posição entre os homens e a quarta entre as mulheres (INCA, 2013). Em Belém (capital do Estado do Pará), taxa média de sobrevida após cinco anos do diagnóstico está estimada em aproximadamente 9-10%, caracterizando essa neoplasia como um

importante problema de saúde pública (INCA, 2013). A baixa sobrevida em relação a países desenvolvidos pode ser devido ao diagnóstico tardio da doença.

Aproximadamente 80% dos pacientes com câncer gástrico são diagnosticados em estágios avançados da doença. O diagnóstico tardio ocorre, principalmente, devido os pacientes com lesões pequenas serem assintomáticos ou apresentarem apenas sintomas não específicos (MINCIS, 2009; CORREA, 2013). Além disso, é importante ressaltar que o câncer de estômago é largamente resistente à radioterapia e à quimioterapia, sendo o procedimento cirúrgico para a sua ressecção com as cadeias linfonodais envolvidas, o único tratamento com potencial curativo. Entretanto, somente 30 a 50% dos pacientes com esse tumor podem ser operados. Mesmo para pacientes que são submetidos a ressecção total, a taxa de recorrência ainda é elevada (RAJDEV, 2010).

Esses fatos reforçam a gravidade dessa patologia e a necessidade de desenvolvimento de novos estudos que possam ajudar a modificar esse panorama, por meio da identificação de características genéticas, peculiares de um tumor, o que poderia ampliar a capacidade de prever o comportamento dessa neoplasia e permitir o estabelecimento de conduta terapêutica de forma mais precisa.

## **1.2 Classificação histológica do adenocarcinoma gástrico**

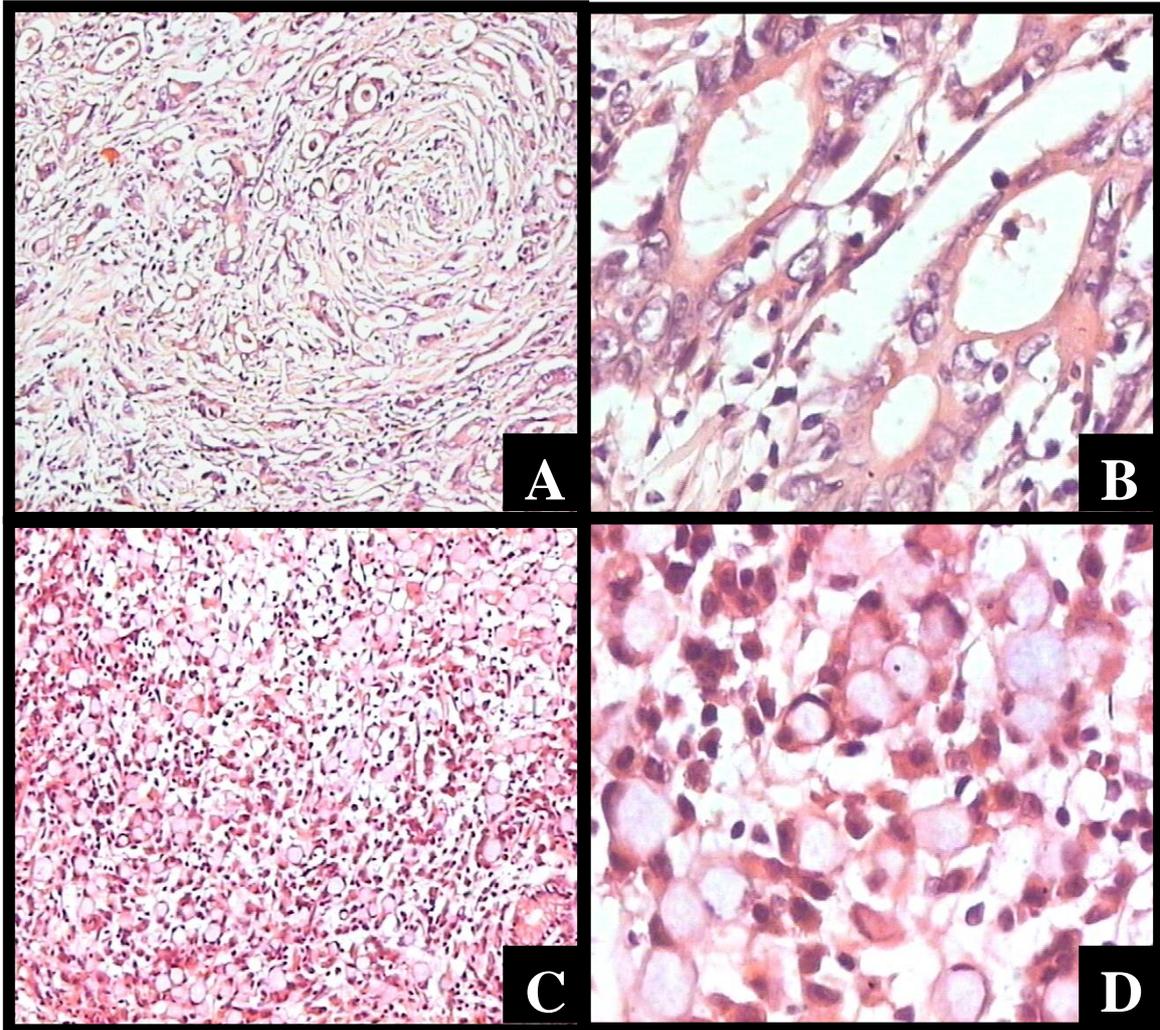
O câncer gástrico é uma neoplasia maligna que se estende entre as regiões esofagogástrica e pilórica, e pode atingir uma ou mais camadas do tecido gástrico, progredindo da mucosa em direção à serosa. O adenocarcinoma, tumor originado na mucosa, é o tipo mais comum de câncer do trato digestivo, correspondendo a 95% dos casos que acometem o estômago (SHANG e PENA, 2005). Este é definido como precoce quando está restrito à mucosa e submucosa, independentemente de sua extensão em superfície e da presença ou não de metástases ganglionares (DEKKER e OP DEN ORTH, 1977).

Os dois principais sítios tumorais do adenocarcinoma gástrico são proximal (corpo) e distal (região do antro, corpo e fundo gástrico) (CORREA, 2013). No que se refere à localização anatômica do tumor, cerca de 50 a 60 % são observados no piloro e antro, 25% na cárdia e os demais no corpo e fundo. Há cada vez mais interesse na distribuição de câncer gástrico por subsítio do estômago, em particular, a distinção entre os tumores originários da região da cárdia mais proximal e os originados mais distalmente (não cárdia). Este interesse é

impulsionado, em parte, pela evidência que sugere que essas duas categorias podem ter diferentes etiologias. Há também relatos que indicam que o câncer localizado no cárdia têm aumentado sua incidência nas últimas décadas, proporcionando assim uma tendência diferente do que é observado (DE MARTEL *et al.*, 2013)

Dentre as possíveis classificações do adenocarcinoma gástrico, duas são as mais utilizadas. A classificação de *Borrmann* (1926) classifica os tumores gástricos de acordo com o aspecto endoscópico e macroscópico da lesão: Tipo I (polipóide), Tipo II (ulcerado de limites bem definidos), Tipo III (ulcerados de limites imprecisos) e tipo IV (infiltrativo com limite plástica). Entretanto, em relação a histologia do tumor, a classificação mais utilizada é a estabelecida por Laurén (1965), a qual divide os adenocarcinomas em dois tipos histológicos: intestinal e difuso (Figura 1).

O tipo intestinal é bem diferenciado e exibe um padrão de crescimento expansivo, apresenta coesão celular e células com núcleos grandes e irregulares. Já o tipo difuso, é pouco diferenciado, constituído de pequenas células não coesas, difusamente dispersas, que não formam estruturas glandulares, podendo apresentar células com núcleos periféricos em função da elevada produção de mucina (LAURÉN, 1965).



**Figura 1** – Aspecto microscópico dos tipos histológicos de Laurén (HE). No tipo intestinal, neoplasia forma glândulas desorganizadas, 200x (A); e as células neoplásicas formam cordões sólidos, 400x (B). No tipo difuso o tumor infiltra difusamente todas as camadas do estômago, e o melhor lugar para identificar a infiltração é a camada muscular, onde as células neoplásicas contrastam com as fibras musculares lisas, 200x (C); o excesso de muco produzido pelas células neoplásicas pode ser observado no citoplasma na forma de um grande vacúolo, que desloca o núcleo para a periferia, originando as células em anel de sinete, 400x (D).

O estadiamento desses tumores é determinado pela classificação TNM estabelecida pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) juntamente com a *Union Internationale contre Le Cancer* (UICC). O sistema de estadiamento pode ser clínico ou patológico. A letra “T” determina a extensão do Tumor. Enquanto, “N” determina a ausência ou a presença, bem como a extensão das metástases em linfonodos regionais. Já a letra “M” estabelece a ausência ou a presença de metástase à distância (Tabela 1). Por conseguinte, o resultado do pTNM determina o estágio da doença, relacionando-o diretamente com o prognóstico do paciente (AJCC, 2010) (Tabela 2).

**Tabela 1** - Classificação do TNM patológico (AJCC, 2010).

<b>pT</b>	<b>Tumor Primário</b>
TX	O tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria.
T1	Tumor invade a lâmina própria, muscular da mucosa ou submucosa.
T1a	Tumor invade a lâmina própria ou muscular da mucosa.
T1b	Tumor invade a submucosa.
T2	Tumor invade a muscular própria.
T3	Tumor que invade a serosa (peritônio visceral). Tumor penetra no tecido conjuntivo subseroso sem invasão do peritônio visceral ou estruturas adjacentes. Também incluem aqueles que se estendem ao gastrocólico ou ligamentos gastrohepáticos, ou para o omento maior ou menor, sem perfuração do peritônio visceral que cobre estas estruturas.
T4	Tumor invade a serosa (peritônio visceral) ou invade estruturas adjacentes.
T4a	Tumor invade a serosa (peritônio visceral).
T4b	Tumor invade estruturas adjacentes como baço, cólon transverso, fígado, diafragma, pâncreas, parede abdominal, glândula adrenal, rim, intestino delgado e retroperitônio.
<b>pN</b>	<b>Linfonodos Regionais</b>
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais.
N1	Metástase em 1 a 2 linfonodos regionais.
N2	Metástase em 3 a 6 linfonodos regionais.
N3	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais.
N3a	Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais
N3b	Metástase em 16 ou mais linfonodos regionais
<b>pM</b>	<b>Metástase à Distância</b>
MX	A metástase não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

**Tabela 2** - Grupamento por grupos de prognóstico (AJCC, 2010).

<b>Estadiamento</b>		<b>Combinações TNM</b>	
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Estadio IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
Estadio IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Estadio IIIB	T4b	N0-1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Estadio IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2-3	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Entre os problemas mais graves a serem enfrentados no adenocarcinoma gástrico destaca-se a presença de metástases a distância, sobretudo a doença sistêmica disseminada, associada a carcinomatose peritoneal, por diagnóstico tardio ou doença avançada, sobretudo na região norte do Brasil (DE VITA, 2009; LI *et al.*, 2012). Nessa situação não existem opções terapêuticas eficazes, e os pacientes evoluem na quase totalidade dos casos para o óbito, padecendo ainda de péssima qualidade de vida durante sua curta sobrevivência (RAJDEV, 2010).

### 1.3 Carcinomatose

Neoplasias gástricas apresentam carcinomatose peritoneal com elevada frequência e esta é a forma mais comum de metástase à distância do carcinoma gástrico. A carcinomatose peritoneal é definida como a disseminação de células cancerosas na cavidade peritoneal resultando em depósitos de células malignas sobre o peritônio visceral ou parietal. A fisiopatologia e os mecanismos moleculares envolvidos na formação da carcinomatose peritoneal não são completamente conhecidos. Depósitos tumorais metastáticos disseminam-se na cavidade peritoneal de maneira distinta do que ocorre na disseminação hematogênica para órgãos sólidos ou para linfonodos regionais (DEVITA, 2009).

