



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE O
ADENOCARCINOMA DA JUNÇÃO ESÔFAGO-GÁSTRICA E O
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.

Rui Wanderley Mascarenhas Junior

Belém – Pará
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE O
ADENOCARCINOMA DA JUNÇÃO ESÔFAGO-GÁSTRICA E O
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.

Autor: Rui Wanderley Mascarenhas Junior

Orientador: Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção

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 – Pará
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Mascarenhas Junior, Rui Wanderley, 1981-
Análise da expressão gênica diferencial entre o
adenocarcinoma da junção esofago-gástrica e o adenocarcinoma
gástrico. / Rui Wanderley Mascarenhas Junior. - 2016.

Orientador: Paulo Pimentel de Assumpção.
Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Núcleo de Pesquisa em
Oncologia, Programa de Pós-Graduação em
Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2016.

1. Neoplasias Gástricas. 2. Adenocarcinoma.
3. Função Esofagogástrica. 4. Expressão Gênica.
I. Título.

CDD 23. ed. 616.99433098115

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rui Wanderley Mascarenhas Junior

Análise da expressão gênica diferencial entre o adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e o adenocarcinoma gástrico.

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

MEMBROS

Prof^a. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)

Assinatura: _____

Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)

Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Danielle Queiroz Calcagno

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)

Assinatura: _____

SUPLENTE

Prof. Dr. André Salim Khayat

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)

Assinatura: _____

ORIENTADOR

Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho,
a todas as pessoas com câncer,
que acreditam em Deus e na ciência
e não perdem a esperança.*

AGRADECIMENTO

Ao meu pai por ter me dado a razão.

A minha mãe por ter me dado o amor.

A minha esposa por me dar o equilíbrio.

Ao meu irmão por me dar a inspiração.

A minha filha por me fazer sonhar.

Ao meu orientador por ser um exemplo.

A colega Taissa por me incentivar.

EPÍGRAFE

“O que fazemos hoje reverbera por toda eternidade”.

Gregory Widen.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

FIGURAS	Página
Figura 1. Taxa de incidência do câncer gástrico em países selecionados de 1975 a 2010; taxa padronizada por 1000.000 homens.	1
Figura 2. Incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer no mundo sem distinção por gênero.	3
Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma, no Brasil.	4
Figura 4. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma, na região norte do Brasil.	4
Figura 5. Divisões anatômicas do estômago: cárdia, corpo, fundo e antro/piloro.	5
Figura 6. Fotomicrografia de adenocarcinoma difuso (A) e intestinal (B) – aumento de 40 vezes.	6
Figura 7. Localização da Junção Esôfago-Gástrica.	9
Figura 8. Esquema topográfico da classificação de Siwert para adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica.	12
Figura 9. Fluxograma das etapas de processamento e hibridação do <i>GeneChip</i> [®] <i>Gene 1.0 ST Array</i> .	24
Figura 10. Doenças estatisticamente significativas relacionadas a expressão dos genes.	32

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Página
Tabela 1. Estimativa do número de novos cânceres gástricos nos anos de 2012 e 2015.	2
Tabela 2. TNM patológico adenocarcinoma gástrico.	7
Tabela 3. Estadiamento adenocarcinoma gástrico.	8
Tabela 4. TNM patológico do adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e adenocarcinoma de esôfago.	10
Tabela 5. Estadiamento do adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e adenocarcinoma de esôfago.	11
Tabela 6. Caracterização das amostras utilizadas no estudo.	21
Tabela 7. Genes hiperexpressos no adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica em relação ao adenocarcinoma gástrico.	30
Tabela 8. Genes hipoexpressos no adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica em relação ao adenocarcinoma gástrico.	30
Tabela 9. Genes validados pelo TCGA, comparando adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e adenocarcinoma gástrica.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

INCA- Instituto Nacional do Câncer

OMS – Organização Mundial da Saúde

JCGC – Classificação Japonesa de Câncer Gástrico

pTNM- TNM patológico

pT- Extensão do tumor primário

pN- Ausência ou presença e extensão de metástases para linfonodos regionais

pM- Ausência ou presença de metástases à distância

AJCC – Comitê Conjunto Americano sobre o Câncer

JEG – Junção esôfago-gástrica

JEC- Junção escamo colunar

UICC – União Internacional Contra o Câncer

cDNA – DNA complementar

MDK – gene midkine

HUJBB- Hospital Universitário João de Barros Barreto

RMA – Média robusta de várias matrizes

TCGA – Atlas Genômico do Câncer

RESUMO

O câncer gástrico é a quinta neoplasia maligna mais frequente no mundo e a terceira em mortalidade. Em 2010, a UICC lançou a edição mais recente do manual de estadiamento TNM, em que o adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica (JEG), com epicentro a 5 cm da JEG e que se estende para o esôfago é classificado e estadiado junto com os tumores de esôfago, enquanto que aqueles que não se estendem ao esôfago continuam sendo classificados e estadiados como adenocarcinoma gástrico. Esta mudança ocorreu devido às diferenças entre os adenocarcinomas da JEG e gástrico, como fatores de risco, tratamento e prognóstico. Com o desenvolvimento da biologia molecular, diversas áreas - como a transcriptômica, que estuda a expressão gênica em uma escala genômica - passaram a ser utilizadas a fim de explorar diferenças de expressão entre diversos tipos tumorais. Nesse sentido, o Atlas Genômico do Câncer (TCGA) é um banco de dados que tem como objetivo gerar mapas completos das alterações genômicas-chave dos principais tipos de câncer, no intuito de acelerar a compreensão da base molecular do câncer através da aplicação de tecnologias de análise de genoma, o que o torna uma poderosa ferramenta nesta área. Tendo em vista esses aspectos, o objetivo deste trabalho consiste em analisar comparativamente o transcriptoma de adenocarcinomas da JEG e gástricos, utilizando dados do TCGA como ferramenta para validação. Para este fim, foram obtidas amostras de oito pacientes submetidos a gastrectomia no Hospital Universitário João de Barros Barreto, sendo quatro adenocarcinomas da JEG e quatro adenocarcinomas gástricos. As amostras foram analisadas utilizando a técnica de microarranjo de expressão com os chips *Human Gene 1.0 ST array* (Affymetrix®), que permitem a análise de 36.079 transcritos. A análise do transcriptoma revelou 36 genes diferencialmente expressos (fold-change maior ou igual a 5), sendo 11 genes hiperexpressos e 25 hipoexpressos no adenocarcinoma da JEG em relação aos adenocarcinomas gástricos. Na análise do TCGA, foram identificados 509 genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$), sendo os genes *ASPN*, *LIPF* e *HNRNPM* validados por este banco de dados. Assim, conclui-se que a análise gênica diferencial demonstra alterações significativas entre os adenocarcinoma gástrico e da JEG e que suas diferenças moleculares podem refletir nas características clínicas, reforçando que estas neoplasias devam ser classificadas e estadiadas de forma diferente.

Palavras-chave: adenocarcinoma gástrico, expressão, genes, junção esôfago-gástrica, TCGA.

ABSTRACT

Gastric cancer is the fifth most common malignancy worldwide and the third in mortality. In 2010, UICC released the latest edition of the TNM staging manual in the adenocarcinoma esophageal-gastric junction (JEG) with epicenter at 5 cm from the JEG and extending into the esophagus is classified and staged together with the esophageal tumors, while those that do not extend into the esophagus remain classified and staged as gastric adenocarcinoma. This change was due to differences between adenocarcinomas of the JEG and stomach, risk factors, treatment and prognosis. With the development of molecular biology, several areas - such as transcriptomics, studying gene expression on a genomic scale - started to be used to explore differences in expression in various tumor types. In this sense, the Atlas Genomic Cancer (TCGA) is a database that aims to generate complete maps of the genomic key changes of the major types of cancer, in order to accelerate the understanding of the molecular basis of cancer through the application of technology genome analysis, which makes it a powerful tool in this area. Considering these aspects, the aim of this study is to comparatively analyze the transcriptome of adenocarcinomas of the JEG and gastric using TCGA data as a tool for validation. To this end, the gastrectomy at the University Hospital João de Barros Barreto eight patients samples were obtained submitted, four adenocarcinomas of the JEG and four gastric adenocarcinomas. Samples were analyzed using the technique of expression microarray chips with Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix®) which allow the analysis of 36,079 transcripts. The transcriptome analysis revealed 36 genes differentially expressed (fold-change greater than or equal to 5), 11 and 25 hipoexpressos hiperexpressos genes in JEG adenocarcinoma in relation to gastric adenocarcinomas. In the analysis of TCGA were identified 509 differentially expressed genes ($p < 0.05$), and the ASPN genes, LiPF HNRNPM and validated for this database. Thus, it is concluded that the differential gene analysis shows significant changes between gastric adenocarcinoma and JEG and its molecular differences may reflect the clinical features, stressing that these tumors should be classified and staged differently.

Keywords: gastric adenocarcinoma, expression, genes, esophageal-gastric junction, TCGA.

SUMÁRIO	Página
FOLHA DE APROVAÇÃO	II
DEDICATÓRIA	III
AGRADECIMENTO	IV
EPÍGRAFE	V
LISTA DE ILUSTRAÇÃO	VI
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VIII
RESUMO	IX
<i>ABSTRACT</i>	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia	1
1.2 Adenocarcinoma gástrico	5
1.3 Adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica	9
1.4 Diferenças entre adenocarcinoma gástrico e adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica	14
1.5 Transcriptômica	15
1.6 O atlas genômico do câncer	17
1.7 Análise de microarranjo de expressão	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 METODOLOGIA	20
3.1 Amostras	20
3.1.1 Tecidos gástricos	20
3.1.2 Caracterização das amostras	20
3.2 Extração de RNA	21
3.3 Microarranjo	22

3.3.1 Adição de controles exógenos	22
3.3.2 Síntese do cDNA	22
3.3.3 Síntese e quantificação do RNA complementar	23
3.3.4 Síntese de cDNA e fita simples de DNA	23
3.3.5 Hidrólise do RNA complementar, purificação e quantificação da fita simples de DNA	25
3.3.6 Fragmentação da fita simples de DNA	25
3.3.7 Marcação de DNA fita simples fragmentado	25
3.3.8 Hibridação	26
3.3.9 Lavagem e coloração	26
3.3.10 Leitura	27
3.3.11 Processamento de dados	27
3.3.12 Identificação dos genes diferencialmente expressos	28
3.3.13 Análise funcional dos genes diferencialmente expressos	28
3.3.14 Validação dos resultados	28
4 RESULTADOS	30
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO	40
7 REFERÊNCIAS	41
ANEXO - Genes diferencialmente expressos obtidos a partir da análise dos dados do TCGA, comparando adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e adenocarcinoma gástrico.	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo responsável em 2015, por uma estimativa de 8,8 milhões de mortes, e aproximadamente 15,2 milhões de casos novos (Globocan, 2015).

Apesar dos grandes avanços na medicina, com diagnósticos mais precoces e terapias mais eficientes, a prevalência das neoplasias malignas continua a crescer, devido ao envelhecimento da população e a adoção de hábitos como tabagismo, alcoolismo, sedentarismo e dieta inadequada (Weir *et al.*, 2015).

O número absoluto de casos de câncer gástrico continua aumentando a cada ano de uma forma global, porém em alguns países a taxa de incidência está diminuindo gradativamente (Figura 1), principalmente por causa das melhorias nas técnicas de preservação de alimentos, com o uso de uma quantidade menor de sal e a identificação da infecção pelo *H. pylori* como fator de risco (Globocan, 2015).

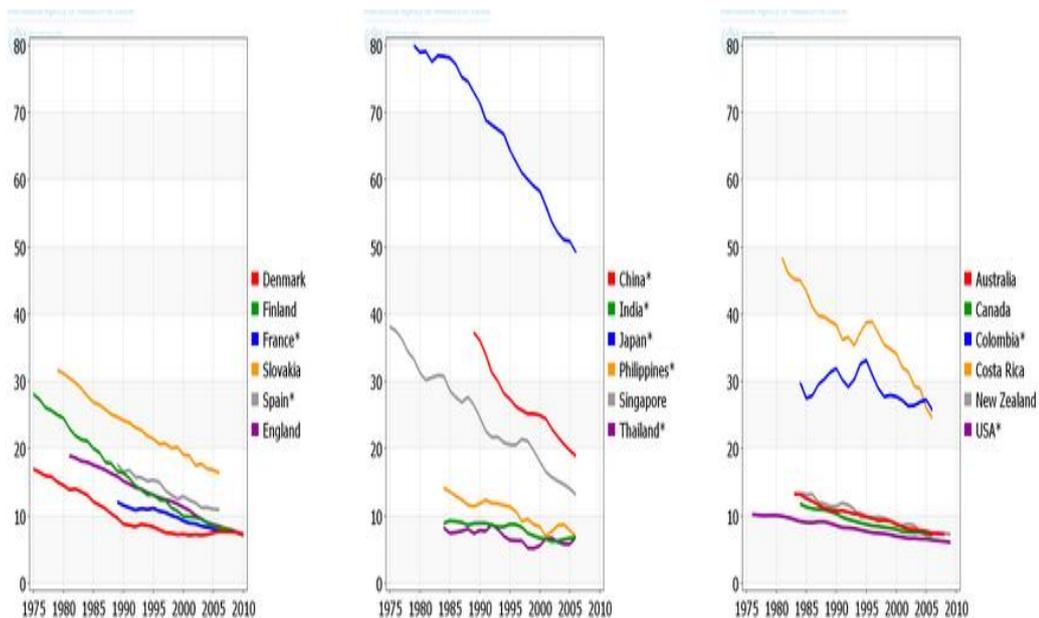


Figura 1: Taxa de incidência do câncer gástrico em países selecionados de 1975 a 2010; taxa padronizada por 1000.000 homens (Globocan, 2015).

Em 2015 a estimativa mundial foi de aproximadamente 1.034.124 (Tabela 1) casos novos e cerca de 785.558 mortes decorrentes do câncer gástrico, sendo responsável por 8,8% das mortes por câncer, colocando-o como a quinta neoplasia maligna mais frequente no mundo, de acordo com os dados da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), ficando atrás apenas do câncer de pulmão, mama, cólon e próstata, e correspondendo a quase 6,8% de todos os cânceres excluindo as neoplasias de pele não-melanoma. O câncer gástrico faz parte também das três neoplasias com maior mortalidade no mundo, a saber: pulmão com 19,4%; fígado com 9,1% e estômago com 8,8% (Figura 2) (Globocan, 2015).

Tabela 1 - Estimativa do número de novos casos de câncer gástrico nos anos de 2012 e 2015 (Globocan, 2015).

