



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

ANTONIO ANDRÉ CONDE MODESTO

**ANÁLISE SISTEMÁTICA DE POTENCIAIS VARIANTES INDELS DE
miRNAs EM PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO NO ESTADO DO PARÁ**

Tese de Doutorado

Belém-PA
Dezembro/2022

ANTONIO ANDRÉ CONDE MODESTO

**ANÁLISE SISTEMÁTICA DE POTENCIAIS VARIANTES INDELS DE
miRNAs EM PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO NO ESTADO DO PARÁ**

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Pará, sob a orientação do Prof. Dr. Sidney E. Batista dos Santos.

Prof. Dr. Sidney E. Batista dos Santos
Orientador - UFPA

Prof. Dr. Geraldo Ishak
Examinador Externo – UFPA

Prof. Dra. Giovanna Chaves Cavalcante
Examinador Interno – UFPA

Prof. Dr. Samir Mansour Moraes Casseb
Examinador Externo – UFPA

Prof. Dr. Adenilson Leão Pereira
Examinador Externo – UFPA

Apresentado em: ___/___/___ Conceito: _____

Belém-PA
Dezembro/2022

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM/ICB)

Núcleo de Pesquisa em Oncologia (NPO/HUJBB)

Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB)

Hospital Ofyr Loyola

Prefeitura Municipal de Ananindeua

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Treonina quinase
AUC	Cálculo área sobre a curva
<i>BCL2</i>	Proteína 2 do Linfoma de células-B
<i>BRCA</i>	Gene câncer de mama
CA	Câncer
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética.
<i>CASP8</i>	Caspase 8
<i>CCNG1</i>	Ciclina G1
CCR	Câncer de colorretal
<i>CDH1</i>	Gene E-caderina
<i>CEBPB</i>	CCAAT Enhancer Binding Protein Beta
CG	Câncer gástrico
CGD	Câncer gástrico do tipo difuso
CID	Classificação internacional de doenças
CircHIAT1	CircRNA Hippocampus Abundant Transcript 1
C-Myc	Aviária Mielocitomatose homólogo de oncogene viral
<i>COL28A1</i>	Collagen Type XXVIII Alpha 1 Chain
DA	Análise discriminante
DE	Diferencialmente expressos
DAPC	Análise discriminante de componentes principais
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database
<i>DCAF11</i>	DDB1 And CUL4 Associated Factor 11
D-CDK4	Cinases dependentes de ciclina
<i>DESeq2</i>	Pacote para análise diferencial de dados de contagem
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E-CDK2	Quinase 2 dependente de ciclina,
EMT	Transição epitélio mesenquimal
ERα	Receptor de estrogênio
ESCC	Carcinoma de células esofágicas
FAST	É um formato baseado em texto para armazenar uma sequência biológica e seus correspondentes índices de qualidade.
<i>GAPDHP72</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Pseudogene 72
GENCODE	Projeto usado para identificar e classificar todas as características genéticas nos genomas humanos com alta precisão com base em evidências biológicas e liberar essas anotações para o benefício da pesquisa biomédica e interpretação do genoma.
<i>GPAM</i>	Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase, Mitochondrial
HDGC	Câncer gástrico difuso hereditário
HLA	Human Leukocyte Antigen
HUJBB	Hospital Universitário João de Barros Barreto
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ICB	Instituto de ciências biológicas
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INDELs	Polimorfismo de Inserção/Deleção
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KM	Kaplan-Meier
<i>KRAS</i>	Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten
LGHM	Laboratório de genética humana e médica
MAF	Minor Allele Frequency
MD	Mutações driver
mIRDB	MicroRNA target prediction database
miRISC	Complexo de silenciamento induzido por microRNA

miRNA	MicroRNA
MYC	Família de genes reguladores e proto-oncogenes que codificam fatores de transcrição.
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFKβ	Factor nuclear kappa B
NGS	Sequenciamento de nova geração
NPO	Núcleo de Pesquisa em Oncologia
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds ratio
PCA	Análise de componentes principais
PAJCC	American Joint Committee on Câncer
PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
QV	Valor de qualidade
qRT-PCR	PCR em Tempo Real quantitativo
SEED	Sequência de leitura do miRNA
SMURF1	Proteína ligase 1 de ubiquitina E3 específica de SMAD
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPSS	Statistical Package for the Social Science
TargetScan	Servidor da Web que prediz alvos biológicos de microRNAs, procurando a presença de sites que correspondam à região de semente de cada miRNA.
TGFBR2	Transforming Growth Factor Beta Receptor 2
TGF-β 1	Transformador do fator de crescimento β
TNF	Fator de necrose tumoral
TNM	Estadiamento avançado do tumor

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Surgimento do câncer.....	13
Figura 02 - Etapas do processo carcinogênico.....	13
Figura 03 - Características adquiridas pela célula do Câncer, Modelo 2011 e Modelo 2022 respectivamente.....	15
Figura 04 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer, no Brasil, mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.....	16
Figura 05 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer, na Região Norte do Brasil, mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.....	16
Figura 06 - Carcinogênese do adenocarcinoma gástrico. Fluxograma das alterações genéticas e epigenéticas associadas ao tipo intestinal e difuso de <i>Láuren</i> .	18
Figura 07 - Histologia do estômago normal: M – Mucosa (MM – muscular da mucosa); SM – Submucosa; MO, MC e ML – Musculares oblíqua, circular e longitudinal, respectivamente; S – Serosa.....	20
Figura 08 - Anatomia do Estômago.....	20
Figura 09 - Tipos histológicos do adenocarcinoma gástrico. A e B: Tipo intestinal, em objetivas de 10x e 40x, respectivamente. C e D: Tipo difuso, em objetivas de 10x e 40x, respectivamente.....	21
Figura 10 - Biogênese canônica de microRNAs.....	25
Figura 11 - Síntese do miRNA humano.....	28
Figura 12 - Sequência de microRNAs com destaque em <i>Seed</i>	29
Figura 13 - Eletroferograma de um marcador <i>HLA</i> e <i>CASP8</i> do tipo INDEL pós-eletroforese capilar, indicando uma dupla heterozigose (196 – 206pb), e um homozigoto para deleção (249 - 255pb).....	30
Figura 14 - Eletroferograma do painel com 11 marcadores de câncer do tipo INDEL.	42
Figura 15 - Alinhamento de sequências <i>MIRNA4463</i> (Query) e ao alvo biológico <i>DACF11</i> (Subject).....	50
Figura 16 - Modelo de alinhamento de sequências <i>MIRNA4463</i> (Query) e ao alvo biológico <i>DACF11</i> (Subject)...	50
Figura 17 - Alinhamento de sequências <i>MIRNA548-4</i> e ao alvo biológico <i>COL28A...</i>	52
Figura 18 - Modelo de alinhamento de sequências <i>MIRNA548-4</i> e ao alvo biológico <i>COL28A1</i>	53
Figura 19 - Alinhamento de sequências <i>MIRNA516B-2</i> (Query) e ao alvo biológico <i>PGA3</i> (Subject).....	54
Figura 20 - Modelo de alinhamento de sequências <i>MIRNA516B-2</i> e ao alvo biológico <i>PGA3</i>	54
Figura 21 - Alinhamento de sequências <i>MIRNA516B-2</i> (Query) e ao alvo biológico <i>SMURF1</i> (Subject).....	55
Figura 22 - Modelo de alinhamento de sequências <i>MIRNA516B-2</i> e ao alvo biológico <i>SMURF1</i>	55
Figura 23 - Alinhamento de sequências <i>MIRNA548AJ-2</i> (Query) e ao alvo biológico <i>GPAM</i> (Subject).....	56
Figura 24 - Modelo de alinhamento de sequências <i>MIRNA548AJ-2</i> e ao alvo biológico <i>GPAM</i>	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 - Sobrevivência global de pacientes com CG associado significativamente ao genótipo <i>del/del</i> para o INDEL <i>MIRNA3652</i> . Wilcoxon $p = 0,03$ (HR = 3,46); Long-rank $p = 0,04$. As análises e gráficos foram realizados pelo pacote de sobrevivência, software SPSS.....	48
Gráfico 02 - Sobrevivência global de pacientes com CG tipo Lauren difuso. Wilcoxon $p = 0,04$; Long-rank $p = 0,01$. As análises e gráficos foram realizados pelo pacote de sobrevivência, software spss.....	49
Gráfico 03 - Volcano plot sumarizando transcritos diferencialmente expressos em amostras tumorais para o marcador <i>MIRNA4463</i>	49
Gráfico 04 - Volcano plot sumarizando transcritos diferencialmente expressos (DE) em amostras tumorais para o marcador <i>MIRNA3171</i>	51
Gráfico 05 - Volcano plot sumarizando transcritos diferencialmente expressos em amostras tumorais para o marcador <i>MIRNA548H-4</i>	52
Gráfico 06 - Volcano plot sumarizando transcritos diferencialmente expressos em amostras tumorais para o marcador <i>MIRNA516B-2</i>	53
Gráfico 07 - Volcano plot sumarizando transcritos diferencialmente expressos (DE) em amostras tumorais para o marcador <i>MIRNA548AJ-2</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Classificação do TNM patológico.....	23
Tabela 02 - Grupamento por estádios.....	24
Tabela 03 - Grupos de polimorfismos INDEL de <i>MIRNA</i> que apresentaram expressão alterada em pacientes portadores de câncer.....	32
Tabela 04 - Dados do <i>MIR630</i> e os tipos de câncer.....	33
Tabela 05 - <i>MIRNAs</i> e os Genes alvos.....	37
Tabela 06 - Frequência absoluta dos casos de câncer gástrico (CG). Os dados são apresentados por números absolutos de indivíduos e porcentagem.....	42
Tabela 07 - Dados demográficos dos grupos de câncer gástrico (CG) e controle. Os dados categorizados são apresentados por números absolutos de indivíduos (porcentagem) e analisados pelo teste Qui-quadrado.....	43
Tabela 08 - Frequência genotípica e alélica das 07 variantes do tipo INDEL investigados neste estudo com base na análise do teste Qui-quadrado. Dados apresentados em porcentagem de pacientes com CG/porcentagem de controles. dbSNP: Registro da variante genética no banco de dados NCBI.....	45
Tabela 09 - Variantes alélicas nos <i>MIRNAs</i> com associações significativas para a predisposição ao CG. Análises de regressão logística com correção de Bon Ferroni. Genótipos: <i>del/del</i> = homozigoto deleção, <i>del/ins</i> = heterozigoto e <i>ins/ins</i> = homozigoto inserção.....	46
Tabela 10 - Associações significativas de inserções e deleções na análise do INDEL <i>MIRNA4463</i> quanto ao prognóstico no CG. Genótipos: <i>del/del</i> = homozigoto deleção, <i>del/ins</i> = heterozigoto e <i>ins/ins</i> = homozigoto inserção.....	46
Tabela 11 - Genes associados e alinhados com as variantes INDELs de <i>MIRNAs</i>	56
Tabela 12 - Alinhamentos, interação dinâmicas e termodinâmicas entre moléculas de miRNAs e os mRNA-alvos.....	58
Tabela 13 - Níveis de expressão dos mRNA-alvos no Banco de transcriptoma/NPO..	59

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Câncer.....	13
1.2	Câncer Gástrico.....	17
1.3	Epidemiologia do Câncer Gástrico.....	19
1.4	Localização Tumoral e Classificação Clínico-histopatológica do Câncer Gástrico.....	19
1.5	Estadiamento Patológico do Câncer Gástrico.....	22
1.6	Biogênese dos miRNAs.....	25
1.7.	INDEL em <i>MiRNAs</i>	30
1.8.	Potenciais marcadores genéticos de câncer	31
1.9.	Potenciais marcadores genéticos do tipo <i>inserção/deleção</i> em regiões de miRNA.....	32
1.9.1	<i>MIR630</i>	32
1.9.2.	<i>MIR516B2</i>	33
1.9.3.	<i>MIR4463</i>	34
1.9.4.	<i>MIR3171</i>	34
1.9.5.	<i>MIR3945</i>	34
1.9.6.	<i>MIR548h-4</i>	35
1.9.7.	<i>MIR548aj-2</i>	35
1.9.8.	<i>MIR302c</i>	35
1.9.9.	<i>MIR4274</i>	36
1.9.10.	<i>MIR920</i>	36
1.9.11.	<i>MIR3652</i>	36
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	Objetivo geral.....	37
2.2.	Objetivos específicos.....	37
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	Caracterização da Amostra e Lócus da Pesquisa.....	37
3.2	Aspectos Éticos.....	38
3.3	METODOLOGIA DA ANÁLISE DE FRAGMENTOS (INDEL)....	38
3.3.1.	Extração de DNA.....	38
3.3.2.	Seleção dos polimorfismos (INDELS).....	38
3.3.3.	PCR Multiplex e análise de fragmentos.....	38
3.3.4.	Análises Estatísticas.....	39
3.4.	METODOLOGIA RNA-seq.....	39
3.4.1.	Extração de RNA.....	39
3.4.2.	Construção das bibliotecas.....	40
3.4.3.	Sequenciamento NGS.....	40
3.4.4.	Controle de qualidade das leituras.....	40
3.4.5.	Identificação e quantificação dos lncRNAs.....	40
3.4.6.	Análise da característica de operação do receptor.....	40
3.4.7.	Análises Multivariadas.....	41
3.4.7.1.	Normalização de contagens.....	40
3.4.7.2.	Análise de componentes principais.....	41
3.4.7.3.	Análise de sobrevivência global.....	41
4	RESULTADOS.....	42
5	DISCUSSÃO.....	61

6	CONCLUSÃO.....	70
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8	APÊNDICES.....	81
8.1.	Apêndice A – Cronograma.....	81
8.2.	Apêndice B – Artigo	82
8.3.	Apêndice C – Termo de Consentimento Livre e esclarecido.....	92
8.4.	Apêndice D – Tabelas Suplementares.....	94
8.5.	Apêndice E – Artigos publicados como co-autor, durante o Doutorado.....	97

RESUMO

O Câncer Gástrico é uma doença multifatorial, complexa e agressiva, na qual fatores como alterações genéticas, epigenéticas e ambientais contribuem para o surgimento e progressão da doença. O fator genético é favorecido através das mutações gênicas e da epigenética, pois ambas influenciam no controle de proliferação e morte celular. Os biomarcadores do tipo *MIRNA* têm papel crucial no mecanismo de adoecimento de inúmeras enfermidades humanas, e pode ser também interpretado como marcadores do seu processo, prognóstico, diagnóstico e na avaliação da resposta ao tratamento. Nossa pesquisa investigou a genotipagem de marcadores INDELS, relacionados a diversas vias envolvidas no câncer, em pacientes com diagnóstico médico de câncer gástrico. Os marcadores, foram genotipados em uma única reação de PCR e posteriormente, submetidos a eletroforese capilar. Da análise obtivemos a padronização de um painel com 11 biomarcadores, e a susceptibilidade dos dados clínicos dos pacientes com câncer gástrico. Associações significativas foram encontradas em três INDELS: *hsa-mir-4463_rs5877455*, *hsa-mir-3945_rs145931056*, *hsa-mir-548H-4_rs150141473* correlacionados ao risco aumentado, e o *hsa-mir-920_rs66686007*, *hsa-mir-3652_rs62747560* correlacionados ao risco diminuído de desenvolver o câncer gástrico. O *hsa-mir-4463_rs5877455* também apresentou dados clínicos com associação significativa para risco aumentado para adenocarcinoma do tipo Lauren difuso, para tumores desenvolvidos na região não-cárdia e para diagnóstico precoce do câncer gástrico. A validação dos marcadores, também, foi realizada em 27 casos de câncer gástrico pela técnica de RNA-seq, onde foi possível verificar os níveis de expressão do transcrito nos tumores sólidos e tecidos adjacentes de câncer gástrico. Do mesmo modo, foi realizada a associação do mRNA-alvos a partir de banco de previsão de alvos para miRNAs e por último o alinhamento das sequências gênicas 3'UTR a 5'UTR dos alvos para cada variante alterada. Nossos dados apontam interações relevantes destes biomarcadores a genes que influenciam em vias importantes do CG.

Palavras chaves: Câncer gástrico, *miRNA*, RNA-seq e Transcriptoma.

ABSTRACT

Gastric Cancer is a multifactorial, complex and aggressive disease, in which factors such as genetic, epigenetic and environmental changes contribute to the onset and progression of the disease. The genetic factor is favored through gene mutations and epigenetics, as both influence the control of cell proliferation and death. Os biomarcadores do tipo *MIRNA* têm papel crucial no mecanismo de adoecimento de inúmeras enfermidades humanas, e pode ser também interpretado como marcadores do seu processo, prognóstico, diagnóstico e na avaliação da resposta ao tratamento. Our research investigated the genotyping of INDELs markers, related to several cancer pathways, in patients with a medical diagnosis of gastric cancer. The markers were genotyped in a single PCR reaction and subsequently submitted to capillary electrophoresis. From the analysis, we obtained the standardization of a panel with 11 biomarkers, and the susceptibility of the clinical data of patients with gastric cancer. Significant associations were found in three INDELs: *hsa-mir-4463_rs5877455*, *hsa-mir-3945_rs145931056*, *hsa-mir-548H-4_rs150141473* correlated with increased risk, and *hsa-mir-920_rs66686007*, *hsa-mir-3652_rs62747560* correlated with decreased risk. Develop gastric cancer *hsa-mir-4463_rs5877455* also presented clinical data with a significant association for increased risk for diffuse Lauren-type adenocarcinoma, for tumors developed in the non-cardia region, and for early diagnosis of gastric cancer. The validation of the markers was also performed in 27 cases of gastric cancer by the RNA-seq technique, where it was possible to verify the transcript expression levels in solid tumors and adjacent tissues of gastric cancer. Likewise, the association of mRNA-targets from a target prediction bank for miRNAs was performed and, finally, the alignment of the 3'UTR to 5'UTR gene sequences of the targets for each altered variant was performed. Our data point out relevant interactions of these biomarkers to genes that influence important GC pathways.

Keywords: Gastric cancer, miRNA, RNA-seq and Transcriptome.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer (CA) é o conjunto de mais de 200 tipos de doenças complexas, na qual apresenta como característica em comum, a todos os tipos, a capacidade de crescimento celular desordenado (Figura 1) com um alto potencial invasivo em diferentes tecidos e órgãos do corpo humano, denominado de metástase (Da Silva, 2020).

Figura 1 - Surgimento do câncer.

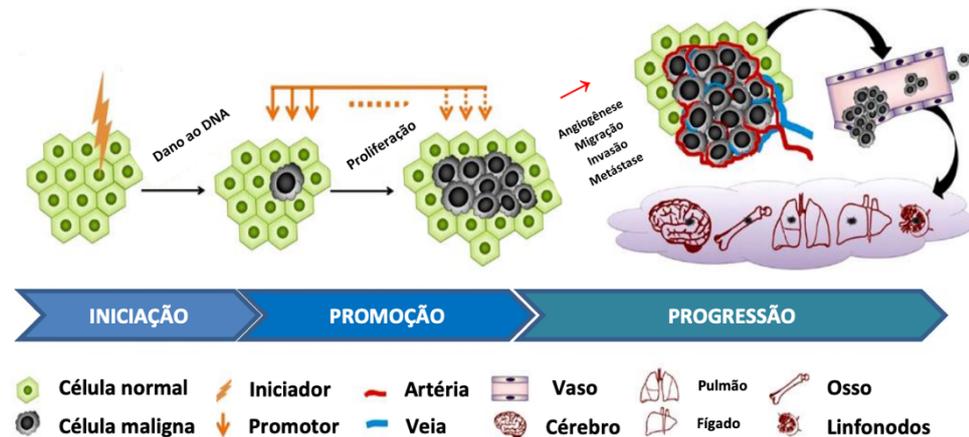


Fonte: Adaptado do INCA, 2020.

Diversos fatores atuam contribuindo diretamente na causa da carcinogênese. O surgimento desta patologia oncológica ocorre a partir do acúmulo de mutações favoráveis a instalação do fenótipo maligno, na qual cópias de células mutadas são expandidas e submetidas a diversas alterações genéticas, epigenéticas e a alterações do microambiente, o que favorecerá o surgimento de lesões neoplásicas. Vale ressaltar que essas células alteradas adquirem diferentes características genéticas (Prasetyanti; Medena, 2017).

Conforme a Figura 2, o processo carcinogênico ocorre em três etapas: a iniciação, a promoção e a progressão. Na etapa de iniciação, fatores carcinogênicos ao entrar em contato com o microambiente celular, podem causar danos irreparáveis ao DNA, transformando esta célula normal em uma célula mutada. Na segunda etapa de promoção, agentes promotores induzem a proliferação celular nas células já mutadas, como exemplo, os receptores celulares que alteram vias de sinalização e aumentam a capacidade proliferativa dessas células. Na terceira e última etapa ocorre a progressão celular, na qual a célula alterada adquire um perfil maligno com capacidade invasivo e metastático devido as alterações genéticas, bioquímicas e morfológicas, sendo que este perfil celular maligno e metastático poderá atingir outros tecidos e órgãos no corpo humano (Da Silva, 2020).

Figura 2 - Etapas do processo carcinogênico.



Fonte: Adaptado de Da Silva, 2020.

Em relação as mutações que as células neoplásicas sofrem, na maioria delas são mutações passageiras que não conferem capacidade proliferativa, porém algumas mutações denominadas mutações driver (MD) atuam diretamente na ativação da cascata de sinalização intracelular favorecendo a capacidade proliferativa e invasão. As MD são necessárias para o surgimento do fenótipo maligno, pois conferem uma dependência biológica, na qual as proteínas alteradas são fundamentais para sobrevivência da célula maligna (Baldotto et al., 2016; Vogelstein et al., 2013).

Cerca de 5 a 10% de todos os tumores malignos são herdados através das mutações germinativas em genes de alta penetrância, logo o câncer hereditário, através destas mutações, aumenta significativamente o risco cumulativo vital para o câncer e para transmissão genética à prole. A investigação do câncer hereditário através da avaliação clínica e do levantamento detalhado do histórico familiar de câncer de um indivíduo e/ou da família é muito importante para um direcionamento mais claro de um prognóstico da doença e adequada indicação de diagnóstico molecular (Gehm, 2013).

Dentre os fatores que caracterizam o CA hereditário, os indivíduos diagnosticados com câncer em idade jovem e a presença de mais de um tumor primário ao longo da vida, apresentam grande predisposição genética a terem outros familiares em maior risco para o câncer, sendo que esta detecção precoce poderá contribuir na intervenção de redução de risco de câncer e/ou no tratamento específico com drogas alvo-moleculares (Gehm, 2013).

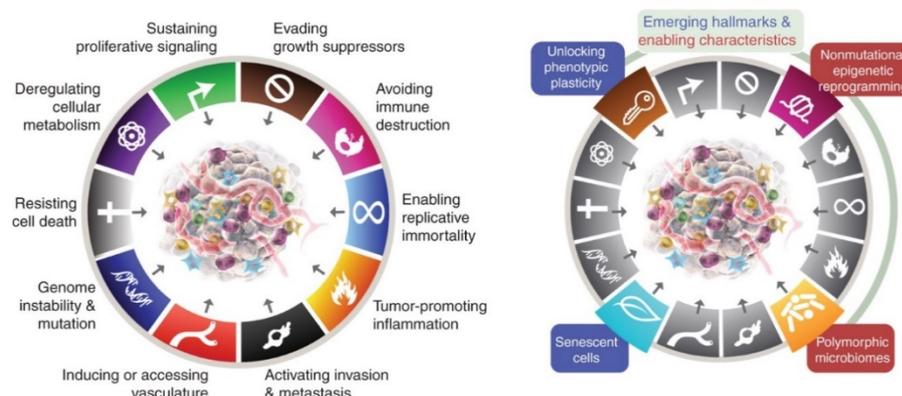
É importante destacar que os principais genes envolvidos na carcinogênese são denominados de oncogenes e de genes supressores tumorais. Os oncogenes atuam nas mutações de ganho de função o que facilita a multiplicação, a proliferação e a diferenciação da célula

normal. Estes oncogenes são resultados de mutações pontuais, microdeleções, inserções e alterações cromossômicas em genes de células normais, os chamados proto-oncogenes, sendo que o resultado de uma proteína codificada por um oncogene poderá contribuir diretamente ou indiretamente para um efeito neoplásico (Mullauer et al., 2001).

Os genes supressores tumorais atuam codificando proteínas que inibem o crescimento celular bloqueando o desenvolvimento do tumor, pois esse tipo de gene atua no reparo do DNA e, caso o DNA não seja reparado, pode ocorrer o início do processo de apoptose celular. Logo, a perda de função das proteínas codificadas pelos genes supressores de tumor resulta em uma divisão celular anormal e uma apoptose deficiente o que favorece a patologia do câncer (Nussbaum et al., 2016).

Diante de todo essa natureza complexa e multifatorial que o câncer abrange, é importante destacar o que Hanahan e Weinberg (2000) conceituaram como as “marcas genéticas” adquiridas pelas células neoplásicas, isto é, conjunto de capacidades funcionais adquiridas pelas células neoplásicas. Inicialmente no ano de 2000 propuseram seis marcas genéticas, em 2011 adicionaram mais quatro novas características, totalizando 10 características genéticas do câncer, como: a insensibilidade a sinais que bloqueiam o crescimento, a evasão do sistema imune, a capacidade replicativa ilimitada, a inflamação promovida pelo tumor, a invasão tecidual e metástase, a indução a angiogênese, a instabilidade genômica e mutacional, a evasão a via apoptótica, a desregulação energética celular e a alta suficiência em sinais de crescimento (Hanahan; Weinberg, 2011). Em 2022, foram incorporados mais 4 características emergentes, dentre elas: o desbloqueio da plasticidade fenotípica, a reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e a senescência das células, conforme a Figura 3 (Hanahan, 2022).

Figura 3 - Características adquiridas pela célula do Câncer, Modelo 2011 e Modelo 2022 respectivamente.



Fonte: Hanahan, 2022.

O câncer é um importante problema de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de 6 milhões de óbitos e representa cerca de 12 % de todas as causas de morte do mundo (Oliveira et al., 2016).

Segundo (INCA, 2021a) estima-se que no Brasil, no biênio 2020-2022, ocorra 625 mil casos novos de câncer, sendo que o câncer de próstata, cólon e reto, mama e pulmão estão entre os mais incidentes, contudo os cânceres de estômago e colo de útero ainda apresentam altas taxas (Figura 4).

Figura 4 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer, no Brasil, mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2020.

Na região Norte do Brasil (Figura 5), o câncer de próstata e mama feminina estão entre os principais, sendo que a incidência dos cânceres do estômago e do colo do útero tem impacto significativo nessa população (INCA, 2020a).

Figura 5 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer, na Região Norte do Brasil, mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.770	28,7%	Homens	Mulheres	Mama feminina	1.970	21,0%
Estômago	1.110	11,5%			Colo do útero	1.940	20,6%
Traqueia, brônquio e pulmão	870	9,0%			Cólon e reto	590	6,3%
Cólon e reto	490	5,1%			Traqueia, brônquio e pulmão	590	6,3%
Leucemias	410	4,2%			Estômago	550	5,9%
Cavidade oral	340	3,5%			Leucemias	320	3,4%
Sistema nervoso central	300	3,1%			Sistema nervoso central	280	3,0%
Esôfago	250	2,6%			Ovário	310	3,3%
Laringe	240	2,5%			Glândula tireoide	260	2,8%
Linfoma não Hodgkin	210	2,2%			Corpo do útero	230	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2020.

