



Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde

Luiz Alberto Reis Mattos Júnior

**EPIGENÉTICA E CÂNCER GÁSTRICO: PAPEL DAS SIRTUÍNAS NA
ONCOGÊNESE E SUA ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES OXIDATIVOS**

Recife - PE
2018

Luiz Alberto Reis Mattos Júnior



**EPIGENÉTICA E CÂNCER GÁSTRICO: PAPEL DAS SIRTUÍNAS NA
ONCOGÊNESE E SUA ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES OXIDATIVOS.**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação
em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de
Imunopatologia Keizo Asami/LIKA da
Universidade Federal de Pernambuco/UFPE,
para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Recife - PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Mattos Júnior, Luiz Alberto Reis

Epigenética e câncer gástrico: papel das sirtuínas na oncogênese e sua associação com biomarcadores oxidativos/ Luiz Alberto Reis
Mattos Júnior - 2018.

177 folhas: il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos

1. Câncer 2. Adenocarcinoma 3. Epigenética I. Lima Filho, José Luiz de (orient.) II. Título

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-165

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Parecer da comissão examinadora da defesa da tese de doutorado de

LUIZ ALBERTO REIS MATTOS JUNIOR

Epigenética e Câncer Gástrico: Papel das sirtuínas na oncogênese e sua associação com biomarcadores oxidativos.

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera o candidato **LUIZ ALBERTO REIS MATTOS JUNIOR** como:

APROVADO

Recife, 22 de fevereiro de 2018.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Departamento de Bioquímica – UFPE

Membro interno: Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins
Departamento de Bioquímica – UFPE

Membro interno: Prof. Dr. Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto
Centro Acadêmico do Agreste – UFPE

Membro externo: Prof. Dr. Álvaro Antonio Bandeira Ferraz
Departamento de Cirurgia – UFPE

Membro externo: Profa. Dra. Luciana Teixeira de Siqueira
Departamento de Cirurgia – UFPE

AGRADECIMENTO

AGRADECER E LOUVAR

*"Chegar para agradecer e louvar o ventre que me gerou, que me consagrou.
Louvar a água de minha terra, o chão que me sustenta, o massapê, o palco, a beira do abismo, o punhal do
susto de cada dia.
Agradecer as nuvens que logo são chuva, que sereniza os sentidos e ensina a vida a reviver.
Agradecer os amigos que fiz e que mantêm a coragem de gostar de mim, apesar de mim.
Agradecer a alegria, as crianças, as borboletas dos meus jardins reais ou não.
A cada folha, a toda raiz, as pedras majestosas e as pequeninas como eu, em Aruanda.
Ao sol que raia o dia, a lua que como o menino Deus espalha luz e vira meus sonhos de pernas pro ar.
Agradecer as marés altas e também aquelas que carregam para outros costados os males do corpo e
da alma.
Agradecer a tudo que canta livre no ar, dentro do mato, sobre o mar.
As vozes que soam de cordas tênues e partem cristais.
E aos senhores que acolhem e aplaudem esse milagre.
Agradecer, ter o que agradecer, louvar e abraçar."
Maria Bethânia*

Agradeço a Deus e Maria, que me consagraram, por oportunizar minha existência com o concurso de meus pais, Luiz Alberto e Iva, **(o ventre que me gerou)**. Esses me permitiram chegar até aqui nesse momento com apoio, respeito, suor, lágrimas e sorrisos, tudo regado de muito amor. Meus ancestrais, **água de minha terra**, por me apresentarem alguns dos reais valores da vida: Amor, Verdade, Honestidade, Amizade.

Aos meus Irmãos Nataly e Luiz Gustavo, meus sobrinhos, Matheus e Marina, e meu cunhado Miguel que proporcionam momentos de acolhimento e aconchego inenarráveis **(o chão que me sustenta)**.

Agradecer com mais profundo carinho meu companheiro Glauber que em 16 anos compartilhou momentos desafiadores que nada pode abalar **(que sereniza os sentidos e ensina a vida a reviver)**.

