



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

LAÍS COSTA DOS REIS

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MICRORNAS *hsa-miR-10a*,
hsa-miR-148a, *hsa-miR-150*, *hsa-miR-483* NO CÂNCER GÁSTRICO

BELÉM-PARÁ
2017

LAÍS COSTA DOS REIS

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MICRORNAS *hsa-miR-10a*,
hsa-miR-148a, *hsa-miR-150*, *hsa-miR-483* NO CÂNCER GÁSTRICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade de Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ândrea Ribeiro dos Santos

BELÉM-PARÁ

2017

LAÍS COSTA DOS REIS

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MICRORNAS *hsa-miR-10a*,
hsa-miR-148a, *hsa-miR-150*, *hsa-miR-483* NO CÂNCER GÁSTRICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina, aprovado com o conceito
EXCELENTE.

Belém (PA), 06 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ândrea Ribeiro dos Santos, UFPA

Msc. Adenilson Leão Pereira, UFPA

Msc. Amanda Ferreira Vidal, UFPA

Antonette Souto El Husny, CESUPA

EPÍGRAFE

*“O hematoma é uma lição, e todas as lições
nos melhoram”*

(Syrio Forel, A Guerra dos Tronos)

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, minha guerreira e meu exemplo
de vida, pelo incentivo, apoio e dedicação que tornou possível a chegada até aqui!*

*Ao meu amor, que sempre me ajudou, pelo seu
cuidado, amor, dedicação, compreensão e força!*

Vocês são meus anjos da guarda!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por essa conquista, pois Ele tem me sustentado desde o ventre da minha mãe, guiando-me e protegendo. Obrigada Senhor, por ter me ajudado a fazer as escolhas certas!

Agradeço à Universidade Federal do Pará por proporcionar a oportunidade e toda a infraestrutura necessária à conclusão do curso de biomedicina e obtenção do grau de biomédica.

À minha orientadora, professora Ândrea, primeiramente por ter me aceitado no laboratório, e posteriormente ter-me concedido diversas oportunidades acadêmicas que foram demasiadamente importantes, tanto para o meu “crescimento científico”, quanto pessoal. Obrigada pela confiança em desenvolver este trabalho, e sobretudo pela paciência e disposição em solver dúvidas.

Ao Msc. Adenilson, pelo incentivo, ajuda, paciência e dedicação, que tornaram possível a conclusão desta monografia. Além de ser uma das melhores pessoas para se trabalhar, já que tornar o ambiente por vezes divertido, mesmo ao longo das mais desgastantes tarefas.

Agradeço a todos do Laboratório de Genética Humana e Médica, os que conheci quando cheguei e os recém chegados, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho. Em especial ao Leo, Aline e Amanda que ajudaram em grande parte do meu desenvolvimento no laboratório, inclusive na elaboração desse manuscrito. E a minha “inseparável” amiga Rebecca, a primeira pessoa que conheci na faculdade, amizade que se fortaleceu no laboratório e quem devo levar pra vida. Vocês são de mais, muitíssimo obrigada.

Agradeço à minha família por acreditarem em mim. Especialmente à minha mãe, por quem sou incapaz de encontrar palavras que representem minha verdadeira gratidão! Sou grata, sobretudo, por cuidar de mim até hoje. Essa conquista também é mérito seu! Por último, mas não menos importante, agradeço ao meu amor, Luis Felipe, que foi, e tem sido, muito importante na minha formação acadêmica me ajudando com trabalhos; por muitas vezes, ter sido meu primeiro revisor; minha platéia; por ter me dado apoio nos piores momentos, fazendo com que as situações se tornassem melhores! Você é um amor, muito obrigada por tudo.

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1 - Alterações inerentes ao processo de carcinogênese (Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).	1
Figura 2 - Ilustração da anatomia estômago humano (Fonte: Adaptado de NETTER, Frank H., 2000).	2
Figura 3 - Estimativa para os principais cânceres incidentes na região Norte do Brasil para o biênio 2016-2017, por sexo, excetuando-se os tumores de pele não melanoma (Adaptado de INCA, 2015).	3
Figura 4 - Biogênese do microRNA (Fonte: Adaptado de HE et al., 2016).	7
Figura 5 - Pareamento entre a região <i>seed</i> do microRNA e a extremidade 3' <i>UTR</i> do RNA mensageiro alvo. (Fonte: RIBEIRO-DOS-SANTOS; CRUZ; DARNET, 2012).	8
Figura 6 - Boxplots demonstrando as diferenças estatísticas existentes entre os três grupos de amostras analisadas. A) <i>hsa-miR-10a</i> , B) <i>hsa-miR-148a</i> , C) <i>hsa-miR-150</i> e D) <i>hsa-miR-483</i> . (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.001$; (***) $P < 0.0001$. Valores de P obtidos pelo teste ANOVA <i>one-way</i> corrigido pelo método de Bonferroni.	19
Figura 7 - <i>Heatmap</i> dos perfis de expressão dos miRNAs <i>hsa-miR-10a</i> , <i>hsa-miR-148a</i> , <i>hsa-miR-150</i> e <i>hsa-miR-483</i> em amostras de adenocarcinoma gástrico (câncer), adjacente ao adenocarcinoma (adjacente) e sem câncer.	21
Figura 8 - Análise da curva ROC (<i>receiver operating characteristic</i>) dos microRNAs A) <i>hsa-miR-10a</i> , B) <i>hsa-miR-148a</i> , C) <i>hsa-miR-150</i> , e D) <i>hsa-miR-483</i> . (SC) sem câncer; (CG) câncer gástrico; (ADJ) tecido adjacente ao CG. AUC (<i>area under curve</i> - área sob a curva). $AUC \geq 0.850$ = Alto poder discriminatório; $AUC = 0.700-0,849$ = Médio poder discriminatório; $AUC < 0.700$ = Baixo poder discriminatório.	24
Quadro 1 - Genes alvejados por regulação negativa dos miRNAs analisados neste estudo. Informações baseadas em fortes evidências disponíveis no banco de dados miRTarBase [§] .	25
Tabela 1 - Análise do perfil de expressão dos microRNAs entre amostras sem câncer (SC), adjacente ao câncer (ADJ) e de câncer gástrico (CG).	20

Tabela 2 - Análise da capacidade discriminatória dos microRNAs entre amostras sem câncer (SC), adjacente ao câncer (ADJ) e câncer gástrico (CG)._____23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADJ	Adjacente ao tumor
AFP	Alfa-fetoproteína
AGO 1-4/AGO 2	Proteínas Argonautas
AUC	Área sob a curva
CA 125	Antígeno carboidrato 125
CA 19-9	Antígeno carboidrato 19-9
CDKN1B	<i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1B</i>
cDNA	DNA complementar
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CG	Câncer gástrico
<i>Ct</i>	<i>Threshold cycle</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EP300	<i>E1A Binding Protein P300</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Hsa</i>	<i>Homo sapiens</i>
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
miRNA/miR	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
ncRNA	RNA não codificante
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
nt	Nucleotídeo
OncomiR	microRNA oncogênico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pol II	Polimerase II
pri-miRNA	microRNA primário
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo como Transcriptase Reversa
RISC	RNA-induced silencing complex

RNA	Ácido Ribonucléico
ROC	Característica de Operação do Receptor
ROCK1	Proteína quinase associada a Rho
RT	Transcriptase Reversa
SC	Sem câncer
SMAD2/ SMAD4	<i>Small Mother Against Decapentaplegic</i>
SP1	Fator de transcrição Promotor Específico da RNA polimerase II
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TP53	Cellular tumor antigen p53
TS	Supressor Tumoral
TS-miR	microRNA Supressor Tumoral
<i>UTR</i>	Região não traduzida
<i>vs.</i>	<i>versus</i>
XOP5	proteína Exportina-5

RESUMO

Os microRNAs são considerados potenciais biomarcadores para o câncer gástrico devido ao seu envolvimento em distintos processos celulares cruciais na carcinogênese, como apoptose, proliferação e diferenciação. Com o objetivo de avaliar o perfil de expressão dos microRNAs *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483* no câncer gástrico e a existência do campo de cancerização nesse tipo de câncer, investigou-se o perfil de expressão desses miRNAs em amostras de tecidos gástricos sem câncer, adjacente ao câncer e com câncer gástrico. Foram investigadas 61 amostras de tecido gástrico preservados em parafina: sendo, 30 amostras de tecido sem câncer; 20 amostras de câncer gástrico e 11 amostras de tecido adjacente ao câncer, provenientes de pacientes tratados no Hospital Universitário João de Barros Barreto (Belém-PA) e no Hospital São Camilo (Macapá-AP). A quantificação dos dados de expressão dos microRNAs foi realizada por meio de qRT-PCR. A expressão relativa foi obtida pelo método comparativo de *Ct*, utilizando a média dos endógenos Z30/RNU6B como normalizadores. O teste de Shapiro-Wilk demonstrou que os dados apresentaram distribuição normal, logo, para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA *one-way* para múltiplas comparações, com *P* ajustado pelo método de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significativo $P < 0,05$. Além disso, foi realizada análise da curva ROC e da área sob a curva (AUC), com objetivo de avaliar o potencial desses microRNAs como biomarcadores para o câncer gástrico. Os resultados mostraram que *hsa-miR-10a* apresentou-se hiperexpresso nos tecidos de câncer ($P = 2,0 \times 10^{-16}$) e adjacente ($P = 2,2 \times 10^{-8}$) quando comparados ao tecido sem a doença. Adicionalmente, o *hsa-miR-10a* foi encontrado hiperexpresso no câncer gástrico quando comparado ao tecido adjacente ($P = 0,014$). Os miRNAs *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483* foram encontrados significativamente hiperexpressos nos tecidos com câncer gástrico e adjacente quando comparados ao tecido sem câncer. Não foram observadas diferença significativas nos níveis de expressão de *hsa-miR-148a* ($P = 0,309$); *hsa-miR-150* ($P = 0,22$); e *hsa-miR-483* ($P = 0,11$) entre amostras de câncer gástrico e adjacente. A análise da curva ROC demonstrou que *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483* foram capazes de diferenciar os tecidos com câncer gástrico e adjacente daqueles sem a doença com grande acurácia; além disso, o *hsa-miR-10a* foi o único que apresentou diferença estatística significativa nos seus níveis de expressão entre os tecidos com câncer gástrico e adjacente, e demonstrou acurácia razoável em diferenciar esses dois tecidos. Nossos resultados demonstram que o tecido adjacente ao câncer possui um perfil de expressão semelhante ao câncer gástrico. Assim, o tecido adjacente não pode ser considerado um tecido normal, já que possui alterações que se assemelham ao câncer, sendo uma região propícia ao surgimento de novos tumores ou de recidiva local. Dessa forma, os resultados demonstram e corroboram a existência de campo de cancerização no câncer gástrico. Por fim, demonstramos que esses miRNAs possuem grande acurácia em discriminar o câncer gástrico e suas adjacências de tecidos sem histórico de câncer gástrico, sendo considerados potenciais biomarcadores da carcinogênese gástrica.

Palavres-chave: câncer gástrico, campo de cancerização, biomarcadores, miRNA.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
RESUMO	viii
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - CÂNCER	1
1.2 - CÂNCER GÁSTRICO	2
1.2.1 - Epidemiologia	3
1.2.2 - Fatores etiológicos	4
1.2.3 - Diagnóstico	4
1.3 - MICRORNA	5
1.3.1 - miRNA: biogênese e regulação pós-transcricional	6
1.3.2 - miRNAs no câncer gástrico	8
1.3.3 - Campo de cancerização	9
1.3.4 - Justificativa	10
2 - OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	13
3 - MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 - ÁREA DE ESTUDO	14
3.2 - TIPO DE ESTUDO E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS	14
3.2.1 - Material biológico	14
3.3 - DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO METODOLÓGICO	14
3.3.1 - Extração dos miRNAs	14
3.3.2 - Transcrição Reversa dos miRNAs	15
3.3.3 - Validação da expressão diferencial dos miRNAs por qRT-PCR	15
3.4 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS	15
3.5 - BUSCA DE GENES ALVOS	16
3.6 - ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	16
4 - RESULTADOS	18
4.1 - ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO	18

4.2 - ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO	20
4.3 - ANÁLISE DA CURVA ROC	22
4.4 - IDENTIFICAÇÃO DOS GENES ALVOS	25
5 - DISCUSSÃO	26
5.1 - hsa-miR-10a	26
5.2 - hsa-miR-148a	27
5.3 - hsa-miR-150	28
5.4 - hsa-miR-483	29
6 - CONCLUSÃO	30
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - CÂNCER

O câncer é um conjunto de doenças heterogêneas, no qual a capacidade de sustentar a proliferação celular crônica e desordenada é a peculiaridade mais intrínseca, seguida pela diminuição e perda de adesão celular, a qual culmina na invasão da célula cancerosa em tecidos adjacentes, bem como ao acesso da célula maligna à corrente sanguínea, permitindo a formação de metástases (WEINBERG et al., 2008; HANAHAN e WEINBERG, 2011; GUTSCHNER e DIEDERICHS, 2012).

