



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

**EXPRESSÃO DOS GENES *TFF1* E *TFF2* EM
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.**

Pedro Antônio Mufarrej Hage

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

**EXPRESSÃO DOS GENES *TFF1* E *TFF2* EM
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.**

Autor: Pedro Antônio Mufarrej Hage

Orientador: Prof. Dr. Paulo Pimentel Assumpção

Coorientador: Profa. Dra. 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

EXPRESSÃO DOS GENES *TFF1* E *TFF2* EM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Pedro Antônio Mufarrej Hage

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. Rommel Mario Rodriguez Burbano – UFPA.

2º EXAMINADOR: _____

Profa. Dra. Samia Demachki - UFPA

3º EXAMINADOR: _____

Prof. Dr. André Salim Khayat – UFPA.

SUPLENTE: _____

Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro – UFPA.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

Instituto Nacional do Câncer - INCA

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Universidade Federal do Pará - UFPA

*Dedico esta dissertação às Pessoas mais importantes
da minha vida:*

Meu Pai Francisco (in memoriam) e minha Mãe Janete.

Minha esposa Cláudia e Meu Filho Lucas.

AMO MUITO VOCÊS.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a DEUS por ter me dado a oportunidade de realizar e concluir este mestrado.

À minha esposa Cláudia pelo seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, pontos fundamentais para que este trabalho pudesse ter sido concretizado.

Ao meu Filho Lucas razão da minha vida, pela paciência, compreensão e apoio tão amoroso nos momentos em que me dediquei à realização deste Mestrado.

Aos meus Orientadores Prof. Dr. Paulo Assumpção e Prof. Dra. Danielle Queiroz Calcagno pelo incentivo, paciência e orientação para que eu pudesse realizar esta dissertação.

À Doutoranda Aline Seabra por ter me ajudado nesta fase final da minha dissertação.

SUMÁRIO

	pág.
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer gástrico	15
1.2 Classificações clínico-histopatológicas das neoplasias gástricas	17
1.3 Aspectos genéticos do câncer gástrico	22
1.4 Fatores Trifólios	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Tecidos gástricos	29
3.2 Extração de RNA	29
3.3 <i>Microarray</i>	30
3.3.1 ADIÇÃO DE CONTROLES EXÓGENOS	30
3.3.2 SÍNTESE DO CDNA	30
3.3.3 SÍNTESE E QUANTIFICAÇÃO DO RNA COMPLEMENTAR	31
3.3.4 SÍNTESE DE CDNA E FITA SIMPLES DE DNA	31
3.3.5 HIDRÓLISE DO RNA COMPLEMENTAR, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA FITA SIMPLES DE DNA	33
3.3.6 FRAGMENTAÇÃO DA FITA SIMPLES DE DNA	33
3.3.7 MARCAÇÃO DE DNA FITA SIMPLES FRAGMENTADO	33
3.3.8 HIBRIDAÇÃO	34
3.3.9 LAVAGEM E COLORAÇÃO	34
3.3.10 LEITURA	34
3.3.11 PROCESSAMENTO DOS DADOS	35
3.3.12 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	35

3.3.13 ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	36
3.4 Validação dos Resultados qRT-PCR	36
3.5 Análise estatística	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Genes diferencialmente expressos em adenocarcinoma gástrico em relação ao tecido gástrico não-neoplásico adjacente	38
4.2 Quantificação relativa da expressão de <i>TFF1</i> e <i>TFF2</i>	42
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXO I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UFPA/HUJBB	57
ANEXO II - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP	58
ANEXO III - Termo de consentimento livre e esclarecido UFPA/HUJBB	60
ANEXO IV - Termo de consentimento livre e esclarecido UNIFESP/HSP	61
ANEXO V - Tabela descritiva das amostras de adenocarcinoma gástrico	63

RESUMO

O câncer gástrico permanece como grave problema de saúde pública, com elevada morbidade e mortalidade. Os diagnósticos ocorrem, na maioria dos casos, em estágios avançados da doença, situação na qual as opções terapêuticas disponíveis apresentam reduzida eficácia. Não obstante o avanço do conhecimento a respeito da carcinogênese do adenocarcinoma gástrico, em especial sobre mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos, a aplicabilidade clínica destes conhecimentos permanece limitada. Objetivando identificar potenciais biomarcadores no câncer gástricos, foi realizado estudo utilizando *microarray*, comparando-se expressões gênicas em adenocarcinomas gástricos e amostras pareadas de mucosa gástrica não neoplásica. Os resultados preliminares demonstraram diferenças significativas de expressão em 53 genes. Dentre estes, foram selecionados os genes *TFF1* e *TFF2* para validação da expressão por PCR em tempo real em 78 amostras adicionais. As expressões de *TFF1* e *TFF2* foram significativamente reduzidas em amostras de adenocarcinoma gástrico, quando comparas aos tecidos pareados não neoplásicos ($p < 0,05$). Adicionalmente, a expressão do gene *TFF2* foi significativamente mais reduzida no tipo intestinal do que no tipo difuso. A expressão dos dois genes apresentou uma forte correlação, o padrão de expressão semelhante sugere que *TFF1* e *TFF2* podem partilhar elementos reguladores comuns. Essa hipótese é intensificada devido a pequena distancia física entre eles. Os resultados sugerem fortemente a participação de *TFF1* e *TFF2* na carcinogênese gástrica e demonstram um potencial para utilização clínica dos referidos genes como biomarcadores e eventuais alvos terapêuticos no adenocarcinoma gástrico.

Palavras-chave: adenocarcinoma gástrico, biomarcador, *TFF1*, *TFF2*.

ABSTRACT

Gastric cancer remains a serious public health problem with high morbidity and mortality. Generally, the diagnoses occur in advanced disease when the available therapeutic options have limited effectiveness. Despite advances in the understanding of carcinogenesis of gastric adenocarcinoma, particularly on genetic and epigenetic mechanisms involved, the clinical applicability of such knowledge remains limited. In order to identify potential biomarkers in gastric cancer, we conducted a study using microarray comparing gene expression in gastric adenocarcinomas and paired samples of non-neoplastic gastric mucosa. Preliminary, the results showed significant differences in expression of 53 genes. Among these, the *TFF1* and *TFF2* genes were selected for validation of expression by real-time PCR in 78 additional samples. Expression of *TFF1* and *TFF2* were significantly reduced in samples of gastric adenocarcinoma when you compare the paired non-neoplastic tissues ($p < 0.05$). Additionally, the *TFF2* gene expression was significantly lower in the intestinal subtype than in the diffuse subtype. The expression of the two genes showed a strong correlation, the similar pattern of expression suggests that *TFF1* and *TFF2* may have common regulatory elements. This hypothesis is enhanced due to the small physical distances between them. The results suggest the involvement of *TFF1* and *TFF2* in gastric carcinogenesis and demonstrate the potential for clinical use of these genes as biomarkers and potential therapeutic targets in gastric adenocarcinoma.

Keywords: biomarker, gastric adenocarcinoma, TFF1, TFF2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1 – Aspecto microscópico dos tipos histológicos de Laurén	18
Figura 2 – Sequências e eventos moleculares propostos no processo de carcinogênese gástrica dos tipos difuso e intestinal.	23
Figura 3 – Comparação das conformações de esqueleto e as orientações das cadeias laterais semi-conservadas e conservadas resíduos de aminoácidos hidrofóbicos solventes acessíveis em TFF1, TFF2 e TFF3	26
Figura 4 – Fluxograma das etapas de processamento e hibridação do <i>GeneChip® Gene 1.0 ST Array</i>	32
Figura 5 – Quantificação Relativa (RQ) da expressão dos genes <i>TFF1</i> e <i>TFF2</i> em adenocarcinoma gástrico em relação ao tecido não neoplásico adjacente.	42
Figura 6 – Quantificação Relativa (RQ) da expressão do gene <i>TFF2</i> em adenocarcinoma gástrico em relação ao tecido não neoplásico adjacente nos tipos intestinal e difuso.	43

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Definição do TNM patológico para o câncer gástrico.	20
Tabela 2 – Agrupamento por estadiamento para o câncer gástrico	21
Tabela 3 – Amostras de adenocarcinoma gástrico primário utilizadas para análise de <i>microarray</i>	29
Tabela 4 – Ensaios com sonda de hidrólise <i>TaqMan</i> [®] para análise de expressão dos genes selecionados por <i>microarray</i>	37
Tabela 5 – Genes diferencialmente expressos entre amostras pareadas de adenocarcinoma gástrico e tecido gástrico não neoplásico adjacente (long-rank p-value <0.05; n=4)	39
Tabela 6 – Comparação dos valores de RQ dos genes <i>TFF1</i> e <i>TFF2</i> com os dados clinicopatológicos dos pacientes com câncer gástrico	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
CG	Câncer Gástrico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
EBV	Vírus Epstein-Barr
AJCC	American Joint Committee on Cancer
UICC	Union Internationale contre Le Cancer
TNM	Tumor Nódulos Metastase
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UFPA	Universidade Federal do Pará
CpG	ligações fosfodiéster entre a citosina e a guanina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
TFFs	Fatores Trifólios
TFF1	Fator Trifólio 1
TFF2	Fator Trifólio 2
TFF3	Fatores Trifólios 3
pb	Pares de base
MUC6	Mucina 6
HUJBB	Hospital Universitário João de Barros Barreto
HSP	Hospital São Paulo
RNA	Ácido Ribonucléico
cRNA	Ácido Ribonucléico Complementar
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
dUTP	Deoxiuridina-trifosfato
TdT	Deoxynucleotidyl transferase
RMA	Robust Multi-array Average
GCOS	GeneChip [®] Operating Software
IRQ	Inter-Quartile-Range
RP	RankProd
IPA	Ingenuity Pathways Analysis
qRT-PCR	Quantificação da expressão utilizando reação de transcriptase reversa, seguida

	de reação em cadeia da polimerase.
Ct	cycle threshold
RQ	quantificação relativa
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
UDG	uracil DNA glicosilase

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer gástrico

O câncer representa um grave problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-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).

Dentre todos os diferentes tipos de câncer que afetam o homem, o câncer gástrico (CG) (CID-1º 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).

A epidemiologia do CG envolve várias características; sua prevalência, por exemplo, sofre influência de fatores geográficos, étnicos e culturais (Neugut *et al.*, 1996). As taxas mais elevadas de incidência dessa neoplasia são observadas no Leste Asiático, na Europa Oriental e América do Sul (Howe *et al.*, 2006, Jemal *et al.*, 2007; Jemal *et al.* 2011).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 20.000 casos novos de CG 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, 2014).

O Estado do Pará apresenta elevada incidência de CG e essa neoplasia ocupa a segunda posição entre os homens e a quarta entre as mulheres (INCA, 2013).

A etiologia do CG é multifatorial, os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento são divididos em três categorias: meio ambiente, nutricional e fatores genéticos (Mincis, 2009).

A associação da infecção por *Helicobacter pylori* com o CG 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 (IARC, 1994).

Os avanços imunológicos de detecção permitiram observar outro possível agente etiológico além da bactéria *H. Pylori*, o vírus Epstein-Barr (EBV), que está relacionado ao desenvolvimento de diferentes tumores sólidos, entre eles o CG (Lima *et al.*, 2008). Foi relatada a presença do vírus Epstein-Barr em 5% a 16% dos tumores gástricos. A presença do

vírus é mais frequente em homens, em tumores da região cárdia ou do corpo gástrico. Assim, acredita-se que esse vírus também contribua para o processo de malignização de células de estômago (Murphy *et al.*, 2009).

Alguns hábitos alimentares podem contribuir para o risco de desenvolvimento do CG. Populações com um alto risco para o desenvolvimento dessa neoplasia consomem alimentos ricos em amido e pobres em qualidade proteica, bem como baixa ingestão de frutas e verduras frescas (Krejs, 2010; Berretta *et al.*, 2012). Adicionalmente, o alto consumo de sal ou sódio, componentes chave na preservação de alimentos, foi associado positivamente ao aumento da incidência e mortalidade por CG (Park *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que o consumo regular de bebidas alcoólicas e o tabagismo também aumentam o risco de CG (Sjodahl *et al.*, 2007). Além disso, o histórico de tabagismo é fator de risco para o óbito de pacientes que realizaram a ressecção cirúrgica do tumor gástrico primário (Sjodahl, 2010).

Aproximadamente 80% dos pacientes com CG 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).

Em casos mais avançados os sintomas são mais prevalentes. Os pacientes podem apresentar, de acordo com a localização do tumor: vômitos tardios, hematêmese e/ou melena, disfagia precoce ou tardia (Mincis, 2009).

Ao exame físico pode-se encontrar massas palpáveis no epigástrico, ascite, icterícia (quando há metástases hepáticas), gânglios de Virchow (gânglio endurecido na fossa supraclavicular esquerda), sinal de irmã Maria José (nódulo na região umbilical), prateleira de Blummer (irregularidade no fundo de saco de Douglas ao toque retal) (Mincis, 2009).

Esse tipo de neoplasia é largamente resistente à radioterapia e à quimioterapia, sendo a gastrectomia total ou subtotal, associada à linfadenectomia, ainda o principal tratamento para pacientes com CG. Entretanto, somente 30 a 50% dos pacientes com esse tumor podem ser operados. Mesmo para pacientes que são submetidos à ressecção total, a taxa de recorrência ainda é elevada (Hejna *et al.*, 2006).

Apesar dos quimioterápicos adjuvantes serem investigados por mais de 40 anos, pouco benefício na sobrevida dos pacientes com CG é observado. Como consequência, o CG apresenta um prognóstico desfavorável e a sobrevida média cumulativa após 5 anos do diagnóstico da doença é estimada em aproximadamente 20% (Nagini, 2012). Por outro lado,

quando o tumor é detectado e tratado antes de invadir a camada muscular do estômago, a taxa de sobrevivência em 5 anos após o diagnóstico da doença pode chegar a 90% (Miyahara *et al*, 2007).

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 da conduta terapêutica de forma mais precisa.

1.2 Classificações clínico-histopatológicas das neoplasias gástricas

O CG é definido como qualquer neoplasia maligna que se estende entre a junção gastroesofágica e o piloro, e pode atingir diferentes camadas de tecido (mucosa, submucosa, muscular, subserosa e serosa).

Diferentes tipos de câncer podem incidir no estômago. O adenocarcinoma, quando o tumor originou-se na mucosa, é o tipo mais comum de câncer do trato digestivo, correspondendo aproximadamente 90-95% dos casos (Shang e Pena, 2005). Portanto, as citações ao CG neste documento referir-se-ão exclusivamente ao adenocarcinoma.