1.2. Câncer Gástrico

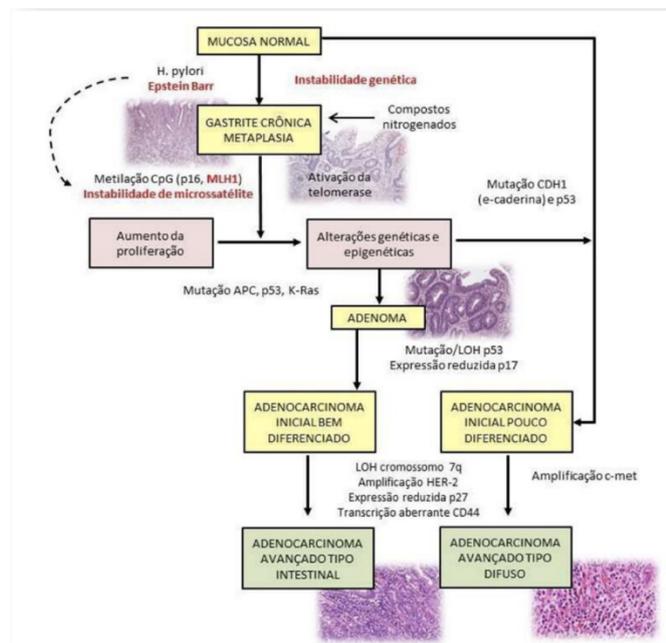
O CG é um tipo de câncer que se desenvolve lentamente com o passar dos anos, e antes da manifestação da doença propriamente dita ocorrem alterações pré-cancerosas na mucosa que reveste internamente o estômago. O CG é uma doença multifatorial, complexa e agressiva, na qual fatores intrínsecos e extrínsecos contribuem para o surgimento e progressão da doença. É importante destacar que a maioria dos cânceres de estômago surgem esporadicamente, sem influência hereditária, pois a maioria das alterações genéticas associadas ao CG são adquiridas, contudo 3% dos casos fazem parte de síndromes de câncer hereditário, sendo que 40% desses casos associados a predisposição genética apresentam mutações no gene *CDHI*, que codifica a proteína E-caderina, responsável pelo processo de adesão e diferenciação celular. Essas alterações genéticas no *CDHI* são frequentemente encontradas em tumores gástricos difusos, denominada de síndrome do câncer gástrico difuso hereditário (HDGC) (INCA, 2021; Magalhães et al., 2018; Oliveira et al., 2016; Ramos, 2019).

Assim como os outros tipos de câncer, as neoplasias da região gastrointestinal sofrem influência dos fatores genéticos e ambientais, sendo que entre as múltiplas variações genéticas, estão as alterações ocorridas nos proto-oncogenes, as quais irão codificar oncoproteínas que influenciarão diretamente no CG.

Em relação aos fatores ambientais, mais descritos na literatura, associados ao CG, estão a infecção por *H. pylori*, a baixa ingestão de frutas e vegetais frescos, alto consumo de sal e o tabagismo. Estudos de caso-controle apontam uma associação significativa e inversa da ingestão de frutas e vegetais frescos com o risco de desenvolver o CG, contudo uma associação direta do tabagismo e do etilismo com o CG (Assumpção et al., 2020). Em relação a infecção por *H. pylori*, há uma associação com adenocarcinoma gástrico, na qual essa infecção desempenha papel importante como iniciador nos principais tipos histológicos do CG: o tipo difuso e o intestinal. O *H. pylori* é classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2018) como carcinógeno do grupo I para humanos e considerada uma das infecções mais comum no mundo com uma prevalência de 70 – 80 % nos países em desenvolvimento. É importante destacar que apenas uma pequena parcela dos indivíduos infectados por *H. pylori* desenvolve o CG, sendo que na maioria dos casos, desenvolve aqueles que apresentam: influência dos fatores ambientais, susceptibilidade genética e variação da cepa bacteriana (Ramos, 2019).

O processo cancerígeno ocorre a partir de múltiplas etapas que atuam no microambiente da mucosa gástrica, o qual resultará em uma cascata de processos degenerativos, na qual a mucosa gástrica normal sofrerá alterações para um quadro de gastrite crônica atrófica e, em seguida progredirá para atrofia multifocal e metaplasia intestinal, displasia e ao final da cascata, resultará na formação do carcinoma (Figura 6), este processo é denominado de cascata de Corrêa. A cascata de Corrêa consiste na progressão histopatológica da mucosa normal até o câncer gástrico conforme as etapas: i - Gastrite não atrófica, ii – Gastrite atrófica multifocal sem metaplasia, iii – Metaplasia intestinal do tipo completo, iv – Metaplasia intestinal do tipo incompleto, v – Displasia, e o vi – Câncer. Estas etapas de lesões podem ser induzidas pela infecção por *H. pylori*. O adenocarcinoma do tipo difuso não apresenta estágios pré-cancerosos bem definidos quanto o tipo intestinal. Este tipo é mais frequente em jovens do sexo feminino, e tem início a partir de uma mucosa normal e sofre alterações a partir da hereditariedade (Correa et al., 1975; Abib et al., 1997; Correa and Piazuolo, 2012; Ramos, 2019).

Figura 6 - Carcinogênese do adenocarcinoma gástrico. Fluxograma das alterações genéticas e epigenéticas associadas ao tipo intestinal e difuso de Lauren.



Fonte: Modificado de Correa et al., 1975.

Durante as diversas etapas de formação do tumor, muitos genes com funções celulares importantes como adesão celular, transdução de sinais, diferenciação ou reparo de DNA, são alvos de carcinógenos. Sendo assim, a biologia molecular do câncer é diversificada e representada pelas inúmeras influências genéticas como: a instabilidade cromossômica, a instabilidade de microssatélites, mutações genéticas somáticas ou de polimorfismos de

nucleotídeos únicos (SNP's), mudanças no perfil dos microRNA's, além de modificações epigenéticas envolvendo a metilação do DNA.

1.3. Epidemiologia do Câncer Gástrico

Considerado o quinto tipo de câncer mais diagnosticado e a terceira causa de morte relacionada ao câncer no mundo, o câncer gástrico é uma doença multifatorial, complexa e agressiva, na qual fatores contribuem para o surgimento e progressão da doença (INCA, 2020a; Magalhães et al., 2018).

No ano de 2020, o CG apresentou uma prevalência de um milhão de novos casos e uma estimativa de 769.000 mortes no mundo. Em relação às taxas de incidência por sexo, esta neoplasia é duas vezes mais frequente nos homens do que nas mulheres. Fatores de risco como a infecção por *H. pilory* é um dos principais fatores que está associado ao aumento do risco para o desenvolvimento do câncer de estômago. Outros fatores ambientais também favorecem este aumento do risco como: hábitos alimentares (alimentos salgados e defumados), obesidade, álcool e o tabaco. Contudo uma alimentação rica em frutas, verduras, cereais e frutos do mar atuam como fator de proteção (INCA, 2020; Sung et al., 2021).

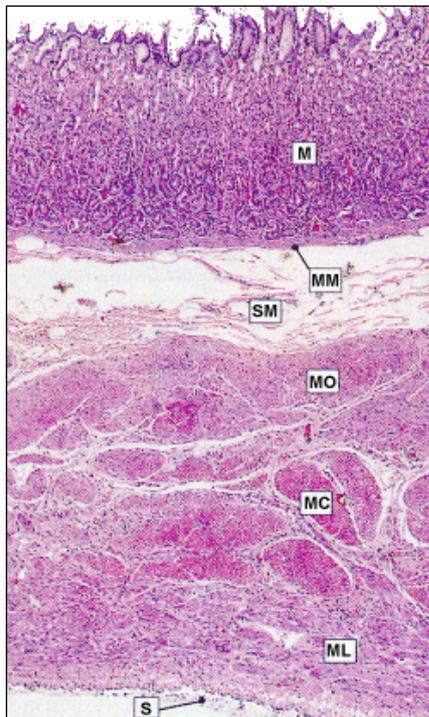
No Brasil, o CG é o quarto tipo mais frequente entre os homens e o sexto entre as mulheres. Na região Norte o câncer de estômago em homens é o segundo tipo mais frequente. No estado do Pará, 860 novos casos foram diagnosticados em 2020, com 560 nos casos em homens e 300 em mulheres. Na cidade de Belém estima-se 260 novos casos, sendo 170 novos casos em homens e 90 novos casos em mulheres. Fatores ambientais da nossa cultura regional que favorecem a incidência da doença é o hábito alimentar, marcado por uma dieta rica em sal e nitritos que afetam a mucosa gástrica (Assumpção, 2016; INCA, 2020).

1.4. Localização Tumoral e Classificação Clínico-histopatológicas do Câncer Gástrico

O câncer gástrico é uma neoplasia maligna que pode localizar-se entre a junção gastroesofágica até o piloro, sendo que, histologicamente, pode atingir diferentes camadas de tecido no estômago (mucosa, submucosa, camadas musculares e a serosa) (Figura 7). Sendo que as camadas musculares são subdivididas em muscular oblíqua, muscular circular e muscular longitudinal (Amin et al., 2017; Owen, 1986; Sobin; Wittekind, 2004).

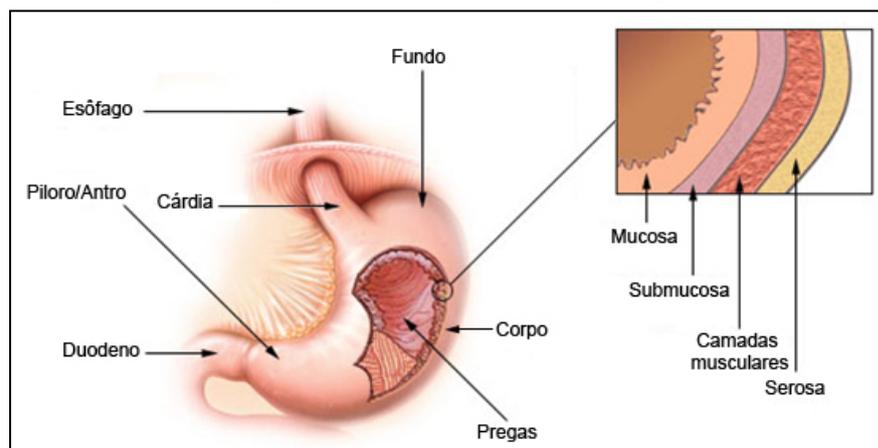
A cárdia é a região proximal do estômago e localiza-se abaixo do diafragma, mais abaixo encontra-se o fundo e o corpo, já na parte final ou distal localiza-se o antro seguido do piloro, o qual atua no controle do fluxo alimentar para o duodeno (Figura 8) (Amin et al., 2017).

Figura 7 - Histologia do estômago normal: M – Mucosa (MM – muscular da mucosa); SM – Submucosa; MO, MC e ML – Musculares oblíqua, circular e longitudinal, respectivamente; S – Serosa.



Fonte: UL - University of Leicester. Disponível em: <<http://www.le.ac.uk>>. Acessado em: 20 de janeiro de 2014

Figura 8 - Anatomia do Estômago.



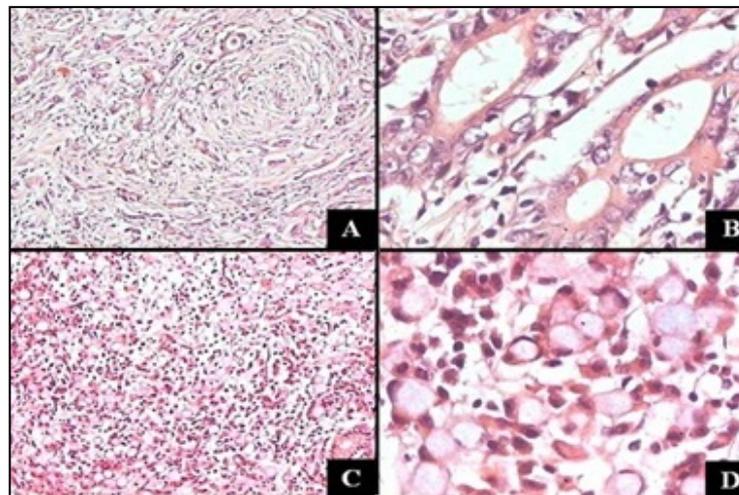
Fonte: Sung, H. et al., 2020

Os tumores de CG apresentam-se divididos em três tipos histológicos: adenocarcinoma, linfoma e o leiomiossarcomas (tumores raros que surgem a partir de células da musculatura lisa do estômago) (Oliveira et al.,2016; INCA, 2019).

Segundo (Smith et al., 2006), o adenocarcinoma gástrico, que se origina na mucosa, corresponde a 95% dos casos de CG , e é considerado o tipo de câncer no estômago mais comum do que os casos de tumores do estroma gastrointestinal, leiomiomas e tumores neuroendócrinos (INCA, 2020; Ramos, 2019).

Dentre muitas classificações microscópicas na literatura, a classificação mais comumente utilizada no ocidente é a que tem como base os estudos de Lauren, a qual classifica os adenocarcinomas em dois tipos principais, o difuso e o intestinal (Figura 9), além de um terceiro tipo, o “padrão misto”, que ocorre em menor frequência, é um tipo intermediário entre os dois tipos histológicos difuso e intestinal (Lauren, 1965; Waldum; Fossmark, 2018).

Figura 9 - Tipos histológicos do adenocarcinoma gástrico. A e B: Tipo intestinal, em objetivas de 10x e 40x, respectivamente. C e D: Tipo difuso, em objetivas de 10x e 40x, respectivamente.



Fonte: Lauren, 1965; Waldum; Fossmark, 2018.

O adenocarcinoma mais comum é o intestinal ou “epidêmico”, o qual é mais diagnosticado em pacientes idosos com uma predileção do gênero masculino, é dependente de fatores extrínsecos associado a lesões pré-cancerosas como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia. Histologicamente este tipo é bem característico com células com núcleos grandes e irregulares, presença de coesão celular e um padrão de crescimento invasivo (Correa; Piazuolo, 2012; Ramos, 2019; Waldum; Fossmark, 2018).

O tipo difuso, que ocorre em pacientes mais jovens e com distribuição igualitária entres os gêneros, com um pior prognóstico, é um tipo de adenocarcinoma pouco diferenciado e não apresenta associações à lesões pré-cancerosas, tendo um padrão de crescimento invasivo (Ramos, 2019). Histologicamente o tipo difuso apresenta células com núcleos periféricos devido a elevada produção de mucina, além disso apresenta células pequenas, não coesas, dispersas de forma difusa e que não formam estruturas glandulares (Waldum; Fossmark, 2018).

Vale ressaltar que o adenocarcinoma que apresenta um bom prognóstico é aquele diagnosticado precocemente, isto é, quando se restringe a mucosa e a submucosa, independente da extensão local ou da presença ou não de metástase ganglionar. Contudo, na maioria dos casos, o CG é detectado na sua fase avançada após invadir as camadas mais internas do estômago, ultrapassando a submucosa, na qual pode ou não apresentar metástase nos linfonodos e/ou em outros órgãos. Logo o diagnóstico tardiamente ocorre devido a manifestação dos sintomas ocorrer somente nesta fase da doença (Oliveira, 2016; Mclean; El-Omar, 2014).

1.5. Estadiamento Patológico do Câncer Gástrico

Estadiar um caso de câncer significa avaliar seu grau de disseminação, logo há uma necessidade em classificar os casos de câncer em estádios a partir da constatação de que as taxas de sobrevivência são diferentes quando a doença se restringe ao órgão de origem ou quando se estende a outros órgãos (INCA, 2021).

O estadiamento do adenocarcinoma gástrico é determinado a partir da classificação TNM segundo *American Joint Committee on Câncer (AJCC)* e pela *Union Internationale contre Le Câncer (UICC)*. A classificação TNM é um sistema para classificar uma malignidade, na qual é utilizada em tumores sólidos e no auxílio prognóstico do câncer. Este sistema de estadiamento utiliza um modelo clínico ou patológico. No modelo clínico avalia-se a extensão do tumor a partir de exames físicos, radiográficos, endoscópicos e histológicos. Enquanto o modelo patológico - pTNM (Tabela 1) ocorre a partir da análise macro e microscópica do tumor, com o objetivo de avaliar a profundidade da invasão, a presença de linfonodos comprometidos e da presença de metástase à distância (Amin et al., 2017; Oliveira, 2016; INCA, 2021; Rosen; Sapro, 2022).

De acordo com esse sistema de classificação, a letra “T” determina a extensão do tumor primário e a sua invasão em tecidos adjacentes; a letra “N” determina a ausência ou a presença, assim como a extensão das metástases em linfonodos proximais. Contudo, a letra “M” estabelece a ausência ou a presença de metástase à distância. Logo, o diagnóstico do pTNM

determina o estágio do câncer (Tabela 1), o qual estará relacionado com o prognóstico do paciente. É importante destacar que há uma necessidade de uma abordagem mais personalizada quanto a classificação tumoral de cada paciente, pois o “*The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual*” introduziu os primeiros passos para reconhecimento da importância da oncologia molecular, pois um estadiamento detalhado e bem conduzido leva a uma correta conduta terapêutica (Amin et al., 2017; Oliveira, 2016; INCA, 2021; Rosen; Sapro, 2022).

Na Tabela 1, estão classificados os tipos de acordo com a extensão do tumor (em tumor primário), a presença e/ou ausência de linfonodos comprometidos (em linfonodos regionais) e a presença e/ou ausência de metástase à distância (em metástase à distância).

Tabela 1 - Classificação do TNM patológico.

Estadiamento	Combinações TNM		
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio IA	T1	N0	M0
Estádio IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Estádio IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
Estádio IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Estádio IIIB	T4b	N0-1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Estádio IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2-3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Amin et al., 2017.

Na tabela 2, encontra-se o estadiamento do tumor que está relacionado ao prognóstico do paciente e está relacionado a combinação da classificação observada na tabela anterior.

Tabela 2 - Grupamento por estádios.

Pt	Tumor Primário
TX	O tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria.
T1	Tumor invade a lâmina própria, muscular da mucosa ou submucosa.
T1a	Tumor invade a lâmina própria ou muscular da mucosa.
T1b	Tumor invade a submucosa.
T2	Tumor invade a muscular própria.
T3	Tumor penetra no tecido conjuntivo subseroso sem invasão do peritônio visceral ou estruturas adjacentes. Também incluem aqueles que se estendem ao gástrico ou ligamentos gastrohepáticos, ou para o momento maior ou menor, sem perfuração do peritônio visceral que cobre estas estruturas.
T4	Tumor invade a serosa (peritônio visceral) ou invade estruturas adjacentes.
T4a	Tumor invade a serosa (peritônio visceral).
T4b	Tumor invade estruturas adjacentes como baço, cólon transverso, fígado, diafragma, pâncreas, parede abdominal, glândula adrenal, rim, intestino delgado e retroperitônio.
pN	Linfonodos Regionais
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais.
N1	Metástase em 1 a 2 linfonodos regionais.
N2	Metástase em 3 a 6 linfonodos regionais.
N3	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais.
Pm	Metástase à Distância
MX	A metástase não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

Fonte: Amin et al., 2017.

Os marcadores biológicos são alterações genéticas e epigenéticas presentes na molécula de DNA que estão associadas a diferentes tipos de câncer, logo mapear estes biomarcadores de modo que suas localizações cromossômicas, efeitos e níveis de expressões se tornem conhecidos é muito importante para a oncologia (Capelozzi, 2001; Strachan, 2013).

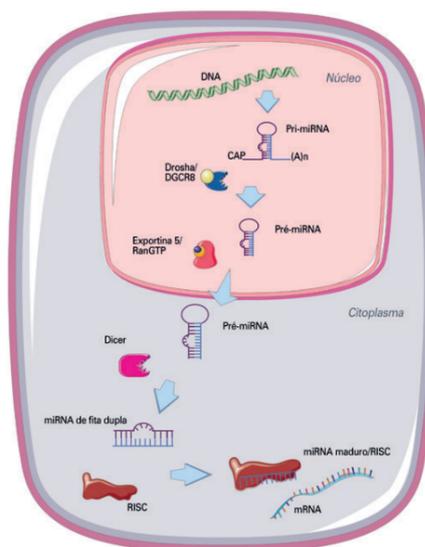
Descobertos em 1993, os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs regulatórios e não codificantes, com comprimento variando entre 17 e 25 nucleotídeos, que atuam no processo de regulação gênica pós-transcricional, esta ocorre por meio da degradação do RNA mensageiro (mRNA) ou do impedimento da síntese proteica.

Do ponto de vista evolutivo, os miRNAs são conservados, estando presentes inclusive em seres unicelulares. Tanto o aparecimento quanto a expansão dos miRNAs estão diretamente relacionados a multicelularidade e à evolução dos organismos, essa expansão destes miRNAs contribuíram para a variabilidade das espécies e para a evolução de diversas doenças como é o caso do câncer.

1.6. Biogêneses dos miRNAs

A biogênese do miRNAs ocorre no núcleo e estende-se até o citoplasma. Várias enzimas e complexos proteicos celulares participam também na regulação de todo o processo até a produção de miRNAs maduros aptos a desempenhar sua função (Figura 10). No mínimo, três vias de produção de miRNAs são conhecidas (O'Brien et al., 2018).

Figura 10. Biogênese canônica de microRNAs.



Fonte: Pereira, Jorge AL et al., 2021.

A via canônica é a mais estudada. Inicia com a transcrição do DNA, porém os miRNAs podem estar codificados em regiões intragênicas (principalmente regiões intrônicas) e intergênicas, tanto da fita sense quanto da fita antisense do DNA. A transcrição é realizada geralmente pela RNA polimerase II e, alternativamente, pela RNA polimerase III (Borchert GM et al., 2006).

O primeiro transcrito (miRNA primário ou pri-miRNA), tem uma estrutura de hairpin, havendo uma parte na qual a molécula está pareada formando uma região de dsRNA (RNA de cadeia dupla) e com seus extremos protegidos por encapamento (CAP - capped) e cauda poli-A (Kim VN et al., 2009). Esse primeiro transcrito é acionado no núcleo pelo complexo enzimático formado pela RNase III Droscha e a proteína Pasha ou DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein (DGCR8), que tem habilidade de se atrelar essa molécula de RNA de cadeia dupla e remover a cauda de poli A e o encapamento dos extremos dela. Esse processo resulta em uma molécula de RNA de dupla fita com aproximadamente 70 nucleotídeos, denominada miRNA precursor ou pré-miRNA, que é exportada para o citoplasma com o auxílio das proteínas exportina-5 e Ran-GTP (Yi R, et al., 2003).

No citoplasma, a enzima Dicer continua com o processamento do miRNA, extraindo a alça não pareada da molécula e dando origem a um miRNA de fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Alternativamente, a proteína argonauta 2 pode participar da clivagem do pré-miRNA no citoplasma (Yang JS et al., 2012). Esse miRNA (fita dupla) é associado a um complexo proteico chamado complexo silenciador induzido por RNA (RISC), formado por várias proteínas, sendo que as proteínas argonautas são um dos fatores mais importantes, pois são as responsáveis pela interação com as moléculas de RNAs (Maniataki E & Mourelatos Z., 2005). O RISC causa a divisão das duas fitas do miRNA, uma delas degenera, e a outra (miRNA maduro) fica exposta para parear com o mRNA-alvo (O'Brien et al., 2018; Kim VN et al., 2009).

Nas vias não canônicas, a produção de pré-miRNAs ocorre no núcleo, a partir de outras moléculas, como short hairpin RNA (shRNAs), miRtron (participação do spliceossomo no núcleo) ou m7G-pre-miRN (precisa da proteína exportina-1 para ser transportado para o citoplasma), sendo que existem também variações em algumas das etapas subsequentes. A diferença entre as vias canônicas e não canônicas, envolvendo os shRNAs, está na participação das argonautas 2 no lugar da Dicer (O'Brien et al., 2018; Plotnikova O et al., 2019).

Sendo assim, os miRNAs tem papel crucial no mecanismo de desenvolvimento de inúmeras enfermidades humanas, e pode ser também interpretado como marcadores do seu processo, prognóstico, diagnóstico e na avaliação da resposta ao tratamento. E este mecanismo de adoecimento é favorecido a partir da atuação destes miRNAs na regulação da expressão de diversos genes, pois trabalham de forma orquestrada com amplas redes regulatórias integradas controlando assim, uma via ou função biológica comum, como as vias de determinadas doenças.

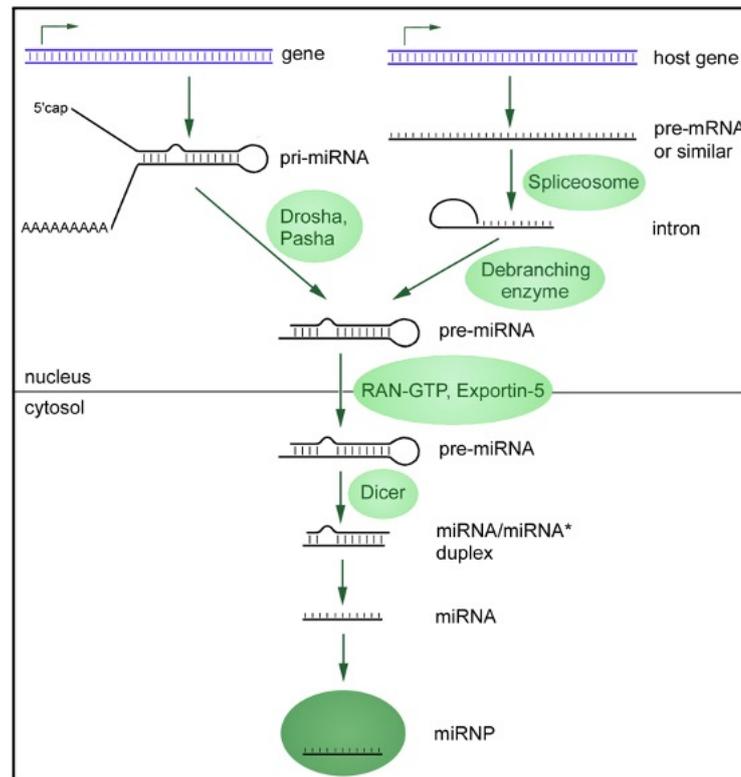
Quando o padrão de expressão é alterado, o miRNA tem perda ou ganho de função, que pode originar uma expressão diferenciada do gene, afetando inúmeros processos celulares e favorecendo doenças como o câncer, o diabetes tipo 2, a hipertensão e doenças coronarianas, exemplos de patologias em que a expressão alterada dos miRNAs influenciam nos diversos processos biológicos (Ribeiro-dos-Santos et al., 2012; Pereira, 2015; Strachan, 2013). Além disso, estudos apontam a importância da detecção de assinaturas de miRNAs no sangue para predição prognóstica, isto é, a utilização de miRNAs no sangue como biomarcadores de resposta patológica completa após quimiorradioterapia neoadjuvante e com excelente prognóstico, como por exemplo, o miRNA148a em pacientes com câncer de reto, na qual pacientes que apresentaram superexpressão deste marcador, após a irradiação neoadjuvante, obtiveram inibição da proliferação celular tumoral e indução da apoptose celular, sendo assim, identificar miRNAs com expressões significativas também é muito importante como ferramenta de diagnóstico e prognóstico para o câncer (Huang et al., 2021; Kahraman et al., 2018).

É importante destacar que o padrão de expressão dos miRNAs diferem quando comparado a tecidos normais e entre os diferentes tipos de câncer. Mais de 50% dos genes de miRNAs são geneticamente alterados nos tumores humanos devido à localização destes genes em sítios frágeis e em regiões de perda de heterozigosidade ou em regiões de quebras comuns (Gehm, 2013).

No caso do câncer gástrico os miRNAs atuam como oncogenes ou supressores de tumor, favorecendo vias importantes para o câncer como proliferação, apoptose e migração celular. O miRNA1284, por exemplo, atua no controle da tumorigênese do CG; o miRNA448 promove o aumento do metabolismo celular e fornece energia para a proliferação descontrolada da célula tumoral; e o biomarcador miRNA125 atua na inibição do fator de crescimento endotelial vascular A (*VEGF-A*) promovendo a formação de novos vasos sanguíneos (Sosa et al., 2016).

O processo de síntese do miRNA acontece inicialmente a partir do filamento de DNA de um gene que é usado como um molde para a síntese de um filamento complementar de RNA, denominado transcrito gênico. Estes são moléculas de miRNAs cujo produto da transcrição é denominado de transcrito primário (pri-miRNA), e geralmente, não controlam ou regulam as moléculas de miRNA (Figura 11) (<http://www.wikiwand.com/gl/MicroARN>>. Acesso em: 14 Mai. 2019).

Figura 11 - Síntese do miRNA humano.