Ao meu orientador, Prof. Zé Luiz, pessoa basilar que forneceu lentes com as quais se vislumbra um mundo que é sempre possível, desde que se queira, olhando o objetivo e deixando o meio para depois. Aprendi com ele, não só ciência, mas lições de vida, de ponderação, de liderança e de humildade. **(As vozes que soam de cordas tênues e partem cristais. E aos senhores que acolhem e aplaudem esse milagre)**

À querida Profa. Dannyelly Bruneska que com seu profissionalismo, dedicação, doçura e amor ao que faz com brilhantismo pode tornar essa tese uma realidade **(Ao sol que raia o dia, a lua que como o menino Deus, espalha luz e vira meus sonhos de pernas pro ar)**.

Ao professor Luiz Bezerra Carvalho que desde meus primórdios da graduação e com seu bom-humor elucidava questões mais complexas em bioquímica e que acolheu inicialmente no LIKA **(As vozes que soam de cordas tênues e partem cristais)**.

À Profa. Dra. Ana Cabral que a mim acompanha desde o Pibiq na UFPE, onde geramos premiação como jovem estudante e que até hoje muito me orgulha com sua amizade sincera e seu carinho maternal. **(Agradecer, ter o que agradecer, louvar e abraçar)**.

Ao Prof. Jim Owen da University College of London pela contribuição na confecção de um dos artigos (de revisão).

Aos colegas que fiz durante esse período no LIKA: Monique Beltrão, Taciana Salviano, Fabrício Souto, Amélia Borba, Andriu Catena **(Agradecer os amigos que fiz e que mantêm a coragem de gostar de mim, apesar de mim)** e ainda Ana Cecília, Joana Santos, Ananda, Fátima Cardoso e ao Prof. Dr. George Telles pelo seu apoio e Profas. Maria da Paz e Elizabeth Chaves por acreditarem em mim.

À Profa. Rosângela Frade que contribuiu de maneira significativa na banca de qualificação e como a predizendo enquanto ser humano que equilibra a rigorosidade do saber científico com um presente e delicadeza.

Ao também colaborador do prospectmol Vinícius Tigre na confecção de algumas figuras dessatense.

À chefe Ilma Maria Santos que, sempre determinada, tem seu olhar focado nas nossas emoções, Da mesma forma meus agradecimentos a Paulina Albuquerque, Conceição Chimendes e Fábio Constatino.

À Superintendência/Diretoria do HC/UFPE, na pessoa do Superintendente Dr. Frederico Jorge Ribeiro e gerentes, que apoiaram sempre para o crescimento profissional.

Ao serviço de patologia do HC/UFPE onde pudemos recolher as amostras para realização de procedimentos e ao SAME para disponibilidade dos prontuários dos pacientes.

Às queridas Enfs. e sobretudo amigas Helena Lins e Lucia Reis que sempre acreditaram em meu potencial como médico assistencial e gestor, me garantido sustentação para que exerça meu ofício com paz e serenidade;

Aos meus residentes de oncologia do HC/UFPE, Estela, Carol, Bruno, John e Luana que sensíveis a condução dessa tese, abdicaram de miha presença como preceptor em alguns momentos.

Aos meus pacientes, razão de meu ofício, e mesmo prassando por dificuldades que demandavam minha presença, foram resilientes, encontrado a apoio de colegas substitutos e de minha secretária Ieda.

Epígrafe I

Oração de São Francisco

*Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.
Onde houver ódio, que eu leve o amor;
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;
Onde houver discórdia, que eu leve a união;
Onde houver dúvida, que eu leve a fé;
Onde houver erro, que eu leve a verdade;
Onde houver desespero, que eu leve a esperança;
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;
Onde houver trevas, que eu leve a luz.*

*Ó Mestre, fazei que eu procure mais
Consolar, que ser consolado;
Compreender, que ser compreendido;
Amar, que ser amado.
Pois é dando que se recebe,
é perdoando que se é perdoado,
e é morrendo que se vive para a vida eterna.*

Épígrafe II

Clarice Lispector, em paixão segundo GH

*“eu estava vivendo a pré-história de um futuro.....
a vida pré-humana divina é de uma atualidade que queima
...perder-se é um achado perigoso
...pois existe a trajetória, e a trajetória não é apenas um modo de ir
A trajetória somos nós mesmos. Em matéria de viver,
nunca se pode chegar antes’*