Há várias propostas de classificação microscópica para o CG. A classificação de Borrmann classificou os tumores gástricos de acordo com o aspecto endoscópico macroscópico da lesão em Tipo I (polipoide), Tipo II (ulcerado de limites bem definidos), Tipo III (ulcerados de limites imprecisos) e tipo IV (infiltrativo com limite plástica) (Borrmann, 1926). Entretanto, a classificação histológica de CG mais utilizada no ocidente é a estabelecida por Laurén, 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 pobremente 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 (Figura 1). Pode ser observado com menos frequência, uma forma intermediária entre os dois tipos histológicos, denominada de “padrão misto” (Laurén, 1965).

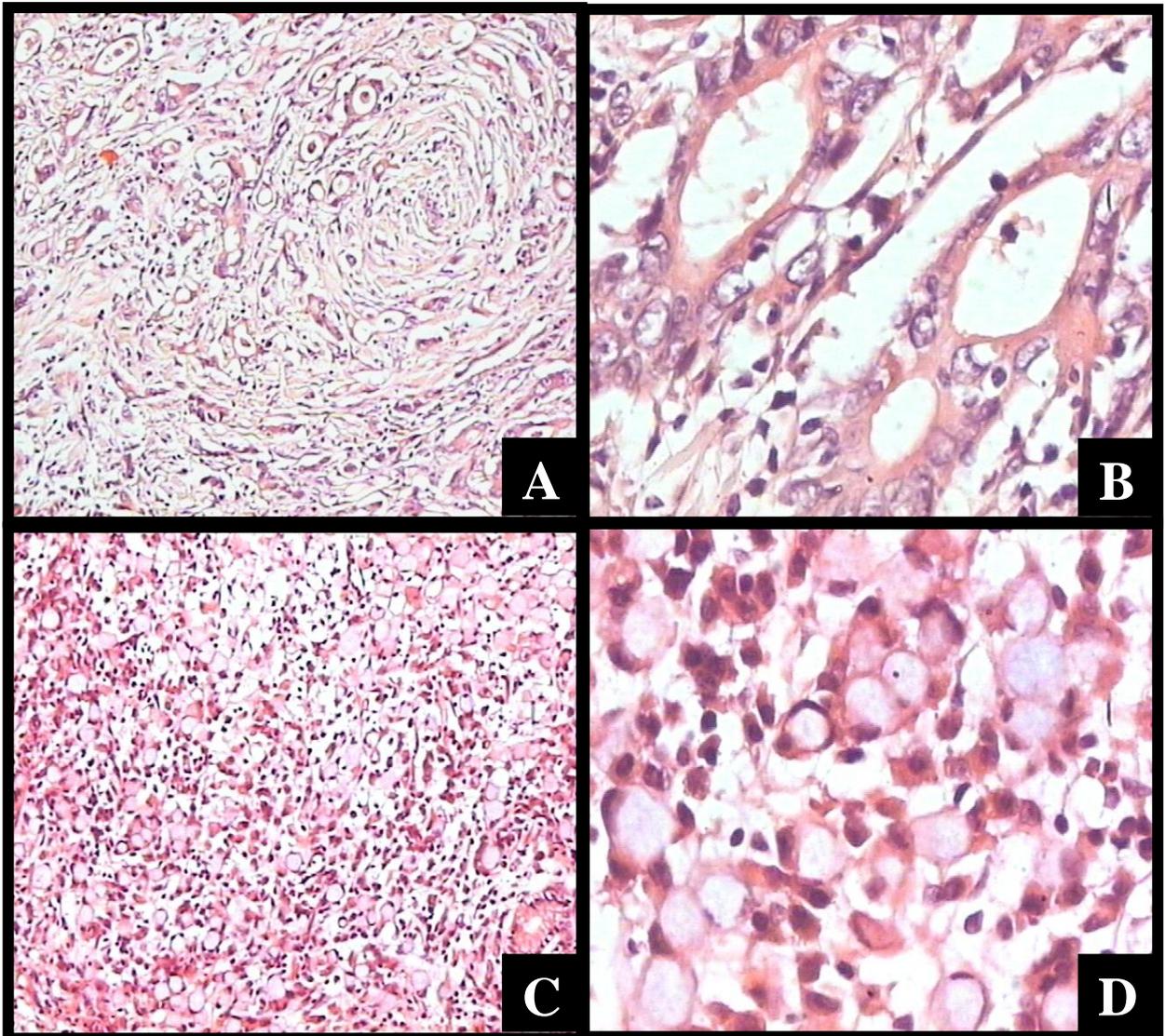


Figura 1 – Aspecto microscópico dos tipos histológicos de Laurén (HE). No tipo intestinal, neoplasia forma glândulas desorganizadas, 200x (A); e as células neoplásicas formam cordões sólidos, 400x (B). No tipo difuso o tumor infiltra difusamente todas as camadas do estômago, e o melhor lugar para identificar 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 tipo intestinal geralmente está associado à presença de lesões pré-cancerosas, como gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal e displasia (Smith *et al.*, 2006). Acredita-se que a obesidade, a infecção por *H. Pylori* e o alto consumo de sal, alimentos defumados e em conserva contendo nitritos e nitratos podem influenciar nesse processo de transformação maligna de células da mucosa gástrica. Além disso, esse tipo histológico apresenta um melhor prognóstico e ocorre mais frequentemente em homens e em idosos

(Nagani *et al.*, 2012). Enquanto que o tipo difuso de adenocarcinoma gástrico, geralmente relacionado a fatores hereditários, não é caracterizado por lesões pré-neoplásicas, além da gastrite crônica associada com a infecção por *H. Pylori*. Esse tipo tumoral ocorre mais frequentemente em mulheres e pacientes jovens (César *et al.*, 2002; Tahara, 2004; Smith *et al.*, 2006)

O estadiamento desses tumores é determinado pela classificação TNM estabelecida pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e pela *Union Internationale contre Le Cancer (UICC)* (Graziosi *et al.*, 2013). O sistema de estadiamento pode ser clínico ou patológico. A avaliação clínica é realizada com base na extensão do tumor, por meio de exames físicos auxiliado por exames radiográficos, endoscópicos e histológicos. Enquanto que a avaliação do estadiamento patológico, definido como pTNM (Tabela 1), é efetuado pela análise macro e microscópica do tumor, visando observar a profundidade da invasão, a presença de linfonodos comprometidos e de metástase à distância. 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. Em contra partida, “M” estabelece a ausência ou a presença de metástase à distância. Por conseguinte, o resultado do pTNM determina o estadio da doença (Tabela 2), o qual é diretamente relacionado com o prognóstico do paciente (UICC, 2009).

Tabela 1 – Definição do TNM patológico para o câncer gástrico (Adaptado da Classificação TNM – UICC, 2009).

Tumor primário (pT)	
TX	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 que invade a lâmina própria, mucosa muscular ou submucosa
T1a	Tumor que invade a lâmina própria ou mucosa muscular
T1b	Tumor que invade a submucosa
T2	Tumor que invade a muscular própria
T3	Tumor que penetra o tecido conectivo subseroso sem invasão do peritônio visceral ou de estruturas adjacentes. Tumores T3 também incluem aqueles que se estendem para o ligamento gastro-cólico ou gastro-hepático ou no omento maior ou menor, sem perfuração do peritônio visceral cobrindo estas estruturas
T4	Tumor que invade a serosa (peritônio visceral) ou estruturas adjacentes
T4a	Tumor que invade a serosa (peritônio visceral)
T4b	Tumor que invade estruturas adjacentes, como o baço, cólon transverso, fígado, diafragma, pâncreas, parede abdominal, glândula adrenal, rim, intestino delgado e retroperitônio
Linfonodos regionais (pN)	
NX	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 7-15 linfonodos regionais
N3b	Metástase em 16 ou mais linfonodos regionais
Metástase a distância (pM)	
MX	Presença de metástase a distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase a distância
M1	Metástase à distância

Tabela 2 – Agrupamento por estadiamento para o câncer gástrico (Adaptado da Classificação TNM – UICC, 2009).

Estadiamento	Combinações TNM		
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T1	N1	M0
	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
IIB	T1	N2	M0
	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
IIIA	T1	N3	M0
	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T2	N3	M0
	T4b	N0 ou N1	M0
	T4a	N2	M0
IIIC	T3	N3	M0
	T4b	N2 ou N3	M0
IV	T4a	N3	M0
	Qualquer	Qualquer	M1

O CG é definido como precoce quando o adenocarcinoma está restrito à mucosa e à submucosa, independente de sua extensão em superfície e da presença ou não de metástase ganglionar. Esse tipo de adenocarcinoma possui um bom prognóstico (Dekker e Op Den Orth, 1977).

Infelizmente, a maioria das neoplasias gástricas é diagnosticada na fase avançada, em função dos sintomas manifestarem-se geralmente somente nessa fase da doença. O tumor

gástrico é considerado avançado quando invade as camadas mais profundas da parede do estômago (invade além da submucosa), podendo ou não apresentar metástase nos linfonodos e em órgãos adjacentes (Macdonald, 1992).

1.3 Aspectos genéticos do câncer gástrico

A progressão de um tumor a partir de células normais para pré-tumorias, câncer, invasão local e finalmente metástases resulta da expansão clonal de células que adquiriram uma vantagem seletiva de crescimento, que lhes permite superar as células circunjacentes (Assumpção e Burbano, 2005).

O CG constitui um interessante modelo de estudo da carcinogênese, pois a identificação de diferentes alterações genéticas no adenocarcinoma do tipo intestinal e difuso sugere que os tipos histológicos seguem vias genéticas distintas (Tahara *et al.*, 2004). Entretanto, ambos os tipos histológicos possuem algumas alterações genéticas comuns (Tamura *et al.*, 2006). No entanto, ainda é controversa a identificação dos genes responsáveis pela iniciação e progressão do câncer gástrico (Figueiredo *et al.*, 2013). As alterações moleculares que são observadas no desenvolvimento e progressão do CG são principalmente a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais (Nagini, 2012).

Os oncogenes são responsáveis pelo crescimento, multiplicação e diferenciação da célula normal. Uma variedade de eventos genéticos, como, por exemplo, mutações pontuais, microdeleções, inserções, justaposição e alterações cromossômicas, podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasias (Mullauer *et al.*, 2001).

Os genes supressores tumorais tem a função primária de reparar o DNA, manter as células em estado de repouso após um dano no DNA e ou ainda iniciar o processo de apoptose caso o defeito do DNA não seja reparado. Vários mecanismos podem levar a inativação dos genes supressores tumorais incluindo alterações cromossômicas em larga escala ou mutações pontuais. No entanto, na maioria dos casos, ambos os alelos do gene deve ser comprometido para abolir o funcionamento do gene, a menos que a proteína mutada possa agir de uma forma negativamente dominante para bloquear a atividade de seu tipo selvagem homólogo (Delbridge *et al.*, 2012).

Alterações de oncogenes *ERBB2 (HER-2)*, *MYC*, *MET (HGFR)*, *KRAS*, *CTNNB1* (β -catenina), *FGFR2 (KAM)* e *CCNE1 (ciclina E1)*, assim como de genes supressores tumorais *TP53*, *CDKN2A (TP16 e TP14)*, *APC*, *RB*, *DCC*, *RUNX* e *CDH1* (E-caderina) têm sido frequentemente descritas no processo de múltiplos passos da carcinogênese gástrica (Nagini,

2012; Panani, 2008; Vauhkonen *et al.*, 2006). A Figura 2 apresenta um esquema de vias hipotéticas na carcinogênese gástrica proposto por Vauhkonen *et al.* (2006).

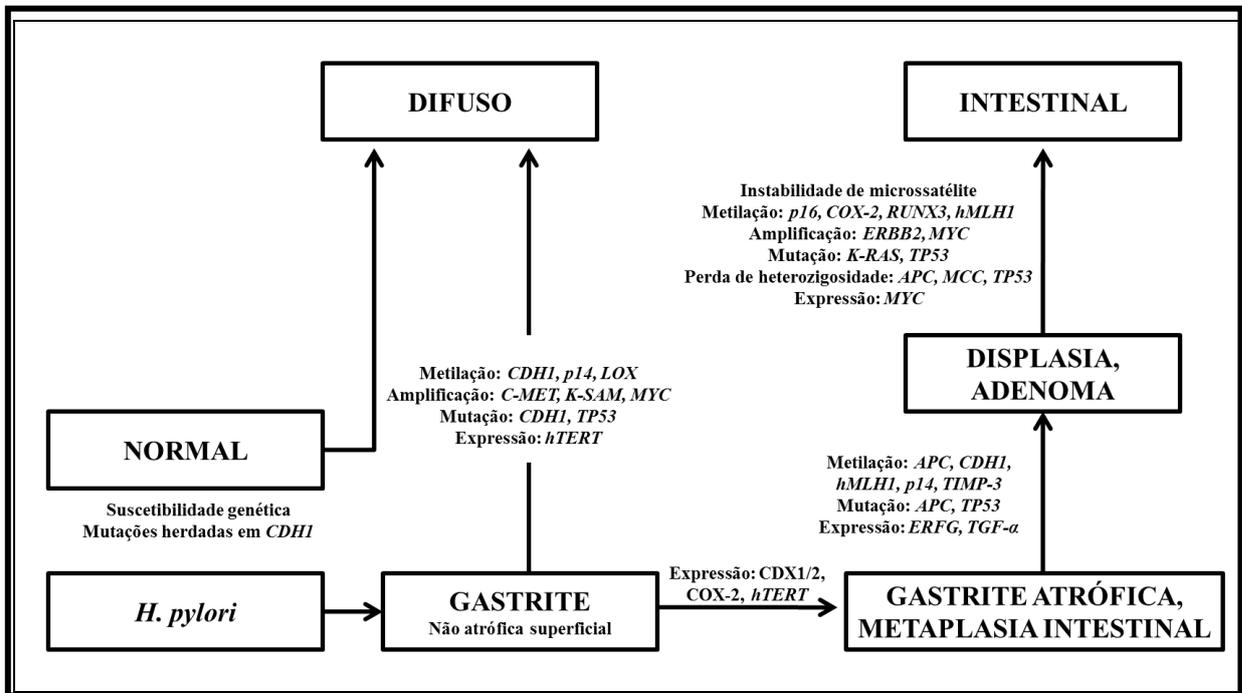


Figura 2 - Sequências e eventos moleculares propostos no processo de carcinogênese gástrica dos tipos difuso e intestinal (Adaptado de Vauhkonen *et al.*, 2006)

Estudos anteriores realizados na Disciplina de Genética da UNIFESP e no Laboratório de Citogenética Humana da UFPA constataram que alterações do gene *MYC*, localizado na região 8q24, e de seu produto proteico são frequentes em tumores primários e em linhagens celulares de CG, bem como em lesões pré-neoplásicas (Assumpção *et al.*, 2006; Burbano *et al.*, 2006; Leal *et al.*, 2009; Calcagno *et al.*, 2005; 2006; 2008; 2009; 2010). Adicionalmente, foi visto que alterações de *MYC* (amplificação e aumento da expressão) parecem contribuir para o processo de carcinogênese gástrica em primatas não humanos tratados com N-metil-N-nitrosourea (da Costa *et al.*, 2011).