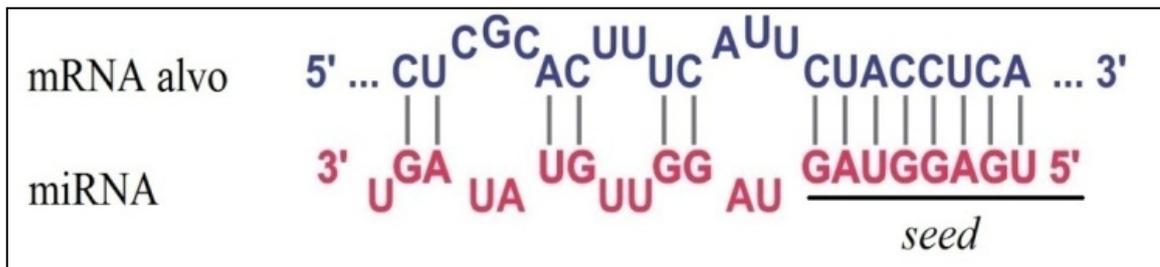
Fonte: <http://www.wikiwand.com/gl/MicroARN>.

O transcrito primário tem repetições invertidas posicionadas em regiões próximas cujas bases pareiam formando um grampo de RNA que chamamos de *hairpin*, este é clivado por uma RNase III nuclear conhecida como Droscha. O resultado desta clivagem é um pequeno pré-miRNA de dupla fita, o qual é transportado para fora do núcleo. No citoplasma uma RNase III citoplasmática chamada Dicer, cliva este pré-miRNA para sintetizar um miRNA de fita dupla contendo dinucleotídeos 3'livres. Finalmente, um complexo de silenciamento específico contendo a endorribonuclease argonauta que se liga a fita dupla de miRNA e degrada uma das fitas, mantendo o miRNA maduro e apto a regulação dos genes (Strachan, 2013).

O mecanismo de funcionamento das moléculas de miRNA e sua molécula alvo é dirigido pela interação molecular entres as extremidades 5'UTR do regulador e a extremidade 3'UTR do regulado e pelo reconhecimento da sequência *seed* (2-8 nucleotídeos iniciais da extremidade 5'UTR do miRNA). Após a síntese do miRNA, este se torna apto para parear com o RNAm alvo. Deste pareamento duas situações podem ocorrer: Perfeito pareamento entre as bases, desencadeando a clivagem ou degradação do mensageiro (siRNAs); e o imperfeito pareamento, o que induz a repressão traducional, característicos dos miRNAs. Contudo, a partir de técnicas mais sensíveis, estudos mais recentes mencionam que o pareamento perfeito não é

o único determinante do mecanismo miRISC (Complexo de silenciamento induzido por microRNA), pois os miRNAs parcialmente complementares também podem levar a clivagem do RNA-alvo, assim como pode ocorrer o silenciamento gênico transcricional, também poderá ocorrer a promoção da transcrição e o aumento da eficiência da tradução (Bartel, 2004; Nielsen et al., 2007; Pereira, 2015) (Figura 12).

Figura 12 - Sequência de microRNAs com destaque em *Seed*.



Fonte: Ribeiro- dos- Santos et al., 2012.

Na área da oncologia que surgiram as primeiras evidências envolvendo os miRNAs e as doenças humanas, onde estas moléculas atuam na regulação do crescimento e diferenciação celular, ambas quando desreguladas atuam intensamente na evolução desta enfermidade (Pereira, 2015).

Os genes específicos codificam produtos que regulam a divisão celular, e a ação de agentes mutagênicos, carcinogênicos e/ou a ação dos miRNAs, podem levar a uma regulação negativa do gene (Snustad et al., 2008).

Portanto, a regulação da expressão negativa do gene está envolvida em processos celulares fundamentais como a proliferação celular, o desenvolvimento, a diferenciação e a apoptose. Sendo assim, o perfil de expressão dos miRNAs pode fornecer fatores de risco, diagnósticos e prognósticos, podendo agir como biomarcadores para diversos tipos de câncer (Moreira et al., 2014).

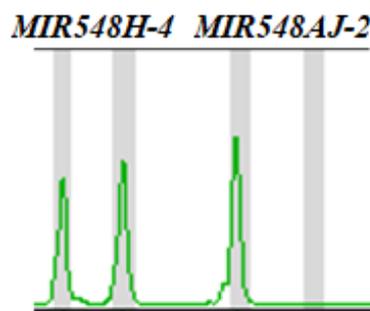
Diversos estudos que mencionam essas moléculas não codificantes no câncer mostraram uma assinatura característica de expressão de miRNAs nos tecidos tumorais, diferenciada em relação aos seus respectivos tecidos normais, logo os miRNAs são considerados eficientes marcadores de risco e de diagnóstico de tumores (Getz et al., 2005). Uma das grandes dificuldades no estudo dessas moléculas reside no fato dos miRNAs controlarem e serem influenciados por diversos fatores. Um dos fatores é quando o segmento

de miRNA sofre modificações genéticas a partir de sequências de polimorfismos, o que resulta em um miRNA com alterações nas funções e nos seus sítios alvos.

1.7. INDEL em miRNAs

O INDEL, polimorfismo de inserção/deleção, é uma variação gênica na qual uma sequência de nucleotídeo está presente (inserção) ou ausente (deleção) (Figura 13). Os INDELS assim como os SNPs estão espalhados pelo genoma, e esta alteração do tipo INDEL, modifica o quadro de leitura e a sequência do transcrito de DNA, codificando um aminoácido diverso ou resultando em um códon de parada prematuro, o que resultará em uma proteína estruturalmente e funcionalmente modificada (Rodriguez-Murillo et al., 2013).

Figura 13 - Eletroferograma de um marcador *MIR548H-4* e *MIR548AJ-2* do tipo INDEL pós-eletroforese capilar, indicando uma dupla heterozigose (196 – 206pb), e um homozigoto para deleção (249 - 255pb).



Fonte: autor da pesquisa

As alterações genéticas em regiões específicas dos miRNAs (pri-miRNAs, pré-miRNAs e região madura) ou nos locais alvos (RNAm) modificam a funcionalidade do mesmo e está relacionado ao risco de doenças. Diversas evidências experimentais através da análise sistemática de identificação de inserções e deleções (INDELS) em miRNA e seus locais alvos comprovam o papel funcional destes polimorfismos no desenvolvimento de doenças como a doença de Parkinson, o acidente vascular cerebral e o câncer.

Bhattacharya et al. (2012) exemplificaram um polimorfismo de um único nucleotídeo (rs2910164) no pré-miRNA do miRNA146a associado a um risco aumentado para diversos tipos de câncer. Esses polimorfismos podem alterar a expressão do miRNA146a e dos sítios alvos (neste caso incluindo *BRCA1*), promovendo a proliferação celular. Assim como alterações do tipo INDELS poderão modificar a região de leitura e com isso a ação do miRNA maduro no mRNA-alvo, alterações deste tipo em regiões do pré-miRNA e pri-miRNA também poderão favorecer a susceptibilidade a doenças como o câncer, pois inserções e deleções em regiões

precursoras podem afetar o reconhecimento da sequência SRp20, proteína responsável pelo processamento do pré-miRNA, logo a alteração neste seguimento perturbará o processo de síntese, maturação e expressão do miRNA maduro (Wang et al., 2017).

Apesar do fato que a função geral dos miRNAs ter sido identificada na década de 1990, são mais recentes os trabalhos publicados descrevendo a função desses miRNAs em relação a doenças complexas, especialmente as diferentes formas de câncer. Neste direcionamento, a maioria dos trabalhos tem se voltado para a identificação de alterações funcionais de miRNAs em tumores (diferença de expressão e silenciamento de genes). Mais ainda, até recentemente muito pouco era conhecido a respeito de alterações germinativas na molécula de DNA que pudessem alterar significativamente sua expressão, alterando, assim diferentes vias metabólicas essenciais para a higidez dos tecidos (Pereira et al., 2021).

Bhattacharya et al. (2012) publicaram um trabalho em que identificaram diferentes polimorfismos INDELS em genes que codificam miRNA, presentes em indivíduos que fazem parte do banco de dados do *1.000 Genomes*. Nesta publicação eles identificaram 181 polimorfismos do tipo INDEL presentes entre 124 miRNAs. Logo, devido essas ligações entre polimorfismos relacionados com miRNA e as doenças humanas, há um crescente interesse em análises sistemáticas de polimorfismos em miRNAs e nos sítios de destino.

O grupo de pesquisas do Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA já identificou uma série de miRNAs que tem expressão alterada em pacientes portadores de câncer gástrico, e acreditamos que este trabalho de investigar a variabilidade pode trazer benefícios para pesquisadores que pretendem investigar miRNAs associados ao câncer. Pensando desta forma construímos um modelo de investigação que passamos a descrever a seguir.

Um painel de 11 biomarcadores do tipo INDEL em miRNAs associados ao câncer. A ideia central é identificar polimorfismos INDEL que tenham frequência média maior de que 2% (MAF=0.02), entre as regiões que codificam miRNAs alterados nesta patologia e montar um modelo prático e rápido de investigação destes polimorfismos, validando em populações miscigenadas, com histórico médico de câncer, residentes no estado do Pará.

1.8. Potenciais marcadores genéticos de câncer

Uma das ferramentas promissoras utilizadas no diagnóstico precoce, no prognóstico e na identificação de novos tratamentos do câncer é o rastreamento através de potenciais marcadores genéticos, pois avaliar e entender os componentes celulares, estruturais e as vias bioquímicas através dos marcadores biológicos é muito importante para a detecção até antes

mesmo do desenvolvimento macroscópico do tumor, o que permite uma intervenção antes da invasão tumoral, da angiogênese e da metástase (Da Silva et al., 2015).

Neste trabalho 11 INDELS foram associados à miRNAs, pois apresentaram expressão alterada em pacientes portadores de câncer, todos marcadores foram genotipados em uma única reação de PCR do tipo Multiplex seguida de eletroforese capilar (Tabela 3).

Tabela 3 - Grupos de polimorfismos INDEL de *MIRNA* que apresentaram expressão alterada em pacientes portadores de câncer

Gene	ID	Região	Alelos	MAF	Primers	Amplicon
<i>MIR302C</i>	rs199971565	seed	CACTT/C	0,08	F5'GCTTCCAGTTCATCCATGT3' R5'CTCAGCGTGGTAGTGTGGA3'	253-257
<i>MIR3945</i>	rs145931056	mature	CCTATGCCCTCC/-	0.28	F5'AGGAGTATCCCCCTCGTGGAC3' R5'CAAGAGTCAGGCAAAAACAGG3'	145-157
<i>MIR548AJ-2</i>	rs145326096	mature	AAGT/-	0.39	F5'CTCTTCAATGCTTCCTTGAGGT3' R5'CTGCATGCCAGGAGCTAAGTAT3'	207-211
<i>MIR4274</i>	rs 202195689	mature	-/CCC/CCCCA	0.26	F5'TTTTGTCTCCAAGCTCC3' R5'GAACAAGAGAGAGGGCAGGA3'	132-135
<i>MIR630</i>	rs139334001	pré-miRNA	-/TTG	0.42	F5'GGTGACCCAGAATTGACCCT3' R5'GCCCTCAGGACGCACCTCTG3'	96-99
<i>MIR516B-2</i>	rs10670323	pré-miRNA	-/AAAGA	0.32	F5'CATGCACAGCTATCCAGGAG3' R5'TGTTCCTGTCCGATAGATGC3'	162-167
<i>MIR4463</i>	rs 5877455	pré-miRNA	-/AG	0.47	F5'TGCCCTACTTAGCAGTCTCA3' R5'GAGAGGTGGAGAAGTGGATT3'	191-193
<i>MIR920</i>	rs 66686007	pré-miRNA	GTTGT/A	0.12	F5'GCATCAGGACGCTGAACATA3' R5'AATGCAACTTGCTCCAGAGG3'	230-235
<i>MIR3171</i>	rs 35170395	pré-miRNA	-/TA	0.21	F5'CTGTGTGTCTGAGGGGTGAA3' R5'ATCCTGCCACTTTCTGATGG3'	331-333
<i>MIR548H-4</i>	rs150141473	pré-miRNA	TAAAG/-	0,28	F5GGAATGGAAAATAGACAAGAAGTGA3' R5'TGGCAAGTGTACCACAGAAAAC3'	197-202
<i>MIR3652</i>	rs 62747560	pré-miRNA	GGGGTGG/-	0,36	F5'ATTGGTGGGTTCATGTTCC3' R5'CAGAACTACTCACCGAAGGTC3'	236-246

Fonte: Adaptado Bhattacharya, 2012.

1.9. Potenciais marcadores genéticos do tipo inserção/deleção em regiões de MIRNA

1.9.1. *MIR630* (rs139334001)

Este INDEL de 3 pares de base (TTG) está localizado na região do pré-miRNA (miRNA precursor) do *MIR630*, no cromossomo 15 e é um RNA gene da classe dos miRNA.

INDELS localizados nessa região precursora do *MIR630* tem sido relacionado ao desenvolvimento do câncer, como por exemplo, o carcinoma urotelial de bexiga (Whang et al, 2012), câncer de ovário (Eoh et al, 2018), câncer gástrico (Zhang et al, 2017). O *miRNA630*

também atua em vias importantes como as vias de sinalização gama e no sistema imunológico inato (Bhattacharya et al, 2012).

Zhang et al. (2017) investigaram os níveis de expressão do miRNA630 em tecidos de câncer gástrico e verificaram que o *MIR630* e o circRNA_100269, juntos, atuam em uma nova via que regulam a proliferação de células gástricas.

Pesquisas também apontam o *MIR630* atuando com níveis de expressão aumentados, favorecendo a resistência a quimioterápico, como por exemplo, o paclitaxel, utilizado no tratamento do câncer de ovário (Eoh et al., 2018). Em relação ao câncer de mama, Zhou et al (2016) destacaram o papel importante dos níveis baixos de expressão do *MIR630* regulando vias metastáticas, o que possibilita a aplicabilidade do marcador miRNA630 no tratamento do câncer de mama. A Tabela 4 demonstra diversos trabalhos envolvendo o *MIR630*, onde a regulação da expressão mostra diversidade nos diferentes tipos de câncer.

Tabela 4 - Dados do *MIR630* e os tipos de câncer.

miRNA	Câncer	Expressão	Referência - PubMed
<i>MIRNA630</i>	Mama	Baixa	Zhou et al (2016)
<i>MIRNA630</i>	Colorretal	Alta	Chu et al (2014)
<i>MIRNA630</i>	Gástrico	Baixa	Feng et al (2017)
<i>MIRNA630</i>	Gástrico	Baixa	Li et al (2018)
<i>MIRNA630</i>	Glioma	Baixa	Zhang et al (2017)
<i>MIRNA630</i>	Carcinoma Hepatocelular	Alta	Zhang et al (2015)
<i>MIRNA630</i>	Carcinoma Hepatocelular	Baixa	Chen et al (2016)
<i>MIRNA630</i>	Pulmão	Baixa	Cao et al (2014)

Fonte: <http://mircancer.ecu.edu>.

1.9.2. *MIR516B-2* (rs10670323)

Esse INDEL investigado é de 5 pares de base (AAAGA), localizado na região do pré-miRNA do *MIR516B-2*, este miRNA está localizado no cromossomo 19 e é um RNA gene da classe dos miRNAs. Atuando como supressor tumoral em diversos tumores, o *MIR516B2* modula a expressão do gene *CCNG1* no carcinoma de células esofágicas (ESCC), pois níveis baixos de *hsa-mir-516b-2* estão correlacionados diretamente com os estágios avançados da tumorigênese, da profundidade da invasão, metástase linfática e a pior sobrevida global de pacientes com ESCC (Zhao et al., 2018).

Zhu et al. (2017) verificou o nível de expressão do *MIR516B2* no câncer de pulmão de células não pequenas e constatou que o nível de expressão deste miRNA é significativamente menor nestas células do que nos tecidos e células normais, sendo que este nível de expressão baixo foi associado ao tamanho do tumor, ao estágio da metástase e a menor sobrevida global, logo o *hsa-miR-516B-2* pode ser um marcador potencial de diagnóstico e prognóstico para o câncer de pulmão.

1.9.3. *MIR4463* (rs5877455)

O INDEL investigado é de 2 pares de base (AG), localizado na região do pré-miRNA do *MIR4463*, este miRNA está localizado no cromossomo 6 e é um RNA gene da classe dos miRNAs.

O alto nível de expressão nesse *MIR4463* está associado com o tempo de sobrevida menor em pacientes com carcinoma hepatocelular (Hu et al., 2017). Pesquisas também utilizam este miRNA na aplicabilidade da distinção de subgrupos clinicamente relevantes de linfoma (Jima et al., 2010). Segundo Zhang et al. (2017), o *MIR4463* pode ser considerado um possível biomarcador de diagnóstico para o câncer de cólon, pois níveis altos de expressão deste miRNA foram identificados em tumores de cólon.

1.9.4. *MIR3171* (rs35170395)

Este INDEL apresenta 2 pares de base (TA), localizado na região do pré-miRNA do *MIR3171*, no cromossomo 14 e é um RNA gene da classe dos miRNAs.

Segundo Stark et al. (2010), o *MIR3171* é específico para a linhagem melanocítica, isto é, um forte biomarcador no auxílio da detecção precoce de metástases em níveis circulantes no sangue, logo este miRNA tem papel funcional em células pigmentares, o que possibilita um foco no desenvolvimento e progressão do câncer.

Além disso, há estudos que apontam correlação inversa entre o nível de expressão do *MIR3171* com o circHIAT1 em pacientes com hepatocarcinoma, sendo que o circHIAT1 atua no gene *PTEN* que inibe as células de crescimento do carcinoma hepatocelular, o qual pode ser regulado pelo *MIR3171* (Wang et al., 2019).

1.9.5. *MIR3945* (rs145931056)

Este INDEL de 12 pares de base (CCTATGCCCTCC) está localizado na região madura do *MIR3945*, no cromossomo 4 e é um RNA gene da classe dos miRNAs. O miRNA3945 não apresenta trabalhos descritos associados ao câncer gástrico, porém tem como potenciais alvos genes *RAB* e *TNF*, ambos envolvidos no processo de proliferação celular, metástase e risco ao

mau prognóstico em pacientes com câncer de pulmão (Koh; Song, 2019; Guo et al, 2020; Liu; Wang, 2019).

1.9.6. *MIR548h-4* (rs150141473)

Apresentando um INDEL de 5 pares de base (TAAAG), este polimorfismo está localizado na região do pré-miRNA do *MIR548h-4*, no cromossomo 8 e é um RNA gene da classe dos miRNAs. Estudos apontam a superexpressão deste miRNA associado a inibição da proliferação de células do câncer de mama e sendo considerado alvo terapêutico para este tipo de câncer; no câncer de próstata este miRNA atua na via da *PTEN* e foi correlacionado a sobrevida dos pacientes portadores deste tipo de câncer (Shi et al., 2015; Saffari et al., 2019)

1.9.7. *MIR548aj-2* (rs145326096)

Com um INDEL de 4 pares de base (AAGT), o polimorfismo está localizado na região madura do *MIR548aj-2*, o qual está localizado no cromossomo X e é um RNA gene da classe dos miRNAs. A literatura aponta este miRNA como potencial alvo de vias que favorecem vários tipos de câncer, dentre eles o gene *GPAM*, *KARAS* e o *MYC*, genes que atuam na migração celular e tem associação a sobrevida global dos pacientes portadores de câncer (Marchan et al., 2017; Agarwal et al., 2015)

1.9.8. *MIR302c* (rs199971565)

Apresentando um INDEL de 4 pares de base (ACTT), o polimorfismo está localizado na região de leitura (*Seed*) do *MIR302c*, este miRNA está localizado no cromossomo 4 e é um RNA gene da classe dos miRNAs. Diversos estudos abordam este polimorfismo associado ao câncer gástrico (Raad et al., 2019), ao câncer colorretal (Ma et al., 2018), ao câncer de fígado (Zhu et al., 2014) e ao câncer renal (Guo et al., 2017).

Estudos envolvendo este miRNA apontam uma susceptibilidade e um risco de incidência para o câncer gástrico sob um modelo de herança recessiva, onde o alelo de deleção aumentou significativamente o risco de CG (Raad et al., 2019).

O *MIR302c* também foi investigado por Leivonen et al. (2009), onde verificou a atuação deste miRNA inibindo a sinalização do receptor de estrogênio ($ER\alpha$) em linhagens de câncer de mama, pois o $ER\alpha$ é o principal mediador das atividades mitogênicas do estrogênio no tecido mamário, podendo atuar no desenvolvimento e progressão do câncer de mama.

Shi et al. (2010) investigou o *hsa-mir-302c* inibindo a tumorigênese de células-tronco pluripotentes, ou seja, na espécie humana a expressão elevada do *MIR302c* inibe o ciclo celular através das vias ciclina E-CDK2 e ciclina D-CDK4 bloqueando o ciclo celular.

1.9.9. *MIR4274* (rs202195689)

O INDEL investigado é de 3 pares de base (CCA), localizado na região madura do pré-miRNA do *MIR4274*, este miRNA está localizado no cromossomo 6 e é um RNA gene da classe dos miRNA. Na literatura não existem dados referenciando este miRNA associado ao CG, porém estudos mencionam o envolvimento deste miRNA associado ao *KRAS*, *TNF* e *AKT* atuando na regulação do crescimento celular e na progressão do tumor no câncer do trato urinário (Tao et al., 2015).

1.9.10. *MIR920* (rs66686007)

Com um INDEL de 5 pares de base (GTTGT), o polimorfismo está localizado na região do pré-miRNA do *MIR920*, o qual está localizado no cromossomo 12 e é um RNA gene da classe dos miRNAs.

Pesquisas envolvendo este miRNA estão associadas ao carcinoma hepatocelular (Chen et al, 2010), na qual o estudo associa níveis baixos do *hsa-miR-920* à regulação da proteína β TrCP, a qual regula a via de sinalização NFK β , ambas envolvida na progressão do hepatocarcinoma. O *MIR920* atua em diversas vias do câncer, envolvendo genes de grande potencial na oncologia como o *CEBPB*, o *MYC* e o *TGFBR2*, os quais estão relacionados à vias de proliferação, anti-apoptose, invasão e metástase em patologias como o câncer colorretal, leucemia, linfoma, sarcoma, câncer de próstata e neuroblastoma (Vlachos, 2015).

1.9.11. *MIR3652* (rs62747560)

Este INDEL de 7 pares de base (GGGGTGG) está localizado na região do pré-miRNA do *MIR3652*, no cromossomo 12 e é um RNA gene da classe dos miRNAs. Não contém informações na literatura referenciando este miRNA.

Apesar de poucos estudos envolvendo essas variantes (miRNAs) associadas ao CG, buscamos também possíveis alvos destes marcadores no miRDB e no miR Target Link 2.0 – Bancos de dados on line para previsão de alvos de miRNA e vias funcionais, conforme a tabela 5 (Kern et al., 2021; Liu; Wang, 2019).

Tabela 5: miRNAs e os Genes alvos.

miRNA	Genes alvos	Referência
<i>has-miR-4463</i>	<i>PNUTS, AKT, BCL2, TP53, KRAS</i>	Hu et al (2017); Jima et al (2010); Zhang et al (2017); Liu et al (2019)
<i>has-miR-548h-4</i>	<i>ERBB2, TP53, KRAS, CDH1, TGFBR2</i>	Liu et al (2019)
<i>has-miR-920</i>	<i>MYC, TGFBR2, CEBPB, IL18, TNFα, CDK2, CDK4, NFKB, TP53</i>	Chen et al (2010); Daina Tools-MirParth v.3 (2019); Liu et al (2019)
<i>has-miR-3945</i>	<i>RAB, TNFα</i>	Guo et al (2020); Liu et al (2019); Kho et al (2019)
<i>has-miR-3652</i>	<i>BCL2, TP53, PIK3CA, CDH1</i>	Ramos et al (2019); Liu et al (2019)

Fonte: autor da pesquisa

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Caracterizar variantes do tipo INDEL em *miRNAs* a partir de amostras de sangue periférico de pacientes com CG e validar em amostras de tecido tumoral gástrico.

- Objetivos Específicos

- Investigar a distribuição da frequência alélica e genotípica de 11 marcadores genéticos;
- Comparar as distribuições de frequência genotípica dos marcadores no grupo populacional investigado e comparar com os dados da literatura;
- Validar os resultados obtidos com os dados do transcriptoma (RNA-seq) em 27 amostras de tecidos de indivíduos com câncer gástrico participantes deste trabalho.
- Desenvolver um painel com marcadores moleculares do tipo INDEL associados à genes de *miRNAs*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização das amostras e Locus da pesquisa

A análise dos polimorfismos do tipo INDEL foram realizadas em 301 amostras de sangue periférico de indivíduos miscigenados, sendo 224 provenientes do Hospital Offir Loyola, 77 provenientes do Hospital Universitário João de Barros Barreto com histórico médico de câncer e 145 pacientes controles sem histórico de câncer, ambos residentes no estado do Pará. Estas amostras fazem parte do acervo biológico e do banco de dados de projetos concluídos e em andamentos do Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO/UFGA). Adicionalmente foi solicitado ao comitê de ética do NPO a utilização das amostras para

realização deste trabalho. Os dados clínicos dos participantes foram obtidos pela consulta aos prontuários.

A validação dos resultados deste estudo foi realizada em 27 amostras de tecido tumoral (T) e não tumoral (NTA) de pacientes com diagnóstico confirmado de adenocarcinoma gástrico submetidos a ressecção cirúrgica no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB).

3.2. Aspectos Éticos

Durante o estudo os indivíduos foram devidamente esclarecidos a respeito da pesquisa na qual participaram e solicitados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e caso necessário, o termo de consentimento de uso dos dados, permitindo o uso de suas alíquotas de sangue e obtenção de seus dados clínicos, em nível de prontuário. O projeto desta pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética do Núcleo de Pesquisas em Oncologia – NPO/UFPA (CAAE:0352920.0.0000.5634).

3.3. METODOLOGIA DA ANÁLISE DE FRAGMENTOS - INDEL

3.3.1. Extração de DNA total

O DNA foi extraído pelo método convencional com fenol-clorofórmio, segundo Sambrook et al. (1989). As amostras foram quantificadas no equipamento NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies – USA). Após a quantificação, as amostras foram diluídas (10ng/μL) e posteriormente utilizadas na reação em cadeia da polimerase.

3.3.2. Seleção dos polimorfismos (INDELs)

Os potenciais marcadores genéticos foram escolhidos a partir de levantamento prévio da literatura especializada sobre genes e seus polimorfismos do tipo INDEL relacionados aos miRNAs (*hsa-mir-302c*, *hsa-mir-548AJ-2*, *hsa-mir-4274*, *hsa-mir-630*, *hsa-mir-516B-2*, *hsa-mir-4463*, *hsa-mir-3945*, *hsa-mir-548H_4*, *hsa-mir-920*, *hsa-mir-3171* e *hsa-mir-3652*). Esses polimorfismos, além de estarem relacionados a diversas doenças como o câncer, conferem praticidade na confecção do sistema de genotipagem por PCR multiplex.

3.3.3. PCR multiplex e análise de fragmentos

A genotipagem dos 11 marcadores INDELs investigados foram realizados em uma única reação de PCR e posteriormente, foi realizada a eletroforese capilar. Na PCR multiplex, foi utilizado 5,0 μL do kit QIAGEN Multiplex PCR (QIAGEN, Alemanha), 1,0 μL de Q-solution, 1,0 μL de Primer Mix, 2,0 μL de água e 1,0 μL de DNA (10 ng). As amostras foram

incubadas a 95°C por 15 minutos, posteriormente foram submetidas a 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 60°C por 90 segundos e 72°C por 60 segundos, com uma extensão final a 70°C por 30 minutos. Essa reação foi realizada no termociclador ABI Verity (Life Technologies, Foster City, CA, EUA).

Para a eletroforese capilar e análise de fragmentos, utilizamos 1,0 µL do produto de PCR e adicionado a 8,5 µL da formamida deionizada HI-FI (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) e a 0,5 µL de GeneScan 500 LIZ pattern size (Life Technologies, Foster City, CA, EUA). A separação desses fragmentos de DNA foi realizada com o ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer e, a leitura dos picos, com o uso do programa GeneMapper ID v3.2, também da Life Technologies (Foster City, CA, EUA).