A origem do câncer é multifatorial e complexa, a qual envolve alterações genéticas e epigenéticas que podem ser herdadas, desencadeadas e/ou exacerbadas por fatores ambientais e estilo de vida. Essas alterações moleculares são progressivas e necessárias para que uma célula normal se torne maligna, propiciando o surgimento da carcinogênese. Este processo confere à célula maligna a capacidade de: evasão à apoptose, ao sistema imune e aos supressores de crescimento; adquirir sinalização proliferativa independente; imortalidade replicativa; induzir a angiogênese; invadir tecidos e órgãos adjacentes, favorecendo o desenvolvimento de metástases. Subjacente a essas alterações estão a instabilidade genômica e a inflamação que são cruciais para a formação do tumor e que auxiliam em múltiplas funções do processo carcinogênico (Figura 1; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

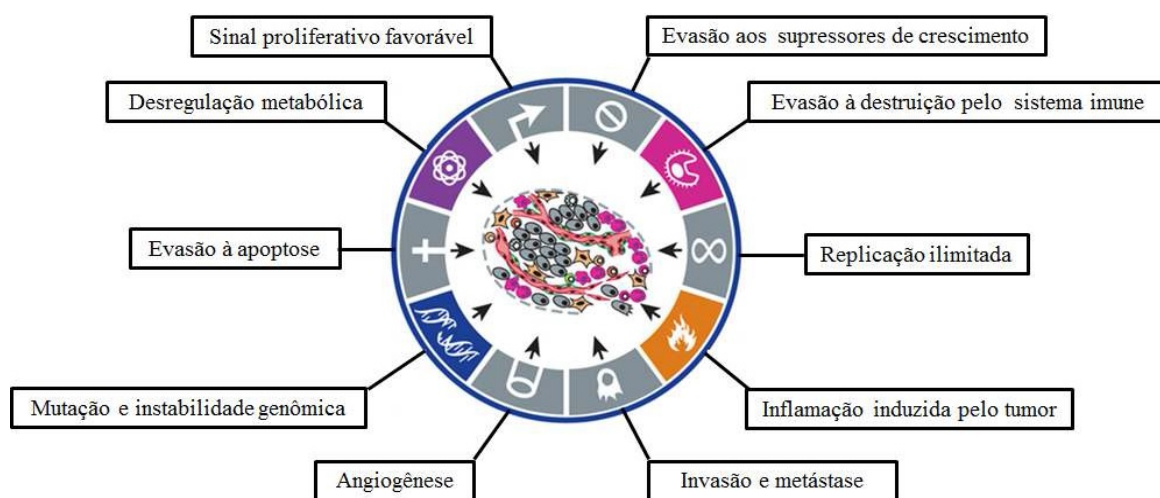


Figura 1 - Alterações inerentes ao processo de carcinogênese (Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011).

1.2 - CÂNCER GÁSTRICO

O adenocarcinoma gástrico (CG) é um tumor maligno que se localiza anatomicamente com maior frequência no corpo do estômago (~40%), antro (~25%) e cárdia (~22%), e o restante no piloro e fundo do estômago (VAUHKONEN, M.; VAUHKONEN H.; SIPPONEN, 2006; ARREGI et al., 2009; Figura 2). A principal classificação histopatológica usada para o CG foi descrita por Lauren (1965), o qual divide o adenocarcinoma em três tipos: intestinal, difuso e indiferenciado (ou ainda, não classificado ou misto), sendo este último o que obtém menor frequência e é caracterizado pela manifestação dos tipos intestinal e difuso simultaneamente (FORONES et al., 2005; VAUHKONEN et al., 2005).

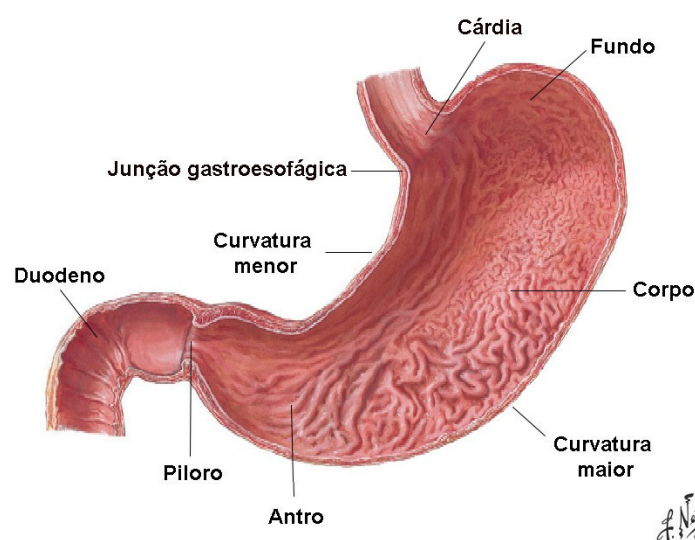


Figura 2 - Ilustração da anatomia estômago humano (Fonte: Adaptado de: NETTER, F. H. Atlas de Anatomia Humana. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2000).

O tipo intestinal se caracteriza por um tumor com grau de diferenciação muito variável, com estrutura glandular bem definida. Segundo a cascata de Correa, este tipo de adenocarcinoma gástrico desenvolve-se lentamente, com múltiplos estágios pré-malignos sequenciais como gastrite crônica não atrófica, gastrite crônica atrófica, metaplasia intestinal e displasia (CORREA e PIAZUELO, 2012). Este tipo está frequentemente relacionado a fatores ambientais, como a infecção pela *Helicobacter pylori*, dieta e estilo de vida

(CORREA; PIAZUELO; WILSON, 2010).

O tipo difuso apresenta-se infiltrado na parede gástrica, com pouca ou nenhuma formação glandular; é pouco diferenciado e suas células em anel de sinete produzem pouca quantidade de mucina e possui padrão de crescimento infiltrativo (VAUHKONEN et al., 2005). Esse tipo de tumor geralmente não tem associação com lesões pré-malignas e, apesar de menos frequente, é mais agressivo que o tipo intestinal (HU et al., 2012).

1.2.1 - Epidemiologia

O CG é o 5º tipo de câncer mais incidente e apresenta-se como a 3ª causa de morte por câncer no mundo (GLOBOCAN, 2012). Esse tipo de câncer possui elevadas taxas de mortalidade e de recidiva após ressecção cirúrgica do tumor, sendo mais frequente em pacientes com idade superior a 60 anos (WU et al., 2008).

De acordo com as estimativas do INCA para o biênio de 2016/2017, o CG é o 4º tipo de câncer mais frequente em todo o território nacional. Na região Norte o CG chama especial atenção por possuir uma das maiores taxas de incidência do país, sendo estimado como o 2º mais frequente entre os homens e o 4º mais frequente entre as mulheres, sem considerar os tumores de pele não melanoma (Figura 3; INCA, 2015).

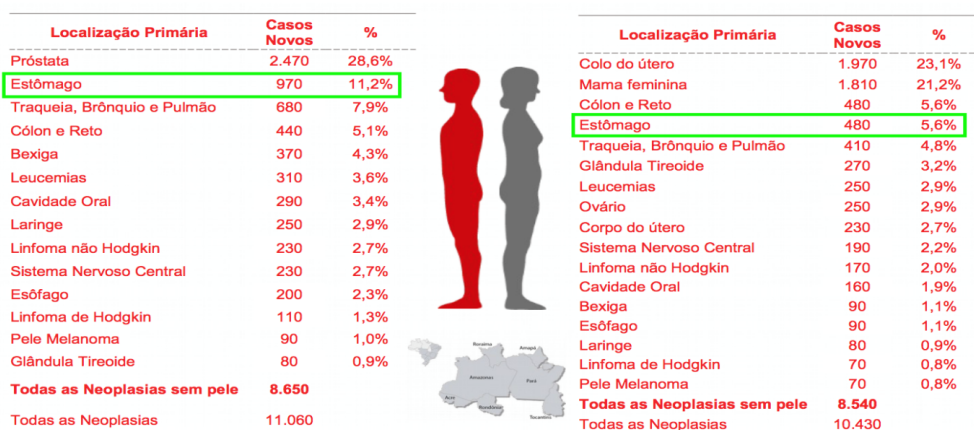


Figura 3 - Estimativa para os principais cânceres incidentes na região Norte do Brasil para o biênio 2016-2017, por sexo, excetuando-se os tumores de pele não melanoma (Adaptado de INCA, 2015).

1.2.2 - Fatores etiológicos

A infecção gástrica pela bactéria *Helicobacter pylori* é a infecção bacteriana mais comum em todo o mundo, adquirida geralmente na fase da infância (EVERHART, 2000). Sua coevolução com humanos a capacitou em evadir ao sistema imune e obter uma relação parasito-hospedeiro sincronizada, limitando o grau e a extensão do dano e da inflamação da mucosa gástrica. Consequentemente, pode não exibir sintomas na maioria da população, persistindo por décadas caso não seja tratada. Neste período, pode evoluir de uma gastrite crônica, ou até um adenocarcinoma gástrico esporádico (RICCI; ROMANO; BOQUET, 2011).

Estima-se que metade da população mundial seja acometida pela infecção por *H. pylori*, alcançando cerca de 90% em países em desenvolvimento (MARTEL et al., 2012), apesar disso, apenas 2% progridem até o câncer gástrico (KIM et al., 2011). Devido a essas associações, a infecção por *H. pylori* é reconhecida como principal fator de risco para o desenvolvimento do CG, sendo classificada como carcinógeno tipo I para esse tipo câncer (IARC, 1994).

Outros fatores de risco notáveis para predisposição ao surgimento do CG envolvem fatores ambientais e/ou estilo de vida, principalmente os maus hábitos alimentares, incluindo o consumo excessivo de sal ou alimentos com conservantes e/ou ultraprocessados, os quais possuem grandes quantidades de sódio (TSUNGANE, 2005; NAGINI, 2012). O consumo excessivo de sal por si só é danoso, já que em concentrações elevadas destrói a mucosa gástrica causando lesões e levando a inflamação (TSUNGANE, 2005). Isso facilita a absorção de nitrosaminas, que são importantes substâncias cancerígenas presentes em diversos alimentos e bebidas (DUTRA; RATH; REYES, 2007).

1.2.3 - Diagnóstico

As chances de cura do paciente depende especialmente do momento em que é realizado o diagnóstico do CG. Dessa forma, o ideal é que seja realizado o diagnóstico precoce para que se inicie o tratamento de forma rápida e eficaz, facilitando o manejo da doença e aumentando as possibilidades de cura do paciente (TAKAHASHI; SAIKAWA; KITAGAWA, 2013).

Todavia, é estimado que somente cerca de 10% a 15% dos casos de CG no Brasil sejam diagnosticados precocemente, isso em parte é decorrente da ausência de sinais ou sintomas patognomônicos, o que favorece o diagnóstico tardio da doença, reduzindo a possibilidade de cura do paciente (ARREGI et al., 2009; COIMBRA et al., 2011).

Associado à ausência de sintomas específicos, a ineficiência dos marcadores sorológicos clinicamente utilizados prejudica a detecção precoce do CG, retardando o início da terapia, e até mesmo conferindo um pior prognóstico para o paciente (LIU; GUO; STILES, 2011; ZHU et al., 2013). O marcador único para o diagnóstico clínico é bastante limitado, por esta razão He et al. (2013) demonstraram que a utilização combinada de diferentes marcadores tumorais — como alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno carboidrato 19-9 (CA 19-9) e antígeno carboidrato 125 (CA 125) — aumentam a sensibilidade para o diagnóstico do CG avançado. No entanto, os resultados permanecem inconsistentes e abaixo do ideal para a detecção do CG precoce. Somado a isso, os avanços nas técnicas cirúrgicas e terapias adjuvantes ainda não são satisfatórias (CHEN et al., 2012; TAKAHASHI; SAIKAWA; KITAGAWA, 2013).

Considerando o exposto, grande força tarefa têm centrado esforços na tentativa de encontrar biomarcadores sensíveis e específicos para este tipo de câncer. Recentemente, vários estudos têm demonstrado que os microRNAs (miRNAs) podem ser utilizados como potenciais biomarcadores para o CG (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010; GOMES et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; WU et al., 2014; DARNET et al., 2015; VIDAL et al., 2016).

1.3 - MICRORNA

Desde a sua identificação (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993) estudos têm relatado que moléculas de RNA não-codificantes (ncRNA) possuem papel central na regulação gênica e consequentemente na homeostase do organismo humano (CALIN e CROCE, 2006). Dentre as classes de ncRNA, encontram-se os miRNAs, que são pequenas moléculas de RNA endógeno, que possuem ~18-22 nucleotídeos de tamanho, e estão envolvidos no processo de regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional, degradando o RNA mensageiro (mRNA) alvo (AMBROS et al., 2004; KIM, 2005; SCOTT, 2015).

Os genes de miRNAs estão geralmente organizados em *clusters*, sendo

distribuídos em regiões codificantes e não codificantes, representando cerca de 1% do genoma (LIM et al., 2003). Desta fração, cerca de 40% dos loci de miRNAs encontram-se dentro de íntrons de genes que codificam proteínas, 10% dentro de íntrons de transcritos não codificantes, e 13% nos éxons de transcritos não codificantes. Os miRNAs remanescentes encontra-se dentro de éxons de codificação (especialmente regiões 3' não traduzidas - 3' *UTR*) e em regiões intergênicas (SAYED e ABDELLATIF, 2011).

Acredita-se que os miRNAs podem regular acima de 30% de genes codificantes do genoma humano, constituindo uma complexa rede regulatória entre os miRNAs e seus alvos (KIM; HAN; SIOMI, 2009), uma vez que um único miRNA pode regular diversos mRNAs alvos, bem como um mRNA alvo pode ser regulado por múltiplos miRNAs (SUBRAMANYAM e BLELLOCH, 2011).