Rosa dos Ventos

Chico, interpretada por Bethânia

E do amor gritou-se o escândalo
Do medo criou-se o trágico
No rosto pintou-se o pálido
E não rolou uma lágrima
Nem uma lástima
Pra socorrer

E na gente deu o hábito
De caminhar pelas trevas
De murmurar entre as pregas
De tirar leite das pedras
De ver o tempo correr

Mas, sob o sono dos séculos
Amanheceu o espetáculo
Como uma chuva de pétalas
Como se o céu vendo as penas
Morresse de pena
E chovesse o perdão

E a prudência dos sábios
Nem ousou conter nos lábios
O sorriso e a paixão

Pois transbordando de flores
A calma dos lagos zangou-se
A rosa-dos-ventos danou-se
O leito dos rios fartou-se
E inundou de água doce

A amargura do mar

Numa enchente amazônica
Numa explosão atlântica
E a multidão vendo em pânico
E a multidão vendo atônita

Ainda que tarde

O seu despertar

RESUMO

INTRODUÇÃO: O Câncer Gástrico (CG) é a segunda maior causa de morte por câncer no mundo com diferenças de incidência, sobrevida, histopatologia e moleculares. Através de novas tecnologias, observam-se particularidades genômicas e epigenômicas. Destas, as modificações das histonas é um importante alvo em funções regulatórias gênicas. As histonas deacetilases desempenham papel na regulação transcricional e estão desreguladas em vários tipos de câncer. Sirtuínas, por sua vez, são deacetilases NAD-dependentes cujas alterações participam da cascata de transmissão de sinais relacionados ao metabolismo tumoral. A associação das sirtuínas a fatores oxidativos, como o *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha* (PGC-1 alfa) e do *hypoxia-inducible factor-1 alpha* (HIF-1 alfa) não tem sido bem estudado. **OBJETIVOS/MÉTODOS:** Essa tese teve como objetivo analisar os dados publicados na literatura sobre o papel das sirtuínas na carcinogênese gástrica, nos últimos dez anos, através de busca em plataformas de banco de dados. Posteriormente, investigamos a associação entre a expressão de SIRT1 a SIRT7, PGC- 1 alfa e HIF-1 alfa e variáveis clínicas de pacientes em 64 amostras de tecido tumoral no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco por *Polymerase Chain Reaction* ou em tempo Real (qPCR) e imunofluorescência. Como braço controle, avaliamos a expressão nos mesmos marcadores em tecido gástrico oriundos de 18 indivíduos submetidos a gastroplastia redutora. **RESULTADOS:** Em levantamento bibliográfico, 23 estudos versavam sobre sirtuínas e CG, sendo 22 (95.6%) eram oriundos de países orientais com resultados acerca de prognóstico favorável (34.8%) ou desfavorável (65.2%). Em nosso estudo original, a idade mediana dos pacientes foi de 59.5 anos, estágio I e II em quase 30% e estágio III, 40% dos casos. Analisamos a expressão de SIRT1 e SIRT3, cujas expressões estavam elevadas estatisticamente no CG. Essa elevação deu-se em fenótipos menos agressivos e em fases mais tardias da doença. Alta expressão de HIF1-alfa também foi demonstrada, mas não para expressão de PGC1- alfa. HIF1- alfa apresentou elevação seguida por queda e nova elevação quando analisamos variáveis como estadiamento, grau histológico, linfonodos comprometidos. Detectamos ainda, uma associação entre as expressões de SIRT1/SIRT3, SIRT1/PGC1- alfa, SIRT1/HIF1- alfa, SIRT3/PGC1- alfa, mas nenhuma associação no grupo controle. Nós ainda detectamos essas associações com significância estatística em pacientes com invasão angiolinfática. Esses resultados sugerem que SIRT1, SIRT3, PGC1- alfa e HIF1- alfa integradamente podem estar envolvidas no processo de estresse oxidativo. **CONCLUSÕES:** A alta expressão de SIRT1 e SIRT3 no CG está associada a fatores oxidativos e desfechos clínicos e patológicos iniciais e menos agressivos seguido por nova elevação em fases tardias da doença. A expressão de HIF1- alfa acompanha esse padrão, e hipotetizamos que a elevação de inibidores do PGC1- alfa (não avaliados) devem participar dessa cascata.

