



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

**CARACTERIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS EM LINHAGENS DE  
CÂNCER GÁSTRICO**

MARIA ELISABETE SILVA SANTOS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.  
Orientador: Edivaldo Herculano Correa de Oliveira

Belém, 2022

# CARACTERIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS EM LINHAGENS DE CÂNCER GÁSTRICO

MARIA ELISABETE SILVA SANTOS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca a examinadora:

---

Prof. Dr. Edivaldo H. C. de Oliveira – Presidente  
IEC/UFPA

---

Profa. Dra. Andrea Ribeiro dos Santos – Membro Interno  
ICB/UFPA

---

Prof. Dr. Samir M. Moraes Casseb – Membro Externo  
NPO/UFPA

---

Profa. Dra. Barbara do Nascimento Borges – Membro Externo  
ICB/UFPA

---

Dr. Wallax Augusto S. Ferreira – Membro Externo  
SAMAM/IEC

---

Dra. Fernanda do E. Santo Sagica – Suplente  
SAMAM/IEC

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)

---

S237c SANTOS, MARIA.  
CARACTERIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS  
EM LINHAGENS DE CÂNCER GÁSTRICO / MARIA  
SANTOS. — 2022.  
81 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de  
Oliveira  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2022.

1. Câncer gástrico. 2. Alterações no número de  
cópias. 3. Linhagens celulares. I. Título.

CDD 304.5

---

## INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINACIADORAS

### INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

- Universidade Federal do Pará
  - Instituto Evandro Chagas
    - Laboratório de vírus HHV-4
- Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética

### INSTITUIÇÕES FINACIADORAS

- Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES).
- Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS)

Dedico esse trabalho aos meus Pais  
Maria Do Carmo da Silva Santos e Antônio Silva Santos

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pelo dom da vida, a Nossa Senhora de Nazaré que colocou força em meu coração para vencer essa etapa de minha vida.

Aos meus Pais Antônio Silva Santos e Maria Do Carmo da Silva Santos, pelos ensinamentos, força e amor incondicional.

Ao meu esposo Danilo Aguiar que não me negou apoio, carinho e incentivo. Obrigado, por compartilhar tantos momentos bons e aguentar tantas crises de estresse e ansiedade. Sem você do meu lado essa caminhada seria bem mais difícil.

Agradeço, especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira pela orientação e todo o suporte dado a esse trabalho, especialmente pela paciência e compreensão.

Ao Dr. Igor Brasil Costa, por me receber de portas abertas, pela co-orientação e por todas as conversas enriquecedoras sobre ciência.

A Dra. Ana Lucia Monteiro Wanzeller por todo o ensinamento.

A todos os amigos e colaboradores da seção de virologia especialmente dos Laboratórios de Vírus HHV-4 e Cultivo Celular, Retrovírus e Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética (Seção de meio Ambiente) que contribuíram direta e indiretamente para a execução desse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	Câncer gástrico	15
1.2	Epidemiologia	16
1.3	Câncer gástrico no Brasil	18
1.4	Etiologia	19
1.5	Infecções vírais e Câncer gástrico	20
1.5	Sintomas e Diagnóstico e estadiamento	21
1.6	Classificação do Câncer Gástrico	23
1.7	Câncer gástrico e Alterações no número de cópias	25
1.8	Linhagens Celulares de Câncer	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
2.1	Objetivo Geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
3.1	Linhagens de células	33
3.2	Extração e quantificação de DNA das linhagens AGP01 e ACP03	33
3.3	Hibridização Genômica Comparativa baseada em array (aCGH)	33
3.3.1	Digestão enzimática e marcação das amostras	34
3.3.2	Purificação e quantificação das Amostras	34
3.3.3	Tratamento pré-hibridização	34
3.3.4	Hibridização	35
3.3.5	Lavagem	35
3.3.6	Escaneamento e extração de dados	35
3.3.7	Análise de Dados	36
3.4	Coleta de dados a partir de repositórios “CellMiner”, CCLE e TCGA	36
3.5	Análises descritivas das CNAs nas linhagens AGP01 e ACP03	36
3.5.1	Identificação de CNAs relevantes para a carcinogênese gástrica	37
3.5.2	Análise <i>in silico</i> : Identificação dos genes diferencialmente expressos	38
3.5.3	Análise <i>in silico</i> Kaplan-Meier plotter”	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>39</b>
4.1	Caracterização Geral das linhagens gástricas	39
4.2	Ontologia geral	41
4.3	Análise comparativa entre as linhagens	44
4.4	Linhagens gástricas	44
4.5	Identificação de regiões ricas em supressores tumorais e oncogenes	49
4.6	Genes diferencialmente expressos	52
4.7	Análise dos genes diferencialmente expressos	54

<b>4.8</b>	<b>Análise Kmplot.....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

CG	<i>Câncer Gástrico</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
CNAS	<i>Copy number alterations</i>
TCGA	<i>CCNAS er Genome Atlas</i>
CCLC	<i>CCNAS er Cell Line Encyclopedia</i>
INCA	<i>Instituto Nacional do Câncer</i>
HHV-4	<i>HHV-4 Vírus</i>
MI	<i>Metaplasia Intestinal</i>
HDGC	<i>Hereditary Diffuse Gastric CCNAS er</i>
MSI	<i>Microsatellite instability</i>
GS	<i>Genomically Stable</i>
NIC	<i>gastric cCNAS er chromosome instability</i>
UICC	<i>Union for International CCNAS er Control</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
aCGH	<i>array Comparative Genomic Hybridization</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
GISTIC	<i>Genomic Identification of Significant Targets in Câncer</i>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Incidência mundial do Câncer Gástrico. Eixo X: Taxas de incidência por idade, Eixo Y: Incidência específica da região por sexo para câncer de estômago em 2020. Fonte SUNG et al (2021).....	17
Figura 2: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020, exceto pelo, não melanoma. Fonte (INCA, 2019).....	18
Figura 3: Taxa de incidência estimada para Câncer gástrico no ano de 2020 no estado do Pará e na Capital Belém. Fonte (Inca, 2019).....	19
Figura 4: Ideograma mostra a distribuição das CNAs encontradas. A. CNAs presentes na Linhagem AGP01. B CNAS presentes na linhagem ACP03.....	39
Figura 5: Diagrama de Veen, A mostra o quantitativo de seguimentos genômicos exclusivos e comuns em ambas nas linhagens AGP01 e ACP03. B número de genes. ....	40
Figura 6: Análise de enriquecimento funcional do Gene Ontology das linhagens AGP01 e ACP03. PB processo biológico, FM Função molecular, CC compartimento celular. (+) termos que foram enriquecidos com CNAs de ganho. (-) termos enriquecidos com CNAs de perdas. ....	41
Figura 7: Análise de enriquecimento funcional do Gene Ontology da linhagem ACP03. PB processo biológico, FM Função molecular, CC compartimento celular. (+) termos que foram enriquecidos com CNAs de ganho. (-) termos enriquecidos com CNAs de perdas. ....	42
Figura 8: Análise de enriquecimento funcional do Gene Ontology da linhagem AGP01. PB processo biológico, FM Função molecular, CC compartimento celular. (+) termos que foram enriquecidos com CNAs de ganho. (-) termos enriquecidos com CNAs de perdas. ....	43
Figura 9 - Regiões que tiveram alteração no número de cópias para perda (quadrados azuis), ou ganhos (quadrados vermelhos) com frequência $\geq 10\%$ e que são comuns as linhagens em estudo (AGP01 e ACP03). Perdas exclusivas da linhagem ACP03 (quadrados CNAS os). (A) Mostra as CNAS mais frequentes nas linhagens do CCLE/CellMiner (n = 1806). (B) CNAS presentes nas linhagens AGP01 e ACP03 e frequentes nas linhagens gástricas do CCLE (n=38). O Diagrama de Venny, mostra o conjunto de genes (C) presentes nas CNAS	

de perda e (D) conjunto de genes nas CNAS de ganho. ....45

Figura 10:O gráfico GISTIC mostra vinte e dois cromossomos estão organizados verticalmente de cima para baixo. A linha pontilhada indica centrômero. A linha verde representa o limiar de significância (valor  $q = 0,25$ ), os picos que ultrapassam a linha verde sinalizam as citobandas mais significativas. Picos Azuis são perdas, picos vermelhos representam ganhos. Em negrito estão destacadas as citobandas encontradas em linhagens de diversos cânceres do CCLE e AGP01 e ACP03 . As citobandas destacadas dentro dos retângulos ocorrem apenas as linhagens gástricas do CCLE e AGP01 e ACP03. ....48

Figura 11: O gráfico das Wikipathways mostra dez vias de sinalização mais, significativas ( $p\text{valor} < 0,05$ ). A. Vias enriquecidas com genes que tiveram ganho no número de cópias. B. Vias enriquecidas com genes que tiveram perda no número de cópias.....49

Figura 12:Diagrama de Veen mostra conjunto de biomarcadores que tiveram ganho ou perda no número de cópias e que estão presentes nas linhagens AGP01 e ACP03.....50

Figura 13:O Diagrama mostra a distribuição cromossômicas dos biomarcadores preditivos para câncer. ....50

Figura 14:Genes diferencialmente expressos em amostras tumorais de câncer gástrico. Cor vermelha indica nível de expressão em amostras tumorais, em cinza indica nível de expressão em amostras normais. ....52

Figura 15:Correlação da expressão de mRNA e alterações genômicas em ERBB2, MYC, CDK6, CYP51A1, ANKB1, GNA12, TERT, C10orf11. Os dados foram recuperados da web portal cBioportal of Câncer Genomics. A expressão de mRNA (RNAseq V2 RSEM) ( $\log_2$ ) é plotado contra alterações putativas do número de cópias de CNA de GISTIC. Esferas Azuis indica perda, esferas vermelhas indica ganho no número de cópias, esferas cinzas indicam número de diploide.....54

Figura 16:Frequência dos genes diferencialmente expressos em amostras de câncer gástrico .....55

Figura 17: Análise kmPLot dos genes diferencialmente expressos. ....56

## LISTA DE TABELA

Tabela 1: Vias <i>KEEG</i> enriquecidas com CNAs presentes nas linhagens AGP01 e ACP03 e nas linhagens gástricas (n=38) do CCLE. ....	46
Tabela 2:CNAS associadas a câncer e que são comuns entre as linhagens AGP01, ACP03 e as linhagens de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso MKN45 e FU97 e tipo intestinal MKN74 e MKN7 .....	47
Tabela 3:Principais vias enriquecidas com oncogenes e supressores tumorais encontrados nas linhagens AGP01 e ACP03. ....	51

## RESUMO

O câncer gástrico (CG) apresenta uma etiologia complexa, responsável por cerca de 780.000 óbitos anualmente no mundo. Essa complexidade dificulta o entendimento do papel das alterações genéticas em seu desenvolvimento. Dessa forma, a caracterização das anormalidades genômicas em linhagens estabelecidas a partir de células tumorais de CG pode ajudar a encontrar genes importantes e esclarecer mecanismos da carcinogênese gástrica e auxiliar no direcionando abordagens e tratamentos eficazes para o CG, em especial de populações nas quais há um alta incidência desse tipo de neoplasia. Poucas linhagens tumorais gástricas foram estabelecidas e caracterizadas até o momento, representando uma amostra pequena da variabilidade genética humana. No Pará, o CG apresenta taxas de mortalidade acima da média nacional. Assim, a caracterização das anormalidades genômicas em linhagens estabelecidas a partir de pacientes dessa população, etnicamente miscigenada, pode trazer dados interessantes que nos auxiliem a entender a alta taxa de incidência de CG, bem como direcionar abordagens e tratamentos eficazes para esses pacientes. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar o genoma de duas linhagens de câncer gástrico, AGP01 e ACP03, estabelecidas a partir de amostras tumorais de pacientes paraenses, e identificar alterações no número de cópias (CNAs) por meio de Hibridização Genômica Comparativa em microarranjos (aCGH). Os resultados indicaram que ambas as linhagens ainda conservam características genômicas associadas ao CG do tipo intestinal. As regiões de ganho 7p11, 7p21, 8q24 como as mais ricas em oncogenes e as regiões de perdas 19p13, 3q25-q27, 15q21-q26 como as mais ricas em supressores tumorais em ambas as linhagens. Essas regiões já foram associadas ao CG em estudos prévios, e influenciam diretamente as vias de sinalização do ciclo celular, PI3K-AKT e predisposição para infecção viral. Identificamos a perda da citobanda 9p21, que inclui um cluster de IFN do tipo 1, o que pode influenciar no escape de células tumorais da imunovigilância. Nossa análise *in silico* também apontou para os genes *GNAD12*, *TERT*, *C10orf11*, *ERBB2*, *MYC*, *CDK6*, *CYP51A1*, *ANKIB* como genes importantes para câncer gástrico, uma vez que, tiveram o aumento da sua expressão associada ao ganho no número de cópias. Além disso, apresentaram uma super expressão em amostras tumorais do TCGA quando comparados com tecido normal, os genes *ERBB2*, *GNAD12* e *TERT* tiveram o aumento da expressão consistente com a piora no prognóstico. Já a relação de marcadores moleculares encontrados principalmente nos genes *CYP51A1* e *ANKIB* ainda é pouco esclarecido no CG e devem ser melhor exploradas por experimentos *in vitro* e *in vivo*. Concluímos, que as linhagens AGP01 e ACP03 conservam alterações genômicas relacionadas aos seus tipos histológicos originais, representando importantes modelos para experimentos *in vitro* que busquem desvendar a biologia e comportamento desses tipos tumorais, incluindo ensaios pré-clínicos.

Palavras-chave: Câncer Gástrico, Alterações no Número de Cópias, Linhagens Celulares, Deleções, Amplificações.

## ABSTRACT

Gastric cancer (GC) has a complex etiology, accounting for about 780,000 deaths annually worldwide. Both ethnicity and gender influence the risk of developing gastric cancer. This complexity makes it difficult to understand the role of genetic alterations in its development. Thus, the characterization of genomic abnormalities in cell lines established from GC tumors can help to unravel new genetic markers, directing effective approaches and treatments for GC, especially in populations in which there is a high incidence of this type of neoplasm. Few gastric tumor lineages have been established and characterized so far, representing a small sample of human genetic variability. In Pará, the GC presents mortality rates above national rates. Thus, the characterization of genomic abnormalities in cell lines established from patients in this population, ethnically miscegenated, can bring interesting data that help to understand the high incidence rates of GC, as well as direct approaches and effective treatments for these patients. Thus, the aim of this work was to characterize the genome of two GC cell lines, AGP01 and ACP03, established from tumor samples from patients from Pará, identifying copy number alterations (CNAs) through Microarray Comparative Genomic Hybridization (aCGH). The results indicated that both cell lines still retain genomic characteristics associated with intestinal-type GC. The gain in 7p11, 7p21, 8q24 corresponded to the richest regions in oncogenes and the loss in 19p13, 3q25-q27, 15q21-q26 as the richest regions in tumor suppressors in both cell lines. These regions have already been found in other studies to be associated with GC, and directly influence cell cycle signaling pathways, PI3K-AKT as well as predisposition to viral infection. We identified the loss of the 9p21 cytoband, which includes a type 1 NFI cluster, which may influence the escape of tumor cells from immunosurveillance. Our *in silico* analysis also pointed to genes *GNAD12*, *TERT*, *C10orf11*, *ERBB2*, *MYC*, *CDK6*, *CYP51A1*, *ANKIB* as important molecular markers for gastric cancer, since their increased expression was associated with a gain in copy number. In addition, they showed an overexpression of TCGA in tumor samples when compared to normal tissue, *GNAD12*, *TERT*, *C10orf11*, *ERBB2* had the increase in expression consistent with worse prognosis. The relationship of molecular markers found mainly in genes *CYP51A1* and *ANKIB* is still unclear in GC and should be better explored by *in vitro* and *in vivo* experiments. We therefore conclude that the cell lines AGP01 and ACP03 retain genomic alterations related to their original histological types, representing important models for *in vitro* experiments that aim to unravel the biology and behavior of these tumor types, including preclinical assays.

Keywords: Gastric Cancer, Copy Number Alterations, Cell Lines, Deletions, Amplifications.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer gástrico

Todos os anos, cerca de 1 milhão de pessoas são diagnosticadas com Câncer Gástrico (CG) em todo o mundo (RAWLA; BARSOUK, 2019). Assim, globalmente, este tipo de câncer é um dos cinco mais incidentes, sendo responsável por aproximadamente 780.000 óbitos por ano (BRAY *et al.*, 2018; CURADO *et al.*, 2019; GUINDALINI *et al.*, 2019). Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, a maioria dos países ainda registram taxas de sobrevivências menores que 30% em casos de CG (JIN *et al.*, 2015). Além disso, a maior parte dos estudos populacionais relata que cerca de 40% dos pacientes desenvolvem metástase tendo sobrevida média de 3 a 4 meses (RIIHIMÄKI *et al.*, 2016).

A diversidade das alterações genéticas encontradas no CG ainda não são totalmente esclarecidas, o que traz desafios para o diagnóstico precoce, limitando as opções de tratamento e um prognóstico mais assertivo (ARAKAWA *et al.*, 2017). A caracterização das anormalidades genômicas pode ajudar a desvendar novos marcadores genéticos direcionando abordagens e tratamentos mais eficazes, especialmente aqueles direcionados a mecanismos de progressão do CG (RIIHIMÄKI *et al.*, 2016).

Dentre as alterações genéticas acumulativas observadas em células cancerosas, destacam-se as alterações no número de cópias (CNAs) de segmentos de DNA, que pode ter 1Kb de tamanho ou mais, pois são resultantes da amplificação, ganho, perda ou exclusão de segmentos genômicos (ARAKAWA *et al.*, 2017; DIAB *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2018). Ou seja, qualquer desvio do estado do número de cópias diploides ( $2n$ ) de uma região do genoma representa uma CNA (HARBERS *et al.*, 2021).

A implementação da técnica de hibridização genômica comparativa baseada em microarray (aCGH) tem possibilitado pesquisas mais aprofundadas sobre o papel das CNAs no CG (SEABRA *et al.*, 2014). Através do aCGH de tumores e linhagens de células gástricas tem sido possível identificar novas regiões e genes importantes na patogênese do câncer gástrico (SEABRA *et al.*, 2014;

TAKENO *et al.*, 2009). A variação no perfil de CNAs do CG permite que se identifiquem subtipos moleculares de câncer, que diferem entre si no que diz respeito aos seus possíveis genes “drivers” e mecanismos molecular (TAKENO *etal.*, 2009). Um dos “drivers” mais conhecidos é o MYC (8q24.21), um fator de transcrição cuja função é regular o ciclo celular, estando geralmente superexpresso em células cancerígenas, estando relacionado à progressão do GC (CALCAGNO *et al.*, 2005).

A identificação de regiões cromossômicas mais susceptíveis a alterações genômicas, bem como o conhecimento do conjunto de genes e suas vias de regulação dentro da carcinogênese gástrica são passos importantes para a compreensão da dinâmica tumoral, o que lança luz a novos marcadores moleculares, além de direcionar estudos para prognóstico e tratamento (ANDOR; MALEY; JI, 2017).

Assim, plataformas de dados como Atlas do Genoma do câncer (TCGA) e Cancer Cell Li-ne Encyclopedia (CCLE), fornecem inúmeras informações sobre os perfis moleculares e histopatológicos de linhagens celulares e amostras tumorais em diferentes populações, além de avaliar a eficácia terapêutica dos fármacos anticâncer e são amplamente utilizados para direcionar pesquisas, caracterização de linhagens (BARRETINA *et al.*, 2012).

## **1.2 Epidemiologia**

Fatores como avanços na área da medicina diagnóstica e preventiva e o surgimento de novas drogas para o tratamento do CG têm contribuído para a redução das taxas de mortalidade (ILIC; ILIC, 2022; MORGAN *et al.*, 2022). No entanto, mesmo nesse cenário promissor, o CG possui a quarta maior taxa de mortalidade por câncer no mundo (BRAY *et al.*, 2018).

A Ásia oriental é responsável por 60% dos novos casos de câncer e possui as maiores taxas de mortalidade (21,1/100.000 para homens e 8,8/100.000 para mulheres), seguida da Europa Oriental e América do Sul, enquanto que o Sul da Ásia Central, Norte da Europa, América do Norte e África possuem as menores taxas incidência. Figura 1 (SUNG *et*



al., 2021).

I

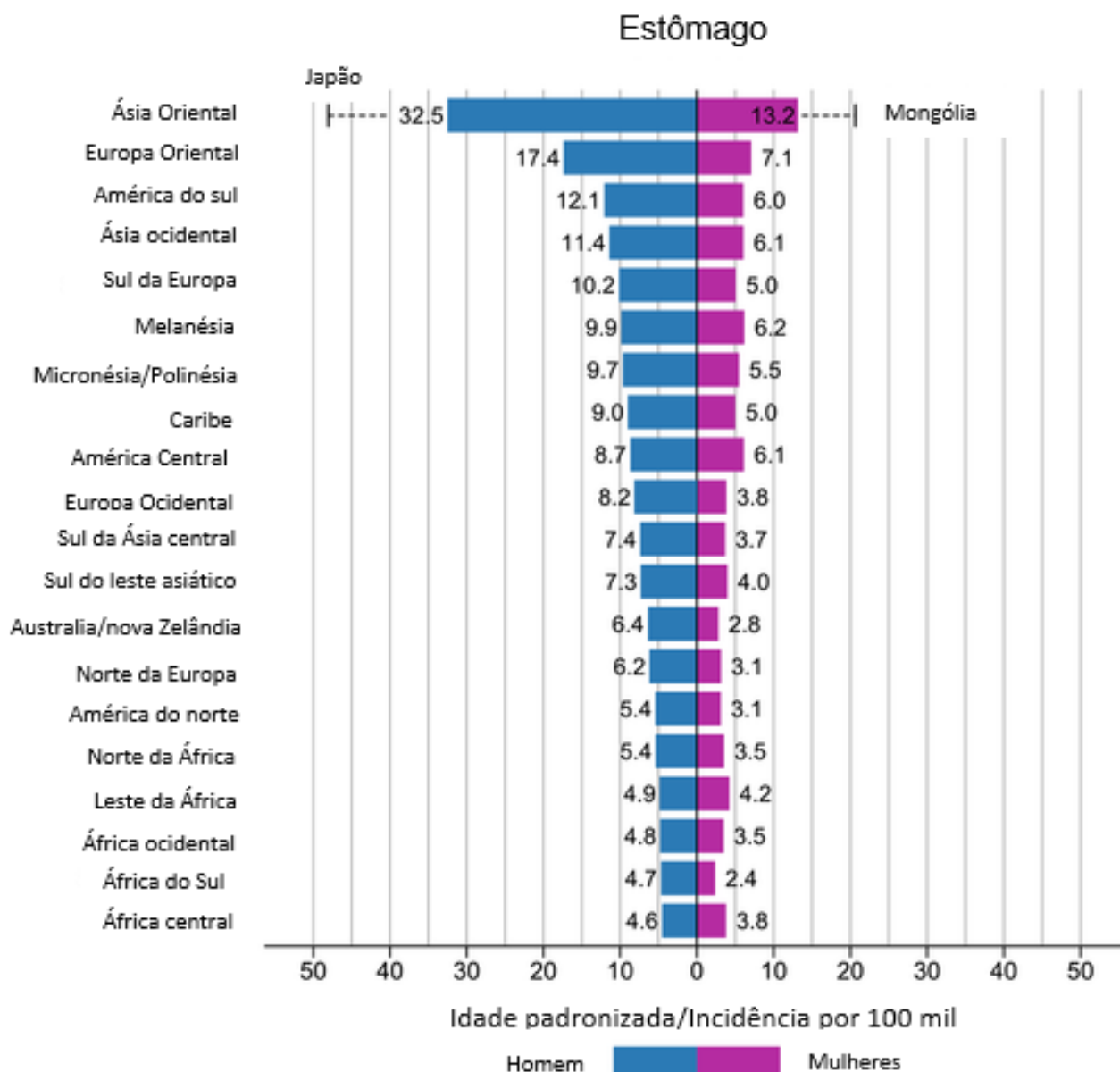




Figura 1: Incidência mundial do Câncer Gástrico. Eixo X: Taxas de incidência por idade, Eixo Y: Incidência específica da região por sexo para câncer de estômago em 2020. Fonte SUNG et al (2021).

Essas diferenças regionais na incidência do CG estão relacionadas ao crescimento e envelhecimento da população, uma vez que há correlação entre o

aumento da idade e o aumento do risco de CG. Além disso, o desenvolvimento socioeconômico de cada região é um fator preponderante para o diagnóstico precoce e tratamento, diminuindo a mortalidade (BRAY et al., 2018).

### 1.3 Câncer gástrico no Brasil

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) aponta que para o triênio 2020-2022 ocorrerão 21 mil novos casos de CG. Para homens, a estimativa é de 13.360 casos, enquanto que para mulheres esse número chega a 7.780 novos casos. No geral, o CG é o quarto câncer mais frequente entre os homens e o sexto entre as mulheres (figura 2) e a faixa etária mais atingida é entre 60 e 70 anos (INCA, 2019).

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	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	5.230	2,3%

\* Números arredondados para múltiplos de 10

Figura 2: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020, exceto pelo, não melanoma. Fonte (INCA, 2019).

Em relação às regiões, o câncer gástrico é mais incidente em homens do norte (11,75/100 mil) e nordeste (10,65/100 mil) e em mulheres do sul (9,15/100 mil) e do Norte (6,03/100 mil) (INCA, 2019). No estado do Pará, o CG é o segundo tipo de câncer mais incidente, ficando atrás apenas do câncer de próstata nos homens e câncer de mama nas mulheres (INCA, 2012). Fatores como a dieta rica em sal, a ingestão de caça e peixes complementada com farinha de mandioca pigmentada com tartariza (SOARES *et al.*, 2015), associada a falta de políticas de saúde e atenção preventiva são fatores que podem estar contribuindo para essas taxas de incidência e mortalidade do CG no estado do Pará, como mostra a figura 3 (MENDES; SANTANA,

2019).

## 1.4 Etiologia

A etiologia do CG é multifatorial e vários fatores tem sido associados à sua incidência. Hábitos alimentares (ISLAMI *et al.*, 2009), tabagismo (PRAUD *et al.*, 2018), obesidade (O’SULLIVAN *et al.*, 2018) consumo de álcool (DENG *et al.*, 2021) e infecções por agentes patogênicos desempenham um papel importante na incidência de câncer gástrico (DE SOUZA *et al.*, 2014; NISHIKAWA *et al.*, 2018). Adicionalmente, o componente genético nos casos de CG é significativo uma vez que, a hereditariedade está associada a 10% dos casos deste tipo de câncer (VOGELAAR *et al.*, 2012).