Os microRNAs estão associados à quase todos os aspectos da biologia do câncer, como: a diferenciação, proliferação, apoptose, metástase e angiogênese (LEE e DUTTA, 2009; CHEN et al., 2012; HU et al., 2013; SONG; BAI; ZHANG, 2014; ZHANG, Z. et al., 2014). O atual conhecimento das funções celulares dos miRNAs permitiu o melhor entendimento do processo da carcinogênese, possibilitando o advento de novos e potenciais biomarcadores (miRNAs) para diagnóstico desse tipo de câncer (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010; GOMES et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; WU et al., 2014; DARNET et al., 2015; VIDAL et al., 2016).

1.3.1 - miRNA: biogênese e regulação pós-transcricional

A biogênese do miRNA é composta por uma série de eventos complexos que podem ser resumidos nas seguintes etapas: (i) transcrição do gene miRNA, (ii) processamento pela DROSHA, (iii) exportação para o citoplasma, (iv) processamento pela DICER, (v) incorporação do miRNA ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), ilustradas na figura 4.

Primeiramente o RNA é transcrito a partir de um gene miRNA, pela RNA polimerase II (Pol II), sintetizando uma molécula de aproximadamente 500 a 3000 pares de base, denominada miRNA primário (pri-miRNA) (LEE et al., 2004; HAN et al., 2006). Este transcrito dispõe de estrutura CAP na extremidade 5' e de cauda poliadenilada na extremidade

3', além de poder sofrer *splicing* de forma similar aos mRNAs (BRACHT et al., 2004). Adicionalmente, o pri-miRNA possui regiões palíndromes, que permite que ele se sobreponha formando uma estrutura de grampo chamada de *hairpin* ou haste-alça, que parece eficaz em aumentar a estabilidade e proteger o transcrito da ação de endonucleases (KIM, 2005). Ainda no núcleo, uma enzima da família RNase III, DROSHA, e seu cofator DGCR8, reconhece o pri-miRNA e interage com a região de haste-alça e, por meio de um microprocessamento endonucleotídico, gera uma molécula de aproximadamente 70 nucleotídeos (nt) de tamanho, que passa a ser chamada de miRNA precursor (pré-miRNA) (LEE et al., 2003).

A proteína de exportação nuclear chamada de Exportina-5 (XOP5) associada ao cofator RAN, carregam o pré-miRNA do núcleo para o citoplasma (YI et al., 2003; CULLEN, 2004), onde ocorre o segundo processamento da molécula por uma enzima da família RNase III, denominada DICER. Esta regula o processamento do pré-miRNA em conjunto com o TRBP ou PACT (proteínas de ligação a DICER), clivando o RNA em haste-alça para um miRNA bifilamentar (duplex) composto pela fita que corresponde ao miRNA maduro e a sua fita antisentido (miRNA:miRNA*) de ~22 nt, dependendo do miRNA (AMBROS et al., 2004; ZHANG et al. 2004; CHENDRIMADA et al., 2005; PARK et al., 2011).

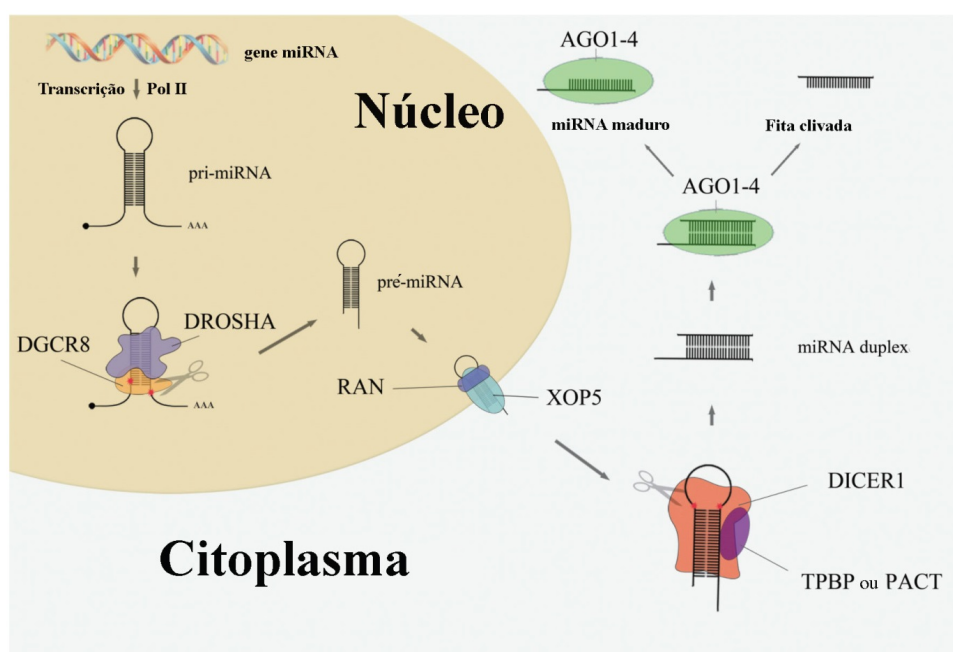


Figura 4 - Biogênese do microRNA (Fonte: Adaptado de HE et al., 2016).

O miRNA bifilamentar é incorporado ao RISC onde é desenrolado e um de seus filamentos é preferencialmente degradado (KIM, 2005). Entretanto, a estabilidade de alguns miRNAs permite que ambos os filamentos (miRNA e miRNA*) possam ser incorporados a complexos RISC. Neste caso, denomina-se “5p” a fita a extremidade 5’ *UTR* da haste-alça e “3p” a fita da extremidade 3’ *UTR* (HE et al., 2005).

Por meio da ação de ribonucleoproteínas, designadas de Argonautas (AGO1-4; caracterizadas como centro catalítico do RISC e responsáveis por agir como *slicer*), o miRNA maduro se torna capaz de interagir com um mRNA específico e regular a sua tradução (LIU et al., 2004; CHENDRIMADA et al., 2005; KLASSE; HOUZET; JEANG, 2011).

O mecanismo pelo qual os miRNAs regulam os mRNA alvo depende do reconhecimento e pareamento da região *seed* (2-8 nt iniciais da extremidade 5’-*UTR* do miRNA) com a região 3’-*UTR* do mRNA (Figura 5; RIBEIRO-DOS-SANTOS; CRUZ; DARNET, 2012). O mecanismo de clivagem do mRNA dependerá do pareamento do mRNA com a região central do miRNA. Caso esse pareamento seja perfeito ou quase perfeito, o mRNA alvo é clivado por meio da ação de AGO2. No entanto, se o pareamento for imperfeito, outras enzimas são carregadas para o complexo RISC, onde promovem a remoção da cauda poliadenilada do mRNA, facilitando sua eventual degradação (SCOTT, 2015).

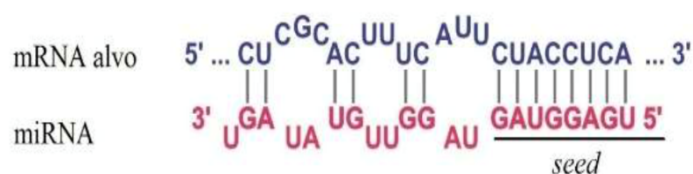


Figura 5 - Pareamento entre a região *seed* do microRNA e a extremidade 3’ *UTR* do RNA mensageiro alvo. (Fonte: RIBEIRO-DOS-SANTOS; CRUZ; DARNET, 2012).

1.3.2 - miRNAs no câncer gástrico

Estudos demonstram que os microRNAs estão intimamente ligados ao câncer (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010; GOMES et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; WU et al., 2014; DARNET et al., 2015; VIDAL et al., 2016), de modo que podem se comportar

como miRNAs oncogênicos (OncomiRs) ou como miRNAs supressores tumorais (TS-miRs) (ZHANG et al., 2007). Os oncomiRs, de modo geral, reprimem a tradução de genes supressores tumorais e tendem a possuir uma expressão elevada em cânceres, o que favorece o desenvolvimento da doença. Os TS-miRs de modo geral reprimem a tradução de oncogenes e tendem a apresentar baixos níveis de expressão no câncer, limitando a sua capacidade de regular a tradução de oncogenes e favorecendo a progressão tumoral (ZHANG et al., 2007).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem juntado esforços na busca de novos biomarcadores para o CG, com ênfase nos miRNAs (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010; GOMES et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; DARNET et al., 2015; VIDAL et al., 2016). Em estudos iniciais, utilizando o sequenciamento de nova geração (NGS), foram detectados 15 miRNAs mais expressos em tecido gástrico saudável da região da cárdia (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010). Posteriormente, Moreira et al. (2014) identificaram oito miRNAs mais expressos na região do antro saudável. Esses estudos demonstram que o estômago possui um perfil de expressão de miRNAs que fazem parte a expressão gênica normal do órgão, e que sua desregulação pode levar a doenças gástricas.

Estudos adicionais desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa identificaram miRNAs com perfis de expressão alterados no CG quando comparado ao tecido gástrico sem câncer, sugerindo-os como potenciais biomarcadores de CG (GOMES et al., 2014; DARNET et al., 2015; VIDAL et al., 2016). Além disso, Assumpção et al. (2015) demonstraram o envolvimento de três miRNAs no campo de cancerização no CG. Esses estudos evidenciam que os miRNAs estão intimamente relacionados ao CG e que necessitam de estudos mais detalhados que demonstrem o seu real envolvimento com esse tipo de câncer.

1.3.3 - Campo de cancerização

O campo de cancerização (também conhecido como *field effect*, *field cancerization* ou *field defect*) foi inicialmente proposto por Slaughter; Southwick; Smejkal (1953), que observaram alterações histopatológicas em regiões de aparência macroscópica normal adjacentes ao carcinoma oral de células escamosas, sendo associado ao surgimento de múltiplos carcinomas ou recidivas. O desenvolvimento das técnicas moleculares possibilitou a evolução do conceito de campo de cancerização para estágios cada vez mais precoces na

carcinogênese, onde se evidencia alterações moleculares, genéticas e epigenéticas, as quais apresentam potencial para o desenvolvimento de novos tumores, mesmo em tecido contíguo ao câncer microscopicamente normal (BRAAKHUIS et al., 2003; CHAI e BROWN, 2009; LOCHHEAD et al., 2015).

A fim de tornar esse modelo de carcinogênese evidente, tem-se explorado o campo de cancerização em diversos estudos com enfoque em diferentes sítios e órgãos (BERNSTEIN et al., 2008; CHAI e BROWN, 2009; RIVENBARK e COLEMAN, 2012; DOTTO, 2014; HAWTHORN; LAN; MOJICA, 2014; MOHAN e JAGANNATHAN, 2014; PATEL et al., 2015; BABA et al., 2016). Nos últimos anos, distintos trabalhos têm reportado importantes alterações genéticas e epigenéticas associadas ao campo de cancerização (CHAI e BROWN, 2009; BABA et al., 2016). Dentre as alterações epigenéticas, a mudança no padrão da metilação é a mais bem documentada na literatura para o câncer gástrico (IVANAUSKAS et al., 2008; SITARAMAN, 2014; BABA et al., 2016; YOSHIDA et al., 2016).

No entanto, os miRNAs têm sido associados ao campo de cancerização por demonstrarem um perfil de expressão alterado nas adjacências do câncer e no câncer quando comparados ao tecido gástrico sem câncer (ASSUMPÇÃO et al., 2015). Esses autores avaliaram o campo de cancerização no câncer gástrico por meio da análise de miRnoma, os quais demonstraram alteração na expressão de três miRNAs (*hsa-miR-150*, *hsa-miR-664a* e *hsa-miR-483*) em amostras de tecido adjacente ao câncer, quando comparadas a amostras de tecidos com e sem câncer. Tais resultados demonstram a existência de campo de cancerização no CG e revelaram que o tecido adjacente não deve ser considerado um tecido normal, já que apresenta alterações moleculares que o tornam propício ao surgimento de novos tumores. Este esclarecimento é bastante pertinente, uma vez que diversos estudos utilizam o tecido adjacente como controle sem câncer em suas análises (PATTERSON et al., 2011; CHEN et al., 2012; WANG, J-L. et al., 2013; FENG et al., 2014; JIA et al., 2014; YU et al., 2016).

1.3.4 - Justificativa

A carcinogênese gástrica é um processo longo, que de modo geral passa despercebido por não causar sintomas graves, como resultado, o câncer gástrico geralmente é diagnosticado em estágio avançado (ARREGI et al., 2009), o que acarreta em dados

epidemiológicos desfavoráveis.

As neoplasias gástricas no Brasil, sobretudo no Estado do Pará e sua capital, Belém, exibem um histórico de elevadas taxas de incidência (INCA, 2005; 2007; 2009; 2011; 2013; 2015). Adicionalmente, em 1999 e 2000, a doença destacou-se como primeira causa de morte, correspondendo, respectivamente, a 15,98 e 13,99 % dos óbitos (RESENDE et al., 2006). O CG também pode ser notado devido a baixa taxa de sobrevida que exhibe, uma vez que mesmo com os avanços nas cirurgias e terapias adjuvantes, somente 20% dos pacientes alcançam cinco anos de sobrevida (TAKAHASHI; SAIKAWA; KITAGAWA, 2013; OBA et al., 2013).