Palavras-chave: Adenocarcinoma Gástrico. Epigenética. Sirtuínas. PGC1-alfa. HIF1-alfa.

ABSTRACT

BACKGROUND: Gastric cancer (GC) is the second-leading cause of global cancer-related mortality with distinct incidence and survival rates, histopathologic and molecular. Through new technologies, is seen genomic and epigenomic particularities. Histones deacetylases provides a pivotal role in transcriptional regulations and are deregulated in many cancer types. Sirtuins, in turn, are deacetylases NAD-dependents whose alterations work at signal transmission cascade at pathways associated to tumor metabolism. The association between sirtuins and oxidative factors, such as *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha* (PGC-1 alpha) and *hypoxia-inducible factor-1 alpha* (HIF-1 alpha) has not been studied. **OBJECTIVES/METHODS:** This thesis was aimed initially to investigate the data published in the literature about the role of sirtuins in gastric carcinogenesis in the last ten years by searching at database. Beside that, we investigate the association between the expression of SIRT1 to SIRT7, PGC-1alpha and HIF-1alpha with clinical outcome in patients in 64 tumoral tissue samples in the Hospital das Clínicas from Federal University of Pernambuco – UFPE with *Polymerase Chain Reaction* or in real time (qPCR) and immunofluorescence. In control arm, we evaluated expression of the same biomarkers in gastric tissue from 18 persons submitted to reductive gastropasty. **RESULTS:** In bibliographic analyses, 23 studies discuss about sirtuin and GC, 22 out 23 (95.6%) in last 10 years, came from Eastern countries, with prognostic favorable and unfavorable (34.8%) and (62.2%), respectively. In our original study, median age was 59,5 years, stage I and II in almost 30% of patients and stage III in nearly 40% of cases. We analyse the expression of SIRT1 and SIRT3, which expressions was statistically high in GC. This elevation was showed in less aggressive phenotypes and in later phases of disease. High expression of HIF1- alpha was also demonstrated, but not in for PGC1- alpha expression. HIF1- alpha was elevated followed by decreasing and new elevation when we analysed variables such as staging, histologic grade, lymph- nodes compromised. A association between SIRT1/SIRT3, SIRT1/PGC1- alpha, SIRT1/HIF1- alpha, SIRT3/PGC1- alpha, but none of them in control group. We still detected these associations with statistically significant difference in patients with angio- lymphatic invasion. These results suggest that SIRT1, SIRT3, PGC1- alpha and HIF1- alpha altogether may be involved in oxidative stress process. **CONCLUSIONS:** The high expression of SIRT1 and SIRT3 in GC are associated to oxidative factors and early favorable clinical and pathological outcomes, therefore less aggressive, followed by new elevation in later phases of disease. The HIF1- alpha follow this pattern, and we hypothesized that the elevation of PGC1- alpha (not available) should participate in this cascade.

Keywords: Gastric adenocarcinoma. Epigenetic. Sirtuins. PGC1- alpha. HIF1- alpha.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Incidência estimada de câncer, em ambos os gêneros, por topografia, no mundo	25
Figura 2	Mortes por câncer, em ambos os gêneros, por topografia, no mundo	26
Figura 3	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, por sexo, exceto pele não-melanoma. Números arredondados por múltiplos de 10	27
Figura 4	Adenocarcinoma subtipo tubular	30
Figura 5	Adenocarcinoma subtipo mucinoso	31
Figura 6	Adenocarcinoma subtipo anel de sinete	31
Figura 7	Classificação macroscópica do câncer gástrico segundo Borrmann	32
Figura 8	Classificação Molecular do câncer gástrico pelo AGC	33
Quadro 1	Classificações histológicas distintas e subtipos histológicos correspondentes	34
Figura 9	Alterações histológicas na patogênese do câncer gástrico.	35
Figura 10	Produto de esôfago-gastrectomia, peça macroscópica e correspondência histológica	36
Figura 11	Representação esquemática da patogênese do câncer gástrico	37
Figura 12	Representação esquemática da E-caderina	39
Figura 13	Diagrama da plataforma do desenvolvimento de Waddington	43
Figura 14	Diagrama de Waddington	43
Figura 15	Representação esquemática da plataforma de Waddington modificado para a carcinogênese	44
Figura 16	Estrutura da cromatina	45
Figura 17	Representação esquemática nucleossomo e modificações das histonas	46
Figura 18	Estrutura da cromatina e controle epigenético	47
Figura 19	Formação dos mRNAs	48
Figura 20	DNMTs e gênese tumoral	49
Figura 21	Mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação da expressão gênica	51
Figura 22	Acetilação e deacetilação das histonas e relação com silenciamento ou expressão gênica	52
Quadro 2	Atividade e localização de cada sirtuína. Adaptado de He et al., 2012.	53

