



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

FLÁVIA EMANOELE DA SILVA SOARES

**ANÁLISE DO PAPEL DOS GENES CXCL12, EPHA2 E EFNA4 NO PROCESSO DE
TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL EM AMOSTRAS DE CÂNCER
GÁSTRICO**

Recife

2022

**ANÁLISE DO PAPEL DOS GENES CXCL12, EPHA2 E EFNA4 NO PROCESSO DE
TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL EM AMOSTRAS DE CÂNCER
GÁSTRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Danyelly Bruneska G. Martins

Coorientadora: Ananda C. F. Aguiar

Recife

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva Soares, Flávia Emanoele da.

Análise do papel dos genes CXCL12, EPHA2, e EFNA4 no processo de transição epitelial-mesenquimal em amostras de câncer gástrico / Flávia Emanoele da Silva Soares. - Recife, 22.

53 : il., tab.

Orientador(a): Danyelly Brunaska Gondim Martins

Cooorientador(a): Ananda Cristina Fernandes de Aguiar

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 22.

Inclui referências, anexos.

1. Câncer gástrico. 2. Receptores tirosina quinase. 3. Transição epitelial-mesenquimal. I. Gondim Martins, Danyelly Brunaska. (Orientação). II. Aguiar, Ananda Cristina Fernandes de. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

FLÁVIA EMANOELE DA SILVA SOARES

**ANÁLISE DO PAPEL DOS GENES CXCL12, EPHA2 E EFNA4 NO PROCESSO DE
TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL EM AMOSTRAS DE CÂNCER
GÁSTRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à obtenção
do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins
Departamento de Bioquímica/ LIKA – UFPE

Dra. Gabriela Calixto Ribeiro de Holanda
School of Tropical Medicine and Global Health - Nagasaki University

Msc. Renata Miranda Chaves
Hospital das Clínicas - UFPE

Dedico este trabalho a Walkiria Silva,
minha amada mãe, a dona Maria Emília S.
Cupertino e a Elyanara Almeida Feitosa
Bonfim (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus Pai pela oportunidade de estudar o que eu amo e colocar meus dons a serviço da sociedade e do Reino, por sempre renovar minhas forças e por ter sustentado eu e a minha mãe até aqui.

Agradeço a minha mãe Walkiria Silva, a minha avó Nina Silva por todo amor, incentivo que me foi dado ao longo da jornada, pois sem elas eu não conseguiria. E a toda a minha amada família Silva, por me ajudar, me incentivar e acreditar em mim sempre.

Ao meu amado companheiro João Victor por ter compartilhado comigo essa aventura com todas as emoções, e ter cuidado do jardim. Agradeço à família Melo por ter me acolhido com tanto amor e ter tornado a jornada mais leve e alegre.

A minha orientadora Danyelly Brunaska, por ter me dado asas e me ensinado sobre ciência e sobre a vida, e pelo apoio na minha jornada. A minha coorientadora Ananda Aguiar por todo o tempo investido e por todas as risadas. A todo o grupo ProspecMol por sempre estar a disposição para me ensinar e me orientar, e pela sua contribuição para a minha formação.

Agradeço a Amanda Souza, minha líder, por ter intercedido por mim e me ajudado a permanecer e investir no meu propósito. As meninas da Rede Pérola por todas as palavras de carinho e incentivo.

As minhas grandes amigas Mikaela, Viviane e Jamyle pelo carinho, pela compreensão e pelo acolhimento de todas as versões de mim ao longo da jornada.

A Rafael, Gabriela, Guilherme e Glória por terem feito a minha jornada mais divertida e mais nerd do que nunca.

**“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito,
nos aproxima.”**

Louis Pasteur

RESUMO

O câncer gástrico é a quarta causa mais comum de morte relacionada ao câncer mundialmente. O desenvolvimento tumoral é relacionado aos hábitos de vida, à infecção por *Helicobacter pylori* e à inflamação, mas atualmente também tem sido relacionado com o processo de transição epitelial-mesenquimal. Neste contexto, alguns genes de receptores tirosina quinase parecem estar associados com o câncer gástrico e vias moleculares no epitélio gástrico. O receptor hepatocelular produtor de eritropoietina 2 (EPHA2) está envolvido em diversos processos biológicos como proliferação celular, diferenciação, e transição epitelial-mesenquimal no câncer. Em paralelo, a efrina A-4 (EFNA4) é um dos ligantes dos receptores EPHA, e vem sendo observada em diversos tipos de neoplasias. O ligante de quimiocina de motivo CXC 12 (CXCL12), já vem sendo correlacionado com a angiogênese e invasão no câncer e transição epitelial-mesenquimal. Este estudo teve como objetivo caracterizar a expressão dos genes EPHA2 e seu ligante EFNA4, além do gene CXCL12, envolvidos no processo de transição epitelial-mesenquimal no câncer gástrico e correlacionar com os dados clínicos do paciente. A expressão relativa dos genes EPHA2, EFNA4 e CXCL2 foi avaliada por PCR em tempo real, a partir do RNA total obtido de amostras de biópsia do tecido gástrico de pacientes com adenocarcinoma gástrico (n=12) e sadios (n=5). A análise estatística dos resultados foi feita pelo software GraphPad Prism 8.0. A expressão relativa de EPHA2 demonstrou diferença significativa entre os pacientes com histologia negativa e positiva para *Helicobacter pylori* ($p= 0,0444$). Todos os pacientes do sexo masculino, *Helicobacter pylori* positivos expressaram EFNA4, enquanto nenhuma das 2 mulheres do grupo avaliado expressou esse gene. A alta expressão relativa de EPHA2 em pacientes *Helicobacter pylori* negativos, não condiz com o que há descrito na literatura. A expressão relativa de EFNA4 não foi significativa em relação aos fatores de risco e às características clínicas observadas neste estudo e as amostras incluídas na análise de CXCL12 não expressaram o gene. Estudos adicionais são necessários para compreender melhor esses resultados e para elucidar se há associações significativas entre as características clínicas, os hábitos de vida dos pacientes e a expressão relativa desses genes, uma vez que o potencial carcinogênico desses hábitos pode desregular as vias moleculares desses genes na EMT e sua expressão nas fases iniciais do câncer.

Palavras-chave: Câncer gástrico; receptores tirosina quinase; transição epitelial-mesenquimal

ABSTRACT

Gastric cancer is the fourth most common cause of cancer-related death worldwide. Tumor development is related to lifestyle habits, *Helicobacter pylori* infection and inflammation, but currently it has also been related to the epithelial-mesenchymal transition process. In this context, some tyrosine kinase receptors genes seem to be associated with gastric cancer and molecular pathways in the gastric epithelium. Hepatocellular erythropoietin-producing receptor 2 (EPHA2) participates in several biological processes such as cell proliferation, differentiation, and epithelial-mesenchymal transition in cancer. In parallel, ephrin A-4 (EFNA4) is one of the ligands of EPHA receptors and has been observed in various types of neoplasms. The CXC motif chemokine ligand 12 (CXCL12), has already been correlated with angiogenesis and invasion in cancer and epithelial-mesenchymal transition. This study aimed to characterize the expression of EPHA2 genes and its ligand EFNA4, as well as the CXCL12 gene, involved in the epithelial-mesenchymal transition process in gastric cancer and correlate it with the patient's clinical data. The relative expression of EPHA2, EFNA4 and CXCL2 genes was evaluated by real-time PCR from total RNA obtained from gastric tissue biopsy samples of patients with gastric adenocarcinoma (n=12) and healthy patients (n=5). Statistical analysis of the results was performed by GraphPad Prism 8.0 software. The relative expression of EPHA2 showed significant difference between patients with negative and positive histology for *Helicobacter pylori* ($p= 0.0444$). All male *Helicobacter pylori* positive patients expressed EFNA4, while none of the 2 women in the evaluated group expressed this gene. The high relative expression of EPHA2 in *Helicobacter pylori* negative patients is not consistent with what has been described in the literature. The relative expression of EFNA4 was not significant in relation to the risk factors and clinical characteristics observed in this study, and the samples included in the CXCL12 analysis did not express the gene. Additional studies are needed to better understand these results and to elucidate whether there are significant associations between clinical characteristics, lifestyle habits, and the relative expression of these genes, since the carcinogenic potential of these habits may downregulate the molecular pathways of these genes in EMT and their expression in the early stages of cancer.

Keywords: Gastric cancer; tyrosine kinase receptor; epithelial-mesenchymal transition

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

BRAF V600E - Mutao V600E do gene BRAF

CA 19-9- *Cancer Antigen 19-9* (Antgeno Cancerígeno 19-9)

CA 72-4- *Cancer Antigen 72-4* (Antígeno Cancerígeno 72-4)

CDKN2A - *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A* (Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina 2A)

CG - Câncer Gástrico

CLDN18–ARHGAP6- *Claudin 18/Rho GTPase Activating Protein 6 Gene Fusion* (Fusão dos genes Claudina 18/ Proteína 6 Ativadora de Rho GTPase)

CEA - *Carcinoembryonic Antigen* (Antígeno Carcinoembrionrio)

CIN - *Chromosomal Instability* (Instabilidade Cromossmica)

C-MET - Receptor do Fator de Crescimento de Hepatócito

CXCL12 - Ligante de Quimiocina de Motivo CXC 12

DAG - Diacilglicerol

EBV - Epstein-Barr Vírus

EFNA4 - Efrina A 4

EGFR - *Epithelial Growth Factor Receptor* (Receptor de fator de crescimento epitelial)

EMT - *Epithelial Mensechymal Transition* (Transição Epitelial Mesenquimal)

EPHA2 - *Ephrin Type-A Receptor 2* (Receptor Tipo 2 de Efrina tipo A)

GE – Gastresofgica

GDP- Difosfato de Guanosina

GS - Genomicamente estável

GSK3 β - Glicognio Sintase Quinase 3 Beta

GTP - Trifosfato de Guanosina

FGFR2 - *Fibroblast Growth Factor Receptor 2* (Receptor 2 do Fator de Crescimento de Fibroblasto)

HCl- cido Clorídrico

HER-2 - *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano, também chamado de ERBB2)

JAK2 - Janus Quinase 2

IL-12 - Interleucina 12

IP-3- Inositol Trifosfato

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinases* (Proteínas-quinases Ativadas por Mitógenos)

MLH1 - *mutL Homolog 1*

MSI- *Microssatélite Instável*

MUC1- *Mucina 1*

PDGFR- *Platelet-derived Growth Factor Receptor* (Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)

PD-L1- *Programmed Death Ligand 1* (Ligante de Morte Programada 1)

PD-L2- *Programmed Death Ligand 2* (Ligante de Morte Programada 2)

PI3K-AKT- *Fosfatidilinositol 3-Quinase/ Proteína Quinase B*

PIK3CA - *Fosfatidilinositol 3-Quinase Subunidade Catalítica Alfa*

PIK3R2 - *Fosfatidilinositol 3-Quinase Subunidade Regulatória 2*

RHOA - *Ras Homolog family member A* (Ras Membro da Família Homóloga A)

TGF- β 1 - *Transforming growth factor β 1* (Fator de Crescimento Transformador β 1)

TP53 - *Tumor Protein P53* (Proteína Tumoral P53)

VEGFR2 - *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* (Receptor 2 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

ZO-1 - *Zona Ocludente*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1a. Cascata de Correa para adenocarcinoma do tipo intestinal.....	17
Figura 1b. Cascata de Correa para adenocarcinoma do tipo difuso	17
Figura 2. Classificação macroscópica de Borrmann	18
Figura 3. Classificação do Tumor Primário.....	22
Figura 4. Distribuição dos subtipos moleculares de câncer gástrico e suas características, em relação as partes do estômago.....	26
Figura 5. O processo de transcrição epitelial-mesenquimal e seus marcadores fenotípicos ...	27
Figura 6. Vias de sinalização de TGF- β e EGFR e a transição epitelial-mesenquimal.....	29
Figura 7. Sinalização da via EFNA4/EPHA2 no carcinoma hepatocelular.....	31
Figura 8. Via de sinalização CXCL12/CXCR4.....	33
Figura 9. População de estudo.....	35
Figura 10. Curva de Melting.	36
Figura 11. Expressão relativa de EPHA2 em relação a idade em pacientes com câncer gástrico.....	39
Figura 12. Expressão relativa do gene EPHA2 em relação ao sexo em pacientes com câncer gástrico.....	39
Figura 13. Expressão relativa de EPHA2 em relação a <i>Helicobacter pylori</i> em pacientes com câncer gástrico	40
Figura 14. Expressão relativa de EPHA2 em relação etilismo em pacientes com câncer gástrico.....	40
Figura 15. Expressão relativa de EPHA2 em relação ao grau de diferenciação do tumor em pacientes com câncer gástrico.....	41
Figura 16. Expressão de EFNA4 em relação a idade dos pacientes com câncer gástrico	41
Figura 17. Expressão relativa de EFNA4 em relação ao estilismo em paciente com câncer gástrico.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação Histológica de Laurén.....	19
Tabela 2. Estadiamento do câncer gástrico conforme AJCC 8ª edição	23
Tabela 3. Caracterização dos pacientes com câncer gástrico envolvidos no estudo.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos	15
1.1.1 Geral.....	15
1.1.2 Específicos.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 O Câncer Gástrico	16
2.2 Fisiopatologia e histologia	16
2.2.1 Classificação Histológica de Laurén.....	18
2.3 Fatores de Risco	19
2.3.1 Idade	19
2.3.2 Gênero.....	19
2.3.3 Obesidade.....	19
2.3.4 Infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	20
2.3.5 Consumo excessivo de sal	20
2.3.6 Consumo de bebidas alcoólicas	20
2.3.7 Tabagismo.....	20
2.4 Diagnóstico	21
2.4.1 Diagnóstico Clínico e Cirúrgico	21
2.4.2 Diagnóstico por Imagem.....	21
2.4.3 Diagnóstico Laboratorial	23
2.5 Tratamento	24
2.6 Classificação molecular do Câncer Gástrico	25
2.7 Transição Epitelial Mesenquimal (EMT)	26
2.7.1 EMT e Câncer	28
2.8 Receptores do Tipo Tirosina Quinase no Câncer	28
2.8.1 <i>EPHA2</i> <i>EFNA44</i>	30
2.8.2 <i>CXCL12</i> e receptores.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 População de Estudo	34
3.2 Análise Histopatológica	35
3.3 Processamento das Amostras	35
3.4 Extração do RNA	35
3.5 Análise de Expressão Gênica	36
3.6 Análise Estatística	37
4 RESULTADOS	37
4.1 Caracterização dos pacientes	37
4.2 Análise de expressão do gene <i>EPHA2</i> em pacientes com câncer gástrico	38
4.3 Análise de expressão do gene <i>EFNA4</i> em pacientes com câncer gástrico	41
4.4 Análise de expressão do gene <i>CXCL12</i> em pacientes com câncer gástrico	42
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	45

REFERÊNCIAS.....	47
LISTA DE ABREVIÇÕES.....	52
ANEXO A.....	53
ANEXO B.....	54

1 INTRODUÇÃO

O câncer de estômago (CG) é a quinta neoplasia mais comum no mundo, com uma estimativa de mais de um milhão de novos casos anualmente. Este câncer é a quarta causa mais comum de morte relacionada ao câncer mundialmente. No Brasil, o câncer gástrico é o terceiro tipo mais frequente entre homens e o quinto entre as mulheres (INCA, 2021).