Esses laboratórios também avaliaram o número de cópias do locus *TP53*, um importante gene supressor tumoral localizado na região 17p13, em tumores gástricos primários e linhagens celulares. Deleção de *TP53* e aneuploidia do cromossomo 17 (ganhos e perdas) foram observadas em todos os tumores e linhagens celulares de CG estabelecidas pelo grupo de pesquisa (Khayat *et al.*, 2009; Leal *et al.*, 2011).

Além das alterações genéticas e genômicas descritas no CG, as alterações epigenéticas desempenham um papel importante na iniciação e progressão do câncer, resultando na desregulação da expressão gênica e das funções associadas a esses genes (Ropero e Esteller, 2007; Jones e Baylin, 2007). Os mecanismos epigenéticos consistem em alterações gênicas, herdadas mitóticas ou meioticamente, e que não podem ser explicitadas por modificações na sequência básica do DNA.

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais descrito em CG (Calcagno *et al.*, 2013; Gigeck *et al.*, 2012). Esse mecanismo refere-se à adição ou subtração de um radical metil na posição 5' do anel citosina dentro dinucleótidos CpG que estão normalmente localizadas nas regiões ricas em CpG ou ilhas CpG e em torno do promotor do gene. A metilação do DNA nas regiões promotoras de genes reprime a sua transcrição (Jones e Takai, 2001). No entanto, a metilação em corpos de genes não bloqueia a transcrição e está por vezes associada com a transcrição ativa (Baylin e Ohm, 2006).

A perda da regulação gênica decorrente de alterações no perfil de metilação do DNA inclui a hipometilação, gerando ativação de oncogenes e instabilidade cromossômica, hipermetilação e conseqüente silenciamento de genes supressores tumorais (Esteller *et al.*, 2001; Feinberg, 2004; Selaru *et al.*, 2009).

O nível de metilação nos longos elementos transponíveis intercalados (LINE-1) surgiu como um prognóstico promissor ou biomarcador preditivo em CG (Baba *et al.*, 2013). Bae *et al.*, (2012) observaram metilação diminuída em LINE-1 durante a transição de metaplasia intestinal para adenoma gástrico e não ocorreu nenhuma diminuição entre a transição de adenoma gástrico para CG. Os autores também reportaram que a hipometilação em LINE-1 foi fortemente associada com pior prognóstico em CG.

Vários estudos foram publicados sobre hipermetilação na região promotora de genes em adenocarcinomas gástricos. Curiosamente, o perfil de metilação varia entre os tipos intestinal e difuso (Gigeck *et al.*, 2012; Calcagno *et al.*, 2013). O gene *CDH1* tem uma regulação baixa em tumores gástricos e é hipermetilado mais frequentemente no tipo difuso do que no intestinal (Yamamoto *et al.*, 2011; Cavallaro *et al.*, 2006). Ao contrário do gene *CDH1*, o gene *TP16* é hipermetilado principalmente em adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (Lima *et al.*, 2008; Ksiaz *et al.*, 2009; Selaru *et al.*, 2009).

Apesar do crescente número de pesquisas, as alterações genéticas e epigenéticas no CG ainda não estão bem definidas e o conhecimento molecular pode ser muito valioso no tratamento do câncer gástrico permitindo, por exemplo, uma avaliação do risco de câncer, o

diagnóstico precoce, prever o prognóstico dos pacientes e/ou avaliação da sensibilidade a drogas quimioterápicas.

O perfil de expressão com comparações de tumores gástricos com tecido gástrico não-neoplásico adjacente pode fornecer tal conhecimento. Portanto, no presente trabalho, após definir o perfil de expressão de tumores gástricos em amostras do Estado do Pará foram selecionados dois genes diferencialmente expressos da família trifólios (*TFF1* e *TFF2*) para validação em um maior número de amostras e verificar possíveis associações clínicas.

1.4 Fatores Trifólios

Fatores Trifólios (*TFFs*) constituem uma família de três pequenos peptídeos (*TFF1*, *TFF2* e *TFF3*) (Nomura, 2011). Os peptídeos foram nomeados devido a existência de 3-estruturas comuns em laço (*loop*) (Figura 3), as quais tornam os peptídeos extremamente estáveis em relação a digestão proteolítica e a degradação por ácido e calor (Aikou *et al.*, 2011). Embora *TFFs* tenham sido envolvidos na proteção do trato gastrointestinal contra a lesão de mucosa, evidências recentes convincentes surgiram a partir de estudos experimentais e clínicos, que indicam um papel essencial dos *TFFs* na transformação oncogênica, crescimento e extensão de metástases de tumores sólidos comuns em seres humanos, incluindo o CG (Soyoung *et al.*, 2013). Além disso, os níveis séricos de *TFFs* em doentes com vários cânceres têm sido relatado como biomarcadores úteis para prever a presença do câncer (Soyoung *et al.*, 2012).

Os genes que codificam os *TFFs* estão agrupados *in tandem* dentro de uma sequência de 50.000 pb (par de bases) na região cromossômica 21q22.3 (Gott *et al.*, 1996).

Investigações indicaram que a expressão dos *TFFs* é regulada através de motivos localizados dentro de um fragmento de menos de 1000 pb em sua região flanqueadora 5' (Beck *et al.*, 1998).

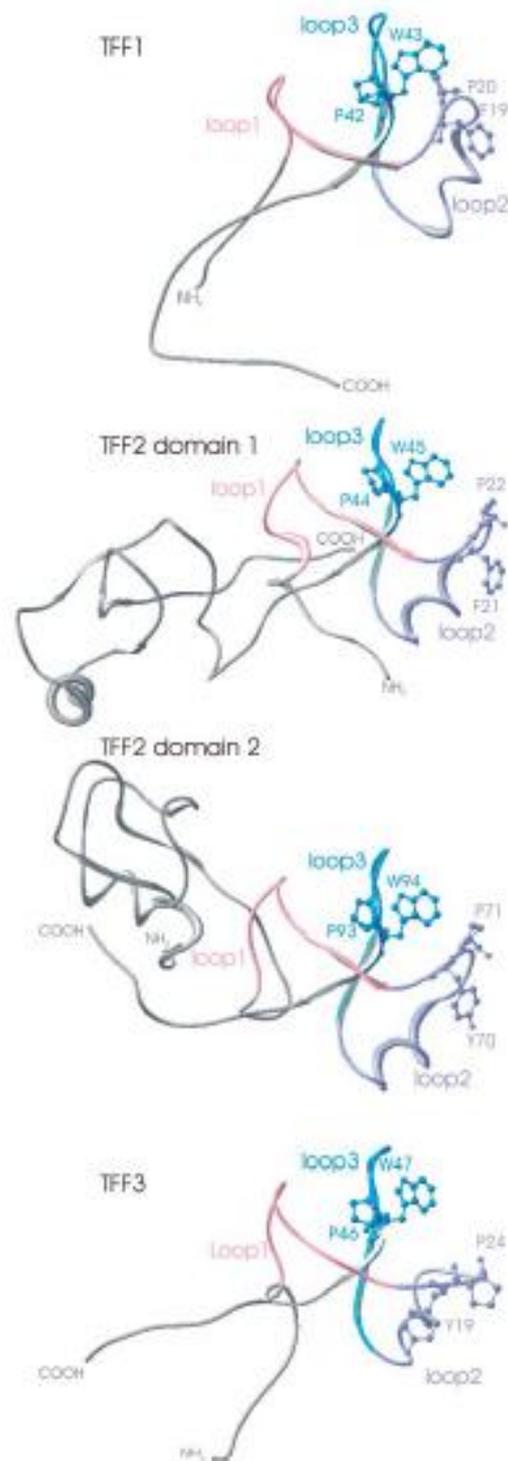


Figura 3. Comparação das conformações de esqueleto e as orientações das cadeias laterais semi-conservadas e conservadas resíduos de aminoácidos hidrofóbicos solventes acessíveis em TFF1, TFF2 e TFF3. Todos os resíduos de aminoácidos em *loop 1*, *loop 2* e *loop 3* são coloridos cor de rosa, roxo e azul, respectivamente. Os resíduos remanescentes nas moléculas são de cor cinza. As cadeias laterais dos quatro resíduos de aminoácidos hidrofóbicos são representadas em uma estrutura de esfera e bastão (Thim e May, 2005).

Normalmente, os TFFs são largamente expressos e de uma forma específica no trato gastrointestinal. O gene *TFF1* é expresso nas células superficiais da mucosa gástrica; *TFF2* é expresso nas células do fundo gástrico, células das glândulas profunda do antro e glândulas de Brunner do duodeno; e *TFF3* é expresso nas células calciformes do intestino delgado e grosso (Henry *et al.*, 1991; May e Westley, 1997). Entretanto, quando há lesão aguda na mucosa gástrica essa distribuição distinta desaparece.

Os TFFs podem proteger contra lesões induzidas pelo estresse, pelo uso de aspirina ou indometacina (Cook *et al.*, 1998; Poulsen *et al.*, 1999; Nie *et al.*, 2003). Alison *et al.* (1995) demonstraram que, quando há lesão aguda na mucosa gastrointestinal, a expressão dos TFFs aumenta em torno da mucosa ferida. Estes resultados sugerem que os TFFs são fatores relacionados às lesões agudas da mucosa gastrointestinal. Shi *et al.* (2005) observou que os TFFs podem recuperar lesão aguda da mucosa, mas não lesão crônica. Esses autores também sugeriram que a elevada expressão de *TFF1* e *TFF2* em mucosa normal indica que *TFF1* e *TFF2* estão relacionadas com a renovação fisiológica de células da mucosa gástrica normais.

O gene *TFF1* é um gene supressor de tumor e tem propriedades anti-proliferativas (Park, 2000; Bossenmeyer Pourie, 2002). É uma proteína de secreção, que assume uma função de proteção da mucosa gástrica, produzindo muco gástrico. Geralmente, são observadas mutações e alterações na expressão desse gene em CG. A diminuição da expressão de *TFF1* em CG poder ser um sinal da deterioração da mucosa gástrica (Shi *et al.*, 2005).

TFF2 é um peptídeo de secreção composto por 106 resíduos de aminoácidos (Hoffmann *et al.*, 2001; Hoffmann e Jagla, 2002). No ser humano, o principal local da expressão de *TFF2* é no estômago (Tomasetto *et al.*, 1990), onde ele é secretado em conjunto com a mucina MUC6 por glândulas cardíacas, as células mucosas do colo e as células de glândulas antrais (Hanby *et al.*, 1993; Ota *et al.*, 2006). Além disso, o *TFF2* está fortemente associado com o muco gástrico e promove a restituição gástrica (Hanisch *et al.*, 2012).

Aikou *et al.* (2011) confirmaram a origem gástrica de *TFF1* e *TFF2* demonstrando a diminuição do nível de expressão no soro de pacientes após a gastrectomia. Kim *et al.* (2009) reportaram maior expressão de *TFF1* em CG metastático comparando com câncer primário.

Nesse estudo, como mencionado anteriormente, após identificarmos genes diferencialmente expressos no adenocarcinoma gástrico em relação ao tecido não-neoplásico adjacente, selecionamos os genes *TFF1* e *TFF2* para validação da expressão, na tentativa de elucidar o papel na carcinogênese gástrica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a expressão dos genes *TFF1* e *TFF2* em adenocarcinomas gástricos

2.2 Objetivos específicos

- 1- Selecionar genes diferencialmente expressos por *microarray* em dois adenocarcinomas gástrico e tecido gástrico não tumoral adjacente;
- 2- Validar a expressão dos genes *TFF1* e *TFF2* por PCR em tempo real em 39 amostras pareadas de tecido gástrico neoplásico e em mucosa gástrica não neoplásica;
- 3- Correlacionar os resultados encontrados e avaliar a existência de associação dos mesmos com gênero, idade, tipo histológico, invasão, presença de metástase em linfonodos e estadiamento tumoral dos adenocarcinomas gástricos estudados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tecidos gástricos

Para a análise de *microarray*, foram coletados tecido gástrico tumoral e não tumoral adjacente de 2 pacientes com adenocarcinoma gástrico primário submetidos à gastrectomia no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) (Tabela 3). Adicionalmente, foram coletadas amostras pareadas de tecido gástrico neoplásico e não neoplásico de 39 pacientes com adenocarcinoma gástrico primário submetidos à gastrectomia no HUJBB e Hospital São Paulo (HSP) para a validação. Todas as amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido até a extração de RNA.

Tabela 3 - Amostras de adenocarcinoma gástrico primário utilizadas para análise de *microarray*

Histológico	Diferenciação	Localização	Estadiamento
Intestinal	pouco diferenciado	antro-piloro e corpo/corpo	pT4aN2
Intestinal	pouco diferenciado	antro e corpo/corpo	pT3N3a/pT3N3b

Os pacientes participantes do estudo receberam informações quanto aos objetivos e ao protocolo da pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre-esclarecido, cujo modelo foi aprovado pelo Comitês de Ética em Pesquisa (Anexos I-IV).

A análise histopatológica dos fragmentos tumorais foi realizada pelo Serviço de Anatomia Patológica do HUJBB e do HSP. As amostras de adenocarcinoma foram submetidas à classificação de Laurén (1965) e o estadiamento tumoral seguiu o critério pTNM, de acordo com AJCC (UICC, 2010).

3.2 Extração de RNA

Para a extração do RNA foi utilizado o *RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen®)*, seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do RNA extraído foram avaliadas no aparelho NanoDrop ND-1000 (*Thermo Scientific®*). Somente amostras com razão A260/A280 de 1,8-2,0 e razão A230/A260 maior que 1,8 foram incluídas. A integridade do RNA (RIN) das amostras em que foi realizado o *microarray* também foi analisada pelo *BioAnalyzer (Agilent Technologies®)*, sendo consideradas elegíveis para análise amostras com RIN > 7,0. A integridade do RNA do restante das amostras utilizado para confirmação dos resultados

descritos no *microarray* foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. Foram utilizadas somente amostras que apresentavam as subunidades do RNAr 28S e 18S preservadas.

3.3 *Microarray*

Para comparação do transcriptoma das amostras de tecido gástrico foram utilizados os chips *Human Gene 1.0 ST array* (*Affymetrix*[®]), que permitem a análise de 36.079 transcritos. As etapas de processamento e hibridação das amostras foram realizadas no Instituto Nacional do Câncer. Após isolamento do RNA total, foram realizadas as seguintes etapas de acordo com o manual do *GeneChip*[®] *Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay*, versão 4.0 (*Affymetrix*, Figura 4).