3.3.4. Análise Estatística

O teste Qui-quadrado foi utilizado nas variáveis categóricas (caso e controle) e verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg entre os grupos. As análises de regressão logística com correção de Bom Ferroni, entre o modelo genotípico, risco de CG, as variáveis de características clínicas e a construção dos gráficos foram desenvolvidos com a utilização do software estatístico R (R development core team, 2021). As curvas de sobrevivência foram realizadas a partir da associação entre genótipo e tempo de sobrevida e avaliada por parcelas de Kaplan-Meier; os testes Log-rank e Wilcoxon foram usados para examinar o efeito genético nos resultados de sobrevivência, estas análises foram realizadas utilizando o programa SPSS (Pacote Estatístico para Ciências Sociais), Versão 27.0 (C. IBM, 2021). Os valores de *p* foram considerados estatisticamente significativos quando menores que 0,05.

3.4. METODOLOGIA RNA-seq

3.4.1. Extração de RNA

O RNA das amostras foi obtido a partir de 50-100 ng de tecido de cada amostra, aproximadamente, e foram macerados. Em seguida, a extração foi realizada com o TRIzol® de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA total foi avaliado quanto à integridade e concentração utilizando-se os equipamentos Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) e 2200 TapeStation System (Agilent Technologies AG, Basel, Suíça). Por fim, o RNA total obtido foi armazenado em nitrogênio líquido até a sua utilização.

3.4.2. Construção das Bibliotecas

A construção das bibliotecas foi realizada a partir do kit TruSeq Stranded Total RNA (Illumina) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram padronizadas para 100 ng/ μ l em 10uL de volume final e avaliada novamente quanto a integridade do RNA. Foram utilizadas para o sequenciamento apenas as amostras que apresentaram o número de integridade de RNA (RIN) ≥ 5 . Em seguida, foi realizada a depleção do RNA ribossômico, síntese de cDNA, ligação dos adaptadores, amplificação por PCR, e, por fim, a normalização, no qual as bibliotecas foram diluídas a 10 mM em um volume de 10 μ l.

3.4.3. Sequenciamento NGS

O RNA-seq foi executado em *pair-end* na plataforma NextSeq (Illumina). O kit NextSeq 500 ID Output V2 kit - 150 cycles (Illumina) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.4. Controle de qualidade das leituras

As *reads* obtidas foram convertidas para o formato FASTQ pelo software reporter, no qual todas as sequências identificadas e suas respectivas sequências de qualidade foram codificadas em ASCII. Em seguida, a qualidade das *reads* foi avaliada utilizando o FASTQC, foi adotado como parâmetro para avaliar as leituras geradas no sequenciamento um valor de qualidade (QV) superior a 15. Por fim, os adaptadores e as leituras de baixa qualidade foram removidas usando o Trimmomatic (Bolger et al., 2014).

3.4.5. Identificação e quantificação dos mRNA-alvos

O alinhamento das *reads* foi realizada com a ferramenta Salmon (Patro et al., 2017), no qual foi utilizada como index a anotação de RNAs mensageiros versão hg38 do GENCODE. As *reads* identificadas foram quantificadas e importadas para o programa estatístico R (R Development Core Team, 2018) por meio da biblioteca tximport (Love et al., 2014) e para a análise da expressão gênica diferencial utilizou-se a biblioteca DeSEQ2 (Love; Huber; Anders, 2014; Love et al., 2014). Foram considerados diferencialmente expressos (DE) os transcritos cuja diferença de expressão apresentaram os seguintes critérios: i) $|\text{Log}_2(\text{Fold-Change})| > 2$; e ii) p -ajustado $< 0,05$.

3.4.6. Análise da característica de operação do receptor

A relevância dos mRNAs identificados foi avaliada calculando área sobre a curva (AUC) de característica do receptor (ROC). A curva ROC foi estimada usando o pacote *pROC*

versão 1.18.0 (Robin et al., 2021) disponível no R. Foram considerados como bons classificadores, mRNAs com AUC maior que 0,75.

3.4.7. Análises Multivariadas

3.4.7.1. Normalização de contagens

Os dados obtidos a partir de RNA-seq apresentaram uma variância que cresce com a média, o que pode ser limitante para visualização multivariada e ordenações como agrupamento hierárquico não supervisionado ou análise de componentes principais (PCA). Por isso, foi utilizado a função de transformação logarítmica regularizada, *rlog*, fornecida pela biblioteca *DESeq2*, para estabilizar a variância e assim, fazer com que a força de expressão de um gene não dependesse da média.

3.4.7.2. Análise de componentes principais

A PCA foi executada apenas com os mRNAs de que apresentaram pelo menos $AUC > 0,75$ entre as condições avaliadas, usando a função *prcomp* disponível no R (versão 4.0.2, R Foundation, Viena, Áustria) e para visualização dos resultados foi utilizada a biblioteca *ggfortify* v 0.4.13 (Horikoshi & Tang, 2018).

3.4.7.3. Análise de sobrevivência global

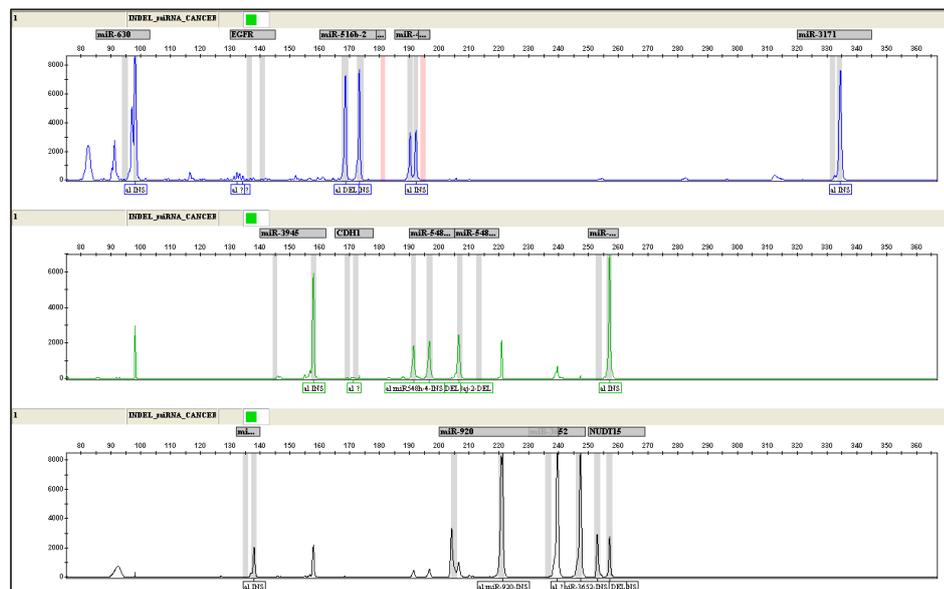
Para analisar o impacto da expressão de lncRNAs na SG foi utilizado a curva de Kaplan-Meier (KM). Foram excluídos da análise os pacientes que faleceram em até 30 dias de pós-operatório (Zheng et al., 2020). Os perfis de expressão de pacientes com câncer gástrico selecionados foram normalizados e dicotomizados em dois grupos baseado nos níveis de expressão utilizando o pacote *Survminer* (Kassambra et al., 2018) disponível no R, que adota a estatística de classificação selecionada ao máximo para fornecer um ponto de corte que corresponde à relação mais significativa com a sobrevivência. Em seguida, com o pacote *Survival* (Therneau, 2015) foi estimada a SG entre os diferentes grupos para os miRNAs DE identificados. Para analisar a diferença entre as curvas, adotou-se o teste log-rank, sendo $p < 0,05$ estatisticamente significativa.

4. RESULTADOS

A variação gênica na qual uma sequência de nucleotídeo está inserida ou deletada é chamada de INDEL, que são pequenas variações genéticas, que medem de 1 a 10.000 pares de bases de comprimento, incluindo episódios de inserção e deleção que podem ser separados por muitos anos, e podem não estar relacionados entre si. Assim, quando há uma mutação na sua leitura, ocorre uma alteração na sequência do DNA gerando proteínas modificadas na sua estrutura e função. A análise sistemática de identificação de INDELS em miRNA e seus locais alvos evidenciam a ação funcional destes polimorfismos no desenvolvimento de algumas doenças como o câncer.

Na Figura 14 encontra-se a padronização do painel de 11 biomarcadores do tipo inserção/deleção relacionados ao câncer, sendo que estes foram estabelecidos a partir da literatura e que apresentaram frequência média maior de que 2% (MAF=0,02) entre as regiões que codificam os alvos alterados nesta patologia.

Figura 14 - Eletroferograma do painel com 11 marcadores de câncer do tipo INDEL.



Fonte: autor da pesquisa.

As amostras foram caracterizadas com 446 indivíduos, sendo 301 indivíduos com CG e 145 indivíduos livres de câncer. Das amostras de câncer gástrico 77 (25,58%) indivíduos são provenientes do Hospital Universitário João de Barros Barreto e 224 (74,41%) indivíduos do Hospital Offir Loyola conforme a Tabela 6.

Tabela 6 - Frequência absoluta dos casos de câncer gástrico (CG). Os dados são apresentados por números absolutos de indivíduos e porcentagem.

Amostras	Frequência	Porcentagem
HUJBB	77	25,58 %
HOL	224	74,41 %
Controle	145	—
Total	446	—

Fonte: autor da pesquisa.

A comparação entre as características caso-controle, idade ($p=0,198$) e gênero ($p=0,606$), não houve diferenças significativas entre elas, conforme apresentada na Tabela 7. Outros dados clínicos foram analisados em relação aos indivíduos diagnosticados com câncer gástrico, como: localização, Lauren e estadiamento do tumor. Para localização apresentaram 20,7% corpo, 29,7% cardia, 30,7% antro, 10,4% fundo, 2% piloro e 6,7% das amostras sem informações. Em relação a Lauren os tumores apresentaram-se 37,5% intestinal, 54% difuso e 8,44% amostras sem informações. E sobre o estadiamento encontramos 10,8% estágio 1, 21,9% estágio 2, 18,9% estágio 3, 20,9% estágio 4 e 27,3% sem classificação de estadiamento.

Tabela 7 - Dados demográficos dos grupos de câncer gástrico (CG) e controle. Os dados categorizados são apresentados por números absolutos de indivíduos (porcentagem) e analisados pelo teste Qui-quadrado.

Características	Casos, n = 301	Controles, n = 145	<i>p</i> valor
Idade (média em anos)	49 (18-88)	41,5 (18-65)	0,198
≤ 40	143 (48,6%)	80 (55,1%)	
> 40	151 (51,4%)	65 (44,82%)	
Gênero			0,606
Masculino	173 (58,4%)	81 (55,8%)	
Feminino	123 (41,55%)	64 (44,1%)	
Localização do tumor			
Corpo	60 (20,7%)	NA	
Cardia	88 (29,7%)	NA	
Antro	91 (30,7%)	NA	
Fundo	31 (10,4%)	NA	
Piloro	6 (2%)	NA	
Ausência	20 (6,7%)	NA	
Lauren			
Intestinal	111 (37,5%)	NA	
Difuso	160 (54%)	NA	
Ausência	25 (8,44%)	NA	
Estadiamento do tumor			
Estádio 1	32 (10,8%)	NA	
Estádio 2	65 (21,9%)	NA	
Estádio 3	56 (18,9%)	NA	
Estádio 4	62 (20,9%)	NA	
Ausência	81 (27,3%)	NA	

Fonte: autores da pesquisa

* NA: não aplicável

Na distribuição de genótipos associados à suscetibilidade ao CG foi realizado a análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) nas amostras estudadas, de maneira que se pudesse controlar as variáveis que poderiam estar sofrendo influência de erros de genotipagem. Desta

forma, a análise de HWE demonstrou que quatro marcadores *MIRNA630* ($p=0,023$), *MIRNA3171* ($p=0,009$) e *MIRNA548AJ-2* ($p=0,000$) e *MIRNA302C* ($p=0,000$) estão em desequilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$), logo foram removidas da análise.

As frequências genóticas e alélicas dos grupos estudados estão descritas na tabela 8. A frequência genotípica dos genes *MIRNA4463* ($p= 0,02$), *MIRNA920* ($p = 0,01$) e *MIRNA3652* ($p= 0,00$) foram significativamente diferentes entre os casos-controles. Os genes *MIRNA516B-2* ($p=0,66$), *MIRNA548H-4* ($p=0,09$), *MIRNA4274* ($p=0,09$) e *MIRNA3945* ($p=0,055$) não apresentaram resultados significativos.

Tabela 8 - Frequência genotípica e alélica das 7 variantes do tipo INDEL investigados neste estudo com base na análise do teste Qui-quadrado. Dados apresentados em porcentagem de pacientes com CG/porcentagem de controles (dbSNP: Registro da variante genética no banco de dados NCBI).

Caso/controle (<i>n</i> = 301/145)								
Gene	dbSNP	Genotype frequency			<i>p</i> value	Allele frequency		HWE
		II	ID	DD		I	D	<i>p</i> value
<i>MIRNA630</i>	rs 139334001	89,7/92,4	9,0/7,6	1,3/0,0	0,440	94,8	5,16	0,023
<i>MIRNA516B-2</i>	rs 10670323	1,0/2,1	19,0/19,4	80/78,5	0,660	10,5	89,5	0,631
<i>MIRNA4463</i>	rs 5877455	28,6/41,6	49,8/43,1	21,5/15,3	0,023	56,5	43,4	0,558
<i>MIRNA3171</i>	rs 35170395	69,2/75	24/25	6,8/0	0,001	83,2	16,74	0,009
<i>MIRNA3945</i>	rs 145931056	80,3/88,8	18,4/9,8	1,4/1,4	0,055	90,8	9,15	0,239
<i>MIRNA548H-4</i>	rs 150141473	74,8/83,9	24,1/15,4	1,0/0,7	0,090	88,4	11,5	0,489
<i>MIRNA548AJ-2</i>	rs 145326096	67,2/75,9	9,6/7,6	23,2/16,6	0,166	74,5	25,4	0,000
<i>MIRNA302C</i>	rs 199971565	96,6/100	2/0,0	1,4/0,0	0,076	98,4	1,59	0,000
<i>MIRNA4274</i>	rs 202195689	90,9/85,2	8,4/14,8	0,7/0,0	0,092	94,2	5,7	0,642
<i>MIRNA920</i>	rs 66686007	91,5/82,1	8,2/16,6	0,3/1,4	0,015	93,8	6,15	0,217
<i>MIRNA3652</i>	rs 62747560	62,2/62,7	35,0/27,5	2,7/9,9	0,004	78,6	21,3	0,567

Fonte: autor da pesquisa.

Para a análise dos INDELS em relação a susceptibilidade (caso-controle) foi feita regressão logística com correção de Bon Ferroni. Esta análise apontou 3 variantes associadas com o risco aumentado para o CG (Alelo *del* do *MIRNA4463*, do *MIRNA3945* e do *MIRNA548H-4*) e 2 variantes associadas com o risco diminuído para o CG (Alelo *del* do *MIRNA920* e alelo *ins* do *MIRNA3652*) conforme a tabela 9.

Tabela 9 - Variantes alélicas nos miRNAs com associações significativas para a predisposição ao CG. Análises de regressão logística com correção de Bon Ferroni. Genótipos: *del/del* - homozigoto deleção, *del/ins* - heterozigoto e *ins/ins* - homozigoto inserção.

Gene	Modelo	OR (IC 95%)	Valor p
<i>MIRNA4463_rs5877455</i>	<i>ins/ins vs del/ins + del/del</i>	1,78 (1,16-2,71)	0,007
<i>MIRNA3945_rs145931056</i>	<i>ins/ins vs del/ins + del/del</i>	1,95 (1,08-3,53)	0,021
<i>MIRNA548H-4_rs150141473</i>	<i>ins/ins vs del/ins + del/del</i>	1,75 (1,05-2,95)	0,028
<i>MIRNA920_rs66686007</i>	<i>ins/ins vs del/ins + del/del</i>	0,43 (0,24-0,77)	0,004
<i>MIRNA3652_rs62747560</i>	<i>ins/ins + ins/del vs del/del</i>	0,26 (0,10-0,62)	0,002

Fonte: autor da pesquisa.

Além susceptibilidade, foi avaliado também as variantes clínicas dos pacientes investigados; sendo que ao avaliar o impacto genético das 7 variantes INDELS nas variantes clínicas categorizadas em Lauren (difuso ou intestinal), tipo (cardia e não cardia) e diagnóstico (precoce e tardio) encontrou-se associação significativa apenas na variante *MIRNA4463* conforme demonstrado na tabela 10.

Não houve correlação dos demais variantes com as características clínicas, assim como nenhuma variante teve associação significativa com o estadiamento tumoral.

Tabela 10 - Associações significativas de inserções e deleções na análise do INDEL *MIRNA4463* quanto ao prognóstico no CG. Genótipos: *del/del* - homozigoto deleção, *del/ins* - heterozigoto e *ins/ins* - homozigoto inserção.

Gene	Modelo	Categorização	OR (IC 95%)	Valor p
<i>MIRNA4463_rs5877455</i>	<i>ins / ins vs del / ins + del / del</i>	Lauren (Difuso ou Intestinal)	2,30 (1,27-4,18)	0,004
<i>MIRNA4463_rs5877455</i>	<i>ins / ins vs del / ins + del / del</i>	Tipo (Cardia e não-cardia)	2,20 (1,26-3,84)	0,005
<i>MIRNA4463_rs5877455</i>	<i>ins / ins vs del / ins + del / del</i>	Diagnóstico precoce ou tardio	2,80 (1,64-4,80)	0,000

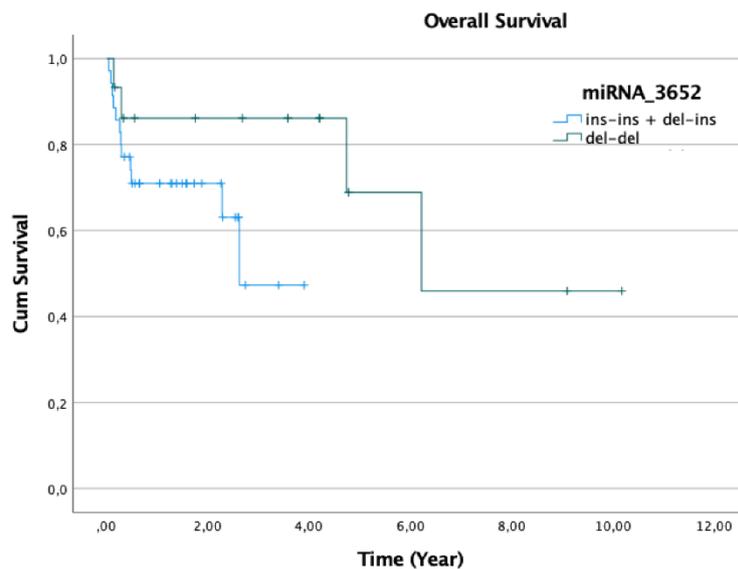
Fonte: autor da pesquisa.

Quanto ao tipo de adenocarcinoma gástrico, foi observado associações significativas do alelo *del* do gene *MIRNA4463* com o risco aumentado para a incidência do adenocarcinoma gástrico do tipo Lauren difuso (OR= 2,30, $p=0,004$). Ao categorizar os tumores em relação ao

tipo (cardia e não-cardia), as análises apontaram uma associação significativa do alelo *del* do gene *MIRNA4463* com risco aumentado de desenvolver o tumor na região da “não-cardia” (OR=2,20, $p=0,005$). Quando se avaliou a distribuição alélica em relação diagnóstico precoce (menos de 40 anos) e tardio (mais de 40 anos) de CG, observou-se que o alelo *del* do *MIRNA4463* foi associado a uma maior incidência nos pacientes com diagnóstico precoce (OR=2,80, $p=0,000$).

Em relação a análise da curva de sobrevivência de CG e considerando 51 dados clínicos e de sobrevida dos pacientes com CG deste estudo, a análise dos INDELS apontou diferenças significativas para a variante *MIRNA3652* ($p=0,04$) conforme a Figura 13. Pois o alelo homozigoto *del/del* do *MIRNA3652* foi associado ao risco diminuído e com isso à uma sobrevida maior destes pacientes, conforme Gráfico 1.

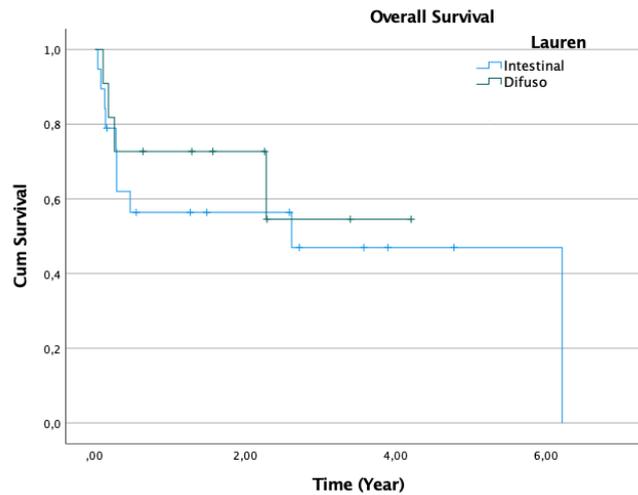
Gráfico 1 - Sobrevivência global de pacientes com CG associado significativamente ao genótipo *del/del* para o INDEL *MIRNA3652*. Wilcoxon $p = 0,03$ (HR = 3,46); Long-rank $p = 0,04$. As análises e gráficos foram realizados pelo pacote de sobrevivência, software SPSS.



Fonte: autor da pesquisa.

Em relação aos dados de sobrevivência associado ao CG tipo Lauren (difuso e intestinal), a curva de sobrevivência apontou diferença significativa com $p=0,01$, conforme o gráfico 2, na qual as amostras de câncer gástrico do tipo difuso apresentaram tempo de sobrevida menor do que as do tipo intestinal.

Gráfico 2 - Sobrevivência global de pacientes com CG tipo Lauren difuso. Wilcoxon $p = 0,04$; Long-rank $p = 0,01$. As análises e gráficos foram realizados pelo pacote de sobrevivência, software SPSS.

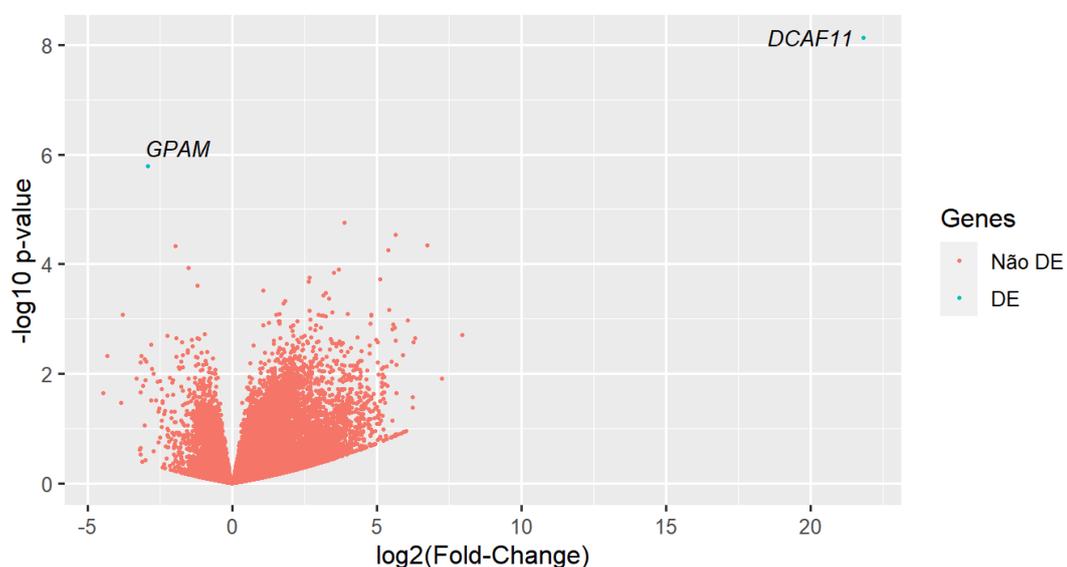


Fonte: autor da pesquisa.

Para a validação dos INDELs de *MIRNAs* pelo método RNA-seq realizamos a análise diferencial em 27 amostras de tecidos tumorais do grupo de CG deste estudo. Nesta análise avaliamos todos os transcritos diferencialmente expressos em amostras tumorais a partir da variante alterada em cada marcador de *MIRNA*.

Para o gene *MIRNA4463* a análise diferencial das 27 amostras tumorais associadas as variantes alteradas (*del/ins* e *del/del*), apontaram os transcritos *GPAM* e *DCAF11* diferencialmente expressos ($p < 0,05$) (gráfico 3).

Gráfico 3 - Volcano plot resumando transcritos diferencialmente expressos (DE) em amostras tumorais para o marcador *MIRNA4463*.



Fonte: autor da pesquisa.

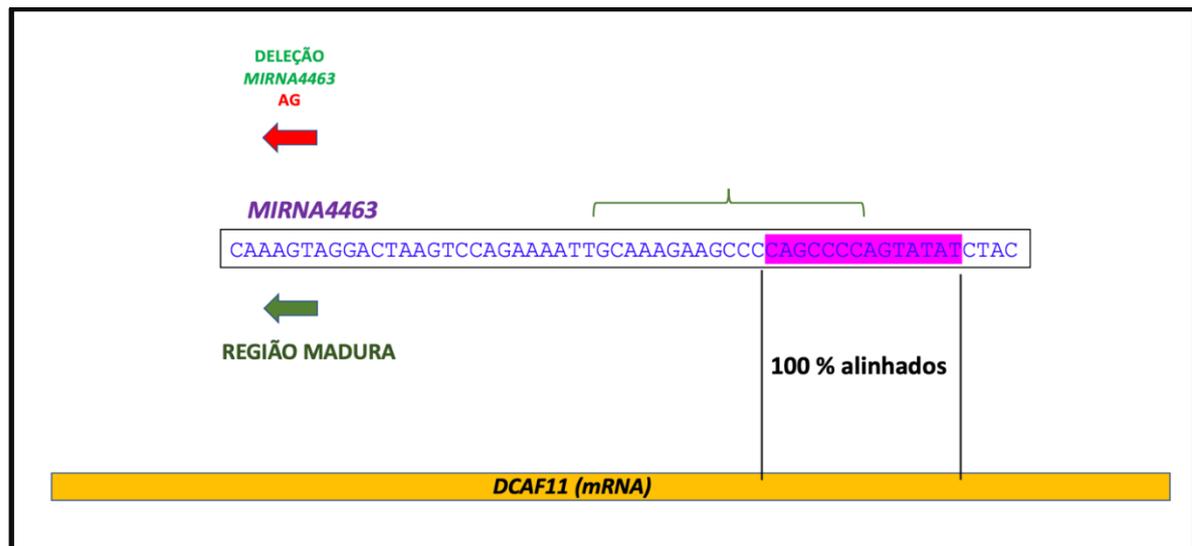
Dentre os diferencialmente expressos buscamos os genes alvos do *MIRNA4463* previstos usando o banco de dados TArgetScan, na qual indicou o alvo *DCAFF11* como um alvo potencial deste *MIRNA* (Agarwal et al., 2015). E ao realizarmos o alinhamento destes, observamos uma similaridade de 100% entre seqüências do *MIRNA4463* e o transcrito *DCAFF11* (Figura 15).

Figura 15 – Alinhamento de seqüências *MIRNA4463* (Query) e ao alvo biológico *DCAFF11* (Subject).