Um conceito conhecido como rotura tumoral considera que um tumor epitelial originário de órgãos presentes na cavidade peritoneal infiltra diretamente a camada serosa, resultando em esfoliação de células neoplásicas para a cavidade peritoneal levando à carcinomatose peritoneal. Esse evento seria facilitado pela manipulação cirúrgica destes tumores (DEVITA, 2009).

A carcinomatose peritoneal (CP) pode ser observada em até 50% dos pacientes que se apresentam com doença metastática e em 16% dos pacientes sem evidência de doença disseminada, porém com estudo citológico do peritônio durante a cirurgia. A metástase para ovário (tumor de *Krukenberg*) frequentemente ocorre durante a disseminação peritoneal (BRUCKNER *et al.*, 1997). No adenocarcinoma gástrico a CP é evento comum em regiões nas quais a maioria dos diagnósticos ocorre em fases avançadas da doença, em especial na região norte do País (LI, 2012).

A presença de carcinomatose peritoneal indica sobrevida invariavelmente menor que seis meses (MORIGUCHI *et al.*, 1992) e os sobreviventes sustentam ainda uma péssima qualidade de vida durante sua curta sobrevida (RAJDEV, 2010). A recorrência peritoneal é a forma mais frequente de recidiva (BROLL *et al.*, 2001; BONENKAMP *et al.*, 1996) e a causa mais comum de morte em pacientes com câncer gástrico (BANDO *et al.*, 1999; WU *et al.*, 1997).

Recentes avanços em análises moleculares de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas do estômago têm revelado uma variedade de alterações genéticas e fatores epigenéticos que contribuem no processo de múltiplos eventos do câncer gástrico. Entretanto, o conhecimento da carcinogênese gástrica ainda é fragmentado e o uso clínico de biomarcadores moleculares no câncer gástrico ainda não é consistente (TAMURA, 2006).

## 1.4 Linhagens Celulares

A cultura de células humanas tem gerado importantes elucidações a respeito da biologia das células neoplásicas, processos patológicos e o desenvolvimento de novas estratégias contra o crescimento e a progressão de células cancerígenas (FRESHNEY, 2010).

Há relativamente poucas linhagens celulares disponíveis de câncer gástrico, apesar da alta incidência dessa neoplasia. A dificuldade técnica na manipulação e no cultivo de amostras de câncer gástrico pode refletir o modesto número de linhagens em relação ao de outras neoplasias (PARK *et al.*, 1997).

Cerca de 80% das linhagens de câncer gástrico foram desenvolvidas em países asiáticos, onde a prevalência é elevada, principalmente em associação com infecção por *Helicobacter pylori*. No Brasil, um grupo de pesquisa estabeleceu e caracterizou as linhagens ACP02, ACP03 e AGP01 de câncer gástrico, a partir de amostras de tecido tumoral e de ascite de pacientes oriundos do Estado do Pará (LIMA *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2009). A linhagem ACP02 foi estabelecida a partir de tumor gástrico primário do tipo difuso e a linhagem ACP03, a partir de um tumor do tipo intestinal. Já a linhagem AGP01 foi estabelecida a partir de células neoplásicas presentes no líquido ascítico de um indivíduo com câncer gástrico do tipo intestinal, com padrão de crescimento em monocamada aderente com divisões alteradas como as demais linhagens estabelecidas de outras origens geográficas. Ao nosso conhecimento, essas linhagens estabelecidas por nosso grupo são as únicas descritas no Brasil.

A caracterização de linhagens celulares é importante para a compreensão da biologia de células neoplásicas e para o desenvolvimento de novas estratégias contra o crescimento e a progressão de células cancerígenas (HU *et al.*, 2000). Recentemente, foi realizada a análise de CGH array (*Comparative Genomic Hybridization array*) nas linhagens ACP02, ACP03 e AGP01 e obtenção de dados sobre ganhos e perdas de cópias genômicas de modo global, sendo essa técnica particularmente útil na investigação de alterações na dosagem genômica em células cancerosas, difíceis de serem cariotipadas (dados não publicados). Nossos resultados demonstraram que, apesar de algumas alterações cromossômicas serem comumente observadas devido ao processo de cultura *in vitro*, as linhagens estabelecidas por nosso grupo de pesquisa compartilham alterações genéticas com os tumores gástricos primários de indivíduos do Norte do Brasil (GUIMARAES *et al.*, 2006; TAKENO *et al.*, 2009; CALCAGNO *et al.*, 2005; CALCAGNO *et al.*, 2006; BURBANO *et al.*, 2006). Essas

linhagens celulares, portanto, constituem um modelo para o estudo do processo de carcinogênese gástrica nessa população e podem ser utilizadas para estudos de triagem.

Não existe tratamento eficaz hoje em dia nos casos de doenças clínicas avançadas e a baixa qualidade de vida, sobretudo na carcinomatose peritoneal, a que esses pacientes são expostos é significativa, o que requer a busca por novas drogas e novos alvos que possam proporcionar uma melhoria nessa qualidade de vida freando o desenvolvimento tumoral.

Mas para o conhecimento dessas novas drogas e alvos devemos conhecer o comportamento dos tumores e suas vias de disseminação, reconhecendo os genes expressos nas mais diferentes vias, portanto, procuramos estudar a via relacionada com a movimentação celular e suas respectivas proteínas, para obter o conhecimento do estímulo ou supressão da metástase do câncer gástrico nas linhagens estabelecidas em nosso estado.

### **1.5 Múltiplos passos da metástase**

Segundo HANAHAN e WEINBERG (2011), os carcinomas surgem da progressão de tecidos epiteliais e podem progredir para graus mais elevados de malignidade, apresentando invasão local e metástase a distância. As metástases são responsáveis pela maioria das mortes de pacientes com tumores sólidos (REYMOND *et al.*, 2013; MARYAS *et al.*, 2014).

Durante disseminação metastática, as células tumorais do tumor primário podem invadir o tecido adjacente como células individuais ou coletivamente como grupos (REYMOND *et al.*, 2013). A associação destas desenvolvem alterações na sua forma, bem como na sua fixação a outras células e a matriz extracelular (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

O processo de múltiplos passos da invasão e metástase tem sido esquematizado como uma sequência de passos, frequentemente denominado de cascata de invasão e metástase. Este esquema prevê uma série de alterações na biologia da célula, começando com a invasão local, seguida de invasão por células tumorais nos sistemas linfático e hematopoiético, seguido de evasão destas do lúmen desses vasos para o parênquima dos tecidos distantes (extravasamento), a formação de pequenos nódulos de células cancerígenas (micrometástases), e finalmente o crescimento de lesões micrometastáticas em tumores

macroscópicos, este último passo sendo denominado de colonização (Figura 2) (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

O primeiro passo da cascata é representado pelo escape das células do tumor primário (Figura 2A). Um dos fatores que contribuem para esse passo, são as alterações na forma da célula, dentre elas a melhor caracterizada envolve a perda de E-caderina por células de carcinoma, uma molécula chave de adesão célula a célula. A expressão aumentada de E-caderina funciona como antagonista de invasão e metástase, enquanto a redução da sua expressão potencializa o fenótipo tumoral. Adicionalmente, também podem estar envolvidas proteínas que estão associadas com as migrações celulares que ocorrem durante a embriogênese e inflamação (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

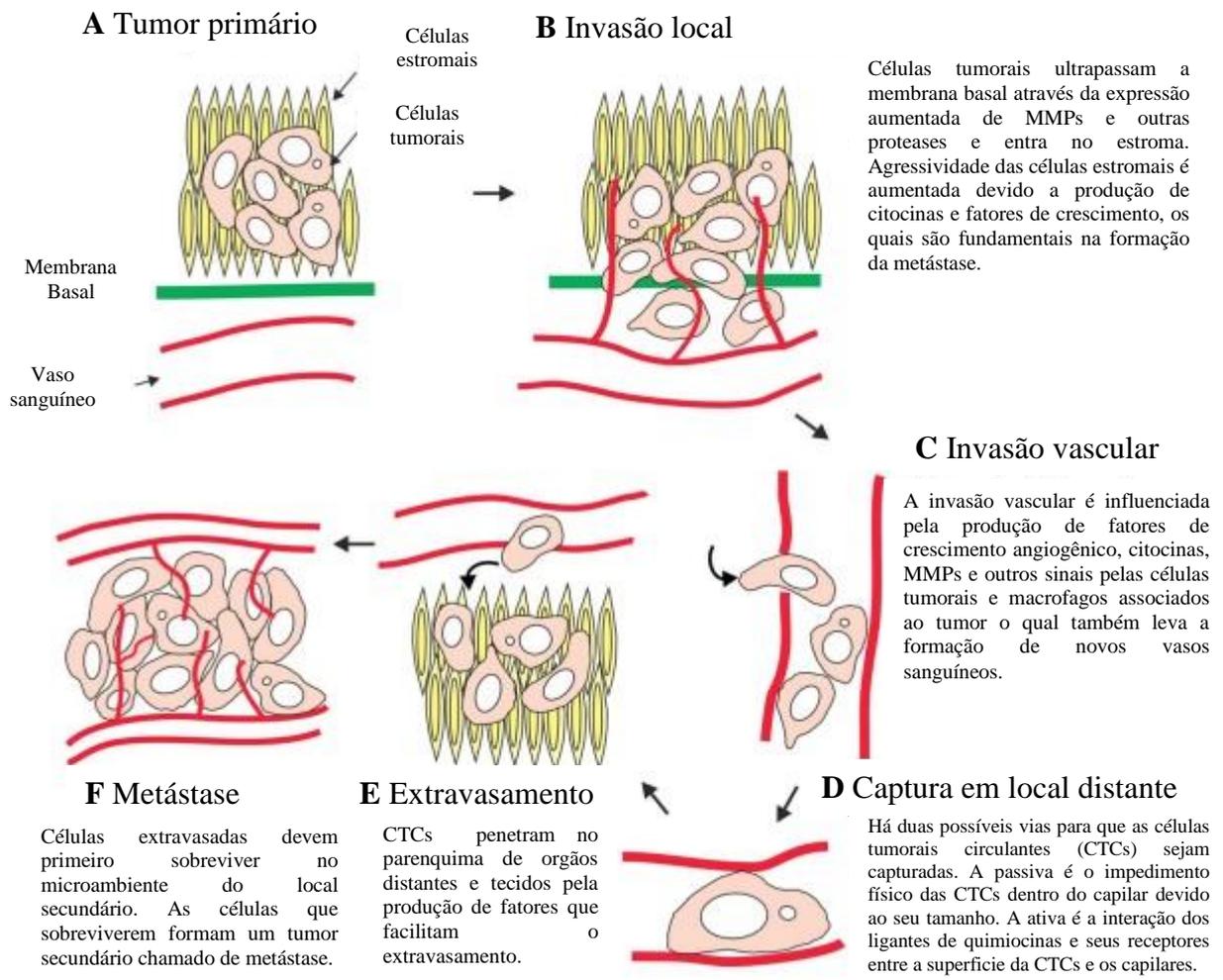
O segundo passo é a invasão local (Figura 2B), que ocorre através da expressão aumentada de proteases (por exemplo, metaloproteinases -MMPs), as células cancerígenas rompem a membrana basal e podem entrar no estroma. As células estromais aumentam o comportamento agressivo das células tumorais e também podem desencadear o processo de transição epitélio-mesenquimal (MARYAS *et al.*, 2014).

A transição epitélio-mesenquimal é um passo fundamental para a progressão do tumor. Esse processo exige a ruptura das junções endoteliais para que as células tumorais atravessem o endotélio e é caracterizado pela perda de adesão celular, perda de polaridade epitelial das células e por um aumento na invasão e na motilidade das células tumorais. Várias outras vias de sinalização como *Wnt*, *Notch*, fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B), fator de crescimento tumoral *beta* (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e outros estão envolvidos nesta transição (REYMOND *et al.*, 2013; MARYAS *et al.*, 2014).

Em seguida, as células tumorais invadem localmente o lúmen de vasos linfáticos ou sanguíneos através da invasão vascular (Figura 2C). Além disso, vasos sanguíneos novos são formados durante a progressão do tumor no processo chamado angiogênese, e esses novos vasos facilitam a invasão vascular devido, em geral, possuir fracas junções célula a célula (REYMOND *et al.*, 2013; MARYAS *et al.*, 2014).

