



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

Análise da expressão de hsa-miR-9 e *CDH1* em adenocarcinoma gástrico

Kelly Cristina da Silva Oliveira

Belém – Pará
Junho de 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

Análise da expressão de hsa-miR-9 e *CDH1* em adenocarcinoma gástrico

Kelly Cristina da Silva Oliveira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas da UFPA como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Danielle Queiroz Calcagno.

Belém – Pará
Junho de 2016



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

Análise da expressão de hsa-miR-9 e *CDH1* em adenocarcinoma gástrico

Banca Examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Danielle Queiroz Calcagno
Professor da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Orientadora

Prof. Dr. Rommel Mário Rodríguez Burbano
Professor da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Membro

Prof. Dr. Paulo Assumpção
Professor da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Membro

Prof. Dr.^a. Patrícia Danielle Lima de Lima
Professor da Universidade do Estado do Pará (UEPA)
Membro

Belém – Pará
Junho de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, aos meus avós maternos, Manoel Carlos e Odila Correa, *in memoriam*, por terem sido tão importantes em meus sonhos e que sem eles muitos não se realizariam...

AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Muito especialmente, desejo agradecer à minha orientadora Prof^a Doutora Danielle Calcagno, por acreditar em mim, fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins, pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação e profissionalismo sempre ... meu Muito Obrigada.

Ao Prof^o Dr^o Rommel Rodriguez Burbano, por sua ajuda no momento mais crítico, por acreditar no futuro deste projeto e contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho.

À minha família, em particular, **aos meus pais e minha irmã**, pelo incentivo, compreensão, fé, confiança e encorajamento, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu noivo Wilson Albuquerque, por todo amor e paciência, sempre me apoiando nas minhas decisões e também por ser tão compreensivo. Por estar sempre ao meu lado, apesar das distâncias, seu apoio foi muito importante para a conclusão desta etapa.

Aos meus amigos, em especial as colegas de trabalho Fernanda Jardim, Gabriela Alcantara e Thayanne Macedo por sempre acreditar em mim.

Obrigada a todos que, mesmo não estando citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa.

EPÍGRAFE

“ Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”(Charles Chaplin)

RESUMO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HSA-MIR-9 E *CDH1* EM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

A perda de expressão de *CDH1* é um evento frequente no câncer gástrico (CG), na manifestação esporádica e hereditária, importante no processo de invasão e metástase. Aproximadamente, 15-50% das famílias afetadas pela síndrome do câncer gástrico difuso hereditário (CGDH) apresentam mutações germinativas no gene *CDH1*. Evidências demonstraram que hsa-miR-9 participa da regulação negativa desta proteína em câncer de mama e carcinoma hepatocelular. No presente estudo, foi investigada a possibilidade do hsa-miR-9 ser um mecanismo envolvido na perda de função de *CDH1* em CGDH e CG esporádico. Para a quantificação relativa da expressão de hsa-miR-9 por PCR em tempo real, foram utilizadas amostras de 9 pacientes portadores de CGDH e amostras pareadas de CG esporádico e tecido não neoplásico adjacente de 138 pacientes. Adicionalmente, foi realizada a análise do número de cópias do gene *MYC*, um regulador positivo do hsa-miR-9, nas amostras de CGDH. A expressão de RNAm de *CDH1* e da sua proteína nas amostras de CG esporádico foram realizadas por PCR em tempo real e Western-Blot, respectivamente. Nas amostras de CGDH, foi observado um aumento da expressão de hsa-miR-9 e do número de cópias do gene *MYC* (≥ 3 cópias) independente da presença de mutação germinativa no gene *CDH1*. No CG esporádico, foi observado uma redução da expressão de RNAm de *CDH1*, *CDH1* e hsa-miR-9 no tumor em relação ao tecido não-neoplásico. Além disso, foi encontrada uma associação significativa da redução da expressão de *CDH1* no tipo difuso e nos tumores avançados. A redução da expressão de RNAm *CDH1*, *CDH1* e hsa-miR-9 também foi associada significativamente com a presença de metástase em linfonodo e estadiamento tumoral III-IV. Na análise de correlação, foi identificado uma correlação muito forte entre a expressão do RNAm e proteica de *CDH1*, e uma correlação forte entre a expressão de RNAm de *CDH1* e hsa-miR-9, e a expressão proteica de *CDH1* e hsa-miR-9. O hsa-miR-9 assume um caráter controverso em CG de acordo com o tipo de manifestação, ora desempenhando papel de oncomiR (CGDH), ora se comportando como tsmiR (esporádico). No CGDH, o aumento da expressão de hsa-miR-9 pode ser influenciado pela amplificação do gene *MYC* e sugerimos que funcione como mecanismo de segundo evento em portadores da síndrome CGDH com mutação germinativa no gene *CDH1*. Em relação ao CG esporádico, baseados na teoria do campo de cancerização, sugerimos que ocorre um aumento da expressão de hsa-miR-9 no tecido gástrico adjacente em relação ao tecido sem neoplasia, sendo essa elevação maior que no tumor, o que levaria a regulação negativa de *CDH1*, importante para transição epitélio-mesenquimal e iniciação do tumor.

Palavras-chave: *CDH1*; hsa-miR-9; câncer gástrico; CGDH.

ABSTRACT

EXPRESSION ANALISYS OF HSA-MIR-9 AND *CDH1* IN GASTRIC ADENOCARCINOMA

The loss of *CDH1* expression is a frequent event in gastric cancer (GC), in sporadic and hereditary manifestation, important in the invasion and metastasis process. Approximately, 15-50% of families affected by hereditary diffuse gastric cancer syndrome (HDGC) have germline mutations in the *CDH1* gene. Evidences established that hsa-miR-9 participates of this protein downregulation in breast cancer and hepatocellular carcinoma. In the present study, we investigated the possibility of hsa-miR-9 is involved in *CDH1* negative regulation in HDGC and sporadic GC. For the relative quantification of hsa-miR-9 expression by real-time PCR, was used samples from 9 patients with HDGC and paired samples of sporadic GC and adjacent non-neoplastic gastric tissue of 138 patients. Additionally, was performed copy number variation analysis of the *MYC* gene, a positive regulator of has-miR-9, in HDGC samples. The expression of *CDH1* mRNA and its protein in sporadic GC samples were performed by real time PCR and Western Blot, respectively. All HDGC samples, exhibited increased of hsa-miR-9 expression and copies number of *MYC* (≥ 3 copies) independent of the presence of germline mutation in *CDH1* gene. In sporadic GC it was detected a reduction of *CDH1* mRNA expression, *CDH1* and hsa-miR-9. Moreover, was found a significant association of *CDH1* reduced expression in diffuse-type tumors and advanced. The reduction of *CDH1* mRNA expression, *CDH1* and hsa-miR-9 was significantly associated with lymph node metastasis and tumor stage III-IV. In correlation analysis, was identified a very strong correlation between the expression of mRNA and protein of *CDH1*, and a strong correlation between the *CDH1* mRNA expression and hsa-miR-9, and the protein expression of *CDH1* and hsa-miR-9. The hsa-miR-9 takes a controversial role in CG according to the type of manifestation, playing oncomiR paper in HDGC, occasionally behaving like tsmiR in sporadic. In HDGC, we suggest that hsa-miR-9 overexpression could be influenced by *MYC* amplification and that it functions as a second event mechanism in patients with germline mutation in the gene *CDH1*. Regarding sporadic GC, as an alternative hypothesis based on the theory of field cancerization, we suggest that there is an increased expression of hsa-miR-9 in the adjacent stomach tissue compared to the gastric tissue without cancer. This overexpression would be higher in adjacent tissue than in the tumor, leading to downregulation of *CDH1*, important for epithelial-mesenchymal transition and tumor initiation.

Keywords: *CDH1*; hsa-miR-9; gastric cancer; HDGC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Características adquiridas pelas células tumorais	1
Figura 2 – Aspecto microscópico dos tipos histológicos de Laurén (HE)	3
Figura 3 – Sequência e eventos moleculares propostos no processo de carcinogênese gástrica dos tipos difuso e intestinal	8
Figura 4 – Principais características de subtipos moleculares de câncer gástrico	10
Figura 5 – Gene supressor de tumor clássico é inativado por duas etapas	11
Figura 6 – Representação esquemática do gene CDH1	14
Figura 7 – Estruturas dos domínios extracelulares das caderinas	15
Figura 8 – Modelo estrutural do complexo caderina – catenina	15
Figura 9 – Biogênese de miRNA	19
Figura 10 – Ilustração dos três loci de pré-hsa-miR-9	24
Figura 11 – Famílias com CGDH.	29
Figura 12 – Expressão de hsa-miR-9 em famílias portadoras de CGDH com e sem mutações germinativas no CDH1	33
Figura 13 – Ação do hsa-miR-9 como mecanismo de segundo evento na hipótese dos dois eventos em portadores de mutações germinativas de CDH1	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Definição do TNM patológico para o câncer gástrico	5
Tabela 2 – Agrupamento por estadiamento para o câncer gástrico	6
Tabela 3 – Descrição das síndromes de câncer gástrico hereditário	12
Tabela 4 – Descrição de outras síndromes de câncer associadas com neoplasias gástricas	13
Tabela 5 – MiRNA desregulados em tumores de câncer gástrico	21
Tabela 6 – Alvos de hsa-miR-9 em diferentes tipos de câncer	25
Tabela 7 – Comparação dos valores de RQ de CDH1 e hsa-miR-9 com os dados clinico-patológicos dos pacientes com câncer gástrico	34
Tabela 8 – Correlação da expressão de RNAm de CDH1, CDH1 e hsa-miR-9	35

LISTA DE ABREVIATURAS

CG	Câncer gástrico
EBV	Vírus Epstein-Barr
AJCC	American Joint Committee on Câncer
UICC	Union Internationale contre Le Câncer
TNM	Tumor Nódulos Metástase
MiRNAs	microRNAs
CpG	Ligações fosfodiéster entre a citosina e a guanina
LINE-1	Longos elementos transponíveis intercalados
MSI	Tumores com instabilidade de microssatélites
GS	Tumores genomicamente estáveis
CIN	Tumores com instabilidade cromossômica
CGDH	Câncer gástrico difuso hereditário
LOH	Perda da heterozigidade
pri-miRNAs	Primários miRNAs
pré-miRNAs	Precursos de miRNAs
miRISC	Complexo miRNA de silenciamento induzido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações gerais.....	1
1.2 Classificação Clínico-Histopatológicas do Câncer Gástrico.....	3
1.3 Estadiamento Patológico do Câncer Gástrico.....	4
1.4 Genética e Epigenética do Câncer Gástrico.....	6
1.5 Classificação Molecular do Câncer Gástrico.....	9
1.6 Tipos de Manifestação de Câncer Gástrico.....	11
1.6.1 Síndrome do Câncer Gástrico Hereditário.....	12
1.6.2 Câncer Gástrico Difuso Hereditário.....	13
1.7 Gene CDH1.....	14
1.8 miRNAs.....	17
1.8.1 miRNAs e Câncer Gástrico.....	19
1.8.2 hsa-miR-9.....	23
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Pacientes.....	28
3.1.1 Famílias com CGDH.....	28
3.1.2 Pacientes com CG esporádico.....	29
3.2 Quantificação da expressão.....	29
3.2.1 Extração de RNA.....	29
3.2.2 Quantificação relativa da expressão de <i>CDH1</i>.....	29
3.2.3 Quantificação relativa da expressão de hsa-miR-9.....	30
3.3 Western-blot.....	30
3.4 Variação de número de cópias.....	31
3.5 Análise Estatística.....	31
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Câncer gástrico difuso hereditário.....	33
4.2 Câncer gástrico esporádico.....	33
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

O câncer é uma doença caracterizada por proliferação celular incontrolável e incessante, resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que conferem as células alteradas a habilidade de evitar a apoptose e replicar indefinidamente. Outras características são inerentes às células neoplásicas como: promoção da inflamação, instabilidade genômica, desregulação do metabolismo energético celular, escape do sistema imunológico, capacidade de desencadear angiogênese e de invadir tecidos, estabelecendo tumores secundários (metástases) (Figura 1) (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

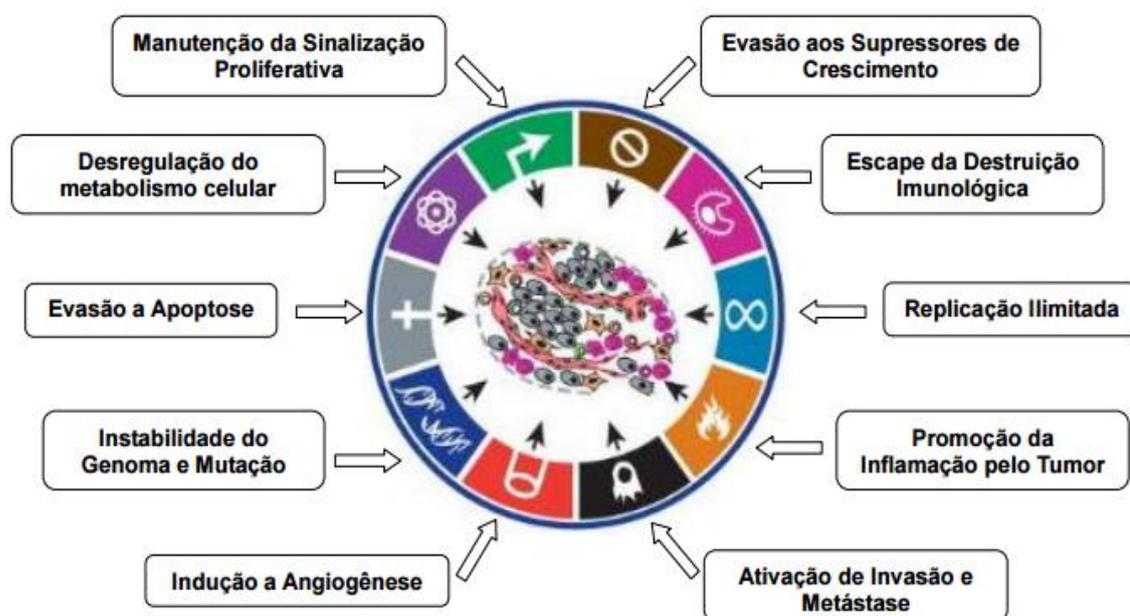


Figura 1: Características adquiridas pelas células tumorais (Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Atualmente, o câncer é considerado um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que o impacto na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (IARC, 2016).

Segundo a estimativa mundial realizada pelo projeto GLOBOCAN/IARC em 2012, os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram: pulmão (1,8 milhão), mama (1,6 milhão), intestino (1,3 milhão), próstata (1,1 milhão) e estômago (950 mil) (GLOBOCAN, 2016).

Apesar da redução na incidência mundial do câncer gástrico (CG), essa neoplasia continua sendo a terceira maior causa de morte por câncer no mundo (GLOBOCAN, 2016).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou, para o ano de 2016, 20.520 casos novos de câncer de estômago. A mortalidade por CG no Brasil permanece elevada e aproximadamente 14.182 óbitos ocorreram em 2013, sendo 9.142 em homens e 5.040 mulheres (INCA, 2016).

O principal fator de risco etiológico para o desenvolvimento do CG é a infecção pela bactéria *H. pylori*. Desde 1994, essa bactéria é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um carcinógeno tipo 1 – ou seja, um agente que causa câncer (AZARHOUSH et al. 2008; KONTUREK et al. 2009; DE MARTEL et al. 2013).

Os avanços imunológicos de detecção permitiram observar outro possível agente etiológico além da bactéria *H. pylori*, o vírus Epstein-Barr (EBV), que está relacionado ao desenvolvimento de diferentes tumores sólidos (ANWAR et al. 2005; YOSHIWARA et al. 2005; LIMA et al. 2008; CAMARGO et al. 2011).

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

Geralmente, o CG é diagnosticado em estágios avançados e mantém taxas de sobrevivência extremamente baixas - média cumulativa estimada em aproximadamente 20% após cinco anos do diagnóstico da doença (NAGINI, 2012). O diagnóstico tardio ocorre, principalmente, devido à ausência de sintomas ou à presença de sintomas não específicos nos estágios iniciais da doença (GLOBOCAN, 2016).

Dentre os sinais e sintomas do CG destacam-se a perda de peso em curto período de tempo, dificuldade de alimentação, dor local, náuseas, vômitos e sensação de plenitude precoce, geralmente associada à doença localmente avançada o que contribui para uma piora no estado clínico do paciente, dificultando os tratamentos propostos e, conseqüentemente, favorecem o pior prognóstico (CECCONELLO e LEITE, 2004; BLUM et al. 2013).

Esses fatos reforçam a gravidade do CG e a necessidade do desenvolvimento de novos estudos que possam ajudar na identificação de características biológicas peculiares do tumor,

ampliando a capacidade de prever o comportamento dessa neoplasia e permitindo o estabelecimento de conduta terapêutica mais precisa.

1.2 Classificação Clínico-Histopatológicas do Câncer Gástrico

O CG é definido como qualquer neoplasia maligna que se estende entre a junção gastroesofágica e o piloro, e pode atingir diferentes camadas de tecido (mucosa, submucosa, muscular, subserosa e serosa). Diferentes tipos de câncer podem incidir no estômago, porém, as citações ao CG neste documento referir-se-ão exclusivamente ao adenocarcinoma.