Figura 23	Família das sirtuínas e funções	55
Figura 24	Epigenética e câncer gástrico, biomarcadores	57

CAPÍTULO I

Figura 1	Fluxograma de seleção de trabalhos a partir plataformas de bancos de dados. Plataformas – CAPES e PubMed, publicados na literatura, para seleção e análise de dados daqueles que versavam câncer gástrico e sirtuínas	63
Figura 2	Gráfico de associação entre expressão de sirtuínas e prognóstico. Em termos percentuais e desfecho favorável (bom) ou desfavorável (pior).	64
Quadro 1	Apresentação dos estudos em câncer gástrico e sirtuína acesso em 15/01/2018	66

CAPÍTULO II

Gráfico 1	Expressão de SIRT1 (A) e SIRT3(B) em pacientes com CG comparados com grupo controle.	71
Gráfico 2	Expressão de SIRT1 e estadiamento (A), SIRT1 e grau histológico (B) e SIRT3 e grau histológico (C)	72
Gráfico 3	Expressão de HIF1- alfa em pacientes com CG e controle.	73
Gráfico 4	Associação entre níveis de expressão por regressão linear	74
Figura 1	Múltiplos passos da carcinogênese. À medida que o tumor cresce, a demanda de oxigênio e grau de diferenciação também progride, o estresse oxidativo, angiogênese e presença de mutações.	79
Figura 2	Interação entre SIRT1, SIRT3 e fatores oxidativos. SIRT1, uma desacetilase dependente de NAD + regula positivamente a expressão de PGC1 alfa que participa do metabolismo mitocondrial, onde SIRT3 é localizada.	80
Figura 3	Padrão histológico de tumor gástrico maligno. x40.	83
Figura 4	SIRT1 está hiperepressa no câncer gástrico humano (CG).	83
Figura 5	O SIRT3 está hiperexpresso no câncer gástrico humano (CG).	84
Figura 6	Expressão de PGC1- alfa em câncer gástrico. PGC1- alfa marcado em verde, Original magnificatin, x20 . PGC1alpha/DAPI, GC,20x	84

CAPÍTULO III

Figure 1	mRNA relative expression of SIRT1	103
Figure 2	mRNA relative expression of SIRT1 and staging	104
Figure 3	Association between sirtuins and oxidative factors by regression linear	105
Figure 4	Multistep of carcinogenesis.	106
Figure 5	Sirtuins and their association with age, calorie restriction and production of reactive oxygen species.	107
Figure 6	Integration between SIRT1, SIRT3, PGC1 alpha and HIF1 alpha. SIRT1, a NAD ⁺ dependent deacetylase regulates positively the expression of PGC1 alpha which participate of metabolism mitochondrial, where SIRT3 is localized. PGC1 alpha still, acting as a sensor of requirement of oxygen can acts as an anti- or oxidant agent, promoting accumulation of ROS.	108
Figure 7	SIRT1 is upregulated in human gastric cancer (GC).	109
Figure 8	SIRT3 is upregulated in human gastric cancer (GC).	110

CAPÍTULO IV

Figure 1	Molecular classification of gastric cancer. GOJ, gastro-oesophageal junction cancer; CINGC, chromosomal instability gastric cancer; GSGC, genomically stable gastric cancer; MSIGC, microsatellite instability gastric cancer; EBVGC, Epstein–Barr virus gastric cancer.	114
-----------------	--	-----