3.3.1 ADIÇÃO DE CONTROLES EXÓGENOS

A cada amostra, com cerca de 100 a 300 ng de RNA total, foram adicionados controles positivos exógenos *Poly-A spikes*, constituídos por 4 transcritos poliadenilados de *Bacillus subtilis: lys, phe, thr e dap*. Essa adição de controles positivos às amostras de RNA tem como função monitorar as etapas de amplificação, fragmentação e marcação. Os controles positivos fazem parte do *Control GeneChip Eucaryotic Poly-A RNA kit* (*Affymetrix*).

3.3.2 SÍNTESE DO cDNA

A partir do RNA total, realizou-se a síntese da primeira fita de cDNA, de acordo com o protocolo da *Affymetrix*. Para isso, adicionaram-se às amostras contendo controles positivos exógenos 2 µL de 5x *1st Strand Buffer*, 1µL de DTT a 0,1M, 0,5 µL de dNTPs a 10 nM, 0,5 µL de inibidor de RNase e 1 µL de enzima transcriptase reversa *SuperScript II* (*Invitrogen*). As amostras foram incubadas em termociclador a 25 °C por 10 min, 42 °C por 60 min e 70 °C por 10 min. Ao término do processo, obteve-se uma molécula híbrida contendo uma fita de cDNA e outra de RNA.

Para síntese da segunda fita de cDNA, adicionaram-se à reação anterior 4 µL de MgCl₂ a 17,5 mM, 0,4 µL de dNTPs a 10 mM, 0,2 µL de RNase-H, 0,6 µL de DNA Polymerase I e 4,8 µL de água livre de RNase para um volume final de 20 µL. As amostras foram, inicialmente, incubadas em termociclador a 16 °C por 120 min sem aquecimento da tampa e, posteriormente, a 75 °C por 10 min com aquecimento da tampa.

3.3.3 SÍNTESE E QUANTIFICAÇÃO DO RNA COMPLEMENTAR

A partir do cDNA sintetizado, foi realizada uma transcrição *in vitro* para obtenção do RNA complementar ao cDNA (cRNA), correspondente à fita antisense do material inicial de RNA. À reação anterior, foram adicionados 5 µL de 10x *IVT Buffer*, 20 µL de *IVT NTP Mix* e 5 µL de *IVT Enzyme Mix* para um volume final de 30 µL. As amostras ficaram incubadas em termociclador por 16 h a 37 °C. Os reagentes fazem parte do *GeneChip® WT cDNA Synthesis and Amplifications kit (Affymetrix)*. A seguir, o cRNA sintetizado foi purificado utilizando-se os reagentes do *GeneChip® IVT cRNA Cleanup kit (Affymetrix)*. Posteriormente, as amostras foram quantificadas em NanoDrop® ND-1000 (*Thermo Scientific*). A concentração esperada para dar seguimento ao protocolo foi de 8 a 10 µg de cRNA.

3.3.4 SÍNTESE DE cDNA E FITA SIMPLES DE DNA

As amostras que apresentaram de 8 a 10 µg de cRNA foram hibridadas com iniciadores randômicos a 3µg/µL em um volume final de 8 µL e incubadas em termociclador a 70 °C por 5 min e 25 °C por 5 min. Em seguida, foram adicionados à reação 4 µL de 5x *1st Strand Buffer*, 2µL de DTT a 0,1 M, 1,25 µL de dNTPs + deoxiuridina-trifosfato (dUTP) a 10 mM e 4,75 µL de enzima transcriptase reversa *SuperScript II (Invitrogen)*. As condições da reação em termociclador foram: 25 °C por 10 min, 42 °C por 90 min e 70 °C por 10 min. Ao término do processo, foram obtidas sequências de cRNA e fitas simples de DNA com maior incorporação de dUTP do que deoxitimidina trifosfato (dTTP). Para essa etapa foi utilizado o *GeneChip® WT cDNA Synthesis kit (Affymetrix)*.

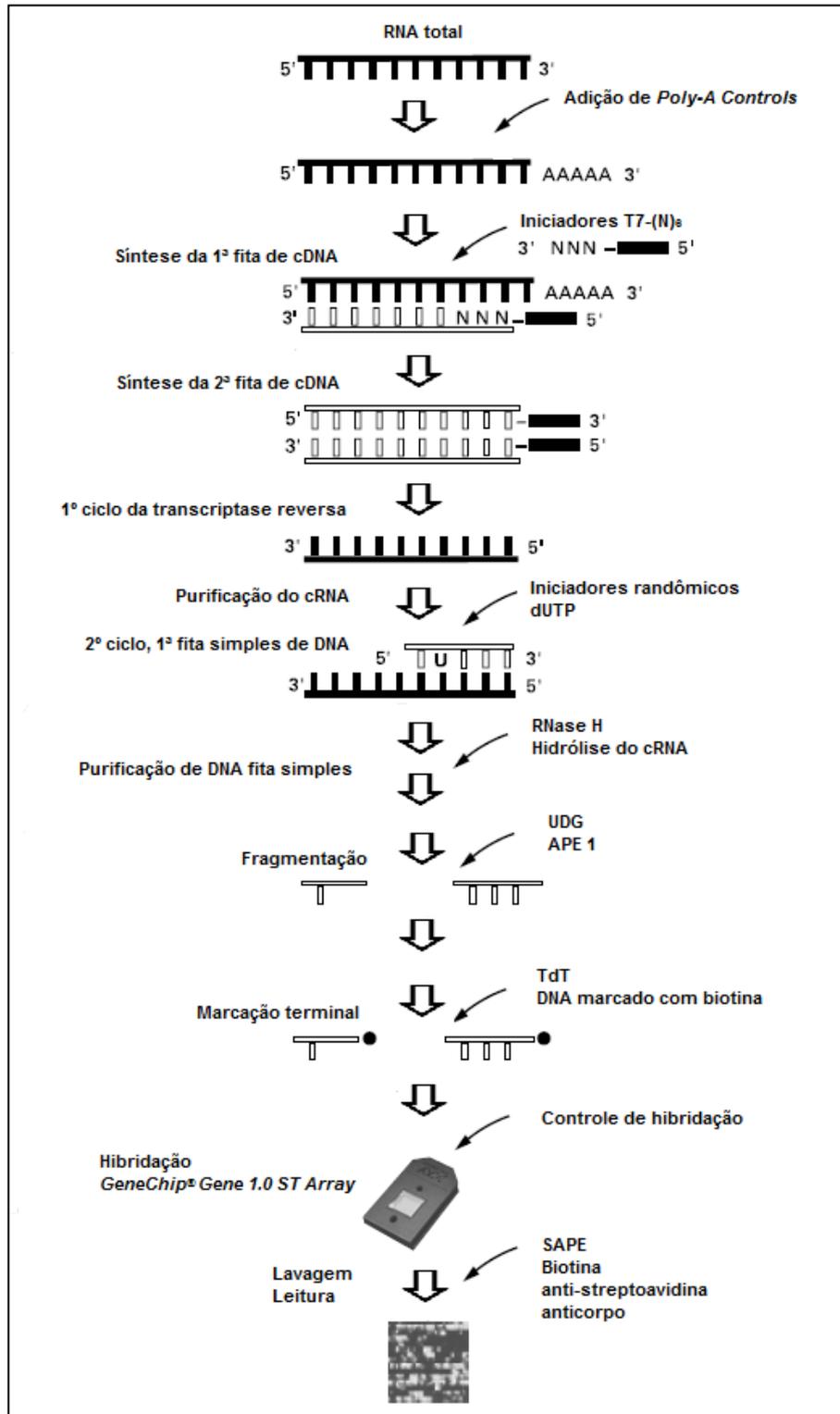


Figura 4. Fluxograma das etapas de processamento e hibridação do GeneChip® Gene 1.0 ST Array. RNA: ácido ribonucleico; cDNA: DNA complementar; dUTP: deoxiuridina – trifosfato; cRNA: RNA complementar ao cDNA; UDG: RNA complementar ao cDNA; APE1: purina/pirimidina endonuclease 1; TdT: *terminal deoxynucleotidyl transferase*; DNA: ácido desoxirribonucleico; SAPE: fluoróforo streptavidina – ficoeritrina. Fonte: *modificado de GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay (Affimetrix).*

3.3.5 HIDRÓLISE DO RNA COMPLEMENTAR, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA FITA SIMPLES DE DNA

Para eliminação das sequências de cRNA, as amostras do item anterior foram hidrolisadas utilizando 1 µL da enzima RNase H do *GeneChip*[®] *WT cDNA Synthesis kit*. As amostras foram incubadas em termociclador a 37 °C por 45 min, 95 °C por 5 min e 4 °C por 2 min. Posteriormente, foi realizada a etapa de limpeza e concentração da fita simples de DNA utilizando o *GeneChip*[®] *Sample Cleanup Module kit*. As amostras foram quantificadas em NanoDrop[®] ND-1000 (*Thermo Scientific*). A concentração esperada para dar seguimento às etapas de fragmentação, marcação e hibridação foi de 5,5 µg.

3.3.6 FRAGMENTAÇÃO DA FITA SIMPLES DE DNA

Para a etapa de fragmentação, foram utilizados 5,5 µg de fita simples de DNA, 10 U/µL de uracil DNA glicosilase (UDG), 1.000 U/µL de purina/pirimidina endonuclease 1 (APE1), 4,8 µL de *10x cDNA fragmentation Buffer* e água livre de RNase para um volume final de 48 µL. A reação foi incubada em termociclador a 37 °C por 60 min, 93 °C por 2 min (inativação da enzima) e 4 °C por 2 min. Os reagentes fazem parte do *GeneChip*[®] *WT (Whole Transcript) Terminal Labeling kit (Affymetrix)*. A enzima UDG remove especificadamente as bases uracil, incorporadas artificialmente às sequências de fita simples de DNA, gerando um sítio de clivagem para que em seguida, a APE1 clive a ligação fosfodiéster do carbono, em que estava a base uracil, deixando as extremidades 3' e 5' livres.

3.3.7 MARCAÇÃO DE DNA FITA SIMPLES FRAGMENTADO

O material fragmentado foi marcado com a enzima terminal *deoxynucleotidyl transferase* (TdT) que transfere a biotina para a extremidade 3'. Aos 45 µL da reação de fragmentação foram adicionados 12 µL de 5x TdT Buffer, 2 µL da enzima TdT e 5 mM de *DNA Labeling Reagent* para um volume final de 60 µL. As amostras foram incubadas em termociclador a 37 °C por 60 min, 70 °C por 10 min e 4 °C por 2 min. Para verificar se a marcação ocorreu de forma adequada, foi realizada uma reação de conjugação das amostras marcadas com biotina, utilizando-se solução de avidina a 2 mg/mL em tampão salino fosfato pH 7,2.

3.3.8 HIBRIDAÇÃO

Para reação de hibridação, foi utilizado o *GeneChip® Hybridization, Wash and Stain kit* (Affymetrix) de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados às amostras 4 controles de hibridação, que são transcritos de *E. coli*, *bioB* a 1,5 pM, *bioC* a 5 pM e *bioD* a 25 pM, um controle de alinhamento digital, *Control Oligo B2* a 50 pM, tampão de hibridação 1x e DMSO a 7% em água livre de RNase para um volume final de 220 µL. As amostras foram incubadas em termociclador a 99 °C por 5 min e 45 °C por 5 min. As amostras pré-aquecidas a 45 °C foram inseridas no *GeneChip® Gene 1.0 ST array* (Affymetrix) e incubadas a 45 °C a 60 rpm por 17 horas no *GeneChip® Hybridization Oven 640* (Affymetrix).

3.3.9 LAVAGEM E COLORAÇÃO

A etapa de remoção dos reagentes foi realizada na estação de lavagem *GeneChip® Fluidics Station 450* (Affymetrix) comandada pelo sistema operacional *GeneChip® Operating Software* (GCOS, Affymetrix). Foram utilizados os reagentes do *GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain kit* (Affymetrix) de acordo com as instruções do fabricante. O processo consiste na ligação covalente entre biotina e o fluoróforo streptavidina-ficoeritrina (SAPE), seguido de um anticorpo anti-streptavidina-biotina e, novamente, com SAPE para amplificar o sinal de fluorescência.

3.3.10 LEITURA

Após o término das lavagens, cada *GeneChip® Gene 1.0 ST array* (Affymetrix) foi inserido no carrossel de leitura *GeneChip® Auto Loader with External Barcode Reader* (Affymetrix) por 40 min, o qual está acoplado ao equipamento de leitura *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix). Esse último é comandado pelo sistema operacional GCOS, responsável por capturar a intensidade dos sinais de fluorescência no comprimento de onda de 570 nm, transformando-os em valores numéricos. Os dados foram salvos e enviados para o processamento dos dados e análise de bioinformática, realizados pela *Genotypes*.

3.3.11 PROCESSAMENTO DOS DADOS

Os valores de expressão gênica foram obtidos por meio do método de pré-processamento *Robust Multi-array Average* (RMA) (Irizarry *et al.*, 2003) disponível no programa R/*Bioconductor* (<http://www.bioconductor.org/> Figura 12).

A qualidade dos *arrays* foi verificada usando a ferramenta *Expression Console* (*Affymetrix*), disponível em: http://www.affymetrix.com/browse/level_seven_software_products_only.jsp?productId=131414&categoryId=35623#1_1.

O método *ComBat* (<http://jlab.byu.edu/ComBat/Abstract.html>)(Johnson *et al.*, 2007), disponível no programa R/*Bioconductor*, foi aplicado para a remoção do *batch* causado pelas diferentes linhagens.

O filtro de *Inter-Quartile-Range* (IQR), disponível no programa R/*Bioconductor*, foi aplicado para excluir todos os genes com variação menor que um valor de corte especificado (IQR < 0,3).

O método *Hierarchical Clustering* (Shamir *et al.*, 2005) com ligação completa para o agrupamento dos dados foi utilizado. O método está disponível no programa *Expander* (<http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/index.html>).

3.3.12 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

O método *RankProd* (RP) (Breitling *et al.*, 2004) foi utilizado para identificação dos genes diferencialmente expressos, considerando-se um valor de $P \leq 0,05$ ajustado para falso positivo (Benjamini e Hochberg, 1995). O método RP é uma ferramenta não paramétrica baseada em posições que possui a vantagem de identificar alterações na expressão de genes biologicamente relevantes quando poucas amostras são avaliadas (Breitling *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2006). Genes selecionados pelo método RP não necessitam necessariamente apresentar níveis homogêneos de expressão entre amostras testes e controles. Da mesma forma, o método RP é uma boa opção para identificação de genes diferencialmente expressos em doenças complexas, nas quais a alteração da expressão de um gene candidato é esperada em apenas um subgrupo de amostras devido à heterogeneidade genética e à natureza estocástica da expressão gênica em sistemas complexos (Raj *et al.*, 2010).