Score	Expect	Identities	Gaps
26.5 bits (28)	0,048	14/14 (100%)	0/14 (0%)
Query 356	CAGCCCCAGTATAT	369	
Sbjct 3568	CAGCCCCAGTATAT	3581	

Fonte: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

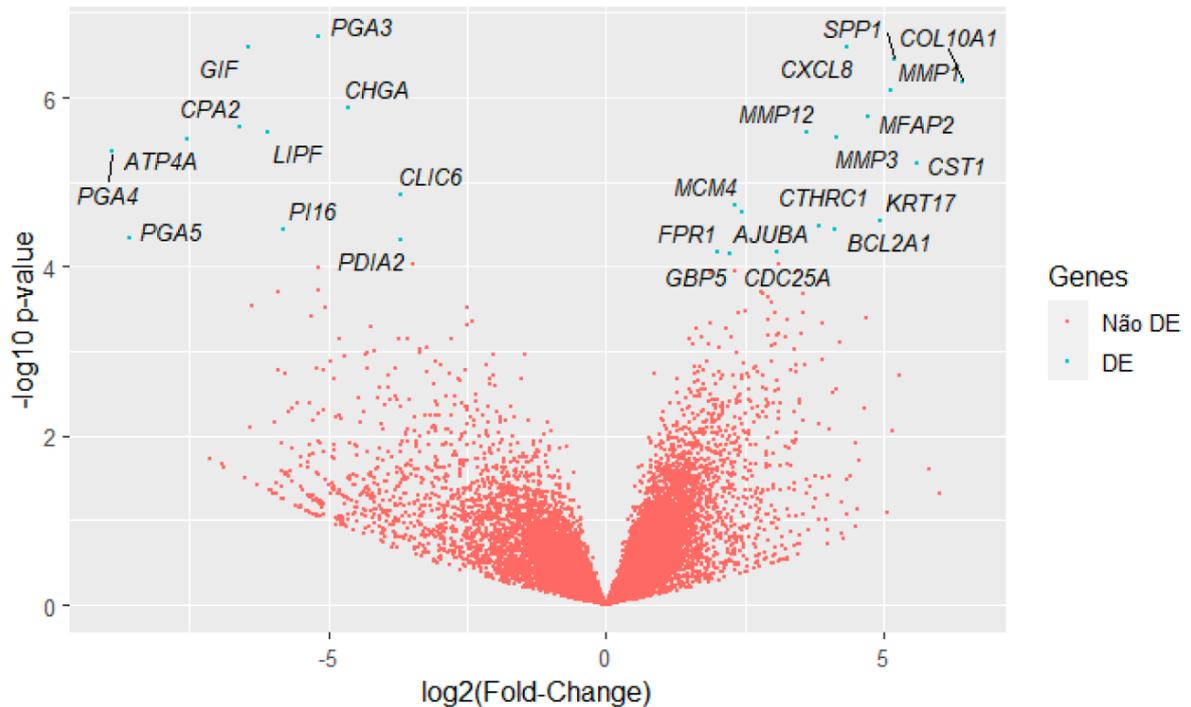
Figura 16 – Modelo do alinhamento de seqüências *MIRNA4463* e o alvo biológico *DCAFF11*.



Fonte: autor da pesquisa.

Para o marcador *MIRNA3171*, a análise diferencial das 27 amostras associadas as variantes alteradas (*del/ins* e *del/del*), identificaram 27 transcritos diferencialmente expressos ($p < 0,05$).

Gráfico 4 - Volcano plot resumando transcritos diferencialmente expressos (DE) em amostras tumorais para o marcador *MIRNA3171*.

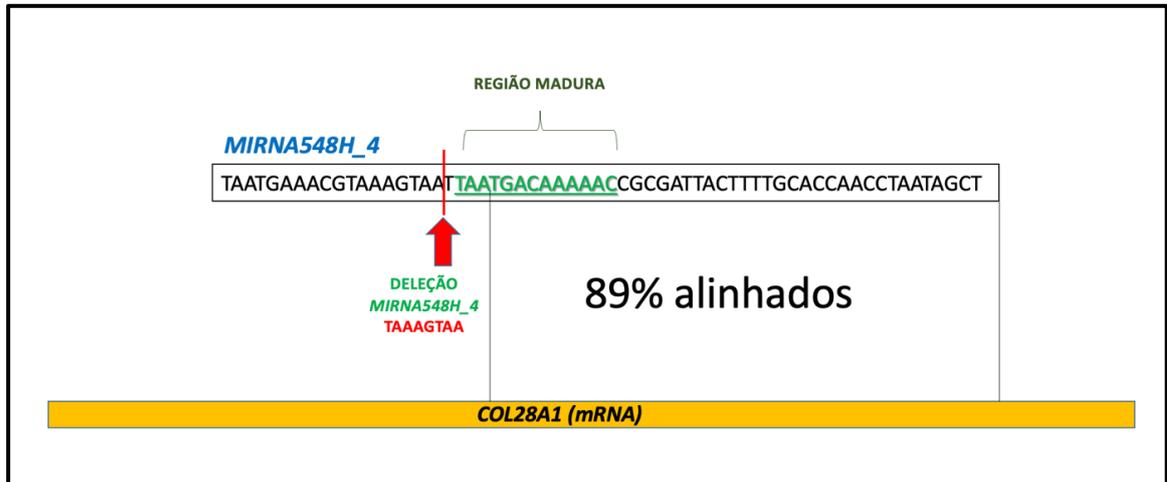


Fonte: autor da pesquisa.

Ao analisarmos esses mRNAs-alvos no site de previsão TargetScanHuman identificamos o *CTHRC1* como um potencial alvo para este marcador (Agarwal et al., 2015). Apesar do alvo previsto, o mesmo não apresentou nenhuma similaridade com a sequência gênica do *MIRNA3171*.

Para o marcador do gene *MIRNA548H-4*, a análise diferencial das 27 amostras tumorais associadas as variantes alteradas (*del/ins* e *del/del*), apontaram o transcrito *COL28A1* diferencialmente expressos ($p < 0,05$) (gráfico 5).

Figura 18 – Modelo do alinhamento de seqüências *MIRNA548H_4* e o alvo biológico *COL28A1*.

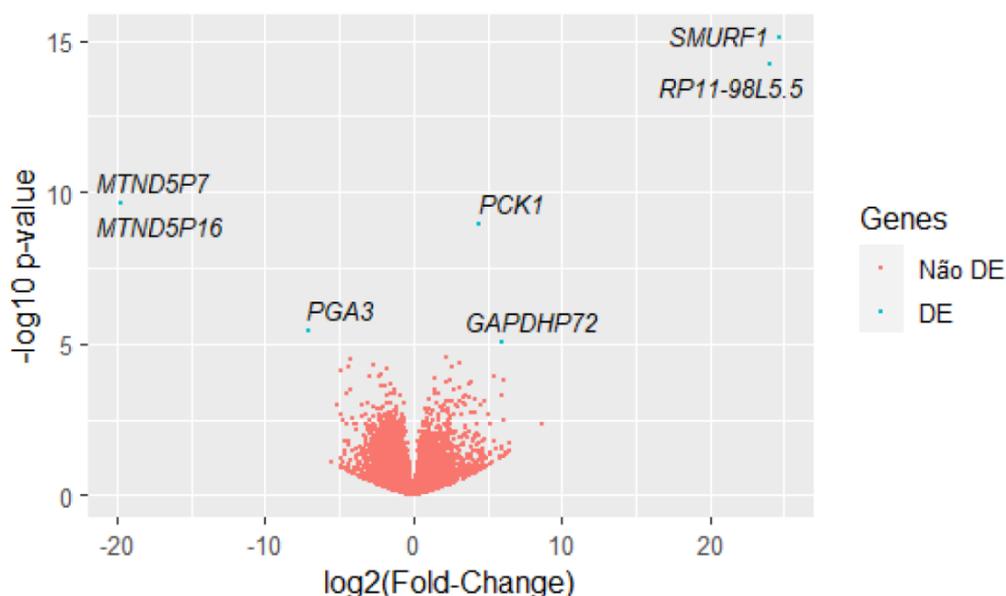


Fonte: autor da pesquisa.

Além desse alvo, o *MIRNA548H-4* apresentou alinhamento com o gene associado a via de proliferação celular do câncer: O *KRAS* (88% alinhados) (NCBI, 2022; Uprety; Adjeei, 2020; Yoon et al., 2019).

No gene *MIRNA516B-2* a análise diferencial das 27 amostras tumorais associadas às variantes alteradas (*dellins* e *ins/ins*), apontaram os transcritos *MTND5P7*, *MTND5P16*, *PGA3*, *GAPDHP72*, *PCK1*, *RP11-98L5.5* e *SMURF1* diferencialmente expressos ($p < 0,05$) (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Volcano plot resumando transcritos diferencialmente expressos (DE) em amostras tumorais para o marcador *MIRNA516B-2*.



Fonte: autor da pesquisa.

Dentre os diferencialmente expressos, a partir do banco de dados TargetScan, identificamos o transcrito *PGA3* e *SMURF1* como potenciais alvos para o *MIRNA516B-2* (Agarwal et al., 2015). E ao realizarmos o alinhamento destes, observamos uma similaridade de 86% do *MIRNA516B-2* e o transcrito *PGA3* (Figura 19)

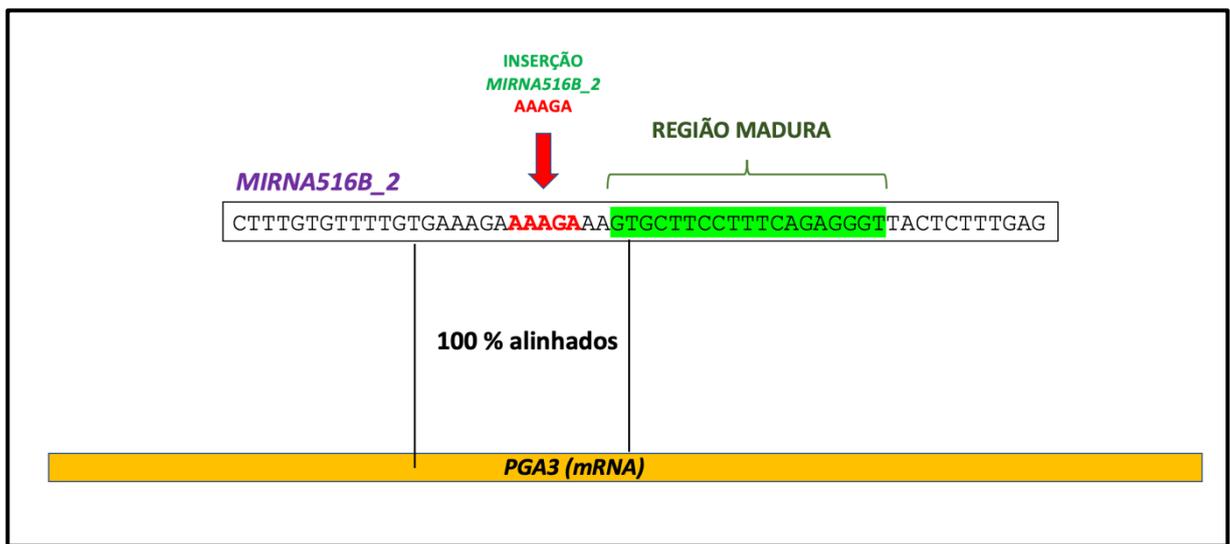
Figura 19 - Alinhamento de seqüências *MIRNA516B-2* (Query) e ao alvo biológico *PGA3* (Subject).

	Score	Expect	Identities	Gaps
	26.5 bits (28)	0,044	14/14 (100%)	0/14 (0%)
Query	200	GAAAGAAAAGAAAAG	213	
Sbjct	460	GAAAGAAAAGAAAAG	473	

Fonte: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

É importante destacar que no alinhamento entre a variante do *MIRNA516B-2* e o *PGA3* encontram-se localizados a inserção do *MIRNA* e parte da região madura (Figura 20).

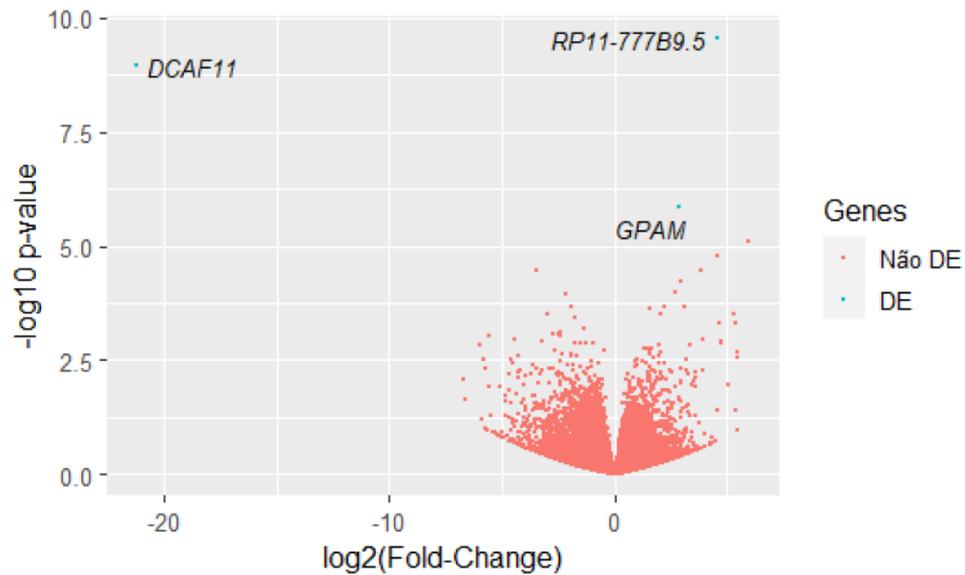
Figura 20 – Modelo do alinhamento de seqüências *MIRNA516B-2* e o alvo biológico *PGA3*.



Fonte: autor da pesquisa.

Também verificamos uma similaridade de 93% do *MIRNA516B-2* e o transcrito *SMURF1* (Figura 21).

Gráfico 7 - Volcano plot sumarizando transcritos diferencialmente expressos (DE) em amostras tumorais para o marcador *MIRNA548AJ-2*.



Fonte: autor da pesquisa.

Ao realizarmos o alinhamento deste, observamos uma similaridade de 91% de do *MIRNA548AJ-2* e o transcrito *GPAM* (Figura 23).

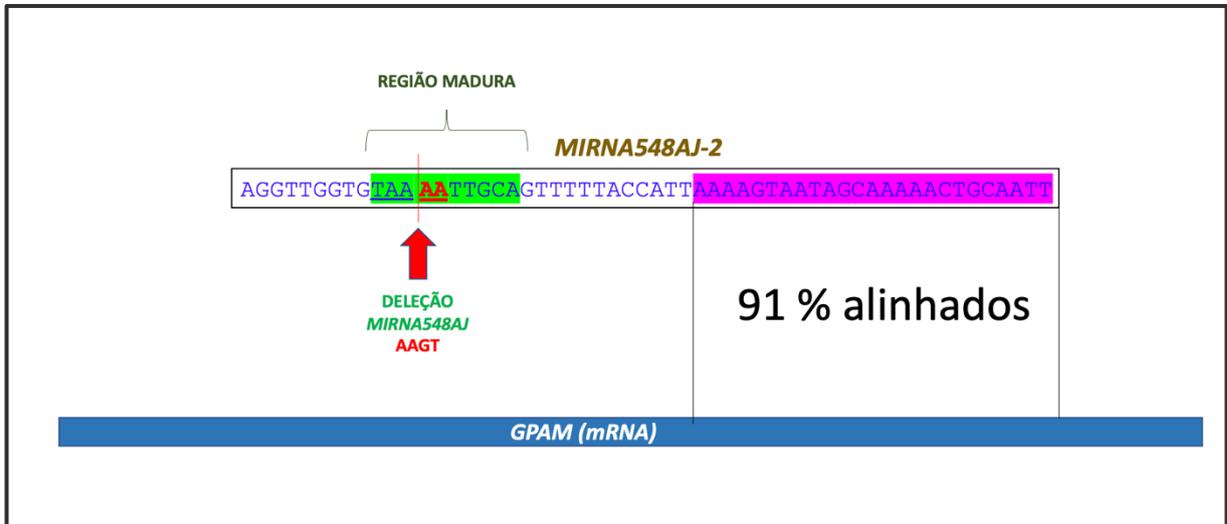
Figura 23 - Alinhamento de seqüências *MIRNA548AJ-2* (Query) e ao alvo biológico *GPAM* (Subject).

	Score	Expect	Identities	Gaps
	64.4 bits (70)	1e - 12	41/45 (91%)	0/45 (0%)
Query	220	AAAAGTAATAGCAAAAACCTGCAATTACTTTTGCACCAACCTAATA	264	
Sbjct	3702	AAAAGTAACAGCGAAAACCGGAATTACTTTTGCACCAACCTAATA	3746	

Fonte: Agarwal et al., 2015.

No modelo de alinhamento entre o *MIRNA548AJ-2* e o *GPAM*, observamos a localização da variante deleção na região madura e a região de alinhamento em destaque (Figura 24).

Figura 24 – Modelo do alinhamento de seqüências *MIRNA548AJ-2* e o alvo biológico *GPAM*.



Fonte: autor da pesquisa.

O transcriptoma não apontou genes diferentemente expressos associados com os marcadores *MIRNA920*, *MIRNA4274*, *MIRNA630* e *MIRNA3945*, porém quando associamos a transcritos envolvidos em vias importantes do CG, obtivemos os seguintes alinhamentos (tabela 11), os quais foram mencionados como potenciais alvos no site de previsão TargetScanHuman.

Tabela 11 – Genes associados e alinhados com as variantes INDEL de *MIRNAs*.

<i>MIRNAs</i>	<i>GENES alinhados</i>	Autor
<i>MIRNA920</i>	<i>KRAS</i> <i>BCL2</i>	Agarwal et al., 2015
<i>MIRNA4274</i>	<i>KRAS</i> <i>TNF</i>	
<i>MIRNA3171</i>	<i>TGFBR2</i>	
<i>MIRNA630</i>	<i>KRAS</i> <i>BCL2</i>	
<i>MIRNA3945</i>	<i>TGFBR2</i>	

Fonte: autor da pesquisa.

Em relação aos INDELs alterados em regiões específicas de alinhamentos SEED e madura dos marcadores (*MIRNA302c*, *MIRNA3945*, *MIRNA548AJ-2*, *MIRNA4274* E *MIRNA516B-2*), mais precisamente nas regiões específicas 3'-5'UTR dos miRNAs e nas regiões 5'-3'UTR dos mRNAs-alvos, identificou-se com exatidão os genes alvos regulados por estes marcadores a partir do banco de dados miRanda (Banco de dados que prevê alvos de

mRNA para miRNAs usando alinhamento de programação dinâmica e termodinâmica - <https://bioweb.pasteur.fr/packages/pack@miRanda@3.3a>). A análise computacional levou em consideração três parâmetros: a complementariedade da sequência usando um algoritmo de alinhamento, o nível de energia de interação entre as ligações miRNA-mRNA a partir de -30 kcal/Mol e uma pontuação (score) acima de 170.000.000, estes valores são considerados devido serem parâmetros significativos e necessários para previsão de locais de ligações de miRNAs de alta afinidade a um mRNA-alvo (Mathews et al. 2007; Stark et al., 2003).

A princípio a análise computacional identificou 118 mRNA-alvos dos miRNAs alterados nas regiões de leitura (SEED e madura), sendo 43 mRNA-alvos associados a diversos tipos de câncer, e desses, 20 alvos associados ao câncer gástrico, e finalmente, 16 mRNA-alvos alinhados com o miRNA302c, 2 mRNA-alvos alinhados com o miRNA548aj-2 e 2 mRNA-alvos alinhados com o miRNA516b-2 (Tabela 12). O miRNA3945 e miRNA4274 não apresentaram alinhamentos com nenhum mRNA-alvo conforme o banco de dados MiRanda.

Tabela 12 – Alinhamentos, interação dinâmicas e termodinâmicas entre moléculas de miRNAs e os mRNA-alvos.

Interação miRNA-mRNA-alvo	INDEL	Região	mRNA-alvo	Score x 10 ⁶	Energia kcal/Mol	Alinhamento 3'-5'	Função Biológica associadas ao câncer gástrico	Referências
Forward: Score: 174.000000 Q:2 to 20 Query: 3' attcagAAGGT-ACAAGTCACC 5' Ref: 5' aatttGCTTTAAGTGTTCAGTGT 3' Energy: -20.809999 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	174	-20.81	89.47%	Proliferação de células.	Goh et al., 2015
Forward: Score: 172.000000 Q:2 to 17 Query: 3' attcacAAGTACAAGTCACC 5' Ref: 5' ggtagTCTGTGTTTCAGTGA 3' Energy: -20.820000 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	172	-20.02	100.00%	Metabolismo de glicose e lipídios associado ao prognóstico.	Yang et al., 2022
Forward: Score: 189.000000 Q:2 to 22 Query: 3' attCAGAGGTACAAGTCACC 5' Ref: 5' gtGGAGCTTCATGTTTCAGTGT 3' Energy: -28.219999 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	189	-28.22	95.00%	Altos níveis associados a uma boa sobrevida global.	Wu et al., 2020
Forward: Score: 172.000000 Q:2 to 19 Query: 3' attcaCG-AGGTACA-AMGTCACC 5' Ref: 5' taagaGATTCATGATTTTCAGTGT 3' Energy: -28.480000 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	172	-28.48	89.47%	Hiperexpressão associada a prognóstico ruim (proliferação e invasão de células).	Hashimoto et al., 2019
Forward: Score: 171.000000 Q:2 to 22 Query: 3' attCAGAGGTACAAGTCACC 5' Ref: 5' ctAG-GTTTTCTGTTCAGTGT 3' Energy: -21.170000 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	171	-21.17	90.00%	Proliferação e migração de células.	Ma et al., 2021
Forward: Score: 173.000000 Q:2 to 19 Query: 3' attcaGAGGT-ACAAGTCACC 5' Ref: 5' acaccGTTGAGTGTTCAGTGT 3' Energy: -26.580000 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	173	-26.58	88.89%	Proliferação, invasão e migração favorecendo a tumorigênese com associação ao <i>H.pylori</i>	Zhang et al., 2019
Forward: Score: 172.000000 Q:2 to 17 Query: 3' attcacAAGTACAAGTCACC 5' Ref: 5' tgtaccATTCATGTTTCAGTGT 3' Energy: -19.250000 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	172	-19.25	93.33%	Hipoxexpressão associada a progressão do tumor e ao prognóstico.	Cui et al., 2010
Forward: Score: 176.000000 Q:2 to 22 Query: 3' attCAGAGGTACA-AMGTCACC 5' Ref: 5' taGATTTTCATGTTTCAGTGT 3' Energy: -25.809999 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	176	-25.8	85.71%	A hiperexpressão promovendo a proliferação, migração e invasão de células no tumor.	Li et al., 2022
Forward: Score: 173.000000 Q:2 to 18 Query: 3' attcacAAGTACAAGTCACC 5' Ref: 5' ctatcaGTTTCATGTTTCAGTGT 3' Energy: -21.080000 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	173	-21.08	93.75%	Promove migração e invasão de células.	Xu et al., 2021
Forward: Score: 172.000000 Q:2 to 17 Query: 3' attcacpAAGTACAAGTCACC 5' Ref: 5' ctcccttaTTCATATTCAGTGT 3' Energy: -23.260000 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	172	-23.26	93.33%	Promoção do CG.	Zhang et al., 2020
Forward: Score: 174.000000 Q:2 to 22 Query: 3' attCAGAGGTACAAGTCACC 5' Ref: 5' gTATTGCTTC-TGTTTCAGTGT 3' Energy: -21.010000 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	174	-21.01	85.00%	Mutação driver.	Wang et al., 2014
Forward: Score: 170.000000 Q:2 to 21 Query: 3' attCAC-GAA-GGTACAAGTCACC 5' Ref: 5' taGTCAGCTTCATGTTTCAGTGT 3' Energy: -21.490000 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	170	-21.49	81,82%	Regula apoptose em células do câncer.	Wang et al., 2018
Forward: Score: 173.000000 Q:2 to 22 Query: 3' attCAGAGGTACAAGTCACC 5' Ref: 5' ttATTGCTTTATGTTTCAGTGT 3' Energy: -22.180000 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	173	-22.12	85.00%	Oncogene que atua na proliferação de células via AKT	Guo et al., 2017
Forward: Score: 171.000000 Q:2 to 22 Query: 3' attCAGAGGTACAAGTCACC 5' Ref: 5' ccACTG-TTCTATTTTCAGTGA 3' Energy: -16.000000 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	171	-16	85,00%	Variante associada ao TP53 e ao C. gástrico	Xu et al., 2020
Forward: Score: 179.000000 Q:2 to 20 Query: 3' attcAGAGGTACAAGTCACC 5' Ref: 5' gtctGCTCTCTGATTCAGTGT 3' Energy: -27.800000 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	179	-27.08	88,89%	Biomarcador associado a baixa sobrevida.	Leong et al., 2017
Forward: Score: 177.000000 Q:2 to 22 Query: 3' attCAGAGGTACAAGTCACC 5' Ref: 5' atGGGTATCTTTGTTTCAGTGA 3' Energy: -22.290001 kcal/Mol			<i>MIRNA302c</i>	177	-22.29	90.00%	Susceptibilidade ao c. gástrico.	Duan et al., 2019
Forward: Score: 171.000000 Q:2 to 16 Query: 3' atTTTTCAGCTTAAAAA 5' Ref: 5' taAAAGTGCATTTA 3' Energy: -18.770000 kcal/Mol		<i>MIRNA548AJ-2</i> Madura	<i>GSTO2</i>	171	-18.77	100%	Associação ao <i>H. pylori</i> e ao CG.	Wang et al., 2021
Forward: Score: 175.000000 Q:2 to 16 Query: 3' atTTTTCAGCTTAAAAA 5' Ref: 5' atAAAGTGCATTTA 3' Energy: -17.660000 kcal/Mol		<i>MIRNA548AJ-2</i> Madura	<i>HOXA3</i>	175	-17.66	100,00%	Proliferação de células.	Lu et al., 2020
Forward: Score: 179.000000 Q:2 to 21 Query: 3' tagACC-TCATTCTCGTGAa 5' Ref: 5' gtCTCGAGGTGATGACACTT 3' Energy: -29.790001 kcal/Mol		<i>MIRNA516B-2</i> Madura	<i>MDM2</i>	179	-29.79	90.00%	Amplificação deste marcador associado a progressão do C.G. e tbm com Epstein-Barr.	Dayyani et al., 2021
Forward: Score: 174.000000 Q:2 to 19 Query: 3' tagaCCTCATTCTCGTGAa 5' Ref: 5' ggaGAAAGTAAAGCACTT 3' Energy: -21.799999 kcal/Mol		<i>MIRNA516B-2</i> Madura	<i>BCL6B</i>	173	-21.08	88.24%	Supressor tumoral no câncer gástrico e associação a baixa sobrevivência.	Xu et al., 2012

Fonte: autor da pesquisa.

A partir dos resultados obtidos pela técnica de RNA-seq nas análises de tecidos de CG e tecidos adjacentes (Banco de dados do NPO), analisamos os níveis de expressão desses mRNA-alvos alinhados com os miRNAs que apresentaram INDELS alterados na região SEED e madura (Tabela 13).

Tabela 13 – Níveis de expressão dos mRNA-alvos no Banco de transcriptoma/NPO

INDEL	Região	mRNA-alvo	Alinhamento 3'UTR	Tecido CG	<i>p</i> valor (<i>p</i> <0,05)
<i>MIRNA302c</i>	Seed	<i>DLAT</i>	89,47%	Hiperexpresso	<i>p</i> = 0,01
<i>MIRNA302c</i>	Seed	<i>PGM2L1</i>	100,00%	Hiperexpresso	<i>p</i> = 0,03
<i>MIRNA302c</i>	Seed	<i>PRKCI</i>	89,47%	Hiperexpresso	<i>p</i> = 0,04
<i>MIRNA302c</i>	Seed	<i>ZBTB20</i>	88,89%	Hipoexpresso	<i>p</i> = 0,02
<i>MIRNA302c</i>	Seed	<i>ABII</i>	93,33%	Hiperexpresso	<i>p</i> = 0,00
<i>MIRNA302c</i>	Seed	<i>RAB14</i>	85,00%	Hiperexpresso	<i>p</i> = 0,04
<i>MIRNA302c</i>	Seed	<i>PKHD1</i>	85,00%	Hipoexpresso	<i>p</i> = 0,00
<i>MIRNA302c</i>	Seed	<i>ACYP2</i>	90,00%	Hipoexpresso	<i>p</i> = 0,00
<i>MIRNA548AJ-2</i>	Madura	<i>HOXA3</i>	100,00%	Hiperexpresso	<i>p</i> = 0,01
<i>MIRNA516B-2</i>	Madura	<i>MDM2</i>	90,00%	Hiperexpresso	<i>p</i> = 0,00

Fonte: autor da pesquisa.

Na Tabela 13 verificamos a interação dos INDELS alterados e seus respectivos mRNA-alvos, apontando níveis de expressões que influenciam vias importantes do CG, porém devemos considerar que a epigenética não ocorre somente com a ação de um único miRNA, é importante entendermos que podem ocorrer em conjunto processos epigenéticos como ação de outros RNAs não codificantes, metilações do DNA e modificações a nível de histonas (Oliveira et al., 2016).