Em seguida, as células tumorais circulantes sobrevivem na corrente sanguínea (Figura 2D) e atingem os órgãos distantes (Figura 2E). No entanto, nem todas as células tumorais nos capilares são capazes de extravasar: Em primeiro lugar, elas têm de superar a barreira física da célula endotelial. Em segundo lugar, o grande desafio são as células de carcinoma extravasarem e se difundirem para sobreviver em local secundário, que é geralmente diferente

do local do tumor primário. Por fim, as células em grupo ou individualmente após saírem dos vasos formam novos tumores em locais que possuem microambiente favorável a proliferação. O local de preferência de metástase de alguns tumores pode levar em consideração o tipo de vascularização, o tipo de quimiocinas expressas no órgão secundário em conjunto com a expressão do receptor para a quimiocina (Figura 2F) (REYMOND *et al.*, 2013; MARYAS *et al.*, 2014).



**Figura 2** - Esquema da cascata de metástase (adaptado de MARYAS *et al.*, 2014).

## 1.6 Proteômica

A proteômica refere-se ao estudo de proteínas, incluindo detecção, identificação, mensuração de sua concentração, detecção e caracterização de suas modificações, interação proteína-proteína e regulação (LEE *et al.*, 2012). Constitui-se uma das mais promissoras estratégias para a identificação de marcadores moleculares relativos ao risco de câncer, fatores prognósticos e alvos terapêuticos, além de sua utilidade na busca de proteínas diferencialmente expressas entre tecidos neoplásicos e não neoplásicos (DOWLING *et al.*, 2007).

O proteoma do câncer é muito complexo, contendo informações de cada processo biológico que existe nas células cancerígenas e do microambiente, assim como da interação entre a célula cancerígena e o hospedeiro. Assim, o estudo do proteoma do câncer é um ponto de partida para a identificação de biomarcadores de diagnóstico e alvos terapêuticos. Vários possíveis biomarcadores de câncer com potencial aplicação clínica têm sido descritos graças às tecnologias de proteômica (ALAOUI-JAMALI e XU, 2006).

Estudos recentes indicam que o líquido ascítico na carcinomatose peritoneal do adenocarcinoma gástrico dispõe de todos os elementos necessários à manutenção e à proliferação das células neoplásicas e revela-se um meio de cultura superior no que tange à manutenção das células neoplásicas *in vitro*. Este achado corrobora a importância da investigação de seu conteúdo proteico, objetivando identificar possíveis alvos terapêuticos, os quais, se inibidos, poderão representar inovadora abordagem terapêutica dirigida a essa grave situação clínica.

Muitas proteínas estruturais, de sinalização, de catalização e enzimas estão envolvidas no processo de metástase, sendo assim é válida a investigação de proteínas com o possível potencial terapêutico e como possíveis alvos diagnósticos. A identificação de proteínas, através de técnicas como a proteômica, que possam estar envolvidas no processo de agressividade e metástase é essencial para a compreensão do papel molecular das proteínas na metástase.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Análise diferencial do proteoma entre as linhagens AGP01 e ACP02 das vias de mobilidade, morfologia e organização celular.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a expressão proteica na linhagem AGP01;
- Avaliar a expressão proteica na linhagem ACP02;
- Analisar comparativamente a expressão proteica de AGP01 em relação a ACP02;
- Investigar nas proteínas diferencialmente expressas aquelas que estão envolvidas na metástase encontrada na linhagem AGP01.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras

Foram utilizadas as linhagens celulares ACP02 e AGP01, obtidas, respectivamente, de amostra tecidual de tumor extraído da região da cárdia e sem metástases, e por cultura primária de ascite carcinomatosa de adenocarcinoma gástrico (LEAL *et al.*, 2009). A ACP02 foi estabilizada de tumor removido da região cárdia, com classificação do tipo difusa e estadiamento T3N2M0 de um homem de 66 anos de idade. A AGP01 foi estabilizada de células de fluido ascítico de tumor localizado na região do antro e corpo, com classificação do tipo intestinal e estadiamento T3N2M1. As técnicas relatadas a seguir foram realizadas na Unidade Proteômica do Instituto Nacional do Câncer, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

#### 3.2 Análise proteômica

##### 3.2.1 Extração e preparação das proteínas

Inicialmente foram preparados extratos totais das células não tratadas pelo método de lise osmótica. Todas as amostras tiveram seus extratos proteicos preparados com protocolos específico para digestão total das proteínas para cromatografia líquida em nano escala. As amostras foram sulfonadas com o reagent RapiGEst SF (Waters®), modificadas com os reagentes DTT (GE®) e iodoacemida (GE®) e digeridas com a enzima tripsina (Promega®).

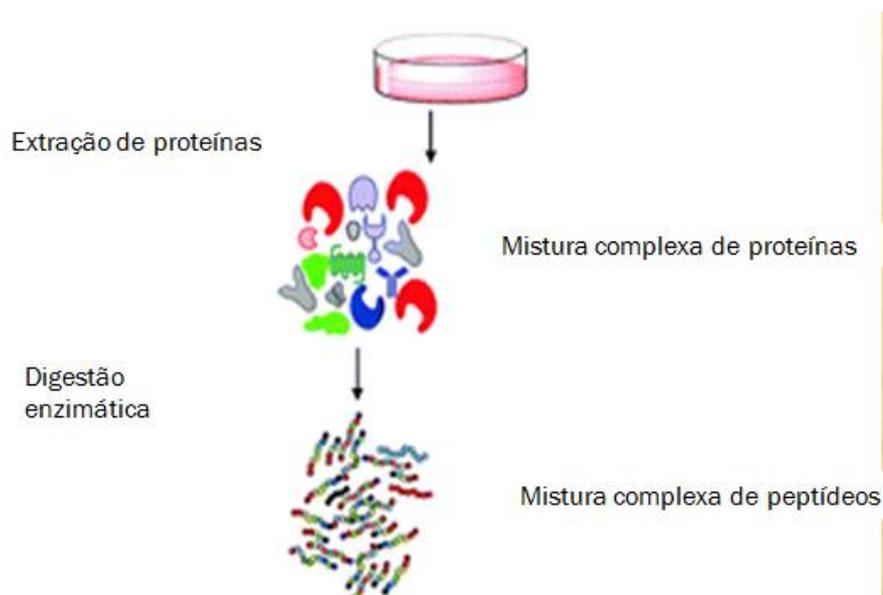


Figura 3: Extração das proteínas.

### 3.2.2 Condições da cromatografia líquida de alta performance 2D Nanoultra (UPLC) em conjunto com nanoESI-MS<sup>E</sup> (MudPIT)

A estratégia utilizada foi de 2DNanoLC-MS/MS associada a quantificação da expressão diferencial (MS<sup>E</sup>-Mass spectrometry expression) para a obtenção do proteoma das linhagens celulares.

Os experimentos quantitativos e qualitativos por *nanoUPLC* bidimensional em conjunto com *nanoESI-MS<sup>E</sup>* foram conduzidos com fase reversa de 1.5 h gradiente de 5% a 40% (v/v) ACN (0.1% v/v ácido fórmico) a 600nL.min<sup>-1</sup> no cromatógrafo NanoAcquity (Waters®). A coluna nanoACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μm, de 100 μm x 100 mm foi usada com uma segunda dimensão em conjunto com uma coluna de forte de troca de cátions (*strong cation exchange* - SCX) de 180 μm × 23 mm, as quais foram empacotadas com 5μm Poly-SULFOETHYL Aspartamida (PolyLC, Columbia, MD, USA). A coluna suporta 2μg de proteínas digeridas para análise em triplicata. A análise da primeira dimensão foi feita com um passo de gradiente de sal e um passo de gradiente orgânico, ambos criados por injeção de *buffer plugs* contendo sal e modificador orgânico com o amostrador automático nanoACQUITY e a bomba de carregamento. As nove frações obtidas foram seguindo: 50, 100, 150, e 200 mM de formato de amônio com 5% de ACN, 200 mM de formato de amônio com 10, 20 e 30% de ACN e 350 mM 30% e uma descarga (LIU *et al.*, 2006). Um tampão de 2μL foi injetado de cada vez, para formar os passos de gradientes. Os tampões foram carregados na coluna de SCX com tampão de carga (5 mM de formato de amônio contendo 5% de ACN, preparado a partir da solução-mãe de formato de amônio) a 3 μL min<sup>-1</sup> de taxa de fluxo por 3 min. Uma amostra de tampão a 2μL foi carregada na coluna de SCX antes dos gradiente de tampões ser injetado.

Cada tampão sal/orgânico eluiu uma fração dos peptídeos retidos da coluna de SCX. Os componentes libertados foram então capturados por uma coluna de aderência RP (Waters), enquanto que os demais compostos, tais como sais, foram descartados. A coluna de aderência (180 μm × 20 mm) foi lavada com material de 5m Symmetry C18 (Waters). Depois todos os peptídeos liberados foram levados para a coluna de aderência, a válvula de três posições foi mudada de posição aderência para a posição de eluição, colocando a coluna *on-line* com uma bomba de gradiente binário e uma coluna analítica RP (Waters) mencionada acima. Todas as análises foram realizadas com ionização por ionização nanoelectrospray no modo positivo nanoESI(+) com uma fonte NanoLockSpray. O bloqueio do canal de massa foi amostrado a

cada 30 s. Uma solução de [Glu] 1-Fibrinopeptideo B (GluFib) (Sigma, St. Louis, EUA) a  $200\text{fmol}\cdot\text{uL}^{-1}$  foi fornecido através do pulverizador de referência da fonte NanoLockSpray e foi utilizado para a calibração considerando um intervalo de amostragem de 30 s de íons por impulso inferior a 0,1. O íon duplamente carregado ( $[M + 2H]^{2+}$ ) foi utilizado para uma calibração inicial de único ponto (Lteff) e íons fragmentos de GluFib MS/MS foram usados para obter a calibração final do instrumento.

Experimentos de escaneamento independente de dados ( $\text{MS}^E$ ) foram realizados com o espectrômetro de massa Synapt HDMS (Waters, Manchester, Reino Unido), o qual foi programado automaticamente para alternar entre baixo consumo de energia de colisão MS (3 eV) e elevadas energias de colisão  $\text{MS}^E$  (12-40 eV) aplicadas a célula CID *T-wave* com gás argônio. A transferência *T-wave* de célula de colisão foi ajustado para 1 eV com um tempo de varredura de 1,0 s, tanto em baixo quanto alto consumo de energia, para dar um mínimo de 10 pontos em baixa e alta energia acima de 10% da capacidade máxima. TOF (*Full-scan orthogonal acceleration*) (oa-TOF)  $\text{MS}^E$  foi adquirida a partir de  $m/z$  50 a 2000. O perfil de MS foi ajustado de modo que a baixa energia LC/MS de dados foram efetivamente adquiridas a partir de  $m/z$  400 a 2000, a qual garantiu que qualquer massa observados nos dados LC/ $\text{MS}^E$  menor que  $m/z$  400 eram conhecidos por surgir de dissociações na colisão celular no total de segundos do canal de contagem de íons do MS.