3.3.13 ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

A análise funcional dos genes diferencialmente expressos foi realizada usando o programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA), disponível em <http://www.ingenuity.com>.

3.4 Validação dos Resultados qRT-PCR

Dois genes diferencialmente expressos identificados por *microarray* (*TFF1* e *TFF2*) foram selecionados para validação por qRT-PCR em 39 pares de amostras de tecido gástrico tumoral e não tumoral adjacente. As funções moleculares associadas ao desenvolvimento de neoplasias já descritas na literatura foram utilizadas como critérios estabelecidos para seleção desses genes.

Nesta etapa, a conversão de RNA das amostras de tecido gástrico para cDNA foi realizada utilizando-se o *High-Capacity® cDNA Reverse Transcription Kit* (*Life Technologies®*), seguindo as instruções do fabricante.

Para detecção da expressão dos genes foram utilizados ensaios já validados com sonda de hidrólise *TaqMan®* e fluorescência FAMTM MGB (*Life Technologies®*) em termociclador *7500 Fast* (*Life Technologies®*). Cada reação de qRT-PCR foi realizada em triplicata técnica e constituiu um volume final de 12 µL, contendo 5,4 µL de cDNA (com aproximadamente 20 ng), 6,0 µL de *Master Mix TaqMan Fast* (*Qiagen®*) e 0,6 µL de ensaio com sonda de hidrólise *TaqMan®* (*Life Technologies®*). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial por 10 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg, anelamento e extensão a 60 °C por 60 seg.

Para normalização dos níveis de expressão desses genes, foram utilizados os genes de referência *GAPDH+B2M* como determinado previamente (Wisniesk *et al.*, 2013). A tabela 4 demonstra os ensaios com sonda de hidrólise *TaqMan®* adquiridos comercialmente para os genes estudados e os valores de eficiência calculados a partir de curva de diluição (1:10) de 4 pontos. Eficiências de 90 a 110% foram consideradas aceitáveis.

Tabela 4. Ensaios com sonda de hidrólise *TaqMan*[®] para análise de expressão dos genes selecionados por *microarray*.

	Gene	Ensaio <i>Taqman</i>	Eficiência
Genes alvos	<i>TFF1</i>	Hs00907239_m1	103%
	<i>TFF2</i>	Hs00193719_m1	98%
Genes de referência	<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	102%
	<i>B2M</i>	Hs00984230_m1	104%

O método escolhido para quantificação da expressão gênica foi o método Ct comparativo, o qual se baseia nos valores de *cycle threshold* (Ct) dos genes de referência e genes alvos. O Ct é o ciclo de amplificação onde a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *threshold*, o qual fixa a fase exponencial de amplificação para a coleta de dados pelo programa de análise. Os valores de ΔCt ($Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{genes de referência}}$) e $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta Ct_{\text{teste}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$) foram calculados e o valor de quantificação relativa ($RQ = E^{-\Delta\Delta Ct}$) foi utilizado de acordo com o método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Nesse método, o valor de RQ é ajustado pela eficiência (E) de amplificação dos genes estudados. O tecido gástrico não-neoplásico adjacente foi usado como calibrador de cada amostra de adenocarcinoma gástrico.

3.5 Análise estatística

Nos tecidos gástricos, os valores de RQ obtidos por qRT-PCR foram primeiramente avaliados quanto a sua distribuição pelo teste estatístico Shapiro-Wilk. Os dados não estavam em normalidade e foi utilizado o teste não paramétrico Mann Whitney para comparação dos valores de RQ entre tecido gástrico tumoral e não tumoral adjacente. Para associar os valores de RQ às características clinicopatológicas, foi utilizado o teste Mann Whitney para variáveis independentes. Os dados foram apresentados em mediana \pm intervalo interquartil. Diferenças estatísticas significantes foram consideradas quando $P < 0,05$.

Para análise de correlação entre os níveis de expressão dos genes selecionados por *microarray* diferencialmente expressos entre amostras de tecido gástrico tumoral e não tumoral adjacente e dos genes *TFF1* e *TFF2* foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Classificou-se como correlação fraca quando $r < 0,40$, moderada quando $0,40 < r < 0,59$, forte quando $0,60 < r < 0,79$ e muito forte quando $r > 0,8$.

4 RESULTADOS

4.1 Genes diferencialmente expressos em adenocarcinoma gástrico em relação ao tecido gástrico não-neoplásico adjacente

Foram observados 53 genes diferencialmente expressos ao comparar adenocarcinoma gástrico e tecido gástrico não-neoplásico adjacente, considerando *fold-change* de 5. Destes genes identificados, 16 genes apresentaram maior expressão e 37 genes menor expressão no tumor em relação ao tecido não-neoplásico (Tabela 5).

Tabela 5 - Genes diferencialmente expressos entre amostras pareadas de adenocarcinoma gástrico e tecido gástrico não neoplásico adjacente (long-rank p-value <0.05; n=4).

Gene	Fold-Change	Localização	gene_assignment
<i>CLDN1</i>	9.16	3q28-q29	NM_021101 // CLDN1 // claudin 1 // // 9076 /// ENST00000295522 // CLDN1
<i>CST1</i>	7.83	20p11.21	NM_001898 // CST1 // cystatin SN // // 1469 /// ENST00000304749 // CST1
<i>CXCL9</i>	7.24	4q21	NM_002416 // CXCL9//chemokine (C-X-C motif) ligand 9 ////4283/// ENST0
<i>ASPN</i>	6.99	9q22	NM_017680 // ASPN // asporin //// 54829 /// ENST00000375544 //ASPN // asp
<i>BGN</i>	6.83	Xq28	NM_001711 // BGN // biglycan // // 633 /// ENST00000331595 // BGN // biglyc
<i>FN1</i>	6.52	2q34	NM_212482 // FN1 // fibronectin 1 // // 2335 /// NM_212475 // FN1 // fibron
<i>LUM</i>	6.38	12q21.3-q22	NM_002345 // LUM // lumican // // 4060 /// ENST00000266718 // LUM //
<i>SULF1</i>	6.09	8q13.2-q13.3	NM_001128205 // SULF1 // sulfatase 1 // // 23213 /// NM_015170 // S
<i>SFRP4</i>	5.97	7p14.1	NM_003014 // SFRP4 // secreted frizzled-related protein 4 // // 6424 ///
<i>COL1A1</i>	5.67	17q21.33	NM_000088 // COL1A1 // collagen, type I, alpha 1 // // 1277 /// ENST000
<i>THY1</i>	5.64	11q22.3-q23	NM_006288 // THY1 // Thy-1 cell surface antigen // // 7070 /// ENST0
<i>SPARC</i>	5.62	5q31.3-q32	NM_003118 //SPARC // secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)//5
<i>COL12A1</i>	5.48	6q12-q13	NM_004370 // COL12A1 // collagen, type XII, alpha 1 // // 1303 /// NM_0
<i>RCN1</i>	5.44	11p13	NM_002901 // RCN1 // reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain ///
<i>TIMP1</i>	5.35	Xp11.3-p11.23	NM_003254 // TIMP1 // TIMP metalloproteinase inhibitor 1 // // 7076
<i>THBS2</i>	5.34	6q27	NM_003247//THBS2 // thrombospondin 2 ////7058 /// ENST00000366787 // TH
<i>MFSD4</i>	-5.25	1q32	NM_181644 // MFSD4 // major facilitator superfamily domain containing 4 //.

Gene	Fold-Change	Localização	gene_assignment
<i>VSIG2</i>	-5.26	11q24	NM_014312 // VSIG2 // V-set and immunoglobulin domain containing 2 //// 2
<i>SLC9A2</i>	-5.32	2q11.2	NM_003048//SLC9A2//solute carrier family 9(sodium/hydrogen exchanger),memb
<i>FUT9</i>	-5.4	6q16	NM_006581 // FUT9 //fucosyltransferase 9 (alpha (1,3) fucosyltransferase) //6q
<i>HMGCS2</i>	-5.47	1p13-p12	NM_005518//HMGCS2//3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2(mitochondrial)
<i>MT1G</i>	-5.53	16q13	NM_005950 // MT1G // metallothionein 1G // // 4495 /// BC020757 // MT1G //
<i>AKR1C1</i>	-5.7	10p15-p14	NM_001353//AKR1C1//aldo-keto reductase family 1, member C1(dihydrodiol dehy
<i>LTF</i>	-6.15	3p21.31	NM_002343 // LTF // lactotransferrin // // 4057 /// ENST00000231751 // L
<i>LOC25845</i>	-6.17	5p15.33	NR_024158 // LOC25845 // hypothetical LOC25845 // // 25845 /// AK074086
<i>GCNT4</i>	-6.17	5q12	NM_016591 // GCNT4 // glucosaminyl (N-acetyl) transferase 4, core 2 //// 5
<i>AKR1C2</i>	-6.23	10p15-p14	NM_205845//AKR1C2// aldo-keto reductase family 1, member C2(dihydrodiol dehy
<i>DUOX2</i>	-6.29	15q15.3	NM_014080 // DUOX2 // dual oxidase 2 // // 50506 /// NM_017434 // DUOX1
<i>HRASLS2</i>	-6.51	11q12.3	NM_017878 // HRASLS2 // HRAS-like suppressor 2 // // 54979 /// ENST00000
<i>HPGD</i>	-6.73	4q34-q35	NM_000860 // HPGD // hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD) ////
<i>CPA2</i>	-6.95	7q32	NM_001869 // CPA2 // carboxypeptidase A2 (pancreatic) // // 1358 /// BC0145
<i>SLC5A5</i>	-7.05	19p13.11	NM_000453 // SLC5A5 //solute carrier family 5(sodium iodide symporter),member
<i>FSIP2</i>	-7.14	2q32.1	AK092099 // FSIP2 // fibrous sheath interacting protein 2 // // 401024 //
<i>SULT1B1</i>	-7.3	4q13	NM_014465 // SULT1B1 // sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1 //
<i>ESRRG</i>	-7.36	1q41	NR_024099 // ESRRG // estrogen-related receptor gamma //// 2104 /// NM_206
<i>ASAH2</i>	-7.45	10q11.21	NM_019893//ASAH2//N-acylsphingosine amidohydrolase(non-lysosomal ceramidase

Gene	Fold-Change	Localização	gene_assignment
<i>PSCA</i>	-7.65	8q24.2	NM_005672 // PSCA // prostate stem cell antigen //// 8000 /// NR_033343
<i>SULT1C2</i>	-9.76	2q11	NM_001056 // SULT1C2 // sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2 //
<i>C6orf105</i>	-9.85	6p24.1	NM_001143948 // C6orf105 // chromosome 6 open reading frame 105 // // 848
<i>TFF2</i>	-9.91	21q22.3	NM_005423 // TFF2 // trefoil factor 2 // // 7032 /// ENST00000291526 //
<i>REG1A</i>	-10.22	2p12	NM_002909 // REG1A // regenerating islet-derived 1 alpha // // 5967 /// ENS
<i>FCGBP</i>	-10.23	19q13.1	NM_003890 // FCGBP // Fc fragment of IgG binding protein // // 8857 ///
<i>TFF1</i>	-11.5	21q22.3	NM_003225 // TFF1 // trefoil factor 1 // // 7031 /// ENST00000291527 //
<i>KRT20</i>	-11.68	17q21.2	NM_019010 // KRT20 // keratin 20 // // 54474 /// ENST00000167588 // KRT2
<i>PGC</i>	-13.16	6p21.3-p21.1	NM_002630 // PGC // progastricsin (pepsinogen C) // // 5225 /// NM_
<i>REG3A</i>	-15.92	2p12	NM_138938 // REG3A // regenerating islet-derived 3 alpha // // 5068 /// NM_
<i>AKR1B15</i>	-17.81	7q33	NM_001080538 // AKR1B15 // aldo-keto reductase family 1, member B15 // // 4
<i>KCNE2</i>	-20.88	21q22.12	NM_172201 // KCNE2 // potassium voltage-gated channel, Isk-related family, membe
<i>ATP4A</i>	-22.6	19q13.1	NM_000704 // ATP4A // ATPase, H ⁺ /K ⁺ exchanging, alpha polypeptide ////
<i>ATP4B</i>	-24.64	13q34	NM_000705 // ATP4B // ATPase, H ⁺ /K ⁺ exchanging, beta polypeptide //// 496
<i>LIPF</i>	-35.06	10q23.31	NM_004190 // LIPF // lipase, gastric // // 8513 /// ENST00000238983 //
<i>PGA4</i>	-40.81	11q12.2	NM_001079808 // PGA4 // pepsinogen 4, group I (pepsinogen A) //// 64384
<i>GIF</i>	-44.47	11q13	NM_005142 // GIF // gastric intrinsic factor (vitamin B synthesis) // // 2

4.2 Quantificação relativa da expressão de *TFF1* e *TFF2*

Os genes *TFF1* e *TFF2* apresentaram expressão significativamente reduzida nas amostras tumorais quando comparadas às amostras não tumorais adjacentes ($0,10 \pm 0,47$; $0,11 \pm 0,56$; mediana \pm desvio interquartilico, respectivamente) (Figura 5). A tabela 4 resume as associações entre as características clinicopatológicas do paciente e a quantificação relativa (RQ) da expressão do mRNA de *TFF1* e *TFF2*, dos tumores gástricos em relação ao tecido gástrico não neoplásico adjacente. A expressão do gene *TFF2* foi significativamente menor em adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal em comparação com o tipo difuso ($p=0,017$) (Figura 6). Entretanto, não foi observada associação entre o nível de expressão desses genes e outras características clinicopatológicas. Adicionalmente, a expressão dos genes *TFF1* e *TFF2* foram fortemente correlacionadas ($r= 0,78$; $p<0,001$).