Ano		Homem	Mulher	Ambos os gêneros
	Total	631.293	320.301	951.594
2012	Idade < 65	284.532	131.856	416.388
	Idade ≥ 65	346.761	188.445	535.206
	Total	688.408	345.716	1.034.124
2015	Idade < 65	308.040	141.677	449.717
	Idade ≥ 65	380.368	204.039	584.407

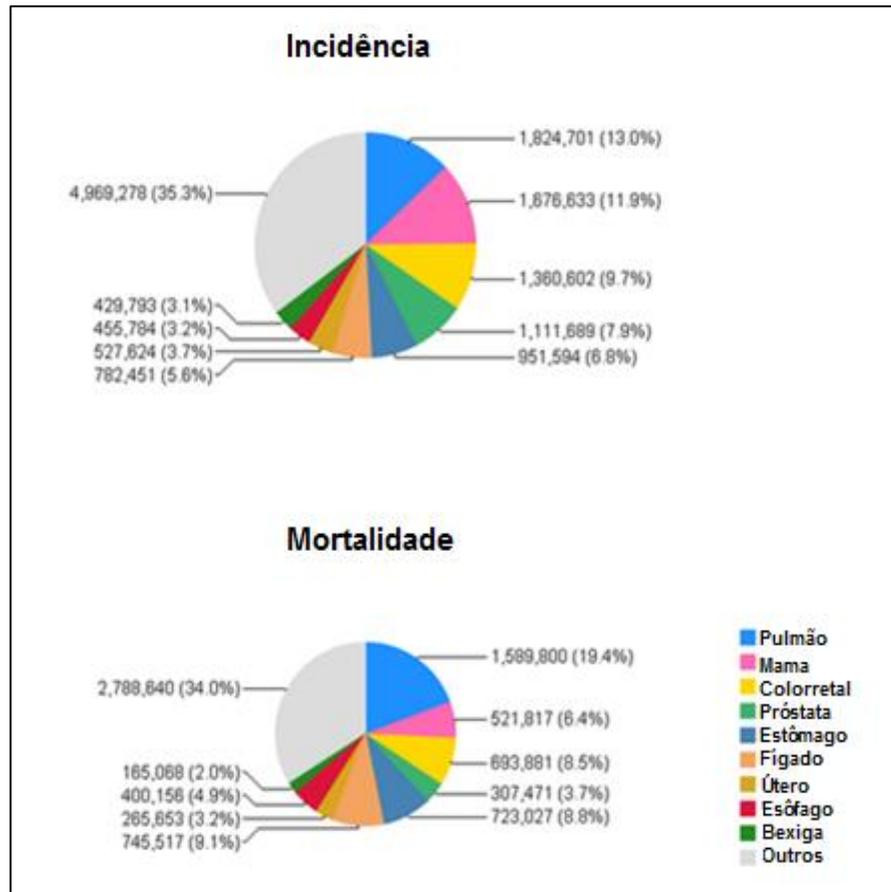
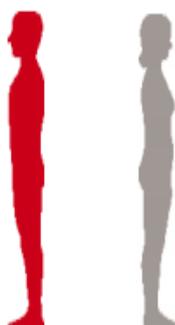


Figura 2: Incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer no mundo sem distinção por gênero (Globocan, 2015).

Em 2016, o INCA estimou que o número de casos novos de câncer gástrico no Brasil foi de 12.920 homens e de 7.600 mulheres (Figura 3), sendo o quarto tipo de câncer mais frequente entre os homens e o quinto entre as mulheres. (INCA, 2016)

A região Norte possui elevada incidência dessa neoplasia, especialmente o estado do Pará, onde tumores gástricos representam o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens e o quarto entre as mulheres (Figura 4) (INCA, 2016).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens 	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 3: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma, no Brasil (INCA, 2016).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.470	28,6%	Homens 	Mulheres	Colo do Útero	1.970	23,1%
Estômago	970	11,2%			Mama Feminina	1.810	21,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	680	7,9%			Cólon e Reto	480	5,6%
Cólon e Reto	440	5,1%			Estômago	480	5,6%
Bexiga	370	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	410	4,8%
Leucemias	310	3,6%			Glândula Tireoide	270	3,2%
Cavidade Oral	290	3,4%			Leucemias	250	2,9%
Laringe	250	2,9%			Ovário	250	2,9%
Linfoma não Hodgkin	230	2,7%			Corpo do Útero	230	2,7%
Sistema Nervoso Central	230	2,7%			Sistema Nervoso Central	190	2,2%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 4: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma, na região norte do Brasil (INCA, 2016).

O câncer de estômago é um tipo de tumor que não possui um bom prognóstico, sendo a razão Morte/Incidência considerada alta em todas as partes do mundo. Sua sobrevida relativa em cinco anos é considerada baixa de uma forma geral, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos, mas quando diagnosticado em estádios mais precoces, o tratamento tem uma maior chance de cura (INCA, 2016).

1.2 Adenocarcinoma gástrico

O câncer gástrico possui três tipos histológicos principais, o mais comum é o adenocarcinoma que é originado das glândulas da camada mucosa, responsável por até 95% dos tumores diagnosticados; o linfoma é originário do tecido linfoide e representa 3% dos casos; e o leiomiossarcoma, caracterizado por iniciar-se em tecidos que dão origem aos músculos e representa 1 a 2% dos casos (Espejo *et al.*, 2003).

O estômago é constituído por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa e é dividido em quatro regiões: cárdia, fundo, corpo e antro-piloro, todas regiões podendo ser acometidas pelo adenocarcinoma (Figura 5) (Halinan *et al.*, 2014).

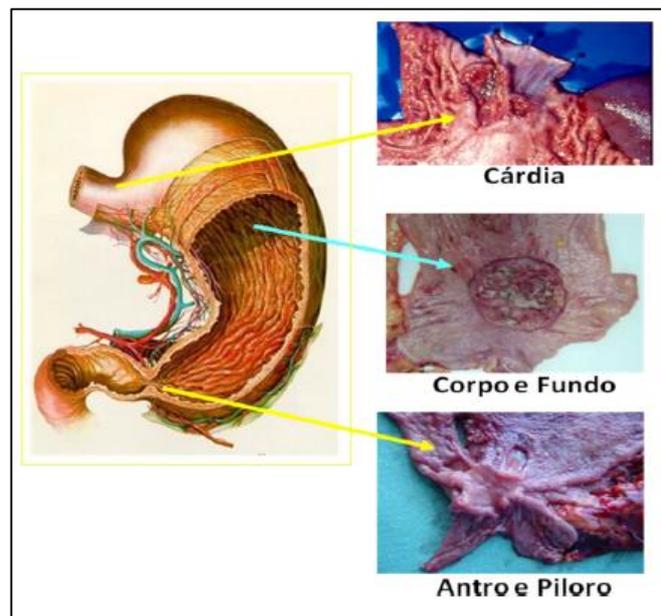


Figura 5: Divisões anatômicas do estômago: cárdia, corpo, fundo e antro/piloro (Haliman *et al.*, 2014).

Dentre as possíveis classificações do adenocarcinoma gástrico, as mais utilizadas são a de Laurén (1965), de Borrmann (1926) e da OMS (Shim *et al.*, 2014).

Segundo Laurén (1965), os adenocarcinomas gástricos podem ser classificados conforme seu aspecto microscópico em dois tipos, o intestinal e o difuso (Turner *et al.*, 2013) (Figura 6). O tipo intestinal geralmente ocorre em indivíduos com idades mais avançadas, com incidência maior no sexo masculino, e está relacionado a lesões pré-cancerosas sequenciais e progressivas, iniciando com a gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia

intestinal, displasia e culminando em carcinoma. O tipo difuso acomete indivíduos mais jovens, com frequência um pouco mais elevada no sexo feminino, registra altas taxas de ocorrência familiar, sugerindo sua ocorrência ligada a fatores genéticos. O aspecto das células neoplásicas é distinto nos dois tipos, sendo o tipo intestinal caracterizado pela presença de células neoplásicas coesas formando estruturas tubulares e uma massa discreta, enquanto que o difuso é caracterizado pela presença de células tumorais pequenas e dispersas que se infiltram difusamente na parede do estômago (Qiu *et al.*, 2013).

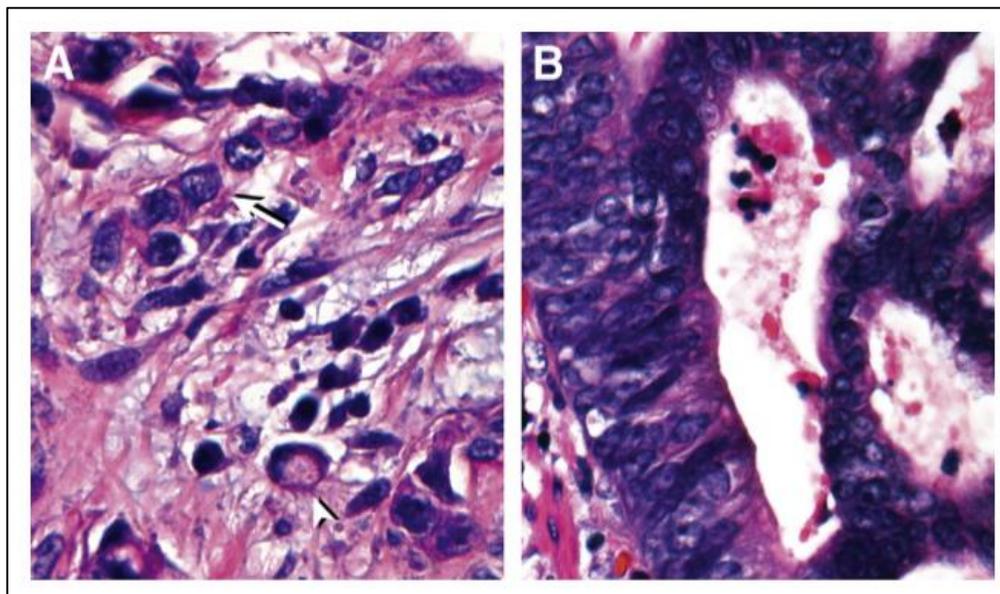


Figura 6: Fotomicrografia de adenocarcinoma difuso (A) e intestinal (B) – aumento de 40 vezes (Tuner *et al.*, 2013).

O sistema proposto pela OMS considera o padrão histológico encontrado e classifica os tumores de acordo com o predominante. O adenocarcinoma subdivide-se em quatro tipos, de acordo com seu padrão de crescimento (papilar, tubular, mucinoso e em anel de sinete) (Zheng *et al.*, 2010).

No Brasil, para o estadiamento tumoral, utiliza-se a classificação TNM da AJCC (*American Joint Committee on Cancer*). O estadiamento patológico é realizado através da análise microscópica proveniente da ressecção cirúrgica e leva em conta critérios como o tamanho do tumor, o acometimento linfonodal e a presença de metástases (Sobin *et al.*, 2010) (Tabelas 2 e 3).

Na Tabela 2 estão classificados os tipos de acordo com a profundidade do tumor (em Tumor Primário), a presença e/ou ausência de linfonodos comprometidos (em Linfonodos

Regionais) e a presença e/ou ausência de metástase à distância (em Metástase à Distância). Em seguida, na Tabela 3, encontra-se o estadiamento do tumor que está relacionado ao prognóstico do paciente e é resultante da combinação da classificação observada na Tabela 1 (Washington, 2010).

Tabela 2 - TNM patológico adenocarcinoma gástrico (Washington, 2010).

pT	Tumor primário
pTx	Tumor primário não pode ser identificado.
pT0	Sem evidência de tumor primário.
pTis	Displasia de alto grau.
pT1	Tumor invade lâmina própria, muscular mucosa ou submucosa.
pT1a	Tumor invade lâmina própria ou muscular mucosa.
pT1b	Tumor invade submucosa.
pT2	Tumor invade muscular própria.
pT3	Tumor penetra no tecido conjuntivo subseroso sem invasão do peritônio visceral ou estruturas adjacentes. Também incluem aqueles que se estendem ao gastrocólico ou ligamentos gastrohepáticos, ou para o omento maior ou menor, sem perfuração do peritônio visceral que cobre estas estruturas.
pT4	Tumor invade a serosa (peritônio visceral) ou invade estruturas adjacentes.
pT4a	Tumor invade a serosa (peritônio visceral).
pT4b	Tumor invade estruturas adjacentes como baço, cólon transversal, fígado, diafragma, pâncreas, parede abdominal, glândula adrenal, rim, intestino delgado e retroperitônio.
pN	Linfonodos regionais
pNx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
pN0	Sem invasão linfonodal.
pN1	Metástase em 1-2 linfonodos.
pN2	Metástase em 3-6 linfonodos.
pN3a	Metástase em 7-15 linfonodos.

pN3b	Metástase em 16 ou mais linfonodos
pM	Metástase a distância
pM0	Sem metástase a distância.
pM1	Com metástase a distância.

Tabela 3 - Estadiamento adenocarcinoma gástrico (Washington, 2010).

Estágio	T	N	M
0	pTIS	pN0	pM0
IA	pT1	pN0	pM0
IB	pT2	pN0	pM0
IIA	pT1	pN1	pM0
	pT3	pN0	pM0
	pT2	pN1	pM0
IIB	pT1	pN2	pM0
	pT4a	pN0	pM0
	pT3	pN1	pM0
	pT2	pN2	pM0
IIIA	pT1	pN3	pM0
	pT4a	pN1	pM0
	pT3	pN2	pM0
	pT2	pN3	pM0
IIIB	pT4b	pN0-1	pM0
	pT4a	pN2	pM0
	pT3	pN3	pM0
IIIC	pT4A	pN3	pM0
	pT4B	pN2-3	pM0
IV	Qualquer pT	Qualquer Pn	pM1

1.3 Adenocarcinoma da Junção Esofago-Gástrica

A definição de junção esôfago-gástrica (JEG) não é padronizada. Anatomicamente a JEG está localizada ao nível do ponto em que o esôfago tubular se une a cárdia do estômago. Os fisiologistas definem a JEG como a margem distal do esfíncter esofágico inferior, conforme determinado pela manometria. Endoscopicamente e patologicamente, a JEG corresponde à extensão mais proximal das pregas gástricas longitudinais (Figura 5) (Moniq e Holsher, 2010).