O adenocarcinoma, quando o tumor se origina na mucosa, é o tipo mais comum de câncer gástrico, correspondendo aproximadamente 95% dos casos (SMITH et al. 2006). Há várias propostas de classificação microscópica para esta neoplasia, porém a classificação mais utilizada e reconhecida no Ocidente é a que se baseia nos estudos de LAURÉN (LAURÈN, 1965), que classifica os adenocarcinomas gástricos em dois tipos principais: difuso e intestinal (Figura 2). Pode ser observado com menos frequência, uma forma intermediária entre os dois tipos histológicos, denominada de “padrão misto” (LAURÈN, 1965).

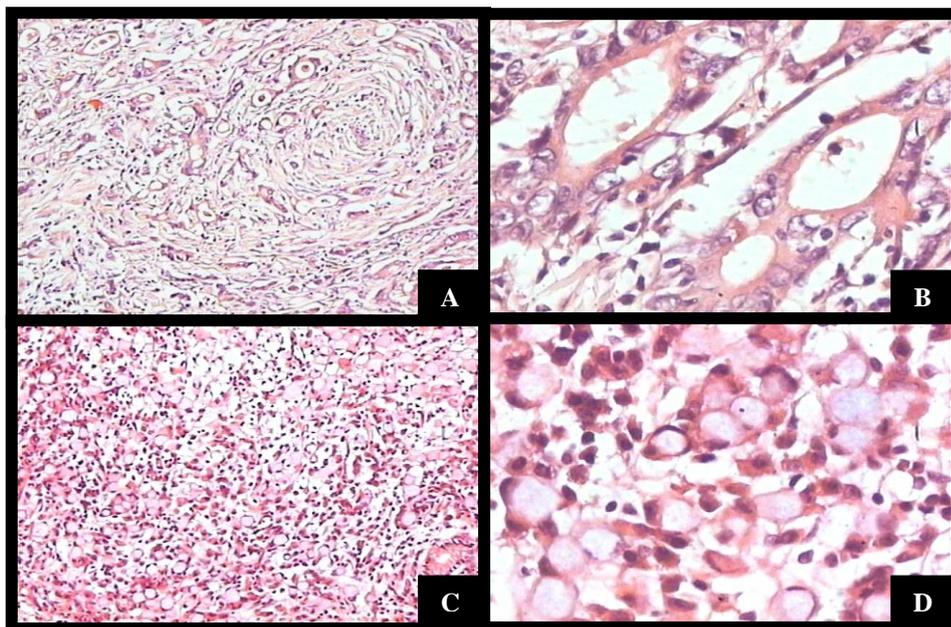


Figura 2: Aspecto microscópico dos tipos histológicos de LAURÉN (HE). No tipo intestinal, neoplasia forma glândulas desorganizadas, 200x (A); e as células neoplásicas formam cordões sólidos, 400x (B). No tipo difuso o tumor infiltra difusamente todas as camadas do estômago, e o melhor lugar para identificar a infiltração é a camada muscular, onde as células neoplásicas contrastam com as fibras musculares lisas, 200x (C); o excesso de muco produzido pelas células neoplásicas pode ser observado no citoplasma na forma de um grande vacúolo, que desloca o núcleo para a periferia, originando as células em anel de sinete, 400x (D) (LAURÈN, 1965).

O tipo intestinal, ou “epidêmico”, é o mais frequente, depende de fatores ambientais e está associado à presença de lesões pré-cancerosas, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia. É bem diferenciado e exibe um padrão de crescimento expansivo, apresenta coesão celular e células com núcleos grandes e irregulares (HUNTSMAN et al. 2001).

Enquanto que o tipo difuso apresenta pior prognóstico, é pobremente diferenciado não está associado a lesões pré-cancerosas e apresenta um padrão de crescimento invasivo (HUNTSMAN et al. 2001). Constituído de pequenas células não coesas, difusamente dispersas, que não formam estruturas glandulares, podendo apresentar células com núcleos periféricos em função da elevada produção de mucina.

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

Infelizmente, a maioria das neoplasias gástricas é diagnosticada na fase avançada, em função dos sintomas manifestarem-se geralmente somente nessa fase da doença. O tumor gástrico é considerado avançado quando invade as camadas mais profundas da parede do estômago (além da submucosa), podendo ou não apresentar metástase nos linfonodos e em órgãos adjacentes (MACDONALD, 1992).

1.3 Estadiamento Patológico do Câncer Gástrico

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

Tabela 1: Definição do TNM patológico para o câncer gástrico (Adaptado da Classificação TNM – UICC, 2013).

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

Tabela 2: Agrupamento por estadiamento para o câncer gástrico (Adaptado da Classificação TNM – UICC, 2013).

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

1.4 Genética e Epigenética do Câncer Gástrico

O CG constitui um interessante modelo de estudo da carcinogênese, pois a identificação de diferentes alterações genéticas e epigenéticas no adenocarcinoma do subtipo intestinal e difuso sugere que os subtipos histológicos seguem vias distintas (TAHARA, 2003; GIGEK et al. 2012; CALCAGNO et al. 2013; CALCAGNO et al. 2015). Ainda é controversa a identificação dos genes responsáveis pela iniciação e progressão do câncer gástrico (FIGUEIREDO et al. 2013).

As alterações moleculares que são observadas no desenvolvimento e progressão do CG são principalmente a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais (NAGINI, 2012).

Os oncogenes são responsáveis pelo crescimento, multiplicação e diferenciação da célula normal. Uma variedade de eventos genéticos - mutações pontuais, microdeleções,

inserções, justaposições e alterações cromossômicas - podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasias (MULLAUER et al. 2001).

Dos muitos oncogenes conhecidos, alguns são derivados de genes celulares normais (isto é, proto-oncogenes), cujos produtos participam em vias de controle do crescimento celular. Um oncogene formado por mutações pontuais em um proto-oncogene codifica uma oncoproteína que é ligeiramente diferente do normal. Em contraste, a amplificação gênica e a translocação cromossômica geram oncogenes cujos produtos de proteína são idênticos com as proteínas normais, mas o seu efeito neoplásico deve-se a níveis mais elevados do que o normal ou em células em que normalmente não são expressas (LODISH et al. 2016).

Geralmente, os genes supressores tumorais codificam proteínas que de uma maneira ou de outra, inibem a proliferação celular. Esse tipo de gene possui a função primária de reparar o DNA, manter as células em estado de repouso após um dano ou ainda iniciar o processo de apoptose caso o defeito do DNA não seja reparado (LODISH et al. 2016).

Vários mecanismos podem levar a inativação dos genes supressores tumorais, incluindo alterações cromossômicas em larga escala ou mutações pontuais. No entanto, na maioria dos casos, ambos os alelos do gene devem ser comprometidos para abolir o funcionamento do gene, a menos que a proteína mutada possa agir de uma forma negativamente dominante para bloquear a atividade de seu tipo selvagem homólogo (DELBRIDGE et al. 2012).

Alterações de oncogenes *ERBB2 (HER-2)*, *MYC*, *MET (HGFR)*, *KRAS*, *CTNNB1* (β -catenina), *FGFR2 (KAM)* e *CCNE1 (ciclina E1)*, assim como de genes supressores tumorais *TP53*, *CDKN2A (TP16 e TP14)*, *APC*, *RB*, *DCC*, *RUNX* e *CDH1* (E-caderina) têm sido frequentemente descritas no processo de múltiplos passos da carcinogênese gástrica (VAUHKONEN et al. 2006; PANANI, 2008; NAGINI, 2012). A Figura 3 apresenta um esquema de vias hipotéticas na carcinogênese gástrica proposto por VAUHKONEN et al. (2006).

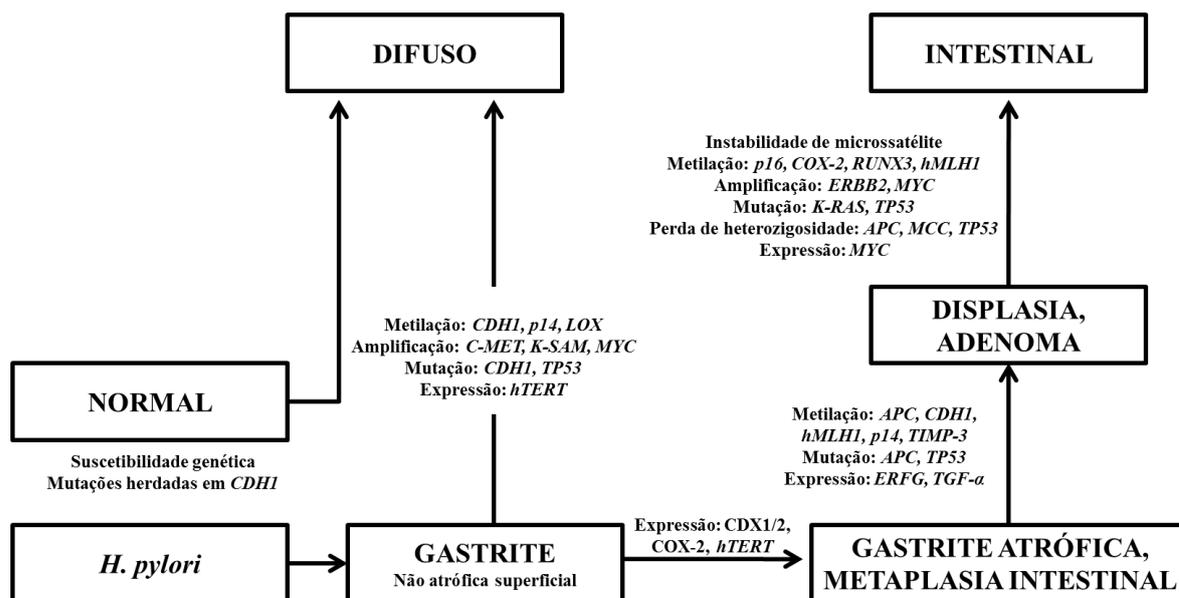


Figura 3: Sequências e eventos moleculares propostos no processo de carcinogênese gástrica dos tipos difuso e intestinal (Adaptado de VAUHKONEN et al. 2006).

Além das alterações genéticas descritas no CG, as de caráter epigenético desempenham um papel importante na iniciação e progressão do câncer, resultando na desregulação da expressão e das funções associadas a esses genes (ROPERO e ESTELLER, 2007; JONES e BAYLIN, 2007).

A epigenética é considerada uma herança não-mendeliana de modificações no DNA. Eventos epigenéticos referem-se a alterações que promovem a variação da expressão gênica sem modificação da sequência de DNA que levam a ativação transcricional ou silenciamento gênico, incluindo metilação do DNA, modificações de histonas e microRNAs (miRNAs) (YOUNGSON e WHITELAW, 2008).

Alterações no controle epigenético da expressão gênica desempenham um papel central no CG (GIGEK et al. 2012; CALCAGNO et al. 2013; CALCAGNO e t al. 2015), sendo a metilação do DNA o mecanismo epigenético mais descrito nessa neoplasia (GIGEK et al. 2012; CALCAGNO et al. 2013; DO NASCIMENTO BORGES, BURBANO e HARADA, 2013; CALCAGNO et al. 2015).

A metilação do DNA refere-se à adição ou subtração de um radical metil na posição 5' do anel citosina dentro dinucleótidos CpG que estão normalmente localizadas nas regiões ricas em CpG (ligações fosfodiéster entre a citosina e a guanina) (ilhas CpG). A metilação do DNA nas regiões promotoras de genes reprime a sua transcrição (JONES e TAKAI, 2001).

No entanto, a metilação em corpos de genes não bloqueia a transcrição e está por vezes associada com a transcrição ativa (BAYLIN e OHM, 2006).

A perda da regulação gênica decorrente de alterações no perfil de metilação do DNA inclui a hipometilação e hipermetilação. A hipometilação é caracterizada pela perda de metilação e pode levar a ativação de oncogenes e instabilidade cromossômica. Por outro lado, a hipermetilação refere-se ao ganho de metilação no locus originalmente não metilado, geralmente resulta silenciamento transcricional estável (FEINBERG, 2004; SELARU et al. 2009).

O nível de metilação nos longos elementos transponíveis intercalados (LINE-1) surgiu como um prognóstico promissor ou biomarcador preditivo em CG (BABA et al. 2014). BAE et al. (2012) observaram metilação diminuída em LINE-1 durante a transição de metaplasia intestinal para adenoma gástrico e não ocorreu nenhuma diminuição entre a transição de adenoma gástrico para CG. Os autores também reportaram que a hipometilação em LINE-1 foi fortemente associada com pior prognóstico em CG.

Vários estudos foram publicados sobre hipermetilação na região promotora de genes em adenocarcinomas gástricos. Curiosamente, o CG é um dos tumores com maior frequência de metilação aberrante e isto pode ser útil para detecção de neoplasia gástrica. Assim, metilação do DNA pode ser um biomarcador útil para avaliação de risco de tumor gástrico, diagnóstico precoce, predição de prognóstico do paciente e avaliação da sensibilidade de drogas quimioterápicas. (GIGEK et al. 2012; CALCAGNO et al. 2013).

1.5 Classificação Molecular do Câncer Gástrico

Através do estudo da base molecular e genômica do CG, o CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. (2014) descreveram uma classificação molecular que define quatro grandes subtipos genômicos de câncer gástrico: tumores infectados por vírus Epstein-Barr; tumores com instabilidade microsatélite (MSI); tumores com estabilidade genômica; e tumores com instabilidade cromossômica (Figura 4).

Os tumores positivos para o vírus Epstein-Barr (EBV) apresentam mutações no gene *PIK3CA*, hipermetilação do DNA, e amplificação dos genes *JAK2*, *PD-L1* e *PD-L2*. Além da hipermetilação do DNA (incluindo silenciamento de *MLH1*), os tumores com instabilidade de microsatélites (MSI) mostram taxas de mutação elevadas. O subgrupo dos tumores genomicamente estáveis (GS) são geralmente variantes histológicas do tipo difuso e com mutações no gene *RHOA* ou fusões envolvendo proteínas de ativação de GTPase e

família RHO. Já os tumores com instabilidade cromossômica (CIN) são predominantemente do tipo histológico intestinal, mostram marcadamente aneuploidia e amplificação focal do receptor tirosina quinases, sendo a maioria dos tumores (73%) possuem mutações no gene *TP53* (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. 2014).

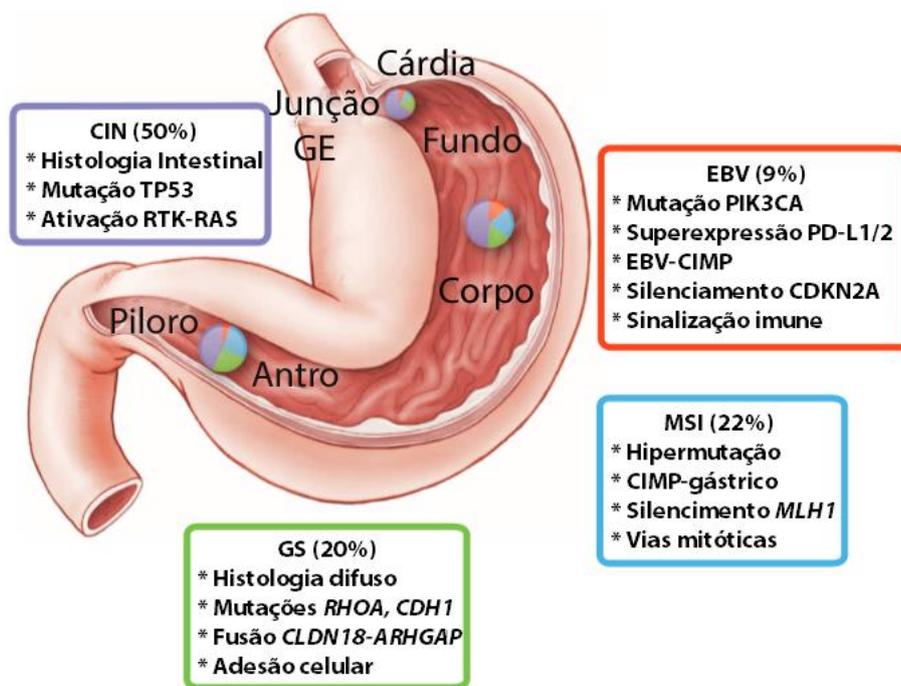


Figura 4: Principais características de subtipos moleculares de CG (Adaptado de CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. 2014).

Cada subtipo foi encontrado ao longo do estômago, mas tumores com instabilidade cromossômica apresentaram elevada frequência na junção cardia/gastroesofagica (65%), enquanto a maioria dos tumores positivos para vírus Epstein-Barr estavam presentes no fundo ou corpo gástrico (62%). Tumores estáveis genomicamente foram diagnosticados em idades precoces (média de 59 anos), enquanto tumores MSI foram diagnosticados relativamente em idades avançadas (média 72 anos) (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. 2014).

A classificação molecular do CG pode servir como um adjunto valioso a histopatologia. É importante ressaltar que esses subtipos moleculares mostraram características genômicas distintas, proporcionando um direcionamento para terapias alvo que devem ser avaliados em ensaios clínicos de diferentes populações de pacientes com CG (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. 2014).

1.6 Tipos de Manifestação de Câncer Gástrico

A maioria das neoplasias gástricas é esporádica, ou seja, são decorrentes de alterações que ocorrem nas células somáticas. No entanto, estudos demonstram que cerca de 1-3% dos casos de câncer têm um indicativo de origem familiar, com as alterações genéticas ocorrendo nas células da linhagem germinativa (LA VECCHIA et al. 1992; VARLEY et al. 1995; VASEN, 1996; COLVIN et al. 2015).