Figura 4: 2D Nanoultra (UPLC) em conjunto com nanoESI- $\text{MS}^E$  (MudPIT)

### 3.2.3 Base de dados de pesquisa e quantificação

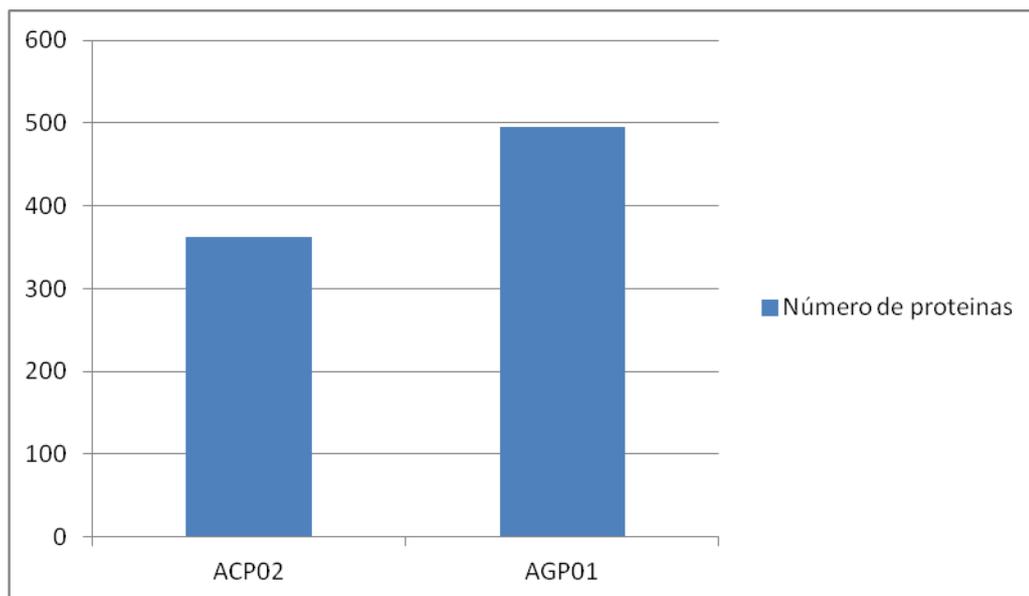
Pacotes de identificações de proteínas e dados quantitativos foram gerados através da utilização de algoritmos dedicados e a procura numa base de dados humana específica. As bases de dados utilizadas foram randomizados *on-the-fly*, durante as consultas no banco de dados e anexado ao banco de dados original para acessar a taxa falso positivo de identificação. Os espectros obtidos foram processados no Protein Lynx Global Server V.2.4 (PLGs) com *ExpressionE informatics* V.2.4.

O padrão de massas obtido para cada amostra foi comparado com o padrão de massas gerado “*in silico*”, a partir do banco de dados UniProtKB Release 2011\_09 e as condições de pesquisa foram baseadas na taxonomia (*Homo sapiens* [humano]), com modificações variáveis por carbamidomethyl (C), acetil N-terminal, e oxidação (M). Para a quantificação diferencial foi utilizada a ferramenta *Waters Expression software analysis* (WEPS). As proteínas obtidas foram organizadas pela ferramenta de algoritmo *PLGs ExpressionE* em uma lista significativa correspondente ao aumento e diminuição índices de regulação entre os diferentes grupos. A normalização foi realizada com uma proteína que não mostrou nenhuma diferença significativa abundante em todas as injeções.

A análise funcional das proteínas diferencialmente expressas foi realizada usando o programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA), disponível em <http://www.ingenuity.com>. As proteínas foram consideradas diferencialmente expressas adotando  $p < 0,05$ .

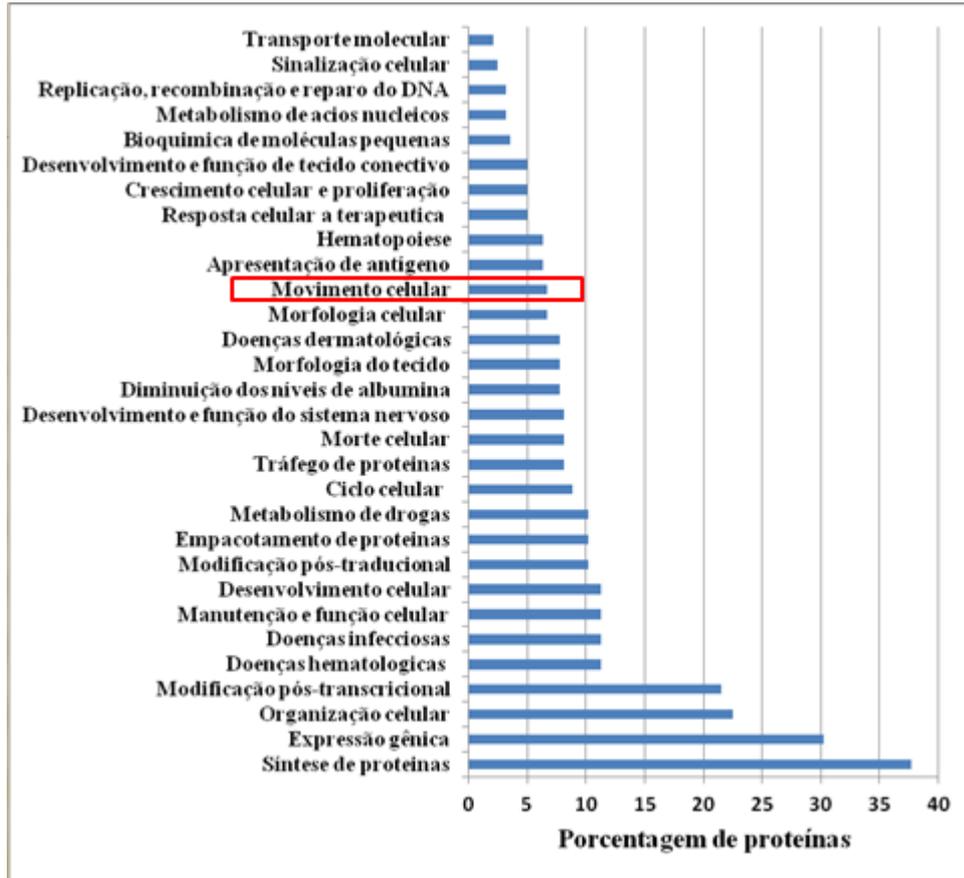
#### 4 RESULTADOS

Foram extraídos os dados da análise do proteoma das duas linhagens ACP02 e AGP01. Nesta análise, identificamos 857 proteínas expressas no total, sendo 495 proteínas expressas em AGP01 e 362 proteínas expressas em ACP02 (Figura 5).



**Figura 5** - Número de proteínas expressas nas duas linhagens

Das proteínas totais foi realizada a interação e análise funcional, comparando a linhagem obtida de metástase (AGP01) em relação a linhagem obtida de tumor sem metástase (ACP02). Foram identificadas 381 proteínas que apresentaram níveis significativamente diferentes na AGP01 em relação a ACP02, sendo 284 com expressão aumentada e 97 com expressão diminuída. Entre o total de proteínas diferencialmente aumentadas, 19 apresentaram relação com movimento, organização e morfologia celular. As proteínas expressas em maior nível na AGP01 e suas vias participantes estão na Figura 6, dentre elas, a via de movimento, organização e morfologia celular que são o alvo do estudo.



**Figura 6** – As vias encontradas e a porcentagem, respectiva, de proteínas em níveis aumentados que estão envolvidas.

Na Tabela 3, encontram-se as proteínas e seus dados, como: nome da proteína, nome do gene, *score*, sequência de cobertura (em porcentagem) e a função da proteína (segundo banco de dados OMIM) (NCBI, 2014). Os dados do *score* são provenientes da combinação de massa molecular, ponto isoelétrico, número de peptídeos equivalentes e porcentagem de cobertura dos peptídeos para identificação das proteínas, assim, quanto maior o valor do *score*, mais válida é a identificação desta proteína. A porcentagem da sequência de cobertura significa a porcentagem da sequência proteica do banco de dados “coberta” pelos peptídeos da amostra.

**Tabela 3** - Proteínas superexpressas na linhagem AGP01 que estão envolvidas no aparecimento das metástases

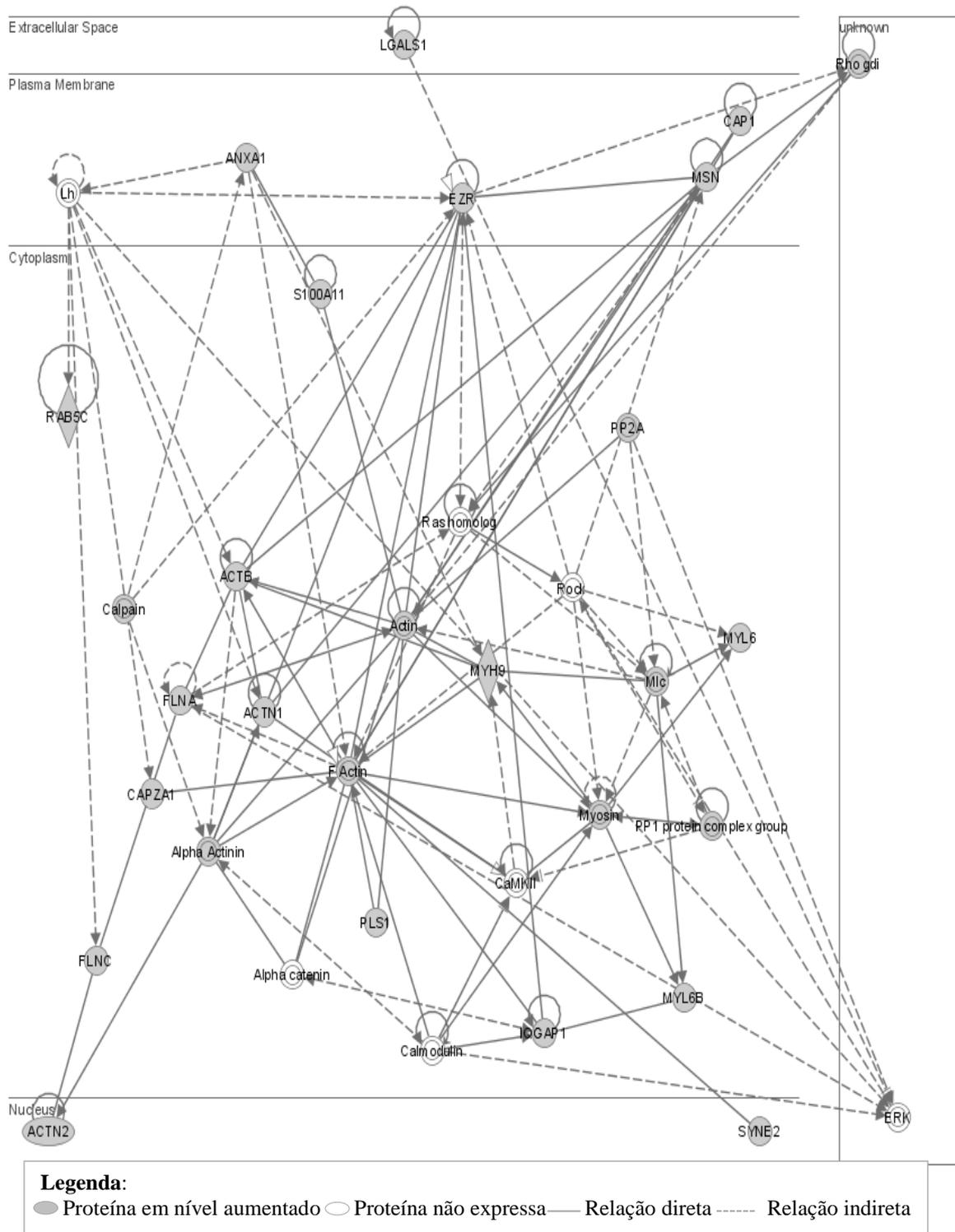
<b>Proteína</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Score</b>	<b>Sequência de Cobertura (%)</b>	<b>Função (OMIM)</b>
<b>ACTB</b>	Actina citoplasmática 1	30492.46	69,07	Modula a migração durante a embriogênese, diferenciação e possível carcinogênese.
<b>ACTN1</b>	Actina alfa 1	2057.97	50	Medeia a ligação dos microfilamentos com a membrana nas junções aderentes.
<b>ACTN2</b>	Actina alfa 1	689.63	22,15	Ligação a membrana
<b>ANXA1</b>	Annexina A1	8731.87	56,65	Inibe as fosfolipases
<b>CAP1</b>	Proteína associada adenililciclase 1	1444.32	26,74	Regulação da organização da actina
<b>CAPZA1</b>	Subunidade alfa 1 da proteína <i>capping</i> da actina F	353.54	11,89	Regula o crescimento do filamento de actina em sua extremidade <i>capping</i>
<b>EZR</b>	Ezrin	1493.75	34,13	Serve como um importante substrato para certas proteínas tirosino cinases citoplasmáticas.
<b>FLNA</b>	Filamina A	424.75	22,74	Regula a reorganização da actina por interação com integrinas e complexos de receptores.
<b>FLNC</b>	Filamina C	362.73	17,91	Envolvida na remodelagem do citoesqueleto
<b>IQGAP1</b>	Proteína semelhante a ativadora de <i>Ras</i> GTPase	543.53	28,24	Modula adesão celular, transcrição, arquitetura do citoesqueleto e sinalização celular.