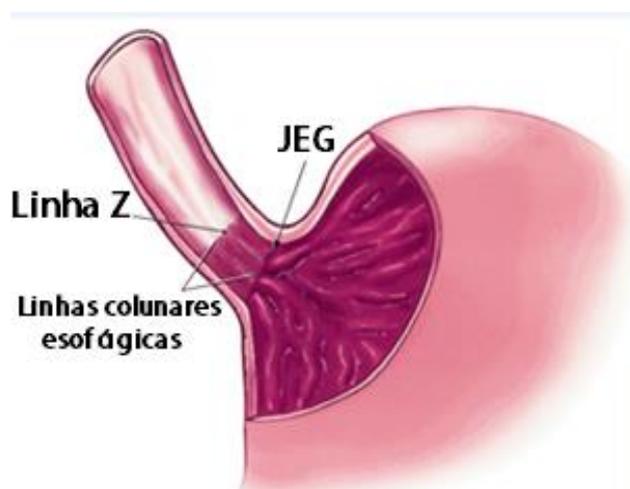


Figura 7: Localização da Junção Esofago-Gástrica (Moniq e Holsher 2010).

A cárdia também é definida de forma imprecisa. Anatomistas descrevem a cárdia como uma zona do estômago que é adjacente ao orifício do esôfago tubular, mas não há nenhuma referência anatômica para a margem distal da cárdia. Uma definição da cárdia comumente utilizada no Japão é a área dentro de 2 cm acima e abaixo da JEG. A falta de definições claras da JEG e da cárdia gástrica tem contribuído para dificuldades na classificação dos tumores provenientes dessas localizações (AJCC, 2010).

O sistema de estadiamento TNM do *American Joint Committee on Cancer/Internacional Union Against Cancer* (AJCC/UICC) para câncer de esôfago e estômago é usada universalmente. Na 7ª edição (2010), a mais recente edição do manual de estadiamento TNM, os tumores da JEG são classificados e estadiados com o esquema dos

tumores esofágicos, quando tem o seu epicentro a 5 cm da JEG e se estendem para o esôfago (Tabelas 4 e 5). Todos os outros tumores com um epicentro no estômago > 5 cm da JEG, ou aqueles distantes até 5 cm da JEG sem extensão para o esôfago são classificados como câncer gástrico. Em edições anteriores do TNM, os tumores que surgiam na JEG e tinham o envolvimento do esôfago em 2 cm ou menos, eram considerados câncer gástrico primário (AJCC, 2010).

Tabela 4 - TNM patológico do adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e adenocarcinoma de esôfago (Washington *et al.*, 2010).

pT	Tumor Primário
pTx	Tumor primário não pode ser identificado.
pT0	Sem evidência de tumor primário.
pTis	Displasia de alto grau.
pT1	Tumor invade lâmina própria, muscular mucosa ou submucosa.
pT1a	Tumor invade lâmina própria ou muscular mucosa.
pT1b	Tumor invade submucosa.
pT2	Tumor invade muscular própria.
pT3	Tumor invade adventícia.
pT4	Tumor invade estruturas adjacentes.
pT4a	Tumor ressecável invade pleura, pericárdio ou diafragma.
pT4b	Tumor irresssecável invade outras estruturas adjacentes, como aorta, corpo vertebral ou traquéia.
pN	Linfonodos Regionais
pNx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
pN0	Sem invasão linfonodal.
pN1	Metástase em 1-2 linfonodos regionais.
pN2	Metástase em 3-6 linfonodos regionais.
pN3	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais.
pM	Metástase à distância
pM0	Sem metástase a distância.
pM1	Com metástase a distância.

Tabela 5 - Estadiamento do adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e adenocarcinoma de esôfago (Washington *et al.*, 2010).

Estágio	T	N	M
0	pTIS	pN0	pM0
IA	pT1	pN0	pM0
IB	pT2	pN0	pM0
IIA	pT3	pN0	pM0
IIB	pT1-2	pN1	pM0
IIIA	pT1-2	pN2	pM0
	pT3	pN1	pM0
	pT4A	pN0	pM0
IIIB	pT3	pN2	pM0
IIIC	pT4A	pN1-2	pM0
	pT4B	Qualquer pN	pM0
	Qualquer pT	pN3	pM0
IV	Qualquer pT	Qualquer pN	pM1

Siewert *et al.* (1987) publicaram um esquema de subclassificação topográfico-anatômica para adenocarcinomas da JEG, que tem sido adotado por muitos médicos. Esse esquema de subclassificação foi aprovado no sétimo congresso da Sociedade Internacional de Doenças do Esôfago em 1995 e posteriormente no Segundo Congresso Internacional de Câncer Gástrico, em 1997. No âmbito desta classificação, adenocarcinomas JEG englobam todos os tumores com um epicentro dentro de 5 cm proximal ou distal à cárdia (Marriet *et al.*, 2011).

Siewert *et al.* (1987) classificam três categorias distintas de adenocarcinoma da JEG com base na localização anatômica: tipo I (localização compreendida entre 5 cm e 1 cm proximal à cárdia anatômica) - adenocarcinoma do esôfago distal que normalmente surge a partir de uma área com metaplasia intestinal do esôfago (esôfago de Barrett) e que pode infiltrar-se na JEG para cima; tipo II (situada, entre 1 cm proximal e 2 cm distal à cárdia anatômica) - esta entidade é também muitas vezes referida como "carcinoma juncional"; e

tipo III (localizado entre 2 e 5 cm distais à cárdia anatômica) - carcinoma gástrico subcardial que infiltra a JEG e o esôfago distal para baixo (Hasegawa *et al.*, 2013).

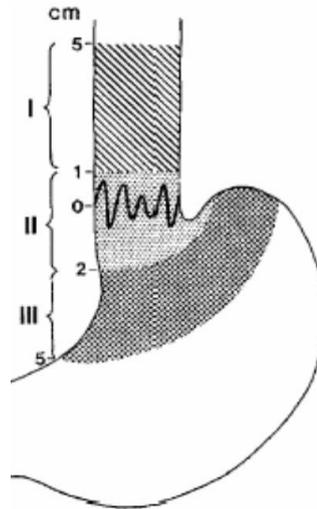


Figura 8: Esquema topográfico da classificação de Siewert para adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica (Hasegawa *et al.*, 2013).

Na maioria dos casos, a classificação é relativamente simples, baseada no resultado da radiografia contrastada, da endoscopia, da tomografia computadorizada e, por vezes, no aspecto intra-operatório. No entanto, em alguns casos, pode ser difícil distinguir o tipo de tumores localmente muito avançados que obliteram a JEG (Fang *et al.*, 2009).

Apesar de alguns dados que sugerem que os tumores tipo II/III possam ser melhor classificados utilizando o sistema de estadiamento pTNM do câncer gástrico, neste momento, todos os três tipos de Siewert (adenocarcinoma da JEG) são classificados e estadiados como uma única entidade no sistema da AJCC/UICC como cânceres de esôfago e JEG, se estiverem se estendendo para o esôfago (Tabela 7). Todos eles compartilham uma série de características morfológicas e um prognóstico semelhante, mas existem diferenças no que diz respeito à epidemiologia, etiologia, distribuição e padrão de metástases (Hasegawa *et al.*, 2010).

O tipo I de Siewert tem características epidemiológicas e histológicas que são semelhantes aos adenocarcinomas de esôfago distal, incluindo uma forte predominância do sexo masculino, associação com história de sintomas de refluxo e uma predominância do tipo

histológico intestinal, que resultaram da metaplasia intestinal de Barrett secundária a refluxo gastroesofágico (Hassen *et al.*, 2007).

Em contraste, os tumores do tipo III se assemelham ao câncer gástrico distal (não-cárdia), com uma proporção similar dos tipos histológicos difuso e intestinal e nenhuma associação com refluxo. Eles surgem a partir da mucosa gástrica e sua origem pode estar associada à *Helicobacter pylori* e à gastrite atrófica. Tumores do tipo III (e II) têm uma menor predominância no sexo masculino do que o tipo I (McColl e Going, 2010).

Há cada vez mais evidências que sugerem que os tumores tipo II de Siewert têm duas etiologias distintas, alguns sendo adenocarcinomas de esôfago, provavelmente decorrentes de esôfago de Barrett curto ou ultracurto, e outros adenocarcinomas gástricos causados pela infecção por *H. pylori* e gastrite atrófica (como o tipo III) (Derakhshan *et al.*, 2008).

Para efeitos do tratamento multimodalidade, os tumores da JEG são todos tratados de forma semelhante, embora a abordagem seja diferente no intra-operatório, em parte por causa da diferença no padrão de propagação linfonodal. Em geral, o tipo I mais frequentemente envolve gânglios linfáticos no mediastino superior (bifurcação traqueal e acima). Pacientes com tumores do tipo I não são candidatos apropriados para uma abordagem puramente transabdominal à ressecção. A abordagem cirúrgica padrão é uma esofagectomia subtotal transtorácica combinado com ressecção da parte superior do estômago e linfadenectomia em dois campos (Ren *et al.*, 2009).

Por outro lado, para o tipo II e III, metástases são mais frequentemente encontrados no mediastino inferior e ao redor do tronco celíaco. A abordagem cirúrgica padrão é uma gastrectomia total trans-hiatal ampliada com ressecção do esôfago distal e linfadenectomia sistêmica dos gânglios que drenam o estômago (Ren *et al.*, 2009).

As características peculiares de cada subtipo, na classificação de Siwert, do adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e a possibilidade de ser classificado e estadiado pela UICC, juntamente com adenocarcinoma esofágico ou com tumor gástrico, torna o entendimento biológico do tumor da junção esôfago-gástrica, um desafio para a ciência (Hasegawa *et al.*, 2013).

1.4 Diferenças entre adenocarcinoma gástrico e adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica

Nos países mais desenvolvidos economicamente, em números absolutos a incidência do adenocarcinoma gástrico ainda é a maioria em relação aos tumores da junção esôfago-gástrica (JEG), mas proporcionalmente os adenocarcinomas da JEG estão aumentando em relação aos adenocarcinomas gástricos, sendo hoje a incidência proporcional de 3 adenocarcinomas da JEG para 7 adenocarcinomas gástricos, e isso acontece devido ao aumento da taxa de incidência dos adenocarcinomas da JEG e diminuição da taxa de incidência dos adenocarcinomas gástricos (Ferro *et al.*, 2014).

O adenocarcinoma da JEG tem como fator de risco o esôfago de Barrett, provocado pela doença do refluxo gastro-esofágico, também sendo um fator de risco para adenocarcinoma de esôfago distal, enquanto que o adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal está associado a uma forma grave de gastrite caracterizada pela atrofia e/ou metaplasia intestinal, relacionado com a infecção pela *Helicobacter pylori*. Carcinógenos químicos como cigarro e álcool podem ser mais fortemente associados com adenocarcinoma da JEG, enquanto a ingestão de alimentos ricos em nitrosaminas são fatores de risco para o adenocarcinoma gástrico (Ang *et al.*, 2014)

Conforme citado anteriormente, o adenocarcinoma gástrico pode ser classificado em dois tipos histológicos: o tipo intestinal, que acomete principalmente a região do antro gástrico e o tipo difuso, que acomete principalmente a região da JEG. O tipo difuso tem um pior prognóstico em relação ao tipo intestinal, levando conseqüentemente o adenocarcinoma da JEG a ter um pior prognóstico em relação ao adenocarcinoma gástrico (Berlth *et al.*, 2014).

Além disso, quando diagnosticado, o adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica geralmente encontra-se em um estadiamento TNM mais avançado em relação ao adenocarcinoma gástrico, o que contribui para o seu pior prognóstico (Posterato *et al.*, 2014).

No estadiamento TNM 7ª edição, o adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica, que surge com epicentro a 5 cm da JEG e se estende para esôfago, foi retirado da classificação do adenocarcinoma gástrico e classificados juntamente com os tumores do esôfago distal (AJCC, 2010).

A principal diferença no tratamento entre o adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e o adenocarcinoma gástrico está na extensão da ressecção gástrica. Os tumores

gástricos distais são melhores tratados com gastrectomia parcial distal, com margem proximal livre de 5 cm, enquanto que nos tumores gástricos proximais, incluindo os adenocarcinomas da junção esôfago-gástrica, a ressecção de 5 cm do esôfago distal e a gastrectomia total é o tratamento de escolha, tendo como opção para tumores proximais a gastrectomia proximal subtotal com esofagectomia total (Toneto, 2012).

Diferenças na expressão gênica entre o adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e o adenocarcinoma gástrico ainda não estão bem estabelecidas, mas alguns estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de caracterizar molecularmente estes dois tipos de tumores. Wang *et al.* (2013) estudaram o transcriptoma destes adenocarcinomas e seu tecido adjacente e identificaram 511 genes diferencialmente expressos, destacando a existência de uma assinatura gênica tumoral, o que representa um ponto de partida para o entendimento da etiologia dessas neoplasias. Além disso, a caracterização molecular desses tumores pode contribuir para a identificação de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, bem como para o desenvolvimento de terapias-alvo.

1.5 Transcriptômica

O dogma central da biologia molecular é um modelo onde o DNA serve como molde para a síntese de moléculas de RNA, que por sua vez, coordenam a síntese de proteínas. Isso gera três níveis básicos de informação biológica: o genoma, o transcriptoma e o proteoma. O genoma é o conjunto completo dos genes (DNA) de um organismo, o transcriptoma é o conjunto completo dos transcritos (RNA mensageiro, RNA ribossômico, RNA transportador, microRNA e outros RNAs não codificantes) e o proteoma é o conjunto de todas as proteínas traduzidas (Ruivo, 2007).

O sequenciamento do primeiro genoma, do Bacteriófago 0X174, iniciou a “Era da Genômica” que sofreu modificação na ênfase da expressão do mapeamento e sequenciamento de genomas (Genômica Estrutural) para a função (Genômica Funcional). Atualmente, na “Era Pós-genômica”, novas tecnologias permitem a análise do perfil de RNAs (transcriptoma), proteínas (proteoma) e metabólitos (metaboloma) (Derks *et al.*, 2014).

A transcriptômica é a área da biologia molecular que estuda o transcriptoma, analisando a expressão gênica e avaliando o conjunto de transcritos de um organismo em

determinada situação celular. Neste sentido, diversos trabalhos na literatura têm investigado o perfil de expressão de mRNA no tecido tumoral de uma variedade de neoplasias, entre elas o câncer gástrico (Derks *et al.*, 2014).

A análise do transcrito de tecidos gástricos de pacientes saudáveis, identificou um perfil de expressão de miRNA, servindo de referência para comparação com o tecido tumoral. (Ribeiro-dos-santos *et al.*, 2010).

Na análise do tecido peritumoral gástrico foi identificada alterações na expressão de miRNAs, que apoiam a teoria do campo de cancerização, onde mesmo este tecido não sendo tumoral, já apresenta eventos carcinogênicos, não podendo ser considerado um tecido não patológico (Assumpção *et al.*, 2015).