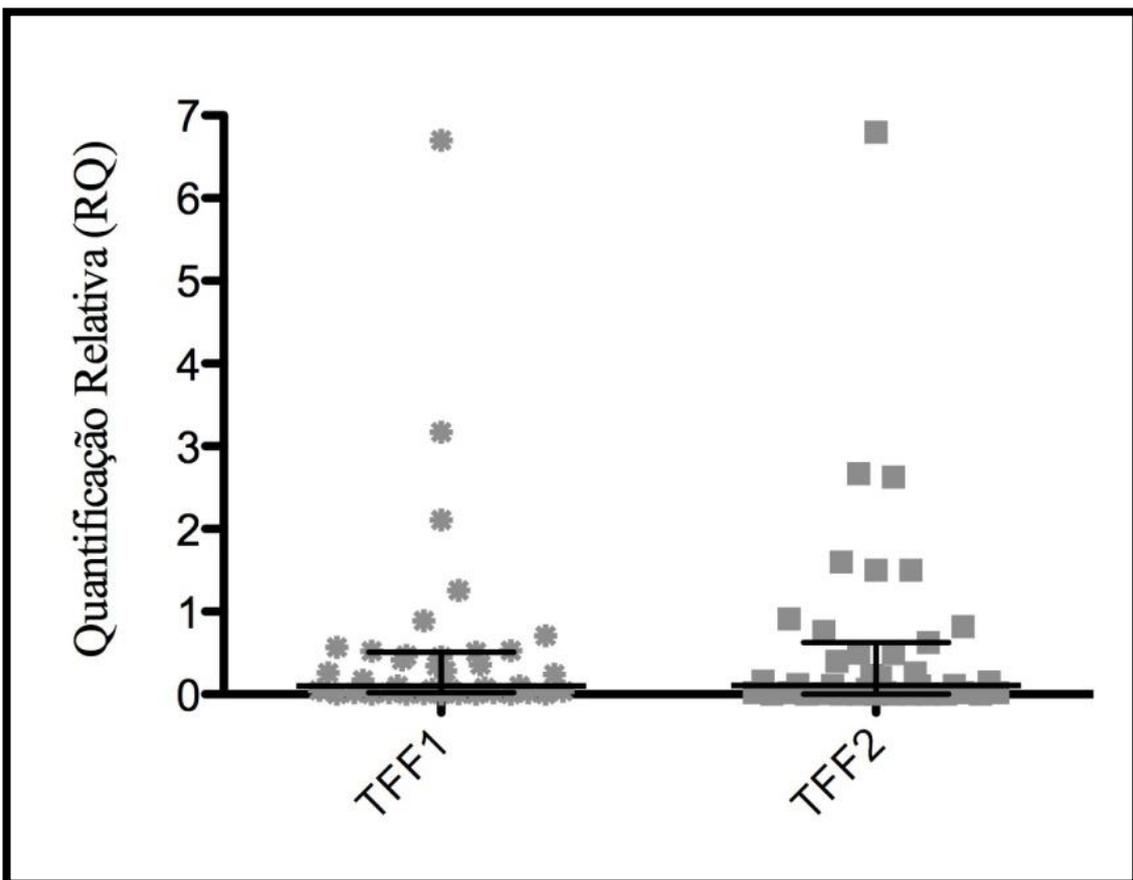


Figura 5 - Quantificação Relativa (RQ) da expressão dos genes *TFF1* e *TFF2* em adenocarcinoma gástrico em relação ao tecido não neoplásico adjacente.

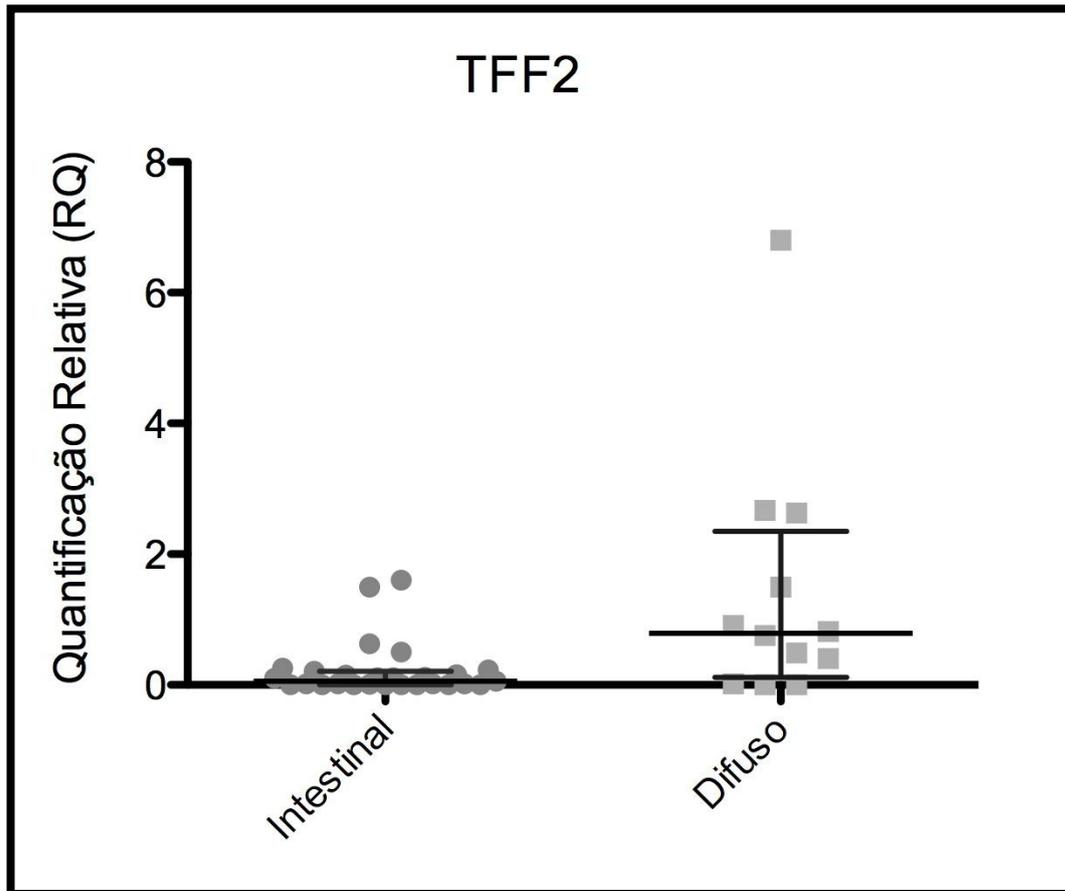


Figura 6 - Quantificação Relativa (RQ) da expressão do gene *TFF2* em adenocarcinoma gástrico em relação ao tecido não neoplásico adjacente nos tipos intestinal e difuso.

Tabela 6 - Comparação dos valores de RQ dos genes *TFF1* e *TFF2* com os dados clinicopatológicos dos pacientes com câncer gástrico (n=39)

Características Clinicopatológicas	<i>TFF1</i>	<i>P</i>	<i>TFF2</i>	<i>P</i>
Idade				
<50anos	0,09±0,45	0,625	0,11±0,42	0,928
≥50 anos	0,35±0,43		0,06±0,99	
Gênero				
Masculino	0,17±0,41	0,665	0,11±0,50	0,353
Feminino	0,14±0,49		0,16±1,04	
Histopatológico^a				
Intestinal	0,08±0,37	0,095	0,06±0,19	0,017*
Difuso	0,47±0,74		0,79±1,48	
Invasão^b				
pT1-pT2	0,17±0,40	0,602	0,11±0,61	0,905
pT3-pT4	0,08±0,51		0,13±0,50	
Metástase em Linfonodos^b				
pN0	0,26±0,93	0,165	0,26±1,04	0,301
pN1-N3	0,07±0,41		0,11±0,38	
Estádio^b				
I-II	0,14±0,47	0,603	0,10±0,69	0,955
III-IV	0,10±0,42		0,16±0,48	

^aClassificação de Laurèn (1965); ^b7th Edition of the AJCC Cancer Staging manual: Stomach (2011).

5 DISCUSSÃO

O CG é o quarto tumor mais frequente no mundo sendo responsável pela segunda causa de morte por câncer (Jemal *et al.*, 2011). Compreender os mecanismos moleculares e alterações por trás da iniciação e da progressão da tumorigênese gástrica é fundamental para a detecção precoce da doença e identificar alvos terapêuticos e clínicos inovadores para CG.

Algumas anormalidades moleculares foram identificadas em CG, como o aumento da expressão de oncogenes e o silenciamento de genes supressores tumorais. No entanto, é de importância vital decifrar os mecanismos da carcinogênese gástrica, devido a patogênese molecular do CG ainda não ser completamente compreendida.

Perfis de expressão de genes são úteis para a análise simultânea dos níveis de expressão de milhares de genes (Wang *et al.*, 2010). Esse estudo fornece uma base para o desenvolvimento de um novo biomarcador para o prognóstico de CG. A análise de *microarray* de expressão foram observados 53 genes diferencialmente expressos, sendo 16 genes com aumento da expressão e 37 com diminuição da expressão no tecido tumoral em relação ao tecido não-neoplásico adjacente. Posteriormente, foram selecionados dois genes, *TFF1* e *TFF2*, para validação em 78 amostras de tecido gástrico.

Os genes *TFF1* e *TFF2* fazem parte da família de fatores trifólios (TFFs) e são expressos abundantemente nas superfícies mucosas do trato gastrointestinal. *TFF1* é uma proteína de secreção, que assume uma função de proteção da mucosa gástrica, produzindo muco gástrico. *TFF2* também está associada ao muco gástrico, promovendo a restituição da mucosa gástrica (Hanisch *et al.*, 2012).

A quantificação relativa da expressão de *TFF1* e *TFF2* mRNA em tumores gástricos em relação ao tecido gástrico não-neoplásico adjacente foi menor ($0,10 \pm 0,47$; $0,11 \pm 0,56$, respectivamente), sugerindo que a diminuição da expressão desses genes é um evento comum na carcinogênese gástrica e pode estar associado com a proliferação e transformação maligna da mucosa.

Essa redução da expressão de *TFF1* em câncer gástrico pode ser consequência de deleções, mutações de sentido trocado ou hipermetilação na região promotora (Katoh, 2003). O mecanismo de redução da expressão de *TFF2* ainda não é bem esclarecido, alguns trabalhos sugerem que a metilação da região promotora pode ser responsável pela diminuição da expressão em CG (Leung *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2006). Peterson *et al.* (2010) demonstraram que a expressão de *TFF2* é epigeneticamente silenciada durante a progressão para o CG do tipo intestinal por hipermetilação do promotor.

Adicionalmente, a expressão dos genes *TFF1* e *TFF2* foram fortemente correlacionadas ($r= 0,78$; $p<0,001$), esta forte correlação da expressão desses dois genes sugere que ambos podem partilhar elementos reguladores comuns. May e Westley (1997) determinaram que a distância física entre os genes *TFF1* e *TFF2* é de apenas 12,5 kb. Essa pequena distância física entre os genes corrobora a hipótese sugerida de que os dois genes podem compartilhar elementos reguladores.

Os peptídeos TFF1 e TFF2 desempenham um papel crítico na manutenção da integridade da mucosa e a provável perda funcional combinada de ambos os peptídeos compromete a mucosa gástrica, o que permite aumentar a inflamação e dano enquanto subjugar processos de reparação (Taupin *et al.*, 2003).

Não houve associação da expressão desses genes com idade, gênero, profundidade de invasão, presença de metástase em linfonodos e estadiamento. Entretanto, foi observada menor expressão do gene *TFF2* em adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal em relação ao tipo difuso ($p=0,017$).

Aiko *et al.* (2011) observaram menor expressão dos genes *TFF1* e *TFF2* em soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal do que em soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo difuso. Esses autores confirmaram a origem gástrica desses peptídeos ao analisar os níveis de expressão dos TFFs em soro de pacientes antes e após a gastrectomia, e observaram que a expressão de *TFF1* e *TFF2* diminuiu drasticamente após a ressecção gástrica.

Sabe-se que os adenocarcinomas dos tipos intestinal e difuso são entidades distintas no âmbito patológico e molecular (Lauren, 1965; Tahara *et al.*, 2004). Shi *et al.* (2005) observaram uma redução gradual da expressão de *TFF2* em diferentes lesões: gastrite crônica superficial, úlcera gástrica, gastrite crônica atrófica e CG. No entanto, a diferença estatística só foi observada quando comparada a expressão de *TFF2* de ambas as lesões não consideradas pré-neoplásicas (gastrite crônica superficial e úlcera gástrica) com a gastrite crônica atrófica e CG.

A diminuição da expressão de *TFF2* no CG e estado pré-cancerosas indica que *TFF2* poderia ser um dos fatores inibidores de tumor gástrico e a expressão diminuída de *TFF2* pode ser um sinal da deterioração da mucosa gástrica.

Em resumo, a redução da expressão de *TFF1* e *TFF2* pode ser um evento comum na carcinogênese gástrica e essa redução na expressão de *TFF2* é ainda mais pronunciada no tipo intestinal. Futuramente, a determinação do perfil de expressão de *TFF1* e *TFF2* no tecido gástrico pode fornecer uma nova abordagem para a intervenção precoce no adenocarcinoma

gástrico, uma doença em que o diagnóstico tardio continua a apresentar um grande desafio terapêutico.

6 CONCLUSÃO

- A análise por microarray identificou 53 genes diferencialmente expressos em duas amostras de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal em relação ao tecido não neoplásico adjacente.
- As expressões de *TFF1* e *TFF2* estão significativamente reduzidas em amostras de adenocarcinoma gástrico, quando comparadas à mucosa gástrica não neoplásica nos mesmos pacientes.
- A redução da expressão de *TFF2* no adenocarcinoma do tipo intestinal é mais pronunciada que no tipo difuso. Entretanto, nenhuma outra associação foi observada entre a expressão dos genes *TFF1* e *TFF2* com as outras características clínicas.
- A forte correlação na expressão dos genes *TFF1* e *TFF2* sugere que esses genes compartilham mecanismos regulatórios comuns.
- A redução de expressão dos genes *TFF1* e *TFF2* constitui um possível mecanismo no processo de carcinogênese gástrica.
- *TFF1* e *TFF2* podem ser considerados potenciais alvos terapêuticos no CG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKOU, S.; OHMOTO, Y.; GUNJI, T.; MATSUHASHI, N.; OHTSU, H.; MIURA, H.; KUBOTA, K.; YAMAGATA, Y.; SETO, Y.; NAKAJIMA, A.; GOLDENRING, J.R.; KAMINISHI, M.; NOMURA, S. *Tests for Serum Levels of Trefoil Factor Family Proteins Can Improve Gastric Cancer Screening*. *Gastroenterology*, v.141 (3), p.837-845, 2011. [DOI: 10.1053/j.gastro.2011.05.040]
- ALISON, M.R.; CHINERY, R.; POULSOM, R.; ASHWOOD, P.; LONGCROFT, J.M.; WRIGHT, N.A. *Experimental ulceration leads to sequential expression of spasmolytic polypeptide, intestinal trefoil factor, epidermal growth factor and transforming growth factor alpha mRNAs in rat stomach*. *J Pathol*, v.175, p.405-414, 1995.
- 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.
- ASSUMPCÃO, P.P. *Atualização em Câncer-Gástrico*. 1º edição. São Paulo: Tecmed Editora, 2005. p.95-106.
- ASSUMPCAO, P.P.; ISHAK, G.; CHEN, E.S.; TAKENO, S.S.; LEAL, M.F.; GUIMARAES, A.C.; CALCAGNO, D.Q.; KHAYAT, A.S.; DEMACHKI, S.; SMITH, M.DE A.; BURBANO, R.R. *Numerical aberrations of chromosome 8 detected by conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, v.169 (1), p.45-9, 2006.
- BABA, Y.; MURATA, A.; WATANABE, M.; BABA, H. *Clinical implications of the LINE-1 methylation levels in patients with gastrointestinal cancer*. *Surg Today*, 2013.
- BAE, J.M.; SHIN, S.H.; KWON, H.J.; PARK, S.Y.; KOOK, M.C.; KIM, Y.W.; CHO, N.Y.; KIM, N.; KIM, T.Y.; KIM, D.; KANG, G.H. *ALU and LINE-1 hypomethylations in multistep gastric carcinogenesis and their prognostic implications*. *Int J Cancer*, v.131 (6), p.1323-31, 2012. [DOI: 10.1002/ijc.27369]
- BAYLIN, S.B.; OHM, J.E. *Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?* *Nat Rev Cancer*, v.6, p.107-116, 2006. [DOI: 10.1038/nrc1799]
- BECK, S.; SOMMER, P.; BLIN, N.; GOTT, P. *50-flanking motifs control cell-specific expression of trefoil factor genes (TFF)*. *Int J Mol Med*, v.2, p.353-61, 1998.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. *Journal of the Royal Statistical Society B*, v.57, p.289-300, 1995.
- BERRETTA, M.; CAPPELLANI, A.; LLESHI, A.; DI VITA, M.; LO MENZO, E.; BEARZ, A.; GALVANO, F.; SPINA, M.; MALAGUARNERA, M.; TIRELLI, U.; BERRETTA, S. *The role of diet in gastric cancer: still an open question*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, v.17, p.1640-7, 2012.