5. DISCUSSÃO

O estudo de variantes em miRNAs é de grande importância para entendermos vias importantes que acometem o câncer gástrico, pois diversas alterações genômicas ocorrem em regiões específicas do gene que podem atuar na modificação da funcionalidade e na biogênese de uma molécula a ser codificada como um miRNA, logo é relevante avaliar variantes em genes de pacientes portadores de CG da região Norte, região esta que apresentou uma alta incidência de novos casos em comparação com as taxas gerais no Brasil e no mundo (Bhattacharya; Ziebarth; Cui, 2012; Cavalcante et al., 2020; Chen; Guo, 2020; INCA, 2020).

Neste estudo caso-controle analisamos um painel de 11 INDELs (*hsa-mir-302c*, *hsa-mir-548AJ-2*, *hsa-mir-4274*, *hsa-mir-630*, *hsa-mir-516B-2*, *hsa-mir-4463*, *hsa-mir-3945*, *hsa-mir-548H-4*, *hsa-mir-920*, *hsa-mir-3171* e *hsa-mir-3652*) em 446 amostras, sendo 301 pacientes portadores de CG e 145 indivíduos do grupo controle todos eles oriundos de populações miscigenadas da Amazônia brasileira. É importante destacar que pouco estudos foram desenvolvidos em estas 11 variantes INDELs no trabalho relacionadas ao CG. Neste trabalho, encontramos associação significativas em cinco variantes do tipo INDEL: *hsa-mir-3945_rs145931056*, *hsa-mir-548H_4_rs150141473*, *hsa-mir-920_rs66686007*, *hsa-mir-3652_rs62747560* e *hsa-mir-4463_rs5877455*.

A validação desses marcadores do tipo INDEL foi realizada através da análise dos transcritos diferencialmente expressos e através da busca do alinhamento desses *MIRNAs* com seus respectivos RNA-alvos, pois apesar do grau de complementariedade ser um parâmetro complexo e muito importante, o perfeito pareamento não é obrigatoriamente o único fator determinante para o funcionamento do complexo miRISC, porque miRNAs com alinhamentos imperfeitos também podem levar à clivagem do RNA-alvo, além de que novos mecanismos estão sendo mais detalhados como a ação destes miRNAs não somente no silenciamento transcricional, mas como promotor da transcrição e ainda como indutor na eficiência da tradução (Pereira, 2015).

Com um INDEL de 12 pares de bases, o *MIRNA3945* está localizado no cromossomo 4 e na região madura do gene. Encontramos associação significativa do alelo alterado *del* do *hsa-mir-3945* com o risco aumentado para o desenvolvimento do CG ao fazer análise em relação a susceptibilidade. Apesar deste miRNA não estar descrito na literatura associado ao CG, o banco de dados miRDB (Banco de dados para alvos funcionais de miRNA) apontou o *hsa-mir-3945* como alvo de proteínas da família Rab, sendo esta considerada como um potencial indicador

de metástase e prognóstico para o carcinoma de pulmão (Koh; Song, 2019); Além disso o *hsa-mir-3945* é alvo também da família da proteína receptora TNF que atua no processo de proliferação celular e de tumorigênese (Guo et al., 2020; Liu; Wang, 2019).

O gene *TNF* codifica uma citocina pró-inflamatória pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral, este gene está envolvido em vários processos biológicos como proliferação celular, metabolismo lipídico, coagulação, diferenciação e apoptose, funções biológicas associadas a diversas doenças entre elas, o câncer (NCBI, 2022).

É importante destacar, que o *MIRNA3945* apresentou similaridade de sequências quando alinhado com o RNA-alvo *TGFBR2* (88% Alinhados) (Tabela 13). O *TGFBR2* é um gene codificador de uma proteína transmembrana que tem um domínio de proteína quinase compondo um complexo heterodimérico com o receptor Tgf- β 1 e se liga ao Tgf- β . A fosforilação das proteínas entra no núcleo e regulam a transcrição de genes relacionados à proliferação celular, parada do ciclo celular, cicatrização de feridas, imunossupressão e tumorigênese (NCBI, 2022). A inflamação, na verdade, pode ser um mecanismo chave na patogenicidade de algumas doenças como artrite reumatóide, doença de Crohn e aterosclerose, bem como câncer de fígado, estômago e cólon (Onizawa M, et al, 2009).

Nas análises do RNA-seq, o *MIRNA516B-2* apresentou dois RNAs-alvo diferenciadamente expressos nos tumores de CG: o *PGA3* (hipoexpresso) e o *SMURF1* (hiperexpresso) (Figura 19). Quando alinhados com uso da ferramenta BLAST estes RNAs-alvos *PGA3* e *SMURF1* apresentaram pareamento de 100% e 93% respectivamente como o *MIRNA516B-2*. O transcrito *PGA3* aparece diferencialmente hipoexpresso nos pacientes de acordo com o gráfico Volcano plot (Figura 19). Este transcrito *PGA3* traduz um gene que codifica um precursor proteico da enzima digestiva pepsina, um membro da família peptidase, em seguida o precursor codificado é secretado pelas células principais gástricas e em condições ácidas forma a enzima ativa, que funciona na digestão de proteínas alimentares. Este gene traduzido é encontrado em um conjunto de genes relacionados no cromossomo 11, cada um dos quais codifica um dos vários pepsinogênicos. Os níveis de pepsinogen no soro podem servir como biomarcador para gastrite atrófica e câncer gástrico (NCBI, 2022). Logo, nossos dados associam este miRNA ao risco diminuído quando a variante INDEL na região do alinhamento e pode estar favorecendo o pareamento perfeito (100%) do *MIRNA516b-2* para com o mRNA-alvo *PGA3* (Figura 21) e contribuindo para a maquinaria miRISC, isto é, o silenciamento deste transcrito, o qual apresenta-se nas análises de transcriptoma hipoexpresso (Figura19).

Além desse transcrito, as análises do transcriptoma apresentaram o transcrito *SMURF1* diferencialmente hiperexpresso para os alelos alterados do *MIRNA516B-2*, na qual apresentou um pareamento incompleto (93%) entre miRNA e mRNA-alvo (Figura 23). O *SMURF1* atua como um fator oncogênico em neoplasias humanas, na qual a hiperexpressão deste gene está associado ao tamanho do tumor, a linfonodos e metástases distantes, um estadiamento avançado do tumor (TNM) e a uma diminuição significativa da sobrevida. Além disso o *SMURF1* atua em vias importantes como a via PI3K/Akt e seus alvos adjacentes, incluindo c-Myc e Zeb1. O nocaute do *SMURF1* inibiu significativamente a proliferação, a migração e a invasão celular, logo inibiu o crescimento tumoral e a metástase de CG. Logo, a literatura menciona o *SMURF1* como um potencial biomarcador clínico para o tratamento do CG (Tao et al., 2017). Uma possível interpretação dos nossos resultados em relação a hiperexpressão do transcrito *SMURF1* é que o pareamento imperfeito (93%) (Figura 23) não foi suficiente para o miRNA516b-2 silenciar o RNA-alvo *SMURF1*, logo este apresenta-se hiperexpresso nos tecidos tumorais de CG conforme nossos dados do RNA-seq mencionaram o transcrito.

A variante tipo INDEL *MIRNA3171* é caracterizada por um INDEL de 2 pares de bases, a qual está localizado na região do pré-miRNA do gene. As análises de RNA-seq identificaram como diferencialmente expresso o transcrito *CTHRC1*, na qual o banco de dados TargetsScanHuman associou o mesmo como um alvo potencial para o *MIRNA3171*. O *CTHRC1* quando expresso está associado a processos de remodelação de tecidos e à carcinogênese e metástases em tumores de CG, além de que a superexpressão deste gene em tecidos tumorais está associada a um mau prognóstico de CG (Ding et al., 2020; Zhao et al., 2022). Vários estudos mencionam o *CTHRC1* como um eficiente biomarcador de prognóstico para previsão de recorrência ou metástase tumoral (Mei et al., 2020; Guo et al., 2014). Além desse alvo, ao alinharmos o *MIRNA3171* com vias importantes e que influenciam no CG citadas no site de predição de alvos para miRNAs TArgetScanHuman, verificamos associação e alinhamento com os genes *TGFBR2* (77% alinhados), gene este envolvido na proliferação e ciclo celular do câncer (Agarwal et al., 2015; Onizawa M, et al.,2009). Logo a nossa interpretação é que o alelo alterado del esteja causando um erro de leitura do miRNA3171 para com os mRNA-alvos, e impedindo a ação do complexo de silenciamento, o que favorecerá a superexpressão dos genes *CTHRC1* e *TGFBR2* no CG.

A variante *MIRNA548AJ-2* está localizada no cromossomo X e na região madura do gene da classe dos miRNAs. Em relação as análises moleculares do INDEL, este marcador não apresentou um *p* significativo quanto a susceptibilidade e aos dados clínicos ($p < 0,05$), porém

quando associamos os marcadores alterados (*del/del + del/ins*) ao transcriptoma do CG, identificamos transcritos diferencialmente expressos no transcriptoma, como: O *DCAF11*, o *GPAM* e o *RP11-777B9.5*. O banco de dados de miRNA TargetScanHuman identificou somente o transcrito *GPAM* como potencial alvo do *MIRNA548AJ-2* (Agarwal et al., 2015). O *GPAM* é um gene que atua na migração celular e que se apresenta hiperexpresso em diferentes tipos de câncer, além de estar associado uma redução da sobrevida global em casos de câncer de ovário (Marchan et al., 2017).

Quando alinhados, este *MIRNA548AJ-2* e o RNA-alvo *GPAM* apresentaram-se com um alinhamento incompleto (91% alinhados) (Figura 27). Logo, a nossa interpretação é que a localização da variante deleção na região madura poderá ocasionar um erro de leitura do complexo miRISC *MIRNA548AJ-2* e o mRNA *GPAM*, o que favorecerá a expressão deste transcrito, esta interpretação corrobora com o dado obtido da análise do transcriptoma apresentando o transcrito *GPAM* hiperexpresso nas amostras de tumor gástrico (Figura 25).

Além disso, o site de predição de alvos para o *MIRNA548AJ-2* resalta como mRNAs-alvos o gene *KRAS* e o *MYC* (Agarwal et al., 2015). Estes dois transcritos apresentaram alinhamentos 91% e 100% de alinhamentos respectivamente, sendo ambos apresentaram alinhamentos na região madura do gene e de localização da variante deleção.

O *MYC* é um oncogene envolvido nos mais diferentes tipos de câncer, no câncer gástrico a desregulação dele é fundamental para o processo de tumorigênese no tecido gástrico a partir da associação à proliferação celular, sobrevivência e resistência a medicamentos. O papel exato dos miRNAs e o *MYC* é desconhecido, porém muitos estudos buscam esclarecer esse papel e identificar o potencial da via do *MYC*, pois trata-se de um potencial alvo a ser utilizado na clínica médica como biomarcador e também como alvo para desenvolvimento de terapias promissoras (Anauate et al., 2020).

O *KRAS* é um oncogene que codifica a proteína kras que atua em vias importantes de proliferação celular e angiogênese, sendo que no adenocarcinoma gástrico a ativação do *KRAS* estimula a transição epitélio mesenquimal (EMT) a qual favorece o processo metastático (NCBI, 1988; Uprety; Adjei, 2020; Yoon et al., 2019).

Logo, a associação e o alinhamento dos genes *MYC* e *KRAS* com a variante *miRNA548AJ-2* faz deste marcador um potencial alvo de estudo, pois ele pode estar desregulando duas vias de grande complexidade e importância para o desenvolvimento do CG.

Em relação ao alinhamento 3'e 5'UTRs do miRNA548aj-2 alterado com mRNA-alvos nas análises de RNA-seq, verificamos complementariedade de 100% com o mRNA hiperexpresso *HOXA3*, um supressor tumoral atuante em vias importantes e favorece a proliferação do CG (Lu et al, 2020) (tabela 13).

O INDEL *MIRNA302C* localiza-se no cromossomo 4, sendo que a variante se encontra localizada na região de leitura (SEED) do gene da classe dos miRNAs. Nossos resultados não apresentaram significância para este marcador, contudo ao analisarmos o alinhamento 3'UTR do miRNA302c e 5'UTR dos mRNA identificamos potenciais alvos deste marcador atuando em diversas funções biológicas que favoreceriam a progressão do CG (Tabela 12). Ao investigamos a expressão desses potenciais alvos associados ao CG nas análises de RNA-seq verificamos que o miRNA302c alterado alinhou-se aos alvos (*DLAT*, *PRKCI*, *ABI1* e *RAB14*), os quais estão hiperexpressos e associados significativamente a vias de proliferação e invasão celular do CG (Goh et al., 2015; Hashimoto et al., 2019; Cui et al., 2010; Guo et al., 2017), além desses o miRNA302c alinhou-se ao mRNA-alvo *ZBTB20*, um supressor tumoral que apresentou a hipoeexpressão associada a regulação da tumorigênese do CG e associação ao *H. pylori* (Zhang et al., 2019) (tabela 13). Este marcador apresentou dados relevantes de interação com alvos associados ao CG, o que faz dessa variante um forte candidato a marcador de risco a câncer gástrico.

No biomarcador *MIRNA4274*, nossas análises moleculares não apresentaram valor estatístico significativo para avaliarmos este miRNA, porém apesar deste resultado, o biomarcador alinhou-se com os transcritos importantes como o *KRAS* e o *TNF* (Agarwal et al., 2015).

A variante de INDEL *MIRNA630* não apresentou significância na análise de susceptibilidade para o CG, e os dados do transcriptoma não apresentaram genes diferencialmente expressos, porém dois genes importantes e que atuam em vias do CG alinharam-se com este *MIRNA*, contudo mais estudos são necessários para avaliarmos o potencial deste marcador (Agarwal et al., 2015).

Na variante *MIR548h-4*, em relação a susceptibilidade, encontramos associação significativa do alelo alterado *del* do *MIRNA548h-4* com o risco aumentado para desenvolver CG (Tabela 4). Este INDEL tem sido mencionado em vários estudos importantes como, o estudo da expressão anormal do miRNA548h-4 e a interação como o *KRAS* em pacientes com osteossarcoma, na qual a análise correlacionou negativamente a expressão do miRNA548h-4

com a expressão do *KRAS*, gene atuante no processo de tumorigênese e de metástase de diversos tipos de câncer, sendo que, no adenocarcinoma gástrico a ativação do *KRAS* estimula a transição epitélio mesenquimal (EMT) e a geração de células-troncos cancerígenas, promovendo assim metástases. Além disso ocorreu alinhamento do *MIRNA548h-4* com o transcrito *KRAS* o que favorece a hipótese de que haja uma possibilidade da perda de função do RNA-alvo em decorrência do complexo miRISC. Estudos mencionam a hipoexpressão deste miRNA revertendo os efeitos do silenciamento do *KRAS*, e com isso, estimulando o crescimento e a migração metastáticas (Chen et al., 2019b). Logo nosso estudo contribui com a interpretação de que o alelo alterado *del* possa atuar na perda de função do miRNA548h-4 em pacientes com CG e conseqüentemente reverter os efeitos do silenciamento do *KRAS*, o qual estimula o crescimento celular e o processo metastático do câncer (Chen et al., 2019b; NCBI, 1988; Yoon et al., 2019).

Na validação do transcriptoma, o transcrito *COL28A1* apresentou-se diferencialmente expresso quando associado a variante *del* do *MIRNA548h-4* (Figura 18). Segundo Agarwal et al. (2015) este *MIRNA* está associado ao gene *COL28A1*, induzindo uma possível interpretação de que o alelo alterado *del* esteja contribuindo para a perda de função do miRNA548h-4, e possivelmente favorecendo a hiperexpressão do *COL28A1* já que o mesmo não está sendo silenciado. O gene *COL28A1* está associado a resistência ao tratamento imunoterápico e associado ao prognóstico de pacientes oncológicos (Chen et al., 2019a; Yang et al, 2019).

Nossos dados demonstram uma associação significativa do alelo alterado *del* do *MIRNA3652* ao risco diminuído para o desenvolvimento de CG (Tabela 4). A literatura aponta o miRNA3652 desempenhando papel importante na regulação da expressão de alguns membros da família *BCL2*. Alguns estudos apontam a Bcl-2 atuando como uma proteína antiapoptótica reguladora da fisiologia mitocondrial, e quando desregulada torna as células do câncer insensíveis aos medicamentos antineoplásicos indutores de apoptose (Singh; Saini, 2012), codificando uma proteína integral da membrana mitocondrial externa que bloqueia a morte apoptótica de algumas células, sendo que o bloqueio desta via favorece o processo neoplásico. Além disso a expressão do *BCL2* está correlacionada ao tratamento radioterápico de alguns cânceres (Chrysovergis et al., 2019; NCBI, 2022; Siddiqui; Ahad; Ahsan, 2015). Apesar das informações não serem suficientes para qualquer conclusão, uma possível interpretação dos dados deste INDEL é a de que o alelo alterado *del* no *MIRNA3652* possa estar atuando negativamente na expressão de genes como o *BCL2* e com isso, contribuindo para o risco diminuído de CG, o que corrobora com nossos dados, assim como com a nossa curva de

sobrevivência global na figura 6, na qual apontou o genótipo homozigoto *del/del* deste INDEL associado ao risco diminuído e com isso a uma sobrevida maior desses pacientes.

Na validação dos dados da variante INDEL *MIRNA3652* por RNA-seq, não obtivemos resultados diferencialmente significativos e relacionados com este miRNA. Talvez o número amostral reduzido (27 amostras do transcriptoma) tenha sido o fator limitante para obtermos resultados significativos para este marcador.

O *MIR920* apresentou diferença significativa quanto a susceptibilidade dos casos e controles, onde o alelo alterado *del* deste miRNA apresentou um risco diminuído para o CG (Tabela 4). Pesquisas envolvendo este miRNA estão associadas ao carcinoma hepatocelular (Chen et al., 2010), na qual o estudo associa níveis do *hsa-miR-920* à proteína β TrCP, e regula a via de sinalização *NFK β* , ambas envolvidas na progressão do hepatocarcinoma. Além disso, o *MIR920* atua em diversas vias do câncer, envolvendo genes de grande potencial na oncologia como o *CEBPB*, o *MYC* e o *TGFBR2*, relacionados à vias de proliferação, anti-apoptose, invasão e metástase em patologias como o câncer colorretal, leucemia, linfoma, sarcoma, câncer de próstata e neuroblastoma (Vlachos et al., 2015). Apesar da importância que o marcador apresentou em diversas vias associadas ao câncer, é necessário o aprofundamento maior do estudo deste marcador associado ao câncer gástrico.

Nossos dados de RNA-seq não apresentaram genes associados com o *MIRNA920*, porém durante o alinhamento alvos importantes apresentaram similaridade entre as sequências, como o *KRAS* e o *BCL2*. Assim como outros marcadores, talvez o número amostral reduzido (27 amostras do transcriptoma) tenha sido o fator limitante para obtermos resultados significativos para este marcador.

O gene *MIR4463* apresentou associação significativa, em nosso estudo, para susceptibilidade em desenvolver o CG (Tabela 4). Quanto as características clínicas, nossos dados demonstraram que o alelo *del* do *MIRNA4463* tem risco aumentado para o desenvolvimento do câncer gástrico precocemente. Quando categorizamos os tumores por região do estômago observamos que o alelo *del* deste miRNA apresentou um risco aumentado de desenvolver tumores na região da não-cardia. E quando analisados de acordo com a classificação de Lauren, o alelo *del* do gene *MIRNA4463* apresentou diferença significativa e associado a uma chance maior de desenvolver o tumor gástrico do tipo difuso (Tabela 5).

Segundo Assumpção (2020), o CG do tipo difuso apresenta uma frequência elevada em pacientes mais jovens e relevância aumentada a fatores genéticos do que ambientais, logo

encontrar associação significativa do alelo *del* do *MIRNA4463* a tumores do tipo difuso a uma frequência significativa de chances de desenvolver o CG precocemente, reforça o potencial do marcador *MIR4463*, pois os tumores deste tipo são os que não estão ligados a lesões pré-cancerosas que ocorrem em pacientes mais jovens apresentando pior prognóstico e possuem um padrão de crescimento invasivo (Assumpção et al., 2020).

O celular no câncer colorretal (CCR), pois o miRNA4463 apresenta-se hiperexpresso nestes tipos de tecidos, tendo uma expressão ainda maior nos tecidos de CCR com metástase, sendo assim a expressão positiva do miRNA4463 tem como alvo o supressor tumoral *PPP1R12B*, o qual atua inibindo o processo de tumorigênese e metastático no CCR (Ding et al., 2019; Tan et al., 2022). Além disso, o marcador do tipo INDEL apresentou similaridade gênica com o transcrito *PPP1R12B*, o que corrobora com os dados da literatura, pois a deleção do *MIRNA4463* pode estar possibilitando o silenciamento gênico do mRNA-alvo. Neste caso, a hipótese é que nossos dados apontam para a deleção deste marcador atuando no complexo miRISC do gene supressor tumoral *PPP1R12B*, de modo que o silenciamento deste favoreceria a regulação de vias de sinalização e com isso, a progressão do CG. Portanto, entende-se que essa variante possa ser um excelente candidato a marcador de risco a câncer gástrico precoce e de pior prognóstico.

A validação da variante INDEL *MIRNA4463* pela técnica do RNA-seq apontou uma associação com o transcrito *DCAF11*, um gene regulador da progressão do ciclo celular (Agarwal et al., 2015), sendo que ao alinharmos as sequências do gene deste *MIRNA* com a do RNA-alvo, obtivemos um pareamento de 100% (Figuras 16 e 17). A hipótese desta validação é que a deleção deste marcador possa estar promovendo a transcrição ou aumentando a tradução do mRNA *DCAF11*, conforme observamos o transcrito superexpresso em 20 vezes nos dados de RNA-seq de CG (gráfico 3), logo esta hiperexpressão pode estar desregulando o funcionamento deste gene e com isso, descontrolando a progressão do ciclo celular e favorecendo a progressão do tumor no CG (Chen et al., 2017).

Vale ressaltar que literatura aponta o marcador *MIRNA4463* com potencial significativo associado ao pior prognóstico em pacientes com carcinoma hepatocelular, pois estes pacientes apresentaram níveis elevados de expressão do miRNA-4463 associado significativamente a um curto tempo de sobrevivência quando comparado ao grupo controle (Hu et al., 2017). Contudo o nosso estudo não obteve dados significativos para compor uma curva de sobrevivência dos casos de CG deste marcador, pois obtivemos dados de sobrevida apenas de 51 pacientes.

Zhang (2017), por sequenciamento, sugere o miRNA4463 como um potencial biomarcador de rastreamento não-invasivo para o câncer. Pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) validou o nível de expressão deste miRNA, sendo que esta variante apresentou uma hiperexpressão mais sensível na prevenção da progressão do câncer de colón, além disso Zhang mencionou o papel importante do miRNA4463 associado a resposta a danos no DNA, a apoptose celular, a proliferação celular e a desregulação transcricional no câncer (Zhang et al., 2017).

Adicionalmente, em nosso estudo, realizamos a curva de sobrevivência (figura 7) apresentando casos de câncer gástrico do tipo difuso associado significativamente com o menor tempo de sobrevivência. Logo estes dados corroboram com o da literatura, caracterizado por uma forte histologia difusa, que compreende o câncer gástrico do tipo difuso (CGD) como um dos cânceres mais agressivos, na qual é diagnosticado em pacientes com idade precoce apresentando uma propensão a metástases à distância, o que demonstra a agressividade desta doença, havendo possibilidades de um número elevado de óbitos. Vale ressaltar que o câncer gástrico do tipo difuso está associado a hereditariedade e é considerado uma síndrome autossômica dominante, na qual 40 % dos casos possuem mutações germinativas no gene *CDHI* (Liao et al., 2020). A E-caderina (*CDHI*) é um gene de predisposição ao câncer gástrico difuso hereditário, sendo que mutações neste gene contribui ainda mais para o menor tempo de sobrevida do paciente (Van Der Post et al., 2015). El-Husny et al. (2016), em seu estudo, realizado por sequenciamento de nova geração (NGS), avaliou mutações da linha germinativa *CDHI* em indivíduos que correspondem aos critérios clínicos para câncer gástrico difuso hereditário (HDGC), ou que exibem diagnóstico muito precoce de câncer gástrico. Como resultado, enfatizou a existência de casos de câncer gástrico causados por mutações da linha germinativa *CDHI* no norte do Brasil, embora as informações sejam regularmente ignoradas devido à existência de inúmeros fatores ambientais ofuscando os dados genéticos.

Sendo assim, mutações no gene da E-caderina fornece estimativas confiáveis para o estudo e manejo do CGD em portadores de mutações germinativas (Hansford et al., 2015). Portanto, nossa curva de sobrevivência corrobora com os dados da literatura, porém sugerimos análises mais detalhadas dos casos de câncer gástrico difuso, buscando o histórico oncológico familiar desses pacientes, assim como a análise molecular de mutações importantes como as do gene *CDHI*, a fim de validar informações importantes para o estudo deste tipo de câncer gástrico.

6. CONCLUSÃO

A incidência do câncer gástrico (CG) vem diminuindo pela evolução do tratamento, assim como melhorias no saneamento básico, diminuição de refrigerantes, aumento no consumo de frutas, diminuição de sal, erradicação do *H. pylori* e a intensificação na pesquisa (Moore MA, et al. 2010).

O adenocarcinoma é o tipo mais comum, representando cerca de 90-95% dos tipos de cânceres. Biomarcadores na análise genética e clínica viriam contribuir no diagnóstico precoce e hereditário. Para a clínica, a identificação e o conhecimento da influência de determinados genes aumentariam a compreensão dos preditores e suas associações poderiam resultar em práticas clínicas melhorando a eficácia dos tratamentos.

Nossos dados apontaram resultados relevantes em relação a susceptibilidade e a variantes clínicas diante de biomarcadores de INDELS pouco estudados em associação ao CG na Amazônia. A princípio nossos objetivos foram alcançados quando demonstramos a importância de variantes associadas ao CG. Encontramos associações significativas em três INDELS para risco aumentado: *hsa-mir-4463_rs5877455*, *hsa-mir-3945_rs145931056* e *hsa-mir-548h-4_rs150141473* e dois INDELS para risco diminuído: o *hsa-mir-920_rs66686007* e *hsa-mir-3652_rs62747560*, todos associados ao CG.

A análise de 27 amostras de tecidos de CG pela técnica de RNA-seq possibilitou buscar a validação dessas variantes apontadas no estudo e na literatura como biomarcadores que influenciam o CG, porém o aumento do número amostral para validação pelo transcriptoma, análise de expressão de cada miRNA nos casos de CG pela técnica de PCR em tempo real, além da análise de expressão proteica por western blotting possibilitarão estudos futuros a elucidar de forma mais precisa a ação de cada INDEL no CG, afinal descobertas de variantes de miRNAs associados a população da Amazônia é de extrema relevância para a utilização desses biomarcadores como ferramentas de auxílio no diagnóstico precoce e no tratamento a partir do perfil genético e ambiental da nossa população.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abib, A. R., Oliveira, I. M. de , Koifman, S. **Histopatologia do câncer de estômago (classificação de Lauren) em amostra de pacientes hospitalares no Rio de Janeiro.** 1997. 1980-1995.