Em vários tipos de câncer, os receptores tirosina quinase (RTKs) quando ativados desempenham funções importantes no controle de processos fundamentais para o metabolismo da célula como crescimento, diferenciação, adesão, migração e apoptose (ROBINSON; WU, Y.-M.; LIN, 2000). No câncer gástrico, estudos relatam a superexpressão de RTKs, como ERBB2, c-Met, FGFR2, VEGFR, PDGFR, EGFR e HER-2 (LEMMON; SCHLESSINGER, 2011; MORISHITA; GONG, J.; MASAKI, 2014). A cascata de sinalização intracelular destes receptores, podem convergir para a ativação de fatores de transcrição que desencadeiam o processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT).

O processo de EMT é de extrema importância no microambiente tumoral, na regulação da proliferação celular, progressão e metástase de células tumorais (RIBATTI; TAMMA; ANNESE, 2020). Os eventos que ocorrem durante a EMT incluem a perda das junções aderentes das células e inibição da expressão de E-caderina, que é um marcador epitelial específico, o aumento de marcadores mesenquimais, como fibronectina, N-caderina e vimentina, a aquisição de um fenótipo invasivo fibroblastóide, e a resistência à apoptose (RIBATTI; TAMMA; ANNESE, 2020).

A carcinogênese no estômago, tem estreita relação com a EMT. Além disso, foi demonstrado que no tecido gástrico de pacientes com câncer, a expressão de E-caderina é significativamente menor do que nos tecidos normais adjacentes, estando associada com o grau de malignidade (LIU, A. N. et al., 2012). O receptor hepatocelular produtor de eritropoietina 2 (EPHA2) está envolvido em diversos processos biológicos como proliferação celular, diferenciação, e transição epitelial-mesenquimal no câncer (HUANG *et al.*, 2014). Em paralelo, a efrina A-4 (EFNA4) é um dos ligantes dos receptores EPHA, e vem sendo observada em diversos tipos de neoplasias (LIN, J. *et al.*, 2021). O ligante de quimiocina de motivo CXC 12 (CXCL12), já vem sendo correlacionado com a angiogênese e invasão no câncer e transição epitelial-mesenquimal (TEICHER; FRICKER, 2010).

Um dos desafios no combate do CG, é que ele pode ser assintomático, até mesmo na sua fase mais avançada, já com metástase e é uma doença que não tem sintomas patognomônicos, o que dificulta o diagnóstico precoce já que a endoscopia digestiva alta só é indicada para pacientes com sintomas. Por isso é comum que a doença seja identificada já em estado avançado. Uma alternativa que poderia auxiliar no diagnóstico precoce, é a dosagem

de Clique ou toque aqui para inserir o texto.marcadores no sangue, que é um método simples, menos invasivo do que a endoscopia. Porém, os biomarcadores utilizados atualmente têm baixa sensibilidade e especificidade para a detecção precoce de CG (BRASIL, 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), para que seja feita a identificação precoce de cânceres agressivos é necessária uma melhor sensibilidade e implementação de biomarcadores representativos da heterogeneidade do tumor, ou seja, moléculas que possam ser quantificadas e que indiquem a presença do tumor ainda no início do seu desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Já se sabe que em pacientes com câncer gástrico existe uma associação entre os RTKs com expressão gênica desregulada e a EMT, e que estes receptores possuem um potencial para funcionarem como biomarcadores de detecção precoce do câncer, invasão e metástase (KANG, E. *et al.*, 2021). Assim, um grande esforço tem sido dedicado à exploração de novas moléculas para detectar os primeiros sinais da doença e os indícios de metástase. Além do diagnóstico precoce, a identificação de novos biomarcadores é importante para a compreensão da relação entre os processos biológicos mensuráveis e os resultados clínicos, que são essenciais para iniciar o tratamento adequado para o câncer gástrico o mais cedo possível.

No câncer gástrico, a superexpressão do gene EPHA2, um receptor do tipo tirosina quinase, tem sido associada à EMT, metástase e ao aumento de marcadores mesenquimais (YUAN, Weijie *et al.*, 2009) O gene EFNA4 codifica uma proteína ligante do receptor EPHA2, molécula que possui um papel importante na regulação da carcinogênese, angiogênese, agressividade do tumor, metástase e prognóstico (IEGUCHI; MARU, 2021; LEITE *et al.*, 2020). Em vários tipos de câncer, CXCL12 é um gene que codifica uma quimiocina com o mesmo nome, que desempenha o papel recrutamento de células que expressam o gene CXCR4, cuja sinalização favorece o surgimento de novos vasos sanguíneos, aumenta o aporte de nutrientes e contribui para o crescimento do tumor (PETIT; JIN, D.; RAFII, 2007).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é caracterizar a expressão dos genes EPHA2, EFNA4 e CXCL12 em amostras de tecido gástrico de pacientes com câncer e correlacionar com as características clínicas dos pacientes, com intuito de investigar o potencial desses genes como biomarcadores do câncer gástrico em seu estágio inicial e/ou metástase.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Caracterizar a expressão dos genes EPHA2 e seu ligante EFNA4, além do gene CXCL12, envolvidos no processo de transição epitelial-mesenquimal no câncer gástrico e correlacionar com os dados clínicos do paciente.

1.1.2 Específicos

- Selecionar os receptores do tipo tirosina quinase envolvidos no câncer gástrico e no processo de transição epitelial-mesenquimal, descritos na literatura;
- Determinar a expressão dos genes no tecido gástrico de pacientes com CG e voluntários saudáveis;
- Avaliar a correlação da expressão destes genes com características clínicas dos pacientes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Câncer Gástrico

O câncer gástrico (CG) é uma doença relevante a nível mundial, sendo a quinta neoplasia mais comum no mundo, com uma estimativa de mais de um milhão de novos casos anualmente. No Brasil, o câncer gástrico é o terceiro tipo mais frequente entre homens e o quinto entre as mulheres (INCA, 2022). Este câncer é duas vezes mais incidente em homens do que em mulheres (SMYTH *et al.*, 2020), e o diagnóstico é feito frequentemente em estágios avançados. Devido a isso, o câncer gástrico é a quarta causa mais comum de morte relacionada a câncer mundialmente, com uma estimativa de 768.000 mortes em 2020 ao redor do mundo (SUNG *et al.*, 2021).

As taxas de incidência de novos casos e de mortalidade para câncer gástrico são mais críticas na Ásia Oriental, Europa Oriental e América do Sul (FERLAY *et al.*, 2020). Houve uma diminuição das taxas de incidência em muitos países devido a melhoria das condições associadas ao desenvolvimento econômico. Porém, com o envelhecimento da população é possível que o número de casos de câncer gástrico aumente no futuro (SMYTH *et al.*, 2020).

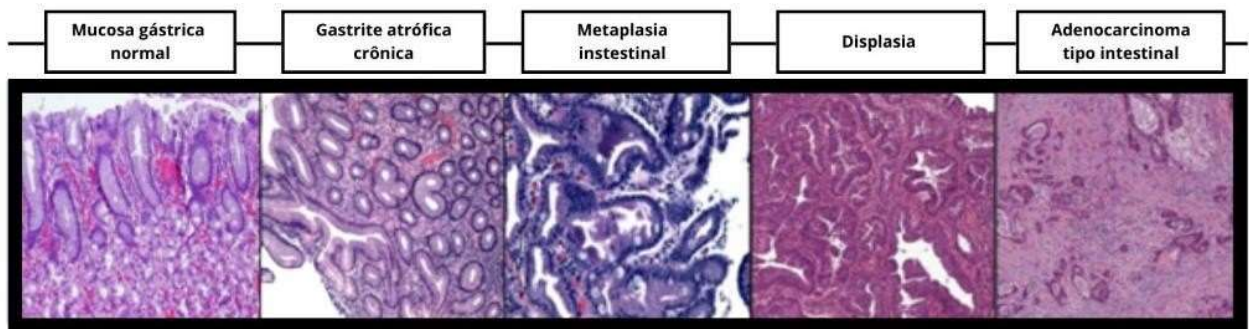
O tipo histológico mais comum do câncer gástrico, é o adenocarcinoma, que corresponde a 95% dos casos de neoplasia maligna do estômago, e o restante correspondem a linfomas, sarcomas e tumores de outros padrões histológicos (INCA, 2022). O presente estudo se restringirá ao tipo histológico adenocarcinoma gástrico, utilizando “câncer gástrico” como sinônimo.

2.2 Fisiopatologia e histologia

Em 1992, Correa propôs um modelo de cascata que mostra que a carcinogênese gástrica é um processo que envolve uma sequência de alterações histológicas que resultam no adenocarcinoma de estômago do tipo intestinal. Esse processo se inicia com gastrite crônica, depois, atrofia, metaplasia intestinal, podendo ou não levar a uma displasia, e consequentemente o câncer. Esse processo tem como gatilho inicial a gastrite atrófica causada pela infecção por *Helicobacter pylori* (**Figura 1a**) (BAJ *et al.*, 2020).

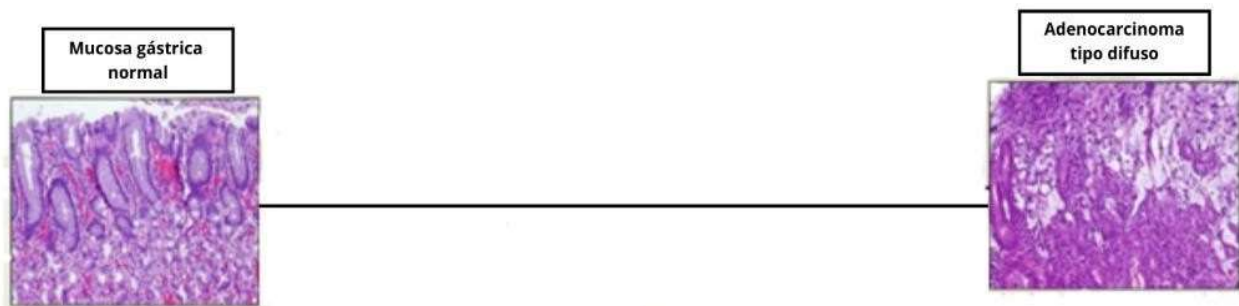
O adenocarcinoma gástrico também pode se desenvolver sem que haja uma infecção por *Helicobacter pylori* precedente, porém esse tipo de lesão possui características histológicas diferentes, como por exemplo, um número maior de células pouco diferenciadas e por isso é denominado adenocarcinoma gástrico do tipo difuso (**Figura 1b**) (BAJ *et al.*, 2020).

Figura 1a. Cascata de Correa para adenocarcinoma do tipo intestinal



Fonte: Adaptado pelo autor. (BAJ *et al.*, 2020)

Figura 1b. Cascata de Correa para adenocarcinoma do tipo difuso

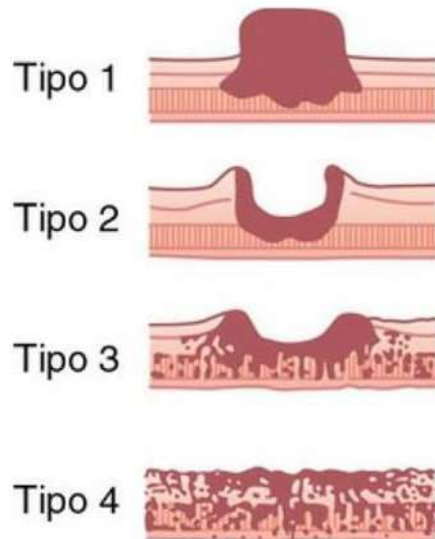


Fonte: Adaptado pelo autor. (BAJ *et al.*, 2020)

No câncer gástrico em seu estágio inicial, a aparência macroscópica é dividida em protusa (tipo I), superficial (tipo II), e escavada (tipo III). As lesões superficiais são subdivididas em elevada, plana ou deprimida (MURAKAMI, 1971). Já para o câncer gástrico avançado, temos a classificação de Borrmann (**Figura 2**) que divide a lesão em 4 tipos: Tipo 1 – Carcinoma Polipoide. Esta lesão é bem demarcada com áreas de tecido normal em toda a sua volta. Sobrevida média em cinco anos de 40%; tipo 2 – Carcinoma Ulcerado com margens bem demarcadas e nenhuma infiltração. Esta lesão é mais difícil de ser diferenciada da úlcera gástrica benigna somente pelo aspecto endoscópico. Sobrevida média em cinco anos de 35%; tipo 3 – Carcinoma úlcera infiltrativo com margens rasas e pouco definidas; geralmente há infiltração da submucosa, muscular própria e serosa. Esta é a apresentação mais comum do câncer gástrico no momento do diagnóstico. Sobrevida média em cinco anos de 20%; tipo 4 – Carcinoma infiltrativo difuso. Lesão difícil de ser definida.

Ela se estende por todas as camadas do estômago e em todas as direções. A extensão do tumor ultrapassa significativamente as lesões visíveis. (BORRMANN, 1926)

Figura 2. Classificação macroscópica de Borrmann



Legenda: A classificação macroscópica de Borrmann descreve o epitélio gástrico em quatro tipos: (1) Carcinoma polipoide; (2) Carcinoma ulcerado; (3) Carcinoma úlcera infiltrativo e (4) Carcinoma infiltrativo difuso. Fonte: Adaptado pelo autor. TOWNSAND *et al.*, 2017)

2.2.1 Classificação Histológica de Laurén

O câncer gástrico também é uma doença heterogênea quando se trata de suas características histológicas. Com base na classificação de Laurén, os adenocarcinomas de estômago podem ser classificados em três subtipos histológicos: I- tipo intestinal, com um padrão glandular bem definido; II- tipo difuso, infiltrativo e caracterizado pela coesão celular; e III- tipo misto, que apresenta características intermediárias entres os dois grupos (**Tabela 2**) (FUCHS *et al.*, 1995).

O subtipo intestinal é o mais comum no Brasil, localizado tipicamente no estômago distal, com ulcerações, e costuma ser precedido por lesões pré-malignas. É um tumor bem diferenciado, com formação de estruturas glandulares parecidas com as estruturas do adenocarcinoma de cólon, por isso a nomenclatura “intestinal”. Esse subtipo histológico é frequentemente associado com as características genéticas do subtipo molecular instabilidade microsatélite (MSI) (TOWNSAND *et al.*, 2017).

Em contraste, o subtipo difuso afeta mais o estômago proximal (cárdia) e tem o pior prognóstico com uma maior probabilidade de metástases, e é frequentemente associado com a perda da expressão da proteína E-caderina, que é codificada pelo gene CDH1, característica em comum com o subtipo molecular genomicamente estável (GS) (CRISTESCU *et al.*, 2015).

Esse subtipo é um tumor indiferenciado sem formações glandulares, e pode apresentar células em anel de sinete, que é quando há o acúmulo de muco no citoplasma deslocando o núcleo para a periferia.

Tabela 1. Classificação Histológica de Laurén

INTESTINAL	DIFUSO
Fatores ambientais	Familiar
Atrofia gástrica, metaplasia intestinal	Sangue tipo A
Mulheres > homens	Homes > mulheres
Aumento da incidência com a idade	Grupo etários mais jovem
Formação de glândulas	Células pouco diferenciadas, anel de sinete
Disseminação hematogênica	Disseminação linfática, transmural
Instabilidade de microssatélite (MSI)	Diminuição de E-caderina
Inativação p53, p16 e mutações no gene APC	Inativação p53, p16

Adaptado pelo autor. (TOWNSAND *et al.*, 2017).

2.3 Fatores de Risco

2.3.1 Idade

O câncer de estômago afeta, na maioria, homens entre 60 e 70 anos. No Brasil, cerca de 65% dos pacientes têm mais de 50 anos (INCA, 2022).