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

BOSSENMEYER-POURIÉ, C.; KANNAN, R.; RIBIERAS, S.; WENDLING, C.; STOLL, I.; THIM, L.; TOMASETTO, C.; RIO, M.C. *The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis*. J Cell Biol, v.157 (5), p.761-70, 2002.

BREITLING, R.; ARMENGAUD, P.; AMTMANN, A.; HERZYK, P. *Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments*. FEBS Lett, v.573 (1-3), p.83-92, 2004.

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 Res, v.26 (4B), p.2909-14, 2006.

CALCAGNO, D.Q.; GUIMARAES, A.C.; LEAL, M.F.; SEABRA, A.D.; KHAYAT, A.S.; PONTES, T.B.; ASSUMPCAO, P.P.; DE ARRUDA CARDOSO SMITH, M.; BURBANO, R.R. *MYC insertions in diffuse-type gastric adenocarcinoma*. Anticancer Res, v.29 (7), p.2479-83, 2009.

CALCAGNO, D.Q.; LEAL, M.F.; ASSUMPCAO, P.P.; SMITH, M.A.; BURBANO, R.R. *MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis*. World J Gastroenterol, v.14 (39), p.5962-8, 2008.

CALCAGNO, D.Q.; LEAL, M.F.; DEMACHKI, S.; ARAUJO, M.T.; FREITAS, F.W.; OLIVEIRA E SOUZA, D.; ASSUMPCAO, P.P.; ISHAK, G.; DE ARRUDA CARDOSO SMITH, M.; BURBANO, R.R. *MYC in gastric carcinoma and intestinal metaplasia of young adults*. Cancer Genet Cytogenet, v.202 (1), p. 63-6, 2010.

CALCAGNO, D.Q.; LEAL, M.F.; SEABRA, A.D.; KHAYAT, A.S.; CHEN, E.S.; DEMACHKI, S.; ASSUMPCAO, 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 J Gastroenterol, v.12 (38), p.6207-11, 2006.

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

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. *Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules*. Ann N Y Acad Sci, v.1014, p.58-66, 2004.

CÉSAR, A.C.; SILVA, A.E.; TAJARA, E.H. *Genetics and environmental factors in gastric carcinogenesis*. Arq Gastroenterol, v.39 (4), p.253-9, 2002.

- COOK, G.A.; THIM, L.; YEOMANS, N.D.; GIRAUD, A.S. *Oral human spasmolytic polypeptide protects against aspirin-induced gastric injury in rats. J Gastroenterol Hepatol*, v.13, p.363-370, 1998.
- CORREA P. *Gastric cancer: overview. Gastroenterol Clin North Am*, v.42 (2), p.211-7, 2013.
- DA COSTA, J.DE F.; LEAL, M.F.; SILVA, T.C.; ANDRADE JUNIOR, E.F.; REZENDE, A.P.; MUNIZ, J.A.; LACRETA JUNIOR, A.C.; ASSUMPCAO, P.P.; CALCAGNO, D.Q.; DEMACHKI, S.; RABENHORST, S.H.; SMITH, M.DE A.; BURBANO, R.R. *Experimental gastric carcinogenesis in Cebus apella nonhuman primates. PLoS One*, v.6 (7), 2011. [DOI: 10.1371/journal.pone.0021988.]
- DEKKER, W.; OP DEN ORTH, J.O. *Early gastric cancer. Radiol Clin (Basel)*, v.46 (2), p.115-29, 1977.
- DELBRIDGE, A.R.; VALENTE, L.J.; STRASSER, A. *The Role of the Apoptotic Machinery in Tumor Suppression. Cold Spring Harb Perspect Biol*, v.4 (11), 2012.
- DEVITA, V.T.JR. *The NIH entitlement program. Nat Rev Clin Oncol*, v.11, p.613, 2009.
- FEINBERG, A.P. *The epigenetics of cancer etiology. Semin Cancer Biol*, v.14 (6), p.427-32, 2004.
- FIGUEIREDO, C.; GARCIA-GONZALEZ, M.A.; MACHADO, J.C. *Molecular pathogenesis of gastric cancer. Helicobacter. Suppl 1:28-33*, 2013.
- GOTT, P.; BECK, S.; MACHADO, J.C.; CARNEIRO, F.; SCHMITT, H.; BLIN, N. *Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. Eur J Hum Genet*, v.4 (6), p.308-15, 1996.
- GRAZIOSI, L.; MARINO, E.; CAVAZZONI, E.; DONINI, A. *Prognostic value of the seventh AJCC/UICC TNM classification of non-cardia gastric cancer. World J Surg Oncol*, v.11, p.103, 2013.
- 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.
- HANBY, A.M.; POULSOM, R.; SINGH, S.; ELIA, G.; JEFFERY, R.E.; WRIGHT, N.A. *Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: Distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach. Gastroenterology*, v.105, p.1110-1116, 1993.
- HEJNA, M.; WOHRER, S.; SCHMIDINGER, M.; RADERER, M. *Postoperative chemotherapy for gastric cancer. Oncologist*, v.11 (2), p.136-45, 2006.
- HENRY, J.A.; BENNETT, M.K.; PIGGOTT, N.H.; LEVETT, D.L.; MAY, F.E.B.; WESTLEY, B.R. *Expression of the pNR-2/pS2 protein in diverse human epithelial tumours. Br. J. Cancer*, v.64, p.677-682, 1991.

- HOFFMANN, W.; JAGLA, W. *Cell type specific expression of secretory TFF peptides: Colocalization with mucins and synthesis in the brain*. *Int Rev Cytol*, v.213, p.147–181, 2002.
- HOFFMANN, W.; JAGLA, W.; WIEDE, A. *Molecular medicine of TFF-peptides: From gut to brain*. *Histol Histopathol*, v.16, p.319–334, 2001.
- HONG, F.; BREITLING, R.; MCENTEE, C.W.; WITTNER, B.S.; NEMHAUSER, J.L.; CHORY, J. *RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis*. *Bioinformatics*, v.22 (22), p.2825-7, 2006.
- HOWE, H.L.; WU, X.; RIES, L.A.; COKKINIDES, V.; AHMED, F.; JEMAL, A.; MILLER, B.; WILLIAMS, M.; WARD, E.; WINGO, P.A.; RAMIREZ, A.; EDWARDS, B.K. *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations*. *Cancer*, v. 107(8), p. 1711-42, 2006.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer (2013). Disponível em:<<http://www.inca.org.br>>. Acessado em: 23 de junho de 2013.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. ed. I.A.o.R.o. Cancer. Lyon (France): IARC press, 1994.
- IRIZARRY, R.A.; BOLSTAD, B.M.; COLLIN, F.; COPE, L.M.; HOBBS, B.; SPEED, T.P. *Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data*. *Nucleic Acids Res*, v.31 (4), p.e15, 2003.
- 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]
- JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; THUN, M.J. *Cancer statistics - 2007*. *CA Cancer J Clin*, v.57(1), p.43-66, 2007.
- JOHNSON, W.E.; LI, C.; RABINOVIC, A. *Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods*. *Biostatistics*, v.8 (1), p.118-27, 2007.
- JONES, P.A.; BAYLIN, S.B. *The epigenomics of cancer*. *Cell*, v.128 (4), p.683-92, 2007.
- JONES, P.A.; TAKAI, D. *The role of DNA methylation in mammalian epigenetics*. *Science*, v.293, p.1068-1070, 2001. [DOI: 10.1126/science.1063852]
- KATO, M. *Trefoil factors and human gastric cancer (review)*. *Int J Mol Med*, v.12 (1), p.3-9, 2003.
- KHAYAT, A.S.; GUIMARAES, A.C.; CALCAGNO, D.Q.; SEABRA, A.D.; LIMA, E.M.; LEAL, M.F.; FARIA, M.H.; RABENHORST, S.H.; ASSUMPCAO, P.P.; DEMACHKI, S.; SMITH, M.A.; BURBANO, R.R. *Interrelationship between TP53 gene deletion, protein expression and chromosome 17 aneusomy in gastric adenocarcinoma*. *BMC Gastroenterol*, v.9, p.55, 2009.

KREJS G.J. *Gastric cancer: epidemiology and risk factors*. Dig Dis, v.28 (4-5), p.600-3, 2010.

KSIAA, F.; ZIADI, S.; AMARA, K.; KORBI, S.; TRIMECHE, M. *Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma*. Clin Chim Acta, v.404, p.128-133, 2009. [DOI: 10.1016/j.cca.2009.03.044]

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.; CALCAGNO, D.Q.; BORGES DA COSTA, J.DE F.; SILVA, T.C.; KHAYAT, A.S.; CHEN, E.S.; ASSUMPCAO, P.P.; DE ARRUDA CARDOSO SMITH, M.; BURBANO, R.R. *MYC, TP53, and chromosome 17 copy-number alterations in multiple gastric cancer cell lines and in their parental primary tumors*. J Biomed Biotechnol, v.2011, 2011. [DOI: 10.1155/2011/631268]

LEAL, M.F.; MARTINS DO NASCIMENTO, J.L.; DA SILVA, C.E.; VITA LAMARAO, M.F.; CALCAGNO D.Q.; KHAYAT, A.S.; ASSUMPCAO, P.P.; CABRAL, I.R.; DE ARRUDA CARDOSO SMITH, M.; BURBANO, R.R. *Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines*. Cancer Genet Cytogenet, v.195 (1), p.85-91, 2009.

LEUNG, W.K.; YU, J.; CHAN, F.K.; TO, K.F.; CHAN, M.W.; EBERT, M.P.; NG, E.K.; CHUNG, S.C.; MALFERTHEINER, P.; SUNG, J.J. *Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues*. J Pathol, v.197, p.582– 588, 2002.

LIMA, V.P.; DE LIMA, M.A.; ANDRÉ, A.R.; FERREIRA, M.V.; BARROS, M.A.; RABENHORST, S.H. *H pylori (CagA) and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas: correlation with p53 mutation and c-Myc, Bcl-2 and Bax expression*. World J Gastroenterol, v.14 (6), p.884-91, 2008.

MACDONALD, J.S. *Gastric cancer: chemotherapy of advanced disease*. Hematol Oncol, v.10 (1), p.37-42, 1992.

MAY, F.E.B.; WESTLEY, B.R. *Expression of human intestinal trefoil factor in malignant-cells and its regulation by estrogen in breast-cancer cells*. J Pathol, v.182, p.404–413, 1997.

_____. *Close physical linkage of the genes encoding the pNR-2/pS2 protein and human spasmodic protein (hSP)*. Hum Genet, v.99, p.303-307, 1997.

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

MIYAHARA, R.; NIWA, Y.; MATSUURA, T.; MAEDA, O.; ANDO T.; OHMIYA, N.; ITOH, A.; HIROOKA, Y.; GOTO, H. *Prevalence and prognosis of gastric cancer detected by screening in a large Japanese population: data from a single institute over 30 years*. J Gastroenterol Hepatol, v.22 (9), p.1435-42, 2007.

MURPHY, G.; PFEIFFER, R.; CAMARGO, M.C.; RABKIN, C.S. *Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location*. *Gastroenterology*, v.137 (3), p.824-33, 2009.

MÜLLAUER, L.; GRUBER, P.; SEBINGER, D.; BUCH, J.; WOHLFART, S.; CHOTT, A. *Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease*. *Mutat Res*, v.488 (3), p.211-31, 2001.

NAGINI, S. *Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention*. *World J Gastrointest Oncol*, v.4 (7), p.156-69, 2012.

NEUGUT, A.I.; HAYEK, M.; HOWE, G. *Epidemiology of gastric cancer*. *Semin Oncol*, v.23 (3), p.281-91, 1996.

NIE, S.N.; QIAN, X.M.; WU, X.H.; YANG, S.Y.; TANG, W.J.; XU, B.H.; HUANG, F.; LIN, X.; SUN, D.Y.; Sun, H.C.; Li, Z.S. *Role of TFF in healing of stress-induced gastric lesions*. *World J Gastroenterol*, v.9, p.1772-1776, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. Organização Mundial De Saúde. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

OTA, H.; HAYAMA, M.; MOMOSE, M.; EL-ZIMAITY, H.M.; MATSUDA, K.; SANO, K.; MARUTA, F.; OKUMURA, N.; KATSUYAMA, T. *Co-localization of TFF2 with gland mucous cell mucin in gastric mucous cells and in extracellular mucous gel adherent to normal and damaged gastric mucosa*. *Histochem Cell Biol*, v.126, p.617-625, 2006.

PANANI, A.D. *Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications*. *Cancer Lett*, v.266 (2), p.99-115, 2008.

PARK, B.; SHIN, A.; PARK, S.K.; KO, K.P.; MA, S.H.; LEE, E.H.; GWACK, J.; JUNG, E.J.; CHO, L.Y.; YANG, J.J.; YOO, K.Y. *Ecological study for refrigerator use, salt, vegetable, and fruit intakes, and gastric cancer*. *Cancer Causes Control*, v.22 (11), p.1497-502, 2011.