Este panorama pode estar em parte envolvido com a ineficiência dos marcadores sorológicos, os quais são pouco utilizados com a finalidade de diagnóstico de CG, uma vez que são bastante limitados quanto a sua acurácia (HE et al., 2013). Isso restringe o diagnóstico a exames mais complexos e invasivos, como a endoscopia digestiva (Takahashi; Saikawa; Kitagawa, 2013). Por esta razão, tem-se aumentado a busca por biomarcadores sensíveis e específicos para o CG.

A seleção dos microRNAs utilizados foi baseada em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, sobretudo resultados de NGS, bem como outros estudos disponíveis na literatura, os quais demonstravam os *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483* como prováveis biomarcadores para o câncer gástrico (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010; GOMES et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; DARNET et al., 2014; ASSUMPÇÃO et al., 2015).

Estudos sugerem que *hsa-miR-10a* pode ser utilizado como potencial biomarcador no CG (CHEN et al., 2012; JIA et al., 2014; ZHANG, G. et al., 2014). Chen et al. (2012) demonstraram a hiperexpressão do *hsa-miR-10a* no câncer gástrico primário quando comparado a metástase. Enquanto Jia et al. (2014) e Zhang, G. et al. (2014) encontraram a hipoexpressão de *hsa-miR-10a* no CG quando comparado ao tecido gástrico adjacente ao câncer. Por meio de NGS, Assumpção et al. (2015) verificaram que este miRNA possui um perfil de expressão diferencial entre os tecidos com CG, adjacente e saudável, sugerindo o campo de cancerização nesse tipo de câncer. Esses estudos têm sugerido que este miRNA pode ser utilizado como potencial biomarcador para o câncer gástrico, entretanto, novos estudos são necessários com objetivo reforçar e estabelecer o real papel desse miRNA na

carcinogênese gástrica.

Dos estudos iniciais realizados por nosso grupo de pesquisa que delinearam o perfil de expressão de miRNAs em tecidos gástricos saudáveis (RIBEIRO-DOS-SANTOS ET AL., 2010; MOREIRA ET AL., 2014), o *hsa-miR-148a* encontra-se como um componente da expressão normal desses tecidos, indicando que este miRNA possui importante papel na homeostase do órgão e que sua desregulação pode contribuir para o desenvolvimento do CG. Nosso grupo de pesquisa também identificou que este miRNA está hipoexpresso no CG, quando comparado ao tecido adjacente (ASSUMPÇÃO et al., 2015) e tecido sem câncer gástrico (DARNET et al., 2015).

Por meio do NSG, estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o *hsa-miR-150* encontra-se hipoexpresso no CG quando comparado ao antro sem câncer (DARNET et al., 2015) e ao tecido adjacente ao câncer (ASSUMPÇÃO et al., 2015). Ao validar este miRNA utilizando o método de qRT-PCR, Assumpção et al. (2015) encontraram-no hiperexpresso no CG quando comparado ao tecido adjacente, embora houvesse diferença de expressão significativa, corroborando a existência de campo de cancerização. Os resultados conflitantes entre as duas metodologias utilizadas por Assumpção et al. (2015) pode ser atribuído ao pequeno número amostral utilizado no sequenciamento. Curiosamente, Wu et al. (2010) identificaram a hiperexpressão do *hsa-miR-150* no CG quando comparado ao tecido às adjacências e ao tecido distante do tumor, corroborando os dados de qRT-PCR identificados por Assumpção et al. (2015). Estes dados indicam que o *hsa-miR-150* é um biomarcador em potencial para o CG, havendo a necessidade de novos estudos para corroborar o seu perfil de expressão, além de explorar alvos e consequentemente estabelecer a sua relação no desenvolvimento do CG.

Outro miRNA identificado e sugerido por Assumpção et al. (2015) como potencial biomarcador para o CG é o *hsa-miR-483*, o qual encontra-se hiperexpresso no CG e no antro sem câncer quando comparado ao tecido adjacente ao tumor. Em outro estudo, Wang, Z. et al. (2013), observaram que o *hsa-miR-483* está hipoexpresso em metástases associadas a linfonodos quando comparadas ao CG primário. Este miRNA é pouco explorado e consequentemente não possui sua uma relação bem esclarecida no CG, bem como em outros tipo de câncer. Apesar de ser indicado como potencial biomarcador (Assumpção et al., 2015), são necessários novos estudos para ampliar a visão sobre seu envolvimento no CG.

2 - OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar e avaliar o campo de cancerização no câncer gástrico, através da análise do perfil de expressão dos miRNAs: *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483* em amostras de tecidos de câncer gástrico, tecidos adjacentes ao câncer gástrico e tecidos gástricos de pacientes sem histórico de câncer gástrico.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Identificar o perfil de expressão dos microRNAs *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483* em amostras de adenocarcinoma gástrico, tecido não neoplásico adjacente ao adenocarcinoma gástrico e tecido gástrico de pacientes sem câncer;
2. Comparar o perfil de expressão dos microRNAs *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483* entre as diferentes amostras aqui analisadas;
3. Avaliar possíveis alterações no perfil de expressão dos microRNAs aqui analisados entre as diferentes amostras;
4. Avaliar a capacidade discriminatória desses miRNAs entre os diferentes grupos aqui analisados e seu potencial como biomarcadores de CG e/ou de campo de cancerização;
5. Comparar o perfil de expressão dos microRNAs *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483* obtido neste estudo com os dados descritos na literatura;
6. Identificar os genes drivers alvejados pelos microRNAs *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483* e sua relação com CG.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - ÁREA DE ESTUDO

Genética.

3.2 - TIPO DE ESTUDO E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Estudo quantitativo de investigação experimental em laboratório, utilizando amostras de biópsia gástrica preservadas em parafina de pacientes com e sem câncer.

3.2.1 - Material biológico

Foram obtidas um total de 31 amostras preservadas em parafina provenientes de 20 pacientes com adenocarcinoma de estômago, sendo: 20 amostras de câncer gástrico (CG) e 11 amostras de tecido adjacente ao câncer gástrico (ADJ). Além disso, foram utilizadas como controles sem câncer (SC), 30 amostras preservadas em parafina de pacientes com gastrite, porém sem histórico de CG.

Amostras de câncer gástrico e adjacentes ao câncer gástrico são procedentes de pacientes do HUIBB (Belém-PA) submetidos a tratamento cirúrgico. As amostras gástricas de pacientes sem histórico de câncer gástrico foram obtidas a partir de pacientes submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta no Hospital São Camilo (Macapá-AP).

3.3 - DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

3.3.1 - Extração dos miRNAs

O RNA total de todas as amostras foi isolado com o kit de extração *High Pure miRNA Isolation Kit* (Roche) utilizando procedimentos para extração de amostras em parafina recomendados pelo fabricante. Após o isolamento, a quantificação dos miRNAs foi realizada no aparelho Qubit® 2.0 *Fluorometer* (Invitrogen, USA) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, as amostras foram diluídas para uma concentração final de 4ng/μL e estocadas a -20°C até as etapas seguintes do experimento.

3.3.2 - Transcrição Reversa dos miRNAs

A partir das moléculas de RNA total extraído foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) por transcriptase reversa, utilizando o *TaqMan® microRNA Reverser Transcription Kit* (Applied Biosystem) em um termociclador *Verity 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystem). As reações foram individualmente realizadas em *pool* de até três miRNAs, possuindo cada reação um volume final de 15 µL, a qual consiste em 4,16 µL de água livre de nucleases; 1,5 µL de 10x RT *Buffer*; 0,15 µL de dNTP mix; 0,19 µL de RNase inhibitor; 1µL de *Multiscribe™ RT enzyme*; 1 µL de cada *Primer RT TaqMan®* e 5µL de amostra de RNA total. Após o preparo da reação, as amostras foram submetidas ao termociclador por um ciclo de 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C e 5 minutos a 4°C. Posteriormente, as amostras de cDNAs foram armazenados a 10°C até a realização da etapa seguinte.

3.3.3 - Validação da expressão diferencial dos miRNAs por qRT-PCR

A expressão dos miRNAs (*hsa-miR-10a*, *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483*) foi mensurada pelo próprio programa de PCR em Tempo Real quantitativo (qRT-PCR), utilizando o *TaqMan® microRNA Assays* (Life Technologies) no aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As reações foram desenvolvidas em triplicata e com um volume final de 10 µL, com pelo menos uma reação controle para verificar uma possível contaminação da água. A reação individual consistia em 3,8µL de água livre de nucleases; 5µL de Master Mix II (Life Technologies, USA); 0,5µL de *Primer TM Taqman®* e 0,7µL de cDNA do respectivo miRNA. As condições de termociclagem no PRISM 7500 foram um ciclo de 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e de 1 minuto a 60°C. O fator de normalização dos microRNAs de todas as amostras foi a média aritmética entre endógenos Z30 e RNU6B.

3.4 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para o cálculo de expressão foi adotado o método comparativo de *Ct*, sendo em seguida analisado o *fold change* para investigação da diferença de expressão relativa dos

miRNAs entre os tecidos envolvidos.

Todos os dados foram analisados quanto ao seu padrão de distribuição por meio do teste de Shapiro-Wilk. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* com *P* ajustado pela correção de Bonferroni para analisar a diferença estatística entre os grupos (CG *vs.* SC; ADJ *vs.* SC; CG *vs.* ADJ). Foi considerado estatisticamente significativo o *P* valor < 0,05.

Para avaliar a capacidade discriminatória dos miRNAs e sua capacidade de atuar como potenciais biomarcadores, foi desenvolvida a curva característica de operação do receptor (ROC - *receiver operating characteristic*), indicando sensibilidade e especificidade, bem como a acurácia por meio da área abaixo da curva (AUC – *area under curve*) para cada comparação grupal.

Realizou-se também uma análise de *clusterização* para os miRNAs em estudo. Todos os testes estatísticos e gráficos foram gerados utilizando o pacote estatístico R (<http://www.r-project.org/>) e RStudio (versão 0.99.903) e IBM SPSS Statistics Software (versão 20).

3.5 - BUSCA DE GENES ALVOS

A identificação de genes alvos para miRNAs *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483* foi realizada por meio de consulta ao banco de dados miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>; CHOU et al., 2016; Quadro 1), utilizando apenas genes alvos validados por fortes evidências. Os genes drivers utilizados nas buscas foram os disponíveis em Vogelstein et al. (2013).

3.6 - ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente estudo obedeceu à Resolução Nº 466 de 12 de dezembro de 2012 sendo submetido ao Conselho de Ética em Pesquisa e fez parte do projeto Rede de Pesquisa em Genômica Populacional Humana. O projeto teve a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da UFPA sob o protocolo de número 14052004/HUJBB.

Foram incluídos somente os pacientes que consentiram livremente em participar

do estudo, dessa forma, para cada amostra cedida há um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinados por pacientes com idade acima de 18 anos ou por responsáveis de pacientes menores de idade, autorizando a participação dos mesmos no estudo.

4 - RESULTADOS

Para cada microRNA foram analisadas 61 amostras, sendo: 20 amostras de câncer gástrico (CG), 11 amostras de tecido adjacente ao câncer gástrico (ADJ) e 30 amostras de tecido sem câncer (SC).

4.1 - ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO

O miRNA *hsa-miR-10a* revelou diferenças estatisticamente significantes entre todas as comparações (Figura 6A; Tabela 1). Este miRNA encontrou-se hiperexpresso no CG ($P= 2e-16$; *fold* > 24) e no ADJ ($P= 2,2e-8$; *fold* > 9) quando comparados ao tecido SC (Figura 6A; Tabela 1). Ao comparar CG vs. ADJ, foi observado que *hsa-miR-10a* possui maior expressão no CG ($P= 0,014$; *fold* > 2) que o tecido ADJ (Figura 6A; Tabela 1).

A expressão do *hsa-mir-148a* foi significativamente maior no CG ($P= 3,7e-9$; *fold* > 6) e ADJ ($P= 0,00022$; *fold* > 4) quando comparados ao tecido SC (Figura 6B; Tabela 1). Este miRNA não exibiu diferença de expressão significativa entre os tecidos CG e ADJ ($P= 0,309$; *fold change* < 2; Figura 6B; Tabela 1).

O miRNA *hsa-miR-150* foi encontrado significativamente hiperexpresso nos tecidos de CG ($P=1,3e-10$; 11-*fold* maior) e ADJ ($P=3,6e-5$; 4-*fold* maior) quando comparados ao tecido SC. Contudo, sem exibir diferença de expressão significativa entre os tecidos CG e ADJ ($P=0,22$; 1-*fold* maior no CG; Figura 6C; Tabela 1).

Da mesma maneira, o miRNA *hsa-miR-483* demonstrou-se hiperexpresso nos tecidos de CG ($P= 2,9e-13$; 1200-*fold* maior) e ADJ ($P= 9,6e-7$; 551-*fold* maior) quando comparados ao tecido SC (Figura 6D; Tabela 1). Esse miRNA não demonstrou diferença estatística nos seus níveis de expressão entre os tecidos de CG e ADJ ($P= 0,11$; 22-*fold* maior no CG; Figura 6D; Tabela 1).