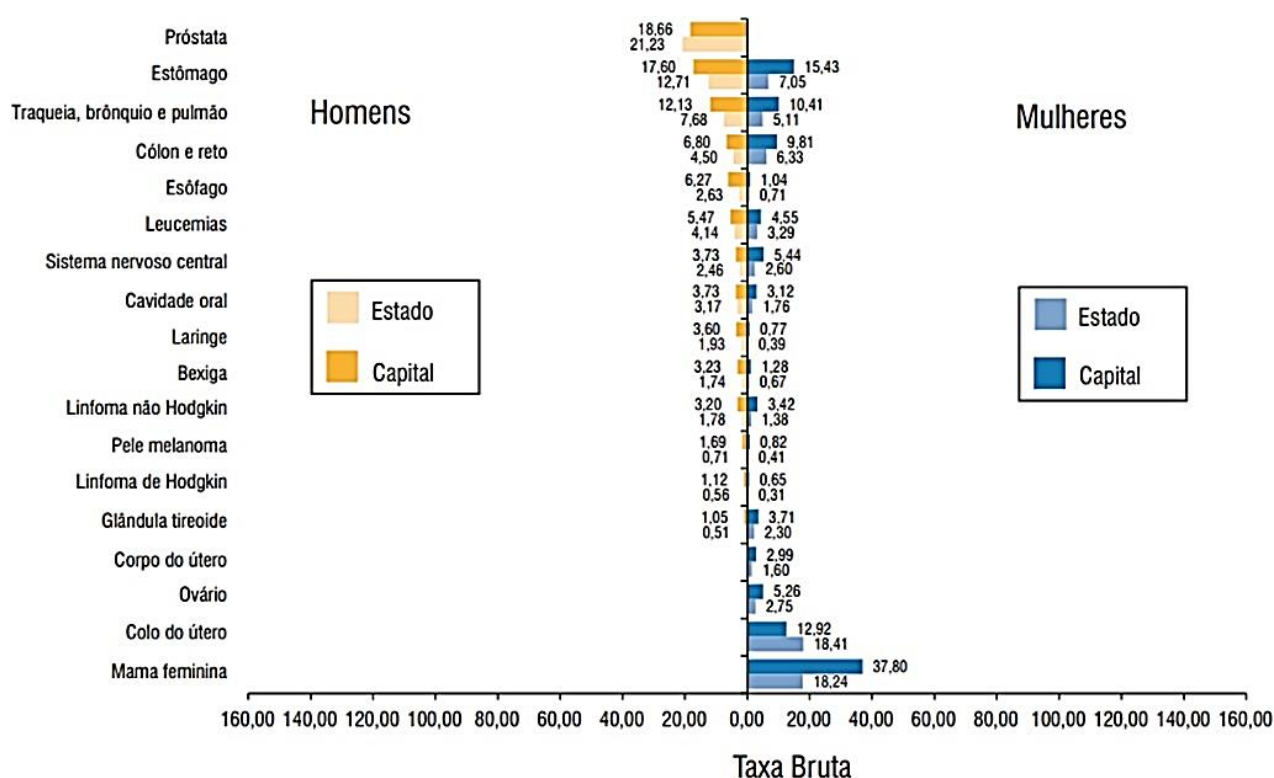


Figura 3: Taxa de incidência estimada para Câncer gástrico no ano de 2020 no estado do Pará e na Capital Belém. Fonte (Inca, 2019).

O consumo de alimentos ricos em sal, contaminados com amianto ou metais pesados, carnes vermelhas, processadas e/ou em conserva, defumados até à exposição contínua da mucosa gástrica a alimentos em altas temperaturas estão associadas ao aumento de risco de CG (FERRO *et al.*, 2020; ISLAMI *et al.*, 2009).

Adicionalmente, o tabagismo e o consumo de álcool tem importância na incidência de CG (DENG *et al.*, 2021), sendo que o tabagismo tem sido frequentemente associado ao subtipo difuso ou cárdia (PRAUD *et al.*, 2018) e o consumo de álcool, pode aumentar o risco de CG devido a produção de metabólitos primários e acetaldeídos (ARAKAWA *et al.*, 2017; DENG *et al.*, 2021; KARCZEWSKI *et al.*, 2019; YOO *et al.*, 2021). A obesidade é outro fator que contribui para a carcinogênese através de mecanismos como a sinalização alterada da insulina, inflamação crônica de baixo grau e alteração dos hormônios sexuais (KARCZEWSKI *et al.*, 2019).

A hereditariedade representa cerca de 1% a 3% dos casos totais de CG (SLAVIN *et al.*, 2019). A maior parte dos casos hereditários envolve a síndrome do câncer gástrico difuso hereditário (HDGC), que geralmente é diagnosticado em torno dos 37 anos de idade (SLAVIN *et al.*, 2019). Indivíduos que nascem com mutações no gene E-caderina (*CDH1*) tem até 50% chances de desenvolver a HDGC (VOGELAAR *et al.*, 2012). Outras síndromes associadas a aumento do risco de CG são, síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar (2%) causada por deleção do supressor tumoral *APC* (tumor adenomatous polyposis coli) localizado no cromossomo 5q21, Câncer de Cólon Hereditário sem Polipose, que envolve mutações nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e Síndrome de Li-Fraumeni onde há prejuízo na função dos genes *TP53* (SETIA *et al.*, 2015).

Infecções por *H. pylori* ocorre em mais de 50% da população mundial e é uma das mais prevalentes entre os seres humanos (BAKHTI; LATIFI-NAVID; ZAHRI, 2020). Do ponto de vista da incidência de CG, a infecção por *H. pylori* é significativa e representa aproximadamente 5,5% de todas as condições malignas em todo o mundo (KIM; WANG, 2021). A presença da *H. pylori* no estômago do hospedeiro causa inflamação crônica que resultam em alterações morfológicas da mucosa gástrica, como o desaparecimento das células parietais e de células glandulares por autofagia o que caracteriza a gastrite atrófica, seguida de metaplasia intestinal (MI), e posteriormente lesões malignas, como displasia e GC (DINCĂ; MELIȚ; MĂRGINEAN, 2022).

### **1.5 Infecções vírias e Câncer gástrico**

O principal vírus associado ao CG é o Epstein-Bar (HHV-4), detectado pela primeira

vez em 1964, em células de linfoma de primeira infância ou Linfoma de Burkitt (LB), muito comum na África. A presença de um vírus com morfologia típica do grupo Herpes em células de LB foi confirmada através de microscopia eletrônica. Deste modo, o HHV-4 passou a ser classificado como pertencente à família Herpesviridae, sendo também denominado de Gamaherpesvirus humano 4 (HHV-4) (Balfour et al. 2015).

O HHV-4 é um dos vírus mais comuns em seres humanos, pois está presente em cerca de 90-95% da população adulta mundial (Balfour et al. 2015), sendo transmitido pela saliva e infectando as células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares, onde frequentemente ocorre a produção de novas partículas virais infecciosas (Balfour et al. 2015).

O potencial oncogênico do HHV-4 é demonstrado pela expressão de várias proteínas oncogênicas que interferem diretamente nas vias de proliferação, apoptose, diferenciação e migração celular. Além disso, ao integrar-se ao genoma do hospedeiro, o DNA viral pode causar mutações em genes como o TP53, importante regulador do ciclo celular (Ribeiro et al. 2017). Deste modo, o HHV-4 induz a transformação dos linfócitos B e células epiteliais, sendo apontado como agente causador da mononucleose infecciosa (doença do beijo), do linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin (Cao et al. 2017). Além disso, está associado ao fenótipo maligno das células tumorais: o carcinoma nasofaríngeo em 95% dos casos e câncer gástrico, em 10% dos casos (Dummire et al., 2018).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o contato célula a célula entre linfócitos B infectados com HHV-4 e células epiteliais gástricas tem sido suficiente para a entrada do vírus nessas células (IMAI; NISHIKAWA; TAKADA, 1998). Doenças como refluxo, gastrite crônica e úlcera gástrica podem aumentar a chance de interação entre as células epiteliais gástricas lesionadas e os linfócitos B infectados com o HHV-4, favorecendo a infecção por contato célula a célula. Uma vez estabelecida a infecção do epitélio gástrico, o HHV-4 tende a permanecer em estado de latência expressando proteínas virais como LMP1 e EBNA1 entre outras, tidas como oncoproteínas, pois induzem a transformação e imortalização dessas células (YANG *et al.*, 2019).

## **1.5 Sintomas e Diagnóstico e estadiamento**

Os sintomas do CG em estágio inicial não são comuns, e em estágios posteriores são variados e inespecíficos, podendo estar associados à várias outras patologias e tipos de câncer dificultando um diagnóstico precoce (WADDINGHAM *et al.*, 2021). Falta de apetite, náuseas, vômitos com ou sem sangue, anemia, dores abdominais, sangue nas fezes são alguns dos mais comuns presentes em pessoas com CG (JOSHI; BADGWELL, 2021).

Vários exames de imagem são importantes para auxiliar no prognóstico e identificar o estágio do CG como ressonância magnética e tomografia computadorizada (ZYTOON; EL-ATFEY; HASSANEIN, 2020). No entanto, o principal método diagnóstico é a endoscopia digestiva alta com biópsia ou ecoendoscopia (HORIUCHI *et al.*, 2021).

Esse método identifica tumor precoce raro (T1) e na maioria das vezes tumores de T2 a T4 no tórax/abdome/pélvica (KIM; WANG, 2021). No entanto, a ecoendoscopia tem dificuldade de identificar com precisão metástases nodais (JOSHI; BADGWELL, 2021). Nesses casos a tomografia computadorizada é mais sensível que a ecoendoscopia, pois consegue detectar metástases em outros órgãos como fígado e pulmão, sendo o principal método de estadiamento (BARCHI *et al.*, 2020). O processo de busca da localização e extensão do CG (e outros tipos de câncer) é denominado estadiamento, e é um procedimento crítico para o médico oncologista realizar um prognóstico mais assertivo (TANIGUCHI *et al.*, 2019).

O sistema de estadiamento mais utilizado atualmente foi criado pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC 8ª edição). Esse sistema avalia o estágio do tumor utilizando 3 critérios primeiro a extensão do tumor primário (T), segundo pelo o grau de disseminação para os linfonodos (N) e terceiro a presença de metástase (M) (BARCHI *et al.*, 2020) como mostra o quadro 1.

Quadro 1 - Classificação TNM de câncer gástrico.

Tumor Primário (T)	
<b>Tx</b>	Tumor primário não pode ser avaliado.
<b>T0</b>	Sem evidência de tumor primário.
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i> tumor intraepitelial sem invasão de lâmina própria, displasia de alto grau.
<b>T1</b>	Tumor invade a lâmina própria, muscular da mucosa ou submucosa.
<b>T1a</b>	Tumor invade a lâmina própria ou muscular da mucosa
<b>T1b</b>	Tumor invade a submucosa.
<b>T2</b>	Tumor invade a muscular própria.
<b>T3</b>	Tumor invade a subserosa sem invasão do peritônio visceral ou de estruturas adjacentes.
<b>T4</b>	Tumor invade a serosa (peritônio visceral) ou estruturas adjacentes.
<b>T4a</b>	Tumor invade a serosa (peritônio visceral).
<b>T4b</b>	Tumor invade estruturas adjacentes.
Linfonodos Regionais (N)	
<b>Nx</b>	Metástases em linfonodos não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Ausência de metástases em linfonodos
<b>N1</b>	Metástase em 1 a 2 linfonodos regionais.
<b>N2</b>	Metástase em 3 a 6 linfonodos regionais.
<b>N3</b>	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais.
<b>N3a</b>	Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais.
<b>N3b</b>	Metástase em mais de 16 linfonodos regionais.
Metástases a distância (M)	
<b>Mx</b>	Metástases a distância não podem ser avaliadas.
<b>M0</b>	Ausência de metástases à distância.
Estádio	
<b>0</b>	TisN0M0
<b>I</b>	T1N0M0
	T2N0M0
<b>IIA</b>	T2N1-3M0
	T1N1-3M0
<b>IIB</b>	T3N0M0
	T4aN0M0
<b>IIIA</b>	T3N1-3M0
	T4aN1-3M0
<b>IVA</b>	T4b qualquer N M0
<b>IVB</b>	qualquer T qualquer N M1

Adaptado de (SOBIN; WITTEKIND; INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER, 2002)

## 1.6 Classificação do Câncer Gástrico

A complexidade do CG tem sido alvo de vários estudos que buscam compreender a gênese tumoral bem como suas características histológicas, anatômicas, fisiopatológicas e moleculares, deste modo, surgiram diferentes formas de classificação, permitindo comparações entre tumores que mesmo semelhantes, apresentassem um conjunto de características distintas (BARCHI *et al.*, 2020; BASS *et al.*, 2014; LAUREN, 1965; OUE *et al.*, 2019).

A classificação de Lauren (1965) é baseada na histologia, dividindo os CG em subtipo intestinal e difuso. O subtipo intestinal é caracterizado por tumores bem diferenciados, as células tumorais se agrupam em formações glandulares ou

tubulares. A metástase ocorre na maioria das vezes via sistema linfático e hematogênico com baixo grau de infiltração na mucosa gástrica. É associado a gastrite crônica atrófica e metaplasia intestinal provocada pela infecção pela *H. pylori* e apresenta maior prevalência em homens com o aumento da faixa etária (BRAY *et al.*, 2018).

Por outro lado, o subtipo difuso é pouco diferenciado e sem glândulas, pequenos grupos de células se isolam, organizam-se em anel de sinete e tendem a se espalhar através de metástases precoces via hematogênica ou peritoneal, com maior grau de infiltração da mucosa gástrica (PETRELLI *et al.*, 2017). O tipo difuso é mais frequente em indivíduos com menos de 40 anos de idade e atinge homens e mulheres na mesma proporção. Tem origem no epitélio gástrico normal, sem lesão neoplásica (DHOBI *et al.*, 2013).

Avanços recentes na tecnologia genômica e análises de alto rendimento permitiram a criação em 2005 do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) um projeto de genômica do câncer que caracterizou alterações genéticas de mais de 20.000 cânceres primários e amostras normais correspondentes abrangendo 33 tipos de câncer usando matrizes de polimorfismo de nucleotídeo único de alta densidade (SNP) (HARBERS *et al.*, 2021). Assim, o TCGA identificou mutações, perfis de metilação, e CNAs que podem afetar um ou múltiplos *locis* que prejudicavam principalmente o funcionamento de genes relacionados à integridade do genoma, remodelação da cromatina, adesão celular e citoesqueleto, e motilidade celular (CHIA, N.-Y.; TAN, 2016). O mapeamento das principais alterações revelou o comprometimento das vias oncogênicas canônicas, genes envolvidos na sinalização Wnt e receptor tirosina quinase (RTK) (YIN *et al.*, 2022).

De acordo com as características moleculares, o TCGA classificou o CG em quatro tipos. O subtipo positivo para o vírus HHV-4 (HHV-4CG) é responsável por 10% dos casos de CG, possui menor tendência de metástase nos linfonodos, menor taxa de mortalidade e em 80% dos casos há mutações no gene *PI3K*, além de ampliações dos genes *JAK2*, *CD274*, *PDCD1LG2* e *ERBB2* e deleções em *PTEN*, *SMAD4*, *CDKN2A* e *ARID1A* (NOWALK; GREEN, 2016).



Outro subtipo é o com Instabilidade de Microssatélites (MSI), associado ao adenocarcinoma do tipo intestinal, mais frequente em mulheres de idade avançada (PULIGA *et al.*, 2021). A principal característica do subtipo MSI é a hipermetilação do promotor do gene *MLH1*, um dos envolvidos no sistema de reparo de incompatibilidade ou reparo de mal pareamento. Esse sistema de reparo é composto de proteínas que formam os complexos *MSH2/MSH6/MSH3* e *MLH1/PMS2* responsáveis por primeiro, se ligar e detectar erros de pareamento. Segundo responsável pela excisão e a ressíntese das bases (RATTI *et al.*, 2018).

A ausência da expressão de um ou mais elementos dessa maquinaria determina a deficiência do processo de reparo levando a um tumor com alta carga de mutação principalmente em genes importantes para a carcinogênese como os genes *PIK3CA*, *ERBB3*, *ERBB2* e *EGFR* (7p11.2) (PULIGA *et al.*, 2021).

O subtipo Geneticamente Estável (GS) é mais prevalente no tipo difuso, sendo pouco diferenciado, ocorre em paciente mais jovens, com mutações nos genes *TP53*, *CDH1* e *RHOA* (RAMOS *et al.*, 2021). Finalmente, o subtipo com Instabilidade Cromossômica (NIC) está presente em 50% dos CG, sendo que a maioria dos casos com esse perfil vão apresentar mutações no *TP53*, *ARID1A*, *KRAS*, *PIK3CA*, *RNF43*, *ERBB2* e *APC* e ampliações de genes que codificam receptores de tirosina quinases (RTKs), importantes para o crescimento celular descontrolado (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

### **1.7 Câncer gástrico e Alterações no número de cópias**

Variações do número de cópias (CNV) são variações genéticas que ocorrem na linhagem germinativa e levam a mudanças no número de cópias das regiões genômicas (KHALIL *et al.*, 2020; MACDONALD *et al.*, 2014). Por outro lado, as alterações no número de cópias (CNA) podem ser definidas como qualquer variação do número de cópias diploides (2n) de um segmento genômico em comparação com um genoma de referência (HARBERS *et al.*, 2021).

As CNAs de ganho ocorrem quando há um aumento no número de cópias de um cromossomo ou segmento cromossômico, sendo que quando ocorre um ganho de alto nível

de um segmento cromossômico, frequentemente definido como 8 cópias, temos uma amplificação (SANTARIUS *et al.*, 2010).

Quando estão relacionadas à diminuição do número de cópias, as CNAs são classificadas como perda/deleção. As CNAs também são definidas em CNAs amplas, quando ocorrem a nível do braço cromossômico, e CNAs focais, quando variam de 1Mb à  $\leq 3$  Mb, ou seja, podem cobrir de parte de um braço cromossômico à alguns quilobases (KRIJGSMAN *et al.*, 2014).

As ampliações focais são regiões frequentemente enriquecidas por oncogenes ou genes anti-apoptóticos, enquanto que deleções focais envolvem supressores de tumor ou pró apoptóticos (KHALIL *et al.*, 2020). Amplificações e deleções focais são consideradas “*drivers*”, pois surgem após eventos diversos e oferecem às células vantagens seletivas que irão favorecer o processo de carcinogênese e resistência a drogas terapêuticas (DONG, Min *et al.*, 2016; DONG, Yuanqiang *et al.*, 2022). CNAs podem surgir em outras regiões, mas não conferem nenhuma vantagem seletiva a célula: essas alterações são chamadas de passageiras (DONG, *et al.*, 2022; MERMEL *et al.*, 2011).

As CNAs *drivers* vem sendo estudadas em linhagens de células cancerosas, que são utilizadas como importantes modelos pré-clínicos para pesquisa sobre CG (KHALIL *et al.*, 2020). Esses estudos tem mostrado que há uma correlação entre aumento do número de cópias e a super-expressão de oncogenes, desregulando vias de sinalização importantes para o processo de carcinogênese como vias RTK/RAS/MAPK, ciclo celular e fatores de transcrição (CHIA *et al.*, 2015).

Os receptores de tirosina kinase (RTK) são receptores de membrana que regulam proliferação, metabolismo, migração e invasão celular (WANG, Xiaohong *et al.*, 2016). Fazem parte da família de receptores RTK, o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (*EGFR*) (7p11.2), Receptor Erb-B2 Tirosina quinase 2 (*ERBB2*), o proto-oncogene c-Met, e o Receptor 2 do Fator de Crescimento de Fibroblastos (*FGFR2*). A amplificação dos genes *RTK* está relacionada a super ativação das vias a jusante, como Ras/MAPK, PI3-quinase/Akt, JAK/Stat. Os RTKs são considerados *drivers* oncogênicos e sua amplificação está presente em 40% GC (WANG *et al.*, 2019).

As vias de adesão celular também podem ser desreguladas pela ação das CNAs *drivers*, através da perda de segmentos genômicos contendo genes importantes para a adesão, como o supressor tumoral *CDH1* (16q22.1) gene que codifica a proteína de adesão celular E-caderina. Essa proteína forma o desmossomo, uma junção ancoradora que une a membrana celular de uma célula à membrana da célula vizinha. Na ausência de E-caderina, as células se desprendem umas das outras, se tornam isoladas, com o citoplasma mucoso, o núcleo celular fica restrito as regiões periféricas do citoplasma. Morfologicamente, a célula fica semelhante a um anel de sinete, por esse motivo o tumor também chamado de Adenocarcinoma pouco coeso. Uma vez “soltas”, as células tumorais têm maior facilidade na invasão das estruturas adjacentes, além disso, não formam estruturas glandulares ou tubulares como no tipo intestinal.

De acordo com essas alterações, o câncer gástrico foi também classificado em cinco subgrupos permitindo o tratamento personalizado de cada subgrupo por diferentes drogas (SHITARA *et al.*, 2020). Quando a amplificação do gene *HER2* é detectada através de biópsia líquida ou sólida, a terapia indicada é o Trastuzumab combinado com fluoropirimidina mais cisplatina, enquanto que casos com as amplificações de *MET* podem ser tratados com crizotinib e sapotitinib. Nos casos com aumento no número de cópias do *EGFR* (7p11.2) é mais indicado o onartuzumab e nimotuzumab (YAMAGUCHI; NAGAMURA; MIYAZAKI, 2022).

Os genes *CCND1*, *CCNE1* e *CDK6*(7q21.2) codificam as ciclinas, classe de proteínas relacionados à regulação do ciclo celular. Assim, a amplificação desses genes tem sido relacionada a malignidades gastroesofágicas. O palbociclib, um potente inibidor de *CDK4/6*, pode interromper a sinalização proliferativa do câncer gástrico (KARASIC *et al.*, 2018). Além disso, estudos têm evidenciado que pacientes com co-amplificações da 19q12 (*CCNE1*) e 17q12 (*HER2*) possuem resistência ao lapatinib (KIM; WANG, 2021; NING, 2021).

Os fatores de transcrição *KLF5*, *GATA4* (8p23.1) e *GATA6* se ligam às sequências específicas de DNA. A co-expressão dos *KLF5*, *GATA4* e *GATA6*, ativam a expressão do *HNF4α*, e juntos promovem a proliferação de células gástricas *in vitro* e *in vivo* (CHIA *et al.*, 2015). Cerca de 30% dos pacientes do GC apresentam amplificações em *KLF5/GATA4/GATA6*. No entanto, o medicamento antidiabético Metformina tem como alvo o *HNF4α* impedindo que esse seja super-expresso, mesmo que os fatores de transcrição estejam amplificados, contribuindo para a terapêutica do CG (CHANG *et al.*, 2016).

## 1.8 Linhagens Celulares de Câncer

Os estudos *in vitro* são ferramentas flexíveis, fáceis de manusear, geneticamente tratáveis, além de serem os modelos próximos das condições *in vivo* (PREKSHA; YESHESWINI; SRIKANTH, 2021). Permitem o estudo de crescimento e proliferação celular, absorção de drogas e interações microbianas do hospedeiro, reduzindo as despesas e as questões éticas associadas ao uso de experimentos com animais (COSTA; AHLUWALIA, 2019). São muito utilizados em estudos de biologia do câncer, pesquisas farmacológicas e toxicológicas, engenharia de tecidos, engenharia genética e têm auxiliado amplamente a pesquisa biomédica básica e aplicada (ZEILINGER *et al.*, 2016).

O estômago é um órgão importante para o processamento de alimentos, portanto fica permanentemente em contato com diversos nutrientes, toxinas e microrganismos gerando um ambiente muito tóxico para as células que compõem sua mucosa (SEIDLITZ; KOO; STANGE, 2021). Todas essas adversidades suportadas pelas células gástricas, traz dificuldade na execução de experimentos *in vivo*. Culturas de células simplificam o estudo de fenômenos *in vivo* complexos, permitindo condições bem controladas e repetíveis para a avaliação da resposta celular (COSTA; AHLUWALIA, 2019). Os sistemas *in vitro* podem fornecer informações valiosas sobre o desenho de protocolos clínicos para tratamento de câncer de estômago em humanos, pois servem como excelentes sistemas modelo para estudos envolvendo as respostas heterogêneas a drogas e radiação, identificação de mecanismos de sensibilidade e resistência a drogas e o teste de esquemas de tratamento de combinação de drogas

Apesar do câncer gástrico ter uma alta mortalidade, poucos grupos de pesquisa pelo mundo estabeleceram e caracterizaram linhagens tumorais gástricas, e portanto há pouca variabilidade étnica entre as linhagens derivadas de câncer gástrico disponíveis para estudo (MYTAR *et al.*, 2018). Em 1961 foi estabelecida a primeira linhagem celular tumoral gástrica, a CaVe, (KULAGINA; MUZURENKO; POGOSIANTS, 1975). A partir de então, começaram a surgir estudos sobre linhagens em todo o mundo. Barranco *et al.* (1983) estabeleceram e caracterizaram a linhagem de adenocarcinoma gástrico AGS, derivada de pacientes americanos (BARRANCO *et al.*, 1983).

Entre os anos de 1990 e 1997, um grupo de pesquisadores coreanos estabeleceram e caracterizaram as linhagens SNU-1, SNU-5 e SNU-16 NCI-N87, todas derivadas de

adenocarcinoma gástrico metastático. Posteriormente, foi a vez das linhagens SNU-484, SNU-520 e SNU-719 derivadas de adenocarcinoma primário e as linhagens SNU-601, SNU-620, SNU-63, SNU-668 e SNU216, derivadas de líquido ascítico e metástase linfonodal (PARK *et al.*, 1990;1997).

Em 1993, os pesquisadores alemães desenvolveram duas linhagens derivadas de tumores primários (St23132, St3051) e mais duas derivadas de metástases linfonodais (St2474, St2957) (VOLLMERS *et al.*, 1993). Em 2000 mais oito linhagens originadas de câncer gástrico de pacientes japoneses se tornaram ferramentas de estudo. Trata-se das linhagens TMK-1, MKN-1, MKN-7, MKN-8, MKN-45 e MKN-74, KATO-III e HSC-39, todas originadas de tumores gástricos em metástase, coletadas em órgãos como fígado, linfonodos, pleura e fluído ascítico. (YOKOZAKI, 2000).

Em 2018, pesquisadores poloneses também estabeleceram e caracterizaram mais três novas linhagens (GC1401, GC1415 e GC1436) todas derivadas de fluídos ascíticos de pacientes caucasianos com CG (MYTAR *et al.*, 2018), e em 2020 a linhagem XGC-1 foi estabelecida a partir de um adenocarcinoma gástrico pouco diferenciado de um paciente chinês (PENG; XU; CAI, 2020).

Como observamos, a maioria das linhagens celulares estabelecidas e caracterizadas são de origem Asiática (MYTAR *et al.*, 2018). Entretanto, é desejável que um banco de linhagens de células tumorais reflita a diversidade de fenótipos e genótipos tumorais, uma vez que aspectos como, estadiamento tumoral, localização anatômica do tumor, a origem geográfica e a etnia do doador das células tumorais influenciam nas características genômicas da linhagem (LIN *et al.*, 2015).

Para termos linhagens primárias que refletissem as características da população brasileira, um grupo de pesquisa da Universidade Federal do Pará, estabeleceu e caracterizou em 2004 a primeira linhagem de CG do tipo intestinal brasileira denominada como ACP-01 (LIMA, *et al.*, 2004). Em 2009, o mesmo grupo desenvolveu três novas linhagens derivadas de pacientes do norte do Brasil (AGP1, ACP02 e ACP03), região onde o CG é altamente incidente (INCA, 2012).