Darnet *et al.* (2015), conseguiram determinar uma assinatura gênica tumoral, ao identificar um conjunto restrito de miRNAs (*hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c*) diferencialmente expressos entre o tecido do antro-gástrico sadio e o tecido tumoral, sendo potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos.

O estudo de Jiang *et al.* (2014) verificou que o perfil de expressão gênica do tecido gástrico tumoral, quando comparado ao de tecido gástrico não neoplásico, estava associado com a progressão e com o desenvolvimento do câncer gástrico. Os genes que estavam expressos de forma anormal no tecido tumoral estavam relacionados com o ciclo celular, fatores de crescimento, remodelação da matriz, metástase, motilidade e adesão celular.

A análise do transcriptoma do adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e do adenocarcinoma gástrico, realizada por Ju *et al.* (2014), identificou 1024 genes diferencialmente expressos, entre eles o *VSNLI* (proteína 1 Visinin-like), mais expresso no adenocarcinoma gástrico e o *KRT 14* (citoqueratina 14), mais expresso no adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica.

Diferenças na expressão gênica entre os tipos histológicos difuso e intestinal do adenocarcinoma gástrico também já foram identificadas. Volkomorov *et al.* (2013) observaram a hiperexpressão do gene *FGF12* no tipo difuso e a hipoexpressão do gene *WNT4* no tipo intestinal, quando comparados com o tecido adjacente. Além disso, o gene *CTGF* apresentou-se hiperexpresso no tipo difuso em relação ao intestinal, estando associado com a presença de metástase ganglionar.

Traduzir o uso desses achados para a prática clínica ainda é um desafio para a oncologia. Um alto número desses biomarcadores é proposto diariamente, porém raramente são consolidados como ferramentas úteis para os clínicos. Para facilitar essa tradução,

estratégias inovadoras estão sendo utilizadas, incluindo esforços multicêntricos como o Atlas Genômico do Câncer (The Cancer Genome Atlas - TCGA) (Assumpção *et al.*, 2015).

Os dados disponíveis nesse e em outros bancos de dados internacionais, além de proporcionarem uma base molecular para entender as propriedades biológicas de diversos tipos de câncer, incluindo o câncer gástrico, podem ser muito úteis para a pesquisa de novos alvos terapêuticos e biomarcadores (Wu *et al.*, 2015).

1.6 O Atlas Genômico do Câncer

O Atlas Genômico do Câncer (The Cancer Genome Atlas - TCGA) é um projeto que foi iniciado em 2005 com o objetivo de catalogar modificações genéticas responsáveis pelo câncer usando diversas técnicas, entre elas o sequenciamento de nova geração. Este banco de dados representa um esforço para melhorar a capacidade de diagnosticar, tratar e prevenir o câncer por meio de uma melhor compreensão da base genética da doença (Sunakawa *et al.*, 2015).

O TCGA é supervisionado pelo Instituto Nacional do Câncer e pelo Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano e financiado pelo governo dos Estados Unidos. O financiamento é dividido entre centros de caracterização do genoma, que realizam as técnicas e centros de análise de dados do genoma, que realizam as análises de bioinformática (Chu *et al.*, 2015).

A estratégia do TCGA é a coleta de tecido com quantidade e com qualidade suficientes para produzir dados completos. Analisa-se um grande número de amostras, até 500 amostras para cada tipo de tumor, o que fornece a potência estatística necessária para produzir um perfil genômico de cada câncer e as informações essenciais para identificar os melhores alvos para o desenvolvimento de drogas (Chu *et al.*, 2015).

Para todas as amostras de câncer estudadas também são coletadas amostras de tecido adjacente ao tumor, permitindo a identificação de alterações genômicas específicas do tumor (Chu *et al.*, 2015).

O estudo das amostras de adenocarcinoma gástrico do banco de dados do TCGA classificou o câncer gástrico em quatro subtipos moleculares: tumores positivos para o vírus Epstein-barr, tumores com instabilidade de microssatélite, tumores genomicamente estáveis e tumores com instabilidade cromossômica (Zhang *et al.*, 2014). A identificação desses

subtipos fornece um roteiro para a estratificação dos pacientes e para nortear pesquisas de terapia alvo (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014).

1.7 Análise de microarranjos de expressão

Microarranjos de expressão consistem num conjunto ordenado de milhares de moléculas cuja sequência é conhecida. Dessa forma é criada uma matriz de fragmentos genéticos distintos e posicionados numa ordem pré-definida, a qual pode ter sua imagem capturada, bem como digitalizada. Isso permite avaliar a expressão de milhares de genes simultaneamente po meio de métodos de processamento computacional de imagens. A técnica que utiliza microarranjos de expressão tem se revelado uma ferramenta importante para a análise de experimentos genéticos, contribuindo, por exemplo, para a busca de tratamento e descoberta de novos tipos de doenças, além de predizer ou diagnosticar aquelas cuja expressão genética é conhecida (Mariadson *et al.*, 2008).

Há vários estágios para a execução de uma análise de microarranjos: 1) Preparação 2) Geração de alvos fluorescentes 3) Hibridação com as sondas 4) Aquisição de dados e 5) Análise de dados (Tafferri *et al.*, 2009).

A finalidade da análise dos dados de microarranjo é extrair a "ordem biológica" com base em semelhanças e diferenças na expressão dos genes. A intensidade do sinal deve ser ajustada a um padrão comum para corrigir diferenças de ruído de fundo, melhorando a eficiência de aquisição de dados. Após a normalização, o perfil de expressão gênica é apresentado como razões de expressão do teste entre amostra e controle. Os genes que estão expressos duas vezes acima do nível superior ou inferior são mais propensos a ser de interesse. O nível absoluto de expressão de genes em teste, em comparação com amostras de controle é importante para a seleção dsses genes (Wittes *et al.*, 2009).

Por meio da utilização da tecnologia de microarranjos de expressão, que permite analisar a expressão de milhares de genes, permitindo a identificação de uma assinatura genética tumoral que diferencie o adenocarcinoma da junção esofagogástrica dos adenocarcinomas de antro gástrico, confirmando os diferentes achados clínico-patológicos que levaram a UICC a separar, em 2010, a classificação e estadiamento TNM destas neoplasias, justificando, portanto, o objetivo deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar diferenças de expressão gênica entre o adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e o adenocarcinoma gástrico pela análise de microarranjos.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar a expressão de genes entre o adenocarcinoma gástrico e adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica, com o intuito de identificar uma assinatura gênica;
- Validar os resultados encontrados utilizando o banco de dados do TCGA.

3. METODOLOGIA E PACIENTES

3.1 Amostras

3.1.1 Tecidos gástricos

As amostras foram obtidas de oito pacientes submetidos à gastrectomia no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), sendo quatro de adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e quatro de adenocarcinoma gástrico.

A análise histopatológica dos fragmentos tumorais foi realizada pelo Serviço de Anatomia Patológica do HUJBB.

3.1.2 Caracterização da amostra

Na Tabela 6 estão caracterizadas as amostras, de acordo com a localização tumoral, tipo e grau histológico, estadiamento TNM, gênero e idade. Todos os adenocarcinomas eram tumores gástricos avançados. A amostra incluiu seis homens e duas mulheres com idade média de 52 anos.

Tabela 6 - Caracterização das amostras utilizadas no estudo.

AMOSTRA	LOCALIZAÇÃO DO TUMOR	CLASSIFICAÇÃO E GRAU HISTOLÓGICO	ESTADIAMENTO	GÊNERO	IDADE (ANOS)
1	JUNÇÃO ESOFAGO-GÁSTRICA	ADENOCARCINOMA MODERADAMENTE DIFERENCIADO	PT3N3	MASCULINO	64
2	JUNÇÃO ESOFAGO-GÁSTRICA	ADENOCARCINOMA MODERADAMENTE DIFERENCIADO	PT3N3	MASCULINO	69
3	JUNÇÃO ESOFAGO-GÁSTRICA	ADENOCARCINOMA POUCO DIFERENCIADO	PT3N2	MASCULINO	54
4	JUNÇÃO ESOFAGO-GÁSTRICA	ADENOCARCINOMA POUCO DIFERENCIADO	PT2N2	MASCULINO	51
5	ANTRO GÁSTRICO	ADENOCARCINOMA PADRÃO INTESTINAL DE LAUREN POUCO DIFERENCIADO	PT4AN2	MASCULINO	52
6	ANTRO GÁSTRICO	ADENOCARCINOMA PADRÃO INTESTINAL DE LAUREN POUCO DIFERENCIADO	PT3N3B	MASCULINO	49
7	ANTRO GÁSTRICO	ADENOCARCINOMA PADRÃO INTESTINAL DE LAUREN POUCO DIFERENCIADO	PT3N3A	FEMININO	46
8	ANTRO GÁSTRICO	ADENOCARCINOMA PADRÃO INTESTINAL DE LAUREN POUCO DIFERENCIADO	PT4AN2	FEMININO	36

3.2. Extração de RNA

Para extração do RNA a partir das amostras de tecido gástrico, foi utilizado o *AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen®)*, segundo instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas pelo *NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific®)*. A integridade dessas amostras foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. Foram utilizadas somente amostras que apresentaram as subunidades do RNAr 28S e 18S preservadas.

3.3 Microarranjo

Para a comparação do transcriptoma das amostras, foram utilizados os chips *Human Gene 1.0 ST array* (Affymetrix®), que permitem a análise de 36.079 transcritos. Após isolamento do RNA total das amostras, foram realizadas as seguintes etapas, de acordo com o manual do *GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay*, versão 4.0 Affymetrix (Figura 9):

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 quatro transcritos poliadenilados de *Bacillus subtilis*: *lys*, *phe*, *thr* e *dap*. A 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, foi realizado a síntese da primeira fita de cDNA, de acordo com o protocolo da Affymetrix. Para isso, foram adicionados 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, foi obtido uma molécula híbrida contendo uma fita de cDNA e outra de RNA.

Para a síntese da segunda fita de cDNA, foram adicionados 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 faziam 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 massa 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 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 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*, 2 μL 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)*.

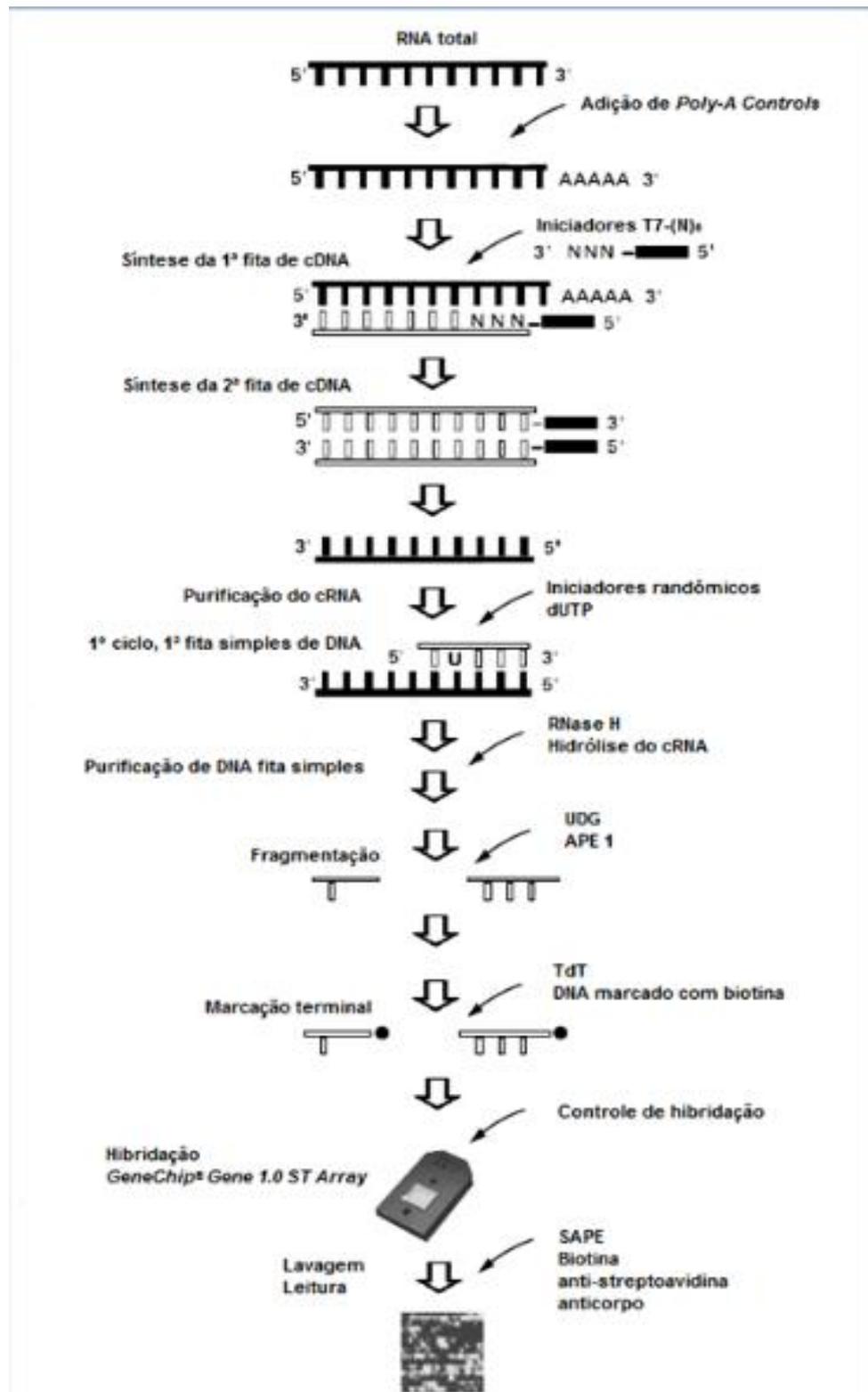


Figura 9: Fluxograma das etapas de processamento e hibridação do *GeneChip® Gene 1.0 ST Array*. RNA: ácido ribonucleico; cDNA: DNA complementar; dUTP: deoxiuridina – trifosfato; cRNA: RNA complementar ao cDNA; UDG: RNA complementar ao cDNA; APE1: purina/pirimidina endonuclease 1; TdT: *terminal deoxynucleotidyl 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 faziam parte do *GeneChip*[®] *WT (Whole Transcript) Terminal Labeling kit (Affymetrix)*. A enzima UDG removeu 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 a reação de hibridação, foi utilizado o *GeneChip® Hybridization, Wash and Stain kit (Affymetrix)*, de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados às amostras quatro controles de hibridação, que eram 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 consistiu 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 foi 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) disponível no programa R/*Bioconductor* (<http://www.bioconductor.org/>).