2.3.2 Gênero

O risco de desenvolver câncer de estômago ao longo da vida é maior em homens (cerca de 1 em 96) do que em mulheres (cerca de 1 em 152). No Brasil, o câncer de estômago é o terceiro tipo mais frequente entre homens e o quinto entre as mulheres (INCA, 2022).

2.3.3 Obesidade

O excesso de gordura corporal e a inflamação crônica que caracterizam a obesidade podem promover o desenvolvimento do câncer, devido ao aumento da produção de fatores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6 e proteína reativa C. Além disso a obesidade também aumenta os níveis de produção de hormônios como leptina e insulina, hormônios esteroides sexuais que podem promover o crescimento de células neoplásicas pelo aumento da proliferação celular e inibição da apoptose (KARIMI *et al.*, 2014).

2.3.4 Infecção por *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori é uma bactéria extracelular gram-negativa, classificada como carcinógeno classe I e é um fator etiológico de adenocarcinomas gástricos. Essa bactéria não é eliminada pelo sistema imunológico do hospedeiro e estabelece uma infecção crônica que além de inflamação também pode levar a uma gastrite atrófica que resulta em condição chamada acloridria, caracterizada pela ausência de produção de ácido clorídrico (HCl) pelo estômago. Tal condição favorece o crescimento bacteriano e a conversão de nitratos (provenientes da alimentação) em nitritos. Os nitritos combinados com fatores genéticos induzem um aumento na proliferação celular e mutações genéticas, podendo resultar em câncer (KARIMI *et al.*, 2014). A interação de longo prazo entre *Helicobacter pylori* e o epitélio gástrico humano estimula continuamente vias de sinalização associadas aos receptores tirosina quinases (RTKs) (NAUMANN *et al.*, 2017).

2.3.5 Consumo excessivo de sal

A ingestão de sal (cloreto de sódio) superior a 6 gramas por dia (equivalente a 2,4g de sódio) de todas as fontes alimentares pode causar danos e promover a inflamação e a atrofia na mucosa gástrica. Por consequência, podem aumentar a colonização por *Helicobacter pylori* nos indivíduos que já são portadores dessa bactéria, que é um fator de risco para câncer (KARIMI *et al.*, 2014).

2.3.6 Consumo de bebidas alcoólicas

Quando ingerido, o álcool (etanol) é convertido no organismo em um metabólito chamado acetaldeído. Tanto o etanol quanto o acetaldeído são agentes carcinogêneos desencadeiam a produção de prostaglandinas, a peroxidação lipídica e a produção de radicais livres. Além disso, o etanol age como solvente podendo facilitar a entrada de outras substâncias carcinogêneas nas células (KARIMI *et al.*, 2014).

2.3.7 Tabagismo

O cigarro além de conter nicotina e alcatrão, concentra 60 substâncias cancerígenas, tais como arsênio, níquel, benzopireno, cádmio, chumbo, e até mesmo substâncias radioativas e resíduos de agrotóxicos. O tabagismo está associado à diversas doenças, inclusive úlcera gastrointestinal e câncer de estômago (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020)

2.4 Diagnóstico

Para o controle do câncer, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda ações de prevenção, por meio de hábitos saudáveis, e detecção precoce. A primeira estratégia de detecção é o rastreamento, que tem como população-alvo pessoas que não apresentam sinais e sintomas sugestivos e o objetivo é detectar o câncer pré-clínico ou as lesões pré-cancerígenas, através de exames de rotina. A segunda estratégia é o diagnóstico precoce, que tem como objetivo identificar o câncer em estágio inicial em pessoas que apresentam sinais e sintomas suspeitos da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

2.4.1 Diagnóstico Clínico e Cirúrgico

O rastreamento do câncer de estômago é uma medida adotada pelo Japão e pela Coreia do Sul, países onde o CG é mais incidente, e pode ser feito por endoscopia digestiva alta ou por radiografia (HAMASHIMA, 2018). No Brasil, de acordo com as Diretrizes da Associação Brasileira de Câncer Gástrico (ABCG), a endoscopia digestiva alta com biópsia de lesões suspeitas é recomendada para pacientes com sintomas de CG (pirose, regurgitação, perda de peso e apetite, dispepsia, disfagia, epigastralgia e massa em abdômen superior) com o objetivo de realizar um diagnóstico precoce e não como um exame de rotina para rastreio (BARCHI *et al.*, 2020; INCA, 2022).

Porém, o CG pode ser assintomático, até mesmo na sua fase mais avançada, já com metástase e é uma doença que não tem sintomas patognomônicos, o que dificulta o diagnóstico precoce. Por isso é comum que a doença seja identificada já em estado avançado (BRASIL, 2018).

2.4.2 Diagnóstico por Imagem

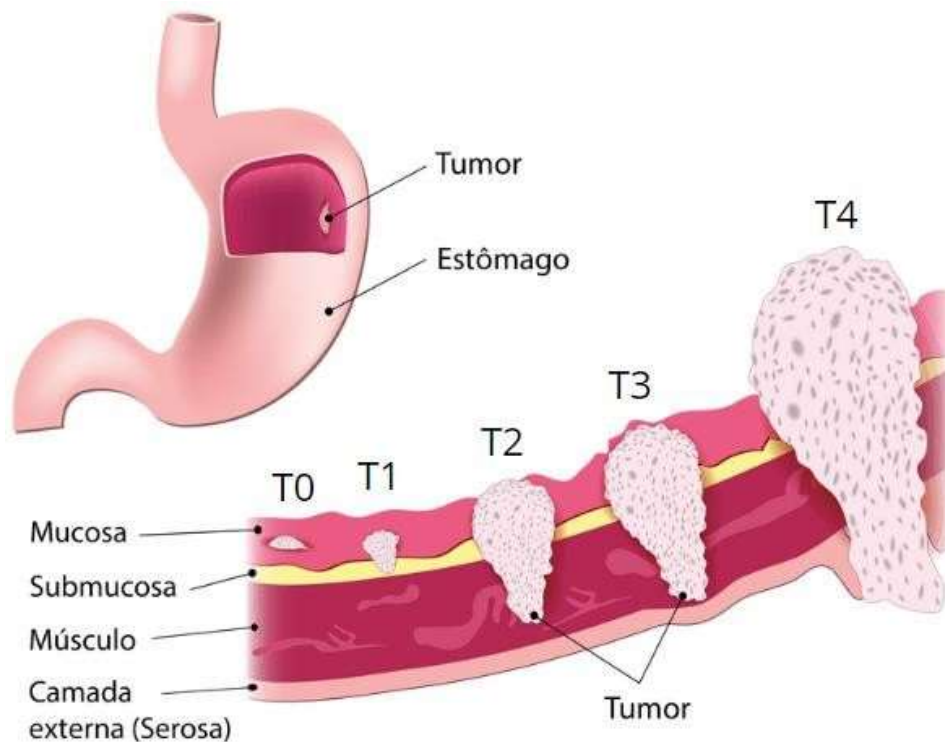
Após o diagnóstico histopatológico, deve ser realizada a tomografia computadorizada do tórax e do abdômen, com contraste oral e venoso para definir o estadiamento e direcionar o tratamento. A ultrassonografia endoscópica (também chamada de ecoendoscopia) também pode ser feita auxiliar na avaliação da extensão da doença (BRASIL, 2018).

2.4.2.1 Estadiamento

A classificação clínica de estadiamento para o adenocarcinoma gástrico mais aceita é a da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que utiliza o sistema TNM. Esse sistema desenvolvido e publicado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T) (**Figura 3**), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases a distância (M). Os

parâmetros TNM recebem graduações que expressam o nível de evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos. As combinações dos parâmetros se distribuem em estádios que variam de I a IV, que são subclassificados em A, B e C para expressar o nível de evolução da doença (**Tabela 1**) (BRASIL, 2018; INCA, 2021).

Figura 3. Classificação do Tumor Primário



Legenda: A figura ilustra a classificação dos estágios do tumor primário de acordo com o grau de comprometimento das camadas de tecido do estômago. T0-Sem evidência do tumor primário; T1-Tumor invade a camada mucosa e/ou submucosa; T2- Tumor invade a camada muscular própria; T3-Tumor invade a camada subserosa e T4- Tumor perfura a serosa e/ou invade estruturas adjacentes.

Fonte: Adaptado de *National Cancer Institute*.

Tabela 2. Estadiamento do câncer gástrico conforme AJCC 8ª edição

Resumo da classificação clínica TNM			
Tx	O tumor não pode ser avaliado.	NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
T0	Sem evidência de tumor primário.	N0	Sem invasão linfática regional.
Tis	Tumor <i>in situ</i> /displasia de alto grau: tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria.	N1	1 a 2 linfonodos regionais acometidos.
T1	O tumor invade a lâmina própria ou muscular da mucosa (T1a) ou submucosa (T1b).	N2	3 a 6 linfonodos regionais acometidos.
T2	O tumor invade a muscular própria.	N3	7 ou mais linfonodos regionais acometidos.
T3	O tumor invade a subserosa.	N3a	7 a 15 linfonodos regionais acometidos.
T4	O tumor perfura a serosa (T4a) ou invade estruturas adjacentes (T4b).	N3b	16 ou mais linfonodos regionais acometidos.
M0 Sem metástase à distância			
M1 Metástase à distância			
Grupamento por estádios patológicos			
EC 0	Tis	N0	M0
EC IA	T1	N0	M0
EC IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
EC IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
EC IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3a	M0
EC IIIA	T4a	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3a	M0
	T4b	N0	M0
EC IIIB	T4b	N1- N2	M0
	T4a	N3a	M0
	T3	N3a	M0
	T2	N3b	M0
	T1	N3b	M0
EC IIIC	T4a	N3b	M0
	T4b	N3a	M0
	T4b	N3b	M0
	T3	N3b	M0
EC IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Adenocarcinoma de Estômago (Brasil, 2018).

2.4.3 Diagnóstico Laboratorial

Além dos exames laboratoriais realizados para avaliar as condições clínicas do paciente, também podem ser medidos os níveis dos marcadores tumorais: antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno cancerígeno (CA) 19-9, e CA 72-4. A dosagem desses marcadores no sangue é um método simples, menos invasivo do que a endoscopia e a elevação dos níveis séricos desses biomarcadores são indicativos de doença extensa e de pior

prognóstico. Porém, esses exames só são feitos após o paciente se queixar de sintomas e esses marcadores não se encontram elevados apenas no câncer de estômago (BRASIL, 2018).

O nível de CEA pode estar aumentado nos carcinomas de colorretal, pancreático, pulmonar, gástrico e mamário. O CA 19-9 é mais usado para câncer de pâncreas, e pode estar presente em no câncer de colorretal, câncer gástrico e câncer de bexiga. Mas também pode estar aumentado em outras doenças benignas como pancreatite e colelitíase. CA 72-4 além de estar presente no câncer gástrico também pode estar presente nos cânceres de mama, de colorretal e de pâncreas (ZHENG, 2018).

No estudo realizado por Yu e colaboradores, foi demonstrado que esses marcadores têm baixa sensibilidade e especificidade. Além disso, quanto mais avançado o estadiamento, maior os níveis séricos desses biomarcadores, no entanto, a taxa de positividade do teste diminui quando o estadiamento TNM é menos avançado (YU, J.; ZHENG, 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), para que seja feita a identificação precoce de cânceres agressivos é necessária uma melhor sensibilidade e implementação de biomarcadores representativos da heterogeneidade do tumor, ou seja, moléculas que possam ser quantificadas e que indiquem a presença do tumor ainda no início do seu desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Assim, um grande esforço tem sido dedicado à exploração de novas moléculas para detectar os primeiros sinais da doença e os indícios de metástase. Além do diagnóstico precoce, a identificação de novos biomarcadores é importante para a compreensão da relação entre os processos biológicos mensuráveis e os resultados clínicos, que são essenciais para iniciar o tratamento adequado para o câncer gástrico o mais cedo possível.

2.5 Tratamento

Um dos desafios no combate ao câncer gástrico, é que apesar do crescente progresso no desenvolvimento de medicamentos, o CG tem um prognóstico ruim decorrente da heterogeneidade molecular, que dificulta a escolha da melhor alternativa terapêutica (BONELLI *et al.*, 2019).

De forma geral, o tratamento se dá por ressecção cirúrgica, às vezes combinada com quimioterapia e/ou radioterapia, depende do estadiamento do paciente. A cirurgia consiste na remoção de grande parte ou de todo o estômago e talvez dos linfonodos regionais (< 50% dos pacientes), se estiverem acometidos. A quimioterapia adjuvante ou a combinação de quimio e radioterapia depois da cirurgia podem ser benéficas, se o tumor for ressecável.

Metástase ou envolvimento nodal extenso inviabiliza a cirurgia curativa e, resta apenas a opção de cuidados paliativos. A cirurgia paliativa, diferente da curativa, consiste em

gastroenterostomia para que o trânsito seja mantido e deve ser realizada somente se isso for benéfico a qualidade de vida do paciente.

Em pacientes não submetidos à cirurgia, tratamento com quimioterapêuticos combinados (5-fluorouracila, capecitabina, doxorrubicina, mitomicina, cisplatina, oxaliplatina, irinotecano, paclitaxel, docetaxel ou leucovorina em várias combinações) podem produzir resposta temporária, mas pouca melhora na sobrevida em 5 anos. Recentemente, tem sido utilizado um tratamento direcionado com trastuzumabe para tumores com uma expressão do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (tumores HER2+) aumentada e ramucirumabe (inibidor do fator de crescimento endotelial vascular VEGF) junto com a quimioterapia no câncer avançado (National Comprehensive Cancer Network, [s.d.]).

A imunoterapia como com pembrolizumabe foi aprovada para uso em pacientes com câncer gástrico avançado ou metastático que apresentam uma expressão do ligante 1 da morte celular programada (PD-L1). Inibidores do receptor de morte celular programada 1 (p. ex., nivolumabe) estão aprovados para uso fora dos EUA para pacientes com câncer gástrico avançado (National Comprehensive Cancer Network, [s.d.]).

2.6 Classificação molecular do Câncer Gástrico

Os sistemas de classificação molecular de referência publicados pelo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e o *Asian Cancer Research Group* (ACRG) estabeleceram vários subtipos de CG associados a características clínicas e moleculares distintas. Esses sistemas de classificação propõem uma estrutura de subtipagem molecular que permite o desenvolvimento e a aplicação de terapias direcionadas para o perfil molecular de cada paciente (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014; CRISTESCU *et al.*, 2015).

A classificação do TCGA dividiu o câncer gástrico em 4 subtipos moleculares: Epstein-Barr virus positivo (EBV+), instabilidade microssatélite (MSI), genômica estável (GS) e instabilidade cromossômica (CIN), sendo esses dois últimos grupos diferenciados pelo grau de aneuploidia (**Figura 4**).