Casos de câncer hereditários geralmente desenvolvem-se apenas após um evento somático mutacional. Segundo KNUDSON (1971) um alelo mutante é herdado e o outro é gerado de forma somática durante o desenvolvimento humano. Devido a elevada chance do segundo evento ocorrer quase todos os indivíduos com o primeiro evento herdado (alelo mutante) irão desenvolver câncer e assim o fenótipo de susceptibilidade de câncer é herdado de forma dominante. Um mecanismo similar pode ser aplicado aos casos esporádicos, porém ambos eventos ocorrem em um tecido somático (BERGER et al. 2011) (Figura 5).

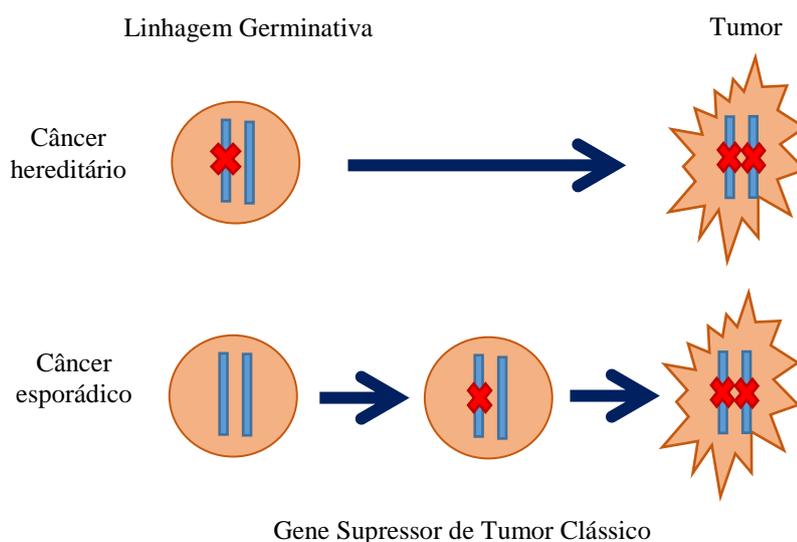


Figura 5: Gene supressor de tumor clássico é inativado por duas etapas. No câncer hereditário, uma dessas etapas é adquirida na linhagem germinativa com a segunda etapa adquirida somaticamente durante o desenvolvimento do tumor. Entretanto, no câncer esporádico as duas etapas devem ocorrer nas células somáticas durante o desenvolvimento do tumor (Adaptado de PAYNE & KEMP, 2005).

No contexto das síndromes do câncer hereditário, a inativação total está envolvida na doença gênica podendo ser o passo crucial para iniciação tumoral, mas outros eventos podem ocorrer, particularmente promovendo ou aumentando sua progressão. Neste caso, a hipótese

dos dois eventos deve ser aplicada diretamente ao gene supressor tumoral, com dois eventos representando o número necessário para inativação do gene supressor tumoral, mas não necessariamente para tumorigênese (BERGER et al. 2011).

1.6.1 Síndrome do Câncer Gástrico Hereditário

Reconhecidamente, três síndromes conferem predisposição herdáveis a neoplasias primárias de estômago. Estas são segregadas de acordo com seus tipos histológicos conforme morfologia macroscópica: (1) câncer gástrico difuso hereditário (CGDH); (2) câncer gástrico intestinal familiar; e (3) adenocarcinoma gástrico e polipose proximal do estômago. Entre estas síndromes a causa genética é conhecida apenas na minoria de pacientes com CGDH (Tabela 3) (COLVIN et al. 2015).

Tabela 3: Descrição das síndromes de câncer gástrico hereditário.

Síndromes de câncer gástrico hereditário		
Síndromes	Características principais	Mutações associadas a gene
Síndromes de câncer gástrico hereditário		
CGDH	Herança autossômica dominante do CG tipo difuso com elevada penetrância e início precoce e agressivo da doença em casos com mutações patológicas do <i>CDH1</i>	<i>CDH1</i> em 15-50% dos casos a-E-catenin gene (cadherin-associated protein, alpha 1 [CTNNA1])
Câncer gástrico intestinal familiar	Herança autossômica dominante do CG tipo intestinal na ausência de polipose gástrica	Desconhecida
Adenocarcinoma gástrico e polipose proximal do estômago	Herança autossômica dominante de polipose da glândula fúndica do estômago proximal e seu desenvolvimento do adenocarcinoma tipo intestinal	Desconhecida

Adaptado: COLVIN et al. 2015.

Neoplasias gástricas também podem surgir em associação com outras síndromes de câncer hereditário, fornecendo evidência para etiologia genética da doença (Tabela 4). Estas síndromes devem ser consideradas em diagnóstico diferencial quando famílias possuem predisposição gástrica ou qualquer outro câncer relevante, ao lado de síndromes de câncer gástrico hereditário (COLVIN et al. 2015).

Tabela 4: Descrição das outras síndromes de câncer associadas com neoplasias gástricas.

Síndromes	Características principais	Mutações associadas a gene
Outras síndromes de câncer que podem gerar câncer gástrico		
Polipose Adenomatosa familiar	Dominância autossômica Penetrância quase completa de câncer precoce colorretal CG é incomum (<2%)	<i>APC</i>
Síndrome de Câncer de ovário e mama hereditário (quando devido mutações BRCA1/2)	Dominância autossômica Polipose do trato gastrointestinal e câncer colorretal CG é pouco frequente	<i>SMAD4</i> <i>BMPRIA</i>
Síndrome LI-Fraumeni	Condição autossômica dominante que causam uma variedade de neoplasias: mama, cérebro, e glândula adrenal e sarcomas CG é precoce e incomum (4,9%)	<i>TP53</i>
Síndrome de Lynch	Condição autossômica dominante com elevada penetrância Câncer colorretal precoce CG incomum (1,6%), predominantemente do tipo intestinal	Reparo incompatível com mutações genéticas
Síndrome Peutz-Jeghers	Dominância autossômica Polipose hamartomatosa gástrica com pigmentação mucocutânea CG é incomum (2-3%)	<i>STK11</i>

Adaptado: COLVIN, et al. 2015.

1.6.2 Câncer Gástrico Difuso Hereditário

O CGDH é uma síndrome autossômica dominante, caracterizada pelo desenvolvimento de câncer gástrico do tipo difuso altamente agressivo (GUILFORD et al. 1998; GAYTHER et al. 1998; GRADY et al. 2000). Entre as formas familiares do CG, o CGDH é o único tipo com causa genética bem estabelecida (BRESCIANI et al. 2003; GUILFORD et al. 2007).

GUILFORD et al. (1998) realizaram o primeiro relato de mutações germinativas no gene *CDH1* em CGDH em famílias da etnia Maori na Nova Zelândia. Aproximadamente, 15 a 50% das famílias afetadas pelo CGDH são identificadas com mutações germinativas no *CDH1*. Em membros individuais de famílias com CGDH que carrega mutações patogênicas no *CDH1*, o risco de desenvolver o CG está em torno de 70% em homens e 56% em mulheres até os 80 anos (HANSFORD et al. 2015).

O CGDH é o mais comum e para tal diagnóstico é necessário obedecer aos seguintes critérios: 1. Ter 2 ou mais casos documentados de câncer gástrico do tipo difuso em familiares de primeiro ou segundo grau, com no mínimo um diagnóstico antes dos 50 anos ou 2. Ter 3

ou mais casos documentados de câncer gástrico do tipo difuso em familiares de primeiro ou segundo grau independente da idade (CALDAS et al. 1999; OLIVEIRA et al. 2002).

Em indivíduos afetados pelo CGDH com mutações patológicas no *CDH1*, a gravidade desta condição está relacionada com uma elevada penetrância de início precoce e agressivo que nem sempre é possível a detecção por vigilância endoscópica. Muitos portadores dessa condição são orientados a submeterem-se a gastrectomia profilática total como um meio de eliminar o risco de desenvolvimento de CG em estágios avançados e incuráveis (LYNCH et al. 2008; FITZGERALD et al. 2010).

1.7 Gene *CDH1*

O gene *CDH1* está localizado no cromossomo 16q22.1 e compreende 16 exóns transcritos em 4.5kb de RNAm (Figura 6). Esse gene codifica a E-caderina, uma proteína de adesão celular que desempenha um papel importante na manutenção da polaridade celular e arquitetura do tecido epitelial (VAN ROY e BERX, 2008).

A E-caderina é uma glicoproteína composta por três domínios estruturais principais: um domínio único transmembranar, conectando com um domínio citoplasmático e um domínio extracelular que compreende cinco domínios *em tandem* - EC1 a EC5 - que são exclusivos de caderinas (TAKEICHI, 2014). A figura 7 identifica as principais estruturas dos domínios extracelulares das caderinas.

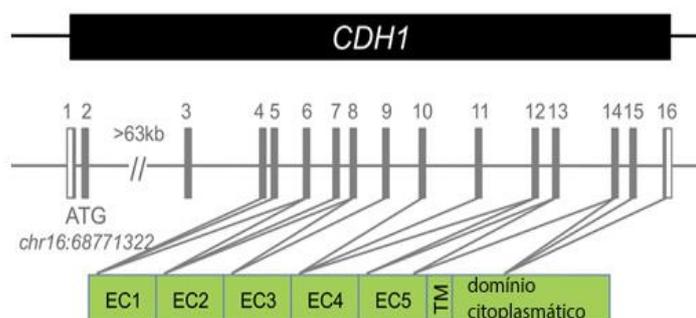


Figura 6: A E-caderina madura está organizada em três domínios estruturais: um domínio extracelular maior composto de cinco repetições caderinas (EC), um segmento único de membrana (TM) e também um domínio citoplasmático curto (Adaptado de PAREDES et al., 2012).

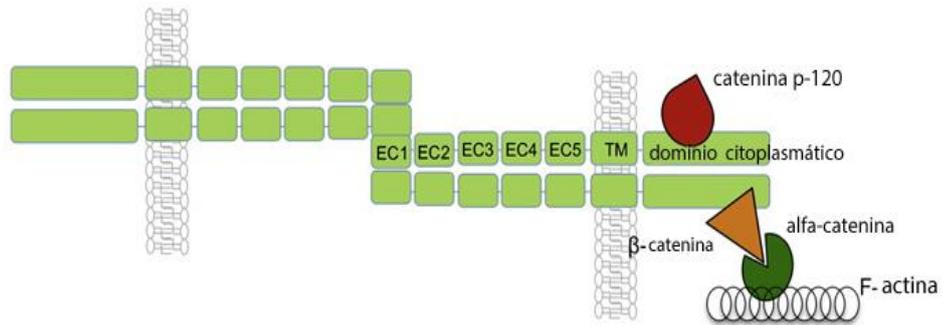


Figura 7: O domínio citoplasmático de caderinas interage com citoesqueleto de actina através de um complexo de proteínas incluindo p-120, beta e alfa cateninas. (Adaptado de PAREDES et al., 2012).

O domínio extracelular de E-caderina é essencial para a adesão célula-célula, assim como para o correto cruzamento e homo/heterodimerização das proteínas. O domínio citoplasmático interage com as cateninas (α -, β - e catenina p120) ancoradas ao citoesqueleto de actina (Figura 7), que estabelece complexo caderina–catenina (Figura 8) (GUMBINER, 2005).

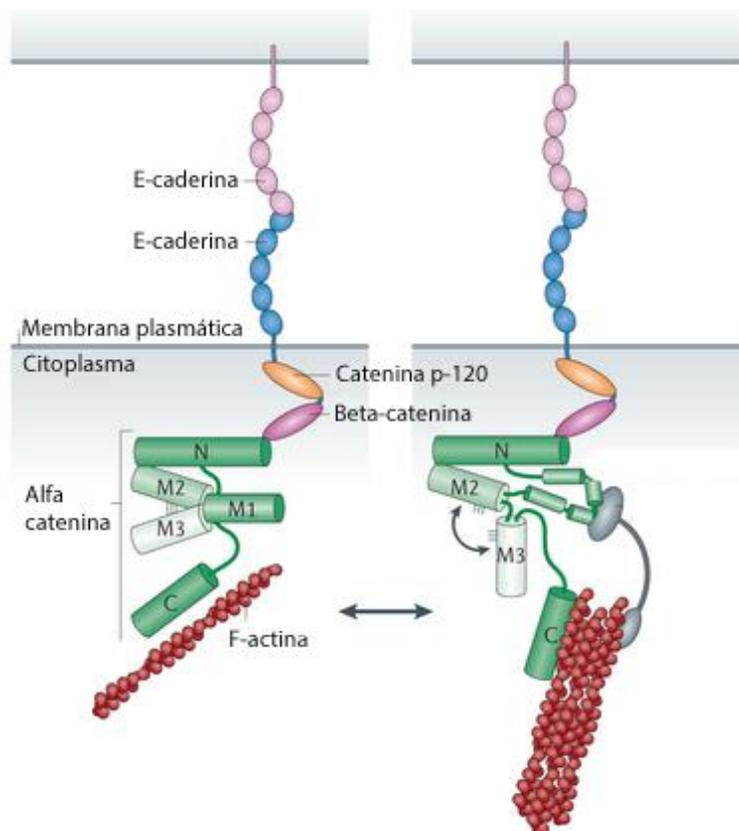


Figura 8: Modelo estrutural do complexo caderina – catenina (Adaptado da TAKEICHI, 2014).

A E-caderina é expressa predominantemente na membrana de células epiteliais, onde exerce a adesão célula-célula e suprime invasão (VAN ROY e BERX, 2008). Sendo o principal componente das junções aderentes, a E-caderina é essencial para contato célula-célula do epitélio gástrico. Consequentemente, diminuição da E-caderina obviamente contribui para disseminação de células do câncer gástrico e adicional progressão tumoral. Estudos demonstraram que a perda da função de E-caderina está presente em ambas as formas de tumorigênese gástrica (esporádicas e hereditárias) (BECKER et al. 1994; GAYTHER et al. 1998; GUILFORD et al. 1998; MACHADO et al. 2000).

A inativação do *CDHI* segue a clássica hipótese de 2 eventos, sendo o primeiro evento a inativação da mutação germinativa (herdada) em um alelo do gene. Assim, ao longo da vida, é necessário apenas o segundo evento de inativação do alelo remanescente para a perda completa da função proteica da E-caderina e progressão da doença neoplásica, como resultado de mutação, metilação na região promotora e perda da heterozigotidade (LOH) (BROOKS-WILSON et al. 2004; CORSO et al. 2007; BARBER et al. 2008; HUMAR et al. 2009; OLIVEIRA et al. 2009).

Evidências crescentes mostram que a região promotora de *CDHI* é frequentemente metilada no CG primário, particularmente no CG pouco diferenciado e difuso (TAMURA, 2006; YAMAMOTO et al. 2011). LEAL et al. (2007) detectaram 98.7% de hipermetilação da região promotora de *CDHI* associada com infecção por *H.pylori* em CG, especialmente do tipo difuso. Adicionalmente, BORGES et al. (2010) sugeriram associação entre amostras de CG com hipermetilação da região promotora do gene *CDHI* com o alelo -160A. Assim, sugere-se que a metilação da região promotora do gene *CDHI* pode funcionar como um evento comum de inativação do gene *CDHI* em CG em casos esporádicos.

A inativação do segundo evento é considerado comum para o gene *CDHI* (GRADY et al. 2000; MACHADO et al. 2001). Além disso, a metilação do *CDHI* está associada com mau prognóstico dos pacientes com câncer gástrico (YU et al. 2012) enfatizando a sua importância clínica potencial.

Mutações no *CDHI* afetam a integridade da proteína, causando assim perturbações na adesão célula-célula em tecidos epiteliais, aumentando a motilidade celular, potencializando o comportamento infiltrativo do tumor e desenvolvimento de metástase (MATEUS et al. 2009; GHAFARI et al. 2010). Mutações germinativas no *CDHI* foram identificadas em CGDH (BECKER et al. 1994; BECKER e HOFLE 1995).

Os tumores de indivíduos portadores de CGDH, que carregam mutações germinativas heterozigotas em *CDHI* (primeiro evento), adquirem inativação completa através de mecanismos de segundo evento. Geralmente, isso ocorre através de hipermetilação do promotor e menos frequentemente através de mutações *CDHI* e perda de heterozigosidade (LOH) (OLIVEIRA et al. 2009). OLIVEIRA et al. (2009) descreveram os diferentes segundos eventos em lesões neoplásicas nos pacientes com CGDH e encontraram que modificações epigenéticas frequentemente são responsáveis pela ocorrência do segundo evento em *CDHI* de tumores primários em CGDH e que a perda da heterozigosidade ocorre nas metástases a distância.

MOREIRA-NUNES et al. (2014) foi o primeiro estudo a avaliar mutações germinativas no gene *CDHI*, o padrão de metilação da região promotora, e a sua expressão protéica em famílias brasileiras com CGDH. Apesar da ausência de expressão da E-caderina observada em todas as famílias, a região promotora do gene *CDHI* não estava metilada e mutações no gene foram observadas somente em 50% (2/4) das famílias avaliadas, sugerindo que outros mecanismos possam estar envolvidos no silenciamento da expressão de E-caderina.

Muitas pesquisas estão voltadas na identificação dos reguladores principais do processo metastático, estas moléculas regulatórias incluem proteínas e microRNAs (miRNAs) (XU et al. 2012). MiRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que funcionam como reguladores negativos da tradução dos RNAm alvo (BARTEL, 2004). MA et al. (2010) revelou que hsa-miR-9 regula negativamente a expressão de CDH1.