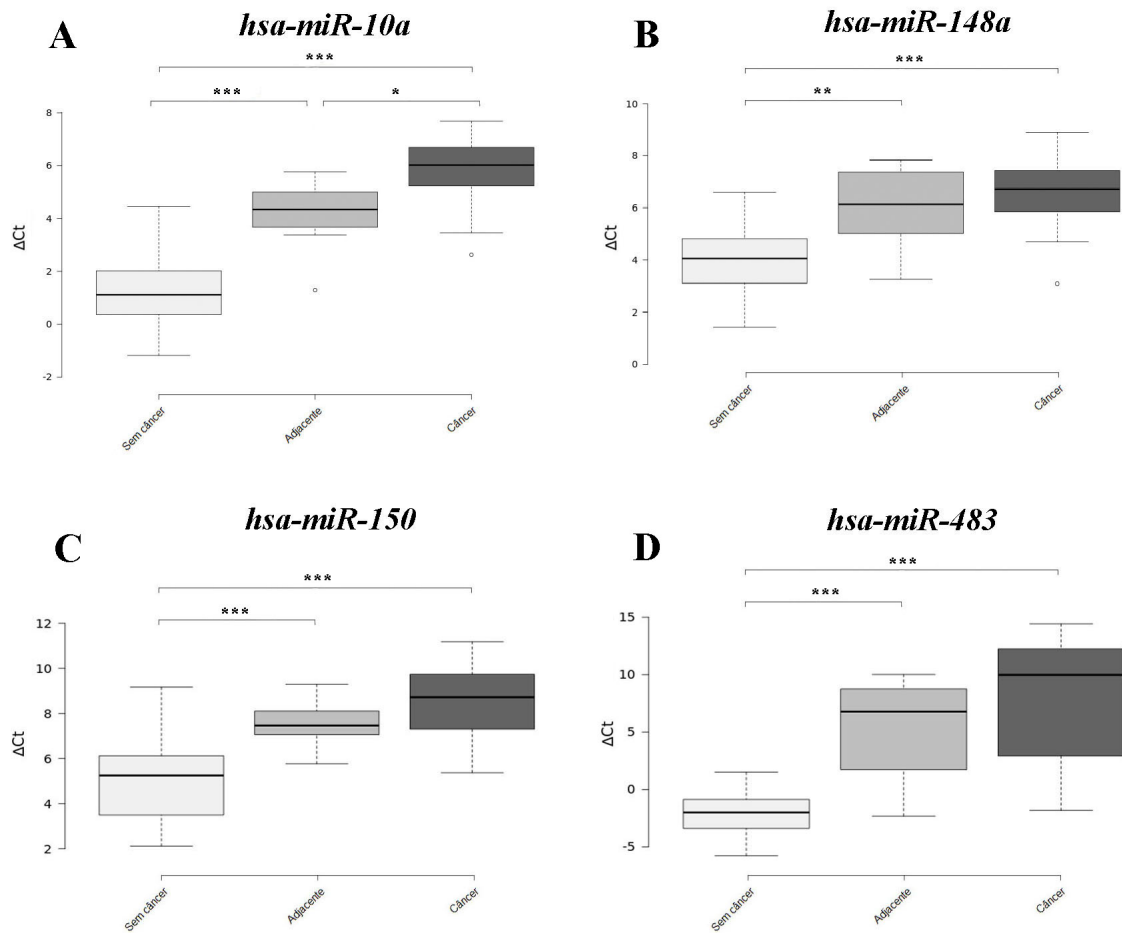


Figura 6 - Boxplots demonstrando as diferenças estatísticas existentes entre os três grupos de amostras analisadas. A) *hsa-miR-10a*, B) *hsa-miR-148a*, C) *hsa-miR-150* e D) *hsa-miR-483*. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.001$; (***) $P < 0.0001$. Valores de P obtidos pelo teste ANOVA *one-way* corrigido pelo método de Bonferroni.

Tabela 1 - Análise do perfil de expressão dos microRNAs entre amostras sem câncer (SC), adjacente ao câncer (ADJ) e de câncer gástrico (CG).

microRNA	Análise	Perfil de Expressão	<i>Fold-change</i>	<i>P-valor</i> [†]
<i>hsa-miR-10a</i>	SC vs. ADJ	↑ ADJ	> 9	2,20e-08*
	SC vs. CG	↑ CG	> 24	2,00e-16*
	ADJ vs. CG	↑ CG	> 2	0,014*
<i>hsa-miR-148a</i>	SC vs. ADJ	↑ ADJ	> 4	0,00022*
	SC vs. CG	↑ CG	> 6	3,70e-09*
	ADJ vs. CG	↑ CG	< 2	0,309
<i>hsa-miR-150</i>	SC vs. ADJ	↑ ADJ	> 4	3,60e-05*
	SC vs. CG	↑ CG	> 11	1,30e-10*
	ADJ vs. CG	↑ CG	< 2	0,22
<i>hsa-miR-483</i>	SC vs. ADJ	↑ ADJ	> 551	9,60e-07*
	SC vs. CG	↑ CG	> 1200	2,90e-13*
	ADJ vs. CG	↑ CG	> 22	0,11

(†) Valores de *P* foram obtidos a partir do teste de ANOVA *one-way* ajustado pela correção de Bonferroni.

(*) *P-valor* significativo.

4.2 - ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO

A análise de clusterização, ofereceu uma ampla visão sobre o perfil de expressão dos miRNAs aqui estudados em todas as amostras analisadas, que estão resumidos em um *heatmap* (Figura 7). O mesmo proporciona uma representação consistente daquelas obtidas por meio das análises estatísticas e gráficas, revelando a existência de três grupos distintos entre as amostras analisadas.

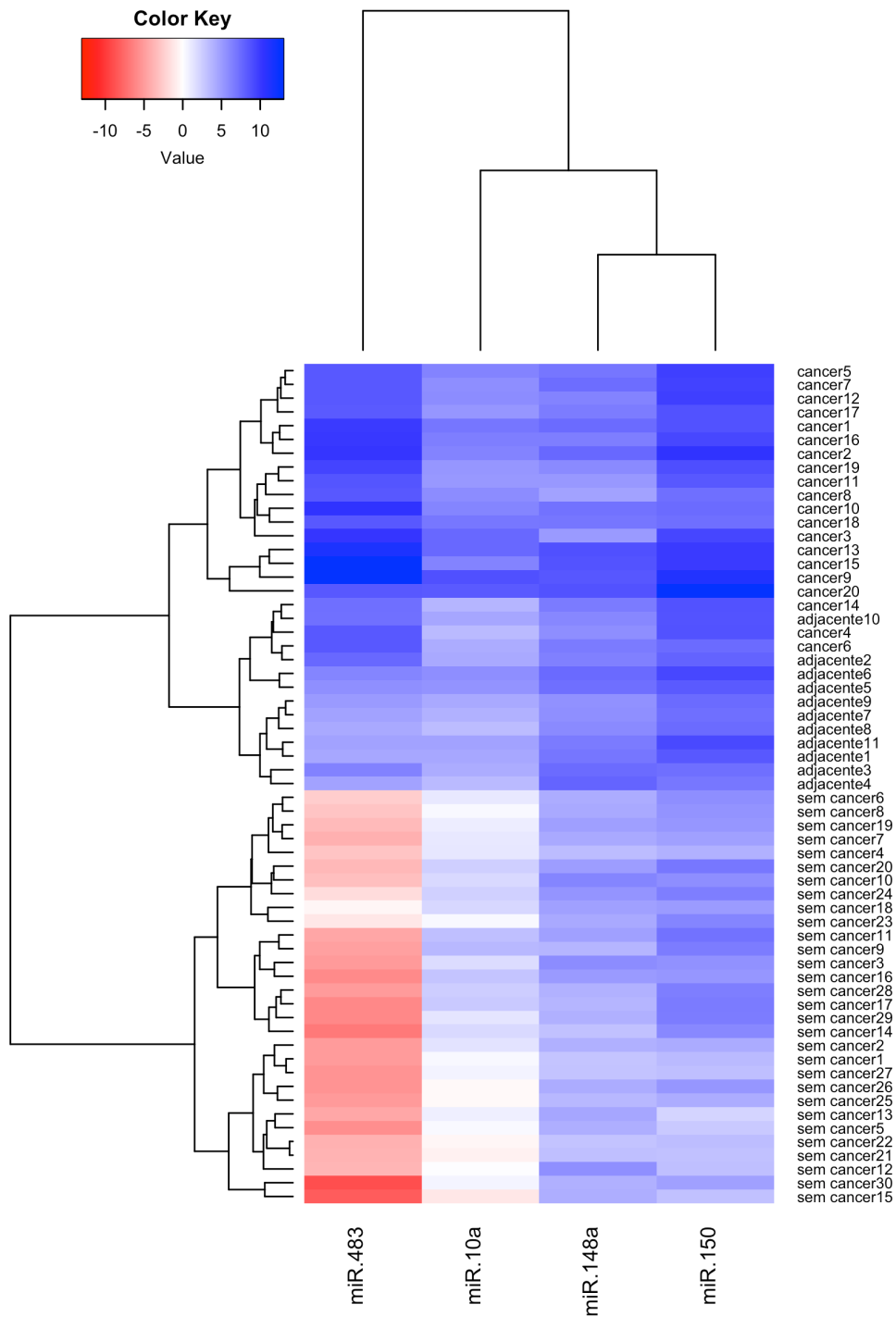


Figura 7 - Heatmap dos perfis de expressão dos miRNAs *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483* em amostras de câncer gástrico (câncer), adjacente ao câncer (adjacente) e sem câncer.

4.3 - ANÁLISE DA CURVA ROC

Adicionalmente, foi realizada a análise da curva ROC e a sua respectiva AUC, em que os miRNAs *hsa-mir-10a*, *hsa-mir-148a*, *hsa-mir-150* e *hsa-mir-483* demonstraram alta capacidade em discriminar os tecidos SC do CG, uma vez que todos apresentam uma AUC > 0,9 (Tabela 2; Figura 8A-D).

Os miRNAs *hsa-mir-10a*, *hsa-mir-150* e *hsa-mir-483* exibiram alta capacidade em discriminar os tecidos SC do ADJ (Figura 8A, C-D), apresentando uma AUC > 0,9 (Tabela 2), enquanto o *hsa-miR-148a* demonstrou uma capacidade moderada em diferenciar SC do ADJ (Figura 8B), apresentando uma AUC > 0,8 (Tabela 2).

Os miRNAs *hsa-mir-10a* e *hsa-mir-483* expressaram uma capacidade moderada em discriminar o tecido ADJ do CG com AUC > 0,7 (Figura 8A e D; Tabela 2), enquanto os miRNAs *hsa-mir-148a* e *hsa-mir-150* demonstraram baixa capacidade discriminatório em separar os tecidos CG e ADJ com AUC < 0,7 (Figura 8B-C; Tabela 2).

Tabela 2 - Análise da capacidade discriminatória dos microRNAs entre amostras sem câncer (SC), adjacente ao câncer (ADJ) e câncer gástrico (CG).

microRNA	Análise	<i>P</i> -valor [†]	ROC - IC 95%	AUC
<i>hsa-miR-10a</i>	SC vs. ADJ	2,20e-08*	0,851-1,000	0,936 ⁺⁺⁺
	SC vs. CG	2,00e-16*	0,965-1,000	0,987 ⁺⁺⁺
	ADJ vs. CG	0,014*	0,569-0,940	0,755 ⁺⁺
<i>hsa-miR-148a</i>	SC vs. ADJ	0,00022*	0,689-1,000	0,836 ⁺⁺
	SC vs. CG	3,70e-09*	0,833-1,000	0,918 ⁺⁺⁺
	ADJ vs. CG	0,309	0,387-0,822	0,605 ⁺
<i>hsa-miR-150</i>	SC vs. ADJ	3,60e-05*	0,844-1,000	0,932 ⁺⁺⁺
	SC vs. CG	1,30e-10*	0,794-1,000	0,902 ⁺⁺⁺
	ADJ vs. CG	0,22	0,462-0,843	0,652 ⁺
<i>hsa-miR-483</i>	SC vs. ADJ	9,60e-07*	0,865-1,000	0,945 ⁺⁺⁺
	SC vs. CG	2,90e-13*	0,972-1,000	0,990 ⁺⁺⁺
	ADJ vs. CG	0,11	0,530-0,897	0,714 ⁺⁺

ROC= Receiver Operating Characteristic - Característica de Operação do Receptor. AUC= area under the curve - área abaixo da curva. (+++) Alto poder discriminatório (AUC $\geq$ 0,850); (++) Poder discriminatório moderado (AUC = 0,700-0,849); (+) Baixo poder discriminatório (AUC < 0,700).

(†) Valores de *P* foram obtidos a partir do teste de ANOVA *one-way* ajustado pela correção de Bonferroni.

(*) *P*-valor significativo.