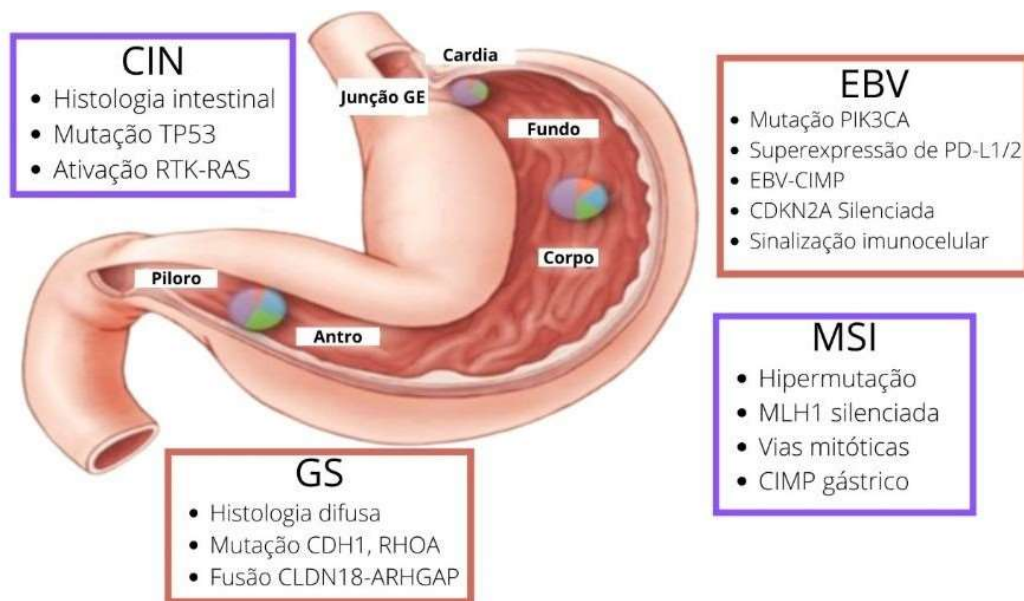
Os tumores EBV+ apresentaram mutações no gene PIK3CA e frequentemente uma amplificação nos genes JAK2 e ERBB2, e foram encontrados em maior parte no fundo e no corpo do estômago. Também foi observado um aumento da expressão de PD-L1 e PD-L2, e uma sinalização mediada por IL-12 que sugere uma atuação da imunidade celular.

O subtipo MSI no câncer gástrico, não consta com mutações no gene BRAF V600E, ao contrário do que é frequentemente observado no câncer de colorretal MSI, mas apresentou mutações nos genes PIK3CA, ERBB2, ERBB3 e EGFR. Também foi observado que este

subtipo tem hipermetilação na região promotora do gene *MLH1*, o que leva ao silenciamento desse gene.

Os tumores do subtipo GS foram associados ao subtipo histológico difuso, mutações no gene *RHOA* que modula a morte celular programada, e à presença da fusão dos genes *CLDN18-ARHGAP6* envolvidos na estrutura das junções intercelulares oclusivas. Essas alterações podem contribuir para a ausência de coesão celular, para o crescimento disperso e resistência a morte celular programada. Já o subtipo CIN, apresentou uma alta frequência de mutações *TP53* e de amplificação de genes de receptores do tipo tirosina quinase (RTKs), como por exemplo *VEGFR2* e outros receptores que já são alvos de terapias atuais ou em desenvolvimento (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014b). Além disso, esse subtipo foi mais frequente na junção gástrica (GE) e associando a uma histologia do tipo intestinal.

Figura 4. Distribuição dos subtipos moleculares de câncer gástrico e suas características, em relação as partes do estômago.



Fonte: Adaptado pelo autor (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014).

2.7 Transição Epitelial Mesenquimal (EMT)

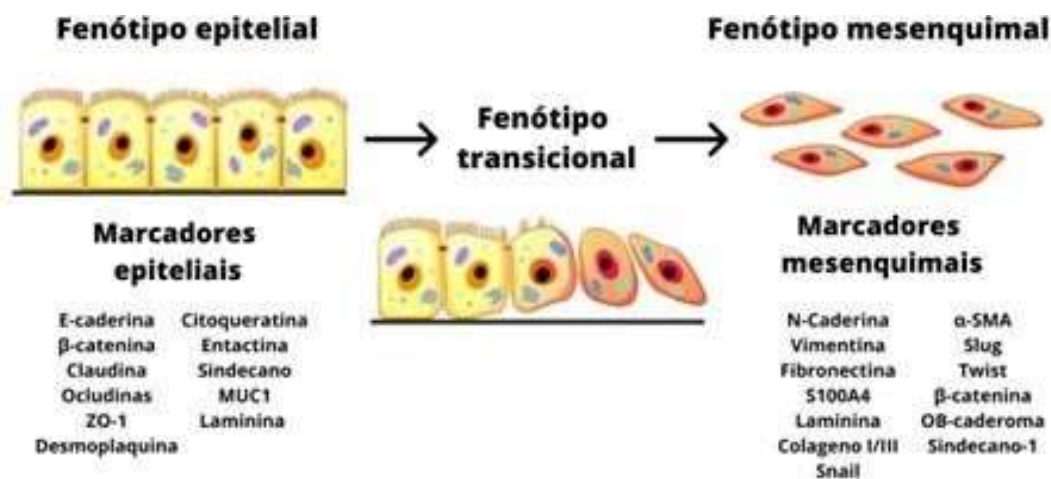
EMT é o termo usado para o processo em que as células epiteliais adquirem um fenótipo mesenquimal, principalmente pela perda de adesão intracelular e capacidade de proliferação (**Figura 5**) (SANNINO *et al.*, 2017).

Durante o processo, várias reações bioquímicas levam a alterações na morfologia das células epiteliais, principalmente a perda de polaridade celular (BURE; NEMTSOVA;

ZALETAEV, 2019; THUAULT *et al.*, 2006). O citoesqueleto passa por uma reorganização, e a célula que antes era colunar adquire um formato fusiforme (REVENU; GILMOUR, 2009; YANG, J.; WEINBERG, 2008). Também ocorre uma mudança no padrão dos marcadores expressos pelas células.

A expressão de E-caderina diminui, em função do aumento da expressão da caderina neural (N-caderina), o que altera as estruturas de ligação intercelulares, incluindo desmossomas. Outros marcadores epiteliais também têm sua expressão significativamente reduzida, como citoqueratina, laminina-1, desmoplacina ou zona oclusiva 1 (ZO-1). Em contrapartida, aumenta a expressão de marcadores mesenquimais como vimentina, fibronectina, e dos fatores de transcrição TWIST, SLUG, SNAIL e α -SMA (FUCHS *et al.*, 2019; PENG *et al.*, 2014; RAJA *et al.*, 2017; REPETTO *et al.*, 2014).

Figura 5. O processo de transcrição epitelial-mesenquimal e seus marcadores fenotípicos



Fonte: Adaptado pelo autor (BAJ *et al.*, 2020).

A EMT pode ocorrer em três cenários: I- durante o desenvolvimento embrionários, II- associado com a regeneração do tecido adulto e III- na progressão do câncer. O processo fisiológico que ocorre durante o desenvolvimento embrionário é bem regulado, enquanto a EMT que ocorre durante a progressão do câncer é altamente desregulada. Esse fenômeno tem sido observado durante a carcinogênese do câncer de mama, câncer de tireoide, carcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de colorretal e câncer de estômago (BAJ *et al.*, 2020; FEDELE; CERCHIA; CHIAPPETTA, 2017; GAŠPAROVIĆ *et al.*, 2019; PEGORARO *et al.*, 2013; PENG *et al.*, 2014).

Entre os fatores de transcrição envolvidos no processo, TWIST, ZEB1 E ZEB2 estão envolvidos principalmente na aquisição do fenótipo mesenquimal invasivo (RIBATTI; TAMMA; ANNESE, 2020).

2.7.1 EMT e Câncer

O processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT) é de extrema importância no microambiente tumoral, na regulação da proliferação celular, progressão e metástase de células tumorais. Várias vias de transdução de sinalização em resposta a sinais do microambiente, como hipóxia, estresse oxidativo, privação de nutrientes e principalmente inflamação, são responsáveis por induzir e sustentar o fenótipo mesenquimal da célula tumoral (RIBATTI; TAMMA; ANNESE, 2020).

A desregulação da EMT, induz nas células cancerígenas a capacidade de expressão de genes relacionados à quimio-resistência, o que resulta em um tumor resistente a várias drogas utilizadas para o tratamento do câncer. Além disso, as células adquirem propriedades migratórias e invasivas. Por essa razão, a EMT é considerada um processo importante na infiltração local do tumor e metástase à distância (CRAENE; BERX, 2013; XU, J.; LAMOUILLE; DERYNCK, 2009).

A carcinogênese no estômago, tem estreita relação com a EMT. Os níveis do fator de crescimento beta tipo 1 (TGF- β 1, sigla derivada do termo em inglês, *transforming growth factor* beta 1), do marcador mesenquimal vimentina e dos fatores de transcrição TWIST, SNAIL, SLUG apresentam-se regulados positivamente em pacientes com displasia ou câncer gástrico em estágio inicial, enquanto o nível de E-caderina está diminuído nesses pacientes (CHOI, Y. J. *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado que no tecido gástrico de pacientes com câncer, a expressão de E-caderina é significativamente menor do que nos tecidos normais adjacentes, estando associada com o grau de malignidade (LIU, A. N. *et al.*, 2012).

A expressão reduzida do TWIST está associada ao aumento da E-caderina, enquanto a expressão de ZEB-1 está significativamente correlacionada com o fenótipo mesenquimal no câncer gástrico. A expressão da vimentina, marcador mesenquimal, está diretamente ligada com o crescimento tumoral, invasão e prognóstico ruim e é expressa em altos níveis em vários tumores epiteliais, como câncer de mama, câncer de próstata, melanoma e câncer de pulmão (SANNINO *et al.*, 2017b).

2.8 Receptores do Tipo Tirosina Quinase no Câncer

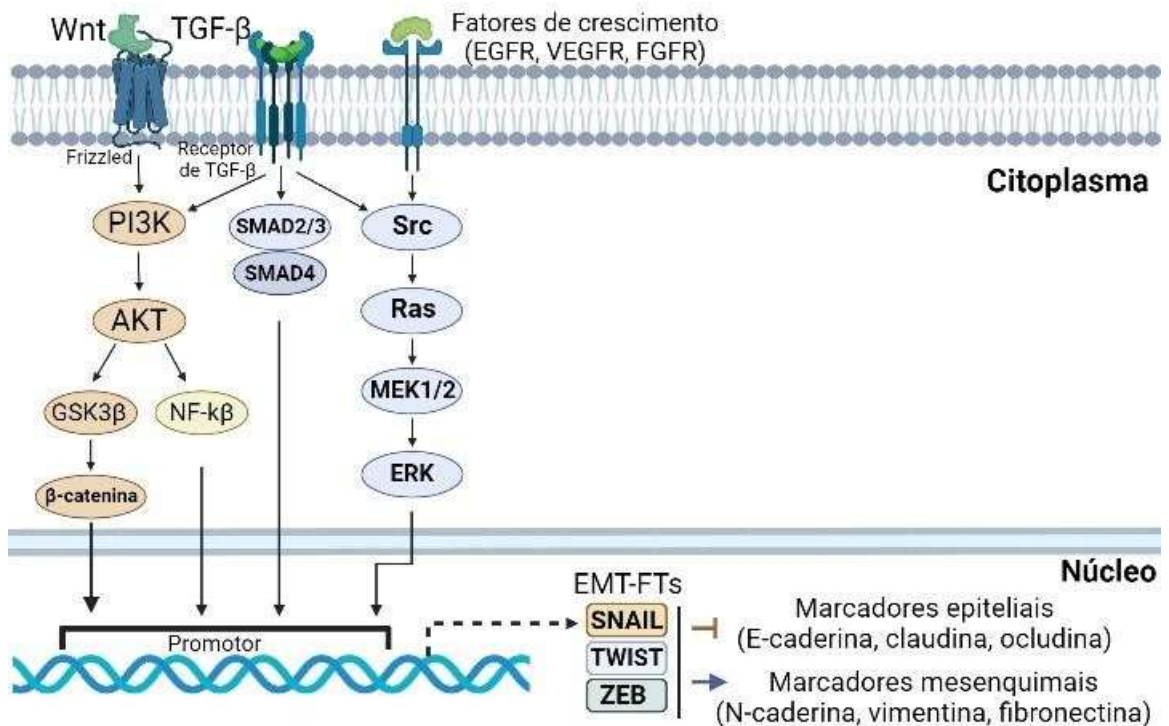
Em vários tipos de câncer, o aumento da expressão e da ativação de receptores tirosina quinase (RTKs) foram relatadas como sendo associadas a diversas vias de sinalização que são

ativadas por meio da dimerização desses receptores. Os RTKs são proteínas que possuem domínios extracelulares de ligação aos ligantes, um domínio transmembrana e um motivo tirosina quinase que quando ativados desempenham funções importantes no controle de processos fundamentais para o metabolismo da célula como crescimento, diferenciação, adesão, migração e apoptose (ROBINSON; WU, Y.-M.; LIN, S.-F., 2000).

No câncer gástrico, estudos relatam a superexpressão de RTKs, como ERBB2, c-Met, FGFR2, VEGFR, PDGFR, EGFR e HER-2. Num estudo realizado por Deng e colaboradores o status de amplificação de RTKs mostrou ser um marcador independente de mau prognóstico em pacientes com câncer gástrico, independente da instabilidade cromossômica (DENG, N. *et al.*, 2012; LEMMON; SCHLESSINGER, 2011).

A cascata de sinalização intracelular destes receptores, podem convergir para a ativação de fatores de transcrição que desencadeiam o processo de transição epitelial-mesenquimal. Por exemplo, o crosstalk de sinalização entre EGFR e TGF- β 1 via Wnt pode induzir a diminuição da expressão de E-caderina e ao aumento da expressão de marcadores mesenquimais (SLUG, α -SMA, N-caderina e vimentina), regulando positivamente a EMT (Figura 6) (KANNAN *et al.*, 2014).

Figura 6. Vias de sinalização de TGF- β e EGFR e a transição epitelial-mesenquimal



Legenda: As vias de sinalização de EGFR e TGF- β 1 via Wnt, já conhecidas da EMT. Suas interações coordenadas ligam-se a regiões promotoras do DNA levando à expressão de EMT-Fts (fatores de transcrição da EMT) que desempenham um papel fundamental na regulação da expressão de seus

genes-alvo relacionados a EMT e metástases de câncer. Fonte: Adaptado pelo autor (KANG, E. *et al.*, 2021)

Considerando o protagonismo dos receptores do tipo tirosina quinase no desenvolvimento das células tumorais e a importância do processo de transição epitelial-mesenquimal no aparecimento e na metástase do câncer. Já se sabe que em pacientes com câncer gástrico existe uma associação entre os RTKs com expressão gênica desregulada e a EMT, e que estes receptores possuem um potencial para funcionarem como biomarcadores de detecção precoce do câncer, invasão e metástase (KANG, E. *et al.*, 2021).

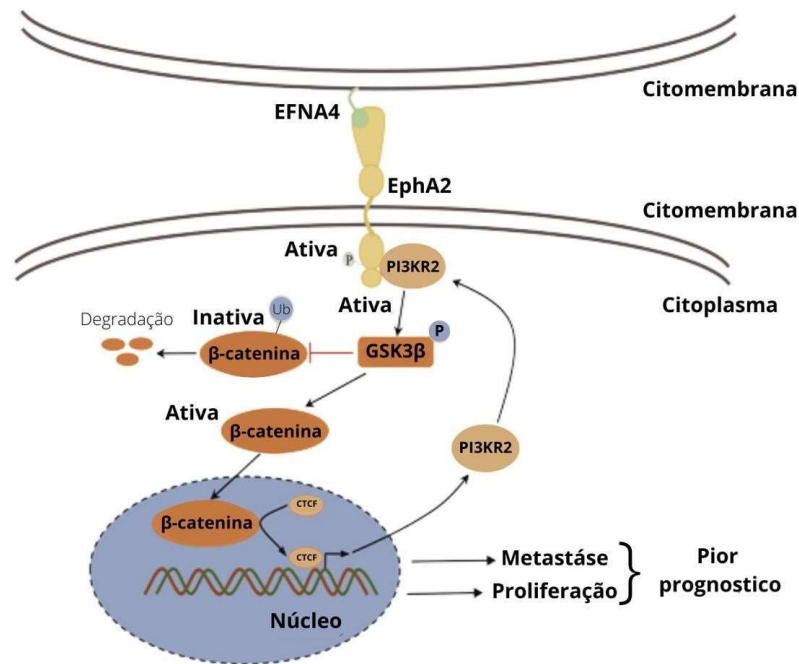
2.8.1 EPHA2 EFNA4

O EPHA2 (receptor hepatocelular produtor de eritropoietina 2) faz parte de uma das maiores famílias de RTKs em humanos, que é formada por catorze receptores divididos em receptores de classe A (EPHA1 – EPHA8, e EPHA10), e os receptores de classe B (EPHB1 – EPHB4 e EPHB6). Diferente de outros RTKs, tanto os receptores quanto os ligantes dessa família são ancorados na membrana, o que permite uma sinalização bidirecional em células que expressam EPH e efrinas (EFNs) após contato célula-célula (KULLANDER; KLEIN, 2002).