<b>LGALS1</b>	Galectina 1	8183.88	69,63	É um regulador autócrino de proliferação celular.
<b>MSN</b>	Moesina	876.80	28,25	Interage com as células pela ligação com a heparina ou sulfato de heparan.
<b>MYH9</b>	Miosina 9	1764.35	39,29	Interage com a actina para movimentação celular
<b>MYL6</b>	Polipeptídeo 6 da cadeia leve da miosina	2898.53	43,71	Interage com a actina para movimentação celular
<b>MYL6B</b>	Cadeia leve 6B da miosina	501.03	6,25	Interage com a actina para movimentação celular
<b>PLS1</b>	Plastina 1	209.38	11,61	Agregação de feixes de actina
<b>RAB5C</b>	Proteína Rab 5C relacionada a <i>Ras</i>	282.77	11,57	Atuam no processo de ancoragem ou fusão correta de vesículas
<b>S100A11</b>	Proteína S100A11	5028.75	44,76	Polimerização da tubulina
<b>SYNE2</b>	Nesprina 2	96.38	4,78	Ligação a F actina

\*Proteínas Diferencialmente Superexpressas na Linhagem AGP01 em relação à ACP02(p<0,05).

Na figura 7, podemos visualizar como as 19 proteínas da via em estudo interagem entre si e suas respectivas localizações nas células. As proteínas com níveis aumentados de expressão que foram observadas nesta via, possuem várias localizações, são elas:

- Extracelular: LGALS1;
- Membrana plasmática: ANXA1, MSN, EZR e CAP1;
- Citoplasma: ACTB, ACTN1, ACTN2, CAPZA1, FLNA, FLNC, IQGAP1, MYH9, MYL6, MYL6B, PLS1, RAB5C e S100A11;
- Núcleo: ACTN2 e SYNE2.



**Figura 7** – Esquema da via de interação das proteínas aumentadas em AGP01.

## 5 DISCUSSÃO

A metástase é a principal causa de falha no tratamento dos mais variados tipos de tumores, incluindo os tumores de estômago, pois já representa um estado avançado da doença. A busca por biomarcadores relacionados com a metástase nos tumores são fundamentais para o conhecimento do mecanismo biológico que garantam as células neoplásicas a capacidade de migração e invasão de tecidos adjacentes ao tumor primário.

No presente trabalho, comparamos a expressão proteica da linhagem de carcinomatose peritoneal com tumor gástrico primário AGP01 em relação a linhagem de adenocarcinoma gástrico ACP02, em via referente a mobilidade celular, para identificar possíveis biomarcadores que confeririam a capacidade metastática aos tumores gástricos.

Foram identificadas 19 proteínas mais expressas na linhagem AGP01 em relação a ACP02 na via de mobilidade celular. Para facilitar o entendimento do papel dessas proteínas na via de mobilidade e câncer, separamos as proteínas encontradas em quatro grupos de acordo com trabalhos descritos na literatura: proteínas com papel bem definido na invasão e metástase em câncer gástrico; proteínas com papel definido na invasão e metástase descritas em outras neoplasias; proteínas com papel conflitante na invasão e metástase tumoral; proteínas sem papel definido na invasão e metástase tumoral.

No primeiro grupo, observamos oito proteínas com papel na mobilidade celular, invasão e metástase no câncer gástrico bem definido na literatura: ACTB, ANXA1, LGALS1, EZR, IQGAP1, MSN, MYH9 e S100A11.

A proteína ACTB (*actin, beta*) é uma das principais constituintes do aparelho contrátil celular e uma das duas actinas formadoras do citoesqueleto funcional da célula (NCBI, 2014). Esta proteína é codificada pelo gene localizado na banda 22 do braço curto do cromossomo 7 (7p22) e funciona geralmente como um regulador na maioria das células tumorais e tecidos. A expressão anormal e a polimerização de ACTB são associadas com a capacidade de invasão e metástase dos tumores, além das mudanças estruturais do citoesqueleto celular (Guo *et al.*, 2013).

O aumento da expressão da proteína ACTB foi descrita em uma grande variedade de tumores, como: leucemias, linfomas, melanomas, tumores renais, colorretais, gástricos, pancreáticos, esofágicos, pulmonares, de mama, de próstata e de ovário (VILA *et al.*, 2000; GOIDIN *et al.*, 2001; JUNG *et al.*, 2007; SUZUKI *et al.*, 2010), o que sugere que o gene ACTB pode não ser adequado para normalização em estudos no nível gene/proteína para

certos tipos de células tumorais. Entretanto, a utilização de *ACTB*, em nível de mRNA, como gene de referência em estudos de expressão deve ser realizada com cautela. Recentemente, Winieski *et al.* (2013) estabeleceu que a combinação dos genes *ACTB* e *B2M* ( $\beta_2$  microglobulina) eram os genes mais estáveis para serem utilizados como genes de referência nos estudos de quantificação da expressão de mRNA nas linhagens de câncer gástrico ACP02, ACP03, AGP01 e PG100.

Outra proteína que apresentou expressão aumentada na linhagem AGP01 em relação a ACP02 foi a ANXA1 (*annexin A1*), codificada por gene localizado na região 9q21.13. Essa proteína pertence a uma família de proteínas dependente do cálcio. Estão preferencialmente localizadas na face citosólica da membrana plasmática e possuem atividade inibidora da fosfolipase A2. Uma vez que a fosfolipase A2 é necessária para a biossíntese de mediadores potentes da inflamação, as prostaglandinas e os leucotrienos, a ANXA1 possui uma potente atividade anti-inflamatória (NCBI, 2014). Para Zhu *et al.* (2010), ela é uma proteína multifuncional, pois faz mediação de vários processos fisiológicos importantes, dependendo da sua localização dentro da célula.

Em relação ao câncer gástrico, a alta expressão de *ANXA1* esta relacionada à sua localização nuclear e também está associada com a invasão da serosa, metástase em linfonodos, disseminação peritoneal, estágios avançados do TNM e risco de menor sobrevida global para estes pacientes (ZHU *et al.*, 2010; SATO *et al.* 2011; CHENG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.* 2013). Sendo assim, esta proteína poderia ser considerada como um biomarcador na avaliação de prognóstico clínico e um possível alvo de terapias no câncer gástrico com associação a carcinogênese, progressão, invasão e metástase. Entretanto, Cheng *et al.* (2012) relatam que o papel de *ANXA1* neste tipo tumoral é indeterminado e o seu mecanismo nesses tumores podem estar envolvidos com receptores de peptídeo formil, cinases extracelulares e com a via de ligação da proteína integrina beta-1, através da qual *ANXA1* regula a invasão celular do câncer de estômago.

Recentemente, foi observado que as proteínas *ANXA1* e *LGALS1*(*galactoside-binding, soluble, 1*) apresentaram uma alta expressão proteica e gênica tanto na gastrite quanto no câncer gástrico, o que sugere uma forte associação destas com inflamação gástrica crônica e carcinogênese dos tumores gástricos (JORGE *et al.*, 2013).

No presente trabalho, a proteína *LGALS1* também mostrou uma elevada expressão na linhagem AGP01 em relação a ACP02. As galectinas são uma família de proteínas que tem a função de reguladoras autócrinas da proliferação celular (NCBI, 2014). O gene está localizado

no cromossomo 22 (22q13.1), a grande expressão das galectinas1 relaciona-se com o VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e interfere no comportamento biológico de alguns tipos de tumores, incluindo o câncer gástrico, tendo a sua alta expressão associada com o tamanho do tumor, grau de diferenciação, grupamento TNM e metástases linfonodais, podendo servir como indicador de pior prognóstico para câncer gástrico (CHEN *et al.*, 2013).

A proteína IQGAP1 (*IQ motif containing GTPase activating protein 1*) é um membro da família IQGAP e seu gene está localizado no cromossomo 15q26. Essa proteína interage com os componentes do citoesqueleto, com moléculas de adesão celular e com várias moléculas de sinalização regulando a morfologia e a motilidade celular (NCBI, 2014). IQGAP1 é reconhecido como um regulador negativo da adesão célula-célula nas junções aderentes em vários tipos de células, incluindo células da mucosa gástrica (MORRIS *et al.*, 2005). Segundo Wu *et al.* (2012), a IQGAP1 é altamente expressa em câncer gástrico e pode funcionar como um estimulador da proliferação neste tipo de câncer, entretanto seu papel na gênese tumoral não está bem estabelecido. A IQGAP1 associada com a proteína Cdc42, funcionam como um regulador negativo de E-caderina e  $\beta$ 1-integrina, e pode ser influenciada por infecção causada pela bactéria *H. pylori* no carcinoma gástrico, resultando em uma lesão na polaridade celular. (OSMAN *et al.*, 2013).

A EZR (*ezrin*) é uma proteína de membrana citoplasmática, periférica, codificada por um gene localizado em 6q25.3. Essa proteína funciona como um substrato de proteína-tirosina-quinase nas microvilosidades celulares. Como um membro da família de proteínas da membrana plasmática, ela funciona como uma mediadora entre a membrana plasmática e a actina do citoesqueleto, tendo assim um papel fundamental na estrutura da superfície de adesão celular, migração e organização, e que tem sido identificada alterada em vários tumores humanos (NCBI, 2014). EZR atua diretamente na regulação da actina do citoesqueleto controlando a forma celular, adesão, motilidade e a modulação das vias de sinalização. Embora seja reconhecida como uma componente chave na metástase tumoral, seus papéis e o seu mecanismo permanecem sem esclarecimento. Chen *et al.* (2013), demonstraram, *in vitro*, que EZR desempenha um papel importante na carcinogênese e metástase de câncer de pulmão, o que irá beneficiar o desenvolvimento de uma melhor estratégia terapêutica para este tipo tumoral. Em outro estudo, Lin e Chen (2013) demonstraram que a forte expressão de EZR está relacionada com crescimento do tumor, invasão da serosa e metástase linfonodal em adenocarcinoma de cólon e reto.

Especificamente em câncer gástrico, a expressão de EZR foi significativamente associada com metástase linfonodal e a distância em 436 casos de câncer gástrico analisados por imunohistoquímica (LI *et al.*, 2011). Em 2012, Jin *et al.* observaram que a expressão da proteína EZR foi significativamente mais elevada no adenocarcinoma gástrico e displasia, quando comparadas a mucosa gástrica não neoplásica, ao investigar a expressão dessa proteína em 26 amostras de tecido gástrico não-neoplásico, 32 amostras de displasia e 277 amostras de adenocarcinomas gástricos, por imunohistoquímica. Além disso, os autores descreveram que a frequência de expressão da proteína EZR aumentou significativamente em metástase linfonodal e estádios mais avançados do tumor. Consistentemente, a forte expressão de EZR foi correlacionada com pior prognóstico do câncer gástrico. No entanto, nenhum estudo funcional para avaliar o papel na migração e invasão celular em câncer gástrico envolvendo esta proteína foi descrito na literatura.

A proteína MSN (*moesin*), codificada por gene localizado na região Xq11.1, é um membro da família ERM que inclui ezrina e radixina. Proteínas ERM funcionam como agentes de ligação cruzada entre as membranas plasmáticas e o citoesqueleto de actina. MSN está localizada na membrana e é importante para o reconhecimento célula-célula e para a sinalização no movimento celular (NCBI, 2014). É relatada como um marcador de prognóstico negativo no câncer gástrico quando associada a CD44, sendo um forte preditor de metástase linfonodal. Assim, ambas estão significativamente associadas com pobre sobrevida global nos pacientes com câncer gástrico e em idade avançada (JUNG *et al.*, 2013).