A linhagem AGP01 foi originada de um indivíduo de 55 anos de idade, do sexo masculino. As células cancerosas foram obtidas a partir do líquido ascítico, através de

gastrectomia e linfadenectomia. O tumor foi retirado do antro e da porção mais baixa do corpo do estômago. Seguindo a classificação da UICC (*Union Internationale Contre Le Cancer*), correspondia a um adenocarcinoma gástrico dotipo intestinal e classificado como T3N2M1 (LEAL et al. 2009).

As linhagens celulares ACP02 e ACP03 foram estabelecidas a partir de adenocarcinoma gástrico de indivíduos do sexo masculino com faixa etária de 66 e 63 anos respectivamente. A ACP02 foi obtida a partir de tumor removido da região cárdia do estômago, sendo classificada como adenocarcinoma gástrico do tipo difuso e como T3N2M0, enquanto a linhagem ACP03 foi obtida através da remoção de um tumor presente na região do antro do estômago. Essa amostra foi então classificada como adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal e como T4N1M0, conforme a classificação da UICC (LEAL et al. 2009).

Todas as linhagens foram obtidas de indivíduos residentes na região nortedo Brasil, onde a população é composta pela mistura étnica de europeus, africanos e ameríndios. Quando analisadas por citogenética convencional e FISH, as linhagens AGP01, ACP02 e ACP03 apresentaram trissomia para o cromossomo 8(83% das células). Essa trissomia pode provocar o aumento da expressão de genes presentes nesse segmento, como é o caso do C- MYC (8q24.21), localizado no cromossomo 8q24, importante regulador dos processos de crescimento celular, diferenciação e apoptose. Essas alterações genômicas tem sido frequente encontradas em amostras de câncer gástrico. A desregulação de C-MYC (8q24.21) também está relacionada ao linfoma de Burkitt associado ao vírus HHV-4 (NISHIKAWA *et al.*, 2018).

Leal e colaboradores (2009) observaram que as linhagens AGP01 e ACP03 apresentam trissomia do cromossomo 17 em 90% das células analisadas e a ACP02 apresentou deleção do 17p em 50% das células. As alterações no cromossomo 17 como trissomias e deleções envolvem o locus que codifica a p53, uma das principais proteínas mediadoras dos processos de reparo do DNA e apoptose. Alteração da expressão da proteína p53 está presente em 50% dos cânceres humanos incluindo câncer gástrico (LEAL *et al.*, 2011),

Para uma maior compreensão da carcinogênese gástrica na população brasileira, essas linhagens são atualmente usadas para diversos estudos que vão desde ensaios de

expressão gênica como de avaliação fenotípica após o silenciamento de genes como *PIWIL1* (ARAÚJO *et al.*, 2018) e genes envolvidos na desacetilação de histonas (WISNIESKI *et al.*, 2014), ensaios de citotoxicidade (SOARES *et al.*, 2015) e farmacológicos (PINTO *et al.*, 2019). Estudos genômicos que permitiram identificar a alteração no número de cópias dos genes *MYC* (8q24.21), *TP53* do cromossomo 17 (LEAL, Mariana *et al.*, 2011), a amplificação de *IL11RA* e *MELK* (CALCAGNO, *et al.*, 2016). (BURBANO *et al.*, 2006)

Como vimos, as linhagens AGP01 e ACP03 são amplamente utilizadas em pesquisas científicas com os mais variados objetivos (BURBANO *et al.*, 2006; CALCAGNO, *et al.*, 2005; CALCAGNO, *et al.*, 2016; LEAL, 2011; LEAL, 2009). No entanto, nenhum estudo mais amplo que explorasse o papel funcional das diversas CNAs encontradas nas linhagens AGP01 e ACP03 foi realizado. Assim, a identificação de CNAs recorrentes em tumores gástricos que sejam capazes de induzir a expressão diferencial e influenciar no prognóstico do paciente é importante para uma maior compreensão do mecanismos envolvidos na carcinogênese gástrica (CHENG *et al.*, 2018).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Caracterizar o genômica das linhagens celulares AGP01 e ACP03, identificando alterações no número de cópias (CNAs) e relacionando seu conteúdo genômico ao processo de desenvolvimento tumoral.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar a ocorrência de CNAs nas linhagens AGP01 e ACP03.
- Determinar os possíveis efeitos de CNAs recorrentes no processo de carcinogênese e progressão tumoral.
- Comparar os resultados obtidos com dados de outras linhagens de CG, a fim de verificar se as alterações encontradas são concordantes com esses tipos tumorais de outras etnias.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Linhagens de células**

Neste estudo, foram utilizadas duas linhagens de câncer gástrico AGP01 e ACP03. A linhagem AGP01 foi derivada do fluído ascítico canceroso de um paciente de 55 anos com adenocarcinoma gástrico. O tumor foi retirado da região do antro e corpo do estômago, sendo classificado como T3N2M1. A linhagem ACP03 (Adenocarcinoma Gástrico Tipo Intestinal) localizado na região do antro e classificado como T4N1M0. Essas linhagens foram estabelecidas e caracterizadas pelo grupo do laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará (UFPA) (LEAL *et al.*, 2009).

As linhagens foram cultivadas em garrafas plásticas estéreis de 25cm<sup>2</sup> utilizando *Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12* (DMEN/F12) (1/1 vol) suplementado com soro bovino fetal à (10%) e mantidas em estufa de 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Os repiques ocorreram aproximadamente a cada sete dias, quando a confluência estava acima de 80%, com a utilização de solução de tripsina 0,25% em tampão fosfato salino (PBS).

#### **3.2 Extração e quantificação de DNA das linhagens AGP01 e ACP03**

Para a extração de DNA, foi utilizado o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e qualidade do DNA genômico foi verificada através do nanodrop ND-2000 Spectrophotometer, versão 1.4.1 (ThermoFisher, Waltham, EUA).

#### **3.3 Hibridização Genômica Comparativa baseada em array (aCGH)**

A técnica aCGH foi utilizada para a detecção de alterações genéticas de ganho e perda cromossômica, através da matriz SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray Kit, 4x180K, da Agilent. Essa matriz contém cerca de 120.000 sondas para identificação de CNAs, cobrindo o total de clones do consórcio ISCA (International Standards for Cytogenomic Arrays, disponível em (<http://isca.genetics.emory.edu>))(MILLER *et al.*, 2010).

### 3.3.1 Digestão enzimática e marcação das amostras

O DNA extraído da AGP01 e ACP03, foram diluídos na proporção de 1 µg/22µL em água ultra-pura. Logo depois, o DNA das linhagens juntamente com o DNA de referência (Human Reference DNA Male or Female da Agilent), disponibilizado no kit. Foram submetidos a digestão enzimática originando fragmentos de 200 a 500pb. Esses fragmentos de DNA foram marcados com Cy5-dUTP e Cy3-dUTP respectivamente, utilizando-se o kit SureTag Complete DNA Labeling seguindo o protocolo do kit foram utilizados 21 µL do Labeling Master Mix (composto por água ultrapura, tampão de reativação 5x, 10x dNTPs, Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP e Exo- Klenow, uma DNA polimerase).

### 3.3.2 Purificação e quantificação das Amostras

A purificação das amostras de DNA foi realizada através de duas lavagens, a primeira com 430 µL de 1xTE (pH 8.0), seguida de centrifugação a 14.000xg por 10 minutos e descarte do sobrenadante, a segunda lavagem foi com 480 µL de 1xTE (pH 8.0). Após a segunda centrifugação, a coluna foi invertida em tubo coletor novo de 2 mL e centrifugada a 1000 x g para obtenção do material purificado. O *Nanodrop* foi utilizado para a realizar quantificação das concentrações do DNA marcador que foram utilizados, junto com a medição do volume final da amostra, para a estipulação dos valores de atividade específica dos marcadores e rendimento do processo de marcação.

### 3.3.3 Tratamento pré-hibridização

Após a quantificação, o DNA das linhagens AGP01 e ACP03 e o DNA de referência foram pré-tratados: com 71 µL do Hybridization Master Mix para posterior incubação a 95°C por 3 minutos e imediatamente transferidos para um banho maria a 37°C, por 30 minutos. Após essa etapa, o material foi centrifugado por 1 minuto a 6000x g após a conclusão dessa etapa iniciou-se o processo de hibridização.

### 3.3.4 Hibridização

O processo de hibridização seguiu os seguintes passos:

1. Em uma lamínula específica, foi adicionado 100 $\mu$ L da solução de hibridização em cada um dos poços.
2. Então foi encaixado a lâmina com microarranjos sobre a lamínula, e as duas unidades – lâmina e lamínula – foram fixadas com uma base de fixação.
3. Manualmente foi ajustada uma braçadeira para manter o conjunto – lâmina e lamínula bem fixadas.
4. As duas unidades – lâmina e lamínula foram movidas verticalmente para que o líquido se espalhe uniformemente sobre cada arranjo e para que possíveis bolhas de ar não se fixem nessa região.
5. Logo depois – o conjunto foi colocado em uma câmara de hibridização e mantida a 65°C por 24 horas, com uma rotação de 20 rpm.

### 3.3.5 Lavagem

A lavagem dos microarranjos foi realizada em ambiente pobre em ozônio. A primeira lavagem do conjunto “lâmina+lamínula” em tampão de lavagem 1 (Wash Buffer 1 – Wash Buffer 1 – Agilent Oligo aCGH/ChIP-onChip Wash) onde serão mergulhadas para ajudar na dissociação. Na segunda lavagem as lâminas serão colocadas em uma cuba de vidro contendo novamente tampão de lavagem 1 sob agitação com magneto, por cinco minutos. Tanto a dissociação como a primeira lavagem serão feitas à temperatura ambiente. As lâminas serão então transferidas para uma terceira cuba contendo o tampão de lavagem 2 (Wash Buffer 2), em agitação com magneto, à temperatura de 37°C. Por fim, as lâminas serão cobertas com uma lamínula protetora de ozônio e encaixadas em um estojo para proceder para a próxima etapa.

### 3.3.6 Escaneamento e extração de dados

Os estojos com os microarranjos serão devidamente encaixados em cassetes do

scanner. O scanner tem a capacidade para até 48 estojos de cada vez. Após o encaixe e fechamento da tampa, o controle e obtenção das imagens do scanner serão realizados com o uso do software Feature Extraction v10.10 Technologies), utilizando o protocolo CGH\_10.7\_Sep09.

### 3.3.7 Análise de Dados

Os dados foram analisados com auxílio do software Agilent CytoGenomics 5.0, aplicando o algoritmo estatístico ADM-2, limiar de sensibilidade 6 e filtro de aberração Mosaico, o número mínimo de sondas para ganho e perda = >5; Tamanho mínimo (Kb) da região de ganho e perda = > 0.0 e mínimo de log2Ratio para ganho e perda = < 0.15. Os dados das CNAs das linhagens AGP01 e ACP03 foram baixados do cytoGenomics 5.0 e organizados em Excel para posterior análise descritiva das CNAs.

## 3.4 Coleta de dados a partir de repositórios “CellMiner”, CCLE e TCGA

Para este estudo, baixamos dados de sequenciamento de 1806 linhagens de células de diversos cânceres entre elas 38 linhagens de câncer gástrico fornecidos pelo CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia (Novartis/Broad, Nature 2012, NCI-60 Cell Lines (NCI, Cancer Res 2012). Além de dados de 478 pacientes (Stomach Adenocarcinoma (TCGA, Firehose Legacy). Os estudos foram selecionados com base na presença de informações sobre CNAs e foram acessados pelo cBioportal for Cancer Genomics Acessado em: 01 de mar de 2022 (<https://www.cbioportal.org/>).

## 3.5 Análises descritivas das CNAs nas linhagens AGP01 e ACP03

Para mostrar a localização e a extensão das CNAs identificadas nas linhagens AGP01 e ACP03 utilizamos o software *on line PhenoGram* (<https://ritchielab.org/software/phenogram-downloads>). Para análise funcional dessas CNAs realizamos uma análise de enriquecimento para isso utilizamos o Panther ([pantherdb.org](http://pantherdb.org)). Para gerar perfis de ontologia gênica de proteínas identificadas com base em processo

biológico, função molecular e para cada linhagem celular e vias de sinalização celular (MI et al., 2019). Para uma análise funcional mais específica das CNAs foi executada a análise de enriquecimento da via, KEGG e Wikipathways com o auxílio do DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>). O valor de  $p < 0,05$  foi selecionado como critério de corte. O enriquecimento GO, KEGG e Wikipathways foi concluído pelo SRplot (<http://www.bioinformatics.com.cn/>). Este é um servidor de web de livre acesso para a visualização de dados e geração de gráficos baseado na plataforma R (LUO; BROUWER, 2013).

### 3.5.1 Identificação de CNAs relevantes para a carcinogênese gástrica

Para identificarmos regiões genômicas relevantes para a carcinogênese em geral e a carcinogênese gástrica utilizamos os dados genômicos fornecidos pelo CCLE (CCNAS e Cell Line Encyclopedia (Novartis/Broad, Nature 2012), NCI-60 Cell Lines (NCI, CCNAS Res 2012). Selecionamos apenas as regiões com frequência igual ou acima de dez por cento. A ferramenta Sumário dos Tipos de Câncer disponível no cBioportal foi utilizada para visualizar a frequência dessas CNAs em outros tipos de câncer. Para verificar a ocorrência de regiões genômicas compatíveis com a histologia das linhagens AGP01 e ACP03, fizemos uma análise comparativa entre com as CNAs mais frequentes e associadas a câncer presentes nas linhagens CG do tipo difuso MKN45 e FU97 e das linhagens de CG do tipo intestinal MKN74 e MKN7.

Utilizamos o software público GenePattern, (<https://genepattern.org/>) para ter acesso ao algoritmo de Identificação Genômica de Alvos Significativos em Câncer (GISTIC 2.0). O método identifica as regiões do genoma que são aberrantes com mais frequência do que seria esperado se as aberrações ocorressem ao acaso. O GISTIC 2.0, foi aplicado aos dados dos 478 pacientes com adenocarcinoma gástrico, o nível de confiança estabelecido foi de 0,99. Ambos os limiares de amplificação e deleção foram estabelecidos em 0.1. As regiões que obtiveram valor  $q \geq 0,25$  são consideradas regiões significativas exibidas em gráficos como regiões de pico (Mermel et al., 2011).

Uma vez identificadas as CNAs frequentes em linhagens de células do CCLE e CellMiner e as CNAs mais significativas (valor  $q \geq 0,25$ ) nas amostras de adenocarcinoma gástrico do

TCGA. Estabelecemos as CNAs mais importantes para a carcinogênese e verificamos a ocorrência dessas alterações bem como seus respectivos genes, nas linhagens de células tumorais AGP01 e ACP03.

### 3.5.2 Análise *in silico*: Identificação dos genes diferencialmente expressos.

Genes cobertos pelas CNAs mais relevantes nas AGP01 e ACP03 foram analisados através do GEPIA 2.0: um servidor de web aprimorado para criação de perfil de expressão em larga escala e análise interativa que contém dados de 9.736 tumores e 8.587 controles (TANG *et al.*, 2019). Através do GEPIA 2.0 visualizamos a expressão do mRNA desses genes, em amostras de câncer gástrico e em amostras de gástricas não cancerosas esses dados estão disponíveis em: (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#analysis>). As ferramentas *oncprints* e *plots* do cbiportal foram utilizadas para estabelecer a frequência dos genes, bem como a correlação entre mRNA e alteração no número de cópias. O valor de  $p < 0,05$  foi selecionado como critério de corte.

### 3.5.3 Análise *in silico* Kaplan-Meier plotter

A Análise de sobrevida foi realizada por meio do banco de dados “*The Kaplan-Meier plotter*” (*KM plotter*), no qual dados atualizados de expressão gênica e informações de sobrevida incluem um total de 876 pacientes com câncer gástrico. Disponível em: (<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service>).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização Geral das linhagens gástricas

Na linhagem AGP01 encontramos 95 segmentos genômicos de 34Mb a 63Mb que tiveram alteração no número de cópias (78 perdas e 17 ganhos). Todos os cromossomos apresentaram perdas de segmentos genômicos. As maiores perdas ocorreram nas regiões 2q13 - q24.3 (55,476.879Kb), 4p16.3 - p15.1(35,176.854Kb) e 13q13.2 - q21.31 (31,148.126Kb). Ganhos no número de cópias foram encontrados nos cromossomos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 14, 17, 19 e X. Os maiores ganhos ocorreram no cromossomo 8q13.1 - q24.21 (63,001.903Kb), Xq21.31 - q28 (62,870.445Kb) e Xp22.33 - p11.21 (52,287.056Kb) e o cromossomo 7p22.1 - p11.2 (49,474.618Kb) (Figura 4).

Na linhagem ACP03 encontramos 152 alterações no número de cópias (123 perdas e 24 ganhos) que variaram de 40Mb á 103Mb. Com exceção do cromossomo 20, todos os cromossomos apresentaram perdas de segmentos genômicos. As maiores perdas ocorreram nos cromossomos 3 q25 - q35.2 (103539542Kb), 13q11 - q34 (95773559Kb), 4q25 - q35.2 (77258246Kb). Enquanto as regiões 8 q13.1 - q24.21 (63,001.903 Kb), 7 p22.1 - p11.2 (49,335.109 Kb) e X p22.31 - p11.21 (48,501.956) (Figura 4).

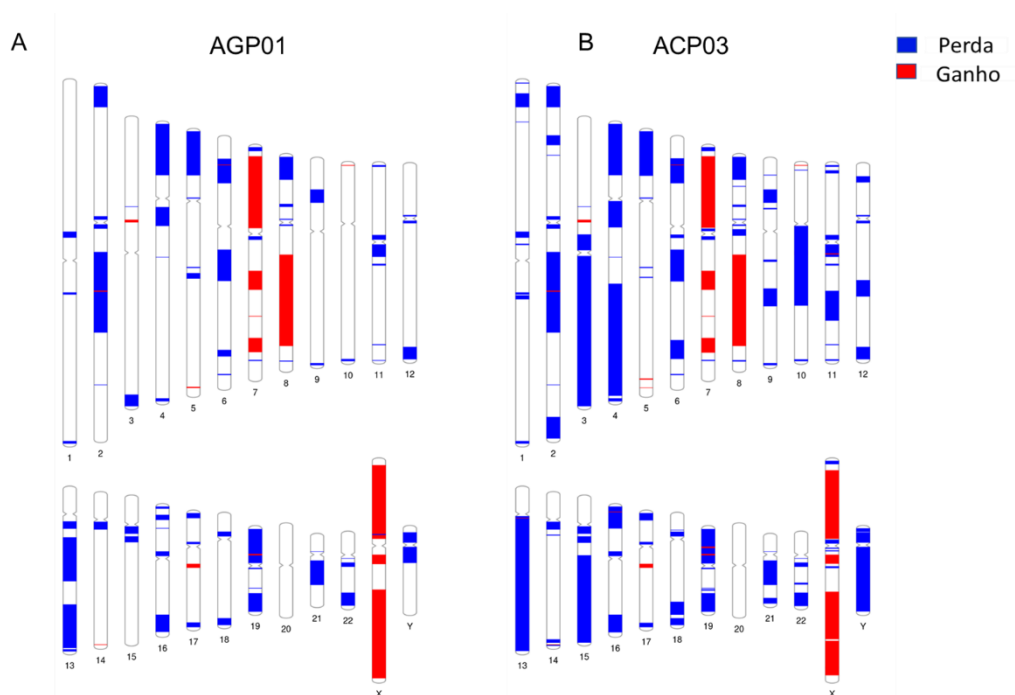


Figura 4: Ideograma mostra a distribuição das CNAs encontradas. A. CNAs presentes na Linhagem AGP01. B. CNAs presentes na linhagem ACP03.

Realizamos uma análise comparativa entre a AGP01 e ACP03 e observamos que 8% dos ganhos (1077 genes) e 50% das perdas (6510 genes) ocorreram em ambas as linhagens. Os nove segmentos que tiveram ganho no número de cópias na linhagem AGP01 cobriram cento e quatro genes. Em relação as perdas essa mesma linhagem perdeu vinte e oito genes. Enquanto que os dezessete segmentos encontrados como ganho na linhagem ACP03 cobriram apenas setenta e seis genes. também observamos que a ACP03 perdeu um total de 5.244 genes como mostra a figura 5.

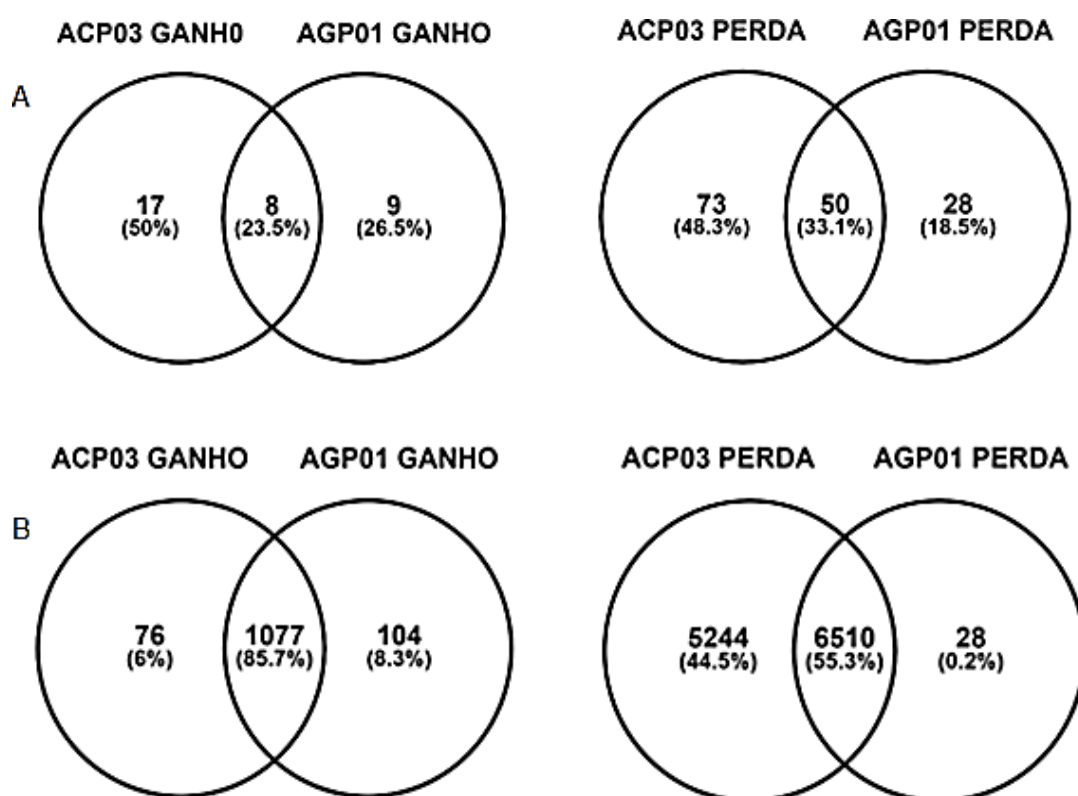


Figura 5: Diagrama de Venn, A mostra o quantitativo de seguimentos genômicos exclusivos e comuns em ambas nas linhagens AGP01 e ACP03. B número de genes.

No geral, as linhagens apresentaram mais perdas do que ganhos, em algumas regiões do genoma os ganhos que variam de 2 até Dez cópias como correu na 10p15.3 (Figura 5).



## 4.2 Ontologia geral

No intuito de entender o papel funcional das CNAs de ganho e perda, os dados de aCGH das linhagens AGP01 e ACP03 foram submetidos a uma análise de enriquecimento realizada pelo sistema de classificação PANTHER. Os genes foram enriquecidos nas três categorias, processo biológico, função molecular e componente celular. As figuras 6, 7 e 8 ilustram o número de genes envolvidos em cada uma dessas dessas categorias.

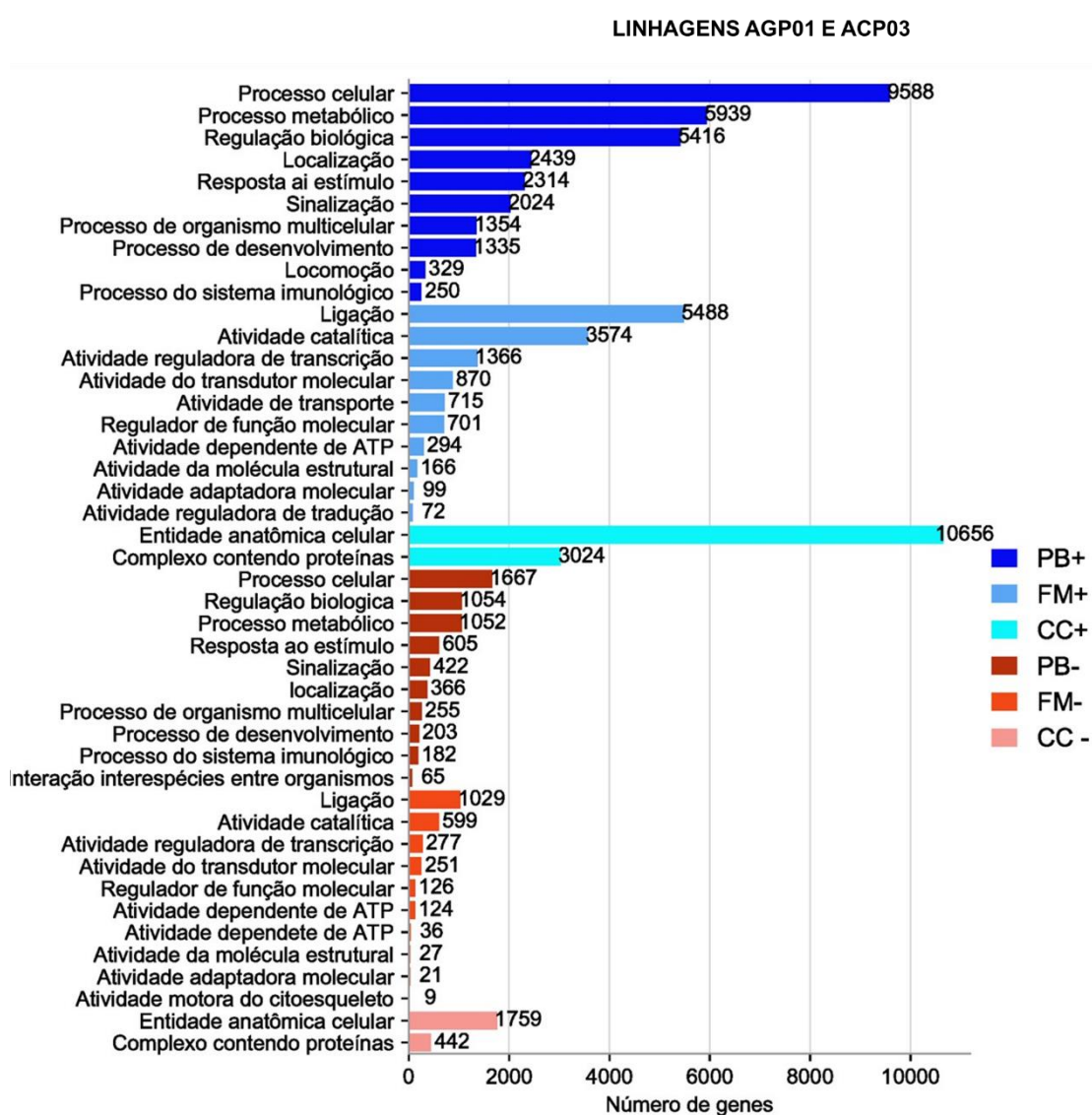


Figura 6: Análise de enriquecimento funcional do Gene Ontology das linhagens AGP01 e ACP03. PB processo biológico, FM Função molecular, CC compartimento celular. (+) termos que foram enriquecidos com CNAs de ganho. (-) termos enriquecidos com CNAs de perdas.