O EPHA2 e os demais receptores da mesma família, se ligam aos ligantes correspondentes e ativam a tirosina quinase na porção citoplasmática do receptor alterando a conformação do EPH e ativando a fosforilação do receptor e da sinalização a jusante. Os ligantes são divididos em dois tipos Efrina A (EFNA1 – EFNA5) e Efrina B (EFNB1 – EFNB3), de acordo com as diferenças de homologia, domínio estrutural e afinidade de sequência gênica. As efrinas têm sido investigadas nos últimos anos, pelos seus papéis na regulação da carcinogênese, angiogênese, agressividade do tumor, metástase e prognóstico (IEGUCHI; MARU, 2021; LEITE *et al.*, 2020).

O EFNA4 é um ligante quando superexpresso, afeta a via PIK3R2/GSK3 β / β -catenina que promove a proliferação e a migração no carcinoma hepatocelular (**Figura 7**) (LIN, J. *et al.*, 2021). Essa mesma via de sinalização também está envolvida com a EMT no câncer gástrico (HUANG; XIAO; LI, G.; MA, J.; CHEN, P.; YUAN, W.; *et al.*, 2014). Sendo assim é possível que haja a indução de EMT pela ligação de EFNA4 e EPHA2 em pacientes com câncer gástrico.

Figura 7. Sinalização da via EFNA4/EPHA2 no carcinoma hepatocelular.



Legenda: A superexpressão de EFNA4 ativaria EPHA2 por fosforilação. Além disso, PI3KR2 interage com EPHA2 e promove a fosforilação de GSK3β, acelerando assim o transporte de β-catenina para o núcleo e ativando CTCF, o que leva a um aumento de PI3KR2, alimentando o feedback positivo da via. Fonte: Adaptado pelo autor. (LIN, J. et al., 2021)

Os receptores EPH são expressos na maioria dos tecidos durante a embriogênese (SUGIMURA, 2010). O eixo de sinalização EPH/ EFN está envolvido em diversos processos biológicos como brotamento capilar, proliferação celular, diferenciação, morfogênese, neurogênese, adesão, migração e morte (HONG *et al.*, 2018; STROZEN *et al.*, 2021; YIN *et al.*, 2020).

Vários estudos sugerem que o EPHA2 é superexpresso em vários tipos de tumores sólidos, tanto em linhagens celulares quanto em amostras de tumores primários. No câncer gástrico, a superexpressão de EPHA2 tem sido associada à EMT, metástase e prognóstico ruim (YUAN, Weijie *et al.*, 2009). Um estudo realizado por Huang e colaboradores, evidenciou que a superexpressão de EPHA2 resulta no aumento da expressão de N-caderina e SNAIL, via Wnt/β-catenina e se correlaciona com a perda de marcadores epiteliais (HUANG; XIAO; LI, G.; MA, J.; CHEN, P.; YUAN, W.; *et al.*, 2014). Esses achados corroboraram com um estudo anterior, que demonstrou que em pacientes com adenocarcinoma gástrico, a expressão de E-caderina estava diminuída, enquanto a expressão de EPHA2 estava aumentada nos tecidos tumorais em comparação com a mucosa normal do estômago (YUAN, Weijie *et al.*, 2009).

2.8.2 CXCL12 e receptores

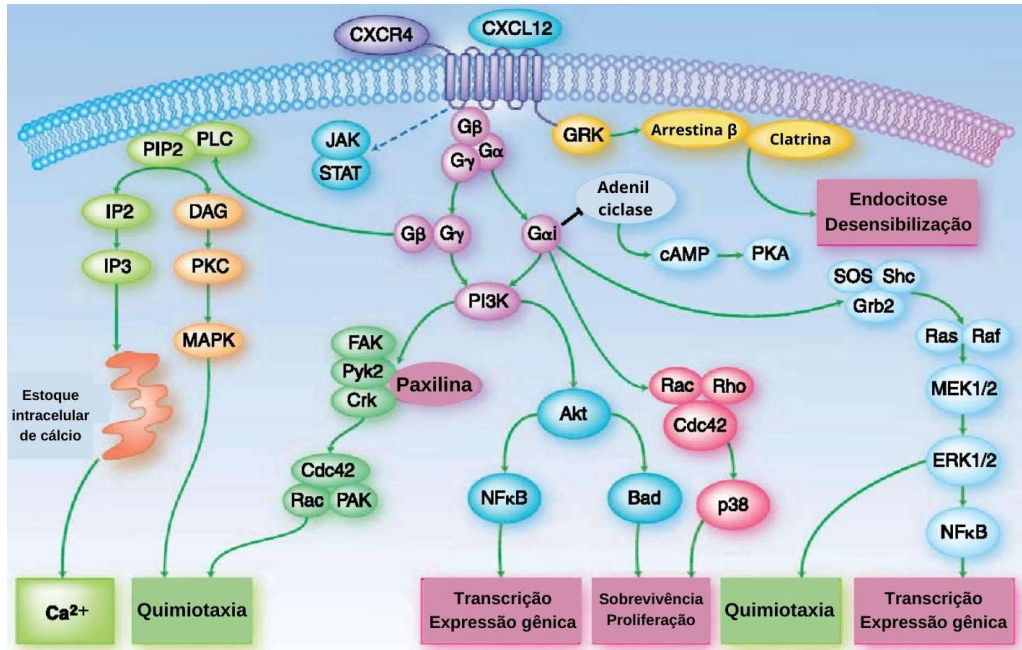
CXCL12 é uma quimiocina homeostática, e sua principal função é regular o tráfego de células hematopoiéticas e a arquitetura do tecido linfóide secundário. A secreção dessa quimiocina está associada a danos nos tecidos. O gradiente de concentração de CXCL12 atrai por quimiotaxia, células que expressam CXCR4, como células endoteliais. No câncer, CXCL12 desempenha o papel recrutamento de células que expressam CXCR4 para os nichos neoangiogênicos para favorecer a revascularização do tecido isquêmico e o crescimento do tumor (PETIT; JIN, D.; RAFII, 2007).

O CXCR4 é um receptor de quimiocina que pertence à superfamília de receptores acoplados à proteína G, que se liga seletivamente ao fator 1 derivado da célula do estroma (SDF-1), também conhecido como CXCL12 para promover a metástase do câncer. Algumas vias de sinalização, como Wnt/ β -catenina e PI3K-AKT, foram relatadas como contribuindo para a invasão mediada por CXCR4/CXCL12 e angiogênese em cânceres (BURGER; KIPPS, 2006).

A interação entre CXCL12 e CXCR4 inicia vias de sinalizações diferentes, e pode gerar uma variedade de respostas como quimiotaxia, sobrevivência e/ou proliferação celular, aumento do cálcio intracelular e transcrição gênica. O mecanismo de ativação do receptor é mediado pelo acoplamento a uma proteína G intracelular heterotrimérica associada a parte interna da membrana plasmática. O heterotrîmero é composto pelas subunidades $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$, que em seu estado basal se liga ao nucleotídeo guanina GDP. Após a ativação, o GDP é liberado e substituído pelo GTP, o que leva à dissociação da subunidade em um dímero $\beta\gamma$ e no monômero α ao qual o GTP está ligado. O GTP é rapidamente hidrolisado em GDP resultando na reassociação do receptor e do complexo trimérico da proteína G. A subunidade $G\alpha_s$ estimula a adenil ciclase enquanto $G\alpha_i$ inibe a adenil ciclase. A família $G\alpha_q$ atua via PLC, como PLC β , para ativar fosfolipases específicas de fosfatidilinositol, que hidrolisam PIP2 para gerar dois segundos mensageiros, IP3 e DAG. IP3 e DAG aumentam as concentrações intracelulares de Ca^{2+} livre e ativam várias proteínas quinases, incluindo PKC. $G\alpha_q$ ativa o fator de transcrição NF κ B através de PYK2. Ambos os receptores acoplados $G\alpha_i$ - e $G\alpha_q$ estimulam a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que medeia a quimiotaxia. $G\alpha_{12}$ está associada a proteínas G de baixo peso molecular, como Rho e Ras, que medeiam a sobrevivência. A sinalização através de $G\alpha_i$ foi associada à transcrição e expressão através do eixo PI3K-AKT-NF- κ B, e via MEK1/2 e Erk 1/2. A PI3K pode levar à ativação da serina-treonina quinase AKT, que desempenha um papel fundamental na sobrevivência das células tumorais. Ambos p38 e Erk1/2 foram implicados na sobrevivência de células tumorais. Além disso, ERK pode se translocar para o núcleo e

fosforilar e/ou ativar fatores de transcrição, inclusive os envolvidos na EMT, levando a alterações na expressão gênica e progressão do ciclo celular (**Figura 8**) (TEICHER; FRICKER, 2010).

Figura 8. Via de sinalização CXCL12/CXCR4



Fonte: Adaptado pelo autor (TEICHER; FRICKER, 2010).

Estudos mostraram que a superexpressão de CXCR4 exacerba a carcinogênese induzida por inflamação no cólon (YU, X. *et al.*, 2019). Considerando o envolvimento de CXCR4 e CXCL12 na indução da transição epitelial-mesenquimal em reposta a inflamação, e a correlação desse processo com a carcinogênese, é possível que haja uma correlação entre a expressão desses genes e os fatores de risco para CG.

Em outros tipos de neoplasia, como por exemplo, glioblastoma e tumores neuroendócrinos, foi evidenciado o envolvimento do receptor 4 de quimiocina (CXCR4) na regulação positiva do fator de transcrição TWIST, via PI3K/AKT e ERK, induzindo o processo de EMT (YAO *et al.*, 2016). Enquanto no câncer gástrico CXCR4 foi associado à invasão e metástase (IZUMI *et al.*, 2016; YING *et al.*, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População de Estudo

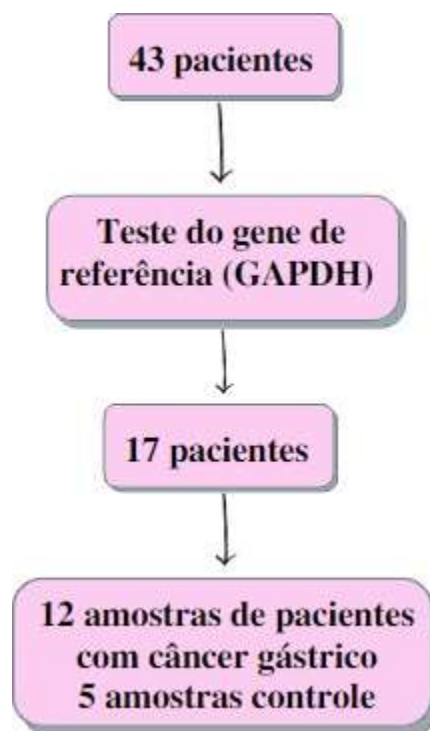
Ao total, foram recrutados aleatoriamente 43 indivíduos cadastrados no Serviço de Endoscopia do Hospital das Clínicas – UFPE (HC) para a realização do estudo de coorte transversal.

Os critérios de inclusão foram: aceitar voluntariamente contribuir ao estudo; ter idade mínima de 18 anos; ser diagnosticado com câncer de estômago de acordo com os critérios preliminares da Federação Brasileira de Gastroenterologia (FBG). Para o grupo controle, os critérios de inclusão foram: ter no mínimo 18 anos de idade; não ter sido diagnosticado com neoplasia maligna no estômago. Os critérios de exclusão foram: pacientes diagnosticados com câncer no esôfago e pacientes diagnosticados com câncer de colorretal.

Após esclarecimentos sobre a pesquisa, aqueles que aceitaram participar do projeto, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e responderam um questionário socioepidemiológico. No questionário, foram obtidas informações sobre os hábitos de vida, como etilismo, tabagismo e alto consumo de sal na dieta. Foi realizada a endoscopia digestiva alta com biópsia, em que foram coletados fragmentos do tecido gástrico para análise histopatológica e análise de expressão gênica.

O critério de qualidade adotado para as amostras foi a expressão do gene de referência endógeno GAPDH, que é um gene que tende a apresentar uma expressão constante em todos os tecidos e estágios do desenvolvimento e que não sofrem interferência de condições experimentais. A expressão de um gene é representada pelo *Ct* (*Cycle Threshold*), que corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para o início da amplificação, é o momento que a fluorescência ultrapassa o ponto de corte da fluorescência de ruído da reação. O *Ct* é inversamente proporcional à quantidade do gene sendo amplificado. Dessa forma, valores de *Ct* menores do que 28,00 para o gene de referência GAPDH, indicam uma boa qualidade da amostra. De acordo com esse critério, selecionamos 17 indivíduos, dos quais 12 foram diagnosticados com câncer gástrico, e 5 pacientes controle (4 pacientes com diagnóstico de lesão benigna e 1 paciente sadio) (**Figura 9**).

Figura 9. População de estudo



Os dados clínicos de prontuário dos pacientes também foram coletados para determinação do perfil epidemiológico dos pacientes. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco - Plataforma Brasil (Ministério da Saúde) CAAE: 31575414.5.0000.5208.

3.2 Análise Histopatológica

Após a biópsia, parte dos espécimes de tecido gástrico foram encaminhados para o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas – UFPE para análise histopatológica e pesquisa histológica para *Helicobacter pylori*.

3.3 Processamento das Amostras

As amostras de tecido gástrico destinadas a análise de expressão gênica, foram encaminhadas para o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) e ficaram imersas em 0,5 ml de solução RNAlater para a conservação do material genético em micro tubos de 1,5 ml devidamente identificados e armazenados em ultra freezer (-80°C).