A MYH9 é uma proteína codificada por gene localizado no cromossomo 22 (22q13.1), está envolvida em várias funções importantes: citocinese, motilidade celular e na manutenção da forma celular. Defeitos no gene codificante desta proteína, estão associados com doenças não síndrômica autossômicas, como: surdez neurossensorial tipo dominante 17, síndrome de *Epstein*, síndrome de *Alport*, síndrome *Sebastian*, síndrome *Fechtner* e macrotrombocitopenia com surdez neurossensorial progressiva (NCBI, 2014). A alta expressão desta proteína já foi observada em câncer de próstata por MU *et al.* (2013). Liang *et al.* (2011) demonstraram que a alta expressão da proteína MYH9 pode ser inibida pela alta expressão do micro-RNA let-7f no câncer gástrico, e ocasionar a diminuição da capacidade celular de invasão e migração neste tipo tumoral.

A proteína S100A11 (S100 calcium binding protein A11) é um membro da família de proteínas contendo *S100* e seu gene correspondente localizado em 1q21. Estão localizadas no citoplasma e/ou núcleo de uma grande variedade de células, e estão envolvidas na regulação

de um grande número de processos celulares, tais como: a progressão do ciclo celular e a diferenciação. Esta proteína pode funcionar na motilidade, invasão, e na polimerização da tubulina. Rearranjos cromossômicos e alterações na expressão deste gene/proteína são implicados na metástase tumoral (Li *et al.*, 2011; NCBI, 2014). Os membros da família *S100* são vistos em alguns tipos de câncer de diferentes formas e estão frequentemente associadas com a progressão do tumor. Entretanto, Salama *et al.* (2008) sugerem que a proteína *S100A11* pode ter função de supressora tumoral em alguns tipos de câncer e promotora tumoral em outros. Mori *et al.* (2004) relataram que a expressão da proteína *S100A11* estava associada com o desenvolvimento de metástases nos tumores gástricos, podendo ser útil para diferenciar, nesses casos, grupos de pacientes com metástases. Esta informação contribui para uma melhor compreensão das alterações moleculares durante o desenvolvimento e proliferação dos tumores gástricos malignos, o que pode ajudar a prever o desenvolvimento de metástases linfáticas e ajudar os pesquisadores na identificação de novos alvos terapêuticos para pacientes com câncer gástrico.

No segundo grupo, observamos cinco proteínas com papel definido na invasão e metástase descritas em outras neoplasias: ACTN1, CAP1, PLS1, RAB5C e SYNE2.

ACTN1 (*actinin, alpha 1*) pertencente a superfamília de genes de espectrina, também representa um grupo diverso de proteínas do citoesqueleto celular, incluindo as *alfa*, *beta* e espectrinas distróficas. A *alfa* actina é uma proteína que se liga à actina com múltiplas funções em diferentes tipos de células. Em células não musculares, a isoforma do citoesqueleto é encontrada ao longo de feixes microfilamentosos e junções aderentes. Em contraste, nos músculos esqueléticos, cardíacos e lisos as isoformas musculares são localizadas no disco Z e corpos densos análogos, os quais ajudam a ancorar os filamentos de actina miofibrilares. Há três variantes de transcritos que codificam diferentes isoformas para gene codificante dessa proteína (localizado na região 14q24) (NCBI, 2014). Segundo Li *et al.* (2012), o gene *ACTN1* é um gene chave na carcinogênese do câncer colorretal e sua proteína possui um papel crucial na adesão celular, estando presente em altos níveis na metástase de câncer de reto. Não observamos nenhum estudo envolvendo a expressão de ACTN1 em câncer gástrico, porém acreditamos que o papel dessa proteína seja semelhante ao observado em câncer de reto.

CAP1 (*adenylate cyclase-associated protein 1*) foi identificada pela primeira vez em levedura como uma proteína que regula a actina do citoesqueleto e a via de Ras/cAMP. Embora o papel na sinalização Ras não se estenda além de leveduras, a evidência suporta que

CAP regula a actina do citoesqueleto em todos os eucariotas, incluindo mamíferos. Em humanos, gene codificante da proteína CAP1 está localizado na região 1p34.2, e ela está envolvida na regulação de filamentos de actina, desempenhando um papel fundamental na motilidade celular também no câncer (NCBI, 2014).

Evidências demonstram uma alta expressão de CAP1 em tumores hepáticos, com estreita relação com as metástases desse tipo de tumor, mas não com outros parâmetros clínico-patológicas (Liu *et al.*, 2013). Recentemente, Tan *et al.* (2013) demonstraram que a expressão de mRNA e proteína de CAP1 foram significativamente maiores tanto em amostras neoplásicas em comparação com as não neoplásicas de tecido pulmonar, quanto em amostras de câncer de pulmão metastático em comparação com as amostras de câncer de pulmão não-metastáticas. Esses autores também descreveram que o sinal CAP1 imunoreativa foi significativamente mais forte em amostras de células metastáticas e na linhagem de câncer de pulmão invasiva (95-D) em comparação com amostras não-metastáticas e de linhagem de câncer de pulmão não metastática (95-C). Adicionalmente, ao realizar experimentos de migração *in vitro* para determinar os efeitos do silenciamento do gene *CAP1* em uma linhagem de câncer de pulmão invasiva (95-D), os autores verificaram que o silenciamento atenuou a capacidade invasiva de células de 95-D *in vitro*. Estes resultados sugerem que o aumento da expressão de CAP1 em células de câncer de pulmão, particularmente na fase de metástase, pode ter implicações clínicas importantes como fator de prognóstico para câncer de pulmão. Não observamos na literatura nenhum trabalho em CG.

A proteína RAB5C (*member RAS oncogene family*) é membros da família de proteínas *Rab* e são *GTPases* pequenas da superfamília *Ras*. São codificadas por gene localizado no cromossomo 17q21.2 e estão presentes para assegurar a fidelidade do processo de ancoragem e/ou fusão das vesículas com o seu compartimento correto (NCBI, 2014). Onodera *et al.* (2012) sugerem que esta proteína possa participar, quando ativada pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), de um mecanismo pelo qual a sinalização EGFR promove a invasão em câncer de mama.

A proteína PLS1 (*plastin 1*), codificada por gene localizado no cromossomo 3q23, é uma proteína da família das plastinas que são proteínas conservadas que se ligam à actina e são expressas na maioria dos tecidos de eucariotas superiores (NCBI, 2014). Erdogan *et al.* (2009), em uma meta-análise, verificou que o transcrito do gene *PLS1* estava significativamente mais expresso em tecidos de adenocarcinoma de pulmão quando comparados com tecidos normais.

SYNE2 (*spectrin repeat containing, nuclear envelope 2*) é uma proteína codificada por um gene localizado na região 14q23.2. Esta é uma proteína de membrana nuclear que se liga a F-actina citoplasmática e tem como principal função manter a integridade estrutural do núcleo (NCBI, 2014). Schoppmann, *et al.* (2013), após análises de expressão por imunohistoquímica, observou uma alta expressão de SYNE2 em tumor estromal gastrointestinal (GIST).

No terceiro grupo, observamos três proteínas com papel conflitante na invasão e metástase tumoral: CAPZA1, FLNA e FLNC.

O gene *CAPZA1* (*capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1*), localizado na região 1p13.2, é um membro da família da actina F. Esse gene codifica a subunidade alfa da proteína de ligação a actina farpado-fim, que regula o crescimento do filamento de actina (NCBI, 2014). Até agora, muito pouco se sabe sobre o papel da proteína do citoesqueleto CAPZA1 e qualquer associação com o câncer, mas alguns estudos demonstraram resultados conflitantes com os apresentados no presente trabalho. Linge *et al.* (2012) revelaram diminuição da expressão de CAPZA1, por imunohistoquímica, em 14 melanomas uveais que, posteriormente, metastatizaram em comparação com aqueles que não o fizeram.

Especificamente em câncer gástrico, Lee *et al.* (2013) não identificaram relação da expressão de CAPZA1 com potencial metastático. Esses autores observaram associação da expressão de CAPZA1 com histologia bem diferenciada, menor tamanho do tumor, menor estágio T, ausência de metástase linfonodal, menor estágio TNM, menor taxa de recorrência e maior tempo de sobrevivência. Adicionalmente, demonstraram, *in vitro*, que a expressão induzida de CAPZA1 causou uma diminuição significativa na migração celular e invasão do câncer gástrico, ao passo que o silenciamento de CAPZA1 teve o efeito oposto. Em outras palavras, esses resultados demonstram que CAPZA1 pode ser um marcador de bom prognóstico em câncer gástrico e mostra que está associada à diminuição da migração celular e invasão do câncer gástrico. Outros estudos devem ser realizados para esclarecer o papel dessa proteína no processo de metástase, já que nossos resultados discordam dos encontrados na literatura.

A FLNA (*filamin A, alpha*) está envolvida na remodelação do citoesqueleto para efetuar alterações na forma da célula e a sua migração é codificada por um gene localizado no cromossomo X (Xq28). Esta proteína interage com as integrinas, os complexos de receptores transmembranas e segundos mensageiros. Defeitos neste gene são uma causa de várias síndromes, incluindo heterotopias periventriculares nodulares, síndromes otopalatodigital,

displasia frontometáfisiana, síndrome de *Melnick-Needles* e pseudo-obstrução intestinal idiopática congênita ligada ao X (NCBI, 2014). Sun *et al.* (2013) demonstraram expressão diminuída de FLNA ao analisar a expressão dessa proteína em 47 casos de câncer gástrico e na linhagem SGC-7901, por imunohistoquímica e western-blot, respectivamente. Nos tumores gástricos, os autores encontraram associação significativa da diminuição da proteína FLNA com a presença de metástase em linfonodos, grau histológico e pior sobrevida global. Esses resultados sugerem que FLNA desempenhe um papel importante como um regulador negativo no câncer gástrico.

O gene *FLNC* (*filamin C, gamma*) localizado no cromossomo 7 (7q32-q35) codifica a proteína FLNC (filamina C), que é uma proteína reticular dos filamentos de Actina e participa na ancoragem das proteínas da membrana com a actina do citoesqueleto (NCBI, 2014). Shin *et al.* (2012), após análise de metilação de promotores de alguns genes no câncer gástrico, observaram que a metilação do promotor do gene *FLNC* estava intimamente associado com uma pior sobrevida no câncer gástrico. Já em 2009, Kim *et al.* verificaram que a metilação do promotor de *FLNC* pode estar envolvida na metástase de linfonodos de carcinoma gástrico. Assim como Mahapatra *et al.* (2012), que após estudo de metilação em câncer de próstata, também verificaram que a metilação do gene *FLNC* está associada a um pior prognóstico deste tipo tumoral.

No quarto grupo, observamos três proteínas sem papel definido na invasão e metástase tumoral: ACTN2, MYL6 e MYL6B.

A ACTN2 (*actinin, alpha 2*) é produto do gene localizado no cromossomo 1 (1q42-q43) também é da família das espectrinas e do grupo de proteínas do citoesqueleto celular; mostrou-se no presente estudo com um aumento de sua expressão na linhagem de câncer gástrico AGP01 em comparação com a linhagem ACP02. Entretanto, não há na literatura nenhuma referência deste gene e/ou sua proteína alterados em tumores.

A MYL6B (*myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle*) é uma *ATPase* celular proteína do motor hexamérica. É composta de duas cadeias pesadas, duas cadeias leves não fosforiladas alcalinas e duas cadeias leves fosforiláveis reguladoras. Este gene (localizado na região 12q13.13) codifica uma cadeia leve de miosina alcalina expressa em contração do músculo esquelético e no tecido não muscular (NCBI, 2014). Não há descrição desta proteína ou de seu gene alterados ou diferencialmente expressos em tipos tumorais.

## 6 CONCLUSÃO

Após a análise proteômica comparativa das linhagens de câncer gástrico AGP01 e ACP02 e identificação das proteínas na via de mobilidade celular, podemos sugerir que algumas proteínas tem efetivamente, de acordo com nossos achados e literatura condizente, associação com a metástase de adenocarcinomas gástricos.

Podemos agrupar as proteínas encontradas com expressão significativa na linhagem AGP01 em quatro categorias. As proteínas com papel bem definido na invasão e metástase em câncer gástrico foram: ACTB, ANXA1, LGALS1, IQGAP1, EZR, MSN, MYH9 e S100A11, que de acordo com nossos achados e a literatura pesquisada, tem associação com a metástase de adenocarcinomas gástricos.