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>) disponível no programa R/*Bioconductor*, foi aplicado para a remoção do *batch* causado pelas diferentes amostras.

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* 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) foi utilizado para identificação dos genes diferencialmente expressos, considerando-se um valor de $P < 0,05$ ajustado para falso positivo. 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. 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>.

3.3.14 Validação dos resultados

O banco de dados do TCGA foi analisado para identificar as diferenças da expressão gênica entre os adenocarcinomas da junção esôfago-gástrica (n=93) e o adenocarcinoma gástrico (n=302).

A análise da expressão diferencial foi realizada em R, utilizando dados RAW e o pacote DESeq2. Para evitar o problema de teste múltiplo foram utilizadas as correções *Benjamini and Hochberg False Discovery Rate*. Os genes foram considerados como diferencialmente expressos se cumpridos os seguintes critérios: i) valor-p <0,05 e ii) |Log2

(fold-change)| >2 (expressões maiores ou menores que dois *fold changes*). Os resultados foram utilizados para validar os genes diferencialmente expressos encontrados neste trabalho.

4 RESULTADOS

A partir da análise dos resultados do transcriptoma foi possível identificar 36 genes diferencialmente expressos (*fold change* maior ou igual a 5) quando comparados os adenocarcinomas da junção esôfago-gástrica e os adenocarcinomas gástrico. Na comparação dos sítios tumorais, os adenocarcinomas da junção esôfago-gástrica apresentaram 11 genes hiperexpressos e 25 genes hipoexpressos (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 - Genes hiperexpressos no adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica em relação ao adenocarcinoma gástrico.

Gene	<i>Fold change</i>
<i>LIPF</i>	23,51
<i>PGC</i>	19,61
<i>CEACAM7</i>	8,24
<i>CP</i>	7,15
<i>GIF</i>	7,05
<i>PDK4</i>	6,92
<i>CAPN6</i>	6,38
<i>GSTTP1</i>	5,75
<i>REXO1L1</i>	5,70
<i>SLITRK6</i>	5,67
<i>LCE1D</i>	5,11

Tabela 8 - Genes hipoexpressos no adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica em relação ao adenocarcinoma gástrico.

Gene	<i>Fold change</i>
<i>CDH17</i>	-11,5
<i>SERPINB5</i>	-8,74
<i>CDC6</i>	-8,43
<i>TOP2A</i>	-7,92
<i>ILF2</i>	-7,72

<i>MMP12</i>	-7,69
<i>HHLA2</i>	-7,51
<i>HNRNPM</i>	-6,69
<i>CEACAM5</i>	-6,68
<i>ASPN</i>	-6,45
<i>CDK1</i>	-6,37
<i>KIAA1199</i>	-5,9
<i>TNS4</i>	-5,89
<i>HIST1H2BE</i>	-5,88
<i>DSG3</i>	-6,71
<i>KRT23</i>	-5,67
<i>SERPINB2</i>	-5,50
<i>HNRNPD</i>	-5,46
<i>LMBR1</i>	-5,33
<i>AHNAAK2</i>	-5,31
<i>KIF11</i>	-5,28
<i>MUC17</i>	-5,19
<i>CHORDC1</i>	-5,11
<i>ANAPC5</i>	-5,06
<i>DKK1</i>	-5,02

Os 36 genes diferencialmente expressos foram analisados pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis*, e o perfil gênico foi compatível de forma significativa com as doenças : neoplasia gástrica em primeiro lugar ($p= 0,0000$) e doença gástrica em segundo lugar ($p= 0,0000$) (Figura 10).



Figura 10: Doenças estatisticamente significativas relacionadas à expressão dos genes.

Os três genes mais diferencialmente hiperexpressos nos adenocarcinomas da junção esôfago-gástrica em relação aos adenocarcinomas gástricos foram o *LIPF* (*fold change* de 23,51), *PGC* (*fold change* de 19,61) e *CEACAM7* (*fold change* de 8,24).

Os três genes mais diferencialmente hipoexpressos nos adenocarcinomas da junção esôfago-gástrica em relação aos adenocarcinomas gástricos foram o *CDH17* (*fold change* de 11,5), *SERPINB5* (*fold change* de 8,74) e *CDC6* (*fold change* de 8,43).

Na análise comparativa com o banco de dados do TCGA, foram identificados 509 genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$) comparando os adenocarcinomas da junção esôfago-gástrica ($n = 93$ casos) e os adenocarcinomas gástricos ($n = 302$) (Anexo A). Entre eles encontraram-se os genes *ASPN*, *LIPF* e *HNRNPM* (Tabela 9).

No presente trabalho, o *fold change* da expressão gênica do *ASPN* foi de -6,45, do *LIPF* de 23,51 e do *HNRNPM* de -6,69; por outro lado, na análise dos dados do TCGA os *fold changes* e valores de p foram os seguintes: *ASPN* *fold change* de -2,27 e $p = 0,0000$, *LIPF* *fold change* de 2,1 e $p = 0,0006$ e *HNRNPM* *fold change* de -1,05 e $p = 0,0395$.

Ressalta-se que tanto nos resultados do transcriptoma quanto nos resultados da análise do TCGA, os genes *ASPN* e o *HNRNPM* apresentaram-se hipoexpressos e o *LIPF* apresentou-se hiperexpresso no adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica em relação ao adenocarcinoma gástrico.

Tabela 9 - Genes validados pelo TCGA, comparando adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e adenocarcinoma gástrica.

Gene	<i>Fold change</i> no TCGA	Valor de P no TCGA
<i>ASPN</i>	2,27	0,0000
<i>LIPF</i>	2,1	0,0006
<i>HNRNPM</i>	1,05	0,0395

5 DISCUSSÃO

O adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica (JEG) apresenta inúmeras diferenças clínico-patológicas quando comparado ao adenocarcinoma gástrico, como a taxa de incidência, o tipo histológico predominante, o prognóstico e o tratamento; o que levou a UICC, em 2010, a modificar o estadiamento TNM, classificando os tumores da junção esôfago-gástrica, que se estendem para o esôfago, juntamente com os tumores do esôfago distal. No entanto, existem poucos trabalhos na literatura que avaliam as diferenças moleculares entre o adenocarcinoma da JEG e o adenocarcinoma gástrico (Wang *et al.*, 2013).

Dentre as várias técnicas para realizar a análise da expressão gênica, a técnica de microarranjo de expressão é uma das mais robustas, pois permite a análise de milhares de transcritos de forma concomitante, com uma ampla cobertura e alta resolução, otimizando os resultados das pesquisas na área da transcriptômica (Derks *et al.*, 2014).

No presente estudo, foi realizada a análise do transcriptoma de pacientes com adenocarcinoma da JEG e adenocarcinoma gástrico, por meio da utilização da técnica de microarranjo de expressão. Foram identificados 36 genes diferencialmente expressos entre os dois sítios tumorais (com *fold change* maior que 5), estando 11 hiperexpressos e 25 hipoexpressos no adenocarcinoma da JEG em relação ao adenocarcinoma gástrico.

Similarmente, Wang *et al.* (2013), realizaram uma análise diferencial entre esses dois tipos tumorais e seus tecidos normais adjacentes, utilizando um *fold change* de 2, e identificaram no adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica uma hiperexpressão de 86 genes e hipoexpressão de 42 genes, enquanto que no adenocarcinoma gástrico houve uma hiperexpressão de 113 genes e hipoexpressão de 126 genes. Os genes foram investigados por qRT-PCR, sendo 12 genes validados para o tumor da junção esôfago-gástrica e nove genes validados para adenocarcinoma gástrico, não sendo nenhum destes 21 genes coincidentes com os 36 genes diferencialmente expressos deste trabalho.

No presente estudo, os genes hiperexpressos com maior *fold change* nos adenocarcinomas gástricos em relação aos adenocarcinomas da junção esôfago-gástrica foram o *CDH17*, o *SERPINB5* e o *CDC6*.

O gene *CDH17*, localizado em 8q22.1, é um membro da superfamília da caderina que codifica proteínas de adesão celular dependente de cálcio (Genecards, 2016). Alguns estudos

na literatura têm demonstrado uma correlação entre a expressão deste gene e um pior prognóstico no câncer gástrico.

O câncer gástrico pode ser classificado quanto à expressão da mucina em fenótipo gástrico e intestinal. O fenótipo gástrico está relacionado ao estágio inicial do câncer gástrico e o fenótipo intestinal está relacionado à progressão tumoral. Oue *et al.* (2015) identificaram a expressão do *CDH17* no adenocarcinoma gástrico do fenótipo intestinal, correlacionando este gene com maior agressividade tumoral.

A hiperexpressão do *CDH17* em pacientes com câncer gástrico está correlacionada com uma pior sobrevida global em cinco anos, em relação àqueles sem expressão (29,0% vs 45,0%, $p < 0,01$). Além disso, foi demonstrado com ensaios funcionais que o silenciamento do *CDH17*, através de RNA de interferência, inativa a via de sinalização Wnt/ β -catenina, inibindo a proliferação, adesão, migração e invasão celular, tornando-o um atrativo alvo terapêutico (Qiu *et al.*, 2013).

O gene *SERPINB5*, também conhecido como *Maspin*, localizado em 18q21.33, é um gene supressor tumoral, que codifica uma proteína que faz parte da família de inibidores de serina protease (Genecards, 2016).

Este gene atua no controle do ciclo celular, por meio da regulação de E2F1 (Fator transcricional E2F do tipo 1) e o seu silenciamento acelera a progressão do ciclo celular, encurtando o tempo de duplicação e aumentando a taxa de proliferação celular (Kim *et al.*, 2012).

Lei *et al.* (2012) desenvolveram um modelo preditor de sobrevida para câncer gástrico utilizando o escore imunohistoquímico de três genes do grupo das serina proteases e seus inibidores, correlacionando-os com o TNM, pela equação: o tempo de sobrevida (meses) = $88,8607 + 2,6395 \text{ SERPINB5} - 12,0772 \text{ KLK10} + 13,7562 \text{ KLK11} - 7,0318 \text{ TNM}$. Nesse modelo, o gene *SERPINB5* foi correlacionado com ganho de sobrevida.

O gene *CDC6*, localizado em 17q21.3, codifica uma proteína altamente semelhante a *CDC6* de *Saccharomyces cerevisiae*, essencial para a iniciação da replicação de DNA. A sua transcrição é regulada em resposta a sinais mitogênicos através do mecanismo de controle transcricional envolvendo proteínas da família E2F (Genecards, 2016).

Tsukamoto *et al.* (2008), utilizando a técnica de Hibridização Genômica Comparativa em array em amostras de adenocarcinoma gástrico, identificou 114 genes amplificados, entre eles o *CDC6*, que também apresentou superexpressão proteica a partir da análise imunohistoquímica.

Similarmente, Rossi *et al.* (2011), utilizando a mesma técnica em amostras de adenocarcinoma gástrico, observaram uma amplificação recorrente de genes envolvidos na via de renovação celular, entre eles o *CDC6*, e relataram a existência de uma correlação histoquímica entre a amplificação deste gene e a expressão de *HER2* na membrana celular.

No presente estudo, os genes hiperexpressos com maior *fold change* no adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica em relação ao adenocarcinoma gástrico foram os genes *LIPF*, *PGC* e *CEACAM7*.

O gene *PGC*, localizado em 6p21.3-p21.1, codifica uma enzima digestiva que é produzida no estômago e constitui um dos principais componentes da mucosa gástrica (Genecards, 2016).

O gene *PGC* é expresso em 100% do tecido gástrico de todos os indivíduos saudáveis, cerca de 50% do tecido gástrico de pacientes com atrofia gástrica e não é expresso no tecido gástrico de pacientes com câncer gástrico, o que o torna um potencial biomarcador de progressão da sequência “indivíduo saudável - gastrite atrófica – câncer gástrico” (Liu *et al.*, 2015).

Ning *et al.* (2004) observaram um decréscimo de 97,6% na expressão de *PGC* da mucosa gástrica normal para o tecido tumoral e relataram que a diminuição da expressão ocorre na ordem: gastrite superficial, úlcera gástrica, gastrite atrófica ou displasia gástrica e câncer gástrico ($p < 0,01$), Portanto, sua expressão inversamente correlacionada com o grau de malignidade da mucosa gástrica.

O gene *CEACAM7*, localizado em 19q13.2, codifica a proteína antígeno carcinoembrionário relacionada à molécula de adesão 7 (Genecards, 2016).

Existem poucos trabalhos na literatura correlacionando o *CEACAM7* com o câncer gástrico, como o de Zhou *et al.* (2011), que identificaram um aumento na expressão do *CEACAM7* com a progressão na indiferenciação tumoral e um pior prognóstico.

Diversos trabalhos na literatura utilizaram como estratégia a análise dos dados presentes no banco TCGA para fins de validação de seus resultados. Shi *et al.* (2015) identificaram uma assinatura de expressão de microRNA associada com hepatocarcinoma e utilizaram para validação dos seus resultados a realização de qPCR em tempo real e a comparação com o banco de dados do TCGA e todos os genes validados também foram validados pela análise do banco de dados do TCGA. Kwon *et al.* (2015), pesquisando a identificação de biomarcadores para câncer de pâncreas, utilizaram para validação dos seus

resultados as informações de dois bancos de dados, o TCGA e o *Gene Expression Omnibus* (GEO).

A análise das informações do banco de dados do TCGA, utilizadas para identificar as diferenças de expressão gênica do adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica com o adenocarcinoma gástrico, permitiu a validação dos genes *ASPN*, *LIPF* e *HNRNPM*, que foram encontrados diferencialmente expressos no presente estudo.

O gene *ASPN*, conhecido como *Asporin*, localizado em 9q22, codifica uma proteína extracelular da cartilagem que é membro da família dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina, um componente chave para o estroma tumoral (Genecards, 2016).

Existem poucos trabalhos na literatura que correlacionam a expressão do gene *ASPN* com o adenocarcinoma gástrico ou da junção esôfago-gástrica. Rajkumar *et al.* (2010) observaram pela primeira vez que o gene *ASPN* estava diferencialmente expresso entre o tecido gástrico neoplásico e o tecido gástrico normal.