### Linhagem ACP03

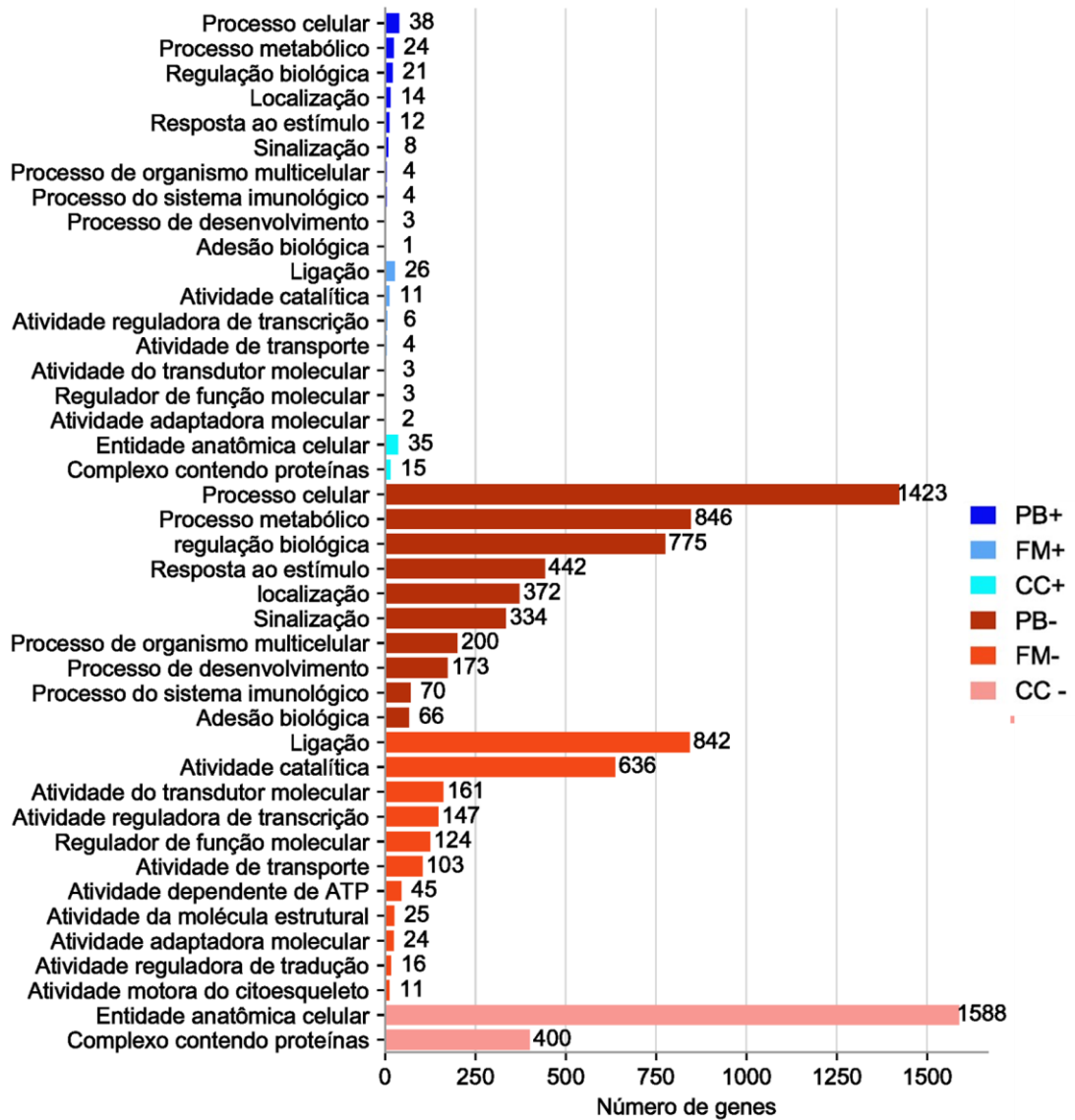


Figura 7: Análise de enriquecimento funcional do Gene Ontology da linhagem ACP03. PB processo biológico, FM Função molecular, CC compartimento celular. (+) termos que foram enriquecidos com CNAs de ganho. (-) termos enriquecidos com CNAs de perdas.

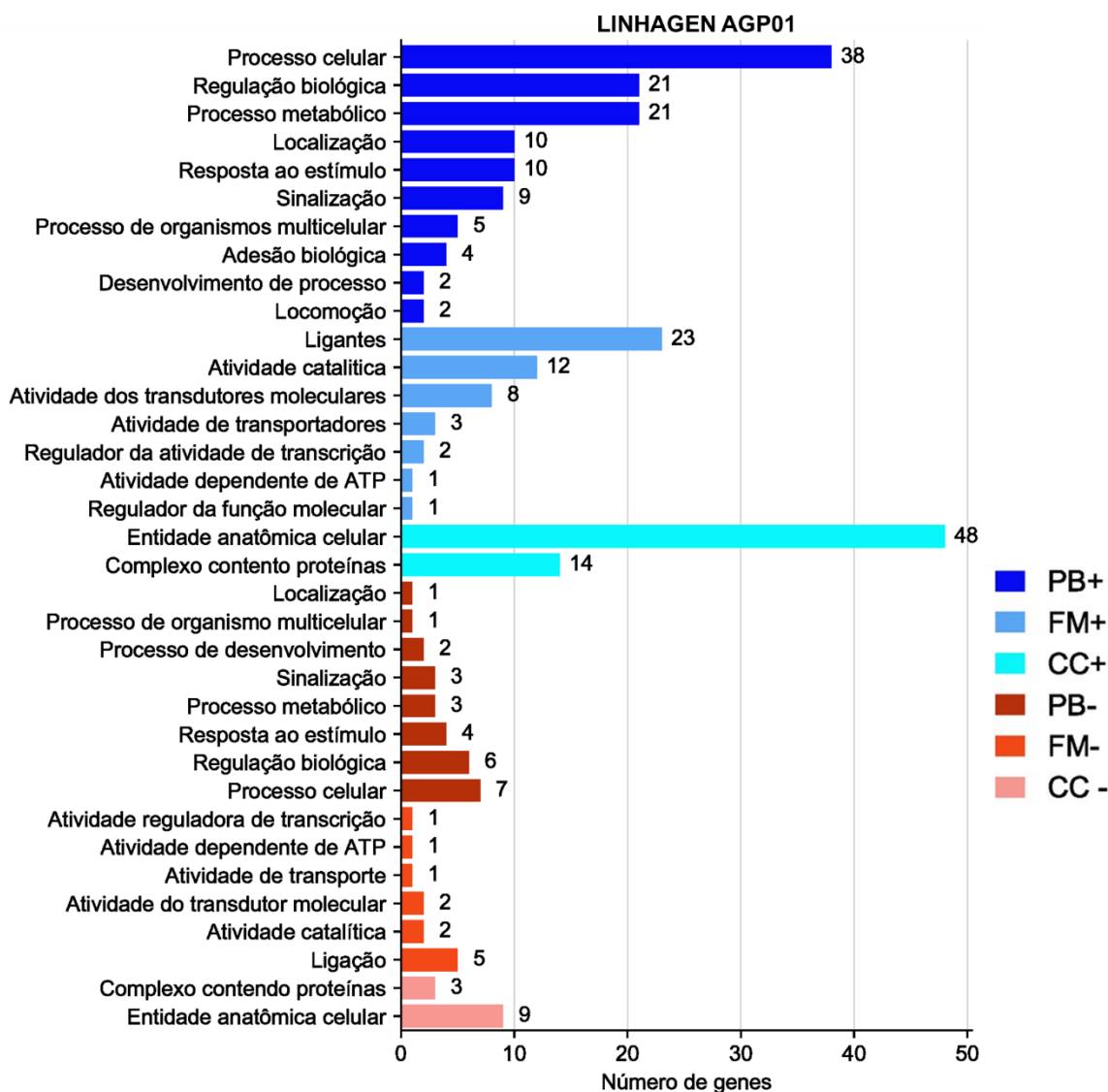


Figura 8: Análise de enriquecimento funcional do Gene Ontology da linhagen AGP01. PB processo biológico, FM Função molecular, CC compartimento celular. (+) termos que foram enriquecidos com CNAs de ganho. (-) termos enriquecidos com CNAs de perdas.

Observamos que mesmo o conjunto de genes alterados especificamente em cada linhagen, contribuem com os mesmas categorias: No processo biológico as CNAs de ganho e perda enriqueceram os seguintes termos: Processo metabólico, regulação biológica, processo celular, localização estímulo, processo do sistema imunológico, desenvolvimento e adesão celular. O mesmo ocorreu para a categoria função molecular onde os termos mais enriquecimento foram ligação, atividade catalítica e atividade de transcrição. Na categoria Compomente celular os termos mais enriquecidos foram entidade anatômica celular e complexo contendo proteínas.

### 4.3 Análise comparativa entre as linhagens

No intuito de explorar os dados de aCGH realizamos uma análise comparativa entre as CNAs das linhagens em estudo (AGP01 e ACP03) e os dados genômicos mais frequentes ( $\geq 10\%$ ) de linhagens de diversos cânceres obtidas no *Cancer Cell Line Encyclopedia* e *CellMiner* ( $n = 1806$ ). A análise *in silico* revelou os ganhos mais frequentes e comuns entre as linhagens do CCLE, CellMiner, AGP01 e ACP03. No geral, identificamos 177 genes distribuídos nas regiões 7p11-p15, 7p21-p22, 7q21, 8q21-q22, em destaque a citobanda 8q24 (45 genes) onde notou-se a maior parte desses ganhos.

Também identificamos 203 genes que tiveram perda no número de cópias, esses distribuídos nas regiões 2q11, 2q22, 3p14, 4p16, 4q13, 5p15, 6p22, 6q26, 7q35, 8p12, 8p22, 8p23, 9p21, 9p22, 13q12, 13q13, 13q14, 14q11, 15q11, 16p13, 16q23, 17p11, 17p13, 18q22, 18q23, 19p12, 19p13, 22q11, 22q13, Yp11. Além dessas CNAs, a ACP03 também apresentou perdas de 143 genes, sendo a maioria nas regiões 1p36, 3p11, 3p12, 3q22, 3q26, 4q27, 4q34, 4q35, 8q11, 9p24, 10q11, 10q21, 10q22, 10q23, 11p15, 11q22, 12p13, 13q21, 13q22, 13q34, 15q24, 15q25, 18q21 como mostra a figura 9.

### 4.4 Linhagens gástricas

Realizamos uma segunda análise comparativa, para verificamos quais são as CNAs mais frequentes ( $\geq 10\%$ ) nas 38 linhagens gástricas de adenocarcinoma gástrico provenientes do CCLE e quais dessas alterações estão presentes nas linhagens AGP01 e ACP03. Identificamos a perda de 546 genes distribuídos nas regiões 1p21, 2q11, 2q21, 2q22, 2q33, 3p14, 3q28, 3q29, 4p15, 4p16, 4q13, 4q35, 5p14, 5p15, 6p22, 6q24, 6q25, 6q26, 7p22, 8p23, 8q24, 9p21, 11p15, 11q11, 12q24, 13q12, 13q21, 13q31, 14q11, 15q11, 16q23, 16q24, 17p11, 17p13, 18p11, 19p12, 19p13, 21q21, 22q11, 22q13, Yp11. Além dessas CNAs, a ACP03 também apresentou perdas de 181 genes, nas regiões 1p36, 2p22, 2q37, 3p12, 3q13, 3q22, 3q24, 3q25, 3q26, 3q27, 3q28, 4q32, 4q34, 4q35, 6q25, 7p11, 8q11, 8q22, 9p24, 10q11, 10q21, 10q22, 11p15, 11q14, 11q21, 11q22, 12p13, 12q21, 15q24, 15q25, 16p13, 16q24, 17p13, 18q21, 18q22, 19q13 como mostra a figura 9.

Também identificamos regiões onde 414 genes tiveram ganho no número de cópias,

3p13, 7p11, 7p12, 7p13, 7p14, 7p15, 7p21, 7p22, 7q21, 8q13, 8q21, 8q22, 8q23, 8q24, 14q32, 17q12, Xp11, Xp21, Xp22, Xq21, Xq26, Xq27, Xq28 figura 9.

A análise dos genes nos levou a identificar um grupo de CNAS de perda e ganho comuns nas linhagens em estudo (AGP01 e ACP03) e que possuem frequência entre 10% á 89% nas linhagens obtidas do CCLE e Cell Miner. Além disso, identificamos um grupo de CNAS que foram mais frequentes nas linhagens gástricas do que em linhagens provenientes de outros cânceres, como mostra a figura 9.

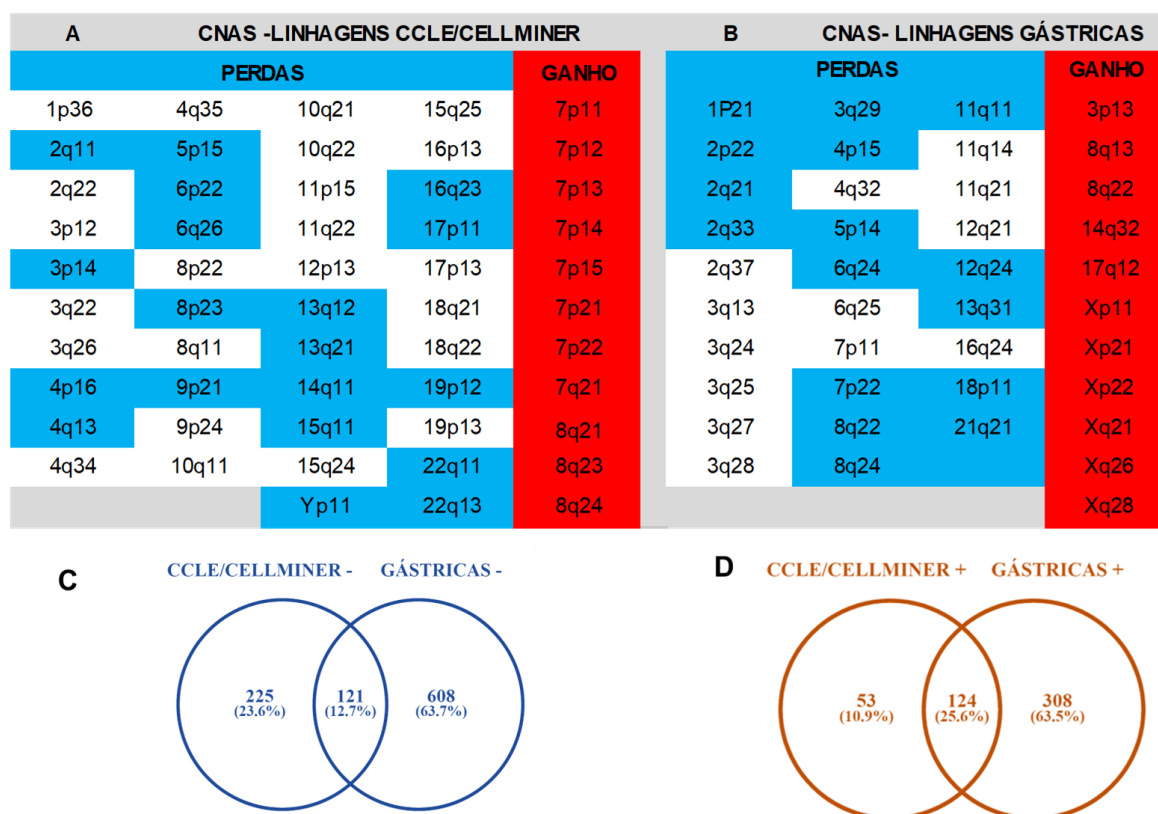


Figura 9 - Regiões que tiveram alteração no número de cópias para perda (quadrados azuis), ou ganhos (quadrados vermelhos) com frequência  $\geq 10\%$  e que são comuns as linhagens em estudo (AGP01 e ACP03). Perdas exclusivas da linhagem ACP03 (quadrados CNAS os). (A) Mostra as CNAS mais frequentes nas linhagens do CCLE/CellMiner (n = 1806). (B) CNAS presentes nas linhagens AGP01 e ACP03 e frequentes nas linhagens gástricas do CCLE (n=38). O Diagrama de Venny, mostra o conjunto de genes (C) presentes nas CNAS de perda e (D) conjunto de genes nas CNAS de ganho.

No total foram 308 genes que ocorreram apenas nas linhagens gástricas do CCLE e que também estão presentes nas linhagens AGP01 e ACP03. A análise de vias KEEG mostra que esses genes enriqueceram vias de sinalização como infecção pelo vírus Epstein Barr, via de sinalização MAPK como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Vias KEEG enriquecidas com CNAs presentes nas linhagens AGP01 e ACP03 e nas linhagens gástricas (n=38) do CCLE.

Termos Enriquecidos	N° de genes	Genes	FDR
Infecção do Herpes vírus Simplex	46	ZNF28, ZNF550, ZNF470, ZNF83, ZNF528, ZNF525, IL12A, ZNF765, ZNF600, ZNF468, ZNF841, ZNF665, ZNF543, ZNF587, ZNF761, ZIM3, ZNF583, ZNF582, ZNF460, ZNF160, ZFP92, HLA-A, TICAM1, HCFC1, ZNF519, ZNF616, ZNF836, ZNF813, ZNF417, IRF7, ZNF614, BAX, ZNF613, ZNF415, ZNF611, ZNF534, ZNF479, ZNF677, ZNF578, ZNF554, ZNF114, ZNF432, ZNF135, ZFP28, BIRC3, ZNF552	1.0
Vias do Câncer	32	RET, RALA, CTBP1, LRP5, KLK3, ADCY1, PLD1, GLI3, GNGT1, MECOM, HEY1, TERT, GNG7, GNA12, PLCG2, IL12A, ELOC, HRAS, FGF22, FGF21, FZD1, PRKCG, APC2, GADD45B, FZD6, DAPK3, MITF, CCNE2, LPAR6, BAX, FGFR3, BIRC3	1.0
Interação ligante receptor de vias neuroativas	24	PTGIR, SCT, GRIK5, GABRA3, GPR50, GPR83, FPR3, PTH2, BRS3, CRHR2, GRIN2D, GRM3, GHRHR, GRM5, GAL, CCKAR, CALCR, MTNR1B, TBXA2R, LPAR6, NPVF, NPBWR1, GABRE, TAC1	1.0
MAPK vias de sinalização	20	MAP2K3, PRKCG, GADD45B, DUSP8, DUSP9, NTF4, CACNG6, CACNG7, CACNG8, MECOM, RAS, PDGFD, GNA12, MKNK2, TEK, HRAS, PAK2, FGFR3, FGF22, FGF21	1.0
Câncer gástrico	13	FZD1, APC2, SHC2, GADD45B, FZD6, LRP5, TERT, CCNE2, BAX, HRAS, CDH17, FGF22, FGF21	1.0
Câncer de Mama	12	FZD1, APC2, SHC2, HEY1, GADD45B, FZD6, LRP5, BAX, PGR, HRAS, FGF22, FGF21	1.0
Receptor de sinalização de células B	9	IFITM1, PLCG2, LILRB2, LILRA1, LILRB3, LILRA2, HRAS, LILRB4, LILRB5	1.0
Secreção pancreática	9	PRKCG, CPA3, CPB1, CCKAR, AMY2A, SCT, CA2, ADCY1, TPCN2	1.0

Também verificamos a ocorrência dessas CNAs nas linhagens de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso MKN45 e FU97 e nas linhagens de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal MKN74 e MKN7, as linhagens foram selecionadas com base na sua histologia. A Análise *in silico* aponta que 17 genes associados a câncer que tiveram as mesmas alterações nas linhagens AGP01, ACP03, MKN74 e MKN7 demonstrando que as linhagens analisadas ainda possuem alterações típicas do sub tipo intestinal como mostra a tabela 2.

Tabela 2: CNAS associadas a câncer e que são comuns entre as linhagens AGP01, ACP03 e as linhagens de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso MKN45 e FU97 e tipo intestinal MKN74 e MKN7

Localização	Gene	Descrição	Evento	Linhagens	Tipo Histológico das Linhagens.
2q22.1-q22.2	<i>LRP1B</i>	Proteína 1B relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade	perda	MKN7 e MKN74	Tubular
3p14.2	<i>FHIT</i>	Triade frágil da histidina	perda	MKN7, MKN74, FU97 e MKN45	Tubular e Difuso
6q26	<i>PRKN</i>	Parkin RBR E3 proteína ubiquitina ligase	perda	MKN7, MKN74, FU97 e MKN46	Tubular e Difuso
7p11.2	<i>EGFR</i>	Receptor do fator de crescimento epidérmico	ganho	MKN7, MKN74, FU97 e MKN47	Tubular e Difuso
7p15.2	<i>HNRNPA2B1</i>	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea A2/B1	ganho	MKN7, MKN74, FU97 e MKN48	Tubular e Difuso
7p15.2-p15.1	<i>JAZF1</i>	JAZF dedo de zinco 1	ganho	MKN7, MKN74, FU97 e MKN49	Tubular e Difuso
7p22.1	<i>RAC1</i>	RAC família das pequenas proteínas sinalizadoras Rho Gtpases.	ganho	MKN7 e MKN74	Tubular
7q21.2	<i>CDK6</i>	Quinase 6 dependentes de ciclinas	ganho	MKN7 e MKN74	Tubular
8p23.1	<i>GATA4</i>	Fator de transcrição GATA-4	perda	MKN7 e MKN74	Tubular
8q23.1	<i>RSP02</i>	R-Espondina 2	ganho	MKN7 e MKN74	Tubular
8q24.11	<i>EXT1</i>	Exostosina-1	ganho	MKN7 e MKN74	Tubular
8q24.11	<i>RAD21</i>	Componente Complexo de Coesina RAD21	ganho	MKN7 e MKN74	Tubular
8q24.21	<i>MYC</i>	MYC Proto-Oncogene	ganho	MKN7 e MKN74	Tubular
9p21.3	<i>CDKN2B</i>	Inibidores de quinase dependente de ciclinas 2B	perda	FU97 e MKN45	Difuso
9p21.3	<i>CDKN2A</i>	Inibidores de quinase dependente de ciclinas 2A	perda	MKN7 e MKN74	Tubular
9p21.3	<i>MTAP</i>	Metiltioadenosina Fosforilase	perda	MKN7 e MKN74	Tubular
9p21.3	<i>MLLT3</i>	Subunidade do Complexo de super Alongamento MLLT3	perda	MKN7 e MKN74	Tubular

Uma vez estabelecida as regiões mais frequentes entre as linhagens em estudo AGP01 e ACP03 e as linhagens do CCLE, utilizamos o algoritmo GISTIC

2.0 para identificar as CNAs e genes mais significativos nas amostras de 478 pacientes com câncer gástrico disponíveis no TCGA. No geral identificamos 52 perdas e 35 ganhos. Em seguida verificamos a ocorrência dessas CNAs nas linhagens AGP01 e ACP03. Nossa análise identificou 25 perdas e 4 ganhos que foram significativas nas amostras de CG do TCGA e que estão presentes nas linhagens estudadas (AGP01 ACP03) como mostra a figura 10. Além disso identificamos ganhos de cópias dos genes TERT (5p15.13) e GNA12 (7p22.3) e perdas de cópias do gene C10orf11 (10q22) ocorreram apenas nas linhagens gástricas do CCLE sendo também presentes nas linhagens em estudo AGP01 e ACP03. Como mostra a figura 10.

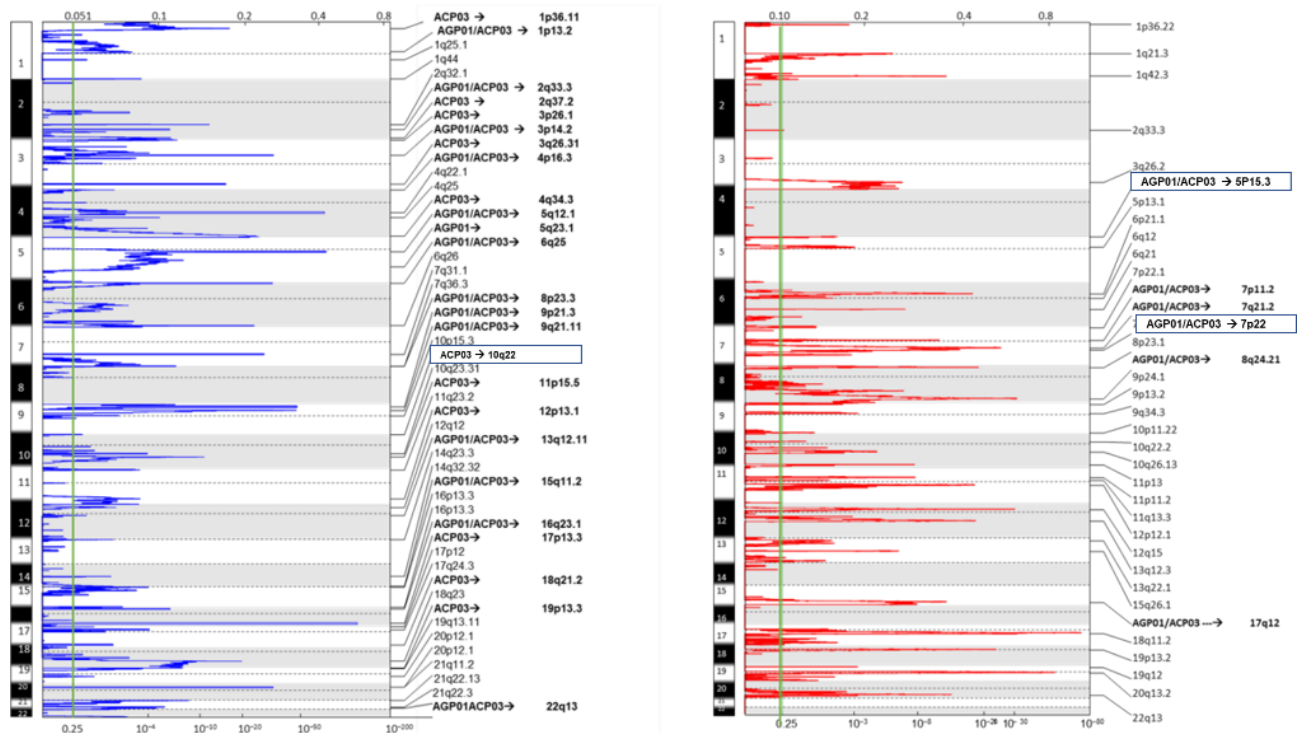


Figura 10: O gráfico GISTIC mostra vinte e dois cromossomos estão organizados verticalmente de cima para baixo. A linha pontilhada indica o centrômero. A linha verde representa o limiar de significância (valor  $q = 0,25$ ), os picos que ultrapassam a linha verde sinalizam as citobandas mais significativas. Picos Azuis são perdas, picos vermelhos representam ganhos. Em negrito estão destacadas as citobandas encontradas em linhagens de diversos cânceres do CCLE e AGP01 e ACP03. As citobandas destacadas dentro dos retângulos ocorrem apenas as linhagens gástricas do CCLE e AGP01 e ACP03.