As proteínas com papel definido na invasão e metástase descritas em outras neoplasias foram para mama (RAB5C), pulmão (PLS1 e CAP1), reto (ACTN1) e GIST (SYNE2), as que se mostraram em forte expressão em nosso estudo, mas na literatura pesquisada sua expressão tem relação com as vias de disseminação apenas desses outros tumores.

As proteínas com papel conflitante na invasão e metástase tumoral em comparação ao nosso estudo foram: CAPZA1, FLNA e FLNC, observadas na literatura como um inibidor de avanço tumoral; enquanto que no último grupo, o das proteínas sem papel definido na invasão e metástase tumoral, as expressão das proteínas MYL6, MYL6B, e ACTN2, aparecem pela primeira vez como tendo relação com a mobilidade celular, invasão e metástase em câncer.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Buscando sempre o achado de marcadores biológicos que justifiquem a disseminação metastática dos adenocarcinomas gástricos, sugerimos que essas proteínas que aparecem em nosso estudo, com expressão significativa na linhagem AGP01, devem ser submetidas a imunohistoquímica, devido sua relação com a mobilidade celular, invasão e metástase dos adenocarcinomas gástricos, pois estão envolvidas no processo de agressividade e metástase e seu estudo é essencial para a compreensão do papel molecular das proteínas nesta situação, podendo ser válida para a detecção de possível potencial terapêutico, assim como, de possíveis alvos diagnósticos.

## REFERÊNCIAS

ALAOUI-JAMALI, M.A.; XU, Y.J. Proteomic technology for biomarker profiling in cancer: an update. *J Zhejiang Univ Sci B*, v.7(6), p. 411-20, 2006.

American Joint Committee on Cancer – AJCC. *Cancer Staging Manual*. In: *Digestive System*. Seventh edition. ed. Springer, p. 117-127, 2010.

ANDO, T.; GOTO, Y.; MAEDA, O.; WATANABE, O.; ISHIGURO, K.; GOTO, H. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, v.12 (2), p.181-6, 2006.

ASSUMPÇÃO, P.P. *Atualização em Câncer-Gástrico*. 1º ed. São Paulo: Tecmed Editora. p.95-106, 2005.

BANDO, E.; YONEMURA, Y.; TAKESHITA, Y.; TANIGUCHI, T.; YASUI, T.; FUSHIDA, S.; FUJIMURA, T.; NISHIMURA, G-I.; MIWA, K. Intraoperative lavage form cytological examination in 1297 patients with gastric carcinoma. *AM J Surg*, v. 178, p. 256-262, 1999.

BONENKAMP, J.J.; SOGUN, I.; HERMANS, J.; VAN DE VELDE, C.J. Prognostic Value of positive cytology findings from abdominal washings in patients with gastric câncer. *Br J Surg*, v. 83, p. 672-674, 1996.

BORRMANN, R. *Geschwulste des margens*. In: Henke F, Lubarsch O. editors. *Handbuch spez pathol anat und histo*. Berlim: Springer: Verlag; 1926. p.864-71.

BROLL, R.; WESCHTA, M.; WINDHOEVEL, U.; BERNDT, S.; SCHWANDNER, O.; ROBLICK, U.; SCHIEDECK, T.H.; SCHIMMELPENNING, H.; BRUCH, H.P.; DUCHROW, M. Prognostic significance of free gastrointestinal tumor cells in peritoneal lavage detected by immunocytochemistry and polymerase chain reaction. *Langenbeck's Arch Surg*, p. 285-292, 2001.

BRUCKNER, H.W.; KONDO, T.; KONDO, K. Neoplasms of the stomach. *In: Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E III, Kufe DW, Weichselbaum RR, eds. Cancer medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 1879, p. 22, 1997.

BURBANO, R.R.; ASSUMPCAO, P.P.; LEAL, M.F.; CALCAGNO, D.Q.; GUIMARAES, A.C.; KHAYAT, A.S.; TAKENO, S.S.; CHEN, E.S.; DE ARRUDA CARDOSO SMITH, M. C-MYC locus amplification as metastasis predictor in intestinal-type gastric adenocarcinomas: CGH study in Brazil. *Anticancer research*, v. 26 (4B), p.2909-14, 2006.

CALCAGNO, D.Q.; LEAL, M.F.; SEABRA, A.D.; KHAYAT, A.S.; CHEN, E.S.; DEMACHKI, S.; ASSUMPÇÃO, P.P.; FARIA, M.H.; RABENHORST, S.H.; FERREIRA, M.V.; DE ARRUDA CARDOSO SMITH, M.; BURBANO, R.R. Interrelationship between chromosome 8 aneuploidy, C-MYC amplification and increased expression in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *World Journal Gastroenterol*, v.12 (38), p. 6207-6211, 2006.

CALCAGNO, D.Q.; LEAL, M.F.; TAKEN, S.S.; ASSUMPCAO, P.P.; DEMACHKI, S.; SMITH MDE, A.; BURBANO, R.R. Aneuploidy of chromosome 8 and C-MYC amplification in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *Anticancer research*, v.25 (6B), p.4069-74, 2005.

CHEN, J.; TANG, D.; WANG, S.; LI, Q.G.; ZHANG, J.R.; LI, P.; LU, Q.; NIU, G.; GAO, J.; YE, N.Y.; WANG, D.R. High expressions of galectin-1 and VEGF are associated with poor prognosis in gastric cancer patients. *Tumour Biol*, 2013.

CHEN, J.; ZHOU, S.J.; ZHANG, Y.; ZHANG, G.Q.; ZHA, T.Z.; FENG, Y.Z.; ZHANG, K. Clinicopathological and prognostic significance of galectin-1 and vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, v. 19(13), p. 2073-9, 2013. [DOI: 10.3748/wjg.v19.i13.2073]

CHEN, Q.Y.; XU, W.; JIAO, D.M.; WU, L.J.; SONG, J.; YAN, J.; SHI, J.G. Silence of ezrin modifies migration and actin cytoskeleton rearrangements and enhances chemosensitivity of lung cancer cells in vitro. *Mol Cell Biochem*, v. 377(1-2), p. 207-18, 2013. [DOI: 10.1007/s11010-013-1586-x]

CHENG, T.Y.; WU, M.S.; LIN, J.T.; LIN, M.T.; SHUN, C.T.; HUANG, H.Y.; HUA, K.T.; KUO, M.L. Annexin A1 is associated with gastric cancer survival and promotes gastric cancer cell invasiveness through the formyl peptide receptor/extracellular signal-regulated kinase/integrin beta-1-binding protein 1 pathway. *Cancer*, v. 118(23), p. 5757-67, 2012. [DOI: 10.1002/cncr.27565].

CORREA, P. Gastric cancer: overview. *Gastroenterol Clin North Am*, v.42 (2), p.211-7, 2013.

DE MARTEL, C.; FORMAN, D.; PLUMMER, M. Gastric cancer: epidemiology and risk factors. *Gastroenterol Clin North Am*, v. 42 (2), p. 219-40, 2013.

DEKKER, W.; OP DEN ORTH, J.O. Early gastric cancer. *Clinical Radiology*, v. 46, p. 115-129, 1977.

DEVITA, V.T.JR. The NIH entitlement program. *Nat Rev Clin Oncol*, v.11, p.613, 2009.

DOWLING, P.; O'DRISCOLL, L.; MELEADY, P.; HENRY, M.; ROY, S.; BALLOT, J.; MORIARTY, M.; CROWN, J.; CLYNES, M. 2-D difference gel electrophoresis of the lung squamous cell carcinoma versus normal sera demonstrates consistent alterations in the levels of ten specific proteins. *Electrophoresis*, v. 28 (23), p.4302-10, 2007.

ERDOGAN, E.; KLEE, E.W.; THOMPSON, E.A.; FIELDS, A.P. Meta-analysis of oncogenic protein kinase Ciota signaling in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, v. 15(5), p. 1527-33, 2009. [DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2459]

FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells – A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. John Wiley & Sons Hoboken, New Jersey. 2010.

GOIDIN, D.; MAMESSIER, A.; STAQUET, M.J.; Schmitt, D.; Berthier-Vergnes, O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin

genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem*, v. 295(1), p. 17-21, 2001.

GUIMARAES, A.C.; QUINTANA, L.G.; LEAL, M.F.; TAKENO, S.S.; ASSUMPCAO, P.P.; LIMA, E.M.; KHAYAT, A.S.; CHEN, E.S.; DE ARRUDA CARDOSO SMITH, M.; BURBANO, R.R. Aneuploidy of chromosome 8 detected by fluorescence in situ hybridisation in ACP01 cell line gastric adenocarcinoma. *Clinical and Experimental Medicine*, v.6(3), p.129-33, 2006.

GUO, C.; LIU, S.; WANG, J.; SUN, M.Z.; GREENAWAY, F.T. ACTB in cancer. *Clin Chim Acta*, v. 417, p. 39-44, 2013. [DOI: 10.1016/j.cca.2012.12.012]

HAMAJIMA, N.; NAITO, M.; KONDO, T.; GOTO, Y. Genetic factors involved in the development of *Helicobacter pylori*-related gastric cancer. *Cancer Sci*, v.97 (11), p.1129-38, 2006.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next generation. *Cell*, v. 144, p. 646-674, 2011.

IARC - International Agency for Research on Cancer (2013). Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acessado em: 23 de junho de 2013.

INCA - Instituto Nacional do Câncer (2013). Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acessado em: 23 de junho de 2013.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, v.61, p.69-90, 2011. [DOI: 10.3322/caac.20107]

JIN, J.; JIN, T.; QUAN, M.; PIAO, Y.; LIN, Z. Ezrin superexpressão prevê o mau prognóstico da gástrico adenocarcinoma. *Pathol Diagn*, v.5, p. 7:135, 2012. [DOI: 10.1186/1746-1596-7-135]

JORGE, Y.C.; MATARUCO, M.M.; ARAÚJO, L.P.; ROSSI, A.F.; DE OLIVEIRA, J.G.; VALSECHI, M.C.; CAETANO, A.; MIYAZAKI, K.; FAZZIO, C.S.; THOMÉ, J.A.; RAHAL, P.; OLIANI, S.M.; SILVA, A.E. Expression of annexin-A1 and galectin-1 anti-inflammatory proteins and mRNA in chronic gastritis and gastric cancer. *Mediators Inflamm*, v. 2013, p. 152860, 2013. [DOI: 10.1155/2013/152860]

JUNG, M.; RAMANKULOV, A.; ROIGAS, J. *et al.* In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol*, v. 8, p. 47-59, 2007.

JUNG, W.Y.; KANG, Y.; LEE, H.; MOK, Y.J.; KIM, H.K.; KIM, A.; KIM, B.H. Expression of moesin and CD44 is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *Histopathology*, 2013. [DOI: 10.1111/his.12202]

KIM, J.H.; JUNG, E.J.; LEE, H.S.; KIM, M.A.; KIM, W.H. Comparative analysis of DNA methylation between primary and metastatic gastric carcinoma. *Oncol Rep*, v. 21(5), p. 1251-9, 2009.

LAUREN P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*, v.64, p.31-49, 1965.

LEAL, M.F.; COSTI, L.R.; SILVA, C.E.A.; LAMARÃO, M.F.V.; CALCAGNO, D.Q.; KHAYAT, A.S.; ASSUMPCÃO, P.P.; CABRAL, I.R.; DE ARRUDA CARDOSO SMITH, M.; BURBANO, R.R. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. *Cancer Genetic and Cytogenetic*, 2009.

LEE, K.H.; KUENTANG, M.; CHAN, J.Y.; CHUI, Y.L.; CHEN, E.; YAO, Y.; NGAN, O.M.Y.; LEE, H.S.S. Comparative Proteomics: An Approach to Elucidating the Function of a Novel Gene Called BRE, *Proteomics - Human Diseases and Protein Functions*, Prof. Tsz Kwong Man (Ed.). 2012. ISBN: 978-953-307-832-8, InTech, DOI: 10.5772/29624.