No presente estudo, investigamos a possibilidade do hsa-miR-9 ser o mecanismo envolvido na perda de expressão da proteína CDH1 em amostras de CGDH e CG esporádico.

1.8 miRNAs

MiRNAs são uma classe de pequenos RNAs não codificantes (19-25 nucleotídeos de comprimento) que suprimem a expressão gênica pela interação com regiões 3' não traduzidas (UTR) de RNAm alvos de genes envolvidos em muitos processos celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose, exercendo uma enorme influência na patogenia do câncer (MALUMBRES, 2013; TIAN et al. 2014).

MiRNAs são processados de moléculas precursoras (pri-miRNAs), que são ou traduzidas por RNA polimerase II de genes independentes ou representam íntrons de genes

codificadores de proteínas. O pri-miRNAs se dobra e age como um substrato para dois membros da família de enzimas de RNaseIII: Drosha e Dicer. O produto da clivagem da Drosha, um pré-miRNA de ~70 nucleotídeos, é exportado para o citoplasma (devido ação da exportina 5), onde a Dicer o processa em um duplex miRNA/miRNA de ~20pb. Uma fita deste duplex, representando um miRNA maduro, é então incorporado em um complexo miRNA de silenciamento induzido – miRISC (KROL et al. 2010).

Como parte do miRISC, miRNAs pareiam as bases para alcançar RNAs e induzir sua repressão translacional ou deânulação e degradação. Proteínas Argonautas (AGO), que interagem diretamente com miRNAs e proteínas tritofano-glicina de 182kDa (GW182) agem como efetores a jusante na repressão e são fatores chave na montagem e funcionamento do miRISC (KROL et al. 2010).

Em seu papel na maturação de miRNA, Drosha e Dicer são assistidos por um número de cofatores ou proteínas acessórias, com algumas desempenhando uma função regulatória importante. Da mesma forma, a formação de miRISC e a execução de sua atividade envolve muitos fatores adicionais (KROL et al. 2010). A Figura 9 ilustra a biogênese do miRNA.

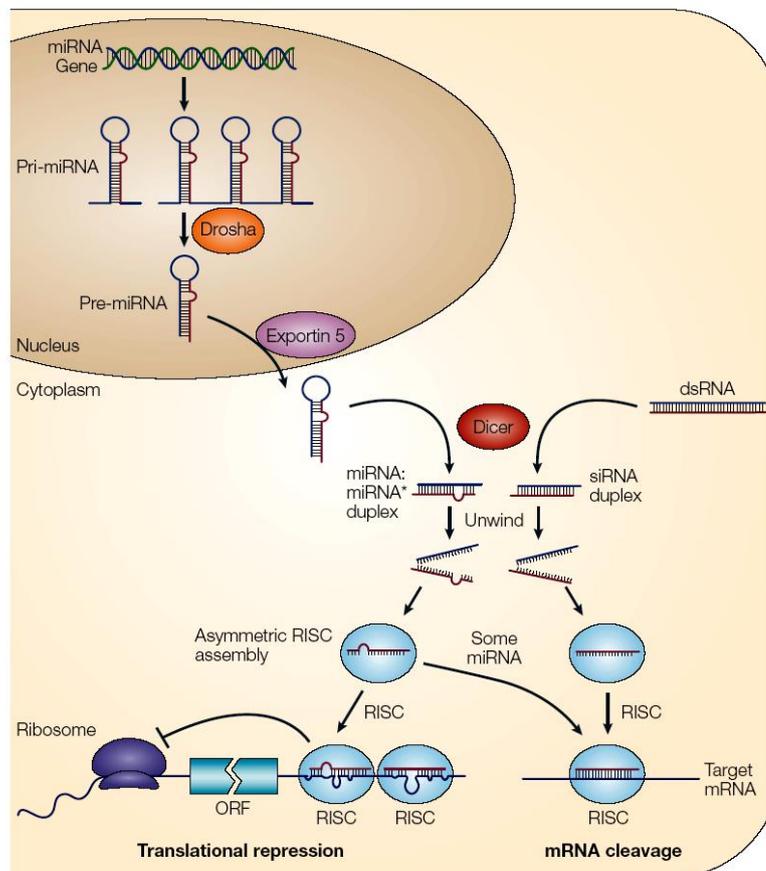


Figura 9: Biogênese de miRNA (AMERES e ZAMORE, 2013).

Em geral, genes de miRNA estão localizados em regiões intergênicas, sugerindo que a maioria dos genes de miRNAs são transcritos como unidades autônomas de transcrição (TONG F. et al. 2014).

O mecanismo básico de transcrição de miRNAs é fundamentalmente similar ao clássico modelo de gene codificadores de proteínas e hipermetilação aberrante de DNA gera silenciamento de tsmiRNAs em neoplasias malignas (KROL et al. 2010).

Muitos mecanismos moleculares levam a desregulação de miRNAs, como mutações genéticas e aberrações epigenéticas. Aproximadamente metade dos genes de miRNAs estão localizados próximos das ilhas CpG e a expressão destes miRNAs são regulados por alterações na metilação do DNA e modificações das histonas (ESTELLER 2007; WEBER et al. 2007; BANDRES et al. 2009; HE et al. 2014).

MiRNAs são altamente implicados na tumorigênese em muitos tipos de câncer (CALIN et al. 2004; TAKAMIZAWA et al. 2004; LU et al 2005; IORIO et al. 2005; VOLINIA et al. 2006; LI et al. 2008; ZHANG et al. 2008; MOTOYAMA et al. 2008). Em CG, um grande número de miRNAs com funções biológicas diferentes encontram-se alterados e correlacionados com características clínico-patológicas e/ou prognósticas (GIGEKE et al. 2012; CALCAGNO et al. 2013; CALCAGNO et al. 2015).

1.8.1 miRNAs e Câncer Gástrico

Em câncer, miRNAs podem funcionar como oncogenes e/ou genes supressores tumorais, dependendo do resultado do RNAm alvo (oncomiRNA or tsmiRNA, respectivamente). Atividade elevada de oncomiRNA leva a proliferação celular e inibição de apoptose. Por outro lado, atividade diminuída de tsmiRNA leva ao aumento da tradução de oncogenes e formação tumoral (RUAN, FANG e OUYANG, 2009).

Ambas expressões elevadas de oncomiRNA e a expressão diminuída de tsmiRNAs desempenham papéis essenciais em CG e muitos estudos na literatura tem identificado um grande número de miRNAs regulados positiva e negativamente em seus alvos em potencial neste tipo de câncer. Logo, a expressão aberrante de miRNAs tem sido significativamente relacionada a condições clínico-patológicas, como estágio do tumor, tamanho, diferenciação, metástase e presença de *H. pylori* (Tabela 5).

Tabela 5: MiRNA desregulados em tumores de câncer gástrico.

miRNA/papel OncomiRNAs	Alvos	Condições clínicopatológicas	Referências
hsa-miR-17	<i>UBE2C</i> <i>FBXO31</i>	Tamanho do tumor, infiltração tumoral, condição clínica e prognóstico Estádio do tumor	Zhang et al., 2014 Zhang et al., 2015 Park et al., 2014 Chen et al., 2015
hsa-miR-19a	<i>MXD1</i> <i>SOCS1</i> <i>PTEN</i>	Migração, invasão e metástase Proliferação e tumorigênese Multidroga Resistente	Wu et al., 2014 Qin et al., 2013 Wang et al., 2013 Guo et al., 2009
hsa-miR-20a	<i>EGR2</i> <i>E2F1</i>	Sobrevida total Sobrevida livre de doença Autorrenovação e proliferação de células tronco de CG Quimioresistência de células de câncer gástrico a cisplatina e docetaxel	Wang et al., 2013 Li et al., 2013 Wu et al., 2013
hsa-miR-21	<i>PTEN</i> <i>PDCD4</i> <i>RECK</i> <i>SERPINI1</i>	Diferenciação Metástase em linfonodo Infecção por <i>H. pylori</i> Estádio Tumoral Tamanho do Tumor	Zhang et al., 2008 Motoyama et al., 2010 Zhang et al., 2012 Yamanaka et al., 2012 Cao et al., 2012 Xu et al., 2012 Wang et al., 2013
hsa-miR-25	<i>FBXW7</i> <i>TOB1</i> <i>RECK</i>	Proliferação, invasão, migração e metástase Fenótipo agressivo Sobrevida ruim a longo prazo	Kim et al., 2013 Zhao et al., 2014 Gong et al., 2015 Li et al., 2015
hsa-miR-27a	<i>PHB</i> <i>ZBTB10</i> <i>HOXA10</i> <i>CCND1</i>	Infecção por <i>H. pylori</i> Proliferação Resistência a drogas	Liu et al., 2009 Sun et al., 2010 Zhao et al., 2011
hsa-miR-106a	<i>TIMP2</i> <i>PTEN</i> <i>FAS</i> <i>RUNX3</i>	Gravidade da invasão tumoral Diferenciação Metástase a distância Linfonodo e metástase tumoral Estádio Tumoral Tamanho do Tumor	Xiao et al., 2009 Tsujiura et al., 2010 Fang et al., 2013 Wang et al., 2013 Zhang et al., 2013 Zhu et al., 2014
hsa-miR-106b	<i>P21</i> <i>E2F5</i> <i>E2F1</i>	Metástase em linfonodo Gravidade da infiltração	Petrocca et al., 2008 Kim et al., 2009 Tsujiura et al., 2010 Tchernitsa et al. 2010 Wang et al., 2013 Yao et al., 2013
hsa-miR-200b	<i>ZEB1</i> <i>ZEB2</i> <i>SUZ12</i> <i>DNMT3A</i> <i>DNMT3B</i> <i>SPI</i> <i>WNT-1</i>	Tipo difuso Sobrevida geral pobre Infecção por <i>H. pylori</i> Metástase Tamanho tumoral	Kurashige et al, 2012 Song et al., 2013 Tang et al., 2013 Tang et al., 2013
hsa-miR-215	<i>RB1</i> <i>RUNX1</i>	Estádio do Tumor	Deng et al., 2014 Xu et al., 2015 Lin et al., 2015

hsa-miR-222	<i>PTEN</i> <i>RECK</i>	Sobrevida menor livre de metástase Proliferação	Chun-Zhi et al., 2010 Li et al., 2012 Kim et al., 2013 Wang et al., 2014
tsmiRNAs			
let-7a	<i>RAB40C</i> <i>CDKN1 SPHK2</i> <i>FNI</i>	Diferenciação Linfonodo metástase Parada do ciclo celular Supressão de crescimento Sobrevida geral Sobrevida livre de doença	Zhu et al., 2010 Zhu et al., 2011 Yang et al., 2011 Li et al., 2011 Zhu et al., 2012 Golestaneh et al., 2012
hsa-miR-9	<i>cyclin D1 Ets1</i> <i>CDX2</i> <i>GRB2</i> <i>NF-kappaB1</i> <i>RAB34</i>	Proliferação, invasão e metástase	Luo et al., 2009 Wan et al., 2010 Rotkrua et al., 2011 Zheng et al., 2013
hsa-miR-143	<i>COX-2</i>	Profundidade da invasão Metástase Hematogênea Metástase em linfonodo Estadio do Tumor	Tagaki et al., 2009 Li et al., 2011 Wu et al., 2011 Guo et al., 2013 Wu et al., 2013
hsa-miR-148a	<i>ROCK1</i> <i>MMP7</i> <i>p27</i> <i>DNMT1</i> <i>SMAD4</i>	Estado clínico Metástase em linfonodo Desfecho clínico ruim Transição epitélio-mesenquimal	Zheng et al., 2013 Sakamoto et al., 2013 Wang et al., 2013 Xia et al., 2014 Yan et al., 2014
hsa-miR-200c	<i>RhoE</i> <i>DNMT3A</i> <i>DNMT3B</i> <i>SPI</i>	Metástase em linfonodo Sobrevida geral ruim Sensibilidade de quimioterapia a cisplatina Estado clínico T estadio	Song et al., 2013 Tang et al., 2013 Liu et al., 2013 Chang et al., 2014
hsa-miR-204	<i>SIRT1</i> <i>BCL-2</i> <i>Ezrin</i>	Transição epitélio-mesenquimal Resistência Anoikis Migração e invasão Habilidade de formação de colônia	Lam et al., 2011 Sacconi et al., 2012 Zhang et al., 2013
hsa-miR-218	<i>VOPPI</i> <i>ROBO1</i>	Proliferação e migração Metástase	Tie et al., 2010 Gao et al., 2010 Gao et al., 2010 Gao et al., 2014
hsa-miR-433	<i>RAB34</i> <i>KRAS</i>	Estadio do Tumor Sobrevida geral Proliferação, migração e invasão	Luo et al., 2009 Ueda et al., 2010 Guo et al., 2013
Controverso			
hsa-miR-107	<i>FOXO1</i> <i>DICER1</i> <i>CDK6</i>	Profundidade da invasão tumoral Diferenciação Metástase em linfonodo Tamanho do tumor Estadio tumoral e Sobrevivência geral	Li et al., 2011 Feng et al. 2012 Inoue et al., 2012 Li et al., 2013
hsa-miR-146a	<i>EGFR</i> <i>IRAK1</i> <i>LICAM</i>	Tamanho do tumor Diferenciação pobre pN estado	Kogo et al., 2011 Hou et al. 2012 Hou et al., 2012

	<i>CARD10</i>	Metástase em linfonodo	Crone et al., 2012
	<i>COPS8</i>	Invasão venosa	Xiao et al., 2012
	<i>NASF2</i>	Tempo sobrevida geral	Yao et al., 2013
	<i>SMAD4</i>	Apoptose	
	<i>WASF2</i>		
hsa-miR-155	<i>SMAD2</i>	Profundidade da invasão tumoral	Xiao et al., 2009
	<i>CDC73</i>	Metástase em linfonodo	Liu et al., 2010
		Infecção por <i>H. pylori</i>	Li et al. 2012
		Viabilidade celular	Kim et al., 2013
		Apoptose	Rather et al., 2013
hsa-miR-181b	<i>CREB1</i>	Proliferação, migração e invasão	Zhu et al., 2010
	<i>BCL2</i>	Formação de colônia	Jiang et al., 2011
		Apoptose	Guo et al., 2012
		Multidroga resistência	Chen et al., 2012
hsa-miR-223	<i>EPB4IL3</i>	Sobrevida ruim livre de metástase	Li et al., 2011
	<i>STMN1</i>	Apoptose	Kang et al., 2012
	<i>FBXW7</i>	Proliferação e invasão	Li et al., 2012
	<i>HMG2A</i>	Prognóstico clínico ruim	

Em CG, estudos tem apontado consistentemente a atividade oncogênica do hsa-miR106a pela supressão da expressão de genes *TIMP2*, *PTEN*, *FAS* e *RUNX3* (XIAO et al. 2009; TSUJIURA et al. 2010; FANG et al. 2013; WANG et al. 2013; ZHANG et al. 2013; ZHU et al. 2014). ZHU et al. (2014) demonstraram que hsa-miR-106a é frequentemente regulado positivamente em CG e está associado com a invasão local do tumor e a distância pela regulação direta do seu alvo funcional *TIMP2*.

Por outro lado, let-7a é um dos mais importantes tsmiRNAs que estão envolvidos na carcinogênese gástrica e estudos na literatura tem apontado *RAB40C*, *CDKN1*, *SPHK2* e *FNI* como seus alvos (ZHU et al. 2010; ZHU et al. 2011; YANG et al. 2011; ZHU et al. 2012; GOLESTANEH et al. 2012). YANG et al. (2011) mostrou que o tecido tumoral de pacientes de CG e linhagens celulares de CG com níveis menores de let-7a tendem a ter menor diferenciação.

Vários estudos mostram miRNAs com um papel controverso na carcinogênese gástrica, como hsa-miR-107 e hsa-miR-181b. Por exemplo, GUO et al. (2012) estabeleceram que a proliferação, migração e invasão de células de CG aumentam significativamente após transfecção de hsa-miR-181b, provavelmente devido a regulação negativa de *TIMP3*. Diferentemente, CHEN et al. (2012) observaram que a expressão positiva de hsa-miR-181b suprimia a proliferação e taxa de formação de colônias de células de CG, sugerindo que hsa-miR-181b pode funcionar como um supressor de tumoral em células de adenocarcinoma gástrico através da regulação negativa do gene *CREB1*.

O papel duplo deste e de outros miRNAs explica-se já que um único miRNA possui a capacidade de ter múltiplos genes alvo, reprimindo a produção de centenas de proteínas,

direta ou indiretamente. Adicionalmente, cada gene pode ser regulado por múltiplos miRNAs, para que o efeito final dependesse destas interações complexas (BAEK et al. 2008; SELBACH et al. 2008).

Além disso, muitos miRNAs estão regulados negativamente devido a hipermetilação de ilhas CpG em CG, como hsa-miR-9, hsa-miR-34b/c, hsa-miR-129, hsa-miR-137, hsa-miR-181c, hsa-miR-199a, hsa-miR-212, hsa-miR-338, hsa-miR-512, hsa-miR-516, hsa-miR-941 e hsa-miR-1247 (STEPONAITIENE et al. 2015).