Nossa análise *in silico* mostra que regiões genômicas frequentes nas linhagens do CCLE e CellMiner foram apontadas pelo GISTIC 2.0 como as mais significativas nas amostras do TCGA (figura 10) esses achados apontam essas regiões como importantes para a carcinogênese de modo geral. Destacamos as regiões 10q22, 5p15 e 7p22 como regiões importantes para a carcinogênese gástrica uma vez que foram encontradas em linhagens gástricas tumorais e em amostras de pacientes (dados fornecidos pelo TCGA).

Para uma melhor compreensão dessas regiões, o *WikiPathways* foi utilizado para explorar a funcionalidade dessas CNAs. Verificamos quais vias de sinalização são enriquecidas por esses genes. As CNAs de ganho enriqueceram vias relacionadas ao controle do ciclo celular, sinalização RAC1/PANK1/P38/MMP2, Câncer gástrico e sinalização WNT, infecção viral. Genes presentes nessas vias foram localizados nas citobandas 7p11 (*EGFR*), 7p21 (*RPA3*, *CDK6*, *POLR1F*, *CYCS*, *NDUFA4*) 8q24 (*FAM91A1*, *ATAD2*, *DSCC1*, *MYC*, *EIF3*, *HNDUFB9*, *ANGPT1*). Da mesma forma as vias de sinalização enriquecidas pelas CNAs são as vias de infecção viral e PI3K-AKT. As CNAs que enriqueceram vias são



4q35.1(CASP3), 13q14.2 (HTR2A, CYSLTR2), 17p13.2 (CXCL16, ARRB2, CRK, OR1D2, OR1D4, OR1A2),18q21.33 (PHLPP1, BCL2, SERPINB2, GALR1) (Figura 11).

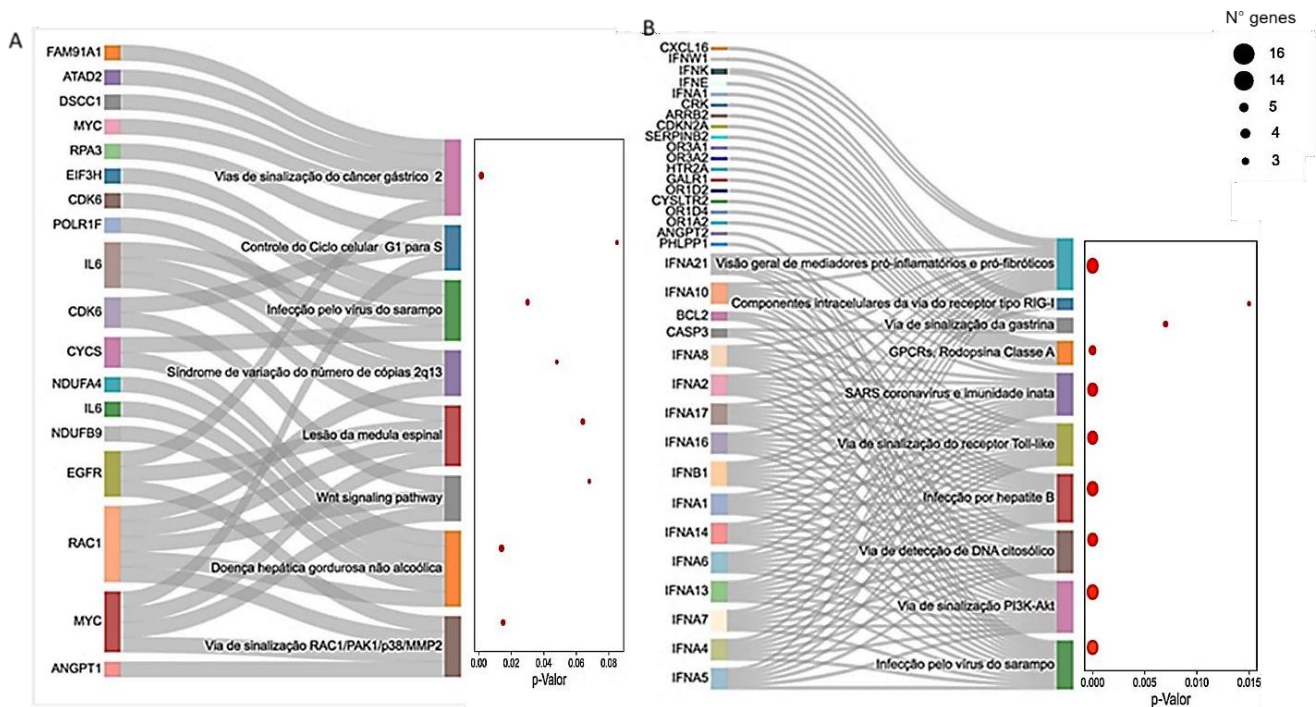


Figura 11: O gráfico das Wikipathways mostra dez vias de sinalização mais, significativas ( $p\text{-valor} < 0,05$ ). A. Vias enriquecidas com genes que tiveram ganho no número de cópias. B. Vias enriquecidas com genes que tiveram perda no número de cópias.

#### 4.5 Identificação de regiões ricas em supressores tumorais e oncogenes.

No intuito de identificar regiões genômicas, com papel relevante na carcinogênese, utilizamos dados do *OncobK* para verificar se oncogenes e supressores tumorais que são utilizados como biomarcadores preditivos de precisão estão presentes nas linhagens AGP01 e ACP03. No geral identificamos 183 genes distribuídos em 49 regiões genômicas, o diagrama de Venn mostra que esse mesmo conjunto de genes também ocorre nas linhagens do CLE e *CellMiner* como mostra a figura 12.

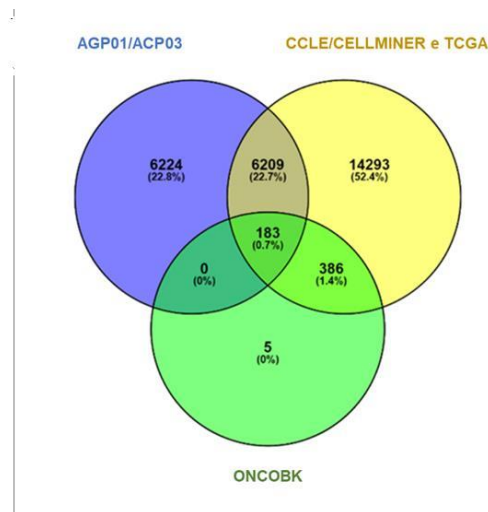


Figura 12: Diagrama de Venn mostra conjunto de biomarcadores que tiveram ganho ou perda no número de cópias e que estão presentes nas linhagens AGP01 e ACP03.

A análise dos 183 genes encontrados nas linhagens AGP01 e ACP03 mostra que a maior parte são supressores tumorais (101 genes) e se encontram em regiões de perda genômica, sendo que 70% a 90% se concentram nas regiões 19p13, 3q25-q27, 15q21-q26 Figura 13.

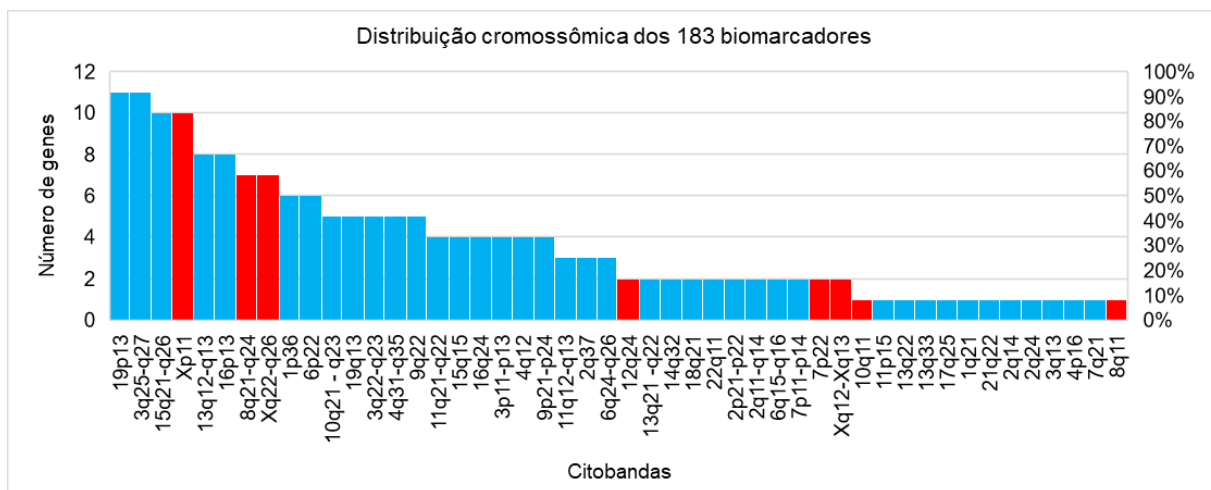


Figura 13: O Diagrama mostra a distribuição cromossômica dos biomarcadores preditivos para câncer.

Também identificamos 43 oncogenes, a maior parte, se concentram nas regiões Xp11, 8q21-q24, Xq22-q26. Também identificamos ganho no número de cópias dos oncogenes *FOXP1*, *MITF* (3p13), *EGFR* (7p11), *INHBA* (7p14), *CDK6* (7q21), *GNA12*

(7p22), *RAC1*, *RUNX1T1*, *WWP1* (8q21), *UBR5* (8q22), *MYC*, (8q24), *ARAF*, *TFE3*, *CCNB3* (Xp11), *AR*, *MED12* (Xq12-q13), *BTK*, *XIAP* (Xq22- q26), esses são oncogenes e tiveram ganho no número de cópias nas linhagens AGP01 e ACP03. Como mostra figura 13.

Esses 183 genes enriqueceram vias de sinalização relacionadas principalmente a infecção viral, ciclo celular. Além disso, na linhagem ACP03 foram alteradas vias de adesão celular e vias relacionadas a síntese de proteoglicanos indicando que essa linhagem possa ter um maior potencial invasivo conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3: Principais vias enriquecidas com oncogenes e supressores tumorais encontrados nas linhagens AGP01 e ACP03.

Vias Afetadas	Genes	Localização	pValor
<b>AGP01/ACP03 PERDA</b>			
hsa05200: Vias em Câncer	FGFR3, CDKN2B, CDKN2A, GADD45B, FLT3, PIK3R2, FOXO1, EPOR, INSR, BBC3, BCR, GNA11, PLCG2, BAX, E2F3, HRAS, JAK3	4p16, 6p22, 9p21, 11p15, 13q12, 13q14, 16q24, 9p13, 19q13, 22q11	8,15E+08
hsa04218: Senescência Celular	CDKN2B, GADD45B, CDKN2A, PIK3R2, GATA4, E2F3, HLA-A, HRAS, FOXO1	6p22, 8p23, 9p21, 19p13, 13q14, 11p15	6,39E+09
hsa05203: Carcinogênese Viral	CDKN2B, H2BC5, CDKN2A, BAX, PIK3R2, HLA, HRAS, JAK3	6p22.2, 9p21, 11p15, 19q13, 19p13	3,21E+11
hsa04068: Via de sinalização FOXO	CDKN2B, GADD45B, INSR, HRAS, FOXO1, KLF2	9p21, 11p15, 13q14, 19p13	1,89E+12
hsa04550: Via de sinalização regulação da pluripotência das células-tronco	ACVR1, PIK3R2, JARID2, HRAS, FGFR3, JAK3, ACVR2A	2q22, 2q24, 4p16.3, 6p22.3, 1p15.5, 19p13	3,05E+12
hsa05226: Câncer gástrico	CDKN2B, CDX2, GADD45B, BAX, PIK3R2, E2F3, HRAS	6p22, 9p21, 11p15, 13q12, 19p13, 19q13	3,80E+11
hsa04151: Via de sinalização PI3K-Akt	HRAS, FGFR3, JAK3, EPOR	4p16, 11p15, 19p13	2,64E-02
hsa05163: Infecção por citomegalovírus humano	CDKN2A, GNA11, BAX, PIK3R2, E2F3, HLA-A, HRAS	6p22, 9p21, 11p15, 19p13, 19q13	0,003204795
hsa01522: Resistência Endócrina	CDKN2A, CARM1, BAX, PIK3R2, E2F3, HRAS	6p22, 9p21, 11p15, 19q13, 19p13	4,11E+12
<b>AGP01/ACP03 GANHOS</b>			
hsa05200: Vias no Câncer	AR, CDK6, HEY1, MYC, XIAP, RAC1, EGFR, RUNX1T1	7 p11, 7q21, 7p22, 8q21, 8q24, Xq12, Xq25	1,35E-03
hsa05207: Carcinogênese química	AR, MYC, CREB3L2, XIAP, EGFR	7p11, 7q33, 8q24, Xq12, Xq25	4,87E-03
hsa05163: Infecção por citomegalovírus humano	CDK6, MYC, CREB3L2, RAC1, EGFR	7p11, 7p22, 7q33, 8q24	6,01E-03
hsa04151: Vias de sinalização PI3K-Akt	CDK6, MYC, CREB3L2, RAC1, EGFR	7p11, 7q21, 7 p22, 7q33, 8q24	2,78E-02
hsa04110: Ciclo Celular	CDK6, STAG2, MYC, RAD21	7q21, 8q24, Xq25	8,03E-03
hsa05224: Câncer de mama	CDK6, HEY1, MYC, EGFR	7p11, 7q21, 8q21, 8q24	1,22E-02
hsa04310: Vias de sinalização Wnt	SFRP4, MYC, RSP02, RAC1	7p14, 7p22, 8q23, 8q24	1,80E-02
hsa05169: Infecção pelo vírus Epstein Barr	CDK6, MYC, BTK, RAC1	7q21, 7p22, 8q24, Xq22	2,83E-02
hsa05131: Shigellosis	NOD1, RAC1, FOXO4, EGFR	7p11, 7p14, 7p22, Xq13	4,70E-02
hsa05165: Infecção por Papilomavírus Humano	CDK6, HEY1, EGFR	7p11, 7q21, 8q21	9,46E-02
<b>ACP03 PERDA</b>			
hsa05200: Vias de Câncer	RET, GSK3B, MAP2K1, CREBBP, SMAD3, NCOA4, PTEN, PIK3CD, BRCA2, ESR1, TGFBR1, IL2, MTOR, ML, IGF1R, RAD51, MSH2, TRAF3, KIT, BCL2, CCDC6, FAZ, AKT1, SOS1,	1p36, 2p21, 2p22, 3q13, 4q12.4q27, 6q25, 9q22, 10q11, 10q21, 10q23, 13q13, 14q32, 15q15, 15q22, 15q26, 16p13, 18q21	1,49E+07
hsa05224: Câncer de Mama	GSK3B, MAP2K1, FLT1, SYK, PDPK1, PTEN, PIK3CD, TSC2, IL2, MTOR, IGF1R,	1p36, 2p22, 3q13, 4q12.4q27, 9q22, 10q23, 13q12, 14q32, 15q22, 15q26, 16p13, 18q21	2,38E+09
hsa05165: Infecção por papiloma Vírus Humano	GSK3B, MAP2K1, KIT, PTEN, PIK3CD, AKT1, PGR, BRCA2, SOS1, ESR1, MTOR, IGF1R	1p36, 2p22, 3q13, 4q12, 6q25, 10q23, 11q22, 13q13, 14q32, 15q22, 15q26	4,90E+11
hsa01521: EGFR resistência a tirosina quinase	GSK3B, MAP2K1, PTEN, BCL2, GAB1, KDR, PIK3CD, AKT1, SOS1, MTOR, IGF1R	1p36, 2p22, 3q13, 4q12, 4q31, 10q23, 15q22, 15q26, 18q21	5,58E+06
hsa05215: Câncer de Próstata	GSK3B, MAP2K1, CREBBP, PDPK1, PTEN, BCL2, PIK3CD, AKT1, SOS1, MTOR, IGF1R,	1p36, 2p22, 3q13, 10q23, 14q32, 15q22, 15q26, 16p13, 18q21	4,20E+08
hsa04068: Via de sinalização FOXO	MAP2K1, CREBBP, SMAD3, PDPK1, SETD7, PTEN, PIK3CD, AKT1, SOS1, TGFBR1, IGF1R	1p36, 2p22, 4q31, 9q22, 10q23, 14q32, 15q22, 16p13,	7,29E+08
hsa05225: Carcinoma Hepatocelular	GSK3B, MAP2K1, SMAD3, PTEN, GAB1, PIK3CD, AKT1, SOS1, TGFBR1, MTOR, IGF1R	1p36, 2p22, 3q13, 4q31, 9q22, 10q23, 14q32, 15q22, 15q26,	7,00E+09
hsa04510: Adesão focal	MAP2K1, GSK3B, FLT1, PDPK1, PTEN, BCL2, KDR, PIK3CD, AKT1, SOS1, IGF1R,	1p36, 2p22, 3q13, 4q12, 10q23, 13q12, 14q32, 15q26, 16p13, 18q21,	3,36E+10
hsa05205: Proteoglicanos em câncer	MAP2K1, PDPK1, GAB1, KDR, FAZ, PIK3CD, AKT1, SOS1, ESR1, MTOR, IGF1R	1p36, 2p22, 4q12, 4q31, 6q25, 10q23, 14q32, 15q22, 15q26, 16p13,	3,97E+10

## 4.6 Genes diferencialmente expressos

Através da análise interativa de perfis de expressão gênica 2 (GEPIA2), comparamos os níveis de expressão dos genes que tiveram alteração no número de cópias em amostras tumorais de pacientes de câncer gástrico (TCGA N° = 408) e em amostras normais (GTEx, N° = 211). A análise do box plots indicou que os níveis de expressão dos genes *ERBB2*, *MYC*, *CDK6*, *CYP51A1*, *ANKIB* são significativamente ( $p < 0,05$ ) aumentados nas amostras tumorais em comparação com as amostras normais do TCGA como mostra a figura 14. Quando analisamos o padrão de expressão das CNAs presentes apenas em linhagens gástricas, observamos que o ganho no número de cópias do GNA12 nessas linhagens pode está relacionado com o aumento da expressão em amostras tumorais uma vez que o resultado foi significativo ( $p < 0,05$ ). O mesmo padrão de expressão foi observado no gene *TERT* e gene *C10orf11*, no entanto, a comparação entre amostras normais e tumorais não foi significativa.

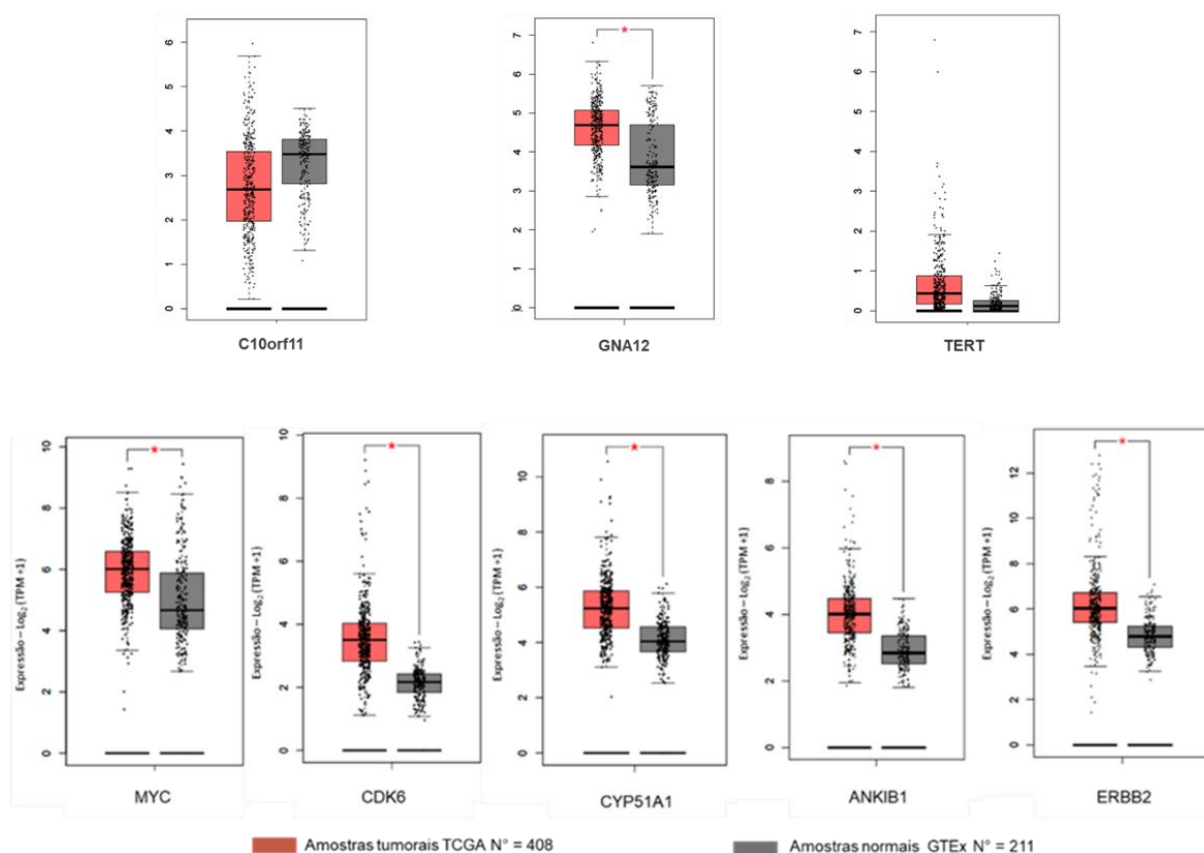
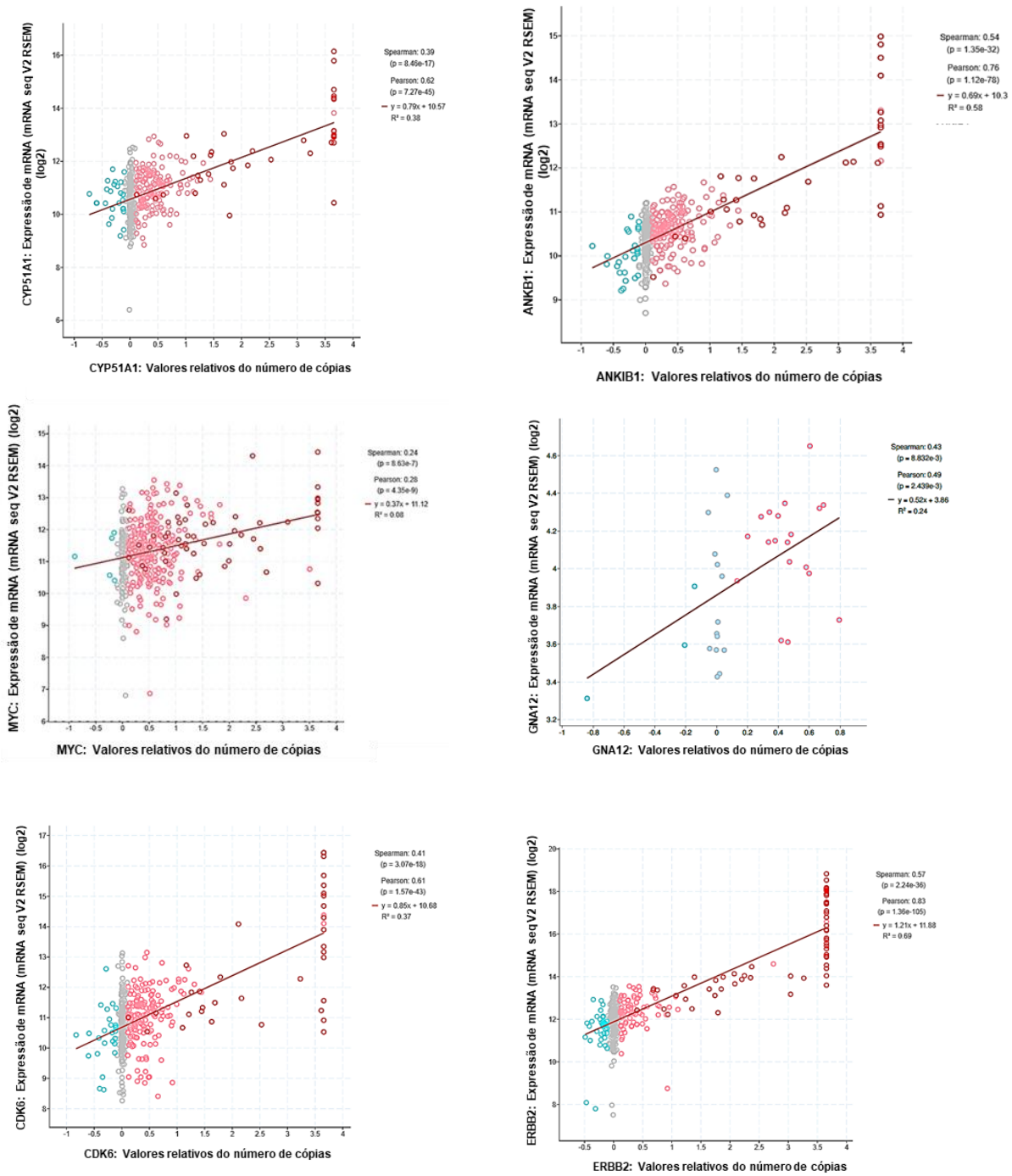


Figura 14: Genes diferencialmente expressos em amostras tumorais de câncer gástrico. Cor vermelha indica nível de expressão em amostras tumorais, em cinza indica nível de expressão em amostras normais.

Por meio da ferramenta *Plos* disponível no cBioportal, verificamos que os níveis de expressão gênica desses genes são consistentes com a alteração do número de cópias. Valores da correlação de Pearson ( $p < 0.05$ ) como mostra a figura 15.



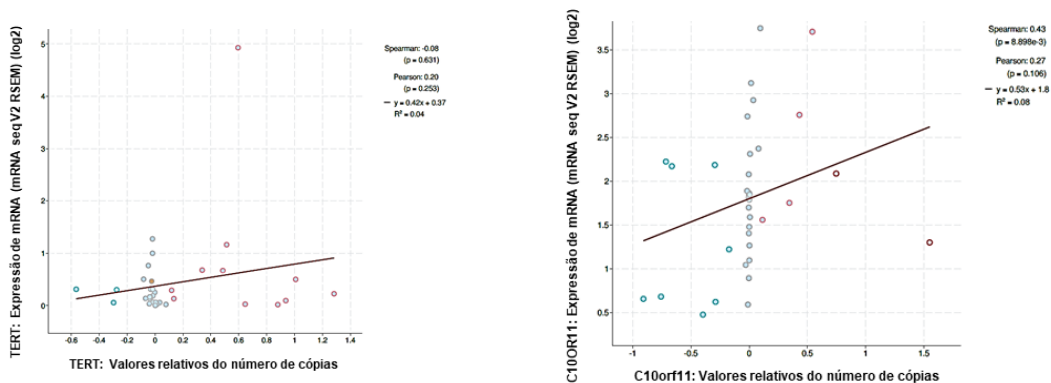


Figura 15: Correlação da expressão de mRNA e alterações genômicas em ERBB2, MYC, CDK6, CYP51A1, ANKB1, GNA12, TERT, C10orf11. Os dados foram recuperados da web portal cBioportal of Câncer Genomics. A expressão de mRNA (RNAseq V2 RSEM) (log2) é plotado contra alterações putativas do número de cópias de CNA de GISTIC. Esferas Azuis indica perda, esferas vermelhas indica ganho no número de cópias, esferas cinzas indicam número de diploide.