3.4 Extração do RNA

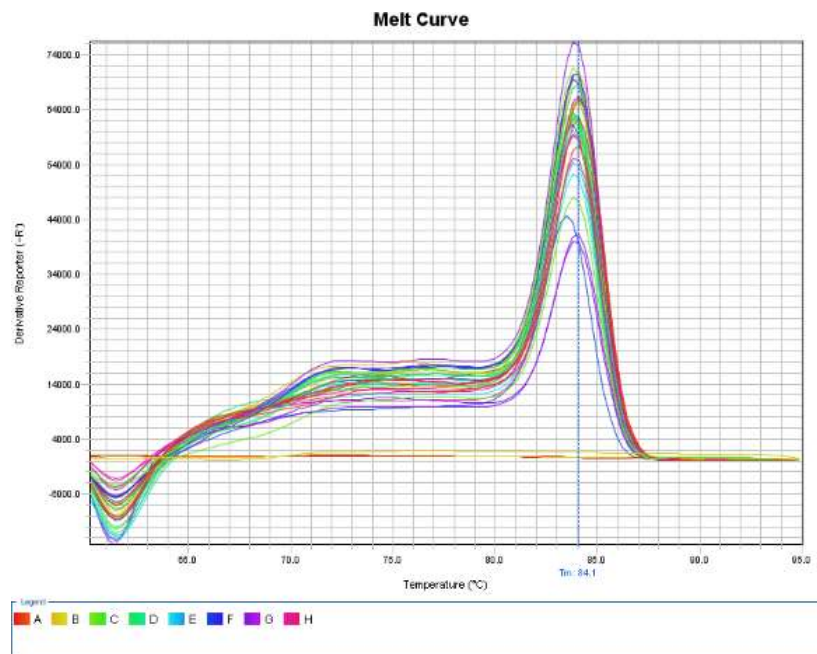
A extração de RNA total dos fragmentos do estômago obtidos por biópsia foi realizada conforme o protocolo de extração do RNeasy Mini Kit (Qiagen). O kit fornece os reagentes, os micro tubos e as colunas necessárias para o protocolo de extração. Posteriormente, foi feita

uma quantificação do material obtido, pelo NanoDrop One^c (Thermo Scientific), um aparelho de espectrofotometria, onde 1 μ L de água livre de RNase foi usada como controle negativo, e 1 μ L de cada amostra de RNA para uma análise comparativa. Os parâmetros utilizados para a quantificação foram as razões 260/280 com valores próximos de 2,0 e 260/230 com resultados entre 2,0-2,2, que indicam baixo grau de contaminação por sais e proteínas.

3.5 Análise de Expressão Gênica

A análise por PCR em tempo real foi realizada no equipamento StepOne PlusTM (Applied Biosystems). Os primers utilizados foram fabricados e fornecidos pela IDT (Integrated DNA Technologies) foram CXCL12 (Hs.PT.58.27881121), EPHA2 (Hs.PT.58.4873218), EFNA4 (Hs.PT.58.26634799). Os primers do gene de referência GAPDH foram sintetizados pela IDT, a partir das sequências fornecidas (Fw: 5'-TGT AGT TGA GGT CAA TGA AGG G' e Rv: 5'-ACA TCG CTC AGA CAC CAT G -3'). Para a reação de qPCR dos genes alvo foi utilizado o kit SyBr[®] Green Master Mix (Promega, USA) com volume final da reação de 10 μ L, contendo: 5 μ L de SYBR, 0,1 μ L do primer, 0,1 μ L de CXR (Carboxy-X-Rhodamine), 3,8 μ L de água e 1 μ L de cDNA (100ng). Para a análise do gene de referência GAPDH, foi utilizado o volume final da reação de 10 μ L: 5 μ L de SYBR, 0,1 μ L do primer forward e 0,1 μ L do primer reverse, 0,1 μ L de CXR, 3,7 μ L de água e 1 μ L de cDNA (100ng). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial 95 °C por 2 min, seguida por 45 ciclos de 95°C por 3 segundos, 60°C por 30 segundos. A curva de melting foi realizada no final da reação em um estágio de 60-95°C. As curvas de dissociação foram geradas para garantir que apenas um produto foi amplificado (melting curve) (**Figura 10**). A expressão gênica foi analisada através dos valores de Δ Ct (Ct_{alvo} – Ct_{GAPDH}), no qual valores mais altos indicam menor expressão gênica.

Figura 10. Melting Curve



3.6 Análise Estatística

As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste exato de Fisher foi utilizado para dados categóricos e, Mann-Whitney foi utilizado para dados numéricos. O nível de significância de todos os testes foi definido em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos pacientes

Dentre os 17 indivíduos selecionados para a pesquisa observou-se que, em relação ao sexo, 23,52% (n=4) são mulheres e 76,47% (n=13) são homens. Os pacientes foram estratificados em dois grupos < 60 anos e ≥ 60 anos. Destes, 4 pacientes (23,52%) tinham menos de 60 anos, enquanto 13 pacientes (76,47%) apresentavam 60 anos ou mais. A mediana da idade para o diagnóstico do câncer gástrico foi de 68,17 anos, sendo a idade mínima de 49 anos, e a máxima de 85 anos.

Um total de 23,52% (n=4) dos indivíduos apresentavam histologia positiva para *Helicobacter pylori*, e 23,52% (n=4) já tinham o diagnóstico de gastrite. Em relação à obesidade, 5,88% (n=1) dos indivíduos eram considerados obesos. Quanto aos hábitos, 5,88% (n=1) se declararam tabagistas, 29,41% (n=5) eram etilistas e 17,64% (n=3) afirmaram um alto consumo de sal na dieta.

Em relação ao grau de diferenciação dos adenocarcinomas observado nas biópsias, os tipos bem diferenciado e moderadamente diferenciado, foram observados em 25% (n=3) pacientes não sendo os mesmos. O tipo pouco diferenciado foi o mais observado, em 33,33% (n=4) pacientes. No entanto, para 16,66% (n=2) dos pacientes a biópsia foi inconclusiva para o grau de diferenciação da lesão. (**Tabela 3**).

Tabela 3. Caracterização dos pacientes com câncer gástrico envolvidos no estudo

Variáveis	Casos (%)	Controle (%)
Idade		
< 60	4 (23,52)	-
≥ 60	8 (47,05)	5 (29,41)
ND	-	-
Sexo		
Feminino	2 (11,76)	2 (11,76)
Masculino	10 (58,82)	3 (17,64)
ND	-	-
Etilista		

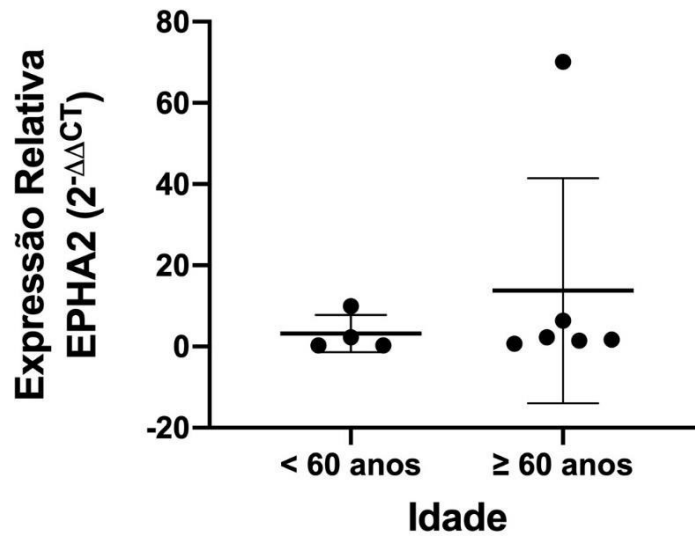
Sim	3 (17,64)	2 (11,76)
Não	8 (47,05)	3 (17,64)
ND	1 (5,88)	-
Laudo da Biópsia**		
Bem Diferenciado	3 (25)	-
Moderadamente Diferenciado	3 (25)	-
Pouco Diferenciado	4 (33,33)	-
Inconclusivo	2 (16,66)	-
Obesidade		
Sim	-	1 (5,88)
Não	11 (64,47)	4 (23,52)
ND	1 (5,88)	-
Alta Ingestão de Sal		
Sim	2 (11,76)	1 (5,88)
Não	9 (52,94)	4 (23,52)
ND	1 (5,88)	-
Tabagismo		
Sim	1 (5,88)	-
Não	10 (58,82)	5 (29,41)
ND	1 (5,88)	-
Diagnóstico Gastrite		
Sim	3 (17,64)	2 (11,76)
Não	8 (47,05)	3 (17,64)
ND	1 (5,88)	-
Histologia Positiva para <i>H. pylori</i>		
Sim	3 (17,64)	1 (5,88)
Não	8 (47,05)	4 (47,05)
ND	1 (5,88)	-
*Não Disponível (ND) ** Dos pacientes com câncer (n= 12) Fonte: Dados da pesquisa		

4.2 Análise de expressão do gene *EPHA2* em pacientes com câncer gástrico

Um total de 17 pacientes foram caracterizados para o gene *EPHA2*, correlacionando a expressão relativa do gene e com as características clínicas. Dos pacientes analisados, 58,82% (n=10) expressaram o gene *EPHA2*.

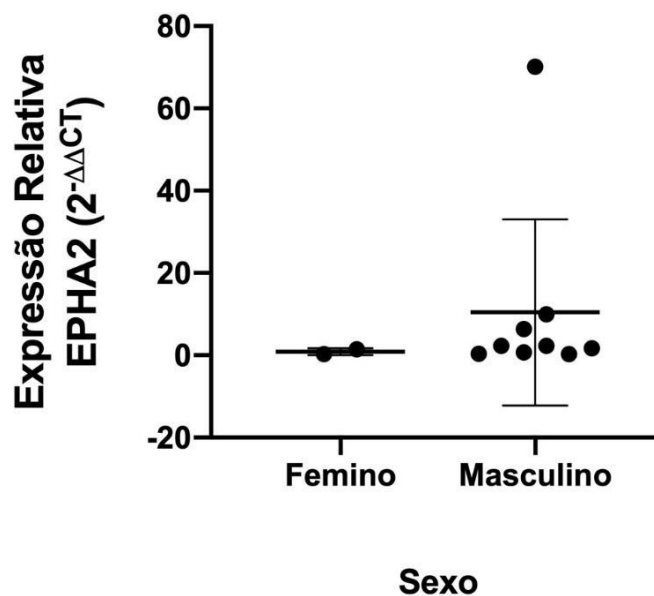
Em relação a idade, não foi observada diferença significativa da expressão de *EPHA2* ($p= 0,6095$) entre os grupos de pacientes menor de 60 anos (n= 4) e maiores de 60 anos (n= 6) (**Figura 11**).

Figura 11. Expressão relativa de EPHA2 em relação a idade em pacientes com câncer gástrico.



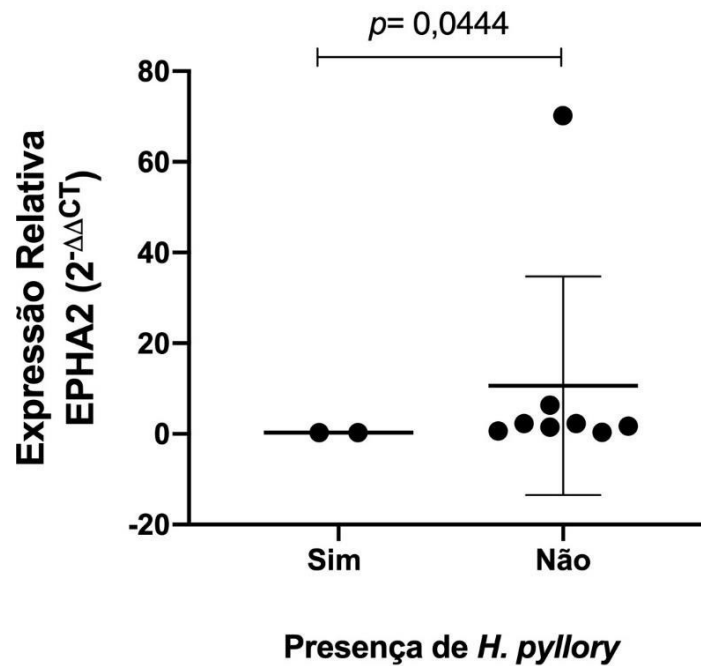
Quanto ao sexo, não houve diferença significativa da expressão relativa do gene EPHA2 ($p=0,3273$) entre o grupo feminino (N= 2) e o grupo masculino (N= 9) (**Figura 12**).

Figura 12. Expressão relativa do gene EPHA2 em relação ao sexo em pacientes com câncer gástrico



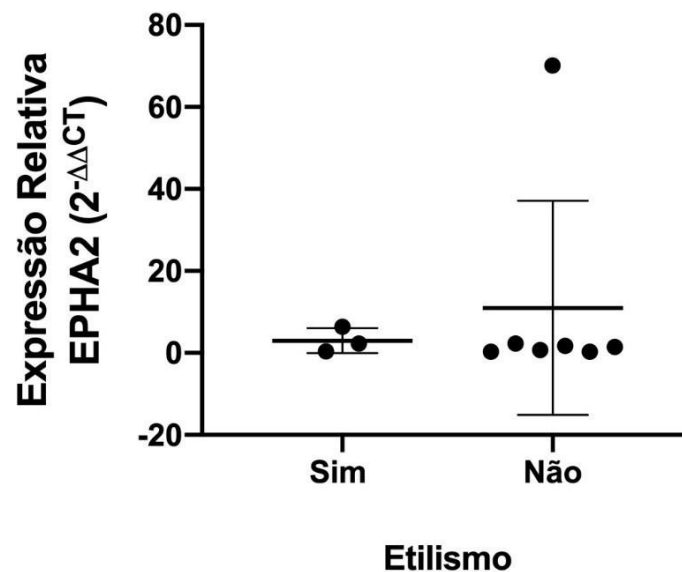
O grupo dos pacientes com histologia positiva para *Helicobacter pylori* que expressaram o gene EPHA2 (N= 2), apresentou diferença significativa ($p= 0,0444$) quando comparado aos pacientes com histologia negativa (N=8). Porém o número reduzido do grupo de pacientes positivos para *Helicobacter pylori* compromete a precisão da análise (**Figura 13**).

Figura 13. Expressão relativa de EPHA2 em relação a *Helicobacter pylori* em pacientes com câncer gástrico



Em relação ao etilismo, não houve significância estatística na expressão relativa de EPHA2 ($p=0,6667$) entre os pacientes etilistas (N=3) e não etilistas (N=7) (**Figura 14**).

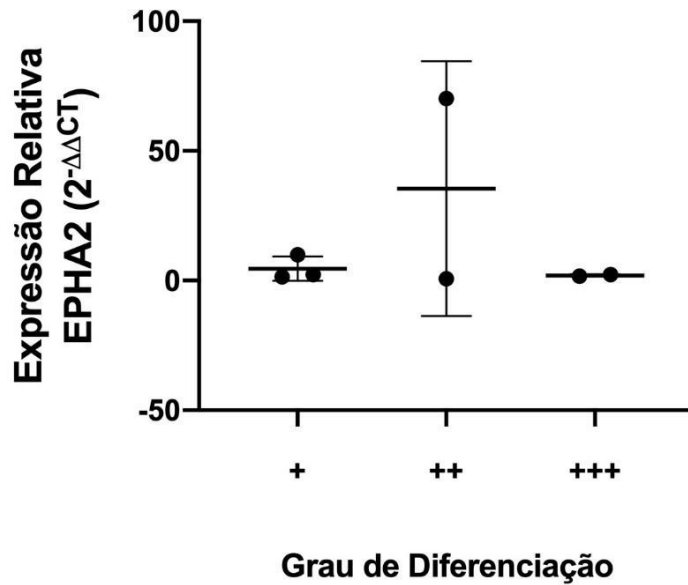
Figura 14. Expressão relativa de EPHA2 em relação etilismo em pacientes com câncer gástrico.



De acordo com o grau de diferenciação dos adenocarcinomas, os pacientes foram divididos em três grupos: bem diferenciado (+++; N=2), moderadamente diferenciado (++; N=2) e pouco diferenciado (+; N=3). Não houve diferença estatística da expressão relativa de

EPHA2 entre os grupos (Figura 15). A informação do grau de diferenciação do tumor foi inconclusiva para 2 pacientes com câncer gástrico.