1.8.2 hsa-miR-9

Em humanos, existem três *loci* gênicos independentes do hsa-miR-9: hsa-miR9-1, hsa-miR9-2 e hsa-miR9-3 (localizados nos cromossomos um, cinco e quinze respectivamente). De acordo com as definições da hsa-miRbase, estes 3 *loci* codificam as mesmas sequências de hsa-miR9 maduro. Os três transcritos pri-hsa-miR-9 estão todos localizados dentro de transcritos não-codificantes (TSAI et al. 2011). A figura 10 ilustra os 3 *loci* do pré-hsa-miR-9 ainda com *hairpin*.

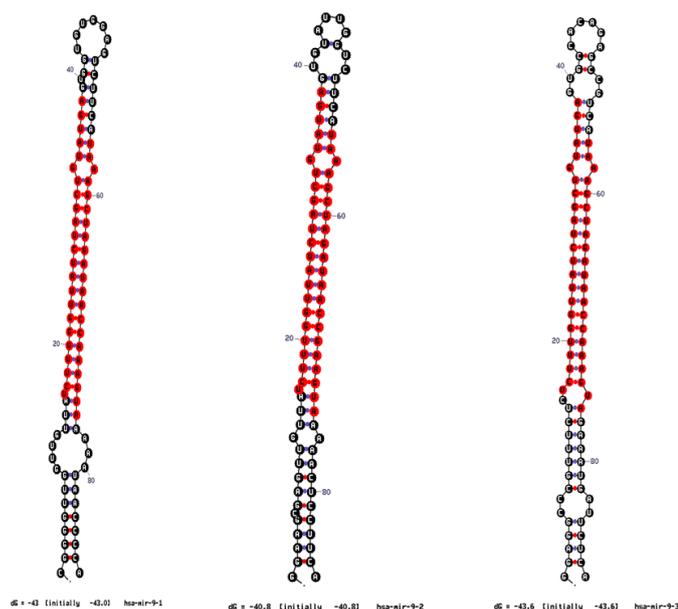


Figura 10: Ilustração dos três *loci* de pré-hsa-miR-9 (MIRTARBASE, 2016).

Estudos relataram alterações nos níveis de hsa-miR-9 associados com diferentes doenças, incluindo câncer de mama, câncer de ovário, carcinomas de células renais e CG (LUO et al. 2009; GUO et al. 2009; HILDEBRANDT et al. 2010; SELCUKLU et al. 2012;

DENG et al., 2016). A tabela 6 sumariza alguns alvos de hsa-miR-9 descritos em diferentes tipos de câncer.

Tabela 6: Alvos de hsa-miR-9 em diferentes tipos de câncer.

Alvo	Descrição	Evidências			Tipo de câncer	Referências
		ER	WB	qPCR		
<i>CUL4A</i>	<i>Cullin 4^a</i>	✓	✓	✓	Gástrico	Deng et al. 2016
<i>CDH1</i>	<i>cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i>	✓	✓		Hepatocelular Mama	Drakaki et al. 2015 Ma et al. 2010
<i>BCL6</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 6</i>	✓			Linfoma de Burkitt	Dai et al. 2013
<i>ETS1</i>	<i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)</i>	✓			Gástrico Linfoma de Hodgking	Zheng et al. 2013 Zhou et al. 2013
<i>RAB34</i>	<i>RAB34, member RAS oncogene family</i>	✓	✓	✓	Gástrico Ovário	Luo et al. 2009 Li et al. 2013
<i>ONECUT2</i>	<i>one cut homeobox 2</i>	✓	✓	✓	Hepatocelular	Zhang et al 2015
<i>CDX2</i>	<i>caudal type homeobox 2</i>	✓	✓		Gástrico	Rotkrua et al. 2012
<i>AP3B1</i>	<i>adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit</i>	✓	✓	✓	Mama	Selcuklu et al. 2012
<i>CCNG1</i>	<i>cyclin G1</i>	✓	✓	✓	Ovário Mama	Li et al. 2015 Selcuklu et al. 2012
<i>CCND1</i>	<i>cyclin D1</i>	✓			Tireóide	Cong et al. 2015

ER: Ensaio repórter; WB: Western-Blot; qPCR: PCR em tempo real.

Em CG, LUO et al. (2009) concluíram que os níveis de hsa-miR-9 estavam reduzidos nas amostras de tumores em relação ao tecido não-neoplásico. ZHENG et al. (2013), além de observarem níveis reduzidos de hsa-miR-9, concluíram que esse miRNA suprime a expressão de ciclina D1 e ETS1, inibindo a proliferação, invasão e metástase em CG. Assim, esses dois estudos sugerem um papel de supressor tumoral para o hsa-miR-9.

Por outro lado, ROTKUA et al. (2012) concluíram que hsa-miR-9 estava expresso positivamente nas amostras de CG e poderia estar envolvido na carcinogênese gástrica através da regulação negativa de da proteína CDX2, resultando na perda da manutenção de diferenciação e promoção do crescimento celular. Desta forma, sugerindo um papel de oncomiR para o hsa-miR-9.

Esses dados conflitantes da expressão de miR-9 (aumento e diminuição da expressão) podem estar relacionados ao processamento diferencial do miR-9 maduro a partir de 3 precursores primários diferentes, onde regulações negativas de miR-9 devido hipermetilações aberrantes de qualquer um dos miR-9-1, miR-9-2 e miR-9-3 em regiões precursoras tem sido

reportado em estudos independentes em diferentes tipos de câncer (HILDEBRANDT et al. 2010; TRANKENSCHUH et al. 2010).

A alteração da expressão de hsa-miR-9 pode estar relacionada ao processamento diferencial do hsa-miR-9 maduro a partir de três precursores primários diferentes, onde regulações negativas de hsa-miR-9 devido hipermetilações aberrantes de qualquer um dos hsa-miR9-1, hsa-miR9-2 e hsa-miR9-3 em regiões precursoras tem sido reportado em estudos independentes em diferentes tipos de câncer (LUJAMBIO et al. 2008; HILDEBRANDT et al. 2010; TRANKENSCHUH et al. 2010;).

Alguns estudos demonstraram uma elevada frequência de hipermetilação em ilhas CpG nos genes hsa-miR9-1 e hsa-miR9-3 resultam na regulação negativa de hsa-miR-9 em neoplasias humanas, incluindo câncer de mama, colorretal, renal e CG (BANDRES et al. 2009; HSU et al. 2009; HILDEBRANDT et al. 2010; WAN et al. 2010; TSAI et al. 2011; Li et al. 2014). Significativamente, em neoplasias humanas, a expressão de níveis de hsa-miR-9 ou estado de metilação estão associados com condições clínicas patológicas, como grau do tumor, metástase e taxa de sobrevida (LUO et al. 2009; BANDRES et al. 2009; LANEVE et al. 2010).

TSAI et al. (2011) reportaram que os três *loci* gênicos de hsa-miR-9 podem estar silenciados devido hipermetilação do DNA em neoplasias gástricas. Além disso, esses autores observaram que a hipermetilação de ilhas CpG de pri-hsa-miR-9-3 foi significativamente associada com pior desfecho clínico de pacientes com CG, o que subentende que o hsa-miR-9 desempenha uma função de supressor tumoral em CG.

Estudos similares apontam que hsa-miR-9 atua com um papel supressor tumoral via repressão de genes associados ao tumor (*NFkB1*, *RAB34*, *ALCAM*) em CG (LUO et al. 2009; WAN et al. 2010; YE et al. 2015).

O hsa-miR-9 é considerado um regulador negativo do *CDH1*, dito como pró-metastático (MA et al. 2010). O hsa-miR-9 pode suprimir a expressão de E-caderina, gerando promoção da motilidade e invasão de células neoplásicas e, em adição, causando a ativação de β -catenina. O último, por sua vez, contribui para elevar a expressão de *VEGFA*, levando a indução de angiogênese associada do tumor. Em última análise, ambos aumentam a motilidade e invasão celular, assim como propicia angiogênese, podendo também contribuir para formação metastática. Sendo a regulação negativa da E-caderina e ativação da β -catenina necessárias, mas não suficientes na mediação da regulação positiva de hsa-miR-9 dependente de VEGF, outros alvos de hsa-miR-9 podem atuar permitindo a indução de fator VEGF.

Até o momento, nenhum estudo correlacionou a expressão de hsa-miR-9 com a regulação negativa de CDH1 em CG.

Adicionalmente, é importante ressaltar a transcrição de hsa-miR-9-3 está regulada positivamente pelo fator de transcrição *MYC* (MA et al. 2010). Esse fator de transcrição se mostra bem estabelecido na regulação direta da expressão de diversos grupos de miRNAs (ex. oncomiR hsa-miR-17-92), que contribuem de uma forma ou outra para tumorigênese (CHANG et al. 2008; TU et al. 2015).

A proteína *MYC* funciona como um regulador importante do metabolismo e proliferação celular, já que é ativado por uma série de vias oncogênicas e assim estimula várias mudanças metabólicas que resultam em transformação maligna. Sob circunstâncias normais, *MYC* é dependente de estimulação mitogênica para sua expressão e funcionamento (MILLER et al. 2012). *MYC* também é essencial para manter a pluripotência e a capacidade de autorenovação de células-tronco embrionárias (KHALILI et al. 2015; WIESE et al. 2015).

Em neoplasias humanas, o aumento da expressão de *MYC* é atribuído principalmente à amplificação gênica e às translocações cromossômicas (MCLEAN e EL-OMAR, 2014; TANSEY, 2014) e a sua desregulação é capaz de afetar praticamente todas as características principais das neoplasias (TAO et al. 2014).

O gene que codifica a proteína *MYC* encontra-se na região cromossômica 8q24.1, e é considerado crucial para carcinogênese gástrica (CALCAGNO et al. 2005. CALCAGNO et al. 2006; CALCAGNO et al. 2008; COSTA-RAIOL et al. 2008; CALCAGNO et al. 2009; CALCAGNO et al. 2013; DE SOUZA et al. 2013). Anteriormente, nosso grupo de pesquisa demonstrou uma associação entre o aumento de expressão do RNAm de *MYC* com invasão e metástase em adenocarcinoma gástrico (CALCAGNO et al. 2013). Assim, o fator transcrição *MYC* poderia influenciar a expressão de hsa-miR-9, o qual regularia negativamente a expressão de CDH1.

No presente estudo, investigaremos a possibilidade do hsa-miR-9 ser o mecanismo envolvido na perda de expressão da proteína CDH1 em amostras de CGDH e CG esporádico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Elucidar a expressão do hsa-miR-9 na regulação negativa de CDH1 em amostras CGDH e CG esporádico.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão de hsa-miR-9 em amostras de CGDH e CG esporádico;
- Quantificar o número de cópias de *MYC* e *CDH1* em amostras de CGDH;
- Realizar a quantificação relativa da expressão de RNAm de *CDH1* em amostras de CG esporádico;
- Analisar a expressão da proteína CDH1 em amostras de CG esporádico;
- Correlacionar os resultados encontrados e avaliar a existência de associação dos mesmos com localização tumoral, presença de *H. pylori* e EBV, estadios e tipo histológico dos adenocarcinomas gástricos estudados.

Todos os indivíduos analisados assinaram termos de consentimento aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB) sob o protocolo 274/12.

3.1.2 Pacientes com CG esporádico

Foram coletadas 138 amostras pareadas de tecido gástrico neoplásico e não neoplásico de 138 pacientes com adenocarcinoma gástrico primário submetidos à gastrectomia no Hospital João de Barros Barreto (HUIBB) para a validação. Todas as amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido até a extração de RNA.

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

A análise histopatológica dos fragmentos tumorais foi realizada pelo Serviço de Anatomia Patológica do HUIBB. As amostras de adenocarcinoma foram submetidas à classificação de LAURÉN (1965) e o estadiamento tumoral seguiu o critério pTNM, de acordo com AJCC (UICC, 2013).

3.2 Quantificação da expressão

3.2.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído com solução de reagente ® TRI (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e concentração de RNA serão determinados utilizando um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e gel de agarose 1%.

3.2.2 Quantificação relativa da expressão de *CDHI*

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando um Kit *High capacity* (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Em tempo real, primers qPCR e sondas TaqMan direcionamento *CDHI* (Hs01023894_m1) foram adquiridos como produtos de ensaios inventoriados para expressão gênica (Life Technologies, Foster City, CA, EUA). qPCR em tempo real foi realizada usando um sistema ABI Prism 7500 (Life Technologies, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

GAPDH e *B2M* (NM_002046.3; NM_004048.2, Life Technology, EUA) foram selecionados como um controle interno para monitorar a entrada de RNA e eficiência de transcrição reversa (WISNIESKI et al. 2013). Todas as reações em qPCR tempo real para genes-alvo e de controles internos foram realizadas em triplicata na mesma placa. A quantificação relativa (RQ) da expressão do gene foi calculada usando o método de $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), em que a amostra não-neoplásicos foi designada como um calibrador para cada amostra de tumor emparelhados.

3.2.3 Quantificação relativa da expressão de hsa-miR-9

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit TaqMan Small RNA Assays (Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA), conforme orientação do fabricante. Logo em seguida o cDNA obtido foi armazenado a -20°C .

Posteriormente, os cDNAs obtidos foram misturados em placas de 96 poços com 7,5 μl de 1x TaqMan Universal PCR Master Mix II (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 0,5 μl de TaqMan® Advanced miRNA Assays para o hsa-miR-9 (478214_mir) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), seguindo instruções do fabricante. O ensaio SNORD7 (Hs03298738_s1) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foi selecionado como controle interno para monitorar a entrada de RNA e eficiência de transcrição reversa.

3.3 Western-blot

A proteína das amostras de CG esporádico foi extraída com o tampão RIPA (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) e quantificadas usando o reagente Bradford (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) seguindo instruções do fabricante. Para a separação das proteínas, será utilizado SDS-PAGE 10%, a corrida foi feita em sistema Bio-Rad (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA) por aproximadamente 2 horas submetidas a uma voltagem de 110V.

A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foram feitas pelo sistema *Trans-Blot® Turbo Transfer System* (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA) por 30 minutos, com voltagem de 25V. Posteriormente, o bloqueio da membrana foi realizado em tampão TBST 1x (Tris-HCl, pH 7.6, Tween 20 0.1%; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO,

EUA) com 5% de leite desnatado por 1 hora à temperatura ambiente e, então, a membrana foi lavada por imersão e agitação com TBST 1x.

Logo após a lavagem, as membranas foram incubadas com o respectivo anticorpo primário diluído em TBST 1x com 5% de BSA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). A incubação com anticorpo de rato monoclonal de E-caderina HECD-1 (diluição 10µg/mL; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) foi realizada *overnight* sob agitação e então a membrana foi lavada 3 vezes com TBST 1x por 10 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1 hora e a membrana foi revelada pelo método de quimioluminescência ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido).

A detecção do sinal quimioluminescente foi realizada no sistema de fotodocumentação e posteriormente as bandas marcadas foram analisadas e quantificadas utilizando o software *Image J*, obtendo o índice de densidade óptica de cada anticorpo utilizado. A normalização foi realizada utilizando os endógenos β -actina BA3R (diluição 1:5.000; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA).

3.4 Variação de número de cópia

DNA foi extraído utilizando um mini kit DNAQiap (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizado PCR quantitativo em tempo real Duplex (qPCR em tempo real) utilizando sonda TaqMan FAM/MGB para o gene *MYC* (Hs01764918_cn), e a sonda TaqMan VIC/TAMRA para RNase P (#4403326) (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) foi usado para o controle interno da reação. Todas as reações de qPCR em tempo real foram realizadas em quadruplicatas com gDNA de acordo com o protocolo do fabricante, usando um sistema de PCR em tempo real 7500 (Life Technologies, Foster City, CA, EUA). O número de cópia de cada amostra foi estimado por análise CNV usando Software Copy Caller v 1.0 (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) e conhecido DNA genômico humano (Promega, Madison, EUA) foi usado para calibração.

3.5 Análise Estatística

Primeiramente, os resultados foram avaliados quanto a sua distribuição pelo teste estatístico Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados.

Se os dados estiverem em normalidade se utiliza o teste paramétrico t-Student, tanto para comparação dos valores de expressão entre tecido gástrico tumoral e não tumoral adjacente assim como o tecido sem câncer, quanto para a associação dos valores de expressão com as características clinicopatológicas. Além disso, os dados serão apresentados em média±desvio padrão.

Caso os dados não estejam em normalidade se utiliza o teste não paramétrico Mann Whitney, tanto para comparação dos valores de expressão entre tecido gástrico tumoral e não tumoral adjacente, quanto para a associação dos valores de expressão com as características clinicopatológicas. Assim, os dados serão apresentados em mediana±intervalo interquartilício.

Diferenças estatísticas significantes serão consideradas quando $P < 0,05$.

Para análise de correlação foi utilizado o teste de correlação de Pearson ou Spearman, dependendo da normalidade dos dados. A correlação foi classificada como: fraca quando $r < 0,40$, moderada quando $0,40 < r < 0,59$, forte quando $0,60 < r < 0,79$ e muito forte quando $r > 0,8$.

4 RESULTADOS

4.1 Câncer gástrico difuso hereditário

Na análise de famílias portadoras de CGDH foi observado aumento da expressão de hsa-miR-9 nas amostras tumorais estudadas ($1,78 \pm 0,50$; mediana \pm desvio interquartílico) em relação as amostras não neoplásicas de pacientes sem câncer. A diferença de expressão de hsa-miR-9 entre as famílias portadoras da mutação germinativa em *CDHI* ($1,55 \pm 0,02$) e sem a mutação deste gene ($2,15 \pm 0,17$) não foi estatisticamente significativa ($p=0,0706$) (Figura 11).