Os genes ANKIB1 ( $Pearson = 0.76$ ) e ERBB2 ( $Pearson = 0.83$ ) foram os únicos que apresentaram uma correlação forte entre o ganho no número de cópias e o aumento da expressão. Essa correlação também foi observada nos genes GNA12 e CDK6 que também tiveram aumento no número de cópias.

#### 4.7 Análise dos genes diferencialmente expressos

A utilizamos a ferramenta onprints para verificar a frequência dos genes observamos que com exceção do GNA12, todos possuem frequência acima 10% em amostras tumorais gástricas do TCGA. Destacamos o gene ERBB2 que além possuir uma maior frequência, também é pontado como um gene drive na ocorrência de mutações. Além disso, os CYP51A1 e ANKIB1 ambos localizados na região 7q21 tiveram frequência alta apesar de não serem considerados oncogenes e nem supressores tumorais como mostra a figura 16.

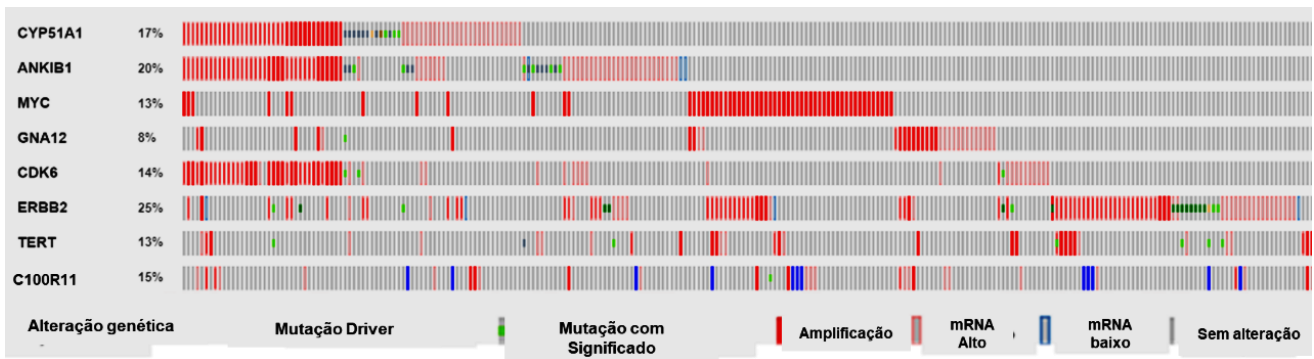


Figura 16: Frequência dos genes diferencialmente expressos em amostras de câncer gástrico

#### 4.8 Análise Kmplot

Para analisamos a a influência desses genes na sobrevida desses pacientes acessamos os valores da expressão dos mRNAs dos genes *ERBB2*, *MYC*, *CDK6*, *CYP51A1*, *ANKIB1*, *GN12* e *TERT* através do *kmpplot*. Observamos que o aumento expressão do *ERBB2* (17q12) *TERT* (5p15) e *GN12* (7p22) está significativamente correlacionada com a piora do prognóstico para todos os pacientes com câncer gástrico, o que também foi observado no aumento da expressão de *ANKIB1* (7q21.2) apesar de não ter sido significativo. O oposto foi observado na análise de expressão do *MYC* (8q24) e *CYP51A1* (7q21.2) onde a baixa expressão estaria relacionada a piora no prognóstico.

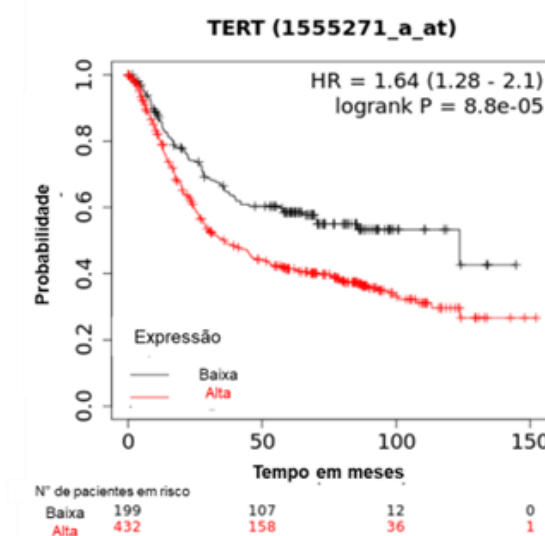
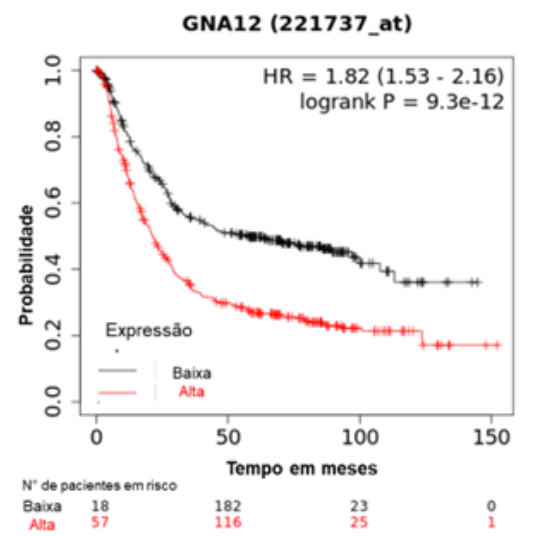
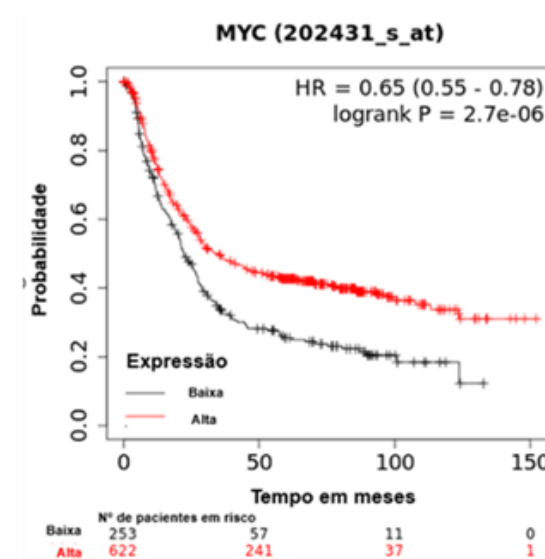
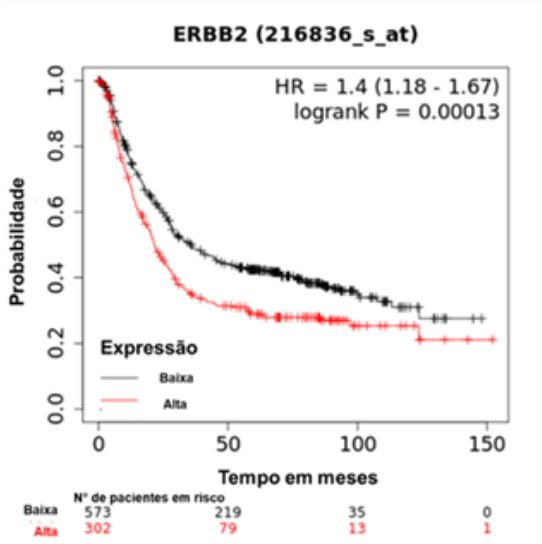
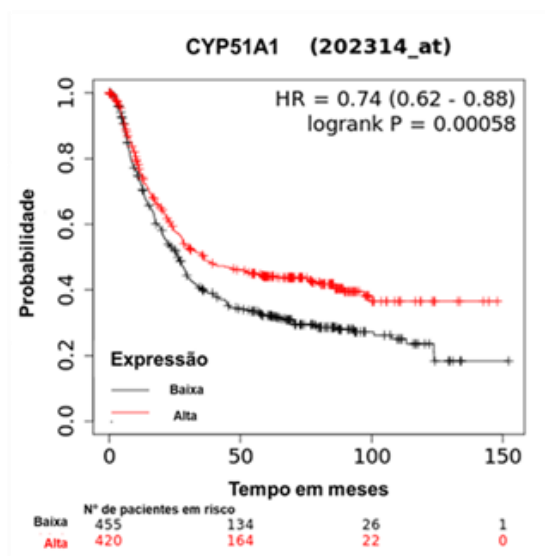
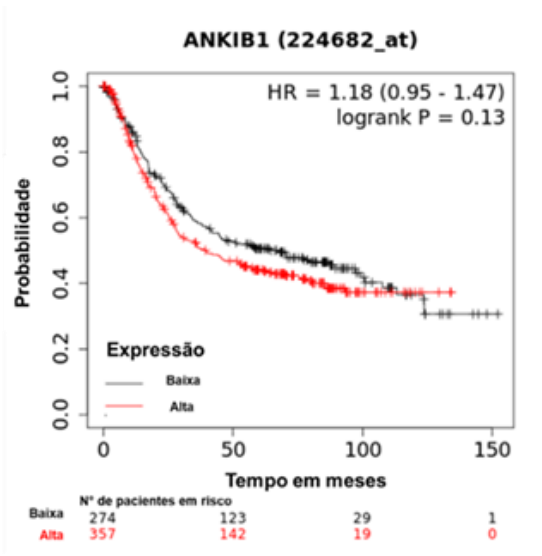


Figura 17: Análise kmPlot dos genes diferencialmente expressos.



## 5 DISCUSSÃO

A AGP01 e ACP03 são linhagens de células de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal derivada de líquido ascítico canceroso e tumor sólido respectivamente. Ambas foram estabelecidas e caracterizadas por Leal e colaboradores (2009). Por serem derivadas de pacientes do Pará, cuja população é caracterizada pela miscigenação entre europeus, africanos e ameríndios, essas linhagens trazem informações relevantes sobre a genômica do CG.

Apesar dessas linhagens serem amplamente utilizadas em pesquisas voltadas a esse tipo de câncer (LIMA et al., 2004; LEAL et al., 2009, 2011; SOARES et al., 2015; ARAUJO et al., 2018; PINTO et al., 2019), o conjunto de CNAs presentes na AGP01 e ACP03 nunca havia sido comparado com de outras linhagens celulares e mesmo com dados de outras populações. Entretanto, esses dados podem maximizar os resultados em pesquisas sobre biomarcadores ou alvos terapêuticos em estudos de drogas anticâncer.

Entendemos que nem todas as regiões de ganho ou perda genômica possuem significado funcional ou um significado relevante para a carcinogênese. Por esse motivo, uma análise mais aprofundada dos dados obtidos sobre CNAs encontradas é importante para uma maior compreensão dos mecanismos tumorais. Inicialmente, realizamos uma caracterização geral das regiões de perda e ganho genômico, e identificamos 95 segmentos genômicos alterados na linhagem AGP01 (78 perdas e 17 ganhos). Já na linhagem ACP03, encontramos 152 CNAs (123 perdas e 24 ganhos). Apesar da diferença na quantidade, a proporção entre segmentos perdidos ou ganhados, bem como a distribuição das CNAs foi semelhante ao observado por Zang e colaboradores (2011) que analisaram um conjunto de 50 amostras de CG do tipo intestinal utilizando a técnica de MLPA para identificar ganhos no número de cópias em segmentos dos cromossomos 1q, 5p, 7, 8, 13 e 20 e perdas no número de cópias nos cromossomos 1p, 3p, 4, 5q, 9p, 17p, 18q, 19p, 21 e 22 (ZANG et al., 2011).

Da mesma forma, identificamos um conjunto de CNAs de ganho e perda nas linhagens AGP01 e ACP03 que se mostraram frequentes nas linhagens do CCLE

e CellMiner. Essas CNAs também foram frequentes em diversos cânceres indicando que podem estar relacionadas a processos de transformação celular. Em geral, CNAs recorrentes afetam genes que fazem parte de vias importantes de controle de proliferação celular. CNAs significativas para o processo de início e proliferação celular devem afetar as células de modo que essas adquiram capacidade proliferativa, evitem supressores tumorais, resistam à apoptose, repliquem-se ilimitadamente, ativem angiogênese e a invasão e metástase, reprogramem seu metabolismo e evitem a destruição imunológica, características importantes para a formação de tumores malignos (HANAHAN, 2022).

O tipo histológico do tumor gástrico também influencia no perfil de CNAS (TAKADA *et al.*, 2005). Em nosso estudo verificamos se CNAS presentes em linhagens comerciais de adenocarcinoma gástrico do subtipo difuso (MKN45 e FU97) e do subtipo intestinal (MKN74 e MKN7) também ocorrem nas linhagens AGP01 e ACP03. Nossos resultados apontaram apenas a perda do *CDKN2B* (9p21.3) como evento comum entre as linhagens de estudos (AGP01 e ACP03) e linhagens do CG do subtipo difuso (MKN45 e FU97). Esse subtipo de CG é caracterizado por ser geneticamente estável e está mais atrelado a mutações no *CDH1*, *RHOA*, por podem ser herdadas de formas hereditárias, além de estar associado ao pior prognóstico e tem maior resistência as terapias (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2020).

Já os ganhos 7q, 8q,17q e as perdas 2q22, 8p23.1, 9p21.3 foram identificadas tanto nas linhagens do subtipo intestinal MKN74, MKN7 como nas AGP01 e ACP03. Esses resultados corroboram como os apresentados na literatura (BURBANO *et al.*, 2006; CALCAGNO *et al.*, 2005; CALCAGNO, *et al.*, 2016; LEAL, *et al.*, 2011). Além disso, também identificamos o ganho no número de cópias dos genes *GNA12* (7p22), *TERT*(5p15) e perda do número de cópias do *C100rf11* ocorreram apenas em linhagens gástricas incluindo as linhagens em estudo. Observamos que as linhagens em estudo AGP01 e ACP03 ainda preservam características do seu tipo histológico de original, caracterizado como subtipo intestinal conforme descrito por Leal colaboradores (2009), que observaram a ocorrência de trissomias nos cromossomos 7 e 8 e deleção do braço curto do cromossomo 17 região do gene TP53 em ambas as linhagens AGP01e ACP03. Essas alterações são descritas por vários autores como características da

instabilidade genômica presente em adenocarcinoma do subtipo intestinal (JIANG; HE; ZHANG, 2020; LARIOS-SERRATO *et al.*, 2022). Ganhos na região 8q24 locus do *MYC* também foi observado em amostras tumorais gástricas do subtipo intestinal (BURBANO *et al.*, 2006). Posteriormente essas mesmas alterações foram relatadas por Calcagno e colaboradores (2013) ao comparar alterações genômicas nas linhagens AGP01 e ACP03 com alterações encontradas em 33 amostras de CG de pacientes Brasileiros. Essas evidências sugerem que embora essas alterações cromossômicas sejam frequentes e comumente observadas em outras linhagens celulares, não são em decorrência do processo de cultivo celular, mas sim uma característica genômica de CG do subtipo intestinal de pacientes brasileiros.

Nossa análise evidenciou que as CNAs apontadas como mais significativas nas amostras tumorais são as mesmas apontadas como mais frequentes nas linhagens comerciais. O enriquecimento das vias acionadas por CNAs de ganho indicaram mudanças significativas no ciclo celular, sinalização RAC1/PANK1/P38/MMP2, sinalização WNT e infecção viral. Também encontramos um grupo de CNAs presentes apenas em linhagens gástricas, cujo o enriquecimento das vias de sinalização estava atrelado ao mecanismos virais. Essas vias impulsionam mecanismos de proliferação celular, migração, diferenciação e angiogênese (GONZALEZ-VILLASANA *et al.*, 2015). A maior parte dos genes que enriqueceram essas vias estão localizados nas regiões 5q 15, 7p11, 7p21, 7p22, 8q24, uma possível explicação para a influência dessas CNAs em vias relacionadas a carcinogênese é devido a presença massiva de oncogenes nessas regiões.

Os dados do OncoBK evidenciaram o ganho no número de cópias de mais de 40 oncogenes classificados como biomarcadores preditivos concentrados em regiões específicas dos cromossomos 7 e 8 que tiveram ganho no número de cópias nas linhagens AGP01 e ACP03. Esses resultados sugerem que as linhagens AGP01 E ACP03 possuem regiões genômicas de ganho que favorecem o crescimento e a transformação celular corroborando com dados da literatura. Para Wee *et al* (2018), os ganhos genômicos estão relacionados ao aumento da expressão de genes que possam proporcionar as células cancerosas uma vantagem para o desenvolvimento de metástase. Em células tumorais é natural o ganho no número de cópias de regiões ricas em oncogenes (WEE *et al.*, 2018).

Por esse motivo ganhos nos cromossomos 7 e 8 foram descritos por vários autores que estudaram CNAs em câncer gástrico (BIBI *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2012; JIN *et al.*, 2015; SEABRA *et al.*, 2014). A análise de aCGH de 40 pacientes com CG realizado por Jin e colaboradores (2015) destaca as regiões 7p22 (*FBXL18*, *ACTB*, *ACTG1* e *RNF216*) e 8q24 (*PLEC1*, *GPAA1*, *SHARPIN*, *BOP1*, *HSF1*, *SLC39A4*, *RECQL4*). Em outro estudo, envolvendo 88 pacientes com CG o ganho no número de cópias do (8q24) *MAPK15* foi correlacionado com o aumento da expressão do mRNA, enquanto que a perda da função do *MAPK15* foi associada a diminuição da proliferação celular, através da parada do ciclo celular.

Do mesmo modo identificamos ganhos no número de cópias das regiões 7q12 (*ERBB2*, *GRB7*, *MIEN1*), 7q21.2 (*KRIT1*, *CDK6*, *PEX1*, *GATAD1*, *RBM48*, *FAM133B*, *LRRD1*), 8q24 (*MYC*) Esses genes foram apontados pelo OncoBK como oncogenes ou supressores tumorais e enriqueceram vias relacionadas a carcinogênese, via PI3K-AKT, vias de sinalização WNT infecção viral e ciclo celular, que podem estar super expressas nas linhagens AGP01 e ACP03. Nossos achados sugerem que regiões dos cromossomos 7 e 8 são ricas em drives genômicos e, portanto, devem ser melhor estudadas para uma maior compreensão dos mecanismos moleculares intrínsecos a essas regiões.

A análise de enriquecimento das vias acionadas pelas perdas genômicas, destacou a via de sinalização de indutores do gene do ácido retinóico I (RIG-I), esses são receptores de reconhecimento de padrões (RRP), avaliam padrões moleculares associados a patógenos, são ativos no citoplasma e ao reconhecerem sequências de RNA viral, ativam a transcrição dos IFN de tipo I e citocinas pró-inflamatórias, dessa forma desempenham um papel importante na imunidade antiviral (YOSHINO *et al.*, 2018). Estudos em camundongos imunodeficientes mostram que tratamentos com (RRP) exercessem efeitos antitumorais (LI *et al.*, 2017). Sugerimos que as CNAs 4q35.1, 9p21, 17p13.2 e 18q21 podem deixar as linhagens AGP01 e ACP03 mais susceptíveis a infecções virais e também a efeitos de oncovírus como o *HHV-4*, uma vez que receptores de reconhecimento de padrões (RRP) possa não estar sendo expressos o que facilitaria a replicação viral na célula tumoral.

Na região 9p21 há um cluster de IFN tipo I, a perda dessa região é

comum em câncer do cérebro, mama, cervical, rim, fígado, pulmão, mesênquima, mesotelioma, tireóide e útero (RAZAGHI *et al.*, 2021). A perda da do cluster de *IFN tipo I*, permite que vias oncogênicas reprimam vias de sinalização imunológica, promovendo a tumorigênese e ajudando células tumorais a evitar a imunovigilância (YE *et al.*, 2018).

Esse mecanismo de evasão imunológica foi associado a um pior prognóstico em pacientes com melanoma (LINSLEY *et al.*, 2014). Assim, a perda 9p21 pode ser útil como um marcador de prognóstico, além de se poder prever resistência à imunoterapia, como o tratamento anti-CTLA4 (RAZAGHI *et al.*, 2021). Além dos interferons o locus 9p21 também abriga inibidores do ciclo celular como *CDKN2A* (codificando *p16INK4a*, *p14ARF*) e *CDKN2B* (codificando *p15INK4b*), que coletivamente ativam as principais vias supressoras de tumor *p53* e *RB17b* (BARRIGA *et al.*, 2022). As vias enriquecidas pelas perdas genômicas sugerem que as linhagens AGP01 e ACP03 tenham desenvolvido mecanismos de resistência e de evasão da resposta imune através da desregulação das vias envolvendo família de indutores do gene do ácido retinóico I (*RIG-I*) e *IFN* de tipo I. Além disso, observamos que a perda 9p21 também esteja relacionada com o potencial proliferativo das linhagens analisadas, uma vez que houve perdas de genes que controlam a apoptose.

As perdas genômicas podem estar relacionadas a perda de função de supressores o que facilitaria a progressão tumoral (ZHAO; ZHAO, 2016). Nossos resultados corroboram os dados da literatura, uma vez que identificamos uma maior presença de supressores tumorais (101 genes) nas regiões de perda genômica, em destaque estão as regiões 19p13, 3q25-q27, 15q21-q26 onde se concentram de 70 a 90% desses supressores. A maior parte dos supressores tumorais estão localizados na região 19p13 e enriqueceram as vias de sinalização PI3K-Akt, Ciclo celular e resposta antiviral que como vimos, sofreram a perda de supressores tumorais e também obtiveram ganhos de oncogenes como já comentamos. O desequilíbrio dessas vias ocorre em ambas as linhagens AGP01 e ACP03 e estão tem sido associado a outros tipos de câncer de mama (OESTERREICH *et al.*, 2001) e adenocarcinoma esofágico (WHITSETT *et al.*, 2018). Além das alterações citadas acima a linhagem ACP03 também apresenta um conjunto de CNAs específicas. Uma dessas alterações foi a perda da região 15q21-q26 onde se localizam os

supressores *TP53BP1*, *B2M*, *SMAD3*, (BONILLA CARLOS, 2014). A perda no número de cópias dessa região foi relatada em carcinomas do colorretal, câncer de bexiga, mama e pulmão (BONILLA CARLOS,2014). Além de ter sido associada a metástase em carcinomas escamosos de cabeça e pescoço (POETSCH; KLEIST, 2006). Outra alteração encontrada a linhagem ACP03 está relacionada a citobanda1p36 onde estão localizados os supressores tumorais *MTOR*, *SDHB*, *SPEN*, *ERF11*, *MAD2L2* a perda do número de cópias de todos esses genes foi associada ao pior prognóstico (NADERI, 2020).

No estudo envolvendo 83 pacientes japoneses com adenocarcinoma do gástrico tipo intestinal a região 1p36 foi significativamente associada a tumores avançados e metástases linfonodais (JIAO et al., 2006). Essas alterações levaram a ACP03 a apresentar alterações nas vias relacionadas aos proteoglicanos, uma das moléculas presente na matriz extracelular e no glicocálix das células. Diversos estudos relatam que mudanças no estroma tumoral é causado pela disfunção dos proteoglicanos o que pode contribuir para metástases (BASS et al., 2014; GUO et al., 2020; IOZZO; SANDERSON, 2011). Apesar da linhagem ACP03 ser derivada de tumor sólido, uma característica mais invasiva pode ter sido adquirida durante a manutenção do cultivo celular.

Os genes *CDK6*(7p21), *CYP51A1* e *ANKIB1* (7q21), *MYC* (8q24), *GNA12* (7p22), *TERT* (5p15), *C10orf11* (10q22) *ERBB2* (17q12), foram identificados como genes diferencialmente expressos em amostras de gástrico do TCGA e nas linhagens AGP01 e CP03. Além disso, a expressão desses genes foi correlacionada com o aumento no número de cópias em vários estudos de câncer indicando a importância dessas regiões para a carcinogênese (BIBI et al., 2018; DEKKEN et al., 2009; OESTERREICH et al., 2001; TAMILZHALAGAN; RATHINAM; GANESAN, 2017). Esses genes foram diferencialmente expressos em amostras tumorais do TCGA, além de disso, tiveram sua expressão fortemente correlacionada com o aumento no número de cópias, além de serem frequentes nas amostras tumorais. A análise do Kmlplot mostra que *GNA12* (7p22), *TERT* (5p15), *C10orf11* (10q22) *ERBB2* (17q12) foram associados a um pior prognóstico.

As CNAs são uma das principais características da carcinogênese gástrica, contribuem para o início, progressão e resistência terapêutica do câncer. No entanto as regiões cromossômicas com ganho e perda frequentes ainda são mal definidas. Bancos de dados com TCGA, CCLE, CellMiner e OncoBK, ajudam a elucidar as alterações genômicas importantes para a carcinogênese. Uma vez caracterizadas as CNAs ricas em marcadores moleculares são cada vez mais utilizadas como indicadores de prognóstico. No entanto, a utilização das CNAs no tratamento do câncer permanece pouco inexplorado. As linhagens células AGP01 e ACP03 são amplamente utilizadas para pesquisas sobre o CG principalmente na busca de novos marcadores e de novas drogas a caracterização dessas linhagens pode ajudar no direcionamento dos próximos estudos.

## 6 CONCLUSÃO

Destacamos que ganho no número de cópias *GNA12* (7p22), *TERT* (5p15), *ERBB2* (17q12) e a perda de cópias do *C10orf11* (10q22) podem está relacionados ao CG a uma piora do prognóstico.

Destacamos os ganhos 7p11, 7p21, 8q24 nas linhagens AGP01 e ACP03 por serem regiões ricas em oncogenes e as perdas 19p13, 3q25-q27, 15q21-q26 por serem regiões ricas em supressores tumorais.

As regiões de ganho e perda influenciam diretamente e de forma simultânea as vias de sinalização ciclo celular, PI3K-AKT e infecção viral essas são as vias mais afetadas nas linhagens AGP01 e ACP03, uma vez que sofreram perdas de supressores tumorais e ganho no número de cópias de oncogenes.

A análise comparativa entre linhagens celulares de CG revelou as CNAs 2q22, 3p14.2, 6q26, 7p11- p15, 7p22, 7q21, 8q23, 8q24, 9p21 ocorrem tanto nas linhagens tumorais gástricas do subtipo intestinal de origem asiática como nas linhagens AGP01 e ACP03, indicando que ambas ainda conservam características associadas ao câncer gástrico do tipo intestinal.

Nossa análise *in silico* evidencia o ganho no número do gene está correlacionado com o aumento da expressão de *ERBB2*, *MYC*, *CDK6*, *CYP51A1*, *ANKIB*, esses genes respondem a variação no número de cópias e são diferencialmente expressos em amostras

tumorais. portanto, esses genes podem ser importantes marcadores moleculares, no entanto, estudos de expressão gênica são indicados para confirmar esses dados.