O gene *ASPN* está hiperexpresso nos fibroblastos associados ao câncer (FAC) e tem um papel essencial em promover a co-invasão dos FAC e das células neoplásicas. Os FAC do adenocarcinoma gástrico tipo linite plástica possuem um elevado potencial para a invasão, mas essa invasão dos FAC só acontece após a invasão das células neoplásicas. Os FAC secretam a proteína *ASPN* que ao interagir com CD44, ativa a Rac1, promovendo a invasão pelo FAC no estroma tumoral, se tornando um importante alvo terapêutico para o desenvolvimento de drogas que visam à manipulação do microambiente do câncer (Satoyoshi *et al.*, 2015).

Ding *et al.* (2015) demonstraram que o *ASPN* estava hiperexpresso em tecidos de carcinoma gástrico, quando comparado com tecido gástrico não canceroso. O silenciamento do *ASPN* mediado por siRNA inibiu a proliferação e suprimiu a migração das células neoplásicas. Além disso, a nível molecular, verificou-se que a regulação negativa da *ASPN* bloqueou a proteína anti-apoptótica Bcl-2, aumentou a expressão pró-apoptótica da proteína Bad, reduziu a expressão de proteínas relacionadas com a migração, CD44 e MMP2, e anulou a ativação do estado de fosforilação de ERK e do fator de crescimento epidérmico (EGF) e o seu receptor (EGFR), indicando que o *ASPN* influencia a via de sinalização de EGFR.

O gene *LIPF*, localizado em 10q23.31, é responsável pela síntese da lipase gástrica (Genecards, 2016). Poucos estudos identificaram o *LIPF*, como um gene diferencialmente expresso no câncer gástrico. Sun *et al.* (2006) foram os primeiros que identificaram a análise

diferencial do gene *LIPF* em adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, comparando-o em seus vários estágios clínicos.

Zhang *et al.* (2010) analisaram tumores gástricos comparando-os com tecido gástrico não neoplásico e o gene mais diferencialmente expresso foi o *LIPF*, estando hipoexpresso no tecido tumoral, com *fold change* de -50. Além disso, este mesmo grupo de pesquisadores identificou uma assinatura gênica diferencial de oito genes entre o adenocarcinoma gástrico e o tecido não tumoral, sendo o *LIPF* um deles.

O gene *HNRNPM* pertence à subfamília de ribonucleoproteína heterogeneamente expressa, localizada em 19p13.3 e codifica proteínas de ligação com o RNA nuclear heterogêneo (RNANH), que está associada com pré-mRNA no núcleo e parece influenciar o processamento de pré-mRNA e outros aspectos do metabolismo e transporte de mRNA (Genecards, 2016).

Não foram encontrados estudos correlacionando a expressão do gene *HNRNPM* com o câncer gástrico, mas alguns estudos demonstram sua relação com a carcinogênese de outros tipos tumorais.

De acordo com Xu *et al.* (2014) a expressão do *HNRNPM* promove metástase em câncer de mama. Foi demonstrado que o este gene atua aumentando os níveis de expressão do fator de crescimento tumoral beta (TGF β) e de CD44s. Quando o *HNRNPM* foi silenciado não houve o processo de transição epitélio mesenquimal induzida pelo TGF β , inibindo a metástase em câncer de mama de ratos, enquanto que a expressão forçada de CD44s substitui a perda de *HNRNPM*, permitindo a ocorrência de metástase.

Palermo *et al.* (2012) descreveram a participação do *HNRNPM* no desenvolvimento de metástases hepáticas de câncer colorretal e relataram que a proteína HNRNPM atua como um receptor de membrana de superfície das células de Kupfer, que se une ao CEA (antígeno carcino-embrionário) produzindo citocinas inflamatórias e promovem um microambiente ideal para a implantação das células tumorais.

Os resultados encontrados demonstraram que existem diferenças moleculares entre os tipos tumorais, e que esta diferença gênica é representada por genes bem descritos na literatura. Apesar de que nenhuma conclusão pode ser obtida acerca do papel destes genes no processo neoplásico de cada um destes tipos tumorais, o fato de se apresentarem diferencialmente expressos representa uma importante ferramenta diagnóstica e de tratamento. Nos casos de câncer gástrico avançado, por exemplo, onde morfologicamente não se consegue identificar se é um adenocarcinoma gástrico invadindo a JEG ou se é um

adenocarcinoma da JEG invadindo o restante do estômago, a identificação desta assinatura gênica diferencial, iria indicar mais precisamente o tipo tumoral, selecionaria a terapia alvo e provavelmente aumentaria a sobrevida global, mesmo nos casos de tratamento quimioterápico paliativo.

6 CONCLUSÃO

O perfil da expressão gênica do adenocarcinoma gástrico é diferente do perfil do adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica.

Os genes *ASPN* e o *HNRNPM* apresentaram-se hipoexpressos e o *LIPF* apresentou-se hiperexpresso no adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica em relação ao adenocarcinoma gástrico, validados em 395 amostras do TCGA.

As diferenças moleculares podem refletir características clínicas, sugerindo que estas neoplasias devam ser classificadas e estadiadas de forma diferente.

7 REFERÊNCIAS

- AJCC- American Joint Committee on Cancer. Manual de estadiamento do câncer. 7ªed. Nova York. Springer. 2010; 115-122.
- ANG TL, FOCK KM. Clinical epidemiology of gastric cancer. Singapore Med J. 2014; 55 (12):621-8.
- ASSUMPÇÃO MB, MOREIRA FC, HAMOY IG, MAGALHÃES L, VIDAL A, PEREIRA A, BURBANO R, KHAYAT A, SILVA A, SANTOS S, DEMACHKI S, RIBEIRO-DOS-SANTOS A, ASSUMPÇÃO P. High-throughput miRNA sequencing reveals a field effect in gastric câncer and suggests an epigenetic network mechanism. *Bioinformatics and biology insights*. 2015; 9(S1): 1-7
- BERLTH F, BOLLSCHWEILER E, DREBBER U, HOELSCHER AH, MOENIG S. Pathohistological classification systems in gastric cancer: diagnostic relevance and prognostic value. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(19):5679-84.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014; 513 (7517):202-9.
- CHU A, ROBERTSON G, BROOKS D, MUNGALL AJ, BIROL I, COOPE R, MA Y, JONES S, MARRA MA. Large-scale profiling of microRNAs for The Cancer Genome Atlas. *Nucleic Acids Res*. 2015; 44(1):e3
- DARNET S, MOREIRA FC, HAMOY IG, BURBANO R, KHAYAT A, CRUZ A, MAGALHÃES L, SILVA A, SANTOS S, DEMACHKI S, ASSUMPÇÃO M, ASSUMPÇÃO P, RIBEIRO-DOS-SANTOS A. High-throughput sequencing of miRNAs reveals a tissue signature in gastric câncer and suggest novel potential biomarkers. *Bioinformatics and biology insights*. 2015; 9(S1): 1-8
- DERAKHSHAN MH, MALEKZADEH R, WATABE H. Combination of gastric atrophy, reflux symptoms and histological subtype indicates two distinct aetiologies of gastric cardia cancer. *Gut* 2008; 57:298.
- DERKS KW, HOEIJMAKERS JH, POTHOF J. The DNA damage response: the omics era and its impact. *DNA Repair*. 2014; 19:214-20.
- DING Q, ZHANG M, LIU C. Aspirin participates in gastric cancer cell growth and migration by influencing EGF receptor signaling. *Oncol Rep*. 2015; 33(4):1783-90.
- ESPEJO ROMERO H, NAVARRETE SIANCAS J. Classification of stomach adenocarcinomas. *Rev Gastroenterol Peru*. 2003; 23(3):199-212.
- FANG WL, WU CW, CHEN JH. Esophagogastric junction adenocarcinoma according to Siewert classification in Taiwan. *Ann Surg Oncol* 2009; 16:3237.

- FERRO A, PELETEIRO B, MALVEZZI M, BOSETTI C, BERTUCCIO P, LEVI F, NEGRI E, LA VECCHIA C, LUNET N. Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980-2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype. *Eur J Cancer*. 2014; 50(7):1330-44.
- GENECARDS. Human Gene Database. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=cdh17>. Acessado em: 14 de janeiro de 2016.
- GLOBOCAN. International Agency for Research on Cancer Disponível em: http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?selection_pop=224900&Text-p=World&selection_cancer=290&Text-c=All+cancers+excl.+non-melanoma+skin+cancer&pYear=3&type=1&window=1&submit=%C2%A0Execute, acessado em: 14 de janeiro de 2016
- HALLINAN JT, VENKATESH SK, PETER L, MAKMUR A, YONG WP, SO JB. CT volumetry for gastric carcinoma: association with TNM stage. *Eur Radiol*. 2014; 24(12):3105-14.
- HANSEN S, VOLLSET SE, DERAKHSHAN MH. Two distinct aetiologies of cardia cancer; evidence from premorbid serological markers of gastric atrophy and *Helicobacter pylori* status. *Gut*. 2007; 56:918.
- HASEGAWA S, YOSHIKAWA T, AOYAMA T. Esophagus or stomach? The seventh TNM classification for Siewert type II/III junctional adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2013; 20:773.
- HASEGAWA S, YOSHIKAWA T. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: incidence, characteristics, and treatment strategies. *Gastric Cancer*. 2010; 13:63.
- INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas 2016: Incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2016.
- JIANG HB, YANG TJ, LU P, MA YJ. Gene expression profiling of gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014; 18(15):2109-15.
- JU F, LU L, ZHAO QY, DU GW, YUAN HC, YU JM. Systematic analysis of gene expression and molecular interactions in cardiac and non-cardiac gastric carcinomas. *Hepatogastroenterology*. 2014; 61(134):1835-42.
- KIM M, JU H, LIM B, KANG C. Maspin genetically and functionally associates with gastric cancer by regulating cell cycle progression. *Carcinogenesis*. 2012; 33(12):2344-50.
- KWON MS, KIM Y, LEE S, NAMKUNG J, YUN T, YI S, HAN S, KANG M, KIM S, JANG JY, PARK T. Integrative analysis of multi-omics data for identifying multi-markers for diagnosing pancreatic cancer. *BMC Genomics*. 2015; 16(9):S4.
- LAUREN P. The two histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at histoclinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965; 64:31-49.

- LEI KF, LIU BY, ZHANG XQ, JIN XL, GUO Y, YE M, ZHU ZG. Development of a survival prediction model for gastric cancer using serine proteases and their inhibitors. *Exp Ther Med*. 2012; 3(1):109-116.
- LIU LX, LEE NP, CHAN VW, XUE W, ZENDER L. Targeting cadherin17 inactivates Wnt signaling and inhibits tumor growth in liver carcinoma. *Hepatology*. 2009; 50: 1453–63.
- LIU WJ, XU Q, SUN LP, DONG QG, HE CY, YUAN Y. Expression of serum let-7c, let-7i, and let-7f microRNA with its target gene, pepsinogen C, in gastric cancer and precancerous disease. *Tumour Biol*. 2015; 36(5):3337-43.
- MARIADASON JM, AUGENLICHT LH, ARANGO D. Microarray analysis in the clinical management of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2008; 17(2):377.
- MARIETTE C, PIESSEN G, BRIEZ N, *et al*. Oesophagogastric junction adenocarcinoma: which therapeutic approach? *Lancet Oncol*. 2011; 12:296.
- MCCOLL KE, GOING JJ. Aetiology and classification of adenocarcinoma of the gastro-oesophageal junction/cardia. *Gut*. 2010; 59:282.
- MONIQ SP, HOLSCHER AH. Clinical classification systems of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Recent Results Cancer Res*. 2010; 182:19.
- NING PF, SUN LP, LIU HJ, YUAN Y. Expression of pepsinogen C in gastric cancer and its precursor. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2004; 84(10):818-21.
- OUÉ N, SENTANI K, SAKAMOTO N, YASUI W. Clinicopathologic and molecular characteristics of gastric cancer showing gastric and intestinal mucin phenotype. *Cancer Sci*. 2015; 106(8):951-8.
- PALERMO NY, THOMAS P, MURPHY RF, LOVAS S. Hexapeptide fragment of carcinoembryonic antigen which acts as an agonist of heterogeneous ribonucleoprotein M. *J Pept Sci*. 2012; 18(4):252-60.
- POSTERARO B, PERSIANI R, DALL'ARMI V, BIONDI A, ARZANI D, SICOLI F, BONASSI S, D'UGO D, RICCIARDI W, BOCCIA S. Prognostic factors and outcomes in Italian patients undergoing curative gastric cancer surgery. *Eur J Surg Oncol*. 2014; 40(3):345-51.
- QIU HB, ZHANG LY, REN C, ZEG ZL, WU WJ, LUO HY, ZHOU ZW, XU RH. Targeting CDH17 suppresses tumor progression in gastric cancer by downregulating Wnt/ β -catenin signaling. *PLoS One*. 2013; 8(3):e56959.
- QIU MZ, CAI MY, ZHANG DS, WANG ZQ, WANG DS, LI YH, XU RH. Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of Lauren classification in gastric adenocarcinoma in China. *J Transl Med*. 2013; 11:58.

- RAJKUMAR T, VIJAYALAKSHMI N, GOPAL G, SABITHA K, SHIRLEY S, RAJA UM, RAMAKRISHNAN SA. Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis. *Cancer Cell Int.* 2010; 10:45.
- RAMASWAMY S, TAMAYO P, RIFKIN R. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 98(26):15149.
- REN JS, KAMANGAR F, QIAO YL. Serum pepsinogens and risk of gastric and oesophageal cancers in the General Population Nutrition Intervention Trial cohort. *Gut.* 2009; 58:636.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS A, KHAYAT AS, SILVA A, ALENCAR DO, LOBATO J, LUZ L, PINHEIRO DG, VARUZZA L, ASSUMPCÃO M, ASSUMPCÃO P, SANTOS S, ZANETTE DL, SILVA JR WA, BURBANO R, DARNET S. Ultra-deep sequencing reveals the microRNA expression. pattern of human stomach. *Plos one* 2010; 5(10): 1-8
- ROSSI E, KLERSY C, MANCA R, ZUFFARDI O, SOLCIA E. Correlation between genomic alterations assessed by array comparative genomic hybridization, prognostically informative histologic subtype, stage, and patient survival in gastric cancer. *Hum Pathol.* 2011; 42(12):1937-45.
- RUIVO HM. Análise Integrada de Dados Ambientais Utilizando Técnicas de Classificação e Agrupamento de Microarranjos de DNA. São José dos Campos. 2007.
- SATOYOSHI R, KURIYAMA S, AIBA N, YASHIRO M, TANAKA M. Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer-associated fibroblasts. *Oncogene.* 2015; 34(5):650-60.
- SHI KQ, LIN Z, CHEN XJ, SONG M, WANG YQ, CAI YJ, YANG NB, ZHENG MH, DONG JZ, ZHANG L, CHEN YP. Hepatocellular carcinoma associated microRNA expression signature: integrated bioinformatics analysis, experimental validation and clinical significance. *Oncotarget.* 2015; 6(28):25093-108.
- SHIM CN, KIM H, KIM DW, CHUNG HS, PARK JC, LEE H, SHIN SK, LEE SK, LEE YC. Clinicopathologic factors and outcomes of histologic discrepancy between differentiated and undifferentiated types after endoscopic resection of early gastric cancer. *Surg Endosc.* 2014; 28(7):2097-105.
- SIWERT JR, HOLSCHER AH, BECKER K, GOSSNER W. [Cardia cancer: attempt at a therapeutically relevant classification]. *Chirurg.* 1987; 58:25.
- SOBIN L, GOSPODAROWICZ, M, WITTEKIND, C. TNM Classification of Malignant Tumor / UICC International Union Against Cancer. 7⁰ edição. Springer. 2010; 328.
- SUN XJ, SUN KL, ZHENG ZH, FU WN, HAO DM, XU HM, LI XM. Gene expression patterns in gastric cancer. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2006; 23(2):142-6.