- Agarwal, V. et al. **Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs.** *eLife*, v. 4, n. AUGUST2015, 12 ago. 2015.
- Amin, M. B. et al. **The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging.** *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 67, n. 2, 2017. p. 93–99, mar.
- Anauate, A. C. et al. **The Complex Network between MYC Oncogene and microRNAs in Gastric Cancer: An Overview.** *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 1782, v. 21, n. 5, 2020. p. 1782, 5 mar.
- Assumpção, P. P. et al. **The diffuse-type gastric cancer epidemiology enigma.** *BMC Gastroenterology* 2020 20:1, v. 20, n. 1, 2020. p. 1–7, 13 jul.
- Assumpção, C. B. ET AL. **Nitrite Levels Before and after Washing in Salted Fish.** *Archives of Clinical Gastroenterology*, 2016. p. 007–009, 7 mar.
- Baldotto, C. et al. **Mutações drivers em câncer de pulmão não-pequenas células (CPNPC).** *Pulmão RJ*, 2016. p. 23–28.
- Bartel, D. P. **MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function.** *Jan 23; 2004*, 116(2):281-97.
- Bhattacharya, A.; Ziebarth, J. D.; Cui, Y. **Systematic Analysis of microRNA Targeting Impacted by Small Insertions and Deletions in Human Genome.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, 2012. p. 46176, 25 set.
- Bolger, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. **Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.** *Bioinformatics*, v. 30, n. 15, 2014. p. 2114-2120.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. **RNA polymerase III transcribes human microRNAs.** *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(12):1097-101.
- [Cao, J.X., Lu, Y., Qi, J.J., An, G.S., Mao, Z.B., Jia, H.T., Li, S.Y., Ni, J.H. \(2014\). MiR-630 inhibits proliferation by targeting CDC7 kinase, but maintains the apoptotic balance by targeting multiple modulators in human lung cancer A549 cells. *Cell Death Dis.* 2014; Sep 25;5:e1426.](#)
- Capelozzi, V. L. **Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer do pulmão.** *Revista scielo Brasil, J. pneumologia*, 2001. vol. 27, número 6, São Paulo.
- Cavalcante, G. C. et al. **Investigation of INDEL variants in apoptosis: the relevance to gastric cancer.** *BMC Medical Genetics*, v. 21, n. 1, 1 dez. 2020.
- Chen Z, Wang K, Hou C, Jiang K, Chen B, Chen J, Lao L, Qian L, Zhong G, Liu Z, Zhang C, Shen H. **CRL4B·E3 ligase targets p21 for degradation to control cell cycle progression in human osteosarcoma cells.** *Sci Rep.* 2017 Apr 26;7(1):1175. doi: 10.1038/s41598-017-01344-9.
- Chen, H. et al. **The new identified biomarkers determine sensitivity to immune checkpoint blockade therapies in melanoma.** *OncoImmunology*, v. 8, n. 8, 2019a.
- Chen, J. et al. **miR-548d-3p inhibits osteosarcoma by downregulating KRAS.** *Aging*, v. 11, n. 14, p. 5058–5069, 2019b.
- Chen, J.; Guo, J. **Comparative assessments of indel annotations in healthy and cancer genomes with next-generation sequencing data.** *BMC Medical Genomics*, v. 13, n. 1, 1 dez. 2020.

Chen, S. et al. **An insertion/deletion polymorphism in the 3' untranslated region of β -transducin repeat-containing protein (β TrCP) is associated with susceptibility for hepatocellular carcinoma in Chinese.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 391, n. 1, 2010; p. 552–556, 1 jan.

[Chen, W.X.](#), [Zhang, Z.G.](#), [Ding, Z.Y.](#), [Liang, H.F.](#), [Song, J.](#), [Tan, X.L.](#), [Wu, J.J.](#), [Li, G.Z.](#), [Zeng, Z.](#), [Zhang, B.X.](#), Chen, X.P. (2016). **MicroRNA-630 suppresses tumor metastasis through the TGF- β - miR-630-Slug signaling pathway and correlates inversely with poor prognosis in hepatocellular carcinoma.** *Oncotarget*. 2016 Apr 19;7(16):22674-86.

Chrysovergis, A. et al. **Digital analysis of BCL2 expression in laryngeal squamous cell carcinoma.** *Anticancer Research*, v. 39, n. 3, 2019; p. 1253–1257, 1 mar.

Chu D, Zheng J, Li J, Li Y, Zhang J, Zhao Q, Wang W, Ji G. **MicroRNA-630 is a prognostic marker for patients with colorectal cancer.** *Tumour Biol*. 2014 Oct;35(10):9787-92. doi: 10.1007/s13277-014-2223-3.

Correa, P. et al. **A Model for Gastric Cancer Epidemiology.** *The Lancet*, v. 306, n. 7924, 1975; p. 58–60, 12 jul.

Correa, P.; PIAZUELO, M. B. **The gastric precancerous cascade.** *Journal of Digestive Diseases*, v. 13, n. 1, 2012; p. 2–9, jan.

Cui M, Yu W, Dong J, Chen J, Zhang X, Liu Y. **Downregulation of ABI1 expression affects the progression and prognosis of human gastric carcinoma.** *Med Oncol*. 2010 Sep;27(3):632-9. doi: 10.1007/s12032-009-9260-6. Epub 2009 Jun 25. PMID: 19554484.

DA Silva, E. L. **Avaliação do Fenótipo metabólico Tumoral da Linhagem Metastática Gástrica AGP-01.** 2015; [s.l: s.n.].

Dayyani F, Kato S, Kurzrock R. **Hyperprogression in Gastric Cancer: Is MDM2 Amplification the Dark Horse?** *JCO Precis Oncol*. 2021 Nov;5:931-932. doi: 10.1200/PO.21.00061. PMID: 34994620.

Ding X, Huang R, Zhong Y, Cui N, Wang Y, Weng J, Chen L, Zang M. **CTHRC1 promote metástases de câncer gástrico através da via de sinalização HIF-1 α /CXCR4.** *Biomed Pharmacother*. 2020 Mar;123:109742. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109742. Epub 2019 25 de dezembro. PMID: 31855733

Ding, C. et al. **The PEAK1-PPP1R12B axis inhibits tumor growth and metastasis by regulating Grb2/PI3K/Akt signalling in colorectal cancer.** *Cancer letters*, v. 442, 2019; p. 383–395, 1 fev.

Duan X, Hong J, Wang F, Wei K, Wang P, Hou F, Zhang M, Liu D, Yuan D, Liu S. **The influence of ACYP2 polymorphisms on gastrointestinal cancer susceptibility in the Chinese Han population.** *Mol Genet Genomic Med*. 2019 Jul;7(7):e00700. doi: 10.1002/mgg3.700.

El-Husny A, Raiol-Moraes M, Amador M, Ribeiro-Dos-Santos AM, Montagnini A, Barbosa S, Silva A, Assumpção P, Ishak G, Santos S, Pinto P, Cruz A, Ribeiro-Dos-Santos Â. **CDH1 mutations in gastric cancer patients from northern Brazil identified by Next- Generation Sequencing (NGS).** *Genet Mol Biol*. 2016 May 13;39(2):189-98. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2014-0342. PMID: 27192129; PMCID: PMC4910547.

Eoh KJ, Lee SH, Kim HJ, Lee JY, Kim S, Kim SW, Kim YT, Nam EJ. **MicroRNA-630 inhibitor sensitizes chemoresistant ovarian cancer to chemotherapy by enhancing**

apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 4;497(2):513-520. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.062. Epub 2018 Feb 13.

Feng J, Wang X, Zhu W, Chen S, Feng C. **MicroRNA-630 Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Regulating FoxM1 in Gastric Cancer Cells.** *Biochemistry (Mosc).* 2017 Jun;82(6):707-714. doi: 10.1134/S0006297917060074.

Getz G et al. **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** *Nature.* 2005; Vol 435. 9 June.

Goh WQ, Ow GS, Kuznetsov VA, Chong S, Lim YP. **DLAT subunit of the pyruvate dehydrogenase complex is upregulated in gastric cancer-implications in cancer therapy.** *Am J Transl Res.* 2015 Jun 15;7(6):1140-51. PMID: 26279757; PMCID: PMC4532746.

Guo L, Liu L, Zhong L, Bai Y, Sui H, Wei X, Zhang W, Huang P, Gao D, Kong Y, Lou G. **A superexpressão Cthrc1 é um marcador prognóstico independente no câncer gástrico.** *Hum Pathol.* 2014 May;45(5):1031-8. doi: 10.1016/j.humpath.2013.12.020. Epub 2014 21 de janeiro. PMID: 24746208.

Guo B, Wang W, Zhao Z, Li Q, Zhou K, Zhao L, Wang L, Yang J, Huang C. **Rab14 Act as Oncogene and Induce Proliferation of Gastric Cancer Cells via AKT Signaling Pathway.** *PLoS One.* 2017 Jan 20;12(1):e0170620. doi: 10.1371/journal.pone.0170620. PMID: 28107526; PMCID: PMC5249107.

Guo, L. M. et al. **Downregulation of TNFRSF19 and RAB43 by a novel miRNA, miR-HCC3, promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells.** *Biochemical and biophysical research communications*, v. 525, n. 2, 2020; p. 425–432, 30 abr.

Hanahan, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions**. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, 2022. p. 31–46, 1 jan.

Hanahan, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*, v. 144, n. 5, 2011; p. 646–674, 4 mar. 2011.

Hanahan D, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer.** *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

Hansford, S. et al. **Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond.** *JAMA Oncology*, v. 1, n. 1, 2015; p. 23–32, 1 abr.

Hashimoto I, Sakamaki K, Oue N, Kimura Y, Hiroshima Y, Hara K, Maezawa Y, Kano K, Aoyama T, Yamada T, Yamamoto N, Ogata T, Ito H, Shiozawa M, Morinaga S, Rino Y, Yasui W, Masuda M, Miyagi Y, Oshima T. **Clinical Significance of PRKCI Gene Expression in Cancerous Tissue in Patients With Gastric Cancer.** *Anticancer Res.* 2019; Oct;39(10):5715-5720. doi: 10.21873/anticancer.13771. PMID: 31570472.

Hoff, Paulo Marcelo Gehm (ed). **Tratado de oncologia.** SÃO PAULO: ATHENEU, 2013.

Horikoshi, M.; Tang, Y. **ggfortify: Data Visualization Tools for Statistical Analysis Results** (2018). URL <http://CRAN.R-project.org/package=ggfortify>. R package version 0.4, v. 1, 2018;p. 28.

Hu, T. et al. **The potential value of microRNA-4463 in the prognosis evaluation in hepatocellular carcinoma.** *Genes and Diseases*, v. 4, n. 2, 2017; p. 116–122, 1 jun.

Huang, C. M. et al. **miRNA-148a Enhances the Treatment Response of Patients with Rectal Cancer to Chemoradiation and Promotes Apoptosis by Directly Targeting c-Met.**

Biomedicines, v. 9, n. 10, 1 out. 2021.

INCA. **Tipos de câncer** | INCA - Instituto Nacional de Câncer/Leucemia, 2020.

Jima DD, Zhang J, Jacobs C, Richards KL, Dunphy CH, Choi WW, Au WY, Srivastava G, Czader MB, Rizzieri DA, Lagoo AS, Lugar PL, Mann KP, Flowers CR, Bernal-Mizrachi L, Naresh KN, Evens AM, Gordon LI, Luftig M, Friedman DR, Weinberg JB, Thompson MA, Gill JI, Liu Q, How T, Grubor V, Gao Y, Patel A, Wu H, Zhu J, Blobel GC, Lipsky PE, Chadburn A, Dave SS; **Hematologic Malignancies Research Consortium. Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs.** *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):e118-27. doi: 10.1182/blood-2010-05-285403. Epub 2010 Aug 23. PMID: 20733160; PMCID: PMC3012600.

Kahraman, M. et al. **MicroRNA in diagnosis and therapy monitoring of early-stage triple-negative breast cancer.** *Scientific reports*, 2018; v. 8, n. 1, 1 dez.

Kassambra, Alboukadel et al. **Survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'.** R package version 0.4.3. 2018.

Kern, F. et al. **miRTargetLink 2.0 - Interactive miRNA target gene and target pathway networks.** *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. W1, 2021; p. W409–W416, 2 jul.

Kim VN, Han J, Siomi MC. **Biogenesis of small RNAs in animals.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):126-39. Review.

Koh, H. M.; SONG, D. H. **Prognostic role of Rab27A and Rab27B expression in patients with non-small cell lung carcinoma.** *Thoracic cancer*, v. 10, n. 2, 2019; p. 143–149, 1 fev.

Lauren, P. **The Two Histological Main Types Of Gastric Carcinoma: Difuse And So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attemp At a Histo-Clinical Classification.** *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, v. 64, 1965; p. 31–49.

Leivonen, S. k. et al. **Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signalysis in breast cancer cell lines.** *Oncogene*. 2009; 28: 3926-3936.

Leong SH, Lwin KM, Lee SS, Ng WH, Ng KM, Tan SY, Ng BL, Carter NP, Tang C, Lian Kon O. **Chromosomal breaks at FRA18C: association with reduced DOK6 expression, altered oncogenic signaling and increased gastric cancer survival.** *NPJ Precis Oncol*. 2017 May 1;1(1):9. doi: 10.1038/s41698-017-0012-3. PMID: 29872697; PMCID: PMC5859466.

Li Q, Qiu Q, Zhang L, Zhang X, Wang Y, Geng Z, Ge S, Zuo L, Song X, Li J, Hu J. **[ALDH3B1 expression is correlated with histopathology and long-term prognosis of gastric cancer]**. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2022 May 20;42 (5):633-640. Chinese. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2022.05.02. PMID: 35673905; PMCID: PMC9178630.

[Li, D.](#), [Tian, B.](#), [Jin, X.](#) **MiR-630 Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) by Regulating the Wnt/ β -Catenin Pathway in Gastric Cancer Cells.** 2018. [Oncol Res.](#)

Liao, F. et al. **A validated survival nomogram for early-onset diffuse gastric cancer.** *Aging (Albany NY)*, v. 12, n. 13, 2020; p. 13160.

Liu, W.; Wang, X. **Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data.** *Genome Biology*, 2019; v. 20, n. 1, 22 jan.

Love, Michael I.; HUBER, Wolfgang; ANDERS, Simon. **Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.** *Genome biology*, v. 15, n. 12, 2014; p. 550.

Lu H, Zhang Q, Sun Y, Wu D, Liu L. **LINC00689 induces gastric cancer progression via**

modulating the miR-338-3p/HOXA3 axis. J Gene Med. 2020 Dec;22(12):e3275. doi: 10.1002/jgm.3275. Epub 2020 Oct 20. PMID: 32926751.

Ma Y, Zhang P, Zhang Q, Wang X, Miao Q, Lyu X, Cui B, Ma H. **Dihydroartemisinin suppresses proliferation, migration, the Wnt/ β -catenin pathway and EMT via TNKS in gastric cancer.** Oncol Lett. 2021 Oct;22(4):688. doi: 10.3892/ol.2021.12949. Epub 2021 Jul 29. Erratum in: Oncol Lett. 2022 Jan;23(1):34. PMID: 34457043; PMCID: PMC8358739.

Magalhães, L. et al. **APC gene is modulated by hsa-miR-135b-5p in both diffuse and intestinal gastric cancer subtypes.** BMC Cancer, 2018. v. 18, n. 1, 30 out.

Maniataki E, Mourelatos Z. **A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA.** Genes Dev. 2005;19: 2979-90.

Marchan R, Büttner B, Lambert J, Edlund K, Glaeser I, Blaszkewicz M, Leonhardt G, Marienhoff L, Kaszta D, Anft M, Watzl C, Madjar K, Grinberg M, Rempel E, Hergenröder R, Selinski S, Rahnenführer J, Lesjak MS, Stewart JD **Glicerol-3-fosfato Aciltransferase 1 Promove a migração de células tumorais e a má sobrevivência no carcinoma ovariano.** Câncer Res. 2017 Set 1;77(17):4589-4601. doi: 10.1158/0008-5472. CAN-16-2065. Epub 2017 26 de junho. PMID: 28652252.

Mathews DH, Turner DH, Zuker M. **Previsão da estrutura secundária do RNA. Quimificação de Ácido Nucleico** Protoc Curr. 2007 Mar;Capítulo 11:Unidade 11.2. doi: 10.1002/0471142700.nc1102s28. PMID: 18428968; PMCID: PMC5115178.

Mclean, M. H.; El-Omar, E. M. **Genetics of gastric cancer.** Nature reviews. Gastroenterology & hepatology, v. 11, n. 11, 2014; p. 664–674, 5 nov.

Mei D, Zhu Y, Zhang L, Wei W. **O Papel do CTHRC1 na Regulação de Sinalização Múltipla e Progressão Tumoral e Metástase. Mediadores Inflam.** 12 de agosto de 2020:9578701. doi: 10.1155/2020/9578701. PMID: 32848510; PMCID: PMC7441421.

Moore MA, Eser S, Iqbal N, et al. **Cancer epidemiology and control in North-Western and Central Asia - past, present and future.** Asian Pac J Cancer Prev. 2010;11 Suppl 2:17-32.

Moreira, F. C. *et al.* **MiRNA Expression Profile for the Human Gastric Antrum Region Using Ultra-Deep Sequencing.** V. 9, 2014; p. e92300.

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

Nielsen, C. B., Shomron, N., Sandberg, R., Hornstein, E., Kitzman, J., Burge, C.B. **Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs.** RNA. 2007; 13:1894-1910.

Nussbaum, R. L.; McInnes, R. R.; Willard, H. F. Thompson & Thompson **Genética Médica 8ED - Evolution.** Elsevier ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2016.

O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. **Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation.** Front Endocrinol (Lausanne). 2018; 9: 402. Review.

Oliveira, K. S. M. et al. **Stomach Cancer: Epidemiological Profile of Elderly Patients | UNINGÁ REVIEW.** 2016. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1845>>. Acesso em: 7 set. 2021.

- Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T, et al. **Signaling pathway via TNF-alpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296:G850–G859.
- Owen, D. A. **Normal histology of the stomach.** *The American journal of surgical pathology*, v. 10, n. 1, 1986; p. 48–61.
- Patro, Rob et al. **Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression.** *Nature Methods*, v. 14, n. 4, 2017; p. 417-419.
- Pereira, Jorge AL; ER, Oliveira CS, Ferreira EDS, Menon ETN, Diniz SN, Pezuk JA. **MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer.** Einstein (Sao Paulo). 2021 Jul 16;19:eRB5996. doi: 10.31744/einstein_journal/2021RB5996. PMID: 34287566; PMCID: PMC8277234.
- Pereira, T. C. **Introdução ao Mundo dos microRNAs.** 2015. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de genética. ISBN: 978-84-89265-21-8. Editora CUBO. Sociedade Brasileira de Genética.
- Plotnikova O, Baranova A, Skoblov M. **Comprehensive analysis of human microRNA–mRNA interactome.** *Front Genet.* 2019;10:933.
- Prasetyanti, P. R.; Medena, J. P. **Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective.** *Molecular Cancer*, v. 16, n. 1, 16 fev. 2017.
- Raad M, Bayat A, Sharafshah A, Amiri AZ, Zohour MM, Ahmadvand M. **Association and in silico investigations of miR-302c insertion/deletion variant as a novel biomarker with susceptibility to gastric cancer.** *J Cell Biochem.* 2019 Nov;120(11):18946-18955. doi: 10.1002/jcb.29215.
- Ramos, M. F. K. P. **Caracterização dos subtipos moleculares do câncer gástrico por expressão gênica e proteica / São Paulo, 2019.** Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Ribeiro-dos-Santos, A. K. C. *et al.* **Deep Sequencing of MicroRNAs in Cancer: Expression Profiling and Its Applications.** Germany: Springer Berlin Heidelberg, v. 1, 2012; p. 523-546.
- Rodriguez-Murillo L., Salem R.M. **Insertion/Deletion Polymorphism.** In: Gellman M.D., Turner J.R. (eds) *Encyclopedia of Behavioral Medicine.* Springer, New York, NY, 2013.
- Rosen, R. D.; Sapra, A. **TNM Classification.** *StatPearls NCBI*, 17 fev. 2022.
- Robin, Xavier et al. **Package ‘pROC’.** 2012-09-10; 2021; 09: 34.
- Saffari M, Ghaderian SMH, Omrani MD, Afsharpad M, Shankaie K, Samadaian N. **The Association of miR-let 7b and miR-548 with PTEN in Prostate Cancer.** *Urol J.* 2019 Jun 17;16(3):267-273. doi: 10.22037/uj.v0i0.4564. PMID: 30318571.
- Sambrook J, Fritschi EF and Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual,** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Shi Y, Qiu M, Wu Y, Hai L. **MiR-548-3p functions as an anti-oncogenic regulator in breast cancer.** *Biomed Pharmacother.* 2015 Oct;75:111-6. doi: 10.1016/j.biopha.2015.07.027. Epub 2015 Aug 18. PMID: 26297544.
- Shi-Lung Lin, Donald C. Chang, Shao-Yao Ying, Davey Leu, David TS Wu; **MicroRNA miR-302 inibe a tumorigenicidade de células-tronco pluripotentes humanas por supressão coordenada das vias do ciclo celular CDK2 e CDK4/6.** *Câncer Res* 15 de novembro de 2010; 70 (22): 9473-9482. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2746>

- Siddiqui, W. A.; Ahad, A.; Ahsan, H. **The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update** *Archives of Toxicology* Springer Verlag, 20 fev. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25618543/>>. Acesso em: 11 jun. 2021
- Singh, R.; Saini, N. **Downregulation of BCL2 by miRNAs augments drug-induced apoptosis--a combined computational and experimental approach.** *Journal of cell science*, v. 125, n. Pt 6, 2012; p. 1568–1578, 15 mar.
- Smith, M. G. et al. **Cellular and molecular aspects of gastric cancer.** *World Journal of Gastroenterology : WJG*, v. 12, n. 19, 2006; p. 2979, 14 maio.
- Snustad, D. P.; Simmons, M. J. 2008. **Fundamentos de genética.** Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Sobin, L.; Wittekind, C. **TNM: classificação de tumores malignos.** 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004.
- [Sosa, L.A.A.](#); [Gómez, B.M.B.](#); [Orduz, A.F.C.](#) **Supresión tumoral por microARN en el cáncer gástrico** *Tumour suppression by microRNAs in gastric câncer.* [Gaceta Mexicana de Oncología, Volume 15, Issue 4](#), July–August 2016; 222-230.
- Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. **Identification of Drosophila MicroRNA Targets.** 2003; *PLoS Biol* 1(3): e60. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000060>
- Stark, M.S., Tyagi, S., Nancarrow, D.J., Boyle, G.M., Cook, A.L., Whiteman, D.C., Parsons, P.G., Schmidt, C., Sturm, R.A., Hayward, N.K. **Characterization of the Melanoma miRNAome by Deep Sequencing.** *PLoS One.* 2010 Mar 12;5(3):e9685.
- Strachan, T.; Andrew, R. **Genética molecular humana.** Quarta edição, Porto Alegre: Artmed, 2013. 780 p.
- Sung, H. et al. Global cancer statistics. **GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, 2020; p. 209–249, 4 fev. 2021. SEER Training Modules, [Cancer Registration & Surveillance Modules](#). U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Access 03/11/2022 <<https://training.seer.cancer.gov/>>.
- Tan, J. et al. **MicroRNA-4463 facilitates the development of colon cancer by suppression of the expression of PPP1R12B.** *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 2022.
- Tao, Y. et al. **SMURF1 promotes the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells.** *Oncology reports*, v. 38, n. 3, 2017; p. 1806–1814, 1 set.
- Therneau, Terry M. **Survival Analysis** [R package survival version 2015; 2.38-3].
- Upretty, D.; Adjei, A. A. **Kras: From undruggable to a druggable Cancer Target.** *Cancer treatment reviews*, v. 89, 1 set. 2020.
- Van Der Post, R. S. et al. **Accuracy of Hereditary Diffuse Gastric Cancer Testing Criteria and Outcomes in Patients With a Germline Mutation in CDH1.** *Gastroenterology*, v. 149, n. 4, 2015; p. 897- 906.e19, 1 out.
- Vlachos, I. S. et al. **DIANA-miRPath v3. 0: deciphering microRNA function with experimental support.** 2015. Disponível em: <<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>>. Acesso em: 26 set. 2021.
- Vogelstein, B. et al. **Cancer Genome Landscapes.** *Science (New York, N.Y.)*, v. 339, n.

6127, 2013; p. 1546, 29 mar.

Waldum, H. L.; Fossmark, R. **Types of Gastric Carcinomas**. International Journal of Molecular Sciences, v. 19, n. 12, 2018.

Wang C, Li L, Yin Z, Zhang Q, Zhao H, Tao R, Wang S, Hu S, He Y, Wang D, Li C, Zhang S, Xu J, Jiang X, Zhu S, Gao Y. **An indel polymorphism within pre-miR3131 confers risk for hepatocellular carcinoma**. Carcinogenesis. 2017 Feb 1;38(2):168-176. doi: 10.1093/carcin/bgw206. PMID: 28034876.

Wang H, Li NS, He C, Xie C, Zhu Y, Lu NH, Hu Y. **Discovery and Validation of Novel Methylation Markers in *Helicobacter pylori*-Associated Gastric Cancer**. Dis Markers. 2021 Dec 8;2021:4391133. doi: 10.1155/2021/4391133. PMID: 34925643; PMCID: PMC8674074.

Wang Z, Zhao Y, Wang Y, Jin C. **Circular RNA circHIAT1 inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating miR-3171/PTEN axis**. Biomed Pharmacother. 2019 Aug;116:108932. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108932.

Wang Y, Yin B, Li D, Wang G, Han X, Sun X. **GSDME mediates caspase-3-dependent pyroptosis in gastric cancer**. Biochem Biophys Res Commun. 2018 Jan 1;495(1):1418-1425. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.156. Epub 2017 Nov 26.

Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HH, Shi ST, Siu HC, Deng S, Chu KM, Law S, Chan KH, Chan AS, Tsui WY, Ho SL, Chan AK, Man JL, Foglizzo V, Ng MK, Chan AS, Ching YP, Cheng GH, Xie T, Fernandez J, Li VS, Clevers H, Rejto PA, Mao M, Leung SY. **Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer**. Nat Genet. 2014 Jun;46(6):573-82. doi: 10.1038/ng.2983. Epub 2014 May 11. PMID: 24816253.

Wu M, Chen B, Pan X, Su J. **Prognostic Value of Autophagy-related Proteins in Human Gastric Cancer**. Cancer Manag Res. 2020 Dec 31;12:13527-13540. doi: 10.2147/CMAR.S278354. PMID: 33414645; PMCID: PMC7783202.

Yang JS, Maurin T, Lai EC. **Functional parameters of Dicer-independent microRNA biogenesis**. RNA. 2012;18 (5):945-57.

Yang Y, Chen Z, Zhou L, Wu G, Ma X, Zheng Y, Liu M, Wang Y, Ji R, Guo Q, Zhou Y. **In silico development and validation of a novel glucose and lipid metabolism-related gene signature in gastric cancer**. Transl Cancer Res. 2022 Jul;11(7):1977-1993. doi: 10.21037/tcr-22-168. PMID: 35966316; PMCID: PMC9372230.

Yang, H.; JIN, L.; SUN, X. **A thirteen-gene set efficiently predicts the prognosis of glioblastoma**. Molecular medicine reports, v. 19, n. 3, 2019; p. 1613–1621, 1 mar.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. **Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs**. Genes Dev. 2003;17 (24):3011-6.

Yoon, C. et al. **KRAS activation in gastric adenocarcinoma stimulates epithelial-to-mesenchymal transition to cancer stem-like cells and promotes metastasis**. Molecular Cancer Research, v. 17, n. 9, 2019; p. 1945–1957.

Xu T, Xie F, Xu D, Xu W, Ge X, Lv S, Li S. **MiR-200b Suppresses Gastric Cancer Cell Migration and Invasion by Inhibiting NRG1 through ERBB2/ERBB3 Signaling**. J Oncol. 2021 Sep 7;2021:4470778. doi: 10.1155/2021/4470778. PMID: 34531912; PMCID: PMC8440071.

Xu B, Liu F, Liu Q, Shi T, Wang Z, Wu N, Xu X, Li L, Fan X, Yu L, Liu B, Wei J. **Highly expressed Claudin18.2 as a potential therapeutic target in advanced gastric signet-ring cell carcinoma (SRCC).** *J Gastrointest Oncol.* 2020 Dec;11(6):1431-1439. doi: 10.21037/jgo-20-344.

Xu L, Li X, Chu ES, Zhao G, Go MY, Tao Q, Jin H, Zeng Z, Sung JJ, Yu J. **Epigenetic inactivation of BCL6B, a novel functional tumour suppressor for gastric cancer, is associated with poor survival.** *Gut.* 2012 Jul;61(7):977-85. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300411.

[Zhang, J.W.](#), [Li, Y.](#), [Zeng, X.C.](#), [Zhang, T.](#), [Fu, B.S.](#) [Yi, H.M.](#), [Zhang, Q.](#), [Jiang, N.](#) **MiR-630 overexpression in hepatocellular carcinoma tissues is positively correlated with alpha-fetoprotein.** *Med Sci Monit.* 2015 Mar 3;21:667-73.