## REFERÊNCIAS

- ANDOR, N.; MALEY, C. C.; JI, H. P. Genomic instability in cancer: Teetering on the limit of tolerance. **Cancer research**, v. 77, n. 9, p. 2179–2185, 1 maio 2017. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-16-1553. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5413432/>. Acesso em: 21 fev. 2021.
- ARAKAWA, N.; SUGAI, T.; HABANO, W.; EIZUKA, M.; SUGIMOTO, R.; AKASAKA, R.; TOYA, Y.; YAMAMOTO, E.; KOEDA, K.; SASAKI, A.; MATSUMOTO, T.; SUZUKI, H. Genome-wide analysis of DNA copy number alterations in early and advanced gastric cancers. **Molecular Carcinogenesis**, v. 56, n. 2, p. 527–537, 2017. DOI <https://doi.org/10.1002/mc.22514>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mc.22514>. Acesso em: 22 fev. 2021.
- ARAÚJO, T.; KHAYAT, A.; QUINTANA, L.; CALCAGNO, D.; MOURÃO, R.; MODESTO, A.; PAIVA, J.; LIMA, A.; MOREIRA, F.; DE OLIVEIRA, E.; SOUZA, M.; OTHMAN, M.; LIEHR, T.; ABDELHAY, E.; GOMES, R.; SANTOS, S.; ASSUMPCAO, P. Piwi like RNA-mediated gene silencing 1 gene as a possible major player in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, p. 5338–5350, 21 dez. 2018. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i47.5338>.
- ASSUMPCÃO, P. P.; BARRA, W. F.; ISHAK, G.; COELHO, L. G. V.; COIMBRA, F. J. F.; FREITAS, H. C.; DIAS-NETO, E.; CAMARGO, M. C.; SZKLO, M. The diffuse-type gastric cancer epidemiology enigma. **BMC Gastroenterology**, v. 20, n. 1, p. 223, 13 jul. 2020. DOI 10.1186/s12876-020-01354-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01354-4>. Acesso em: 14 dez. 2022.
- BAKHTI, S. Z.; LATIFI-NAVID, S.; ZAHRI, S. Unique constellations of five polymorphic sites of *Helicobacter pylori* vacA and cagA status associated with risk of gastric cancer. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 79, p. 104167, abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104167>.
- BARCHI, L. C.; RAMOS, M. F. K. P.; YAGI, O. K.; MUCERINO, D. R.; BRESCIANI, C. J. C.; RIBEIRO JÚNIOR, U.; ANDREOLLO, N. A.; ASSUMPCÃO, P. P.; WESTON, A. C.; COLLEONI NETO, R.; ZILBERSTEIN, B.; FERRAZ, Á. A. B.; CHARRUF, A. Z.; DIAS, A. R.; BRANDALISE, A.; SILVA, A. M. da; ALVES, B.; MALHEIROS, C. A.; MARINS, C. A. M.; ... FREITAS JÚNIOR, W. R. de. BRAZILIAN GASTRIC CANCER ASSOCIATION GUIDELINES (PART 1): AN UPDATE ON DIAGNOSIS, STAGING, ENDOSCOPIC TREATMENT AND FOLLOW-UP. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 33, n. 3, p. e1535, 2020. DOI 10.1590/0102-672020200003e1535. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-67202020000300304&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202020000300304&tlng=en). Acesso em: 7 set. 2022.
- BARRANCO, S. C.; TOWNSEND, C. M.; CASARTELLI, C.; MACIK, B. G.; BURGER, N. L.; BOERWINKLE, W. R.; GOURLEY, W. K. Establishment and

characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Research**, v. 43, n. 4, p. 1703–1709, abr. 1983. .

BARRETINA, J.; CAPONIGRO, G.; STRANSKY, N.; VENKATESAN, K.; MARGOLIN, A. A.; KIM, S.; WILSON, C. J.; LEHÁR, J.; KRYUKOV, G. V.; SONKIN, D.; REDDY, A.; LIU, M.; MURRAY, L.; BERGER, M. F.; MONAHAN, J. E.; MORAIS, P.; MELTZER, J.; KOREJWA, A.; JANÉ-VALBUENA, J.; ... GARRAWAY, L. A. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modeling of anticancer drug sensitivity. **Nature**, v. 483, n. 7391, p. 603–607, 28 mar. 2012. DOI 10.1038/nature11003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320027/>. Acesso em: 22 fev. 2021.

BARRIGA, F. M.; TSANOV, K. M.; HO, Y.-J.; SOHAIL, N.; ZHANG, A.; BASLAN, T.; WUEST, A. N.; DEL PRIORE, I.; MEŠKAUSKAITĖ, B.; LIVSHITS, G.; ALONSO-CURBELO, D.; SIMON, J.; CHAVES-PEREZ, A.; BAR-SAGI, D.; IACOBUZIO-DONAHUE, C. A.; NOTTA, F.; CHALIGNE, R.; SHARMA, R.; PE'ER, D.; LOWE, S. W. MACHETE identifies interferon-encompassing chromosome 9p21.3 deletions as mediators of immune evasion and metastasis. **Nature Cancer**, , p. 1–19, 7 nov. 2022. DOI 10.1038/s43018-022-00443-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s43018-022-00443-5>. Acesso em: 14 nov. 2022.

BASS, A. J.; THORSSON, V.; SHMULEVICH, I.; REYNOLDS, S. M.; MILLER, M.; BERNARD, B.; HINOUE, T.; LAIRD, P. W.; CURTIS, C.; SHEN, H.; WEISENBERGER, D. J.; SCHULTZ, N.; SHEN, R.; WEINHOLD, N.; KELSEN, D. P.; BOWLBY, R.; CHU, A.; KASAIAN, K.; MUNGALL, A. J.; ... UNC LINEBERGER COMPREHENSIVE CANCER CENTER. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature**, v. 513, n. 7517, p. 202–209, set. 2014. DOI 10.1038/nature13480. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature13480>. Acesso em: 22 fev. 2021.

BIBI, F.; ALI, I.; NASEER, M. I.; ALI MOHAMOUD, H. S.; YASIR, M.; ALVI, S. A.; JIMAN-FATANI, A. A.; SAWAN, A.; AZHAR, E. I. Detection of genetic alterations in gastric cancer patients from Saudi Arabia using comparative genomic hybridization (CGH). **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, 13 set. 2018. DOI 10.1371/journal.pone.0202576. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6136709/>. Acesso em: 24 jan. 2021.

BONILLA CARLOS, A. Fine Mapping of the 15q21 Region Implicates TP53BP1 and B2M in the Lymphomagenesis of Follicular and Diffuse Large B-Cell Lymphomas. **Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis**, v. 05, n. 06, 2014. DOI 10.4172/2157-2518.1000195. Disponível em: <http://omicsonline.org/open-access/fine-mapping-of-the-q-region-implicates-tpbp-and-bm-in-the-lymphomagenesis-of-follicular-and-diffuse-large-bcell-lymphomas-2157-2518-5-195.php?aid=35416>. Acesso em: 15 nov. 2022.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal**

for **clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.  
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

BURBANO, R. R.; ASSUMPÇÃO, P. P.; LEAL, M. F.; CALCAGNO, D. Q.; GUIMARÃES, A. C.; KHAYAT, A. S.; TAKENO, S. S.; CHEN, E. S.; SMITH, M. D. A. C. C-MYC Locus Amplification as Metastasis Predictor in Intestinal-type Gastric Adenocarcinomas: CGH Study in Brazil. **Anticancer Research**, v. 26, n. 4B, seç. Experimental Studies, p. 2909–2914, 1 jul. 2006. Disponível em: <https://ar.iijournals.org/content/26/4B/2909>. Acesso em: 17 fev. 2021.

CALCAGNO, D. Q.; LEAL, M. F.; TAKENO, S. S.; DEMACHKI, S.; SMITH, M. D. A. C. Aneuploidy of Chromosome 8 and C-MYC Amplification in Individuals from Northern Brazil with Gastric Adenocarcinoma. **Anticancer Research**, v. 25, n. 6B, seç. Experimental Studies, p. 4069–4074, 1 nov. 2005. Disponível em: <https://ar.iijournals.org/content/25/6B/4069>. Acesso em: 17 fev. 2021.

CALCAGNO, D. Q. [UNIFESP]; TAKENO, S. S. [UNIFESP]; GIGEK, C. O. [UNIFESP]; LEAL, M. F. [UNIFESP]; WISNIESKI, F. [UNIFESP]; CHEN, E. S. [UNIFESP]; ARAÚJO, T. M. T. [UNIFESP]; LIMA, E. M. [UNIFESP]; MELARAGNO, M. I. [UNIFESP]; DEMACHKI, S. [UNIFESP]; ASSUMPÇÃO, P. P. [UNIFESP]; BURBANO, R. R. [UNIFESP]; SMITH, M. de A. C. [UNIFESP]. Identification of IL11RA and MELK amplification in gastric cancer by comprehensive genomic profiling of gastric cancer cell lines. 2016. DOI 10.3748/wjg.v22.i43.9506. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/handle/11600/56706>. Acesso em: 21 set. 2022.

CHANG, H. R.; NAM, S.; KOOK, M.-C.; KIM, K.-T.; LIU, X.; YAO, H.; JUNG, H. R.; LEMOS, R.; SEO, H. H.; PARK, H. S.; GIM, Y.; HONG, D.; HUH, I.; KIM, Y.-W.; TAN, D.; LIU, C.-G.; POWIS, G.; PARK, T.; LIANG, H.; KIM, Y. H. HNF4 $\alpha$  is a therapeutic target that links AMPK to WNT signalling in early-stage gastric cancer. **Gut**, v. 65, n. 1, seç. Stomach, p. 19–32, 1 jan. 2016. DOI 10.1136/gutjnl-2014-307918. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/65/1/19>. Acesso em: 19 set. 2022.

CHENG, H.; YANG, X.; SI, H.; SALEH, A. D.; XIAO, W.; COUPAR, J.; GOLLIN, S. M.; FERRIS, R. L.; ISSAEVA, N.; YARBROUGH, W. G.; PRINCE, M. E.; CAREY, T. E.; VAN WAES, C.; CHEN, Z. Genomic and Transcriptomic Characterization Links Cell Lines with Aggressive Head and Neck Cancers. **Cell Reports**, v. 25, n. 5, p. 1332-1345.e5, out. 2018. DOI 10.1016/j.celrep.2018.10.007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124718315705>. Acesso em: 21 out. 2022.

CHIA, Na-Yu; DENG, N.; DAS, K.; HUANG, D.; HU, L.; ZHU, Y.; LIM, K. H.; LEE, M.-H.; WU, J.; SAM, X. X.; TAN, G. S.; WAN, W. K.; YU, W.; GAN, A.; TAN, A. L. K.; TAY, S.-T.; SOO, K. C.; WONG, W. K.; DOMINGUEZ, L. T. M.; ... TAN, P. Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development. **Gut**, v. 64, n. 5, seç. Stomach, p. 707–719, 1 maio 2015. DOI 10.1136/gutjnl-2013-306596. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/64/5/707>. Acesso em: 19 set. 2022.

- CHIA, N.-Y.; TAN, P. Molecular classification of gastric cancer. **Annals of Oncology**, v. 27, n. 5, p. 763–769, 1 maio 2016. DOI 10.1093/annonc/mdw040. Disponível em: [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)37423-X/abstract](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)37423-X/abstract). Acesso em: 29 jan. 2021.
- COSTA, J.; AHLUWALIA, A. Advances and Current Challenges in Intestinal in vitro Model Engineering: A Digest. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00144>. Acesso em: 20 set. 2022.
- CURADO, M. P.; MENDONÇA E SILVA, D. R.; DE OLIVEIRA, M. M.; SOARES, F.; BEGNAMI, M. D.; FERNANDEZ COIMBRA, F. J.; DE ASSUMPÇÃO, P. P.; DE SANT'ANA, R. O.; DEMACHKI, S.; DIAS-NETO, E. Disparities in Epidemiological Profile of Gastric Adenocarcinoma in Selected Cities of Brazil. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP**, v. 20, n. 8, p. 2253–2258, 2019. DOI 10.31557/APJCP.2019.20.8.2253. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6852822/>. Acesso em: 16 fev. 2021.
- DE SOUZA, C. R. T.; DE OLIVEIRA, K. S.; FERRAZ, J. J. S.; LEAL, M. F.; CALCAGNO, D. Q.; SEABRA, A. D.; KHAYAT, A. S.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; ASSUMPÇÃO, P. P.; SMITH, M. C.; BURBANO, R. R. Occurrence of Helicobacter pylori and HHV-4 virus infection in endoscopic and gastric cancer patients from Northern Brazil. **BMC Gastroenterology**, v. 14, n. 1, p. 179, dez. 2014. DOI 10.1186/1471-230X-14-179. Disponível em: <https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-230X-14-179>. Acesso em: 24 ago. 2021.
- DEKKEN, H. van; TILANUS, H. W.; HOP, W. C. J.; DINJENS, W. N. M.; WINK, J. C.; VISSERS, K. J.; MARION, R. van. Array comparative genomic hybridization, expression array, and protein analysis of critical regions on chromosome arms 1q, 7q, and 8p in adenocarcinomas of the gastroesophageal junction. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 189, n. 1, p. 37–42, 1 fev. 2009. DOI 10.1016/j.cancergencyto.2008.08.018. Disponível em: [https://www.cancerjournal.org/article/S0165-4608\(08\)00536-0/abstract](https://www.cancerjournal.org/article/S0165-4608(08)00536-0/abstract). Acesso em: 16 jan. 2021.
- DENG, W.; JIN, L.; ZHUO, H.; VASILIOU, V.; ZHANG, Y. Alcohol consumption and risk of stomach cancer: A meta-analysis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 336, p. 109365, 25 fev. 2021. DOI 10.1016/j.cbi.2021.109365. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279721000016>. Acesso em: 29 ago. 2022.
- DHOBI, M. A.; WANI, K. A.; PARRAY, F. Q.; WANI, R. A.; WANI, M. L.; PEER, G. Q.; ABDULLAH, S.; WANI, I. A.; WANI, M. A.; SHAH, M. A.; THAKUR, N. Gastric Cancer in Young Patients. **International Journal of Surgical Oncology**, v. 2013, p. 981654, 2013. DOI 10.1155/2013/981654. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3870864/>. Acesso em: 20 set. 2022.

DIAB, S.; SOCOTEANU, M. P.; ENCARNACION, C. A.; OSBORNE, C. R. C.; HENDRICKS, C. B.; MCINTYRE, K.; THOMAS, V. T.; BHASKARAN, R.; MITTEMPERGHER, L.; MENICUCCI, A.; AUDEH, W.; O'SHAUGHNESSY, J. High-risk breast cancer genes at 8q22-24 and their role in over 5,000 patients evaluated with the 70-gene risk of recurrence assay. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 15\_suppl, p. 3569–3569, 20 maio 2020. DOI 10.1200/JCO.2020.38.15\_suppl.3569. Disponível em: [https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2020.38.15\\_suppl.3569](https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.3569). Acesso em: 30 jan. 2021.

DINCĂ, A. L.; MELIȚ, L. E.; MĂRGINEAN, C. O. Old and New Aspects of H. pylori-Associated Inflammation and Gastric Cancer. **Children (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 7, p. 1083, 20 jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/children9071083>.

DONG, M.; WANG, H.; ZHAO, X.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; HUANG, Y.; XUE, L.; LI, H.; DU, H.; WU, X.; SHAO, C. Expression and prognostic roles of PIK3CA, JAK2, PD-L1, and PD-L2 in HHV-4 virus-associated gastric carcinoma. **Human Pathology**, v. 53, p. 25–34, 1 jul. 2016. DOI 10.1016/j.humpath.2016.02.007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0046817716000708>. Acesso em: 29 jan. 2021.

DONG, Y.; SONG, N.; WANG, J.; SHI, L.; ZHANG, Z.; DU, J. Driver Gene Alterations in Malignant Progression of Gastric Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.920207>. Acesso em: 19 set. 2022.

FAN, B.; DACHRUT, S.; CORAL, H.; YUEN, S. T.; CHU, K. M.; LAW, S.; ZHANG, L.; JI, J.; LEUNG, S. Y.; CHEN, X. Integration of DNA Copy Number Alterations and Transcriptional Expression Analysis in Human Gastric Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e29824, 23 abr. 2012. DOI 10.1371/journal.pone.0029824. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0029824>. Acesso em: 17 fev. 2021.

FERRO, A.; ROSATO, V.; ROTA, M.; COSTA, A. R.; MORAIS, S.; PELUCCHI, C.; JOHNSON, K. C.; HU, J.; PALLI, D.; FERRARONI, M.; ZHANG, Z.-F.; BONZI, R.; YU, G.-P.; PELETEIRO, B.; LÓPEZ-CARRILLO, L.; TSUGANE, S.; HAMADA, G. S.; HIDAKA, A.; ZARIDZE, D.; ... LUNET, N. Meat intake and risk of gastric cancer in the Stomach cancer Pooling (StoP) Project. **International journal of cancer**, v. 147, n. 1, p. 45–55, 1 jul. 2020. DOI 10.1002/ijc.32707. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8550819/>. Acesso em: 26 ago. 2022.

FIGUEIREDO, C.; CAMARGO, M. C.; LEITE, M.; FUENTES-PANANÁ, E. M.; RABKIN, C. S.; MACHADO, J. C. Pathogenesis of gastric cancer: genetics and molecular classification. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 400, p. 277–304, 2017. DOI 10.1007/978-3-319-50520-6\_12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8550817/>. Acesso em: 11 nov. 2022.

GONZALEZ-VILLASANA, V.; FUENTES-MATTEI, E.; IVAN, C.; DALTON, H. J.; RODRIGUEZ-AGUAYO, C.; FERNANDEZ-DE THOMAS, R. J.; ASLAN, B.; MONROIG, P. del C.; VELAZQUEZ-TORRES, G.; PREVIS, R. A.; PRADEEP, S.; KAHRAMAN, N.; WANG, H.; KANLIKILICER, P.; OZPOLAT, B.; CALIN, G.; SOOD, A. K.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Rac1/Pak1/p38/MMP-2 axis regulates angiogenesis in ovarian cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 21, n. 9, p. 2127–2137, 1 maio 2015. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-14-2279. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4417466/>. Acesso em: 15 nov. 2022.

GUINDALINI, R. S. C.; CORMEDI, M. C. V.; MAISTRO, S.; PASINI, F. S.; BRANAS, P. C. A. A.; DOS SANTOS, L.; DE LIMA PEREIRA, G. F.; DE BOCK, G. H.; SACCARO, D. M.; KATAYAMA, M. L. H.; FARAJ, S. F.; SAFATLE-RIBEIRO, A.; RIBEIRO JUNIOR, U.; DIZ, M. D. P. E.; DE GOUVÊA, A. C. R. C.; CHAMMAS, R.; FOLGUEIRA, M. A. A. K. Frequency of CDH1 germline variants and contribution of dietary habits in early age onset gastric cancer patients in Brazil. **Gastric Cancer**, v. 22, n. 5, p. 920–931, 2019. DOI 10.1007/s10120-019-00945-9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6694034/>. Acesso em: 17 fev. 2021.

GUO, J.-Y.; CHIU, C.-H.; WANG, M.-J.; LI, F.-A.; CHEN, J.-Y. Proteoglycan serglycin promotes non-small cell lung cancer cell migration through the interaction of its glycosaminoglycans with CD44. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 2, 2 jan. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0600-3>.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 12 jan. 2022. DOI 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>. Acesso em: 13 nov. 2022.

HARBERS, L.; AGOSTINI, F.; NICOS, M.; PODDIGHE, D.; BIENKO, M.; CROSETTO, N. Somatic Copy Number Alterations in Human Cancers: An Analysis of Publicly Available Data From The Cancer Genome Atlas. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.700568>. Acesso em: 18 set. 2022.

HORIUCHI, Y.; HIRASAWA, T.; ISHIZUKA, N.; HATAMORI, H.; IKENOYAMA, Y.; TOKURA, J.; ISHIOKA, M.; TOKAI, Y.; NAMIKAWA, K.; YOSHIMIZU, S.; ISHIYAMA, A.; YOSHIO, T.; TSUCHIDA, T.; FUJISAKI, J. Diagnostic performance in gastric cancer is higher using endocytoscopy with narrow-band imaging than using magnifying endoscopy with narrow-band imaging. **Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association**, v. 24, n. 2, p. 417–427, mar. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10120-020-01125-w>.

HUANG, K. K.; RAMNARAYANAN, K.; ZHU, F.; SRIVASTAVA, S.; XU, C.; TAN, A. L. K.; LEE, M.; TAY, S.; DAS, K.; XING, M.; FATEHULLAH, A.; ALKAFF, S. M. F.; LIM, T. K. H.; LEE, J.; HO, K. Y.; ROZEN, S. G.; TEH, B. T.; BARKER, N.;

CHIA, C. K.; ... TAN, P. Genomic and Epigenomic Profiling of High-Risk Intestinal Metaplasia Reveals Molecular Determinants of Progression to Gastric Cancer. **Cancer Cell**, v. 33, n. 1, p. 137-150.e5, 8 jan. 2018. DOI 10.1016/j.ccell.2017.11.018. Disponível em: [https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108\(17\)30521-4](https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108(17)30521-4). Acesso em: 28 jan. 2021.

ILIC, M.; ILIC, I. Epidemiology of stomach cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 12, p. 1187–1203, 28 mar. 2022. DOI 10.3748/wjg.v28.i12.1187. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8968487/>. Acesso em: 26 ago. 2022.

IMAI, S.; NISHIKAWA, J.; TAKADA, K. Cell-to-Cell Contact as an Efficient Mode of HHV-4 Virus Infection of Diverse Human Epithelial Cells. **Journal of Virology**, v. 72, n. 5, p. 4371–4378, maio 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC109667/>. Acesso em: 19 nov. 2022.

INCA (Org.). Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Instituto Nacional do Câncer. 9 dez. 2019. **INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 25 ago. 2022.

IOZZO, R. V.; SANDERSON, R. D. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 5, p. 1013–1031, maio 2011. DOI 10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3633488/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

ISLAMI, F.; BOFFETTA, P.; REN, J.; PEDOEIM, L.; KHATIB, D.; KAMANGAR, F. High-temperature beverages and Foods and Esophageal Cancer Risk -- A Systematic Review. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 125, n. 3, p. 491–524, 1 ago. 2009. DOI 10.1002/ijc.24445. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2773211/>. Acesso em: 26 ago. 2022.

JIANG, K.; HE, Y.; ZHANG, X. Identification and Characterization of Copy Number-Associated Driver Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2020, p. e6387519, 24 ago. 2020. DOI 10.1155/2020/6387519. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/6387519/>. Acesso em: 17 maio 2022.

JIN, D.-H.; PARK, S.-E.; LEE, J.; KIM, K.-M.; KIM, S.; KIM, D.-H.; PARK, J. Copy Number Gains at 8q24 and 20q11-q13 in Gastric Cancer Are More Common in Intestinal-Type than Diffuse-Type. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0137657, 11 set.

2015. DOI 10.1371/journal.pone.0137657. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0137657>. Acesso em: 16 fev. 2021.

JOSHI, S. S.; BADGWELL, B. D. Current treatment and recent progress in gastric cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 264–279, 2021. DOI 10.3322/caac.21657. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21657>. Acesso em: 6 set. 2022.

KARASIC, T. B.; O'HARA, M. H.; TEITELBAUM, U. R.; DAMJANOV, N.; GIANTONIO, B. J.; D'ENTREMONT, T. S.; GALLAGHER, M.; ZHANG, P. J.; O'DWYER, P. J. Phase II trial of palbociclib in patients with advanced esophageal or gastric cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 4\_suppl, p. 68–68, fev. 2018. DOI 10.1200/JCO.2018.36.4\_suppl.68. Disponível em: [https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.4\\_suppl.68](https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.4_suppl.68). Acesso em: 19 set. 2022.

KARCZEWSKI, J.; BEGIER-KRASIŃSKA, B.; STASZEWSKI, R.; POPŁAWSKA, E.; GULCZYNSKA-ELHADI, K.; DOBROWOLSKA, A. Obesity and the Risk of Gastrointestinal Cancers. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 64, n. 10, p. 2740–2749, 2019. DOI 10.1007/s10620-019-05603-9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6744518/>. Acesso em: 26 ago. 2022.

KHALIL, A. I. S.; KHYRIEM, C.; CHATTOPADHYAY, A.; SANYAL, A. Hierarchical discovery of large-scale and focal copy number alterations in low-coverage cancer genomes. **BMC Bioinformatics**, v. 21, n. 1, p. 147, 16 abr. 2020. DOI 10.1186/s12859-020-3480-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12859-020-3480-3>. Acesso em: 18 set. 2022.

KIM, J.; WANG, T. C. Helicobacter pylori and Gastric Cancer. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, Gastric Cancer. v. 31, n. 3, p. 451–465, 1 jul. 2021. DOI 10.1016/j.giec.2021.03.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105251572100026X>. Acesso em: 18 ago. 2021.

KRIJGSMAN, O.; CARVALHO, B.; MEIJER, G. A.; STEENBERGEN, R. D. M.; YLSTRA, B. Focal chromosomal copy number aberrations in cancer—Needles in a genome haystack. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2698–2704, 1 nov. 2014. DOI 10.1016/j.bbamcr.2014.08.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488914003000>. Acesso em: 16 set. 2022.

KULAGINA, O. E.; MUZURENKO, N. P.; POGOSIANTS, E. E. [Karyotypic analysis of human cell lines (CaVe and HeLa) by the method of differential staining of chromosomes]. **Voprosy Virusologii**, n. 6, p. 677–681, dez. 1975. .

LARIOS-SERRATO, V.; MARTÍNEZ-EZQUERRO, J.-D.; VALDEZ-SALAZAR, H.-A.; TORRES, J.; CAMORLINGA-PONCE, M.; PIÑA-SÁNCHEZ, P.; RUIZ-TACHIQUÍN, M.-E. Copy number alterations and epithelial-mesenchymal



transition genes in diffuse and intestinal gastric cancers in Mexican patients. **Molecular Medicine Reports**, v. 25, n. 5, p. 191, maio 2022. DOI 10.3892/mmr.2022.12707. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8985205/>. Acesso em: 14 nov. 2022.

LAUREN, P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. **Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica**, v. 64, p. 31–49, 1965. <https://doi.org/10.1111/apm.1965.64.1.31>.

LEAL, M.; CALCAGNO, D.; COSTA, J.; SILVA, T.; KHAYAT, A.; CHEN, E.; ASSUMPCAO, P.; CARDOSO SMITH, M.; BURBANO, R. MYC, TP53, and Chromosome 17 Copy-Number Alterations in Multiple Gastric Cancer Cell Lines and in Their Parental Primary Tumors. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2011, p. 631268, 1 jan. 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/631268>.

LEAL, M. F.; NASCIMENTO, J. L. M. do; SILVA, C. E. A. da; LAMARÃO, M. F. V.; CALCAGNO, D. Q.; KHAYAT, A. S.; ASSUMPCÃO, P. P.; CABRAL, I. R.; SMITH, M. de A. C.; BURBANO, R. R. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 195, n. 1, p. 85–91, 1 nov. 2009. DOI 10.1016/j.cancergencyto.2009.04.020. Disponível em: [https://www.cancerjournal.org/article/S0165-4608\(09\)00239-8/abstract](https://www.cancerjournal.org/article/S0165-4608(09)00239-8/abstract). Acesso em: 17 fev. 2021.