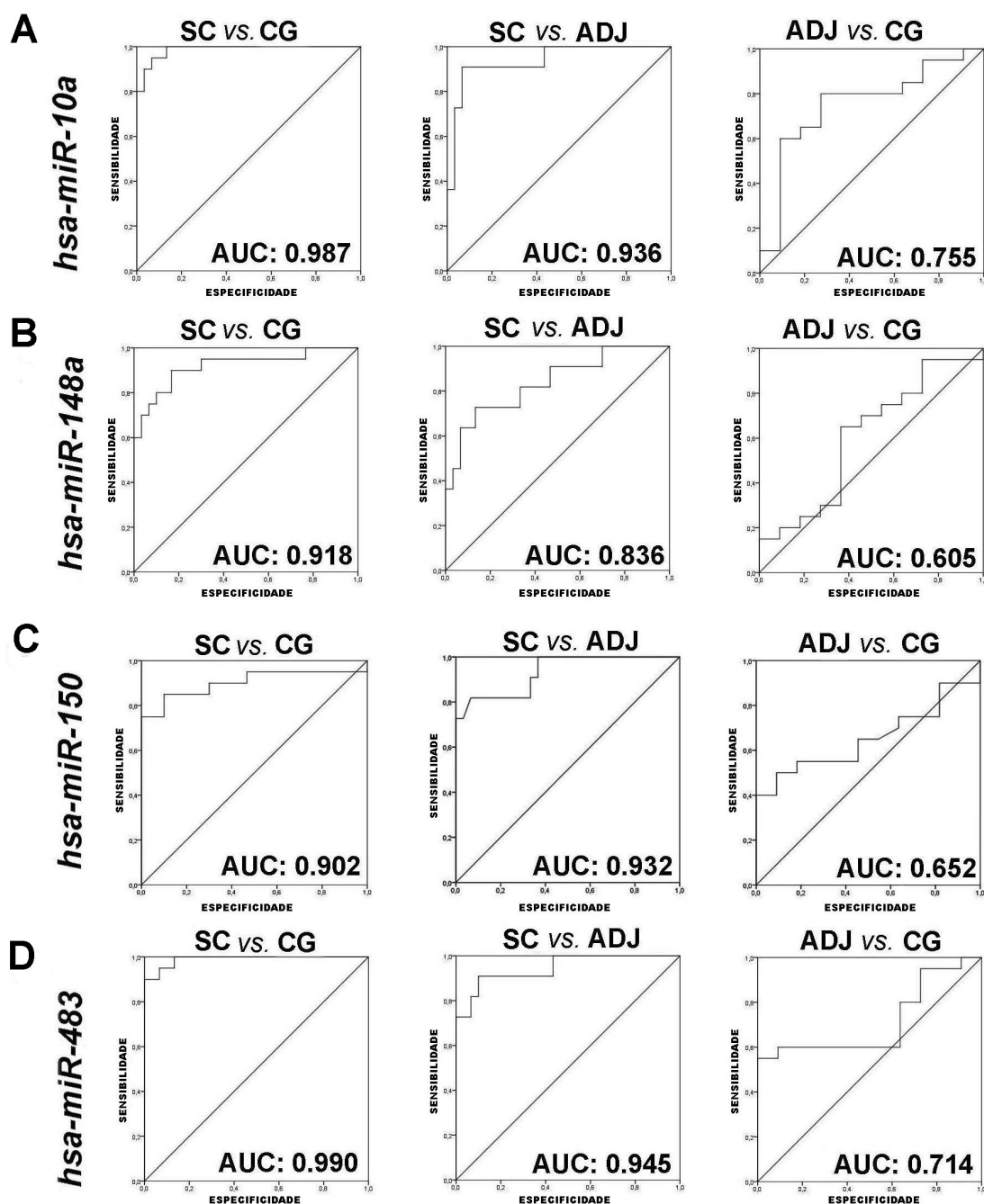


Figura 8 - Análise da curva ROC (*receiver operating characteristic*) dos microRNAs a) *hsa-miR-10a*, b) *hsa-miR-148a*, c) *hsa-miR-150*, e d) *hsa-miR-483*. (SC) sem câncer; (CG) câncer gástrico; (ADJ) tecido adjacente ao CG. AUC (*area under curve* - área sob a curva). $AUC \geq 0.850$ = Alto poder discriminatório; $AUC = 0.700-0,849$ = Médio poder discriminatório; $AUC < 0.700$ = Baixo poder discriminatório.

4.4 - IDENTIFICAÇÃO DOS GENES ALVOS

Realizamos a busca de genes alvos dos miRNAs aqui estudados no banco de dados miRTarBase, utilizando somente as informações baseadas em fortes evidências de acordo com o banco de dados. Essa análise demonstrou que esses miRNAs regulam pelo menos 9 genes importantes (Quadro 2), em que: *hsa-miR-10a* possui como alvo o gene driver *PTEN*; *hsa-miR-148a* regula os genes *ROCK1*, *DNMT1*, *CDKN1B* e *SMAD2*; *hsa-miR-150* regula os genes *TP53*, *EP300*, *SP1*; e *hsa-miR-483* regula o gene driver *SMAD4*.

Quadro 1 - Genes alvejados por regulação negativa dos miRNAs analisados neste estudo. Informações baseadas em fortes evidências disponíveis no banco de dados miRTarBase[§].

microRNA/Perfil de Expressão no CG	Genes alvos	Classificação do gene	Autores
<i>hsa-miR-10a</i> /hiperexpresso	<i>PTEN</i> *	TS*	ZENG e LI, 2014; YU et al, 2015
<i>hsa-miR-148a</i> /hiperexpresso	<i>DNMT1</i> *	Oncogene*	YANG et al., 2011; ZHU et al., 2012
	<i>ROCK1</i>	Oncogene	ZHENG et al., 2011
	<i>CDKN1B</i>	TS	GUO et al., 2011
	<i>SMAD2</i> *	TS*	WANG, S-H et al., 2013; WU et al., 2012
<i>hsa-miR-150</i> /hiperexpresso	<i>TP53</i> *	TS*	FENOGLIO-PREISER et al., 2003; WANG, D. et al., 2013; ZHANG; WEI; XU, 2013; BUSUTTIL et al., 2014
	<i>EP300</i> *	TS*	DUAN et al., 2013; KOSHIISHI et al., 2004; KIM et al., 2013
	<i>SP1</i>	TS/oncogene	ZHENG et al. 2013; BEISHLIN e AZIZKHAN-CLIFFORD, 2015
<i>hsa-miR-483</i> /hiperexpresso	<i>SMAD4</i> *	TS*	HAO et al. 2011; LENG et al., 2009; SHEN et al., 2015; WANG et al., 2007

(*) Genes driver [Informação baseada na "Tabela S2A" disponível em: VOGELSTEIN et al., 2013.]

(§) miRTarBase – <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/> – CHOU et al., 2016.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - *hsa-miR-10a*

A hiperexpressão do *hsa-miR-10a* tem sido reportada em diversos tipos de cânceres, incluindo o melanoma, o câncer de mama (ZHANG et al., 2006), a leucemia mieloide (JONGEN-LAVRENCIC et al., 2008), o carcinoma hepatocelular (VARNHOLT et al., 2008), o glioma (YAN et al., 2015) o câncer colorretal (SCHEE et al., 2013), bem como o câncer gástrico (CHEN et al., 2012; ZHANG, G. et al., 2014; ASSUMPÇÃO et al., 2015).

São escassos os estudos que associam o *hsa-miR-10a* com o CG (CHEN et al., 2012; JIA et al., 2014; ZHANG, G. et al., 2014; ASSUMPÇÃO et al., 2015). Chen et al. (2012) e Assumpção et al. (2015) demonstraram que *hsa-miR-10a* encontra-se significativamente hiperexpresso no CG em relação ao tecido ADJ. Zhang, G. et al. (2014) demonstram que o *hsa-miR-10a* encontra-se hiperexpresso no CG e no ADJ quando comparados a amostras de pacientes SC. Esses estudos reforçam os dados obtidos no presente estudo para este miRNA (Tabela 1; Figura 4A). Dessa forma, percebe-se que o tecido adjacente exibe um perfil de expressão que se assemelha mais ao tecido com câncer que ao tecido sem câncer. Logo, a utilização do tecido ADJ como controle sem câncer pode levar a uma interpretação equivocada do verdadeiro perfil de expressão desse miRNA no CG (JIA et al., 2014).

A análise da curva ROC revelou que este miRNA possui alta acurácia em diferenciar o tecido de CG (AUC: 0,987; Figura 8A; Tabela 2) e o tecido ADJ (AUC: 0,936; Figura 8A; Tabela 2) do tecido SC, bem como acurácia moderada em discriminar os tecidos CG e ADJ (AUC: 0,755; Figura 8A; Tabela 2), indicando ser um potencial biomarcador de carcinogênese gástrica.

Um dos genes drivers alvos do *hsa-miR-10a* é o *PTEN* (ZENG e LI, 2014; YU et al, 2015; Quadro 2), um gene supressor tumoral que possui expressão reduzida no CG (FEI et al., 2002; GUO et al., 2009; XU; YANG; LU, 2014), favorecendo a invasão celular e metástase (ZHANG, L. et al., 2014). Dessa forma, sugere-se que este miRNA age como um oncomiR, um vez que a sua hiperexpressão pode reprimir a expressão do gene *PTEN*, favorecendo a progressão tumoral.

5.2 - *hsa-miR-148a*

Estudos demonstram que *hsa-miR-148a* encontra-se hipoexpresso no CG em relação aos tecidos ADJ e SC (KATADA et al., 2009; CHEN et al., 2010; RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010; GUO et al., 2011; CHEN et al., 2013; WANG, J-L et al., 2013; GOMES et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; SAKAMOTO et al., 2014; ZHANG, G. et al., 2014; ZHENG et al., 2014; ASSUMPÇÃO et al., 2015; DARNET et al., 2015; YU et al., 2016;). Entretanto, nossos resultados demonstraram que o *hsa-miR-148a* encontra-se hiperexpresso nos tecidos com CG (6-fold maior) e no ADJ (4-fold maior) quando comparados ao tecido SC. No mais, não identificamos diferença estatística no perfil de expressão desse miRNA entre os tecidos CG e ADJ. Estes resultados demonstram que o tecido ADJ se encontra mais semelhante ao tecido de CG que ao tecido SC, indicando que o tecido adjacente se encontra alterado a nível molecular.

Os nossos dados demonstram que o *hsa-miR-148a* possui grande acurácia em discriminar o tecido de CG (AUC: 0,918; Figura 8B; Tabela 2) e o tecido ADJ (AUC: 0,836; Figura 8B; Tabela 2) do tecido SC, bem como possui e baixa capacidade em discriminar ADJ de CG (AUC: 0,605; Figura 8B; Tabela 2), demonstrando ser um biomarcador em potencial para a carcinogênese gástrica.

Alguns estudos apontam o *hsa-miR-148a* como um TS-miR, por regular negativamente oncogenes no CG, tais quais, *DNMT1* (ZHU et al., 2012) e *ROCK1* (ZHENG et al., 2011). Enquanto outros indicam este miRNA como um oncomiR, por regular negativamente genes supressores tumorais, como por exemplo, *CDKN1B* (GUO et al., 2011) e *SMAD2* (WANG, S-H et al., 2013). O gene *CDKN1B* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* – Inibidor 1B de quinase dependente de ciclinas) codifica a proteína p27 (GUO et al., 2011), uma proteína atua na inibição do ciclo celular, onde a sua principal função é o controle da progressão do ciclo celular em G1, por meio da ligação e ativação dos complexos E-CDK2 e D-CDK4-ciclina (CHU; HENGST; SLINGERLAND, 2008). Assim, a hiperexpressão desse miRNA pode promover a proliferação de células gástricas por reprimir a expressão de p27.

Diante disso, sugere-se que este miRNA possui múltiplo papel na carcinogênese gástrica, onde a sua hipoexpressão em lesões pré neoplásicas, como a gastrite, pode favorecer a expressão de oncogenes alvos deste miRNA. Bem como, a sua hiperexpressão no câncer já estabelecido pode inibir a expressão de genes supressores tumorais.

5.3 - *hsa-miR-150*

A hiperexpressão do *hsa-miR-150* tem sido reportada nos cânceres de pulmão (ZHANG; WEI; XU, 2013), colorretal (FENG et al., 2014) e gástrico (KATADA et al., 2009; WU et al., 2010; INOUE et al., 2012; ASSUMPÇÃO et al., 2015).

Assumpção et al. (2015), por meio do método de qRT-PCR, identificaram a hiperexpressão do *hsa-miR-150* no tecido ADJ quando comparado ao tecido SC. Além disso, esses autores não encontraram diferenças estatisticamente significativas no nível de expressão desse miRNA entre os tecidos CG e ADJ. Assim, os resultados do presente estudo corroboram os dados de qRT-PCR de Assumpção et al. (2015), uma vez que demonstram que este miRNA encontra-se hiperexpresso no CG (11-*fold* maior) e no ADJ (4-*fold* maior) quando comparados ao tecido SC, sem exibir diferença estatística na comparação entre os tecidos CG e ADJ. Dessa forma, a semelhança no perfil de expressão do *hsa-miR-150* entre as amostras de CG e ADJ, demonstra que o tecido adjacente já possui um perfil de expressão alterado e que ele não pode ser considerado um tecido normal, corroborando a existência de campo de cancerização no câncer gástrico.

Os dados da curva ROC revelam que este miRNA possui alta acurácia em diferenciar o tecido de CG (AUC: 0,902; Figura 8C; Tabela 2) e o tecido ADJ (AUC: 0,932; Figura 8C; Tabela 2) do tecido SC, bem como acurácia moderada em discriminar os tecidos de CG e ADJ (AUC: 0,652; Figura 8C; Tabela 2), indicando ser um potencial biomarcador de carcinogênese gástrica.