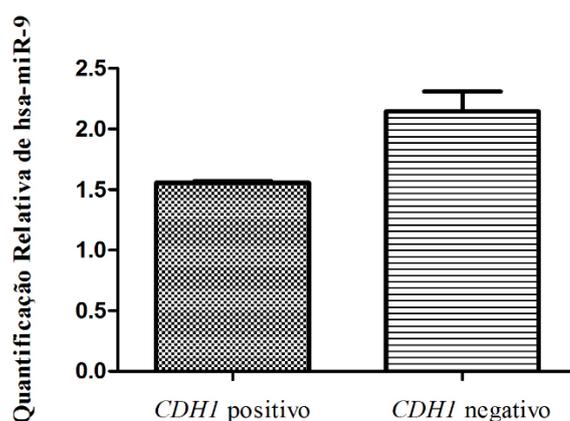


Figura 12: Expressão de hsa-miR-9 em famílias portadoras de CGDH com e sem mutações germinativas no *CDHI*.

Foi observado aumento do número de cópias do gene *MYC* (≥ 3 cópias) nas 9 amostras de CGDH analisadas.

4.2 Câncer gástrico esporádico

As amostras de adenocarcinoma gástrico apresentaram redução da expressão de RNAm de *CDHI* ($0,755 \pm 0,608$; mediana \pm desvio interquartílico), proteína CDH1 ($0,770 \pm 0,532$) e hsa-miR-9 ($0,475 \pm 0,358$) quando comparadas com as amostras de tecido gástrico sem câncer.

A análise de associação da expressão de RNAm de *CDHI*, proteína CDH1, e hsa-miR-9 com os dados clínico-patológicos dos pacientes podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7: Comparação dos valores de RQ de CDH1 e hsa-miR-9 com os dados clínico-patológicos dos pacientes com câncer gástrico.

Características Clínico- patológicas	RNA_m CDH1	p	WB CDH1	P	hsa-miR-9	p
Idade						
<45 anos	0,84±0,58	0,205	0,99±0,49	0,059	0,57±0,35	0,249
≥45 anos	0,67±0,61		0,72±0,74		0,45±0,36	
Gênero						
Masculino	0,75±0,58	0,921	0,78±0,50	0,835	0,45±0,35	0,912
Feminino	0,76±0,64		0,77±0,56		0,49±0,36	
Local						
Cárdia	0,85±0,63	0,097	0,76±0,59	0,850	0,53±0,34	0,651
Não Cárdia	0,66±0,52		0,77±0,51		0,45±0,37	
H.pylori						
Positivo	0,77±0,61	0,949	0,79±0,54	0,927	0,49±0,36	0,994
Negativo	0,61±0,37		0,71±0,17		0,38±0,35	
CagA						
Positivo	0,67±0,62	0,697	0,71±0,51	0,176	0,43±0,36	0,398
Negativo	0,77±0,59		0,79±0,52		0,54±0,35	
EBV						
Positivo	0,76±0,62	0,464	0,79±0,54	0,334	0,49±0,36	0,726
Negativo	0,67±0,41		0,67±0,27		0,38±0,41	
Histopatológico^a						
Intestinal	0,78±0,59	0,228	0,82±0,51	0,010*	0,56±0,35	0,087
Difuso	0,64±0,55		0,70±0,50		0,42±0,37	
Invasão^b						
pT1	1,12±0,4	0,006*	1,05±0,26	0,017*	0,60±0,29	0,317
pT2-pT4	0,69±0,54		0,73±0,53		0,45±0,36	
Metástase em Linfonodos^b						
pN0	1,18±0,16	0,000*	1,09±0,36	0,001*	1,63±0,17	0,005*
pN1-N3	0,65±0,51		0,72±0,53		0,43±0,36	
Estádio^b						
I-II	1,12±0,26	0,000*	1,07±0,23	0,000*	0,65±0,17	0,000*
III-IV	0,54±0,33		0,61±0,34		0,36±0,33	

Na análise de amostras independentes, foi encontrada uma associação da redução da expressão da proteína CDH1 em amostras de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso ($p=0,010$). A redução da expressão de RNA_m de *CDH1* e da proteína CDH1 foi associada com tumores avançados (pT2-T4) ($p=0,006$; $p=0,017$, respectivamente). Além disso, a redução da expressão de RNA_m de *CDH1*, proteína CDH1 e hsa-miR-9 foi associado com a presença de metástase em linfonodos ($p=0,000$; $p=0,001$; $p=0,005$, respectivamente) e com o estadiamento III-IV do tumor ($p=0,000$).

Adicionalmente, foi realizada a análise de correlação de Spearman da expressão do RNA_m de *CDH1*, proteína CDH1 e hsa-miR-9 (Quadro1).

Tabela 8: Correlação da expressão de RNAm de *CDH1*, proteína CDH1 e hsa-miR-9

	RNAm <i>CDH1</i>	WB CDH1	hsa-miR-9
<i>RNAm CDH1</i>			
Coeficiente de correlação	1,000	0,810	0,708
Sig.		< 0,001	< 0,001
<i>WB CDH1</i>			
Coeficiente de correlação	0,810	1,000	0,657
Sig.	< 0,001		< 0,001
<i>hsa-miR-9</i>			
Coeficiente de correlação	0,708	0,657	1,000
Sig.	< 0,001	< 0,001	

Na análise de correlação, foi identificado uma correlação muito forte entre a expressão do RNAm e proteica de CDH1, e uma correlação forte entre a expressão de RNAm de CDH1 e hsa-miR-9, e a expressão proteica de CDH1 e hsa-miR-9.

5 DISCUSSÃO

Moléculas de adesão desempenham um papel crucial na integridade e tumorigênese tecidual, e podem representar o gatilho para o início do desenvolvimento de malignidade (HOY et al. 2010; MURAKAMI et al. 2013; SCHILDBERG et al. 2014).

Particularmente, o gene *CDH1* codifica uma proteína de adesão intercelular que atua como supressor tumoral e desempenha um papel importante na manutenção da arquitetura do tecido epitelial. Mutações nesse gene afetam a integridade desta proteína aumentando a motilidade celular e favorecem o comportamento infiltrativo do tumor propiciando o desenvolvimento de metástases (MATEUS et al. 2009; GHAFARI et al. 2010).

Estudos têm identificando os miRNAs como importantes na regulação de processos metastáticos em diferentes tipos de câncer, incluindo o CG (XU et al. 2012. GIGEK et al. 2012; CALCAGNO et al. 2015). Evidências demonstram que o hsa-miR-9 participa da regulação negativa de CDH1 em câncer de mama e carcinoma hepatocelular (MA et al. 2010; DRAKAKI et al. 2015). Em humanos, existem três *loci* gênicos independentes do hsa-miR-9: hsa-miR9-1, hsa-miR9-2 e hsa-miR9-3 que codificam as mesmas sequências de hsa-miR-9 maduro (TSAI et al. 2011).

O presente estudo é o primeiro a tentar elucidar a influência do hsa-miR-9 na regulação negativa de CDH1 em amostras de CGDH e CG de manifestação esporádica.

Entre as formas familiares de CG, a síndrome do CGDH é a única com uma causa genética bem definida e está relacionada ao gene *CDH1* em 15-50% das famílias afetadas (COLVIN et al. 2015). MOREIRA-NUNES et al. (2014) foi o primeiro estudo a avaliar mutações germinativas no gene *CDH1* em famílias brasileiras portadoras da síndrome do CGDH. Esses autores observaram mutações no gene em apenas 50% (2/4) das famílias estudadas, e não observaram hipermetilação na região promotora do gene *CDH1* em todas as amostras analisadas. Assim, sugerindo que outros mecanismos possam estar relacionados no silenciamento da expressão de CDH1.

Nesta dissertação foi analisado a expressão de hsa-miR-9 nas quatro famílias estudadas por MOREIRA-NUNES et al. (2014) na tentativa de elucidar o papel desse miRNA no CGDH. Foi observado aumento da expressão de hsa-miR-9 nas amostras de CGDH estudadas ($1,78 \pm 0,50$) em relação as amostras não neoplásicas adjacentes, sendo o aumento na expressão desse miRNA mais pronunciado em amostras de famílias sem mutação germinativa no gene *CDH1* ($2,15 \pm 0,17$) do que nas amostras de famílias portadoras de mutações germinativas neste gene ($1,55 \pm 0,02$). Entretanto, a diferença de expressão de hsa-miR-9 entre

as famílias portadoras da mutação germinativa em *CDH1* e sem a mutação deste gene não foi estatisticamente significativa ($p=0,0706$). Estes resultados sugerem um papel de oncomiR para hsa-miR-9 no CGDH e participação na regulação negativa de *CDH1* independente da presença de mutações germinativas neste gene.

Adicionalmente, foi observado aumento do número de cópias do gene *MYC* (≥ 3 cópias) nas 9 amostras de CGDH analisadas. Nossos resultados corroboram MA et al. (2010) que propuseram que *MYC* atua como fator de transcrição no *locus* de hsa-miR-9-3, causando a ativação da expressão de hsa-miR-9 maduro em células tumorais. Além disso, esses autores sugerem que o hsa-miR-9 maduro pode suprimir a expressão da proteína *CDH1* resultando na promoção da motilidade de células de carcinoma com capacidade de invasão. Assim, os níveis de hsa-miR-9 se correlacionam com amplificação do *MYC*, estadió tumoral e presença de metástase em câncer.

Segundo KNUDSON (1971), casos de câncer hereditários geralmente desenvolvem-se apenas após um evento somático mutacional. De acordo com a hipótese, o indivíduo portador de mutação germinativa (primeiro evento) sofre um segundo evento gerado de forma somática durante o desenvolvimento humano. A inativação total está envolvida na doença gênica e poderia caracterizar uma etapa crucial para iniciação tumoral, todavia, outros eventos podem ocorrer, particularmente promovendo ou aumentando sua progressão (BERGER et al. 2011).

De acordo com nossos resultados e a hipótese dos dois eventos, sugerimos que a ocorrência do segundo evento para inativação total da proteína *CDH1* seria a desregulação da expressão do hsa-miR-9 em consequência da amplificação do gene *MYC* nas amostras de CGDH de famílias portadoras de mutação germinativa no gene *CDH1* (Figura 12).

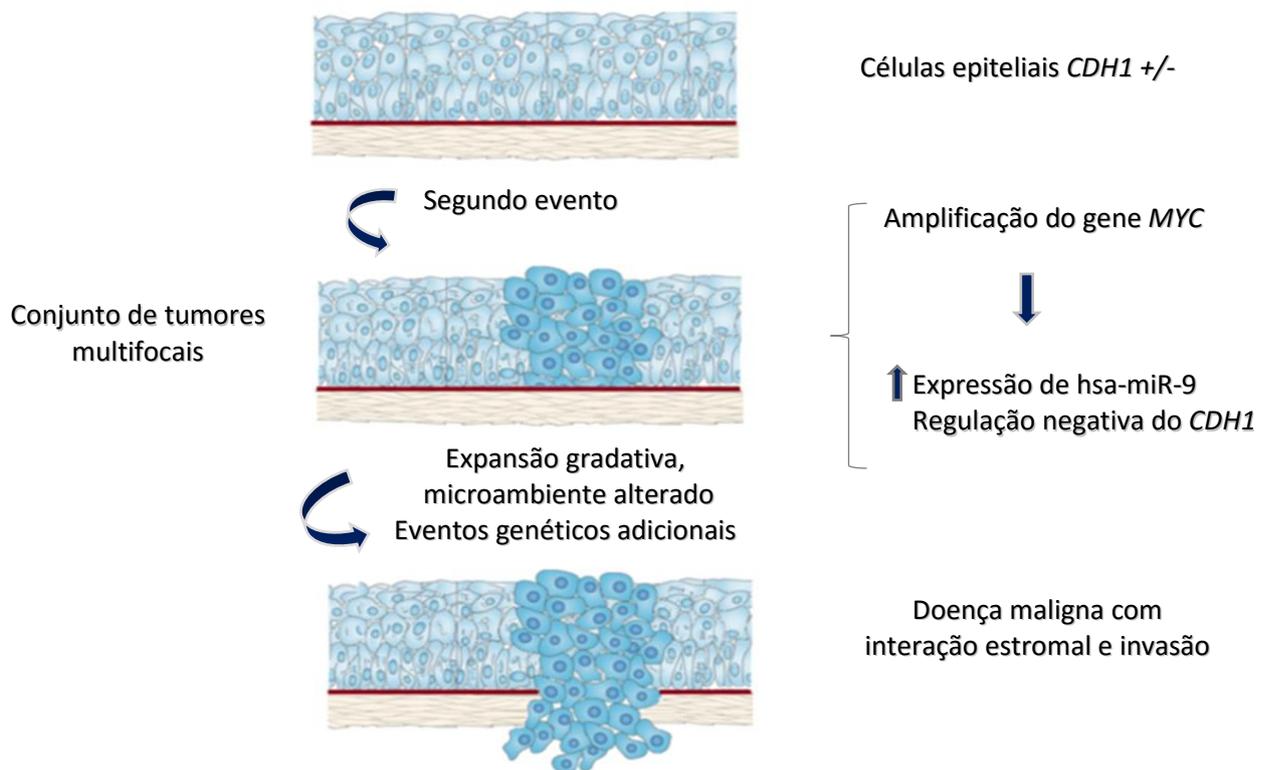


Figura 13: Ação do hsa-miR-9 como mecanismo de segundo evento na hipótese dos dois eventos em portadores de mutações germinativas de *CDH1*.

Nas amostras de CG esporádico foram observadas diminuição da expressão de RNAm de *CDH1* ($0,755 \pm 0,608$), proteína CDH1 ($0,770 \pm 0,532$) e hsa-miR-9 ($0,475 \pm 0,358$) em relação as amostras de tecido gástrico não neoplásico adjacente independente da presença de *H. pylori*, fator de virulência CagA, e EBV. Além disso, a redução da expressão da proteína CDH1 foi associada significativamente as amostras de CG do tipo difuso ($p=0,010$).

Os resultados de redução da expressão de RNAm do gene *CDH1* e proteína CDH1 corroboram a literatura que descreve a redução da expressão dessa proteína mais pronunciada no CG do tipo histológico difuso (BECKER et al. 1993, 1994, 1995; GRAZIANO et al. 2003; CHAN et al. 2006; FERRAZ et al. 2015). Adicionalmente, FERRAZ et al. (2015) também identificaram a redução da expressão de RNAm de *CDH1* independentemente da infecção por *H. pylori* tanto em gastrite, quanto no adenocarcinoma gástrico.

Na análise de amostras independentes dos nossos resultados, a redução da expressão de RNAm de *CDH1* e da proteína CDH1 também foi associada com tumores avançados (pT2-T4) ($p=0,006$; $p=0,017$, respectivamente), presença de metástase em linfonodos ($p=0,000$; $p=0,001$, respectivamente) e com o estadiamento III-IV do tumor ($p=0,000$).

Em CG, a perda de expressão de proteína CDH1 é um evento comum e está associada com a agressividade da doença e mau prognóstico (CALDEIRA et al. 2015).

STĂNCULESCU et al. (2011) observaram reduzida expressão para proteína CDH1 em estágios avançados da doença, com uma relação inversa entre a expressão de E-caderina e prognóstico adverso, incluindo profundidade da invasão parietal e metástase linfática.

Segundo WIJNHOVEN et al. (2000), a regulação negativa de CDH1 é um dos primeiros passos na cascata do processo invasivo que permite as células cancerígenas migrar e invadir tecidos circundantes. A perda de expressão dessa proteína é claramente reconhecida como uma das marcas da transição epitélio-mesenquimal (TEM), crucial para a iniciação do processo metastático (JEANES et al. 2008). Além da perda de expressão da proteína CDH1, a TEM é caracterizada pela perda de adesão celular, aquisição de marcadores mesenquimais (vimentina, fibronectina e N-caderina) e aumento da motilidade celular e invasão (THIERY et al. 2002; KORPAL et al. 2008; MANI et al. 2008).

Em GC, a TEM está associada com um tipo difuso, tumor em estágio avançado, e um mau prognóstico, sugerindo que a inibição da TEM poderia ser promissora na prevenção da progressão e invasão metastática (KIM et al. 2009).

A regulação negativa da proteína CDH1 e iniciação e execução de TEM são causadas por vários miRNAs e vários fatores de transcrição importantes na indução de TEM, incluindo Snail, Slug, Twist, Zeb1, Zeb2, FOXC2, E47, KLF4, KLF8, entre outros, que interagem uns com os outros, e que estão atuando em vias de sinalização importantes ativadas por fator de crescimento transformante- β (TGF- β), Wnt, NOTCH, integrina, interleucina (IL) -5, IL-6, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e transdutor de sinal e ativador de transcrição-3 (STAT-3), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento hepático (HGF), fator nuclear-kB (NF-kB), em diante (LI et al. 2010).

Neste estudo foi identificada uma associação significativa entre a redução da expressão de hsa-miR-9 com metástase em linfonodo e estadiamento III-IV ($p=0,005$; $p=0,000$, respectivamente) nas amostras de CG esporádico. Assim, sugerindo um papel de tsmiRNA para esse miRNA na CG esporádico.