Zhang Y, Zhou X, Zhang M, Cheng L, Zhang Y, Wang X. **ZBTB20 promotes cell migration and invasion of gastric cancer by inhibiting IκBα to induce NF-κB activation.** *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019 Dec;47(1):3862-3872. doi: 10.1080/21691401.2019.1670188. PMID: 31556767.

Zhang, Y. et al. **Serum MicroRNA profile in patients with colon adenomas or cancer.** *BMC Medical Genomics*, v. 10, n. 1, 2017; p. 23, 20.

Zhang Z, Wu H, Chen Z, Li G, Liu B. **Circular RNA ATXN7 promotes the development of gastric cancer through sponging miR-4319 and regulating ENTPD4.** *Cancer Cell Int.* 2020 Jan 23;20:25. doi: 10.1186/s12935-020-1106-5. PMID: 31997941; PMCID: PMC6979400.

Zhao L, Wang W, Niu P, Luan X, Zhao D, Chen Y. **Os mecanismos moleculares do CTHRC1 no câncer gástrico, integrando conjuntos de dados TCGA, GEO e GSA.** *Frente Genet.* 2022 Jul 19;13:900124. doi: 10.3389/fgene.2022.900124. PMID: 35928443; PMCID: PMC9343808.

Zhao, Y., Wang, Y., Xing, G. **miR-516b functions as a tumor suppressor by directly modulating CCNG1 expression in esophageal squamous cell carcinoma.** 2018; Pubmed/30119241

Zheng, Xiaohao et al. **Construction and analysis of the tumor-specific mRNA– miRNA– lncRNA network in gastric cancer.** *Frontiers in Pharmacology*, 2020. p. 1112.

[Zhou, C.X.](#), [Wang, C.L.](#), [Yu, A.L.](#), [Wang Q.Y.](#), [Zhan, M.N.](#), [Tang, J.](#), [Gong, X.F.](#), [Yin, Q.Q.](#), [He, M.](#), [He, J.R.](#), [Chen, G.Q.](#), [Zhao, Q.](#) 2016. **MiR-630 suppresses breast cancer progression by targeting metadherin.** *Oncotarget.*

[Zhu, J.](#), [Zhang, Y.](#), [Yang, X.](#), [Jin, L.](#) **Clinical Significance and Tumor-Suppressive Function of miR-516b in Non-small Cell Lung Cancer.** *Cancer Biother Radiopharm.* 2017May;32(4):115-123.

[Zhu, K.](#), [Pan, Q.](#), [Jia, L.Q.](#), [Dai, Z.](#), [Ke, A.W.](#), [Zeng, H.Y.](#), [Tang, Z.Y.](#), [Fan, J.](#), [Zhou, J.](#) **MiR-302c inhibits tumor growth of hepatocellular carcinoma by suppressing the endothelial-mesenchymal transition of endothelial cells.** *Sci Rep.* 2014 Jul 16;4:5524.

REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

C. IBM. **IBM SPSS Statistics for Macintosh**, Version 27.0. Disponível em: <<https://www.ibm.com/br-pt/analytics/spss-statistics-software>>. Acesso em: 5 out. 2021.

INCA. **Estadiamento | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estadiamento>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

INCA. **Estimativa 2020 - Síntese de Resultados e Comentários | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa>>. Acesso em: 3 abr. 2021.

INCA – Instituto Nacional do Câncer, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 22 Jun. 2019.

MIRCANCER, 2019. Disponível em: <http://mircancer.ecu.edu>. Acesso em: 19 Ago. 2019.

MiRanda. Disponível em: <https://bioweb.pasteur.fr/packages/pack@miRanda@3.3a>

NCBI, 2022 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/596>

NCBI, 2022 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>

NCBI, 2022 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7048>

NCBI, 2022 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845>

OMS – **Organização Mundial de Saúde**, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 13 Jul. 2019.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: The R Project for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 25 maio. 2021.

Síntese do miRNA humano, 2019. Disponível em: <<http://www.wikiwand.com/gl/MicroARN>>. Acesso em: 14 Mai. 2019.

University of Leicester. Disponível em: <<http://www.le.ac.uk>>. Acessado em: 20 de janeiro de 2014

8. APÊNDICES

8.1. Apêndice A – Cronograma

ATIVIDADES	SEMESTRES						
	2018		2019		2020/2021		2022
	I	II	I	II	I	II	I
Coleta de amostras	■	■	■	■			
Padronização dos Métodos de Biologia Molecular		■	■	■			
Indels das Amostras		■	■	■	■		
Obtenção dos Resultados		■	■	■	■		
Elaboração do Plano de Qualificação		■	■				
Defesa do Plano de Qualificação				■			
Análise dos Resultados				■	■	■	
Preparação de Resumos para Publicação em Congressos na Área				■	■	■	■
Preparação de Artigos Científicos para Publicação					■	■	■
Elaboração da Tese					■	■	■
Defesa da Tese							■

8.2. Apêndice B – Artigo

and may initiate cancer development, including GC [9]. These genomic alterations in 46
miRNA genes (pri-miRNAs, pre-miRNAs, mature region and SEED region) or target sites 47
(RNAm) lead to post transcriptional regulation of mRNAs and the biogenesis of mature 48
miRNAs, which in turn affect the expression of target genes [10].

Table 1. Technical characteristics of the markers selected in this study.

Gene	ID	Region	Alleles	MAF	Primers	Amplification
------	----	--------	---------	-----	---------	---------------

interpretation of the data from this INDEL is that the altered Del allele in *MIRNA3652* is 204
downregulating genes such as *BCL2*, thus contributing to a reduced risk of GC, which 205
corroborates our data. 206

With an INDEL of 5 base pairs in the pre-miRNA region, *MIRNA4020*, located on 207

studies focused on other INDELS to better understand the involvement 257
of microRNA gene in gastric cancer. Our findings demonstrate that three INDELS 258
variants in genes encoding microRNAs (hsa-mir-4463, hsa-mir-3945 and hsa-mir-548H_4) 259
are associated with an increased risk of developing GC, whereas the hsa-mir -920 and hsa- 260

8.3. Apêndice C - Termo de Consentimento Livre e esclarecido

8.3. Apêndice C – Termo de Consentimento Livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo 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 você não será penalizado (a) de forma alguma. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Núcleo de Pesquisas em Oncologia, localizado no endereço: rua dos mundurucus, n. 4487, prédio da unacon do hospital barros barreto, telefone 3201- 6778, email cep.npo@gmail.com

Título do Projeto: ANÁLISE SISTEMÁTICA DE POLIMORFISMOS EM GENES DE MIRNAs EM PACIENTES COM CÂNCER NO ESTADO DO PARÁ.

O estudo pretende desenvolver painéis de marcadores moleculares do tipo inserção e deleção (indels) em miRNAs com amostras de sangue periférico de pacientes com câncer do Estado do Pará armazenadas no Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará. Serão utilizadas somente amostras devidamente autorizadas pelos próprios pacientes que serão contatados, esclarecidos a respeito da pesquisa na qual participarão e solicitados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, permitindo o uso de suas alíquotas de sangue e obtenção de seus dados clínicos, em nível de prontuário.

A utilização da sua amostra (sangue periférico armazenada) será realizada mediante sua livre aceitação e assinatura do deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os possíveis riscos encontrados neste projeto estão relacionados a confidencialidade de dados do paciente. Para diminuição destes riscos, serão utilizadas estratégias para manter o sigilo de informações, como associar dados dos pacientes à códigos de identificação. Quanto aos benefícios do estudo, podemos citar a (1) capacidade de utilização do painel de marcadores de MIRNA como ferramenta no prognóstico do câncer e (2) a possibilidade de um diagnóstico do paciente mais eficaz e menos invasivo.

Em qualquer etapa do estudo você poderá ter acesso ao pesquisador responsável para esclarecimento de quaisquer dúvidas, assim como total liberdade de sair da pesquisa caso não queira mais participar, sem qualquer prejuízo ao seu tratamento na Instituição. Os dados coletados serão mantidos sob sigilo, avaliados e utilizados apenas para esta pesquisa e você não será recompensado com qualquer tipo de pagamento por ter participado.

Não há benefício direto para o participante. Em qualquer etapa do estudo, os participantes do estudo ou seus responsáveis terão acesso aos profissionais relacionados com a pesquisa para o esclarecimento de dúvidas. Os principais

investigadores são Professor Dr. Sidney E. Batista dos Santos e o Msc. Antonio André Conde Modesto, que podem ser encontrados no Núcleo de Pesquisas em Oncologia, 2º Piso da UNACON. Av. Mundurucus, 4487, Guamá, Belém-PA, CEP: 66073-000, telefone (91) 3201-6776, e-mail: sidneysantos@ufpa.br e antoniocmodesto@gmail.com.

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

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. O material será utilizado somente para este estudo, e os resultados obtidos estarão a disposição dos doadores. A eventual inclusão dos resultados em uma publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do participante.

Não há despesas pessoais para cada participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consulta.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo um estudo **“ANÁLISE SISTEMÁTICA DE POLIMORFISMOS EM GENES DE MIRNAs EM PACIENTES COM CÂNCER NO ESTADO DO PARÁ”**.

Eu discuti com ANTONIO ANDRÉ CONDE MODESTO sobre a minha decisão de participar do estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o processo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido. Ressaltando que tal documento será emitido em duas vias, permanecendo uma com o participante e uma via com o pesquisador.

Data: _____ / _____ / _____

Nome do participante: _____

Assinatura do participante ou responsável legal: _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo:

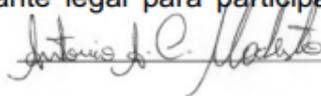


TABELA S9: Variantes alélicas em associações de *MIRNAs* para predisposição de GC. Análise de regressão logística com correção de Bon Ferroni. Genótipos: Del / Del = deleção homozigótica, Del / Ins = heterozigoto e Ins-Ins = inserção homozigótica.

Gene	Modelo	OR (IC 95%)	Valor P
<i>MIRNA630_rs139334001</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	1,40 (0,68-2,88)	0,344
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,68-2,0)	0,308
<i>MIRNA516B_2_rs10670323</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	1,00 (0,50-1,50)	0,37
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	0,91 (0,56-1,48)	0,709
<i>MIRNA4463_rs5877455_</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	1,78 (1,16-2,71)	0,007
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,65-1,65)	0,122
<i>MIRNA3171_rs35170395</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	1,34 (0,85-2,10)	0,203
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,42-1,50)	0
<i>MIRNA3945_rs145931056</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	1,95 (1,08-3,53)	0,021
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,18-5,37)	0,974
<i>MIRNA548H_4_rs150141473</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	1,75 (1,05-2,95)	0,028
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,15-14,2)	0,734
<i>MIR548AJ_2_rs145326096</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	1,53 (0,97-2,41)	0,06
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,91-2,55)	0,102
<i>MIRNA302C_rs199971565</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	1,00 (0,30-1,80)	0,034
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,35-2,00)	0,307
<i>MIRNA4274_rs202195689</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	0,58 (0,31-1,06)	0,081
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,80-2,00)	1
<i>MIRNA920_rs66686007</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	0,43 (0,24-0,77)	0,004
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	0,24 (0,02-2,71)	0,232
<i>MIRNA3652_rs62747560</i>	Ins / Ins + Ins / Del vs Del / Del	0,26 (0,10-0,62)	0,002
	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	1,02 (0,67-1,54)	0,93

Fonte: autor da pesquisa.

TABELA S10: Associações significativas de inserções e deleções na análise dos 11 INDELS em relação às variantes clínicas no GC. Genótipos: Del / Del = deleção homocigótica, Del / Ins = heterocigoto e Ins-Ins = inserção homocigótica.

			OR (IC 95%)	Valor P	
<i>MIRNA630_rs139334001</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	Tipo Difuso ou Intestinal	1,01 (0,46-2,21)	0,975	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,20-10,38)	0,718	
<i>MIRNA516B_2_rs10670323</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		1,00 (0,30-2,10)	0,514	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,43 (0,79-2,61)	0,242	
<i>MIRNA4463_rs5877455_</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		2,30 (1,27-4,18)	0,004	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,83-2,22)	0,216	
<i>MIRNA3171_rs35170395</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		0,88 (0,51-1,50)	0,636	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,21-1,78)	0,351	
<i>MIRNA3945_rs145931056</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		1,22 (0,65-2,27)	0,539	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,05-4,79)	0,52	
<i>MIRNA548H_4_rs150141473</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		1,46 (0,84-2,53)	0,179	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,07-8,43)	0,816	
<i>MIR548AJ_2_rs145326096</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		1,41 (0,84-2,37)	0,199	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,47-1,53)	0,574	
<i>MIRNA302C_rs199971565</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		1,92 (0,50-7,31)	0,338	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,05-4,83)	0,524	
<i>MIRNA4274_rs202195689</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		1,39 (0,57-3,39)	0,474	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,10-0,95)	0,402	
<i>MIRNA920_rs66686007</i>	Ins / Ins vs Del / Ins		1,00 (0,19-1,62)	0,271	
<i>MIRNA3652_rs62747560</i>	Ins / Ins vs Ins / Del + Del / Del		0,97 (0,59-1,62)	0,922	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,56-17,29)	0,178	
<i>MIRNA630_rs139334001</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		Lauren (Cardia e não-cardia)	0,83 (0,37-1,88)	0,659
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del			1,00 (0,20-10,38)	0,01
<i>MIRNA516B_2_rs10670323</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del			1,00 (0,03-7,57)	0,596
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,22 (0,64-2,33)		0,534	
<i>MIRNA4463_rs5877455_</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	2,20 (1,26-3,84)		0,005	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,71-2,57)		0,344	
<i>MIRNA3171_rs35170395</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	0,81 (0,47-1,42)		0,469	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,21-1,47)		0,246	
<i>MIRNA3945_rs145931056</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	0,78 (0,41-1,46)		0,435	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,02-1,48)		0,07	
<i>MIRNA548H_4_rs150141473</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	0,90 (0,50-1,61)		0,72	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,02-2,54)		0,21	
<i>MIR548AJ_2_rs145326096</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	2,01 (1,11-3,63)		0,017	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,66-2,33)		0,502	
<i>MIRNA302C_rs199971565</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	3,86 (0,48-31,39)		0,137	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,14-13,74)		0,762	
<i>MIRNA4274_rs202195689</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	0,62 (0,26-1,46)		0,283	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,10-0,95)		1	
<i>MIRNA920_rs66686007</i>	Ins / Ins vs Del / Ins	3,02 (0,86-10,54)		0,053	
<i>MIRNA3652_rs62747560</i>	Ins / Ins vs Ins / Del + Del / Del	0,73 (0,43-1,23)		0,24	
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del	1,00 (0,21-17,25)		0,545	

<i>MIRNA630_rs139334001</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	Diagnóstico precoce ou tardio	1,58 (0,74-3,39)	0,232
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,13-6,86)	0,961
<i>MIRNA516B_2_rs10670323</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		1,00 (0,10-0,95)	0,237
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,33. (0,75-2,38)	0,331
<i>MIRNA4463_rs5877455_</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		2,80 (1,64-4,80)	0
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,19-1,62)	0
<i>MIRNA3171_rs35170395</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		1,00 (0,01-0,06)	0
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		0,12 (0,07-0,21)	0
<i>MIRNA3945_rs145931056</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		1,34 (0,74-2,42)	0,334
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,07-8,43)	0,058
<i>MIRNA548H_4_rs150141473</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		0,97 (0,57-1,66)	0,918
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,59-1,74)	0,969
<i>MIR548AJ_2_rs145326096</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		1,00 (0,87-5,07)	0
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		7,41 (3,34-16,44)	0
<i>MIRNA302C_rs199971565</i>	Del / Del vs Ins / Del		1,00 (0,14-7,15)	0,994
<i>MIRNA4274_rs202195689</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		0,98 (0,44-2,19)	0,955
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,13-6,86)	0,498
<i>MIRNA920_rs66686007</i>	Ins / Ins vs Del / Ins		1,59 (0,67-3,80)	0,385
<i>MIRNA3652_rs62747560</i>	Ins / Ins vs Ins / Del + Del / Del		0,96 (0,59-1,55)	0,867
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,07-2,04)	0,239
<i>MIRNA630_rs139334001</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del	Estadiamento T1 vs T2 / T3 / T4	0,23 (0,03-1,77)	0,08
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,02-2,54)	1
<i>MIRNA516B_2_rs10670323</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		1,00 (0,45-121,44)	0,19
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		0,98 (0,38-2,52)	0,96
<i>MIRNA4463_rs5877455_</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		0,52 (0,23-1,13)	0,105
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,16-1,39)	0,141
<i>MIRNA3171_rs35170395</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		0,65 (0,27-1,58)	0,326
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,19-3,94)	0,845
<i>MIRNA3945_rs145931056</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		0,59 (0,19-1,76)	0,315
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,24-23,71)	0,183
<i>MIRNA548H_4_rs150141473</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		0,75 (0,31-1,83)	0,52
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,32-40,92)	0,344
<i>MIR548AJ_2_rs145326096</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		0,62 (0,25-1,50)	0,27
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,30-1,97)	0,572
<i>MIRNA302C_rs199971565</i>	Ins / Ins vs Del / Ins + Del / Del		0,00 (0,00 -0,00)	0,606
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0-0)	1
<i>MIRNA4274_rs202195689</i>	Ins / Ins vs Del / Ins		0,4 (0,05-3,09)	0,314
<i>MIRNA920_rs66686007</i>	Ins / Ins vs Del / Ins		0,42 (0,05-3,29)	0,352
<i>MIRNA3652_rs62747560</i>	Ins / Ins vs Ins / Del + Del / Del		1,48 (0,69-3,16)	0,316
	Ins / Ins + Del / Ins vs Del / Del		1,00 (0,02-2,54)	1

Fonte: autor da pesquisa.

8.5. Apêndice E – Artigos publicados como co-autor, durante o Doutorado.

da Silva *et al. BMC Res Notes* (2017) 10:646
<https://doi.org/10.1186/s13104-017-2963-4>

BMC Research Notes

SHORT REPORT **Open Access**

 CrossMark

Effect of genetic ancestry to the risk of susceptibility to gastric cancer in a mixed population of the Brazilian Amazon

Ellen Moreno da Silva^{1,2,4*}, Marianne Rodrigues Fernandes^{1,2†}, Darlen Cardoso de Carvalho^{1,2}, Luciana Pereira Colares Leitao¹, Giovanna Chaves Cavalcante², Esdras Edgar Batista Pereira¹, Antônio André Conde Modesto^{1,2}, João Farias Guerreiro², Paulo Pimentel de Assumpção^{1,2,3}, Sidney Emanuel Batista dos Santos^{1,2} and Ney Pereira Carneiro dos Santos^{1,2}

Schaan *et al. BMC Evolutionary Biology* (2017) 17:185
 DOI 10.1186/s12862-017-1027-7

BMC Evolutionary Biology

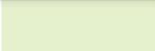
RESEARCH ARTICLE **Open Access**

 CrossMark

mtDNA structure: the women who formed the Brazilian Northeast

Ana Paula Schaan¹, Lorena Costa², Diego Santos², Antonio Modesto¹, Marcos Amador¹, Camile Lopes¹, Sílvia Helena Rabenhorst³, Raquel Montenegro⁶, Bruno D. A. Souza¹, Thayson Lopes⁴, France Keiko Yoshioka⁴, Giovanni Pinto⁴, Vivian Silbiger² and Ândrea Ribeiro-dos-Santos^{1,5*}


 Genes | Genomes | Genetics


 INVESTIGATION

Estimating Asian Contribution to the Brazilian Population: A New Application of a Validated Set of 61 Ancestry Informative Markers

Roberta B. Andrade,* Marcos A. T. Amador,[†] Giovanna C. Cavalcante,[†] Luciana P. C. Leitão,* Marianne R. Fernandes,* Antônio A. C. Modesto,* Fabiano C. Moreira,* André S. Khayat,* Paulo P. Assumpção,* Ândrea Ribeiro-dos-Santos,*[†] Sidney Santos,*[†] and Ney P. C. Santos*¹

*Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil, 66073-005 and [†]Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil, 66075-970

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Investigation of INDEL variants in apoptosis: the relevance to gastric cancer



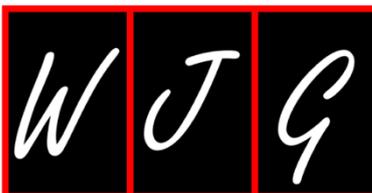
Giovanna Chaves Cavalcante¹, Milene Raiol de Moraes¹, Cristina Maria Duarte Valente¹, Caio Santos Silva¹, Antônio André Conde Modesto², Paula Baraúna de Assumpção², Paulo Pimentel de Assumpção², Sidney Santos^{1,2} and Ândrea Ribeiro-dos-Santos^{1,2*}

Am J Transl Res 2020;12(7):4043-4050
www.ajtr.org /ISSN:1943-8141/AJTR0106543

Original Article

Effects of alkaline water intake on gastritis and miRNA expression (miR-7, miR-155, miR-135b and miR-29c)

Juliana R Chaves^{1,5,6}, Carolina R T de Souza⁴, Antonio A C Modesto^{2,3}, Fabiano C Moreira^{1,2,3}, Eliel B Teixeira¹, Jonathan S Sarraf^{3,5}, Thaís S R Allen^{5,7}, Taíssa M T Araújo², André S Khayat^{1,2,3,4}



World Journal of
Gastroenterology

Submit a Manuscript: <https://www.f6publishing.com>

World J Gastroenterol 2018 December 21; 24(47): 5338-5350

DOI: 10.3748/wjg.v24.i47.5338

ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)

ORIGINAL ARTICLE

Basic Study

Piwi like RNA-mediated gene silencing 1 gene as a possible major player in gastric cancer

Taíssa Araújo, André Khayat, Luciana Quintana, Danielle Calcagno, Ronald Mourão, Antônio Modesto, Juliana Paiva, Adhara Lima, Fabiano Moreira, Edivaldo Oliveira, Michel Souza, Moneeb Othman, Thomas Liehr, Eliana Abdelhay, Renata Gomes, Sidney Santos, Paulo Assumpção



OPEN

Characterization of pharmacogenetic markers related to Acute Lymphoblastic Leukemia toxicity in Amazonian native Americans population

Darlen Cardoso de Carvalho¹, Alayde Vieira Wanderley^{1,3}, André Maurício Ribeiro dos Santos², Fabiano Cordeiro Moreira¹, Roberta Borges Andrade de Sá¹, Marianne Rodrigues Fernandes¹, Antonio André Conde Modesto¹, Tatiane Piedade de Souza¹, Amanda Cohen-Paes¹, Luciana Pereira Colares Leitão¹, Juliana Carla Gomes Rodrigues¹, Artur Luiz da Costa da Silva⁴, João Farias Guerreiro², Sidney Santos^{1,2}, André Salim Khayat¹, Paulo Pimentel de Assumpção^{2,5} & Ney Pereira Carneiro dos Santos^{1,2,6}✉

Schaan et al. *BMC Evolutionary Biology* (2020) 20:15
<https://doi.org/10.1186/s12862-020-1579-9>

BMC Evolutionary Biology

RESEARCH ARTICLE

Open Access

New insights on intercontinental origins of paternal lineages in Northeast Brazil



Ana Paula Schaan^{1†}, Leonor Gusmão^{2†}, Juliana Jannuzzi², Antonio Modesto³, Marcos Amador¹, Diego Marques¹, Silvia Helena Rabenhorst⁴, Raquel Montenegro⁴, Thayson Lopes⁵, France Keiko Yoshioka⁵, Giovanni Pinto⁵, Sidney Santos¹, Lorena Costa⁶, Vivian Silbiger⁶ and Ândrea Ribeiro-dos-Santos^{1,3*}

Journal of
Personalized
Medicine



Article

Influence of Polymorphism on the *NFkB1* Gene (rs28362491) on the Susceptibility to Sarcopenia in the Elderly of the Brazilian Amazon

Esdras E. B. Pereira¹ , Darlen C. de Carvalho², Luciana P. C. Leitão² , Juliana C. G. Rodrigues² , Antônio A. C. Modesto¹ , Evitom C. de Sousa³ , Sidney E. B. dos Santos^{1,2}, Marianne R. Fernandes² and Ney P. C. dos Santos^{1,2,*}

BIOMARCADORES PREDITIVOS EM TECIDOS BUCAIS E SUAS IMPLICAÇÕES NA SAÚDE EM UMA POPULAÇÃO MISCIGENADA DA AMAZÔNIA

Cristina Maria Duarte Valente  
Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brasil

Milene Raiol de Moraes  
Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brasil

Antonio André Conde Modesto  
Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brasil

Leandro Magalhães  
Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brasil

Ándrea Kely Campos Ribeiro-dos-Santos  
Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brasil

Cancer Chemotherapy and Pharmacology
<https://doi.org/10.1007/s00280-021-04327-w>

ORIGINAL ARTICLE



Influence of *FPGS*, *ABCC4*, *SLC29A1*, and *MTHFR* genes on the pharmacogenomics of fluoropyrimidines in patients with gastrointestinal cancer from the Brazilian Amazon

Marianne Rodrigues Fernandes^{1,2}  · Juliana Carla Gomes Rodrigues¹  · Elizabeth Ayres Fragoso Dobbin¹  ·
Lucas Favacho Pastana¹  · Danielle Feio da Costa¹  · Williams Fernandes Barra¹  ·
Antônio André Conde Modesto¹  · Paula Baraúna de Assumpção¹  · Artur Luiz da Costa Silva³  ·
Sidney Emanuel Batista dos Santos¹  · Rommel Mario Rodriguez Burbano^{1,2}  · Paulo Pimentel de Assumpção¹  ·
Ney Pereira Carneiro dos Santos¹ 

Received: 17 January 2021 / Accepted: 16 June 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Research, Society and Development, v. 11, n. 2, e27911225758, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25758>

CDH1 methylation in peritoneal washes as a prognostic factor for gastric cancer

Metilação de *CDH1* em lavados peritoneais como fator prognóstico para câncer gástrico

Metilación de *CDH1* en lavados peritoneales como factor pronóstico de cáncer gástrico

Received: 01/14/2022 | Reviewed: 01/22/2022 | Accept: 01/23/2022 | Published: 01/25/2022

Ana Carolina Favacho Miranda de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4985-2354>

Universidade Federal do Pará, Brasil

E-mail: carolina_mirandaa@hotmail.com

Antônio André Conde Modesto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1854-0358>

Universidade Federal do Pará, Brasil

E-mail: antoniocmodesto@gmail.com

Fabiano Cordeiro Moreira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2799-3546>

Article

The Role of *SLC22A1* and Genomic Ancestry on Toxicity during Treatment in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia of the Amazon Region

Sweny de S. M. Fernandes¹, Luciana P. C. Leitão¹, Amanda de N. Cohen-Paes¹ , Laura P. A. Gellen¹ , Lucas F. Pastana¹, Darlen C. de Carvalho¹ , Antônio A. C. Modesto^{1,2} , Ana C. A. da Costa¹, Alayde V. Wanderley¹, Carlos H. V. de Lima¹, Esdras E. B. Pereira² , Marianne R. Fernandes^{1,*} , Rommel M. R. Burbano^{1,2} , Paulo P. de Assumpção¹, Sidney E. B. dos Santos^{1,2} and Ney P. C. dos Santos^{1,2}

Article

UGT1A1 Gene Polymorphism Contributes as a Risk Factor for Lung Cancer: A Pilot Study with Patients from the Amazon

Esdras E. B. Pereira¹ , Luciana P. C. Leitão², Roberta B. Andrade¹, Antônio A. C. Modesto¹ , Bruno M. Fernandes², Rommel M. R. Burbano^{1,2} , Paulo P. Assumpção², Marianne R. Fernandes^{2,*} , João F. Guerreiro¹, Sidney E. B. dos Santos^{1,2} and Ney P. C. dos Santos^{1,2}



Genetic Variants of MicroRNA and DROSHA Genes in Association With the Risk of Tuberculosis in the Amazon Population

Diana Feio da Veiga Borges Leal¹, Mayara Natália Santana da Silva², Lucas Favacho Pastana¹, Marianne Rodrigues Fernandes^{1*}, Aidalucy do Socorro Costa de Athayde¹, Débora Christina Ricardo Fernandes Porchera¹, Cleonardo Augusto da Silva¹, Antônio André Conde Modesto¹, Paulo Pimentel De Assumpção¹, Sidney Emanuel Batista dos Santos^{1,2} and Ney Pereira Carneiro dos Santos¹