O *hsa-miR-150* regula negativamente importantes genes supressores tumorais que estão envolvidos no CG, dentre eles estão o *TP53* (FENOGLIO-PREISER et al., 2003; WANG, D. et al., 2013; ZHANG; WEI; XU, 2013; BUSUTTIL et al., 2014) e o *EP300* (KOSHIISHI et al., 2004; DUAN et al., 2013; KIM et al., 2013), os quais implicam em um fenótipo agressivo do tumor. Esse miRNA também regula negativamente a expressão do gene *SPI* (ZHENG et al., 2013), um fator de transcrição que regula importantes processos biológicos associados ao câncer, como proliferação, diferenciação, resposta ao dano ao DNA, apoptose, senescência e angiogênese (BEISHLINE e AZIZKHAN-CLIFFORD, 2015). Dessa forma, *hsa-miR-150* pode contribuir para a progressão do tumor.

5.4 - *hsa-miR-483*

O *hsa-miR-483* é um miRNA pouco estudado, sendo encontrando alterado em tumores tais como o de Wilms (VERONESE et al., 2010; LIU et al., 2013), carcinoma adrenocortical (PATTERSON et al., 2011), câncer de coloretal, mama e fígado (VERONESE et al., 2010), bem como no CG (WANG, Z. et al., 2013; LIU et al., 2014; ASSUMPÇÃO et al., 2015).

Wang, Z. et al. (2013), observaram que o *hsa-miR-483* está hipoexpresso em metástases linfonodais associadas ao CG primário. Assumpção et al. (2015) encontraram este miRNA significativamente hiperexpresso no antro sem câncer em relação ao tecido ADJ e ao CG. Além de relatarem a hiperexpressão desse miRNA no tecido de CG quando comparado ao tecido ADJ. Já os resultados deste estudo, demonstram que este miRNA encontra-se hiperexpresso no CG e no ADJ quando comparados ao tecido SC, não sendo observada diferença estatística na comparação entre os tecidos CG e ADJ. Dessa forma, a semelhança no perfil de expressão do *hsa-miR-483* entre as amostras de CG e ADJ, indica que o tecido adjacente possui um perfil de expressão alterado, não devendo ser considerado um tecido normal, o que corrobora a existência de campo de cancerização neste tipo de câncer.

A análise da curva ROC revelou que *hsa-miR-483* possui alta acurácia em diferenciar o tecido de CG (AUC: 0,987; Figura 8A; Tabela 2) e o tecido ADJ (AUC: 0,936; Figura 8A; Tabela 2) do tecido SC, bem como acurácia moderada em discriminar os tecidos CG e ADJ (AUC: 0,755; Figura 8A; Tabela 2), indicando ser um potencial biomarcador de carcinogênese gástrica.

Wu; Ma; Zhu (2016) relatam que a hiperexpressão do *hsa-miR-483* é capaz de induzir a proliferação, invasão, auto renovação e inibição da apoptose em células tronco do câncer gástrico. Este comportamento pode estar parcialmente ligado a atuação desse miRNA como oncomiR ao alvejar genes supressores tumorais. O *SMAD4* é um gene supressor tumoral alvejado por *hsa-miR-483* (HAO et al., 2011; SHEN et al., 2015); a expressão deste gene foi encontrada hipoexpressa no CG (WANG et al., 2007; LENG et al., 2009), sugerindo que a hiperexpressão desse miRNA no CG favorece a progressão tumoral.

6 - CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que os miRNAs *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-150* e *hsa-miR-483* foram capazes de diferenciar tecidos com CG e ADJ daqueles SC. Somente o *hsa-miR-10a* foi capaz de diferenciar o CG de ADJ. Além disso, os demais miRNAs possuem um perfil de expressão semelhante nos tecidos CG e ADJ, indicando que o tecido ADJ possui alterações moleculares que se assemelham ao CG. Sendo assim, o tecido ADJ não pode ser considerado um tecido normal, como utilizado em vários estudos que avaliam o perfil de expressão desses miRNAs no CG. Por fim, os resultados desse trabalho demonstram a existência do campo de cancerização neste tipo de câncer e que esses miRNAs podem ser considerados potenciais biomarcadores da carcinogênese gástrica.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROS V.; BARTEL, B.; BARTEL, D. P. et al. A uniform system for miRNA annotation. **RNA**, **9** (3): 277-9, 2003.

ARREGI, M. M. U.; FÉRRER, D. P. C.; ASSIS, E. C. V. et al. Perfil Clínico-Epidemiológico das Neoplasias de Estômago Atendidas no Hospital do Câncer do Instituto do Câncer do Ceará, no período 2000-2004. **Revista Brasileira de Cancerologia**, **55**: 121-128, 2009.

ASSUMPCÃO, M. B.; MOREIRA, F. C.; HAMOY, I. G. et al. High-Throughput miRNA Sequencing Reveals a Field Effect in Gastric Cancer and Suggests an Epigenetic Network Mechanism. **Bioinformatics and Biology Insights**, **9**: 111-7, 2015.

BABA. Y.; ISHIMOTO, T.; KURASHIGE, J. et al. Epigenetic field cancerization in gastrointestinal cancers. **Cancer Letters**, **375** (2): 360-6.

BEISHLIN, K.; AZIZKHAN-CLIFFORD J. Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. **The FEBS Journal**, **282** (2): 224-58, 2015.

BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C. M. et al. Field defects in progression to gastrointestinal tract cancers. **Cancer Letters**, **260** (1-2): 1-10, 2008.

BRAAKHUIS, B. J.; TABOR, M. P.; KUMMER, J. A. et al. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. **Cancer Research**, **63** (8): 1727-30, 2003.

BRACHT, J.; HUNTER, S.; EACHUS, R. et al. Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. **RNA**, **10**: 1586-94, 2004.

BUSUTTIL, R. A.; ZAPPAROLI, G. V.; HAUPT, S. et al. Role of p53 in the progression of gastric cancer. **Oncotarget**, **5** (23): 12016-26, 2014.

CALIN, G. A.; CROCE, G. M. MiRNA signatures in human cancers. **Nature Reviews Cancer**, **6** (11): 857-66, 2006.

CHAI, H.; BROWN, R. E. Field effect in cancer - an update. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, **39** (4): 331-7, 2009.

CHEN, Y.; SONG, Y.; WANG, Z. et al. Altered expression of miR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, **14** (7): 1170-9, 2010.

CHEN, W.; TANG, Z.; SUN, Y. et al. miRNA expression profile in primary gastric cancers and paired lymph node metastases indicates that miR-10a plays a role in metastasis from primary gastric cancer to lymph nodes. **Experimental and Therapeutic Medicine**, **3** (2): 351-356, 2012.

CHEN, Z.; SAAD, R.; JIA, P. et al. Gastric adenocarcinoma has a unique microRNA signature not present in esophageal adenocarcinoma. **Cancer**, **119** (11): 1985-93, 2013.

CHENDRIMADA, T. P.; GREGORY, R. I.; KUMARASWAMY, E. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**, **436**: 740-744, 2005.

CHOU, C. H.; CHANG, N. W.; SHRESTHA, S. et al. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. **Nucleic Acids Research**, **44** (D1): D239-47, 2016.

CHU, I. M.; HENGST, L.; SLINGERLAND, J. M. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, **8** (4): 253–67, 2008.

COIMBRA, F. J.; COSTA, W. L. JR.; MONTAGNINI, A. L. et al. The interaction between N-category and N-ratio as a new tool to improve lymph node metastasis staging in gastric cancer: results of a single-cancer center in Brazil. **European Journal of Surgical Oncology**, **37** (1): 47-54, 2011.

CORREA, P.; PIAZUELO, M. B.; WILSON, K. T. Pathology of Gastric Intestinal Metaplasia: Clinical Implications. **The American Journal of Gastroenterology**, **105**: 493-498, 2010.

CORREA, P.; PIAZUELO, M. B. The gastric precancerous cascade. **Journal of Digestive Diseases**, **13** (1): 2-9, 2012.

CULLEN, B. R. Transcription and processing of human miRNA precursors. **Molecular Cell**, **16** (6): 861–865, 2004.

DARNET, S.; MOREIRA, F. C.; HAMOY, I. G. et al. High-Throughput Sequencing of miRNAs Reveals a Tissue Signature in Gastric Cancer and Suggests Novel Potential Biomarkers. **Bioinformatics and Biology Insights**, **9**:1-8, 2015.

DOTTO, G. P. Multifocal epithelial tumors and field cancerization: stroma as a primary determinant. **Journal of Clinical Investigation**, **124** (4): 1446-53, 2014.

DUAN, Y.; ZHOU, B.; SU, H. et al. miR-150 regulates high glucose-induced cardiomyocyte hypertrophy by targeting the transcriptional co-activator p300. **Experimental Cell Research**, **319** (3): 173-84, 2013.

DUTRA, C. B.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Nitrosaminas voláteis em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, **18** (1):111-120, 2007.

EVERHART, J. E. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology Clinics of North America**, **29**: 559-578, 2000.

FENG, J.; YANG, Y.; ZHANG P. et al. miR-150 functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting c-Myb. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, **18** (10): 2125-34, 2014.

FENOGLIO-PREISER, C. M.; WANG, J.; STEMMERMANN, G. N. et al. TP53 and gastric carcinoma: a review. **Human Mutation**, **21** (3): 258-70, 2003.

FORONES, N. M.; JESUS-GARCIA FILHO R.; HAKARU, T. et al. **Oncologia: guia de medicina ambulatorial e hospitalar de oncologia**. Ed. Manole. Barueri, São Paulo, 2005. 350p.

FEI, G.; EBERT, M. P.; MAWRIN, C. et al. Reduced PTEN expression in gastric cancer and in the gastric mucosa of gastric cancer relatives. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, **14** (3): 297-303, 2002.

Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. GLOBOCAN, 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 05 setembro 2016.

GOMES, L. L.; MOREIRA, F. C.; HAMOY, I. G. et al. Identification of miRNAs Expression Profile in Gastric Cancer Using Self-Organizing Maps (SOM). **Bioinformation**, **10** (5): 246-50, 2014.

GUO, J.; MIAO, Y.; XIAO, B. et al. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, **24** (4): 652-7, 2009.

GUO, S. L.; PENG, Z.; YANG, X. et al. miR-148a Promoted Cell Proliferation by Targeting p27 in Gastric Cancer Cells. **International Journal of Biological Sciences**, **7** (5): 567-574, 2011.

GUTSCHNER, T.; DIEDERICH, S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. **RNA Biology**, **9** (6): 703-719, 2012.

HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K. H. et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. **Cell**, **125** (5): 887-901, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, **144** (5): 646-74, 2011.

HAO, J.; ZHANG, S.; ZHOU, Y. et al. MicroRNA 483-3p suppresses the expression of DPC4/Smad4 in pancreatic cancer. **FEBS Letters**, **585** (1): 207-13, 2011.

HAWTHORN, L.; LAN, L.; MOJICA, W. Evidence for field effect cancerization in colorectal cancer. **Genomics**, **103** (2-3): 211-21, 2014.

HE, L.; THOMSON, J. M.; HEMANN, M. T. et al. A miRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, **435** (7043): 828-33, 2005.

HE, C.-Z.; ZHANG, K.-H.; LI, Q. et al. Combined use of AFP, CEA, CA125 and CA19-9 improves the sensitivity for the diagnosis of gastric cancer. **BMC Gastroenterology**, **13**: 87, 2013.

HE, J.; ZHAO, J.; ZHU, W. et al. MicroRNA biogenesis pathway genes polymorphisms and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **PeerJ**, **4**: e2706, 2016.

HU, B.; EL HAJJ, N.; SITTLER, S. et al. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, **3** (3): 251-261, 2012.

HU, C. W.; TSENG, C. W.; CHIEN, C. W. et al. Quantitative Proteomics Reveals Diverse Roles of miR-148a from Gastric Cancer Progression to Neurological Development. **Journal of Proteome Research**, **12** (9): 3993-4004, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 61. **Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori***. Lyon, France; IARC, 1994. p. 220.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005. p. 100.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007. p. 98.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009. p.94.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. INCA, 2011. p. 118.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2013. p. 124.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015. p. 27;101;67.

INOUE, T.; IINUMA, H.; OGAWA, E. et al. Clinicopathological and prognostic significance of microRNA-107 and its relationship to DICER1 mRNA expression in gastric cancer. *Oncology Reports*, 27 (6): 1759-64, 2012.

IVANAUSKAS, A.; HOFFMANN, J.; JONAITIS, L. V. et al. Distinct TPEF/HPP1 gene methylation patterns in gastric cancer indicate a field effect in gastric carcinogenesis. *Digestive and Liver Disease*, 40 (12): 920-6, 2008.

JIA, H.; ZHANG, Z.; ZOU, D. et al. MicroRNA-10a is down-regulated by DNA methylation and functions as a tumor suppressor in gastric cancer cells. *PLoS ONE*, 9 (1): e88057, 2014.

JONGEN-LAVRENCIC, M.; SUN, S. M.; DIJKSTRA, M. K. et al. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood*, 111: 5078-85, 2008.

KATADA T, ISHIGURO H, KUWABARA Y. et al. microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *International Journal of Oncology*, 34 (2): 537-42, 2009.

Kim, V. N. miRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6 (5): 376-85, 2005.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10 (2): 126-39, 2009.

KIM, S. S.; RUIZ, V. E.; CARROLL, J. D. et al. *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. **Cancer Letters**, **305** (2): 228-38, 2011.