A redução da expressão de hsa-miR-9 foi associada com metástase do carcinoma de células renais (HILDEBRANDT et al. 2010), adenocarcinomas seroso papilar ovarianos (LAIOS et al. 2008) e câncer papilar da tireóide (SONDERMANN et al. 2015). Em contraste, o aumento da expressão de hsa-miR-9 também foi associado a metástases em linfonodos em câncer de pulmão de não pequenas células (XU et al. 2014), carcinoma hepatocelular (SUN et al. 2013), carcinoma de mama (MA et al. 2010; WANG et al. 2013) e câncer colorectal (ZHU et al. 2013).

Em CG, a expressão do hsa-miR-9 possui um papel controverso. LUO et al. (2009) concluíram que menores níveis de hsa-miR-9 estavam presentes nas amostras tumorais em relação ao tecido não-neoplásico. ZHENG et al. (2013), além de encontrarem os mesmos resultados, concluíram que esse miRNA suprime a expressão de ciclina D1 e ETS1, inibindo a proliferação, invasão e metástase em CG. Além disso, TSAI et al. (2011) afirmaram que a expressão de hsa-miR-9 poderia suprimir migração e a proliferação celular em CG. Semelhantes resultados indicam que o hsa-miR-9 desempenha um papel supressor de tumores através da repressão dos genes associados a tumores (NFκB1 e RAB34) (BANDRES et al. 2009; WAN et al. 2010; WANG et al. 2010).

Diferentemente, ROTKUA et al. (2012) observaram aumento da expressão de hsa-miR-9 nas amostras de CG e que através era responsável pela regulação negativa da proteína CDX2, resultando na perda da manutenção de diferenciação e promoção do crescimento celular. Desta maneira, sugerindo um papel de oncomiR para o hsa-miR-9.

Em uma linhagem celular de carcinoma de mama (SUM149), a redução parcial de níveis da proteína CDH1 mediada pelo hsa-miR-9 não induz diretamente a TEM *in vitro*. Em vez disso, a redução parcial de níveis da proteína CDH1 mediada pelo hsa-miR-9 parece sensibilizar as células deste tipo tumoral a induzir a sinalização de TEM decorrente do microambiente tumoral. Isto conduz à aquisição de traços mesenquimais tardios pelas células de carcinoma na progressão tumoral, que poderiam, por sua vez, contribuir para disseminação metastática (MA et al. 2010).

Agregando estas informações à teoria do campo de cancerização, que propõe que o tecido normal adjacente ao tumor abriga características moleculares que estão presentes no tumor (BRAAKHUIS et al 2003; CHAI, 2009; ASSUMPCÃO et al. 2015), sugere-se que a menor a expressão de hsa-miR-9 observada no CG em relação ao tecido adjacente deve-se ao fato que o tecido gástrico adjacente já apresente um aumento da expressão desse miRNA, o que levaria a regulação negativa de CDH1 importante para TEM e o início da carcinogênese. Portanto, na hipótese formulada, o hsa-miR-9 iniciaria a regulação negativa do *CDH1* desde o tecido adjacente apoiando a instalação tumoral, exercendo um papel de oncomiR, já que regula negativamente o *CDH1*. Este miRNA perderia gradativamente sua expressão após inúmeras divisões celulares até a completa instalação do CG, apresentando níveis mais reduzidos no tumor do que no tecido adjacente.

6 CONCLUSÃO

Câncer gástrico difuso hereditário

1. A expressão de hsa-miR-9 está aumentada no CGDH independente da presença de mutação germinativa no gene *CDH1*;
2. A amplificação do gene *MYC* foi um evento comum no CGDH;
3. O aumento da expressão do hsa-miR-9 funciona como mecanismo de segundo evento em portadores da síndrome CGDH com mutação germinativa no gene *CDH1*;
4. O miR-9 exerceria um papel de oncomiR no CGDH;

Câncer gástrico esporádico

5. A redução da expressão da proteína *CDH1* foi associada significativamente as amostras de CG do tipo difuso;
6. A redução da expressão de RNAm de *CDH1* e da proteína *CDH1* também foi associada com tumores avançados (pT2-T4), presença de metástase em linfonodos e com o estadiamento III-IV do tumor em CG esporádico;
7. A redução da expressão de hsa-miR-9 está diretamente relacionada com metástase em linfonodo e estadiamento III-IV desempenhando um papel de tsmiRNA em CG esporádico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERES, Stefan L.; ZAMORE, Phillip D. Diversifying microRNA sequence and function. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 14, n. 8, p. 475-488, 2013.

ANWAR, M. et al. Epstein-barr virus detection in tumors of upper gastrointestinal tract. An in situ hybridization study in Pakistan. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 24, n. 3, p. 379-385, 2005.

BABA, Yoshifumi et al. Clinical implications of the LINE-1 methylation levels in patients with gastrointestinal cancer. **Surgery today**, v. 44, n. 10, p. 1807-1816, 2014.

BAE, Jeong Mo et al. ALU and LINE-1 hypomethylations in multistep gastric carcinogenesis and their prognostic implications. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 6, p. 1323-1331, 2012.

BAEK, Daehyun et al. The impact of microRNAs on protein output. **Nature**, v. 455, n. 7209, p. 64-71, 2008.

BANDRES, Eva et al. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. **International journal of cancer**, v. 125, n. 11, p. 2737-2743, 2009.

BARBER, M. et al. Mechanisms and sequelae of E-cadherin silencing in hereditary diffuse gastric cancer. **The Journal of pathology**, v. 216, n. 3, p. 295-306, 2008.

BARTEL, David P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.

BAYLIN, Stephen B.; OHM, Joyce E. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction?. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 2, p. 107-116, 2006.

BECKER, Karl-Friedrich et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. **Cancer Research**, v. 54, n. 14, p. 3845-3852, 1994.

BECKER, Karl-Friedrich; HÖFLER, Heinz. Frequent somatic allelic inactivation of the E-cadherin gene in gastric carcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 14, p. 1082-1084, 1995.

BERGER, Alice H.; KNUDSON, Alfred G.; PANDOLFI, Pier Paolo. A continuum model for tumour suppression. **Nature**, v. 476, n. 7359, p. 163-169, 2011.

BERRETTA, Massimiliano et al. The role of diet in gastric cancer: still an open question. **Front Biosci**, v. 17, p. 1640-1647, 2012.

BLUM, Mariela A. et al. Management of localized gastric cancer. **Journal of surgical oncology**, v. 107, n. 3, p. 265-270, 2013.

BORGES, Barbara Do Nascimento et al. Promoter polymorphisms and methylation of E-cadherin (CDH1) and KIT in gastric cancer patients from northern Brazil. *Anticancer research*, v. 30, n. 6, p. 2225-2233, 2010.

BRESCIANI, Cláudio; PEREZ, Rodrigo Oliva; GAMA-RODRIGUES, Joaquim. Familial gastric cancer. *Arquivos de gastroenterologia*, v. 40, n. 2, p. 114-117, 2003.

BROOKS-WILSON, A. R. et al. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *Journal of medical genetics*, v. 41, n. 7, p. 508-517, 2004.

CALCAGNO, Danielle Queiroz et al. MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, v. 14, n. 39, p. 5962-5968, 2008.

CALCAGNO, DANIELLE QUEIROZ et al. Aneuploidy of chromosome 8 and C-MYC amplification in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *Anticancer research*, v. 25, n. 6B, p. 4069-4074, 2005.

CALCAGNO, Danielle Queiroz et al. Interrelationship between chromosome 8 aneuploidy, C-MYC amplification and increased expression in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, v. 12, n. 38, p. 6207, 2006.

CALCAGNO, Danielle Queiroz et al. DNA and histone methylation in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, v. 19, n. 8, p. 1182, 2013.

CALCAGNO, Danielle Queiroz; DE ARRUDA CARDOSO SMITH, Marília; BURBANO, Rommel Rodriguez. Cancer type-specific epigenetic changes: gastric cancer. *Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis*, p. 79-101, 2015.

CALDAS, Carlos et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management*. *Journal of medical genetics*, v. 36, n. 12, p. 873-880, 1999.

CALIN, George Adrian et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 32, p. 11755-11760, 2004.

CAO, Zhang et al. PDCD4 expression inversely correlated with miR-21 levels in gastric cancers. *Journal of cancer research and clinical oncology*, v. 138, n. 4, p. 611-619, 2012.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, v. 513, n. 7517, p. 202-209, 2014.

CECCONELLO, I.; LEITE, A. F.; WAITZBERG, D. L. Influência da dieta na gênese do câncer de esôfago. *Dieta, nutrição e câncer. São Paulo: Atheneu*, p. 243-6, 2004.

CHANG, Tsung-Cheng et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. **Nature genetics**, v. 40, n. 1, p. 43-50, 2008.

CHEN, Lin et al. MicroRNA-181b targets cAMP responsive element binding protein 1 in gastric adenocarcinomas. **IUBMB life**, v. 64, n. 7, p. 628-635, 2012.

CHUN-ZHI, Zhang et al. MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN. **BMC cancer**, v. 10, n. 1, p. 1, 2010.

COLVIN, Hugh et al. Hereditary Gastric Cancer Syndromes. **Surgical oncology clinics of North America**, v. 24, n. 4, p. 765-777, 2015.

CONG, Dan et al. Expression profiles of pivotal microRNAs and targets in thyroid papillary carcinoma: an analysis of The Cancer Genome Atlas. **OncoTargets and therapy**, v. 8, p. 2271, 2015.

CORSO, G. et al. Characterization of the P373L E-cadherin germline missense mutation and implication for clinical management. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 33, n. 9, p. 1061-1067, 2007.

CRONE, Stephanie Geisler et al. microRNA-146a inhibits G protein-coupled receptor-mediated activation of NF- κ B by targeting CARD10 and COPS8 in gastric cancer. **Molecular cancer**, v. 11, n. 1, p. 1, 2012.

DAI, X. et al. [Expression pattern of hsa-miR-9 and its association with BCL6 in EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphoma cell lines]. **Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University**, v. 33, n. 5, p. 661-666, 2013.

DEKKER, W.; OP, Den Orth JO. Early gastric cancer. **Radiologia clinica**, v. 46, n. 2, p. 115, 1977.

DELBRIDGE, Alex RD et al. The role of the apoptotic machinery in tumor suppression. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 11, p. a008789, 2012.

DENG, Jun et al. Cullin 4A (CUL4A), a direct target of miR-9 and miR-137, promotes gastric cancer proliferation and invasion by regulating the Hippo signaling pathway. **Oncotarget**, 2016.

DENG, Yujie et al. MiR-215 modulates gastric cancer cell proliferation by targeting RB1. **Cancer letters**, v. 342, n. 1, p. 27-35, 2014.

DE SOUZA, Carolina Rosal Teixeira et al. MYC deregulation in gastric cancer and its clinicopathological implications. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64420, 2013.

DO NASCIMENTO BORGES, Bárbara; BURBANO, Rommel Mario Rodriguez; HARADA, Maria Lúcia. Analysis of the methylation patterns of the p16 INK4A, p15 INK4B, and APC genes in gastric adenocarcinoma patients from a Brazilian population. **Tumor Biology**, v. 34, n. 4, p. 2127-2133, 2013.

DRAKAKI, Alexandra et al. Functional microRNA high throughput screening reveals miR-9 as a central regulator of liver oncogenesis by affecting the PPARA-CDH1 pathway. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 542, 2015.

EILERS, Martin; EISENMAN, Robert N. Myc's broad reach. **Genes & development**, v. 22, n. 20, p. 2755-2766, 2008

FANG, Yue et al. miR-106a confers cisplatin resistance by regulating PTEN/Akt pathway in gastric cancer cells. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, p. gmt106, 2013.

FEINBERG, Andrew P. The epigenetics of cancer etiology. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2004. p. 427-432.

FERLAY J et al. GLOBOCAN 2012 v1.0. **Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11**. International Agency for Research on Cancer [online], disponível em: <<http://www.globocan.iarc.fr>> Acesso em: 24/03/2016.

FIGUEIREDO, Ceu; GARCIA-GONZALEZ, Maria A.; MACHADO, Jose C. Molecular pathogenesis of gastric cancer. **Helicobacter**, v. 18, n. s1, p. 28-33, 2013.

FITZGERALD, Rebecca et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. **Journal of medical genetics**, v. 47, n. 7, p. 436-444, 2010.

GAO, Caiping et al. Reduced microRNA-218 expression is associated with high nuclear factor kappa B activation in gastric cancer. **Cancer**, v. 116, n. 1, p. 41-49, 2010.

GAO, C. P. et al. [Reduced expression of miR-218 and its significance in gastric cancer]. **Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]**, v. 32, n. 4, p. 249-252, 2010.

GAO, Caiping et al. Epidermal growth factor receptor-coamplified and overexpressed protein (VOPP1) is a putative oncogene in gastric cancer. **Clinical and experimental medicine**, v. 15, n. 4, p. 469-475, 2015.

GAYTHER, Simon A. et al. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. **Cancer Research**, v. 58, n. 18, p. 4086-4089, 1998.

GHAFFARI, S. R. et al. A novel truncating mutation in the E-cadherin gene in the first Iranian family with hereditary diffuse gastric cancer. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 36, n. 6, p. 559-562, 2010.

GIGEKEK, Carolina Oliveira et al. Epigenetic mechanisms in gastric cancer. **Epigenomics**, v. 4, n. 3, p. 279-294, 2012

- GOLESTANEH, Azadeh Fahim et al. miRNAs expressed differently in cancer stem cells and cancer cells of human gastric cancer cell line MKN-45. **Cell biochemistry and function**, v. 30, n. 5, p. 411-418, 2012.
- GONG, Junhua et al. MicroRNA-25 promotes gastric cancer proliferation, invasion, and migration by directly targeting F-box and WD-40 Domain Protein 7, FBXW7. **Tumor Biology**, v. 36, n. 10, p. 7831-7840, 2015.
- GRADY, William M et al. Methylation of the *CDH1* promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. **Nature genetics**, v. 26, n. 1, p. 16-17, 2000.
- GRAZIOSI, Luigina et al. Prognostic value of the seventh AJCC/UICC TNM classification of non-cardia gastric cancer. **World journal of surgical oncology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.
- GUILFORD, Parry et al. A short guide to hereditary diffuse gastric cancer. **Hered Cancer Clin Pract**, v. 5, n. 4, p. 183-94, 2007.
- GUILFORD, Parry et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 402-405, 1998.
- GUMBINER, Barry M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 8, p. 622-634, 2005.
- GUO, Jian-Xin et al. miR-181b as a potential molecular target for anticancer therapy of gastric neoplasms. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 5, p. 2263-2267, 2012.
- GUO, Li-Min et al. MicroRNA-9 inhibits ovarian cancer cell growth through regulation of NF- κ B1. **FEBS journal**, v. 276, n. 19, p. 5537-5546, 2009.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HANSFORD, Samantha et al. Hereditary diffuse gastric cancer syndrome: *CDH1* mutations and beyond. **JAMA oncology**, v. 1, n. 1, p. 23-32, 2015.
- HE, Dong-Xu et al. A methylation-based regulatory network for microRNA 320a in chemoresistant breast cancer. **Molecular pharmacology**, v. 86, n. 5, p. 536-547, 2014.
- HE, Dong-Xu et al. Methylation-regulated miR-149 modulates chemoresistance by targeting GlcNAc N-deacetylase/N-sulfotransferase-1 in human breast cancer. **FEBS Journal**, v. 281, n. 20, p. 4718-4730, 2014.
- HILDEBRANDT, M. A. T. et al. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. **Oncogene**, v. 29, n. 42, p. 5724-5728, 2010.

HOU, Zhibo et al. MicroRNA-146a is down-regulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis. **Medical Oncology**, v. 29, n. 2, p. 886-892, 2012.

HOU, Zhibo et al. microRNA-146a targets the L1 cell adhesion molecule and suppresses the metastatic potential of gastric cancer. **Molecular medicine reports**, v. 6, n. 3, p. 501-506, 2012.

HSU, Pei-Yin et al. Xenoestrogen-induced epigenetic repression of microRNA-9-3 in breast epithelial cells. **Cancer research**, v. 69, n. 14, p. 5936-5945, 2009.

HUMAR, Bostjan et al. E-cadherin deficiency initiates gastric signet-ring cell carcinoma in mice and man. **Cancer research**, v. 69, n. 5, p. 2050-2056, 2009.

HUNTSMAN, David G. et al. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 25, p. 1904-1909, 2001.

IGIETSEME, Joseph U et al. Role of Epithelial-Mesenchyme Transition in Chlamydia Pathogenesis. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0145198, 2015

INCA - Instituto Nacional do Câncer (2016). Disponível em:<<http://www.inca.org.br>>. Acesso em: 25/03/2016.

INOUE, Taisuke et al. Clinicopathological and prognostic significance of microRNA-107 and its relationship to DICER1 mRNA expression in gastric cancer. **Oncology reports**, v. 27, n. 6, p. 1759-1764, 2012.

IORIO, Marilena V. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 16, p. 7065-7070, 2005.

JAFARIAN, Arefeh et al. The Generation of Insulin Producing Cells from Human Mesenchymal Stem Cells by MiR-375 and Anti-MiR-9. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0128650, 2015.

JIANG, Jingting et al. Prognostic significance of miR-181b and miR-21 in gastric cancer patients treated with S-1/Oxaliplatin or Doxifluridine/Oxaliplatin. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23271, 2011.

JONES, Peter A.; BAYLIN, Stephen B. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683-692, 2007.

JONES, Peter A.; TAKAI, Daiya. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1068-1070, 2001.

KANG, Wei et al. Stathmin1 plays oncogenic role and is a target of microRNA-223 in gastric cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33919, 2012.