LIMA, C. J. G. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PAREADA DOS TUMORES PRIMÁRIO E METASTÁTICO DE CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREOIDE REFRACTÁRIO AO IODO RADIOATIVO. , p. 106, [s. d.] .

LIN, S. J.; GAGNON-BARTSCH, J. A.; TAN, I. B.; EARLE, S.; RUFF, L.; PETTINGER, K.; YLSTRA, B.; VAN GRIEKEN, N.; RHA, S. Y.; CHUNG, H. C.; LEE, J.-S.; CHEONG, J. H.; NOH, S. H.; AOYAMA, T.; MIYAGI, Y.; TSUBURAYA, A.; YOSHIKAWA, T.; AJANI, J. A.; BOUSSIOUTAS, A.; ... TAN, P. Signatures of tumour immunity distinguish Asian and non-Asian gastric adenocarcinomas. **Gut**, v. 64, n. 11, p. 1721–1731, nov. 2015. DOI 10.1136/gutjnl-2014-308252. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4680172/>. Acesso em: 21 set. 2022.

LINSLEY, P. S.; SPEAKE, C.; WHALEN, E.; CHAUSSABEL, D. Copy Number Loss of the Interferon Gene Cluster in Melanomas Is Linked to Reduced T Cell Infiltrate and Poor Patient Prognosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109760, 14 out. 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0109760. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0109760>. Acesso em: 14 nov. 2022.

LUO, W.; BROUWER, C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 29, n. 14, p. 1830–1831, 15 jul. 2013. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt285>.

- MACDONALD, J. R.; ZIMAN, R.; YUEN, R. K. C.; FEUK, L.; SCHERER, S. W. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D986–D992, 1 jan. 2014. DOI 10.1093/nar/gkt958. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt958>. Acesso em: 18 set. 2022.
- MENDES, A. dos S.; SANTANA, M. E. de. Caregivers' Knowledge Concerning The Gastric Cancer Prevention / Conhecimento de Cuidadores Sobre Prevenção do Câncer Gástrico. **Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online**, v. 11, n. 5, p. 1194–1201, 4 out. 2019. DOI 10.9789/2175-5361.2019.v11i5.1194-1201. Disponível em: <http://www.seer.unirio.br/cuidadofundamental/article/view/7188>. Acesso em: 16 set. 2022.
- MERMEL, C. H.; SCHUMACHER, S. E.; HILL, B.; MEYERSON, M. L.; BEROUKHIM, R.; GETZ, G. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. **Genome Biology**, v. 12, n. 4, p. R41, 28 abr. 2011. DOI 10.1186/gb-2011-12-4-r41. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r41>. Acesso em: 19 set. 2022.
- MILLER, D. T.; ADAM, M. P.; ARADHYA, S.; BIESECKER, L. G.; BROTHMAN, A. R.; CARTER, N. P.; CHURCH, D. M.; CROLLA, J. A.; EICHLER, E. E.; EPSTEIN, C. J.; FAUCETT, W. A.; FEUK, L.; FRIEDMAN, J. M.; HAMOSH, A.; JACKSON, L.; KAMINSKY, E. B.; KOK, K.; KRANTZ, I. D.; KUHN, R. M.; ... LEDBETTER, D. H. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. **American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 5, p. 749–764, 14 maio 2010. DOI 10.1016/j.ajhg.2010.04.006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2869000/>. Acesso em: 9 dez. 2022.
- MORGAN, E.; ARNOLD, M.; CAMARGO, M. C.; GINI, A.; KUNZMANN, A. T.; MATSUDA, T.; MEHEUS, F.; VERHOEVEN, R. H. A.; VIGNAT, J.; LAVERSANNE, M.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study. **eClinicalMedicine**, v. 47, 1 maio 2022. DOI 10.1016/j.eclinm.2022.101404. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/eclinm/article/PIIS2589-5370\(22\)00134-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/eclinm/article/PIIS2589-5370(22)00134-1/fulltext). Acesso em: 25 ago. 2022.
- MYTAR, B.; STEC, M.; SZATANEK, R.; WĘGLARCZYK, K.; SZEWCZYK, K.; SZCZEPANIK, A.; DRABIK, G.; BARAN, J.; SIEDLAR, M.; BAJ-KRZYWORZEKA, M. Characterization of human gastric adenocarcinoma cell lines established from peritoneal ascites. **Oncology Letters**, v. 15, n. 4, p. 4849–4858, abr. 2018. DOI 10.3892/ol.2018.7995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5840753/>. Acesso em: 21 set. 2022.
- NADERI, A. Genomic and epigenetic aberrations of chromosome 1p36.13 have prognostic implications in malignancies. **Chromosome Research**, v. 28, n. 3,

p. 307–330, 1 dez. 2020. DOI 10.1007/s10577-020-09638-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10577-020-09638-x>. Acesso em: 16 nov. 2022.

NING, G. A novel treatment strategy for lapatinib resistance in a subset of HER2-amplified gastric cancer | *BMC Cancer* | Full Text. 2021. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-021-08283-9>. Acesso em: 19 set. 2022.

NISHIKAWA, J.; IIZASA, H.; YOSHIYAMA, H.; SHIMOKURI, K.; KOBAYASHI, Y.; SASAKI, S.; NAKAMURA, M.; YANAI, H.; SAKAI, K.; SUEHIRO, Y.; YAMASAKI, T.; SAKAIDA, I. Clinical Importance of Epstein–Barr Virus-Associated Gastric Cancer. **Cancers**, v. 10, n. 6, jun. 2018. DOI 10.3390/cancers10060167. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6024931/>. Acesso em: 1 mar. 2021.

NOWALK, A.; GREEN, M. HHV-4 Virus. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 3, jun. 2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0011-2015>.

OESTERREICH, S.; ALLREDL, D. C.; MOHSIN, S. K.; ZHANG, Q.; WONG, H.; LEE, A. V.; OSBORNE, C. K.; O'CONNELL, P. High rates of loss of heterozygosity on chromosome 19p13 in human breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 4, p. 493, fev. 2001. DOI 10.1054/bjoc.2000.1606. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2363776/>. Acesso em: 15 nov. 2022.

OHSHIMA, K.; HATAKEYAMA, K.; NAGASHIMA, T.; WATANABE, Y.; KANTO, K.; DOI, Y.; IDE, T.; SHIMODA, Y.; TANABE, T.; OHNAMI, S.; OHNAMI, S.; SERIZAWA, M.; MARUYAMA, K.; AKIYAMA, Y.; URAKAMI, K.; KUSUHARA, M.; MOCHIZUKI, T.; YAMAGUCHI, K. Integrated analysis of gene expression and copy number identified potential cancer driver genes with amplification-dependent overexpression in 1,454 solid tumors. **Scientific Reports**, v. 7, p. 641, 4 abr. 2017. DOI 10.1038/s41598-017-00219-3. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5428069/>. Acesso em: 18 set. 2022.

O'SULLIVAN, J.; LYSAGHT, J.; DONOHOE, C. L.; REYNOLDS, J. V. Obesity and gastrointestinal cancer: the interrelationship of adipose and tumour microenvironments. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 11, p. 699–714, nov. 2018. DOI 10.1038/s41575-018-0069-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41575-018-0069-7>. Acesso em: 26 ago. 2022.

OUE, N.; SENTANI, K.; SAKAMOTO, N.; URAOKA, N.; YASUI, W. Molecular carcinogenesis of gastric cancer: Lauren classification, mucin phenotype expression, and cancer stem cells. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 7, p. 771–778, 1 jul. 2019. DOI 10.1007/s10147-019-01443-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01443-9>. Acesso em: 4 set. 2022.

- PARK, J.-G.; YANG, H.-K.; KIM, W. H.; CHUNG, J.-K.; KANG, M.-S.; LEE, J.-H.; OH, J. H.; PARK, H.-S.; YEO, K.-S.; KANG, S. H.; SONG, S.-Y.; KANG, Y. K.; BANG, Y.-J.; KIM, Y. I.; KIM, J.-P. Establishment and characterization of human gastric carcinoma cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 70, n. 4, p. 443–449, 1997. DOI 10.1002/(SICI)1097-0215(19970207)70:4<443::AID-IJC12>3.0.CO;2-G. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-0215%2819970207%2970%3A4%3C443%3A%3AAID-IJC12%3E3.0.CO%3B2-G>. Acesso em: 21 set. 2022.
- PENG, J.; XU, H.; CAI, J. Establishment and characterization of a new gastric cancer cell line, XGC-1. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, p. 437, 5 set. 2020. DOI 10.1186/s12935-020-01536-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01536-w>. Acesso em: 21 set. 2022.
- PETRELLI, F.; BERENATO, R.; TURATI, L.; MENNITTO, A.; STECCANELLA, F.; CAPORALE, M.; DALLERA, P.; BRAUD, F. de; PEZZICA, E.; BARTOLOMEO, M. D.; SGROI, G.; MAZZAFERRO, V.; PIETRANTONIO, F.; BARNI, S. Prognostic value of diffuse versus intestinal histotype in patients with gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 8, n. 1, fev. 2017. DOI 10.21037/jgo.2017.01.10. Disponível em: <https://jgo.amegroups.com/article/view/11973>. Acesso em: 15 set. 2022.
- PINTO, L. C.; MESQUITA, F. P.; SOARES, B. M.; DA SILVA, E. L.; PUTY, B.; DE OLIVEIRA, E. H. C.; BURBANO, R. R.; MONTENEGRO, R. C. Mebendazole induces apoptosis via C-MYC inactivation in malignant ascites cell line (AGP01). **Toxicology in Vitro**, v. 60, p. 305–312, 1 out. 2019. DOI 10.1016/j.tiv.2019.06.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233319302218>. Acesso em: 21 set. 2022.
- POETSCH, M.; KLEIST, B. Loss of heterozygosity at 15q21.3 correlates with occurrence of metastases in head and neck cancer. **Modern Pathology**, v. 19, n. 11, p. 1462–1469, nov. 2006. DOI 10.1038/modpathol.3800666. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/3800666>. Acesso em: 15 nov. 2022.
- PRAUD, D.; ROTA, M.; PELUCCHI, C.; BERTUCCIO, P.; ROSSO, T.; GALEONE, C.; ZHANG, Z.-F.; MATSUO, K.; ITO, H.; HU, J.; JOHNSON, K. C.; YU, G.-P.; PALLI, D.; FERRARONI, M.; MUSCAT, J.; LUNET, N.; PELETEIRO, B.; MALEKZADEH, R.; YE, W.; ... LA VECCHIA, C. Cigarette smoking and gastric cancer in the Stomach Cancer Pooling (StoP) Project. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 27, n. 2, p. 124–133, mar. 2018. DOI 10.1097/CEJ.0000000000000290. Disponível em: <https://journals.lww.com/00008469-201803000-00004>. Acesso em: 26 ago. 2022.
- PREKSHA, G.; YESHESWINI, R.; SRIKANTH, C. V. Cell culture techniques in gastrointestinal research: Methods, possibilities and challenges. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 52, 1 jan. 2021. DOI 10.4103/IJPM.IJPM\_933\_20. Disponível em: <https://www.ijpmonline.org/article.asp?issn=0377->

4929;year=2021;volume=64;issue=5;spage=52;epage=57;aulast=Preksha;type=0. Acesso em: 20 set. 2022.

PULIGA, E.; CORSO, S.; PIETRANTONIO, F.; GIORDANO, S. Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows. **Cancer Treatment Reviews**, v. 95, p. 102175, 1 abr. 2021. DOI 10.1016/j.ctrv.2021.102175. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305737221000232>. Acesso em: 18 set. 2022.

RAMOS, M. F. K. P.; PEREIRA, M. A.; DE MELLO, E. S.; CIRQUEIRA, C. dos S.; ZILBERSTEIN, B.; ALVES, V. A. F.; RIBEIRO-JUNIOR, U.; CECCONELLO, I. Gastric cancer molecular classification based on immunohistochemistry and in situ hybridization: Analysis in western patients after curative-intent surgery. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 8, p. 688–701, 24 ago. 2021. DOI 10.5306/wjco.v12.i8.688. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8394162/>. Acesso em: 11 nov. 2022.

RATTI, M.; LAMPIS, A.; HAHNE, J. C.; PASSALACQUA, R.; VALERI, N. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 22, p. 4151–4162, 2018. DOI 10.1007/s00018-018-2906-9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6182336/>. Acesso em: 10 dez. 2022.

RAWLA, P.; BARSOUK, A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. **Przegląd Gastroenterologiczny**, v. 14, n. 1, p. 26–38, 2019. DOI 10.5114/pg.2018.80001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6444111/>. Acesso em: 15 set. 2022.

RAZAGHI, A.; BRUSSELAERS, N.; BJÖRNSTEDT, M.; DURAND-DUBIEF, M. Copy number alteration of the interferon gene cluster in cancer: Individual patient data meta-analysis prospects to personalized immunotherapy. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 23, n. 10, p. 1059–1068, 20 set. 2021. DOI 10.1016/j.neo.2021.08.004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8458777/>. Acesso em: 14 nov. 2022.

RIIHIMÄKI, M.; HEMMINKI, A.; SUNDQUIST, K.; SUNDQUIST, J.; HEMMINKI, K. Metastatic spread in patients with gastric cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 52307–52316, 20 jul. 2016. DOI 10.18632/oncotarget.10740. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5239553/>. Acesso em: 17 fev. 2021.

SANTARIUS, T.; SHIPLEY, J.; BREWER, D.; STRATTON, M. R.; COOPER, C. S. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. **Nature reviews Cancer**, v. 10, n. 1, p. 59–64, 1 jan. 2010. DOI 10.1038/nrc2771. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc2771>. Acesso em: 18 set. 2022.

- SEABRA, A. D.; ARAÚJO, T. M. T.; MELLO, F. A. R.; ALCÂNTARA, D. D. F. Á.; BARROS, A. P. D.; ASSUMPÇÃO, P. P. D.; MONTENEGRO, R. C.; GUIMARÃES, A. C.; DEMACHKI, S.; BURBANO, R. M. R.; KHAYAT, A. S. High-density Array Comparative Genomic Hybridization Detects Novel Copy Number Alterations in Gastric Adenocarcinoma. **Anticancer Research**, v. 34, n. 11, seq. Experimental Studies, p. 6405–6415, 1 nov. 2014. Disponível em: <https://ar.iijournals.org/content/34/11/6405>. Acesso em: 17 fev. 2021.
- SEIDLITZ, T.; KOO, B.-K.; STANGE, D. E. Gastric organoids—an in vitro model system for the study of gastric development and road to personalized medicine. **Cell Death & Differentiation**, v. 28, n. 1, p. 68–83, jan. 2021. DOI 10.1038/s41418-020-00662-2. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41418-020-00662-2>. Acesso em: 20 set. 2022.
- SETIA, N.; CLARK, J. W.; DUDA, D. G.; HONG, T. S.; KWAK, E. L.; MULLEN, J. T.; LAUWERS, G. Y. Familial Gastric Cancers. **The Oncologist**, v. 20, n. 12, p. 1365–1377, dez. 2015. DOI 10.1634/theoncologist.2015-0205. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4679084/>. Acesso em: 16 set. 2022.
- SHITARA, K.; BANG, Y.-J.; IWASA, S.; SUGIMOTO, N.; RYU, M.-H.; SAKAI, D.; CHUNG, H.-C.; KAWAKAMI, H.; YABUSAKI, H.; LEE, J.; SAITO, K.; KAWAGUCHI, Y.; KAMIO, T.; KOJIMA, A.; SUGIHARA, M.; YAMAGUCHI, K. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Gastric Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 25, p. 2419–2430, 18 jun. 2020. DOI 10.1056/NEJMoa2004413. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2004413>. Acesso em: 11 nov. 2022.
- SLAVIN, T. P.; WEITZEL, J. N.; NEUHAUSEN, S. L.; SCHRADER, K. A.; OLIVEIRA, C.; KARAM, R. Genetics of gastric cancer: what do we know about the genetic risks? **Translational Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, p. 55, 29 jul. 2019. DOI 10.21037/tgh.2019.07.02. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6691077/>. Acesso em: 20 set. 2022.
- SOARES, B. M.; ARAÚJO, T. M. T.; RAMOS, J. A. B.; PINTO, L. C.; KHAYAT, B. M.; BAHIA, M. D. O.; MONTENEGRO, R. C.; BURBANO, R. M. R.; KHAYAT, A. S. Effects on DNA Repair in Human Lymphocytes Exposed to the Food Dye Tartrazine Yellow. **Anticancer Research**, v. 35, n. 3, seq. Experimental Studies, p. 1465–1474, 1 mar. 2015. Disponível em: <https://ar.iijournals.org/content/35/3/1465>. Acesso em: 16 set. 2022.
- SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. DOI 10.3322/caac.21660. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21660>. Acesso em: 15 set. 2022.

- TAKADA, H.; IMOTO, I.; TSUDA, H.; SONODA, I.; ICHIKURA, T.; MOCHIZUKI, H.; OKANOUE, T.; INAZAWA, J. Screening of DNA copy-number aberrations in gastric cancer cell lines by array-based comparative genomic hybridization. **Cancer Science**, v. 96, n. 2, p. 100–110, 2005. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00016.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1349-7006.2005.00016.x>. Acesso em: 29 jan. 2021.
- TAKENO, S. S.; LEAL, M. F.; LISBOA, L. C. F.; LIPAY, M. V. N.; KHAYAT, A. S.; ASSUMPÇÃO, P. P.; BURBANO, R. R.; SMITH, M. de A. C. Genomic alterations in diffuse-type gastric cancer as shown by high-resolution comparative genomic hybridization. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 190, n. 1, p. 1–7, 1 abr. 2009. DOI 10.1016/j.cancergencyto.2008.09.007. Disponível em: [https://www.cancerjournal.org/article/S0165-4608\(08\)00539-6/abstract](https://www.cancerjournal.org/article/S0165-4608(08)00539-6/abstract). Acesso em: 17 fev. 2021.
- TAMILZHALAGAN, S.; RATHINAM, D.; GANESAN, K. Amplified 7q21-22 gene *MCM7* and its intronic miR-25 suppress *COL1A2* associated genes to sustain intestinal gastric cancer features. **Molecular Carcinogenesis**, v. 56, n. 6, p. 1590–1602, jun. 2017. DOI 10.1002/mc.22614. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/mc.22614>. Acesso em: 21 jan. 2021.
- TANG, Z.; KANG, B.; LI, C.; CHEN, T.; ZHANG, Z. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W556–W560, 2 jul. 2019. DOI 10.1093/nar/gkz430. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>. Acesso em: 9 dez. 2022.
- TANIGUCHI, K.; OTA, M.; YAMADA, T.; SERIZAWA, A.; NOGUCHI, T.; AMANO, K.; KOTAKE, S.; ITO, S.; IKARI, N.; OMORI, A.; YAMAMOTO, M. Staging of gastric cancer with the Clinical Stage Prediction score. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 17, p. 47, 8 mar. 2019. DOI 10.1186/s12957-019-1589-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6408856/>. Acesso em: 9 nov. 2022.
- VOGELAAR, I. P.; VAN DER POST, R. S.; BISSELING, T. M.; VAN KRIEKEN, J. H. J.; LIGTENBERG, M. J.; HOOGERBRUGGE, N. Familial gastric cancer: detection of a hereditary cause helps to understand its etiology. **Hereditary Cancer in Clinical Practice**, v. 10, n. 1, p. 18, 12 dez. 2012. DOI 10.1186/1897-4287-10-18. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3547820/>. Acesso em: 26 ago. 2022.
- VOLLMERS, H. P.; STULLE, K.; DÄMMRICH, J.; PFAFF, M.; PAPADOPOULOS, Th.; BETZ, C.; SAAL, K.; MÜLLER-HERMELINK, H.-K. Characterization of four new gastric cancer cell lines. **Virchows Archiv B**, v. 63, n. 1, p. 335–343, 1 dez. 1993. DOI 10.1007/BF02899281. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02899281>. Acesso em: 21 set. 2022.
- WADDINGHAM, W.; NIEUWENBURG, S. A. V.; CARLSON, S.; RODRIGUEZ-JUSTO, M.; SPAANDER, M.; KUIPERS, E. J.; JANSEN, M.; GRAHAM, D. G.;

- BANKS, M. Recent advances in the detection and management of early gastric cancer and its precursors. **Frontline Gastroenterology**, v. 12, n. 4, seç. Oesophagus and stomach, p. 322–331, 1 jul. 2021. DOI 10.1136/flgastro-2018-101089. Disponível em: <https://fg.bmj.com/content/12/4/322>. Acesso em: 20 set. 2022.
- WANG, C.; SHI, M.; JI, J.; CAI, Q.; JIANG, J.; ZHANG, H.; ZHU, Z.; ZHANG, J. A self-enforcing HOXA11/Stat3 feedback loop promotes stemness properties and peritoneal metastasis in gastric cancer cells. **Theranostics**, v. 9, n. 25, p. 7628–7647, 14 out. 2019. DOI 10.7150/thno.36277. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6831465/>. Acesso em: 25 jan. 2021.
- WANG, X.; LIU, Y.; SHAO, D.; QIAN, Z.; DONG, Z.; SUN, Y.; XING, X.; CHENG, X.; DU, H.; HU, Y.; LI, Y.; LI, L.; DONG, B.; LI, Z.; WU, A.; WU, X.; BU, Z.; ZONG, X.; ZHU, G.; ... JI, J. Recurrent amplification of MYC and TNFRSF11B in 8q24 is associated with poor survival in patients with gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 19, n. 1, p. 116–127, 1 jan. 2016. DOI 10.1007/s10120-015-0467-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10120-015-0467-2>. Acesso em: 22 fev. 2021.
- WEE, Y.; WANG, T.; LIU, Y.; LI, X.; ZHAO, M. A pan-cancer study of copy number gain and up-regulation in human oncogenes. **Life Sciences**, v. 211, p. 206–214, 15 out. 2018. DOI 10.1016/j.lfs.2018.09.032. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320518305848>. Acesso em: 14 nov. 2022.
- WHITSETT, T. G.; MITTAL, S. K.; ESCHBACHER, J. M.; CARSON, V. M.; SMITH, M. A.; BREMNER, R. M.; INGE, L. J. LKB1 inactivation occurs in a subset of esophageal adenocarcinomas and is sufficient to drive tumor cell proliferation. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 155, n. 4, p. 1891–1899, 1 abr. 2018. DOI 10.1016/j.jtcvs.2017.11.067. Disponível em: [https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223\(17\)32760-5/fulltext](https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223(17)32760-5/fulltext). Acesso em: 15 nov. 2022.
- WISNIESKI, F.; CALCAGNO, D.; LEAL, M.; CHEN, E.; GIGEK, C.; SANTOS, L.; PONTES, T.; RASMUSSEN, L.; PAYÃO, S.; ASSUMPCAO, P.; LOURENCO, L.; DEMACHKI, S.; ARTIGIANI, R.; BURBANO, R.; CARDOSO SMITH, M. Differential expression of histone deacetylase and acetyltransferase genes in gastric cancer and their modulation by trichostatin A. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, 26 mar. 2014. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1841-0>.
- YAMAGUCHI, H.; NAGAMURA, Y.; MIYAZAKI, M. Receptor Tyrosine Kinases Amplified in Diffuse-Type Gastric Carcinoma: Potential Targeted Therapies and Novel Downstream Effectors. **Cancers**, v. 14, n. 15, p. 3750, 1 ago. 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14153750>.
- YANG, S. H.; SEO, M. Y.; JEONG, H. J.; JEUNG, H.-C.; SHIN, J.; KIM, S. C.; NOH, S. H.; CHUNG, H. C.; RHA, S. Y. Gene Copy Number Change Events at Chromosome 20 and Their Association with Recurrence in Gastric Cancer



- Patients. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 2, seq. Imaging, Diagnosis, Prognosis, p. 612–620, 15 jan. 2005. Disponível em: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/11/2/612>. Acesso em: 16 jan. 2021.
- YANG, Z.; WANG, J.; ZHANG, Z.; TANG, F. HHV-4 Virus-Encoded Products Promote Circulating Tumor Cell Generation: A Novel Mechanism of Nasopharyngeal Carcinoma Metastasis. **OncoTargets and therapy**, v. 12, p. 11793–11804, 31 dez. 2019. DOI 10.2147/OTT.S235948. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6997419/>. Acesso em: 2 mar. 2021.
- YE, Z.; DONG, H.; LI, Y.; MA, T.; HUANG, H.; LEONG, H. S.; ECKEL-PASSOW, J.; KOCHER, J.-P. A.; LIANG, H.; WANG, L. Prevalent Homozygous Deletions of Type I Interferon and Defensin Genes in Human Cancers Associate with Immunotherapy Resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 14, p. 3299–3308, 15 jul. 2018. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-17-3008. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3008>. Acesso em: 14 nov. 2022.
- YIN, X.-Q.; YIN, X.-H.; YU, Y.-Q.; XU, L.; ZHANG, M. Genomic Landscape of RTK/RAS Pathway and Tumor Immune Infiltration as Prognostic Indicator of Lung Adenocarcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 924239, 21 jul. 2022. DOI 10.3389/fonc.2022.924239. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9351312/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- YOKOZAKI, H. Molecular characteristics of eight gastric cancer cell lines established in Japan. **Pathology International**, v. 50, n. 10, p. 767–777, 2000. DOI 10.1046/j.1440-1827.2000.01117.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1440-1827.2000.01117.x>. Acesso em: 21 set. 2022.
- YOO, J. E.; SHIN, D. W.; HAN, K.; KIM, D.; JEONG, S.-M.; KOO, H. Y.; YU, S. J.; PARK, J.; CHOI, K. S. Association of the Frequency and Quantity of Alcohol Consumption With Gastrointestinal Cancer. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 8, p. e2120382, 18 ago. 2021. DOI 10.1001/jamanetworkopen.2021.20382. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.20382>. Acesso em: 29 ago. 2022.
- ZEILINGER, K.; FREYER, N.; DAMM, G.; SEEHOFER, D.; KNÖSPEL, F. Cell sources for in vitro human liver cell culture models. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 15, p. 1684–1698, set. 2016. DOI 10.1177/1535370216657448. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4999620/>. Acesso em: 20 set. 2022.
- ZHAO, M.; ZHAO, Z. Concordance of copy number loss and down-regulation of tumor suppressor genes: a pan-cancer study. **BMC Genomics**, v. 17, n. 7, p. 532, 22 ago. 2016. DOI 10.1186/s12864-016-2904-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2904-y>. Acesso em: 14 nov. 2022.

ZYTOON, A. A.; EL-ATFEY, S. I. B.; HASSANEIN, S. A.-H. Diagnosis of gastric cancer by MDCT gastrography: diagnostic characteristics and management potential. **Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine**, v. 51, n. 1, p. 30, dez. 2020. DOI 10.1186/s43055-020-0148-y. Disponível em: <https://ejrnm.springeropen.com/articles/10.1186/s43055-020-0148-y>. Acesso em: 9 nov. 2022.