KIM, M. S.; LEE, S. H.; YOO, N. J. et al. Frameshift mutations of tumor suppressor gene EP300 in gastric and colorectal cancers with high microsatellite instability. **Human Pathology**, **44** (10): 2064-70, 2013.

KLASE, Z.; HOUZET, L.; JEANG, K. T. Replication competent HIV-1 viruses that express intragenomic microRNA reveal discrete RNA-interference mechanisms that affect viral replication. **Cell & Bioscience**, **1** (1): 38, 2011.

KOSHIISHI N, CHONG JM, FUKASAWA T, et al. p300 gene alterations in intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. **Gastric Cancer**, **7** (2): 85-90, 2004.

LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at a histoclinical classification. **Acta pathologica et microbiologica Scandinavica**, **64**: 31-49, 1965.

LEE, Y. S.; DUTTA, A. MicroRNAs in cancer. **Annual Review of Phytopathology**, **4**: 199-227, 2009.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, **75** (5): 843-54, 1993.

LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, **425** (6956): 415-9, 2003.

LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO Journal**, **23** (20): 4051-60, 2004.

LENG, A.; LIU, T.; HE, Y. et al. Smad4/Smad7 balance: a role of tumorigenesis in gastric cancer. **Experimental and Molecular Pathology**, **87** (1): 48-53, 2009.

LIM, L. P.; GLASNER, M. E.; YEKTA, S. et al. Vertebrate microRNA genes. **Science**, **299** (5612): 1540, 2003.

LIU, J.; CARMELL, M. A.; RIVAS, F. V. et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, **305** (5689):1437-42, 2004.

LIU, M.; GUO, S.; STILES, J. K. The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). **Oncology Letters**, **2** (4): 583-89, 2011.

LIU, M.; ROTH, A.; YU, M. et al. The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal promoters and enhances tumorigenesis. **Genes & Development**, **27** (23): 2543-8, 2013.

LIU J, MA L, WANG Z, et al. MicroRNA expression profile of gastric cancer stem cells in the MKN-45 cancer cell line. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, **46** (2): 92-9, 2014.

LOCHHEAD, P.; CHAN, A. T.; NISHIHARA, R. et al. Etiologic field effect: reappraisal of the field effect concept in cancer predisposition and progression. **Modern Pathology**, **28** (1): 14-29, 2015.

MARTEL, C.; FERLAY, J; FRANCESCHI, S. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **Lancet Oncology**, **13**: 607-15, 2012.

MOHAN, M.; JAGANNATHAN, N. Oral field cancerization: an update on current concepts. **Oncology Reviews**, **8** (1): 244, 2014.

MOREIRA FC, ASSUMPÇÃO M, HAMOY IG, et al. MiRNA Expression Profile for the Human Gastric Antrum Region Using Ultra-Deep Sequencing. **PLoS One**, **9** (3): e92300, 2014.

NAGINI, S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, **4** (7): 156-69, 2012.

OBA, K.; PAOLETTI, X.; BANG, Y. J. et al. Role of chemotherapy for advanced/recurrent gastric cancer: an individual patient data meta-analysis. **European Journal of Cancer**, **49**: 1565-77, 2013.

PARK, J. E.; HEO, I.; TIAN, Y. et al. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. **Nature**, **475**: 201-5, 2011.

PATTERSON, E. E.; HOLLOWAY, A. K.; WENG, J. et al. MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. **Cancer**, **117** (8): 1630-9, 2011.

PATEL, A.; TRIPATHI, G.; GOPALAKRISHNAN, K. et al. Field cancerisation in colorectal cancer: A new frontier or pastures past?. **World Journal of Gastroenterology**, **21** (13): 3763–72, 2015.

RESENDE, A. L.; DA, S.; MATTOS, I. E. et al. Mortalidade por câncer gástrico no estado do Pará, 1980-1997. **Arquivos de Gastroenterologia**, **43** (3): 247-252, 2006.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â.; KHAYAT, A. S.; SILVA, A. et al. Ultra-deep sequencing reveals the microRNA expression pattern of the human stomach. **PLoS One**, **5** (10): e13205, 2010.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.; CRUZ, A.; DARNET, S. Deep Sequencing of MicroRNAs in Cancer: Expression Profiling and Its Applications. In: Mallick, B.; Ghosh, Z. **Regulatory RNAs: Basics, Methods and Applications**. New York: Springer, 2012. p. 523-546.

RICCI, V.; ROMANO, M.; BOQUET, P. Molecular cross-talk between *Helicobacter pylori* and human gastric mucosa. **World Journal of Gastroenterology**, **17**: 1383-99, 2011.

RIVENBARK, A. G.; COLEMAN, W. B. Field cancerization in mammary carcinogenesis - Implications for prevention and treatment of breast cancer. **Experimental and Molecular Pathology**, **93** (3): 391-8, 2012.

SAKAMOTO, N.; NAITO, Y.; OUE, N. et al. MicroRNA-148a is downregulated in gastric cancer, targets MMP7, and indicates tumor invasiveness and poor prognosis. **Cancer Science**, **105** (2): 236-43, 2014.

SAYED, D.; ABDELLATIF, M. MicroRNAs in development and disease. **Physiological Reviews**, **91**: 827-87, 2011.

SCOTT, M. H. An overview of microRNAs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **87**: 3-14, 2015.

SHEN, W.; HAN, Y.; HUANG, B. et al. MicroRNA-483-3p Inhibits Extracellular Matrix Production by Targeting Smad4 in Human Trabecular Meshwork Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, **56** (13): 8419-27, 2015.

SITARAMAN, R. *Helicobacter pylori* DNA methyltransferases and the epigenetic field effect in cancerization. **Frontiers in Microbiology**, **5**: 115, 2014.

SLAUGHTER, D. P.; SOUTHWICK, H. W.; SMEJKAL, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. **Cancer**, **6** (5): 963-8, 1953.

SONG, J.; BAI, Z.; ZHANG, Z. MicroRNAs are implicated in the initiation and progression of gastric cancer. **Chinese Medical Journal**, **127** (3): 554-9, 2014.

SUBRAMANYAM, D.; BLELLOCH, R. microRNAs to targets: pathway discovery in cell fate transitions. **Current Opinion in Genetics & Development**, **21** (4): 498–503, 2011.

TAKAHASHI, T.; SAIKAWA, Y.; KITAGAWA, Y. Gastric Cancer: Current Status of Diagnosis and Treatment. **Cancers**, **5** (1): 48-63, 2013.

TSUGANE, S. Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: Epidemiologic evidence. **Cancer Science**, **96** (1): 1-6, 2005.

VARNHOLT, H.; DREBBER, U.; SCHULZE, F. et al. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, **47**: 1223-32, 2008.

VAUHKONEN, M.; VAUHKONEN, H.; SAJANTILA, A. et al. Differences in genomic instability between intestinal- and diffuse-type gastric cancer. **Gastric Cancer**, **8** (4): 238-44, 2005.

VAUHKONEN, M.; VAUHKONEN, H.; SIPPONEN, P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, **20** (4): 651-74, 2006.

VERONESE A, LUPINI L, CONSIGLIO J, et al. Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. **Cancer Research**, **70** (8): 3140-9, 2010.

VIDAL, A. F.; CRUZ, A. M. P.; MAGALHÃES, L. et al. hsa-miR-29c and hsa-miR-135b differential expression as potential biomarker of gastric carcinogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, **22** (6): 2060–70, 2016.

VOGELSTEIN, B.; PAPADOPOULOS, N.; VELCULESCU, V. E. et al. Cancer genome landscapes. **Science**, **339** (6127): 1546-58, 2013.

WANG, L. H.; KIM, S. H.; LEE, J. H. et al. Inactivation of SMAD4 tumor suppressor gene during gastric carcinoma progression. **Clinical Cancer Research**, **13** (1): 102-10, 2007.

WANG, D. T.; MA, Z. L.; LI, Y. L. et al. miR-150, p53 protein and relevant miRNAs consist of a regulatory network in NSCLC tumorigenesis. **Oncology Reports**, **30** (1): 492-8, 2013.

WANG, S-H.; LI, X.; ZHOU, L-S. et al. microRNA-148a suppresses human gastric cancer cell metastasis by reversing epithelial-to-mesenchymal transition. **Tumour Biology**, **34** (6): 3705-12, 2013.

WANG, J-L.; HU, Y.; KONG, X. et al. Candidate microRNA biomarkers in human gastric cancer: a systematic review and validation study. **PLoS One**, **8** (9): e73683, 2013.

WANG, Z.; WANG, J.; YANG, Y. et al. Loss of has-miR-337-3p expression is associated with lymph node metastasis of human gastric cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, **32**: 76, 2013.

WEINBERG, R. A. **A biologia do Câncer**. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2008. 844p.

WU, B.; WU, D.; WANG, M. et al. Recurrence in patients following curative resection of early gastric carcinoma. **Journal of Surgical Oncology**, **98** (6): 411-4, 2008.

WU, Q.; JIN, H.; YANG, Z. et al. MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene EGR2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **392** (3): 340-5, 2010.

WU, Y.; LI, Q.; ZHOU, X. et al. Decreased levels of active SMAD2 correlate with poor prognosis in gastric cancer. **PLoS One**, **7** (4): e35684, 2012.

WU, H. H.; LIN, W. C.; TSAI, K. W. Advances in molecular biomarkers for gastric cancer: miRNAs as emerging novel cancer markers. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, **16**: e1, 2014.

WU, K.; MA, L.; ZHU, J. miR-483-5p promotes growth, invasion and self-renewal of gastric cancer stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. **Molecular Medicine Reports**, **14** (4): 3421-8, 2016.

XU, W. T.; YANG, Z.; LU, N. H. Roles of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) in gastric cancer development and progression. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, **15** (1): 17-24, 2014.

YAN, Y.; WANG, Q.; YAN, X-L. et al. miR-10a controls glioma migration and invasion through regulating epithelial–mesenchymal transition via EphA8. **FEBS Letters**, **589**: 756–765, 2015.

YANG, J.; WEI, X.; WU, Q. et al. Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer. **Molecular Medicine Reports**, **4** (6): 1139-43, 2011.

YI, R.; QIN, Y.; MACARA, I. G. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes and Development**, **17** (24): 3011-6, 2003.

YOSHIDA, S.; YAMASHITA, S.; NIWA, T. et al. Epigenetic inactivation of FAT4 contributes to gastric field cancerization. **Gastric Cancer**, **20** (1): 136-145, 2016.

YU, T.; LIU, L.; LI, J. et al. MiRNA-10a is upregulated in NSCLC and may promote cancer by targeting PTEN. **Oncotarget**, **6** (30): 30239-50, 2015.

YU, B.; LV, X.; SU, L. et al. MiR-148a Functions as a Tumor Suppressor by Targeting CCK-BR via Inactivating STAT3 and Akt in Human Gastric Cancer. **PLoS One**, **11** (8): e0158961, 2016.

ZENG, T.; LI, G. MicroRNA10a enhances the metastatic potential of cervical cancer cells by targeting phosphatase and tensin homologue. **Molecular Medicine Reports**, **10** (3): 1377-82, 2014.

ZHANG, H.; KOLB, F. A.; JASKIEWICZ, L. et al. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. **Cell**, **118** (1): 57-68, 2004.

ZHANG, L.; HUANG, J.; YANG, N. et al. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **103** (24): 9136-41, 2006.

ZHANG, B.; PAN, X.; COBB, G. et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Developmental Biology**, **302** (1):1-12, 2007.

ZHANG, N.; WEI, X.; XU, L. miR-150 promotes the proliferation of lung cancer cells by targeting P53. **FEBS Letters**, **587** (15): 2346-51, 2013.

ZHANG, G.; YE, H-L.; YAO, P. et al. Expressional profiling of carcinoembryonic antigen-related microRNAs in human gastric cancer. **The FASEB Journal**, **28** 1:Supplement 1047.14, 2014.

ZHANG, L. L.; LIU, J.; LEI, S. et al. PTEN inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer via downregulation of FAK expression. **Cellular Signalling**, **26** (5): 1011-20, 2014.

ZHANG, Z.; LI, Z.; LI, Y. et al. MicroRNA and signaling pathways in gastric cancer. **Cancer Gene Therapy**, **21** (8): 305-16, 2014.

ZHENG, B.; LIANG, L.; WANG, C.; et al. MicroRNA-148a Suppresses Tumor Cell Invasion and Metastasis by Downregulating ROCK1 in Gastric Cancer. **Clinical Cancer Research**, **17** (24): 7574-83, 2011.

ZHENG, J.; LIN, Z.; DONG, P. et al. Activation of hepatic stellate cells is suppressed by microRNA-150. **International Journal of Molecular Medicine**, **32** (1): 17-24, 2013.

ZHENG, G.; XIONG, Y.; XU, W. et al. A two-microRNA signature as a potential biomarker for early gastric cancer. **Oncology Letters**, **7**: 679-684, 2014.

ZHU, A.; XIA, J.; ZUO, J.; et al. MicroRNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA methyltransferase 1 in gastric cancer. **Medicine Oncology**, **29** (4): 2701-9, 2012.

ZHU, X.; LV, M.; WANG, H. et al. Identification of Circulating MicroRNAs as Novel Potential Biomarkers for Gastric Cancer Detection: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Digestive Diseases and Sciences**, **59** (5): 911-9, 2013.