- SUNAKAWA Y, LENZ HJ. Molecular classification of gastric adenocarcinoma: translating new insights from the cancer genome atlas research network. *Curr Treat Options Oncol*. 2015; 16(4):17.
- TEFFERI A, BOLANDER ME, ANSELL SM, WIEBEN ED, SPELSBERG TC. Primer on medical genomics. Part III: Microarray experiments and data analysis. *Mayo Clin Proc*. 2009; 77(9):927.
- TONETO MG. Estado atual do tratamento cirúrgico do adenocarcinoma gástrico avançado. *Revista da AMRIGS, Porto Alegre*. 2012; 56 (1): 81-86.
- TURNER ES, TURNER JR. Expanding the Lauren classification: a new gastric cancer subtype? *Gastroenterology*. 2013; 145(3):505-8.
- TSUKAMOTO Y, UCHIDA T, KARNAN S, NOGUCHI T, NGUYEN LT, TANIGAWA M, TAKEUCHI I, MATSUURA K, HIJIYA N, NAKADA C, KISHIDA T, KAWAHARA K, ITO H, MURAKAMI K, FUJIOKA T, SETO M, MORIYAMA M. Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and gene expression in gastric cancer. *J Pathol*. 2008; 216(4):471-82.
- VOLKOMOROV V, GRIGORYEVA E, KRASNOV G, LITVIAKOV N, TSYGANOV M, KARBYSHV M, ZAVYALOVA M, AFANASYEV S, CHERDYNTSEVA N, LISITSYN N, BERESTEN S. Search for potential gastric cancer markers using miRNA databases and gene expression analysis. *Exp Oncol*. 2013; 35(1):2-7.
- XU Y, GAO XD, LEE JH, HUANG H, TAN H, AHN J, REINKE LM, PETER ME, FENG Y, GIUS D, SIZIOPIKOU KP, PENG J, XIAO X, CHENG C. Cell type-restricted activity of hnRNPM promotes breast cancer metastasis via regulating alternative splicing. *Genes Dev*. 2014; 28(11):1191-203.
- WANG G, HU N, YANG HH, WANG L, SU H, WANG C, CLIFFORD R, DAWSEY EM, LI JM, DING T, HAN XY, GIFFEN C, GOLDSTEIN AM, TAYLOR PR, LEE MP. Comparison of global gene expression of gastric cardia and noncardia cancers from a high-risk population in china. *PLoS One*. 2013; 8(5):e63826.
- WASHINGTON K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Annals of surgical oncology*. 2010; 17 (12): 3077-9.
- WEIR HK, THOMPSON TD, SOMAN A, MOLLER B, LEADBETTER S. The past, present, and future of cancer incidence in the United States: 1975 through 2020. *Cancer*. 2015; 121(11):1827-37.
- WITTES J, FRIEDMAN HP. Searching for evidence of altered gene expression: a comment on statistical analysis of microarray data. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 91(5):400.
- WU J, LI G, YAO Y, WANG Z, SUN W, WANG J. MicroRNA-421 is a new potential diagnosis biomarker with higher sensitivity and specificity than carcinoembryonic antigen and cancer antigen 125 in gastric cancer. *Biomarkers*. 2015; 20(1):58-63.

ZHANG X, YANG JJ, KIM YS, KIM KY, AHN WS, YANG S. An 8-gene signature, including methylated and down-regulated glutathione peroxidase 3, of gastric cancer. *Int J Oncol.* 2010; 36(2):405-14.

ZHANG W. TCGA divides gastric cancer into four molecular subtypes: implications for individualized therapeutics. *Chin J Cancer.* 2014; 33(10): 469–470.

ZHENG HC, ZHENG YS, XIA P, XU XY, XING YN, TAKAHASHI H, GUAN YF, TAKANO Y. The pathobiological behaviors and prognosis associated with Japanese gastric adenocarcinomas of pure WHO histological subtypes. *Histol Histopathol.* 2010; 25(4):445-52.

ZHOU J, ZHANG L, GU Y, LI K, NIE Y, FAN D, FENG Y. Dynamic expression of CEACAM7 in precursor lesions of gastric carcinoma and its prognostic value in combination with CEA. *World J Surg Oncol.* 2011; 9: 172.

ANEXO

Genes diferencialmente expressos obtidos a partir da análise dos dados do TCGA, comparando adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica e adenocarcinoma gástrico.

Gene	Valor do p
<i>APOA2</i>	9,22E+08
<i>ATP1A2</i>	1,46E+08
<i>BNIPL</i>	4,71E-23
<i>C1orf110</i>	2,64E+06
<i>C1orf177</i>	2,53E-10
<i>C1orf95</i>	2,43E+08
<i>CACNA1E</i>	1,36E+05
<i>CASQ1</i>	1,31E+05
<i>CHIA</i>	2,83E+07
<i>CLCA1</i>	4,51E+06
<i>CLCA2</i>	4,49E-85
<i>CLCA3P</i>	8,02E+03
<i>CLCA4</i>	6,18E-51
<i>CNTN2</i>	5,39E+07
<i>CRABP2</i>	3,97E+02
<i>CRCT1</i>	3,66E-17
<i>CRNN</i>	1,51E+04
<i>CYP4A11</i>	3,50E+09
<i>CYP4B1</i>	1,58E+04
<i>DKFZp686N1631</i>	9,93E-12
<i>DUSP27</i>	7,09E+04
<i>ECM1</i>	9,24E-02
<i>EDN2</i>	2,62E+08
<i>FLG2</i>	1,42E+06
<i>FLG</i>	4,17E+02
<i>FMO2</i>	1,03E+05
<i>GBP6</i>	4,44E-40
<i>GRHL3</i>	3,09E-15
<i>HSPA6</i>	5,63E-13
<i>HSPB7</i>	1,83E+06
<i>IL19</i>	7,49E+07
<i>IVL</i>	1,29E-23
<i>KCNK2</i>	8,11E+08
<i>KPRP</i>	1,93E+06
<i>LCE3D</i>	0,00151470102156858
<i>LEFTY1</i>	6,42E+04
<i>LMOD1</i>	1,86E+08
<i>LOC646627</i>	3,95E+08
<i>LPAR3</i>	9,04E+07

<i>LRRC7</i>	0,000119829235127798
<i>MAB21L3</i>	1,01E+08
<i>MIR205HG</i>	1,76E-07
<i>NHLH2</i>	0,000760550534904194
<i>PADI1</i>	1,49E-04
<i>PGLYRP3</i>	5,14E+07
<i>PGLYRP4</i>	3,92E+07
<i>PKP1</i>	5,02E-04
<i>PLA2G2A</i>	1,03E+08
<i>PPP1R12B</i>	8,15E+04
<i>PTCH2</i>	1,20E+04
<i>RNF223</i>	2,41E+05
<i>SI00A12</i>	3,56E+02
<i>SI00A2</i>	7,89E-28
<i>SI00A7A</i>	1,33E+05
<i>SI00A7</i>	3,18E+01
<i>SI00A8</i>	3,65E-60
<i>SI00A9</i>	5,96E-39
<i>SFN.2</i>	2,25E+03
<i>SPAG17</i>	2,36E-12
<i>SPRR1A</i>	4,44E-02
<i>SPRR1B</i>	5,60E-03
<i>SPRR2A</i>	1,30E-07
<i>SPRR2B</i>	2,89E+06
<i>SPRR2C</i>	3,14E+06
<i>SPRR2D</i>	1,30E-10
<i>SPRR2E</i>	2,08E-03
<i>SPRR2F</i>	1,24E-11
<i>SPRR2G</i>	4,42E+03
<i>SPRR3</i>	2,54E-15
<i>TACSTD2</i>	1,23E+05
<i>TNN</i>	2,84E+01
<i>VTCN1</i>	3,02E+08
<i>WNT3A</i>	9,46E+08
<i>AK128534</i>	6,39E+02
<i>ANXA8L2</i>	3,41E+00
<i>ARMC3</i>	3,17E+04
<i>AX747977</i>	4,19E-04
<i>BC051760</i>	4,91E-03
<i>CALML3</i>	3,03E-05
<i>CALML5</i>	1,44E+07
<i>CTNNA3</i>	1,33E+08
<i>DKK1</i>	1,90E+08
<i>DUSP13</i>	1,71E+09
<i>FAM25A</i>	3,78E+05

<i>GAD2</i>	0,000308325853369773
<i>HPSE2</i>	6,79E+06
<i>KCNMA1</i>	3,53E+07
<i>LDB3</i>	5,19E-04
<i>LIPF*</i>	0,000600957302028525
<i>LOC100507127</i>	1,28E+04
<i>LOC728978</i>	8,93E+02
<i>PNLIPRP3</i>	1,69E+01
<i>PRLHR</i>	6,25E+09
<i>PSD</i>	1,08E+01
<i>SFTPA2</i>	1,55E+08
<i>TACR2</i>	2,68E+08
<i>ZNF365</i>	3,00E+01
<i>AB231710</i>	1,66E+08
<i>ALDH3B2</i>	5,99E-04
<i>ANO3</i>	4,75E+08
<i>APOA4</i>	0,000131329981276374
<i>BBOX1</i>	1,28E-17
<i>CALCA</i>	1,62E+09
<i>DNAJB13</i>	1,51E+03
<i>FAM55A</i>	1,51E+08
<i>FAM55B.2</i>	1,22E+07
<i>FOLR1</i>	5,89E+09
<i>H19</i>	1,06E-01
<i>HEPHL1</i>	2,38E+00
<i>HRASLS5</i>	1,28E+08
<i>LMO1</i>	1,08E+05
<i>LOC100288346</i>	3,49E+05
<i>MRGPRF</i>	4,28E+06
<i>MUC15</i>	7,61E+06
<i>NCAM1</i>	2,10E+05
<i>PGA5</i>	3,39E-22
<i>SCGB1A1</i>	1,67E+02
<i>TMEM151A</i>	5,20E+07
<i>TP53AIP1</i>	3,06E+01
<i>TRIM29</i>	1,59E+08
<i>A2ML1</i>	3,25E-11
<i>C12orf54</i>	2,30E+06
<i>COL2A1</i>	0,000228284984670818
<i>ENDOU</i>	1,21E-05
<i>GALNT8</i>	1,19E+09
<i>GALNT9</i>	2,62E-02
<i>GYS2</i>	2,95E+02
<i>KCNA1</i>	7,30E-02
<i>KERA</i>	1,24E+02

<i>KRT4</i>	1,69E-46
<i>KRT5</i>	9,21E-40
<i>KRT6A</i>	1,70E-29
<i>KRT6B</i>	1,36E-03
<i>KRT6C</i>	5,68E-34
<i>KRT75</i>	0,00103202350022313
<i>KRT78</i>	3,94E-29
<i>LOC255480</i>	3,83E+04
<i>PDZRN4</i>	1,76E+07
<i>SDR9C7</i>	9,19E-06
<i>TAC3</i>	2,06E+05
<i>TBX5</i>	5,84E+07
<i>AK055459</i>	0,000122854544726686
<i>ATP12A</i>	3,71E+01
<i>CLDN10</i>	6,48E+01
<i>GJB2</i>	3,94E-08
<i>GJB6</i>	4,18E-10
<i>LINC00284</i>	2,02E+09
<i>LINC00330</i>	6,29E+07
<i>MLNR</i>	4,36E+09
<i>SCEL</i>	1,23E-11
<i>ASB2</i>	4,09E+06
<i>ASPG</i>	6,18E+05
<i>CMA1</i>	8,24E+08
<i>FOXG1</i>	2,57E+09
<i>NGB</i>	1,70E+09
<i>NKX2-8</i>	2,74E+09
<i>NRXN3</i>	5,68E+07
<i>PAX9</i>	2,64E-08
<i>RDH12</i>	5,92E+04
<i>RNASE7</i>	5,05E-02
<i>SLC39A2</i>	1,15E+08
<i>TGM1</i>	4,91E-90
<i>TTC9</i>	3,40E+02
<i>BNC1</i>	4,45E-23
<i>CERS3</i>	5,68E-38
<i>CHRNA3</i>	1,03E+01
<i>CILP</i>	1,51E+04
<i>DUOX1</i>	1,10E-06
<i>DUOXA1</i>	6,57E+07
<i>PLA2G4E</i>	7,34E+06
<i>RHCG</i>	2,15E-59
<i>RHOV</i>	6,10E-02
<i>RYR3</i>	4,11E+06
<i>SYNM</i>	4,83E+01

<i>TGM5</i>	1,11E-11
<i>AK123582</i>	6,29E+00
<i>AK126852</i>	2,89E+06
<i>CAPNS2</i>	5,58E-10
<i>CTRB2</i>	1,77E+07
<i>DPEP1</i>	1,03E+07
<i>HS3ST6</i>	3,52E+03
<i>IGFALS</i>	1,44E+09
<i>IRX3</i>	2,13E+06
<i>MSLNL</i>	2,87E+08
<i>MYH11</i>	3,10E+04
<i>NDE1</i>	2,23E+03
<i>NDRG4</i>	5,15E+01
<i>NKD1</i>	1,26E+07
<i>PPL</i>	5,23E-12
<i>PRSS27</i>	4,38E-48
<i>SCNN1B</i>	6,24E-16
<i>SCNN1G</i>	9,05E+02
<i>SHISA9</i>	1,63E+09
<i>TEPP</i>	2,47E+06
<i>VWA3A</i>	3,17E+04
<i>ZG16</i>	7,47E+09
<i>AK057473</i>	2,24E+05
<i>C17orf109</i>	5,73E-01
<i>C17orf78</i>	7,66E+05
<i>D43770</i>	1,68E+08
<i>FOXN1</i>	1,98E+04
<i>GAST</i>	2,07E+07
<i>GLP2R</i>	3,44E+06
<i>KCNH6</i>	9,40E+07
<i>KRT13</i>	1,34E-38
<i>KRT14</i>	5,81E-39
<i>KRT15</i>	5,50E-11
<i>KRT16P2</i>	1,26E+01
<i>KRT16P3</i>	6,03E+07
<i>KRT16</i>	1,16E-16
<i>KRT17</i>	2,31E+09
<i>KRT24</i>	2,68E-04
<i>KRT32</i>	4,79E+08
<i>KRTAP2-3</i>	0,000501906364451418
<i>KRTAP4-1</i>	0,000264941630851534
<i>MYOCD</i>	3,99E+06
<i>NOS2</i>	1,15E+08
<i>OTOP2</i>	3,11E+07
<i>PIRT</i>	4,76E+07