KHALILI, Mitra et al. Downregulation of the Genes Involved in Reprogramming (SOX2, c-MYC, miR-302, miR-145, and P21) in Gastric Adenocarcinoma. **Journal of gastrointestinal cancer**, v. 46, n. 3, p. 251-258, 2015.

- KOGO, Ryunosuke et al. Clinical significance of miR-146a in gastric cancer cases. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 13, p. 4277-4284, 2011.
- KNUDSON, Alfred G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 4, p. 820-823, 1971.
- KREJS, Guenter J. Gastric cancer: epidemiology and risk factors. **Digestive Diseases**, v. 28, n. 4-5, p. 600-603, 2010.
- KROL, Jacek; LOEDIGE, Inga; FILIPOWICZ, Witold. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 9, p. 597-610, 2010.
- KURASHIGE, Junji et al. MicroRNA-200b regulates cell proliferation, invasion, and migration by directly targeting ZEB2 in gastric carcinoma. **Annals of surgical oncology**, v. 19, n. 3, p. 656-664, 2012.
- LA VECCHIA, Carlo et al. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. **Cancer**, v. 70, n. 1, p. 50-55, 1992.
- LANEVE, Pietro et al. A minicircuitry involving REST and CREB controls miR-9-2 expression during human neuronal differentiation. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 20, p. 6895-6905, 2010.
- LAUREN, Pekka. The two histological main types of gastric carcinoma, an attempt at a histoclinical classification. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 64, p. 31-49, 1965.
- LEAL, Mariana Ferreira et al. Promoter hypermethylation of CDH1, FHIT, MTAP and PLAGL1 in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 18, p. 2568, 2007.
- LI, Na et al. miR-215 promotes malignant progression of gastric cancer by targeting RUNX1. **Oncotarget**, 2015.
- LI, Yingfei et al. G-A variant in miR-200c binding site of EFNA1 alters susceptibility to gastric cancer. **Molecular carcinogenesis**, v. 53, n. 3, p. 219-229, 2014.
- LI, Zejuan et al. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 40, p. 15535-15540, 2008.
- LI, Xiao et al. MicroRNA profile of paclitaxel-resistant serous ovarian carcinoma based on formalin-fixed paraffin-embedded samples. **BMC cancer**, v. 13, n. 1, p. 216, 2013.
- LIMA, Marcos AP et al. Relationship between EBV infection and expression of cellular proteins c-Myc, Bcl-2, and Bax in gastric carcinomas. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 17, n. 2, p. 82-89, 2008.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

Lodish H et al. Molecular Cell Biology. **H. Freeman**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475>> Acesso em: 20/03/2016.

LU, Jun et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **nature**, v. 435, n. 7043, p. 834-838, 2005.

LUJAMBIO, Amaia et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36, p. 13556-13561, 2008.

LUO, Hongchun et al. Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 28, n. 1, p. 1, 2009.

LYNCH, Henry T et al. Hereditary diffuse gastric cancer: prophylactic surgical oncology implications. **Surgical Clinics of North America**, v. 88, n. 4, p. 759-778, 2008.

MA, Li et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. **Nature cell biology**, v. 12, n. 3, p. 247-256, 2010.

MACDONALD, John S. Gastric cancer: chemotherapy of advanced disease. **Hematological oncology**, v. 10, n. 1, p. 37-42, 1992.

MACHADO, J. C. et al. E-cadherin gene (*CDH1*) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. **Oncogene**, v. 20, n. 12, p. 1525-1528, 2000.

MALUMBRES, Marcos. miRNAs and cancer: an epigenetics view. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 4, p. 863-874, 2013.

MATEUS, Ana Rita et al. E-cadherin mutations and cell motility: a genotype-phenotype correlation. **Experimental cell research**, v. 315, n. 8, p. 1393-1402, 2009.

MILLER, Donald M. et al. c-Myc and cancer metabolism. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 20, p. 5546-5553, 2012.

MCLEAN, Mairi H.; EL-OMAR, Emad M. Genetics of gastric cancer. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 11, p. 664-674, 2014.

MOREIRA-NUNES, Caroline Aquino, et al. Genetic screening analysis of patients with hereditary diffuse gastric cancer from northern and northeastern Brazil. **Hered Cancer Clin Pract**, 12: 18, 2014.

MOTOYAMA, Kazuo et al. Clinical significance of high mobility group A2 in human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 8, p. 2334-2340, 2008.

MÜLLAUER, Leonhard et al. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 488, n. 3, p. 211-231, 2001.

NAGINI, Siddavaram. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World J Gastrointest Oncol**, v. 4, n. 7, p. 156-169, 2012.

OLIVEIRA, Carla et al. Screening E-cadherin in gastric cancer families reveals germline mutations only in hereditary diffuse gastric cancer kindred. **Human mutation**, v. 19, n. 5, p. 510-517, 2002.

OLIVEIRA, Carla et al. Germline *CDH1* deletions in hereditary diffuse gastric cancer families. **Human molecular genetics**, v. 18, n. 9, p. 1545-1555, 2009.

OLIVEIRA, Carla et al. Quantification of epigenetic and genetic 2nd hits in *CDH1* during hereditary diffuse gastric cancer syndrome progression. **Gastroenterology**, v. 136, n. 7, p. 2137-2148, 2009.

PANANI, Anna D. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. **Cancer letters**, v. 266, n. 2, p. 99-115, 2008.

PAYNE, Shannon R.; KEMP, Christopher J. Tumor suppressor genetics. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 12, p. 2031-2045, 2005.

PEĆINA-ŠLAUS, Nives. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. **Cancer cell international**, v. 3, n. 1, p. 1, 2003.

PAREDES, Joana et al. Epithelial E-and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1826, n. 2, p. 297-311, 2012.

PARK, Boyoung et al. Ecological study for refrigerator use, salt, vegetable, and fruit intakes, and gastric cancer. **Cancer Causes & Control**, v. 22, n. 11, p. 1497-1502, 2011.

PETROCCA, Fabio et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGF β -dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. **Cancer cell**, v. 13, n. 3, p. 272-286, 2008.

QIN, Shuang et al. miR-19a promotes cell growth and tumorigenesis through targeting SOCS1 in gastric cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 2, p. 835-840, 2013.

RAIOL, Láuren Cláudia Costa et al. Interrelationship between MYC gene numerical aberrations and protein expression in individuals from northern Brazil with early

gastric adenocarcinoma. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 181, n. 1, p. 31-35, 2008.

RATHER, Mohammad Iqbal et al. Oncogenic MicroRNA-155 Down-regulates Tumor Suppressor CDC73 and Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation IMPLICATIONS FOR CANCER THERAPEUTICS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 1, p. 608-618, 2013.

ROPERO, Santiago; ESTELLER, Manel. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. **Molecular oncology**, v. 1, n. 1, p. 19-25, 2007.

ROTKRUA, Pichayanoot et al. MiR-9 downregulates CDX2 expression in gastric cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 11, p. 2611-2620, 2011.

RUAN, Kai; FANG, Xiaoguang; OUYANG, Gaoliang. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. **Cancer letters**, v. 285, n. 2, p. 116-126, 2009.

SACCONI, A. et al. miR-204 targets Bcl-2 expression and enhances responsiveness of gastric cancer. **Cell death & disease**, v. 3, n. 11, p. e423, 2012.

SAKAMOTO, Naoya et al. MicroRNA-148a is downregulated in gastric cancer, targets MMP7, and indicates tumor invasiveness and poor prognosis. **Cancer science**, v. 105, n. 2, p. 236-243, 2014.

SELARU, Florin M. et al. Epigenetic events in gastrointestinal cancer. **The American journal of gastroenterology**, v. 104, n. 8, p. 1910-1912, 2009.

SELBACH, Matthias et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. **nature**, v. 455, n. 7209, p. 58-63, 2008.

SELCUKLU, S. Duygu et al. MicroRNA-9 inhibition of cell proliferation and identification of novel miR-9 targets by transcriptome profiling in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 35, p. 29516-29528, 2012.

SMITH, Malcolm G. et al. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 19, p. 2979, 2006.

SONG, Fengju et al. Integrated microRNA network analyses identify a poor-prognosis subtype of gastric cancer characterized by the miR-200 family. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 4, p. 878-889, 2014.

STEPONAITIENE, Ruta et al. Epigenetic silencing of miR-137 is a frequent event in gastric carcinogenesis. **Molecular carcinogenesis**, 2015.

SUN, Qingmin et al. Hsa-mir-27a genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility through affecting miR-27a and target gene expression. **Cancer science**, v. 101, n. 10, p. 2241-2247, 2010.

TAHARA, Eiichi. Genetic pathways of two types of gastric cancer. **IARC scientific publications**, n. 157, p. 327-349, 2003.

TAKAMIZAWA, Junichi et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. **Cancer research**, v. 64, n. 11, p. 3753-3756, 2004.

TAKEICHI, Masatoshi. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 15.6: 397-410, 2014.

TAMURA, Gen et al. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 7, p. 569-573, 2000.

TAMURA, Gen. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 2, p. 192, 2006.

TANG, Hailin et al. miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 20, p. 5602-5612, 2013.

TANG, Hailin et al. Diallyl disulfide suppresses proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer through Wnt-1 signaling pathway by up-regulation of miR-200b and miR-22. **Cancer letters**, v. 340, n. 1, p. 72-81, 2013.

TANSEY, William P. Mammalian MYC proteins and cancer. **New Journal of Science**, v. 2014, 2014.

TCHERNITSA, Oleg et al. Systematic evaluation of the miRNA-ome and its downstream effects on mRNA expression identifies gastric cancer progression. **The Journal of pathology**, v. 222, n. 3, p. 310-319, 2010.

TIAN, S. B. et al. [MicroRNA and gastric cancer]. **Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae**, v. 36, n. 2, p. 214-217, 2014.

TIE, Jun et al. MiR-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the Robo1 receptor. **PLoS Genet**, v. 6, n. 3, p. e1000879, 2010.

TAO, Jiangchuan; ZHAO, Xiaohong; TAO, Jianguo. c-MYC–miRNA circuitry: a central regulator of aggressive B-cell malignancies. **Cell Cycle**, v. 13, n. 2, p. 191-198, 2014.

TONG, Fuyi et al. MicroRNAs in gastric cancer: from benchtop to bedside. **Digestive diseases and sciences**, v. 59, n. 1, p. 24-30, 2014.

TONG, A. W.; NEMUNAITIS, J. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? **Cancer gene therapy**, v. 15, n. 6, p. 341-355, 2008.

TRÄNKENSCHUH, Wolfgang et al. Frequent and distinct aberrations of DNA methylation patterns in fibrolamellar carcinoma of the liver. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13688, 2010.

TSAI, Kuo-Wang et al. Aberrant hypermethylation of miR-9 genes in gastric cancer. **Epigenetics**, v. 6, n. 10, p. 1189-1197, 2011.

TSUJIURA, M. et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. **British journal of cancer**, v. 102, n. 7, p. 1174-1179, 2010.

TU, William B. et al. Myc and its interactors take shape. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 5, p. 469-483, 2015.

UEDA, Tetsuya et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. **The lancet oncology**, v. 11, n. 2, p. 136-146, 2010.

VARLEY, J. M. et al. An extended Li-Fraumeni kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation in TP53. **Journal of medical genetics**, v. 32, n. 12, p. 942-945, 1995.

VASEN, H. F. et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. **Gastroenterology**, v. 110, n. 4, p. 1020-1027, 1996.

VAN ROY, Frans; BERX, Geert. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cellular and molecular life sciences**, v. 65, n. 23, p. 3756-3788, 2008.

VAUHKONEN, Matti et al. Pathology and molecular biology of gastric cancer. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 20, n. 4, p. 651-674, 2006.

VOLINIA, Stefano et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2257-2261, 2006.

WAN, Hai-Ying et al. Regulation of the transcription factor NF- κ B1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma. **Molecular cancer**, v. 9, n. 1, p. 1, 2010.

WANG, Xian; LAM, Emily; JIN, Hongchuan. A microRNA contribution to aberrant Ras activation in gastric cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 8 Supplement, p. 133-133, 2011.

WANG, Zaozao et al. miR-106a is frequently upregulated in gastric cancer and inhibits the extrinsic apoptotic pathway by targeting FAS. **Molecular carcinogenesis**, v. 52, n. 8, p. 634-646, 2013.

WEBER, Barbara et al. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. **Cell cycle**, v. 6, n. 9, p. 1001-1005, 2007.

WIESE, Katrin E et al. Repression of SRF target genes is critical for Myc-dependent apoptosis of epithelial cells. **The EMBO journal**, p. e201490467, 2015.

WISNIESKI, Fernanda et al. Reference genes for quantitative RT-PCR data in gastric tissues and cell lines. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 41, p. 7121-7128, 2013.

WU, Q. et al. MiR-19a/b modulate the metastasis of gastric cancer cells by targeting the tumour suppressor MXD1. **Cell death & disease**, v. 5, n. 3, p. e1144, 2014.

XIA, Jiazeng et al. The role of miR-148a in gastric cancer. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 140, n. 9, p. 1451-1456, 2014.

XIAO, Bingxiu et al. Detection of miR-106a in gastric carcinoma and its clinical significance. **Clinica Chimica Acta**, v. 400, n. 1, p. 97-102, 2009.

XU, Yuejuan et al. miR-21 is a promising novel biomarker for lymph node metastasis in patients with gastric cancer. **Gastroenterology research and practice**, v. 2012, 2012.

YAMADA, Hidetaka et al. Absence of germline mono-allelic promoter hypermethylation of the *CDH1* gene in gastric cancer patients. **Molecular cancer**, v. 8, n. 1, p. 1, 2009.

YAMANAKA, Sumitaka et al. MicroRNA-21 inhibits Serpini1, a gene with novel tumour suppressive effects in gastric cancer. **Digestive and Liver Disease**, v. 44, n. 7, p. 589-596, 2012.

YAMAMOTO, Eiichiro et al. Role of DNA methylation in the development of diffuse-type gastric cancer. **Digestion**, v. 83, n. 4, p. 241-249, 2011.

YAN, Jiang et al. MiR-148a regulates MEG3 in gastric cancer by targeting DNA methyltransferase 1. **Medical Oncology**, v. 31, n. 3, p. 1-7, 2014.

YANG, Jr-Shiuan; LAI, Eric C. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. **Molecular cell**, v. 43, n. 6, p. 892-903, 2011.

YANG, Qiaoyuan et al. Low-level expression of let-7a in gastric cancer and its involvement in tumorigenesis by targeting RAB40C. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 5, p. 713-722, 2011.

YE, Min et al. Overexpression of activated leukocyte cell adhesion molecule in gastric cancer is associated with advanced stages and poor prognosis and miR-9 deregulation. **Molecular medicine reports**, v. 11, n. 3, p. 2004-2012, 2015.

YOSHIWARA, E. et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Lima, Peru. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 24, n. 1, p. 49-54, 2005.

YOUNGSON, Neil A.; WHITELOW, Emma. Transgenerational epigenetic effects. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 9, p. 233-257, 2008.

YU, Qi-Ming et al. *CDH1* methylation in preoperative peritoneal washes is an independent prognostic factor for gastric cancer. **Journal of surgical oncology**, v. 106, n. 6, p. 765-771, 2012.

ZHANG, Jiangbo et al. Comprehensive profiling of novel microRNA-9 targets and a tumor suppressor role of microRNA-9 via targeting IGF2BP1 in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 39, p. 42040-42052, 2015.

ZHANG, Lihua; WANG, Xueqing; CHEN, Pingsheng. MiR-204 down regulates SIRT1 and reverts SIRT1-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells. **BMC cancer**, v. 13, n. 1, p. 290, 2013.

ZHANG, Yi; LU, Qiping; CAI, Xun. MicroRNA-106a induces multidrug resistance in gastric cancer by targeting RUNX3. **FEBS letters**, v. 587, n. 18, p. 3069-3075, 2013.

ZHANG, Zhiyu et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. **Laboratory investigation**, v. 88, n. 12, p. 1358-1366, 2008.

ZHENG, Liduan et al. microRNA-9 suppresses the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer cells through targeting cyclin D1 and Ets1. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55719, 2013

ZHAO, Hongying et al. MiR-25 promotes gastric cancer cells growth and motility by targeting RECK. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 385, n. 1-2, p. 207-213, 2014.

ZHAO, Xiaohong; YANG, Li; HU, Jianguo. Down-regulation of miR-27a might inhibit proliferation and drug resistance of gastric cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 1, 2011.

ZHOU, X. et al. [CD99 regulates redifferentiation of classical Hodgkin's lymphoma cell line L428 towards B cells]. **Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University**, v. 33, n. 2, p. 235-238, 2013.

ZHU, Meng et al. MicroRNA-106a targets TIMP2 to regulate invasion and metastasis of gastric cancer. **FEBS letters**, v. 588, n. 4, p. 600-607, 2014.

ZHU, Yimin et al. Investigation and identification of let-7a related functional proteins in gastric carcinoma by proteomics. **Analytical Cellular Pathology**, v. 35, n. 4, p. 285-295, 2012.

ZHU, Yimin; ZHONG, Zhengxiang; LIU, Zhiming. Lentiviral vector-mediated upregulation of let-7a inhibits gastric carcinoma cell growth in vitro and in vivo. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 46, n. 1, p. 53-59, 2011.

ZHU, Yi-Min et al. Relationship between let-7a and gastric mucosa cancerization and its significance. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 26, p. 3325-3329, 2010.