PETERSON, A.J.; MENHENIOTT, T.R.; O'CONNOR, L.; WALDUCK, A.K.; FOX, J.G.; KAWAKAMI, K.; MINAMOTO, T.; ONG, E.K.; WANG, T.C.; JUDD, L.M.; GIRAUD, A.S. *Helicobacter pylori infection promotes methylation and silencing of trefoil factor 2, leading to gastric tumor development in mice and humans*. *Gastroenterology*, v.139 (6), p.2005-17, 2010. [DOI: 10.1053/j.gastro.2010.08.043]

PFÄFFL, M.W. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, v.29 (9), 2001.

PHAROAH, P.D.; CALDAS, C. *Molecular genetics and the assessment of human cancers*. *Expert Rev Mol Med*, v.1, p.1-19, 1999.

POULSEN, S.S.; THULESEN, J.; CHRISTENSEN, L.; NEXO, E.; THIM, L. *Metabolism of oral trefoil factor 2 (TFF2) and the effect of oral and parenteral TFF2 on gastric and duodenal ulcer healing in the rat*. *Gut*, v.45, p.516-522, 1999.

- RAJ, A.; RIFKIN, S.A.; ANDERSEN, E.; VAN OUDENAARDEN, A. *Variability in gene expression underlies incomplete penetrance*. *Nature*, v.463 (7283), p.913-8, 2010.
- ROCCO, A.; NARDONE, G. *Diet, H pylori infection and gastric cancer: evidence and controversies*. *World J Gastroenterol*, v.13 (21), p.2901-12, 2007.
- ROPERO, S.; ESTELLER, M. *The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer*. *Mol Oncol*, v.1 (1), p.19-25, 2007.
- SELARU, F.M.; DAVID, S.; MELTZER, S.J.; HAMILTON, J.P. *Epigenetic events in gastrointestinal cancer*. *Am J Gastroenterol*, v.104, p.1910-1912, 2009. [DOI: 10.1038/ajg.2008.145]
- SHAMIR, R.; MARON-KATZ, A.; TANAY, A.; LINHART, C.; STEINFELD, I.; SHARAN, R.; SHILOH, Y.; ELKON, R. *EXPANDER-an integrative program suite for microarray data analysis*. *BMC Bioinformatics*, v.6, p.232, 2005.
- SHANG, J.; PENA, A.S. *Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer*. *World J Gastroenterol*, v.11 (27), p.4131-9, 2005.
- SHI, S.Q.; CAI, J.T.; YANG, J.M. *Expression of trefoil factors 1 and 2 in precancerous condition and gastric cancer*. *World J Gastroenterol*, v.12 (19), p.3119-22, 2006.
- SJÖDAHL, K.; LAGERGREN, J. *Epidemiological aspects of gastric adenocarcinoma: are predictive diagnostics and targeted preventive measures possible?* *EPMA J*, v.1 (3), p.461-7, 2010. [DOI: 10.1007/s13167-010-0043-0]
- SJODAHL, K.; LU, Y.; NILSEN, T.I.; YE, W.; HVEEM, K.; VATTEN, L.; LAGERGREN, J. *Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study*. *Int J Cancer*, v.120 (1), p.128-32, 2007.
- SMITH, M.G.; HOLD, G.L.; TAHARA, E.; EL-OMAR, E.M. *Cellular and molecular aspects of gastric cancer*. *World J Gastroenterol*, v.12 (19), p.2979-90, 2006.
- SOYOUNG, IM; YOO, C.; JUNG, J.H.; CHOI, H.J.; YOO, J.; KANG, C.S. *Reduced Expression of TFF1 and Increased Expression of TFF3 in Gastric Cancer: Correlation with Clinicopathological Parameters and Prognosis*. *International Journal of Medical Sciences*, v.10 (2), p.133-140, 2013. [DOI: 10.7150/ijms.5500]
- TAHARA, E. *Genetic pathways of two types of gastric cancer*. *IARC Sci Publ*, v.157, p.327-49, 2004.
- TAMURA, G. *Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer*. *World journal of gastroenterology*, v.12 (2), p.192-8, 2006.
- TAUPIN, D.; PODOLSKY, D.K. *Trefoil factors: initiators of mucosal healing*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.4 (9), p.721-732, 2003.

TOMASETTO, C.; RIO, M.C.; GAUTIER, C.; WOLF, C.; HAREUVENI, M.; CHAMBON, P.; LATHE, R. *hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma*. EMBO J, v.9, p.407–414, 1990.

UNION FOR INTERNATIONAL CANCER CONTROL – UICC. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7th edition, 2009.

VAUHKONEN, M.; VAUHKONEN, H.; SIPPONEN, P. *Pathology and molecular biology of gastric cancer*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, v.20 (4), p.651-74, 2006.

ANEXO I
Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UFPA/HUJBB



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COORDENADORIA DE ATIVIDADES ACADÊMICAS
DIVISÃO DE PESQUISA E EXTENSÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética em Pesquisa analisou no dia 14.05.2004, o projeto de pesquisa intitulado "**Genética do Câncer Gástrico**", desenvolvido por Marília de Arruda Cardoso Smith, Rommel Burbano, Silvia Regina Caminada de Toledo e Maisa Yoshimoto, sob a Orientação do Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção, obtendo **APROVAÇÃO** para desenvolvê-lo nesta instituição.

Belém, 14 de maio de 2004


DR. EDUARDO LEITÃO MAIA

CRM 1997

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa/ HUJBB

ANEXO II

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 15 de maio de 2009.
CEP 0511/09

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ELIZABETH SUCHI CHEN
Co-Investigadores: Rommel Rodriguez Burbano; Mariana Ferreira Leal; Elizabeth Suchi Chen; Carolina de Oliveira Gigeck; Fernanda Wisnieski; Marília de Arruda Cardoso Smith (orientadora)
Disciplina/Departamento: Genética Humana/Morfologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Aspectos genéticos e epigenéticos na carcinogênese gástrica**".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo clínico observacional caso-controle.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco intenso, desconforto intenso, procedimento cirúrgico.

OBJETIVOS: Identificar alterações genéticas e epigenéticas envolvidas na carcinogênese gástrica..

RESUMO: Serão obtidas amostras de tecido gástrico tumoral e normal durante procedimento cirúrgico, para análises genéticas e epigenéticas. Inicialmente serão selecionados genes diferencialmente expressos por microarray em duas linhagens celulares gástricas após tratamento com agentes desmetilante e desacetilante para a identificação de genes controlados por metilação da DNA e/ou metilação e acetilação de histonas. Em seguida, esses genes terão sua expressão avaliada em 50 amostras de tecido gástrico normal e 50 amostras de tecido tumoral. Os genes que apresentarem diferença de expressão serão avaliados quanto ao padrão de metilação nos promotores gênicos por MS-HRM, e/ou padrão de metilação e acetilação de histona H3K9 por ChIP. Também será avaliado o padrão de metilação e de acetilação de histonas associadas a genes previamente estudados. Paralelamente, será avaliada a expressão de genes envolvidos na maquinaria de metilação de DNA, de metilação de histonas e de acetilação de histona. A expressão gênica e as modificações epigenéticas serão associadas ao sexo, à idade, à localização, à presença de *H. pylori* nas amostras de tecido gástrico, e à extensão do tumor, à presença de metástases em linfonodo e à distância, e ao tipo histopatológico nas amostras de adenocarcinoma gástrico.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A identificação dos genes hipermetilados em células cancerígenas poderá ainda gerar novos marcadores tumorais associados, que poderão subsidiar o diagnóstico, o prognóstico e a terapêutica..

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos laboratoriais moleculares que serão realizados por equipe especializada..

TCLE: Apresentado adequadamente.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto..

CRONOGRAMA: Adequado.

OBJETIVO ACADÊMICO: Pós-Doutorado.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **10/05/10** e **10/05/11**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0511/09

ANEXO III

Termo de consentimento livre e esclarecido UFPA/HUJBB

A Universidade Federal do Pará, em colaboração com o Hospital Universitário João de Barros Barreto, está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá conhecer melhor os mecanismos que ocasionam as lesões do estômago e o desenvolvimento de tumor gástrico, através da identificação das alterações genéticas (cromossomos e genes) associadas ao quadro clínico do paciente e exame histopatológico.. Estes estudos são realizados em pequenos fragmentos de tecido estomacal removido por cirurgia ou por exame endoscópico e oferecem novas possibilidades de diagnóstico.

Você está sendo admitido(a) neste Hospital, para estabelecimento de diagnóstico e/ou tratamento de alguma doença gástrica e há a necessidade da remoção de material biológico relacionado à enfermidade. Parte do material retirado é encaminhado para exames laboratoriais, necessários para o diagnóstico definitivo. O restante do material não utilizado é armazenado para novos exames, se necessário.

A obtenção do fragmento de tecido estomacal para pesquisa não implicará em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem em aumento no tempo do exame ou cirurgia. O fragmento de material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras, preservando sua privacidade e identidade. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do paciente.

É necessário esclarecê-lo (a) que não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu atendimento ou tratamento.

Caso você tenha alguma dúvida sobre este documento ou em relação à pesquisa, por gentileza, entre em contato com a Prof. Rommel Burbano, pelo telefone 211-1727 ou 88027972.

Uma cópia deste documento será arquivada em seu prontuário e, se desejar, uma cópia lhe será fornecida.

<p>Declaro estar ciente das informações prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o teor, e autorizo a utilização de amostras de tecido retiradas de meu organismo.</p> <p style="text-align: center;">Belém, de de</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">Assinatura do Paciente ou Responsável</p> <p>Nome:</p> <p>RG:</p>
--

ANEXO IV

Termo de consentimento livre e esclarecido UNIFESP/HSP

Termo de consentimento livre e esclarecido

ASPECTOS GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS NA CARCINOGENESE GÁSTRICA

As seguintes informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo.

A Disciplina de Genética do Departamento de Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) está desenvolvendo uma pesquisa, por meio da identificação das alterações genéticas e epigenéticas associadas ao quadro clínico do paciente e ao exame histopatológico, que permitirá conhecer melhor os mecanismos causadores das lesões do estômago e do desenvolvimento de tumor gástrico e, conseqüentemente, oferecerá novas possibilidades de diagnóstico.

Serão coletados 10 mL de sangue periférico no dia anterior à cirurgia. Serão obtidas amostras de tecido gástrico tumoral e não-neoplásico (margem livre cirúrgica) durante o procedimento cirúrgico. A obtenção de sangue periférico e do fragmento de tecido gástrico para a pesquisa não implicará riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem aumento no tempo do exame ou cirurgia. O desconforto que poderá ocorrer será devido ao próprio procedimento cirúrgico. As amostras coletadas serão utilizadas para análises genéticas e epigenéticas. Como rotineiramente, parte da amostra tumoral será encaminhada para exames laboratoriais, necessários para o diagnóstico definitivo. Será utilizado material estéril e descartável.

Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que alterações genéticas e epigenéticas estão envolvidas no desenvolvimento do câncer. Somente no final do estudo, poderemos identificar a presença de algum benefício.

Em qualquer etapa do estudo, o paciente ou seu responsável terá acesso aos profissionais relacionados com a pesquisa para esclarecimento de dúvidas. Os principais investigadores são Prof^a. Dr^a. Marília Smith, Prof. Dr. Laércio Gomes Lourenço e Prof. Dr. Ricardo Artigiani, que podem ser encontrados na UNIFESP, Rua Botucatu, 740, Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Genética, telefone (011) 5576-4260. Se houver alguma consideração a fazer, ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da UNIFESP, Rua Botucatu, 572, 1º andar, cj 14, 5571-1062, fax 5539-7162, e-mail: cepunifesp@epm.br.

É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. O material biológico será identificado no laboratório

por um código formado por números e letras, preservando sua privacidade e identidade. Os resultados obtidos estarão à disposição do paciente. O material biológico obtido será utilizado somente para o presente estudo. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do paciente.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consulta. Também não há compensação financeira relacionada à participação.

Na eventualidade de ocorrer qualquer dano pessoal causado direta ou indiretamente pelos procedimentos propostos neste estudo (anexo causal comprovado), o participante terá direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações estabelecidas.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "ASPECTOS GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS NA CARCINOGENESE GÁSTRICA".

Eu discuti com o Dr. _____ sobre minha decisão de participar do estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o processo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Nome do paciente

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do participante / representante legal

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXO V

Tabela descritiva das amostras de adenocarcinoma gástrico utilizadas no presente estudo.

ID	Histopatológico	Idade	pTNM	Estadiamento	Gênero
20pT/G67	intestinal	57	pT2N1MX	IIA	MAS
G1	intestinal	35	pT3N3MX	IIIB	MAS
G105/107	intestinal	68	pT3N1	IIA	MAS
G11	difuso	43	pT4N1M1	IV	FEM
G111	intestinal	55	pT4bN3bM1	IV	MAS
G121	difuso	50	pT4N3a	IIIC	FEM
G125	intestinal	49	pT4bN3aM1	IV	MAS
G127	intestinal	65	pT3N2	IIA	MAS
G129	intestinal	64	pT4aN3aM1	IV	MAS
G13	difuso	55	pT4N1MX	IIIA	FEM
G133	intestinal	72	pT3N3aMx	IIIB	MAS
G135	difuso	4	pT4aN3bMx	IIIC	FEM
G15	intestinal	41	pT4N2MX	IIIB	MAS
G17	intestinal	83	pT3N1M1	IV	MAS
G19	difuso	55	pT1N0Mx	IA	FEM
G21	intestinal	39	pT2N1MX	IIA	MAS
G23	intestinal	53	pT3N1MX	IIB	MAS
G25	intestinal	68	pT2N1MX	IIA	MAS
G27	intestinal	61	pT1N1MX	IB	MAS
G3	difuso	79	pT1N0MX	IA	FEM
G39	difuso	63	pT2N1Mx	IIA	FEM
G45	difuso	84	pT4aN2Mx	IIIB	FEM
G5	intestinal	72	pT3N0MX	IIIB	MAS

G51	difuso	42	pT2N1Mx	IIA	FEM
G53	difuso	48	pT3N0Mx	IIA	FEM
G57a	difuso	65	pT2N0Mx	IB	FEM
G59a	intestinal	69	pT4aN2Mx	IIIB	MAS
G61	intestinal	46	pT4N2Mx	IIIB	MAS
G65	intestinal	68	pT3N1Mx	IIB	MAS
G69	intestinal	73	pT1N0Mx	IA	MAS
G7	intestinal	48	pT2N1MX	IIA	MAS
G75	intestinal	71	pT3N0Mx	IIA	MAS
G77	difuso	80	pT4aN2M1	IV	FEM
G79	difuso	32	pT4aN0Mx	IIB	FEM
G81	difuso	71	pT3N0Mx	IIA	FEM
G9	difuso	47	pT3N2M1	IV	FEM
G91	intestinal	82	pT1N0MX	IA	MAS
G93	intestinal	61	pT1N0Mx	IA	MAS
G95	difuso	53	pT4aN3Mx	IIIC	FEM
G97	intestinal	82	pT4aN1cMx	IIIA	MAS