LEE, Y.J.; JEONG, S.H.; HONG, S.C.; CHO, B.I.; HA, W.S.; PARK, S.T.; CHOI, S.K.; JUNG, E.J.; JU, Y.T.; JEONG, C.Y.; KIM, J.W.; LEE, C.W.; YOO, J.; KO, G.H. Prognostic value of CAPZA1 overexpression in gastric cancer. *Int J Oncol*, v. 42(5), p. 1569-77, 2013. [DOI: 10.3892/ijo.2013.1867]

LI, J.N.; ZHAO, G.; WU, J.; WU, B.; YANG, H.; ZHANG, H.H.; QIAN, J.M. Differences in gene expression profiles and carcinogenesis pathways between colon and rectal cancer. *J Dig Dis*, v. 13(1), p. 24-32, 2012. [DOI: 10.1111/j.1751-2980.2011.00551.x].

LI, M.; ZHAO, Z.W.; ZHANG, Y.; XIN, Y. Over-expression of Ephb4 is associated with carcinogenesis of gastric cancer. *Dig Dis Sci*, v. 56(3), p. 698-706, 2011. [DOI: 10.1007/s10620-010-1346-7]

LI, Z.; MIAO, Z.; JIN, G.; LI, X.; LI, H.; LV, Z.; XU, H.M.  $\beta$ ig-h3 supports gastric cancer cell adhesion, migration and proliferation in peritoneal carcinomatosis. *Mol Med Rep*, v. 6(3), p. 558-64, 2012. [DOI: 10.3892/mmr.2012.951]

LIANG, S.; HE, L.; ZHAO, X.; MIAO, Y.; GU, Y.; GUO, C.; XUE, Z.; DOU, W.; HU, F.; WU, K.; NIE, Y.; FAN, D. MicroRNA let-7f inhibits tumor invasion and metastasis by targeting MYH9 in human gastric cancer. *PLoS One*, v. 6(4), p. e18409, 2011. [DOI: 10.1371/journal.pone.0018409]

LIMA, E.M.; RISSINO, J.D.; HARADA, M.L.; ASSUMPCAO, P.P.; DEMACHKI, S.; GUIMARAES, A.C.; CASARTELLI, C.; SMITH, M.A.; BURBANO, R.R. Conventional cytogenetic characterization of a new cell line, ACP01, established from a primary human gastric tumor. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37(12), p.1831-8, 2004.

LIN, L.J.; CHEN, L.T. Association between ezrin protein expression and the prognosis of colorectal adenocarcinoma. *Mol Med Rep*, v. 8(1), p. 61-6, 2013. [DOI: 10.3892/mmr.2013.1490]

LINGE, A.; KENNEDY, S.; O'FLYNN, D.; BEATTY, S.; MORIARTY, P.; HENRY, M.; CLYNES, M.; LARKIN, A.; MELEADY, P. Differential expression of fourteen proteins between uveal melanoma from patients who subsequently developed distant metastases versus

those who did Not. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 53(8), p. 4634-43, 2012. [DOI: 10.1167/iov.11-9019]

LIU, H.; FINCH, J.W.; LUONGO, J.A.; LI, G.Z.; GEBLER, J.C. Development of an online two-dimensional nano-scale liquid chromatography/ mass spectrometry method for improved chromatographic performance and hydrophobic peptide recovery. *J. Chromatograph*, v. 1135, p. 43–51, 2006.

LIU, Y.; CUI, X.; HU, B.; LU, C.; HUANG, X.; CAI, J.; HE, S.; LV, L.; CONG, X.; LIU, G.; ZHANG, Y.; NI, R. Upregulated expression of CAP1 is associated with tumor migration and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract*, 2013. [DOI: 10.1016/j.prp.2013.11.011]

MAHAPATRA, S.; KLEE, E.W.; YOUNG, C.Y.; SUN, Z.; JIMENEZ, R.E.; KLEE, G.G.; TINDALL, D.J.; DONKENA, K.V. Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer. *Clin Cancer Res*, v. 18(10), p. 2882-95, 2012. [DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2090]

MARYAS, J.; FAKTOR, J.; DVORAKOVA, M.; STRUHAROVA, I.; GRELL, P.; BOUCHAL, P. Proteomics in investigation of cancer metastasis: Functional and clinical consequences and methodological challenges. *Proteomics*, v.0, p.1–15, 2014. [DOI: 10.1002/pmic.201300264]

MINCIS, M. *Gastroenterologia e hepatologia: Diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Editora Manole, 2009.

MORI, M.; SHIMADA, H.; GUNJI, Y.; MATSUBARA, H.; HAYASHI, H.; NIMURA, Y.; KATO, M.; TAKIGUCHI, M.; OCHIAI, T.; SEKI, N. S100A11 gene identified by in-house cDNA microarray as an accurate predictor of lymph node metastases of gastric cancer. *Oncol Rep*, v. 11(6), p. 1287-93, 2004.

MORIGUCHI, M.; MAEHARA, Y.; KORENAGA, D.; SUGIMACHI, K.; NOSE, Y. Risk factors which predict pattern of recurrences after curative surgery for patients with advanced gastric cancer. *Surg Oncol*, v. 1, p. 341-346, 1992.

MORRIS, L.E.; BLOOM, G.S.; FRIERSON, H.F.JR.; POWELL, S.M. Nucleotide variants within the IQGAP1 gene in diffuse-type gastric cancers. *Genes Chromosomes Cancer*, v. 42 (3), p. 280-6, 2005.

MU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.; ZHAN, X.; LI, Y.; LIU, T.; LI, G.; LI, M.; XIAO, Z.; GONG, X.; CHEN, Z. Identification of stromal differentially expressed proteins in the colon carcinoma by quantitative proteomics. *Electrophoresis*, v. 34(11), p. 1679-92, 2013. [DOI: 10.1002/elps.201200596]

NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI (2013). The website of the National Cancer Institute. Disponível em: <http://www.cancer.gov>. Acessado em: 20/06/2013.

National Center for Biotechnology Information – NCBI. <Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acessado em: janeiro de 2014.

ONODERA, Y.; NAM, J.M.; HASHIMOTO, A.; NORMAN, J.C.; SHIRATO, H.; HASHIMOTO, S.; SABE, H. Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance  $\beta$ 1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. *J Cell Biol*, v. 197(7), p. 983-96, 2012. [DOI: 10.1083/jcb.201201065]

OSMAN, M.A.; BLOOM, G.S.; TAGOE, E.A. Helicobacter pylori-induced alteration of epithelial cell signaling and polarity: a possible mechanism of gastric carcinoma etiology and disparity. *Cytoskeleton (Hoboken)*, v. 70(7), p. 349-59, 2013. [DOI: 10.1002/cm.21114]

PARK, J.G.; YANG, H.K.; KIM, W.H.; CHUNG, J.K.; KANG, M.S.; LEE, J.H.; OH, J.H.; PARK, H.S.; YEO, K.S.; KANG, S.H.; SONG, S.Y.; KANG, Y.K.; BANG, Y.J.; KIM, Y.H.; KIM, J.P. Establishment and characterization of human gastric carcinoma cell lines. *International journal of cancer*, v.70 (4), p.443-449, 1997.

REYMOND, N.; D'ÁGUA, B.B.; RIDLEY, A.J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature reviews cancer*, v. 13, p. 858-870, 2013.

ROCCO, A.; NARDONE, G. Diet, H pylori infection and gastric cancer: evidence and controversies. *World J Gastroenterol*, v.13 (21), p.2901-12, 2007.

SALAMA, I.; MALONE, P.S.; MIHAIMED, F.; JONES, J.L. A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol*, v. 34(4), p. 357-64, 2008.

SATO, Y.; KUMAMOTO, K.; SAITO, K.; OKAYAMA, H.; HAYASE, S.; KOFUNATO, Y.; MIYAMOTO, K.; NAKAMURA, I.; OHKI, S.; KOYAMA, Y.; TAKENOSHITA, S. Up-regulated Annexin A1 expression in gastrointestinal cancer is associated with cancer invasion and lymph node metastasis. *Exp Ther Med*, v. 2(2), p. 239-243, 2011.

SCHOPPMANN, S.F.; VINATZER, U.; POPITSCH, N.; MITTLBÖCK, M.; LIEBMANN-REINDL, S.; JOMRICH, G.; STREUBEL, B.; BIRNER, P. Novel clinically relevant genes in gastrointestinal stromal tumors identified by exome sequencing. *Clin Cancer Res*, v.19 (19), p.5329-39, 2013. [doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3863].

SHANG, J.; PENA, A.S. Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. *World Journal Gastroenterology*, v. 11(27), p. 4131-9, 2005.

SHI, J.; ZHANG, G.; YAO, D.; LIU, W.; WANG, N.; JI, M.; HE, N.; SHI, B.; HOU, P. Prognostic significance of aberrant gene methylation in gastric cancer. *Am J Cancer Res*, v. 2(1), p. 116-29, 2012.

SUN, G.G.; SHENG, S.H.; JING, S.W.; HU, W.N. An antiproliferative gene FLNA regulates migration and invasion of gastric carcinoma cell in vitro and its clinical significance. *Tumour Biol*. 2013.

SUZUKI, A.; IIZUKA, A.; KOMIYAMA, M.; *et al.* Identification of melanoma antigens using a Serological Proteome Approach (SERPA). *Cancer Genomics Proteomics*, v. 7(1), p. 17-23, 2010.

TAKENO, S.S.; LEAL, M.F.; LISBOA, L.C.; LIPAY, M.V.; KHAYAT, A.S.; ASSUMPCAO, P.P.; BURBANO, R.R.; SMITH, M.de.A. Genomic alterations in diffuse-

type gastric cancer as shown by high-resolution comparative genomic hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics*, v.190(1), p.1-7, 2009.

TAMURA, G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, v. 12(2), p. 192-8, 2006.

TAN, M.; SONG, X.; ZHANG, G.; PENG, A.; LI, X.; LI, M.; LIU, Y.; WANG, C. Overexpression of adenylate cyclase-associated protein 1 is associated with metastasis of lung cancer. *Oncol Rep*, v. 30(4), p. 1639-44, 2013.[DOI: 10.3892/or.2013.2607].

WISNIESKI, F.; CALCAGNO, D.Q.; LEAL, M.F.; DOS SANTOS, L.C.; GIGEK, C.DE O.; CHEN, E.S.; PONTES, T.B.; ASSUMPÇÃO, P.P.; DE ASSUMPÇÃO, M.B.; DEMACHKI, S.; BURBANO, R.R.; SMITH M.DE A. Reference genes for quantitative RT-PCR data in gastric tissues and cell lines. *Mundo J Gastroenterol*, v. 19(41), p. 7121-8, 2013. [DOI: 10.3748/wjg.v19.i41.7121]

WU, C.C.; CHEN, J.T.; CHANG, M.C.; HO, W.L.; CHEN, C.Y.; YEH, D.C.; LIU, T.J.; PENG, F.K. Optional Surgical Strategy for potentially curative serosa involved gastric carcinoma with intraperitoneal free cancer cells. *J AM Coll Surg*, v. 184, p. 611-617, 1997.

WU, Y.; TAO, Y.; CHEN, Y.; XU, W. RhoC regulates the proliferation of gastric cancer cells through interaction with IQGAP1. *PLoS One*, v. 7(11), p. e48917, 2012. [DOI: 10.1371/journal.pone.0048917]

VILA, M.R.; NICOLAS, A.; MOROTE, J. *et al.* Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in renal cell carcinoma identified by RNA-based, arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Câncer*, v. 89(1), p. 152-164, 2000.

ZHANG, Z.Q.; LI, X.J.; LIU, G.T.; XIA, Y.; ZHANG, X.Y.; WEN, H. Identification of Annexin A1 protein expression in human gastric adenocarcinoma using proteomics and tissue microarray. *World J Gastroenterol*, v. 19(43), p.7795-803, 2013. [DOI: 10.3748/wjg.v19.i43.7795]

ZHU, F.; XU, C.; JIANG, Z.; JIN, M.; WANG, L.; ZENG, S.; TENG, L.; CAO, J. Nuclear localization of annexin A1 correlates with advanced disease and peritoneal dissemination in patients with gastric carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)*, v. 293(8), p. 1310-4, 2010. [DOI: 10.1002/ar.21176]