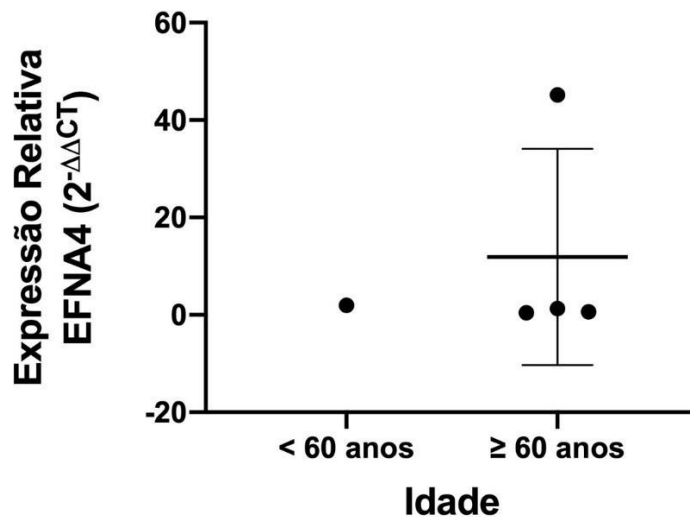
Figura 11. Expressão relativa de EPHA2 em relação ao grau de diferenciação do tumor em pacientes com câncer gástrico.



4.3 Análise de expressão do gene *EFNA4* em pacientes com câncer gástrico

Ao todo 41,66% (n=5) pacientes com câncer gástrico expressaram *EFNA4*. Com relação a idade, apenas 1 paciente com idade menor que 60 anos expressou *EFNA4*, junto com outros 4 pacientes com idade maior ou igual a 60 anos que também expressaram o gene (Figura 16).

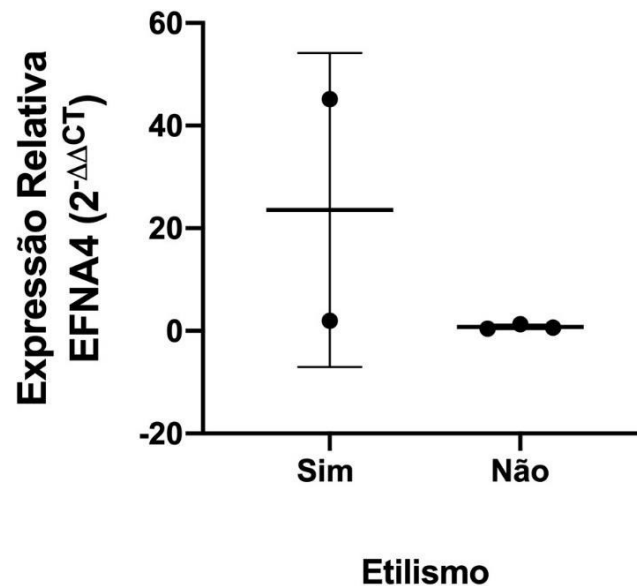
Figura 12. Expressão de *EFNA4* em relação a idade dos pacientes com câncer gástrico



Todos os pacientes do sexo masculino expressaram EFNA4, enquanto nenhuma das 2 mulheres do grupo avaliado apresentou expressão desse gene. Por outro lado, nenhum dos pacientes que expressaram EFNA4 tinham histologia positiva para a bactéria *Helicobacter pylori*.

Quanto ao etilismo, observou-se que os dois pacientes que se declararam etilistas apresentaram uma expressão gênica relativa discrepante entre si. Quando comparadas a expressão relativa do gene do grupo etilista com o grupo de não etilistas (N=3), não foi observada uma diferença com significância estatística (**Figura 17**).

Figura 13. Expressão relativa de EFNA4 em relação ao etilismo em paciente com câncer gástrico



Com relação aos hábitos, apenas 1 paciente relatou etilismo e alto consumo de sal, não sendo o mesmo paciente.

Quanto ao grau de diferenciação do adenocarcinoma, apenas 3 pacientes com câncer gástrico que expressaram EFNA4 tinham a informação disponível, sendo cada um deles pertencente a cada um dos grupos de grau de diferenciação do tumor: bem diferenciado, moderadamente diferenciado, e pouco diferenciado.

4.4 Análise de expressão do gene CXCL12 em pacientes com câncer gástrico

Dos 17 pacientes analisados, 6 pacientes expressaram o gene CXCL12. Porém, foram excluídos das análises porque todos apresentaram um *Ct* maior do que o gene endógeno. Não foram encontrados dados de expressão de CXCL12 dos 11 pacientes.

5 DISCUSSÃO

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, a incidência de câncer gástrico é maior em pacientes com idade entre 60 e 70 anos, corroborando assim com o nosso estudo (INCA, 2022). Quanto ao sexo, 58,82% dos pacientes são do sexo masculino, o que também condiz a epidemiologia mundial do câncer gástrico, que é mais incidente em homens do que em mulheres (KARIMI *et al.*, 2014).

O consumo exagerado de álcool e o tabagismo são fatores de risco independentes para câncer gástrico (MOY *et al.*, 2010). No presente estudo, 17,64% dos pacientes com câncer se declararam etilistas. Sobre o consumo de álcool, há vários mecanismos possíveis, porém não há um consenso exato de como o álcool pode causar o CG. Tanto o etanol quanto o acetaldeído, que é um metabólito intermediário do etanol, são agentes carcinogêneos desencadeiam a produção de prostaglandinas, a peroxidação lipídica e a produção de radicais livres. Além disso, o etanol age como solvente podendo facilitar a entrada de outras substâncias carcinogêneas nas células (KARIMI *et al.*, 2014). No estudo realizado por Myo e colaboradores, foi observado que o risco de CG aumentou em 60% em pacientes que eram tabagistas e etilistas. Além disso, o alto nível de acetoaldeído no sangue foi associado com o aumento do risco de CG na população japonesa (SEITZ; MEIER, 2007).

Os carcinogênicos contidos nos cigarros, principalmente nitrosaminas e outros compostos nitrosos, são capazes de formar ligações covalentes com o DNA, e alterar a função normal do DNA, e isso pode levar ao câncer gástrico (DYKE *et al.*, 1992). Porém ainda não se sabe o mecanismo exato de como o tabaco aumenta o risco de CG, mas há algumas explicações possíveis. Foi demonstrado que fumar cigarro está relacionado ao aumento da frequência da transição de mucosa gástrica normal para lesão pré-cancerosa, como foi demonstrado no modelo de carcinogênese postulado por Correa (FONTHAM *et al.*, 1986). Apenas 5,88% dos pacientes afirmaram ser tabagistas.

O consumo excessivo de sal é considerado um fator de risco para o CG, devido ao efeito de atrofia da mucosa gástrica e favorecimento da proliferação de *Helicobacter pylori* no estômago. Ademais, diversos estudos investigam o impacto da alta ingestão de sal no processo de transição epitelial-mesenquimal, e sua relação com a patogênese de diversas doenças, uma vez que a EMT também é um processo fisiológico importante na embriogênese e na regeneração tecidual. Um estudo realizado por Gao e colaboradores, demonstrou que a alta exposição ao sal, gera uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), e altera a expressão do marcador epitelial E-caderina, e levar a má formação de tubos do coração (GAO, L. *et al.*, 2018). Outro estudo realizado em ratos alimentados com uma dieta rica em sal, observou que a ingestão de sal na dieta por si só induziu a EMT de células da

membrana peritoneal. Isso foi evidenciado pela identificação do marcador mesenquimal α -SMA e pelo aumento da expressão de mRNA de TGF- β 1 e IL-6 peritoneal (PLETINCK *et al.*, 2010).

Apesar dos resultados desse estudo não apresentarem uma relação significativa entre o alto consumo de sal, etilismo, tabagismo e a expressão dos genes analisados, é importante não descartar essa possível relação entre os fatores de risco, a EMT e o câncer, sendo necessária uma análise com um número amostral maior.

O EFNA4 tem sido relatado, junto com a via de sinalização do receptor EPHA2, em processos neoplásicos, como por exemplo, leucemia linfóide crônica (LLC) e carcinoma hepatocelular, bem como a escassez de pesquisas que abordam EFNA4 e câncer gástrico (LIN, J. *et al.*, 2021; TRINIDAD *et al.*, 2009). No entanto, o ligante EFNA1 pode atuar junto com o receptor EPHA2 de forma mais específica, e poderia ser um alvo a ser estudado (SUGIMURA, 2010). Um estudo realizado por Rongrong e colaboradores, demonstrou que a expressão de EFNA1, EFNA3, EFNA4 E EFNA5 foi elevada em pacientes com câncer, numa análise pan-câncer. Quando analisado o câncer gástrico, a expressão de EFNA3 e EFNA4 foi relacionada a uma melhor sobrevida global e sobrevida livre de doença. Os mecanismos de interação das efrinas A, principalmente a EFNA4, com o EPHA2 no câncer gástrico, ainda não foram bem elucidados (XIE; YUAN, M.; JIANG, Y., 2022). A expressão relativa de EFNA4 não foi significativa em relação aos fatores de risco e às características clínicas observadas neste estudo.

A interação crônica entre a bactéria *Helicobacter pylori* e o epitélio do estômago humano estimula vias de sinalização do hospedeiro, inclusive vias associadas aos receptores tirosina quinases (RTKs), como c-MET/ HGF e EGFR (NAUMANN *et al.*, 2017). Um estudo realizado em linhagens de células epiteliais gástricas mostrou que a *Helicobacter pylori* tem como alvo o receptor EPHA2, e que após um período longo de infecção permanente, a bactéria induz a regulação negativa do receptor através da degradação pela via lisossomal, independente de fatores de virulência (LEITE *et al.*, 2020). No mesmo estudo, foi demonstrado que existe a possibilidade de que a ativação de EPHA2, seguida pela sua degradação, induzida pela bactéria também envolva um *crossstalk* com outros RTKs que também são encontrados em células do epitélio gástrico e conhecidos por serem ativados por *Helicobacter pylori* (LEITE *et al.*, 2020). Os efeitos desse fenômeno no câncer se devem ao fato de que EPHA2 induz a adesão célula-célula, medeia as interações célula-colágeno tipo I através da integrina α 2 β 1 e atua na supressão da invasão celular, como foi demonstrado *in vitro* (CHEN, Zhongwen *et al.*, 2018).

O EPHA2 também pode induzir neovascularização em resposta a infecção por *Helicobacter pylori* nas células gástricas, por meio da secreção de fatores que estimulam a angiogênese e através das interações célula tumoral-endotélio. As implicações na carcinogênese gástrica, são características de EMT, como a perda de adesão célula-célula, aumento da invasão e angiogênese. Além disso, a angiogênese promove o fornecimento de nutrientes, então isso também pode favorecer a colonização e a persistência da infecção (BRANTLEY-SIEDERS; CHEN, Jin, 2004). No presente trabalho, houve uma relação significativa entre a expressão relativa de EPHA2 e a histologia negativa para *Helicobacter pylori*. Os pacientes que não apresentaram histologia positiva para essa bactéria tiveram uma expressão relativa de EPHA2 maior, quando comparado aos pacientes sem infecção, sendo um resultado discordante do que diz a literatura.

A expressão de CXCL12 pode ter um papel no crescimento e na progressão de malignidades. Estudos mostram que em na expressão de CXCL12 em biópsias gástricas de pacientes com câncer gástrico, foi maior em pacientes com infecção por *Helicobacter pylori* (JAFARZADEH, A.; NEMAT; JAFARZADEH, S., 2019). Considerando as propriedades quimiotáticas dessa quimiocina, a expressão de CXCL12 estimulada pela infecção crônica *Helicobacter pylori* pode atrair células células-tronco mesenquimais que expressam CXCR4 para o tecido gástrico, e assim promover o início do desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico (JALILI *et al.*, 2014). Um estudo *in vivo* em camundongos, demonstrou que CXCL12 combinada a infecção por *Helicobacter pylori* pode contribuir no desenvolvimento do CG através do recrutamento de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e da expansão das células progenitoras epiteliais gástricas (SHIBATA *et al.*, 2013). O eixo CXCL12/CXCR4 além de angiogênese, também pode desencadear a transição epitelial-mesenquimal e aumentar a migração das células cancerígenas gástricas, juntamente com c-MET (CHENG *et al.*, 2018). Além disso, as vias de sinalização do eixo CXCL12/CXCR4 em combinação com as vias de outros mediadores inflamatórios, como IL-1 β , podem promover o desenvolvimento de malignidades (SAKITANI *et al.*, 2017). Entretanto, as amostras incluídas na análise de CXCL12 não expressaram o gene, o que impossibilitou demonstrar se há associações significativas entre as variáveis clínico-patológicas dos pacientes incluídos e a expressão relativa do gene.

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista os dados apresentados, houve uma relação significativa entre a expressão relativa de EPHA2 e a histologia negativa para a bactéria *Helicobacter pylori*. Os pacientes que não apresentaram infecção por *Helicobacter pylori* tiveram uma expressão

relativa de EPHA2 maior, quando comparado aos pacientes sem infecção, sendo um resultado é discordante do que diz a literatura. A expressão relativa de EFNA4 não foi significativa em relação aos fatores de risco e às características clínicas observadas neste estudo. Esses achados precisam ser melhor investigados em pesquisas futuras, uma vez que a literatura relata um envolvimento relevante do eixo EPHA2/EFNA4 na EMT e no câncer.

As amostras incluídas na análise de CXCL12 não expressaram o gene, estudos adicionais são necessários para compreender melhor este resultado e para elucidar se há associações significativas entre as variáveis clínico-patológicas dos pacientes e a expressão relativa desse gene, frente à EMT.

Apesar dos resultados desse estudo não apresentarem uma relação significativa entre o alto consumo de sal, etilismo, tabagismo e a expressão dos genes analisados, é importante não descartar essa possível relação entre os fatores de risco e a expressão dos genes EPHA2, EFNA4 E CXCL12 na EMT e no câncer, uma vez que o potencial carcinogênico desses hábitos pode desregular as vias moleculares desses genes na EMT e sua expressão nas fases iniciais do câncer.

REFERÊNCIAS

BAJ, J. *et al.* Immunological aspects of the tumor microenvironment and epithelial-mesenchymal transition in gastric carcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020. v. 21, n. 7.

BARCHI, Leandro Cardoso et al. Brazilian Gastric Cancer Association guidelines (part 1): an update on diagnosis, staging, endoscopic treatment and follow-up. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 33, 2020.

BONELLI, P. *et al.* Precision medicine in gastric cancer. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, 15 Oct. 2019. v. 11, n. 10, p. 804–829.

BORRMANN, R. Geschwülste des Magens und Duodenums. **Verdauungsschlauch**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1926, p. 812–1054.

BRANTLEY-SIEDERS, Dana M.; CHEN, Jin. Eph receptor tyrosine kinases in angiogenesis: from development to disease. **Angiogenesis**, v. 7, n. 1, p. 17-28, 2004.

BURE, Irina V.; NEMTSOVA, Marina V.; ZALETAEV, Dmitry V. Roles of E-cadherin and Noncoding RNAs in the Epithelial–mesenchymal Transition and Progression in Gastric Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 12, p. 2870, 2019.

BURGER, J. A.; KIPPS, T. J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. **Blood**, 1 Mar. 2006. v. 107, n. 5, p. 1761–1767.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature**, 11 Sep. 2014. v. 513, n. 7517, p. 202–209.

FUCHS C.S., MAYER R.J. Gastric carcinoma. **New England Journal of Medicine**. 1995 Jul 6;333(1):32-41.