<i>RBFOX3</i>	7,93E+08
<i>RNF222</i>	1,04E-01
<i>SHISA6</i>	9,91E+07
<i>SLC2A4</i>	2,29E+07
<i>SOX15</i>	2,97E-09
<i>STAC2</i>	4,85E+05
<i>TUSC5</i>	0,000296394475110871
<i>ZNF750</i>	7,00E-28
<i>C18orf26</i>	2,61E+04
<i>DSC1</i>	5,66E+06
<i>DSC3</i>	1,28E-20
<i>DSG1</i>	1,27E+07
<i>DSG3</i>	5,10E-02
<i>LOC284215</i>	3,59E+09
<i>SERPINB11</i>	3,12E+01
<i>SERPINB13</i>	2,01E-10
<i>SERPINB2</i>	2,71E+02
<i>SERPINB3</i>	1,56E-04
<i>SLC14A2</i>	3,06E+06
<i>ACER1</i>	3,44E+06
<i>APLP1</i>	7,96E+03
<i>BC007817</i>	5,81E+02
<i>CCL25</i>	1,35E+01
<i>CNFN</i>	3,68E-32
<i>CNN1</i>	9,84E-06
<i>CYP4F22</i>	8,19E-07
<i>DMKN</i>	3,65E+07
<i>EPHX3</i>	2,87E+05
<i>HSPB6</i>	1,22E+00
<i>IGFL1</i>	1,46E+05
<i>IL28A</i>	0,000168287535719798
<i>KLK13</i>	7,08E-14
<i>KLK5</i>	6,04E-06
<i>KLK7</i>	4,11E+06
<i>KLK8</i>	3,23E+07
<i>KLK9</i>	3,06E+05
<i>KRTDAP</i>	9,54E-11
<i>LGALS7B</i>	2,00E-04
<i>LGALS7</i>	0,000189014058328044
<i>LOC100507003</i>	8,05E+08
<i>LOC646862</i>	6,69E-07
<i>LYPD3</i>	8,41E-21
<i>MUC16</i>	9,65E+09
<i>NCCRP1</i>	1,15E-20
<i>NTF4</i>	7,76E+05

<i>PLAC2</i>	2,14E+04
<i>PLIN4</i>	5,46E+04
<i>PSG4</i>	1,07E+07
<i>SBSN</i>	6,77E-46
<i>SLC8A2</i>	2,06E+08
<i>SULT2B1</i>	1,35E+07
<i>SYCN</i>	0,00125134912947298
<i>UPK1A</i>	1,71E+02
<i>VSIG10L</i>	2,66E-16
<i>ZNF676</i>	2,26E+08
<i>ZNF812</i>	5,21E-07
<i>ZNF98</i>	3,94E+07
<i>ACTG2</i>	2,14E-09
<i>AK127124</i>	7,82E+06
<i>APOB</i>	0,000137468878183991
<i>BC051708</i>	3,87E-08
<i>C2orf54</i>	3,81E+06
<i>CAPN14</i>	5,64E-26
<i>CCDC164</i>	4,63E+03
<i>CTNNA2</i>	4,66E+08
<i>DAPL1</i>	4,62E+07
<i>DES</i>	4,48E+02
<i>FEV</i>	2,36E+08
<i>GCG</i>	0,000501870726415481
<i>GRHL1</i>	8,07E-05
<i>IL1RN</i>	2,55E-06
<i>IL36A</i>	6,05E-14
<i>IL36G</i>	6,40E-22
<i>IL36RN</i>	1,54E-01
<i>LOC100506421</i>	0,000525617777133285
<i>LOC200772</i>	5,01E+03
<i>MAL</i>	4,74E-23
<i>NAT8</i>	7,33E+06
<i>PP14571</i>	9,13E+06
<i>SIX2</i>	1,18E+02
<i>SLC5A7</i>	0,000118916097463498
<i>SMYD1</i>	3,72E-04
<i>AK055386</i>	3,91E+09
<i>ARHGAP40</i>	2,09E+05
<i>BPIFB2</i>	0,000132900296158182
<i>C20orf166-AS1</i>	6,19E+06
<i>C20orf166</i>	0,000131793391624234
<i>CDH26</i>	5,99E-05
<i>EEF1A2</i>	2,79E+07
<i>EYA2</i>	3,77E+06

<i>FAM83C</i>	7,98E+01
<i>JPH2</i>	1,84E+08
<i>LBP</i>	2,64E+09
<i>MYL9</i>	6,56E+06
<i>PCSK2</i>	8,96E+05
<i>SEMG2</i>	7,73E+09
<i>TGM3</i>	2,15E-04
<i>VSTM2L</i>	2,01E+08
<i>WFDC5</i>	1,67E-06
<i>AIRE</i>	1,82E+08
<i>BC028044</i>	0,000551162924431827
<i>CLIC6</i>	7,50E+06
<i>CSTB</i>	5,42E-06
<i>LINC00114</i>	6,18E+09
<i>TMPRSS15</i>	4,83E+03
<i>KIAA1644</i>	1,76E-02
<i>UPK3A</i>	5,43E+08
<i>AGTR1</i>	4,82E+07
<i>ATP13A4</i>	6,03E+07
<i>AX746877.1</i>	9,35E+07
<i>AX746877.2</i>	1,31E+06
<i>COL6A5</i>	1,26E+06
<i>CSTA</i>	7,59E-24
<i>EPHA3</i>	1,05E+03
<i>FETUB</i>	1,19E+09
<i>GADL1</i>	4,46E+07
<i>GPR87</i>	5,90E-02
<i>HRASLS</i>	2,80E+08
<i>IL20RB</i>	3,05E-08
<i>LOC100131551</i>	8,21E+04
<i>LOC344887</i>	1,59E+07
<i>LOC401109</i>	2,80E+06
<i>MYLK</i>	3,32E+04
<i>POPDC2</i>	1,30E+03
<i>ROPN1B</i>	6,00E+07
<i>SLC6A11</i>	6,63E+07
<i>SLC7A14</i>	9,15E+09
<i>TMEM40</i>	5,52E-23
<i>TP63</i>	5,73E-21
<i>TPRG1</i>	7,57E-17
<i>WNT7A</i>	1,60E+03
<i>ZBBX</i>	0,000144730588963215
<i>ADH1A</i>	1,14E+06
<i>ADH7</i>	2,64E-03
<i>AMTN</i>	1,24E+06

<i>BMP3</i>	4,19E+04
<i>C4orf51</i>	4,45E+03
<i>CWH43</i>	8,51E+04
<i>EPGN</i>	4,05E+00
<i>FGFBP1</i>	7,66E+06
<i>HAND2</i>	1,43E+04
<i>LOC285547</i>	0,00180792178269481
<i>MAB21L2</i>	7,00E+00
<i>NBLA00301</i>	5,49E-02
<i>NKX3-2</i>	5,19E-16
<i>NKX6-1</i>	2,65E-12
<i>ODAM</i>	1,12E+08
<i>PCDH10</i>	2,51E+07
<i>PPP2R2C</i>	2,00E+04
<i>SPOCK3</i>	4,35E+08
<i>SYNPO2</i>	2,58E+04
<i>TMEM154</i>	4,96E+00
<i>TMPRSS11A</i>	9,22E-17
<i>TMPRSS11B</i>	2,32E-09
<i>TMPRSS11D</i>	4,43E-69
<i>TMPRSS11E</i>	1,86E-30
<i>TMPRSS11F</i>	7,20E-03
<i>AACSP1</i>	0,00015027123885257
<i>ADCY2</i>	4,06E+02
<i>AX747383</i>	1,10E+08
<i>BC034636</i>	9,37E-03
<i>BC047373</i>	2,99E+07
<i>C5orf49</i>	2,45E+08
<i>CARTPT</i>	1,09E+04
<i>CDH10</i>	5,50E+08
<i>FAM153A</i>	2,78E+07
<i>FAT2</i>	2,94E-64
<i>FGF10</i>	1,44E+01
<i>FSTL4</i>	4,73E+09
<i>GABRB2</i>	7,68E+08
<i>IRX1</i>	2,80E+07
<i>IRX4</i>	3,24E+08
<i>JF824130</i>	1,20E+09
<i>LIX1</i>	3,39E+04
<i>MIR143HG</i>	4,84E+07
<i>NKX2-5</i>	4,85E+09
<i>SCGB3A1</i>	1,81E-03
<i>SNCAIP</i>	1,26E+05
<i>SPINK13</i>	3,72E+07
<i>SPINK5</i>	2,37E-29

<i>SPINK6</i>	1,46E+02
<i>SPINK7</i>	2,01E-05
<i>THBS4</i>	7,94E+06
<i>UNC5A</i>	1,99E+07
<i>AK056584</i>	1,11E+00
<i>AK126334</i>	1,30E+08
<i>AL832737</i>	1,50E+05
<i>BC040308</i>	1,06E+09
<i>CLPSL1</i>	6,12E+09
<i>CLVS2</i>	9,91E+09
<i>CRISP3</i>	1,24E+07
<i>DPCR1</i>	0,000129712153096092
<i>EPHA7</i>	4,45E+04
<i>FILIP1</i>	5,40E+05
<i>FLJ23152</i>	1,05E+04
<i>GPR110</i>	2,65E-02
<i>HCG22</i>	4,02E+04
<i>HCG4</i>	1,30E+07
<i>LOC554223</i>	3,98E+05
<i>LPA</i>	4,13E+09
<i>MLN</i>	5,41E+09
<i>MUC21</i>	1,68E-27
<i>MUC22</i>	4,25E+01
<i>NRSN1</i>	1,49E+09
<i>PLN</i>	3,14E+08
<i>PRL</i>	6,12E-02
<i>RAET1E</i>	5,25E-34
<i>RAET1G</i>	8,36E-05
<i>RAET1L</i>	3,60E+03
<i>RBM24</i>	2,29E+07
<i>SFTA2</i>	1,78E+08
<i>TFAP2B</i>	1,10E+09
<i>VIP</i>	1,52E+06
<i>ZFP57</i>	8,76E+08
<i>ADCYAP1R1</i>	5,53E+06
<i>BC040865</i>	3,83E+06
<i>CCDC136</i>	4,45E+05
<i>DLX5</i>	5,03E+06
<i>DPP6</i>	3,10E+05
<i>EPO</i>	4,52E+08
<i>FLNC</i>	7,89E-02
<i>HOXA9</i>	1,67E+06
<i>TAC1</i>	2,52E+09
<i>UPK3B</i>	3,71E+04
<i>VWDE</i>	4,74E+09

<i>AX747062</i>	2,54E+05
<i>CAI</i>	6,91E+09
<i>DEFA5</i>	1,23E+09
<i>DEFA6</i>	0,000333554846114605
<i>DEFB1</i>	2,07E+02
<i>FABP4</i>	9,64E+07
<i>FAM83A</i>	1,63E+03
<i>GSDMC</i>	5,21E-14
<i>LGI3</i>	3,80E+07
<i>LOC100131726</i>	1,12E+06
<i>LOC100192378</i>	3,94E+05
<i>LY6D</i>	1,90E+02
<i>LYNX1</i>	7,84E+04
<i>LYPD2</i>	8,61E+05
<i>NKX6-3</i>	8,82E+02
<i>OPRK1</i>	2,48E+08
<i>PEBP4</i>	5,06E+06
<i>PENK</i>	1,51E+07
<i>RGS20</i>	6,68E+01
<i>SLURP1</i>	5,44E-10
<i>SNX31</i>	4,26E+05
<i>STMN2</i>	5,66E+04
<i>TDH</i>	1,67E+07
<i>AK128153</i>	2,28E-04
<i>AK130904</i>	3,61E+06
<i>AL390170</i>	0,00010335625151254
<i>ANXA1</i>	7,20E-24
<i>AQP3</i>	1,87E-04
<i>ASPN*</i>	4,69E-13
<i>C9orf169</i>	6,97E-09
<i>C9orf171</i>	2,84E+06
<i>C9orf71</i>	6,75E+08
<i>CELP</i>	6,19E+08
<i>CEL</i>	3,22E+06
<i>CLIC3</i>	1,18E-04
<i>CNTFR</i>	1,00E+09
<i>FOXE1</i>	3,29E-05
<i>FRRS1L</i>	6,17E+09
<i>MORN5</i>	1,61E+08
<i>OGN</i>	1,53E+05
<i>OMD</i>	1,46E+07
<i>PGM5</i>	3,86E+06
<i>PRUNE2</i>	3,34E+08
<i>TNC</i>	2,47E+05
<i>AGTR2</i>	1,93E+08

<i>ARSF</i>	7,23E+05
<i>DCX</i>	3,16E+02
<i>DKFZp686D0853</i>	1,84E+05
<i>FAM48B1</i>	3,08E+09
<i>FHL1</i>	2,42E+06
<i>FLNA</i>	3,75E+04
<i>GRPR</i>	6,22E+07
<i>JA202350</i>	3,05E+09
<i>JA202352</i>	5,30E+08
<i>JA202363</i>	6,35E+06
<i>MAGEA10</i>	3,88E+07
<i>MAGEC2</i>	0,000379076873099186
<i>NRK</i>	1,98E+05
<i>OTC</i>	4,47E+07
<i>PLP1</i>	3,72E+08
<i>PNCK</i>	7,14E+08
<i>SMPX</i>	1,35E+07
<i>TNMD</i>	0,000109873109095451
<i>ZNF185</i>	1,58E+04
<i>TBL1Y</i>	2,37E+09
<i>HNRNPM*</i>	0,0395202277058649

*Genes que também foram encontrados diferencialmente expressos através da análise de microarranjo de expressão.