CHEN, Zhongwen *et al.* Spatially modulated ephrinA1:EphA2 signaling increases local contractility and global focal adhesion dynamics to promote cell motility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2018. v. 115, n. 25, p. E5696–E5705.

CHENG, Y.-L. *et al.* Particle Emissions of Material-Extrusion-Type Desktop 3D Printing: The Effects of Infill. **International Journal of Precision Engineering and Manufacturing-Green Technology**, 23 Aug. 2018. v. 5, n. 4, p. 487–497.

CHOI, Y. J. *et al.* Helicobacter pylori-induced epithelial-mesenchymal transition, a potential role of gastric cancer initiation and an emergence of stem cells. **Carcinogenesis**, May. 2015. v. 36, n. 5, p. 553–563.

CRAENE, Bram De; BERX, Geert. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 2, p. 97-110, 2013.

CRISTESCU, R. *et al.* Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. **Nature**, 2015. v. 521, n. 7551, p. 449–456.

DENG, N. *et al.* A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. **Gut**, May. 2012. v. 61, n. 5, p. 673–684.

DYKE, G. W. *et al.* Smoking-related dna adducts in human gastric cancers. **International Journal of Cancer**, 2 Dec. 1992. v. 52, n. 6, p. 847–850.

FEDELE, Monica; CERCHIA, Laura; CHIAPPETTA, Gennaro. The epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer: focus on basal-like carcinomas. **Cancers**, v. 9, n. 10, p. 134, 2017.

FONTHAM, E. *et al.* Diet and Chronic Atrophic Gastritis: A Case-Control Study2. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, 1 Apr. 1986. v. 76, n. 4, p. 621–627.

FUCHS, C. S. *et al.* Ramucirumab with cisplatin and fluoropyrimidine as first-line therapy in patients with metastatic gastric or junctional adenocarcinoma (RAINFALL): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, Mar. 2019. v. 20, n. 3, p. 420–435.

GAO, L. *et al.* High salt-induced excess reactive oxygen species production resulted in heart tube malformation during gastrulation. **Journal of Cellular Physiology**, 25 Sep. 2018. v. 233, n. 9, p. 7120–7133.

GAŠPAROVIĆ, A. Č. *et al.* Chronic Oxidative Stress Promotes Molecular Changes Associated with Epithelial Mesenchymal Transition, NRF2, and Breast Cancer Stem Cell Phenotype. **Antioxidants 2019, Vol. 8, Page 633**, 11 Dec. 2019. v. 8, n. 12, p. 633.

HAMASHIMA, C. Update version of the Japanese Guidelines for Gastric Cancer Screening. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, 1 Jul. 2018. v. 48, n. 7, p. 673–683.

HONG, H. N. *et al.* Cancer-associated fibroblasts promote gastric tumorigenesis through EphA2 activation in a ligand-independent manner. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 2018. v. 144, n. 9, p. 1649–1663.

HUANG, J. *et al.* EphA2 promotes epithelial–mesenchymal transition through the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer cells. **Oncogene**, v. 33, n. 21, p. 2737–2747, 2014.

IEGUCHI, Katsuaki; MARU, Yoshiro. Eph/Ephrin Signaling in the Tumor Microenvironment. In: **Tumor Microenvironment**. Springer, Cham, 2021. p. 45–56.

INCA. **Estadiamento**. 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estadiamento>>. Acesso em: 23 jun. 2022.

INCA. **Câncer de Estômago**. 2022. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-estomago>>.

IZUMI, D. *et al.* CXCL12/CXCR4 activation by cancer-associated fibroblasts promotes integrin β 1 clustering and invasiveness in gastric cancer. **International Journal of Cancer**, 2016. v. 138, n. 5, p. 1207–1219.

JAFARZADEH, Abdollah; NEMATI, Maryam; JAFARZADEH, Sara. The important role played by chemokines influence the clinical outcome of Helicobacter pylori infection. **Life sciences**, v. 231, p. 116688, 2019.

JALILI, A. *et al.* Effect of Helicobacter pylori infection on stromal-derived factor-1/CXCR4 axis in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Advanced Biomedical Research**, 2014. v. 3, n. 1, p. 19.

KANG, E. *et al.* The Post-Translational Regulation of Epithelial–Mesenchymal Transition-Inducing Transcription Factors in Cancer Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, 30 Mar. 2021. v. 22, n. 7, p. 3591.

KARIMI, Parisa *et al.* Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention Gastric Cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 23, n. 5, p. 700-713, 2014.

KULLANDER, Klas; KLEIN, Rüdiger. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 3, n. 7, p. 475-486, 2002.

LEITE, M. *et al.* Helicobacter Pylori Targets the EPHA2 Receptor. **Cells**, 2020. p. 1–22.

LEMMON, Mark A.; SCHLESSINGER, Joseph. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117-1134, 2010.

LIN, J. *et al.* EFNA4 promotes cell proliferation and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma through a PIK3R2/GSK3 β / β -catenin positive feedback loop. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, 2021. v. 25, n. September, p. 328–341.

LIU, A. N. *et al.* Twist expression associated with the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2012. v. 367, n. 1–2, p. 195–203.

MOY, K. A. *et al.* Alcohol and tobacco use in relation to gastric cancer: A prospective study of men in Shanghai, China. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, 2010. v. 19, n. 9, p. 2287–2297.

MURAKAMI, T. Pathomorphological diagnosis, definition and gross classification of early gastric cancer. **Gann Monogr Cancer Res**, 1971. v. 11, p. 53–55.

NAUMANN, M. *et al.* Helicobacter pylori: A Paradigm Pathogen for Subverting Host Cell Signal Transmission. **Trends in Microbiology**, 2017. v. 25, n. 4, p. 316–328.

PEGORARO, S. *et al.* HMGA1 promotes metastatic processes in basal-like breast cancer regulating EMT and stemness. **Oncotarget**, 2013. v. 4, n. 8, p. 1293.

PENG, Z. *et al.* Role of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer initiation and progression. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, 5 May. 2014. v. 20, n. 18, p. 5403.

PETIT, Isabelle; JIN, David; RAFII, Shahin. The SDF-1–CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. **Trends in immunology**, v. 28, n. 7, p. 299-307, 2007.

PLETINCK, A. *et al.* Salt intake induces epithelial-to-mesenchymal transition of the peritoneal membrane in rats. **Nephrology Dialysis Transplantation**, 2010. v. 25, n. 5, p. 1688–1696.

RAJA, U. M. *et al.* Immunohistochemical expression and localization of cytokines/chemokines/growth factors in gastric cancer. **Cytokine**, 1 Jan. 2017. v. 89, p. 82–90.

REPETTO, O. *et al.* Levels of Soluble E-Cadherin in Breast, Gastric, and Colorectal Cancers. **BioMed Research International**, 2014. v. 2014.

REVENU, Céline; GILMOUR, Darren. EMT 2.0: shaping epithelia through collective migration. **Current opinion in genetics & development**, v. 19, n. 4, p. 338-342, 2009.

RIBATTI, Domenico; TAMMA, Roberto; ANNESE, Tiziana. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: a historical overview. **Translational oncology**, v. 13, n. 6, p. 100773, 2020.

ROBINSON, Dan R.; WU, Yi-Mi; LIN, Su-Fang. The protein tyrosine kinase family of the human genome. **Oncogene**, v. 19, n. 49, p. 5548-5557, 2000.

SAKITANI, K. *et al.* CXCR4-expressing *Mist1* + progenitors in the gastric antrum contribute to gastric cancer development. **Oncotarget**, 19 Dec. 2017. v. 8, n. 67, p. 111012–111025.

SANNINO, G. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transition in mesenchymal tumors: A paradox in sarcomas? **Cancer Research**, 2017a. v. 77, n. 17, p. 4556–4561.

SEITZ, H. K.; MEIER, P. The role of acetaldehyde in upper digestive tract cancer in alcoholics. **Translational Research**, Jun. 2007. v. 149, n. 6, p. 293–297.

SHIBATA, W. *et al.* Stromal cell-derived factor-1 overexpression induces gastric dysplasia through expansion of stromal myofibroblasts and epithelial progenitors. **Gut**, Feb. 2013. v. 62, n. 2, p. 192–200.

SMYTH, E. C. *et al.* Gastric cancer. **The Lancet**, Aug. 2020. v. 396, n. 10251, p. 635–648.

STROZEN, T. G. *et al.* The EphB6 receptor: Kinase-dead but very much alive. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021. v. 22, n. 15.

SUGIMURA, H. EPH-EPHRIN in human gastrointestinal cancers. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, 2010. v. 2, n. 12, p. 421.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 2021. v. 71, n. 3, p. 209–249.

TEICHER, Beverly A.; FRICKER, Simon P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. **Clinical cancer research**, v. 16, n. 11, p. 2927-2931, 2010.

THUAULT, S. *et al.* Transforming growth factor- β employs HMGA2 to elicit epithelial–mesenchymal transition. **Journal of Cell Biology**, 17 Jul. 2006. v. 174, n. 2, p. 175–183.

TOWNSEND, Courtney M. *et al.* **Sabiston. Tratado de cirugía: fundamentos biológicos de la práctica quirúrgica moderna.** Elsevier Health Sciences, 2017.

TRINIDAD, E. M. *et al.* An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression. **Blood**, 2009. v. 114, n. 24, p. 5081–5090.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tobacco**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>. Access in: 25 Abr. 2022.>. Acesso em: 5 apr. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240001299>. Access in: 5 Abr. 2022.> Acesso em: 5 apr. 2022.

XIE, Rongrong; YUAN, Mengping; JIANG, Yiyan. The Pan-Cancer Crosstalk Between the EFNA Family and Tumor Microenvironment for Prognosis and Immunotherapy of Gastric Cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 2022.

XU, Jian; LAMOUILLE, Samy; DERYNCK, Rik. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. **Cell research**, v. 19, n. 2, p. 156-172, 2009.

YANG, Jing; WEINBERG, Robert A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. **Developmental cell**, v. 14, n. 6, p. 818-829, 2008.

YAO, C. *et al.* CXCL12/CXCR4 Axis Upregulates Twist to Induce EMT in Human Glioblastoma. **Molecular Neurobiology**, 2016. v. 53, n. 6, p. 3948–3953.

YIN, J. *et al.* EphB2 represents an independent prognostic marker in patients with gastric cancer and promotes tumour cell aggressiveness. **Journal of Cancer**, 2020. v. 11, n. 10, p. 2778–2787.



YING, J. *et al.* The expression of CXCL12 and CXCR4 in gastric cancer and their correlation to lymph node metastasis. **Medical Oncology**, 2012. v. 29, n. 3, p. 1716–1722.

YU, J.; ZHENG, W. An Alternative Method for Screening Gastric Cancer Based on Serum Levels of CEA, CA19-9, and CA72-4. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, 28 Mar. 2018. v. 49, n. 1, p. 57–62.

YU, X. *et al.* CXCL12/CXCR4 promotes inflammation-driven colorectal cancer progression through activation of RhoA signaling by sponging miR-133a-3p. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, 24 Dec. 2019. v. 38, n. 1, p. 32.

YUAN, Weijie *et al.* Expression of EphA2 and E-cadherin in gastric cancer: Correlated with tumor progression and lymphogenous metastasis. **Pathology and Oncology Research**, 2009. v. 15, n. 3, p. 473–478.

ANEXO A

<p>Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos</p>		<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-</p>	
--	---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE MOLECULAR DE ESPÉCIMES TUMORAIS DE PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Pesquisador: LUIZ ALBERTO REIS MATTOS JUNIOR

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 31575414.5.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 728.932

Data da Relatoria: 30/07/2014

Apresentação do Projeto:

Indicado no relatório inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado no relatório inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado no relatório inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado no relatório inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado no relatório inicial.

Recomendações:

Recomenda-se que o pesquisador inclua na metodologia do projeto o número da amostra, bem como a justificativa;

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado com recomendação.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO B

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – HC/UFPE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa Biomarcadores e neoplasia maligna trato gastrointestinal, doença inflamatória intestinal e esôfago de Barrett , que está sob a responsabilidade do pesquisador LUIZ ALBERTO REIS MATTOS JÚNIOR, endereço Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife – PE – CEP: 50670-901 telefone (81) 2126.3744 (ambulatório de oncologia/quimioterapia, terceiro andar do Hospital das Clínicas da UFPE), email luiz.mattos@ufpe.br (inclusive ligações a cobrar) e está sob a orientação do Prof. José Luiz de Lima Filho, telefones para contato (081) 2126.8484, e-mail: joseluz60@gmail.com.

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade. Ressaltamos ainda que as amostras sanguíneas não serão utilizadas para realização de qualquer agente viral como por exemplo os vírus das hepatites, nem do vírus da imunodeficiência adquirida.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Descrição da pesquisa: os objetivos dessa pesquisa será o de detectar a presença e nível de concentração de algumas substâncias no sangue em pacientes que possuem suspeita de neoplasia maligna do aparelho digestivo (esôfago, estômago duodeno, intestino delgado, intestino grosso, reto), ou suspeita de doença inflamatória intestinal (retocolite , Chron, outros todos diagnosticados por endoscopia digestiva alta ou colonoscopia. Além disso, o pesquisadores iram avaliar se a presença ou ausências dessas substâncias de alguma forma têm associação com determinadas características da doença (agressividade, por exemplo) ou como os pacientes portadores dessas patologias respondem ou não aos tratamentos administrados. Após a realização de endoscopia digestiva alta ou colonoscopia, você terá uma amostra de sangue coletada em veia periférica com uma rigorosa assepsia (higiene) da região além do uso de material descartável. Essa amostra será então encaminhadas para análise no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami localizado no campus da Universidade Federal de Pernambuco. Após a coleta da amostra sanguínea você será tratado pelo médico que indicou a endoscopia digestiva alta ou colonoscopia. Os pesquisadores farão ainda uma análise de dados constantes em seu prontuário como data de nascimento, gênero (masculino/feminino), local de residência, presença ou ausência de outras doenças, tratamentos realizados previamente.

- Período de participação do sujeito na pesquisa, início e término. Você estará participando da pesquisa a partir do momento eu concordar em assinar esse termo. Se em algum momento não desejar mais participar do estudo, será permitida sua saída sem qualquer forma de constrangimento. O período de coleta de amostra será de um ano, no entanto você só terá uma amostra sanguínea coletada.

- Riscos diretos para o participante: riscos praticamente se resumem aqueles relacionado à picada de agulha em veia periférica para coleta de amostras sanguíneas, quais sejam: hematoma local e flebite (inflamação da veia onde se coletou a amostra sanguínea). Como forma de amenizar os riscos, procederemos a uma rigorosa assepsia da região além do uso de material descartável. Apesar de raros, caso aconteçam o senhor/a deverá comunicar tal evento ao pesquisador responsável para que as medidas necessárias sejam prontamente executadas para resolução do caso. Os riscos decorrentes da realização da endoscopia digestiva alta não terá relação com o presente estudo, uma vez que você só participará da pesquisa após a realização da endoscopia solicitada pelo seu/sua médico/a.

- Benefícios diretos e indiretos decorrentes da participação na pesquisa: Os benefícios diretos e indiretos de sua participação na pesquisa serão de permitir que os pesquisadores realizem a detecção de determinadas substâncias no seu sangue que podem de alguma forma participar do processo de iniciação ou propagação das patologias acima mencionadas. Dessa forma eles poderão conhecer melhor a doença.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa através de análise de prontuário e o resultado das dosagens das substâncias pesquisadas no sangue, ficarão armazenados em computador de uso pessoal sob a responsabilidade do pesquisador e do Orientador, no endereço (acima informado), pelo período de (5 anos).

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em

Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br)