CAPÍTULO V

Figure 1	Histological analysis of HCC tissue, and Alpha-fetoprotein dosage evolution observed in patient #4.	141
Figure 2	Tridimensional structure of p53 and FBXW7 regions related to the missense polymorphisms.	142
Figure 3	Pathway interaction of p53, β -catenin, and FBXW7 proteins.	143

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1	Achados demográficos e patológicos em tecidos sem neoplasia (controles) de indivíduos obesos submetidos a gastroplastia redutora e pacientes com câncer gástrico (CG).	70
-----------------	--	----

CAPÍTULO III

Table 1	Demographic and pathological features of histological non-gastric cancer tissue (control) from obese individuals and patients with gastric cancer (GC).	102
----------------	---	-----

CAPÍTULO IV

Table 1	TNM classification of gastric cancer	115
Table 2	Anatomic stage/prognostic groups	116
Table 3	Pattern of recurrence following surgery alone in selected randomized trials. RT, radiotherapy; CT, chemotherapy; CRT, chemoradiotherapy. TABLE 4. Completed randomized controlled trials of multimodal gastric cancer treatment. S, surgery resection; OS, overall survival; PFS/DFS, progression-free survival/disease-free survival; MM, multimodal therapy; CT, chemotherapy; CRT, chemoradiotherapy; n.s., non-significant.	124

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

AACR	American Association for Cancer Research
ADP	adenosinediphospho (ADP)-ribosiltransferase
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AGC	atlas genômico do câncer
ANOVA	Analysis of Variance
APC	adenomatous polyposis coli
ARTIST	Adjuvant Chemoradiation Therapy in Stomach Cancer
ASCO	American Society of Clinical Oncology
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCS	Centro de ciências da saúde
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CEA	carcinoembryonic antigen
CG	câncer gástrico
CGIM	câncer gástrico de instabilidade de microssatélites
CGGE	câncer gástrico genomicamente estável
CGEBV	câncer gástrico associado ao Epstein Barr Virus
CINGC	chromosomal instability gastric cancer
CRITICS	Chemoradiotherapy After Induction Chemotherapy of Cancer in the stomach
CLASSIC	capecitabine and oxaliplatin adjuvant study in stomach cancer
CE/CG	Câncer de esôfago/Câncer gástrico
CpG	região promotora gênica
CIMP	CpG island methylator phenotype
CRT	chemoradiotherapy
CT	chemotherapy;
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	desoxirribonucleic acid
DDC	deleted in colon cancer
DRGE	doença do refluxo gastroesofágico
EBV	Epstein Barr Virus
EBVGC	Epstein–Barr virus gastric cancer.

ECC/ EOC	epirubicin, cisplatin/ oxaliplatin or capecitabine
ECF	chemotherapy epirubicin + cisplatin + 5-fluorouracil
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
ESMO	European Society of Medical Oncology
EUS	endoscopic ultrasonography
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco
FHIT	fragile histidine triad
GTPase	guanosine triphosphate (ase)
G1	tumor grade 1
G2	tumor grade 2
G3	tumor grade 3
GIST	gastrointestinal sarcoma tumors
GOJ	gastro-oesophageal junction
GSGC	genomically stable gastric cancer
HATs	histona acetiltransferases
HDACs	histona deacetilases
HER2	human Epidermal growth factor Receptor 2
HIF1- alfa	hypoxia inducible factor-1 alpha
HMT	histona metiltransferase
hMLH1	human mutL homolog 1
HP	helicobacter pylori
HR	hazard ration
H1	histona1
H2A	histona 2A
H2B	histona2B
H3	histona3
H4	histona4
IARC	International Agency for Research on Cancer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IL-1	interleucina 1
IL-8	interleucina 8
JAK 2	Janus kinase 2

LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
MAGIC	Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy
MeSH	Medical Subject Headings
MGMT	methylguanine DNA methyltransferase
miRNA	micro-RNA
MM	multimodal therapy
mRNA	RNA mensageiro
MSI	microsatellite instability
MSIGC	microsatellite instability gastric cancer
NA	Non-applicable
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide oxidado
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide reduzido
NF- κ B	factor nuclear kappa B
NR	normal
n.s.	non-significant.
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	overall survival
PET	positron emission tomography
PFS/DFS	progression-free survival/disease-free survival
PGC1- α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PLM	proteínas ligantes ao grupo metil
PM	peritoneal metastasis
PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPAR γ	gamma Peroxisome proliferator-activated receptor
primiRNA	transcrito primário de microRNA
PubMed	Publicações Médicas
Q-PCR	PCR quantitativo em tempo real
qPCR	real time polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
RT	radiotherapy
RTK-RAS	Receptor Tyrosine Kinase Ras
ROS	reactive oxygens species
S	surgery

SIRT	sirtuína
SWOG	Southwest Oncology Group
TCGA	the cancer genome atlas
TFF	trefoil factor family
TGFb3	transforming growth factor beta3
THBS-1	thrombospondin-1
TNM	Tumor, Node, Metastasis
TP53	tumor protein p53
TP73	tumor protein p53
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UCL	University College of London
UICC	Union for International Cancer Control
USA	United State of America
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1	Câncer gástrico	24
2.1.1	Epidemiologia	24
2.1.2	Câncer gástrico no mundo ocidental e oriental	26
2.1.3	Etiologia, Fatores de risco e fatores prognósticos	26
2.1.4	Classificações histológicas	28
2.1.5	Patogênese câncer gástrico subtipo intestinal e subtipo difuso	33
2.2	Fatores oxidativos e câncer gástrico	38
2.3	Epigenética	40
2.3.1	Histórico e definição	40
2.3.2	Estrutura da cromatina	44
2.3.3	Mecanismos Epigenéticos	46
2.3.3.1	<i>microRNAs não codificantes - miRNA</i>	46
2.3.3.2	<i>Metilação do DNA</i>	48
2.3.3.3	<i>Modificações das histonas</i>	49
2.3.4	Sirtuínas como um tipo de histona deacetilase	52
2.3.5	Alterações epigenéticas no câncer gástrico	55
3	OBJETIVOS	57
4	CAPÍTULO I. Revisão da literatura: câncer gástrico e sirtuínas	58
	Introdução	58
	Metodologia	29
	<i>Eligibilidade</i>	59
	<i>Identificação dos Estudos (electronic database search)</i>	59
	<i>Seleção dos Estudos</i>	60
	Resultados	60
	Discussão	63
	Conclusão	64
5	CAPÍTULO II. Estudo Original: Epigenética e câncer gástrico: Papel das sirtuínas na oncogênese e sua associação com biomarcadores oxidativos	66
	Objetivos	66

	<i>Primários</i>	66
	<i>Secundários</i>	66
	Metodologia	66
	<i>Eligibilidade</i>	66
	<i>Critérios de Inclusão</i>	66
	<i>Amostras</i>	67
	<i>Histologia e imunofluorescência</i>	67
	<i>Extração de RNA de blocos de parafina e PCR quantitativo em tempo real (Q-PCR)</i>	67
	<i>Análise Estatística</i>	68
	Resultados	68
	<i>Características clínicas e patológicas</i>	68
	<i>Expressão de sirtuínas e fatores oxidativos</i>	69
	Discussão	74
	<i>Associação entre sirtuínas e fatores oxidativos</i>	76
	Conclusão	80
	Perspectivas	81
6	CAPÍTULO III. Artigo Original 1: Epigenetics and gastric cancer in Western populations: are sirtuins and associated oxidative-related factors potential biomarkers?	84
	Abstract	85
	Introduction	86
	Methods	87
	<i>Tissue samples</i>	87
	<i>Histology and immunofluorescence</i>	87
	<i>RNA extraction and quantitative real-time polymerase chain reaction</i>	88
	<i>Statistical analysis</i>	88
	Results	88
	<i>Clinical and pathological features</i>	88
	<i>Sirtuin expression</i>	89
	<i>Associations between sirtuins and oxidative-related factors</i>	89
	Discussion	90
	Conclusion	95
	Perspective	96

	References	96
7	CAPÍTULO IV. Artigo Original 2: Medical Treatment of Gastric Cancer: New Challenges, New Horizons	
	Abstract	110
	Introduction	111
	Classification beyond Histological Criteria: Molecular Subtypes	112
	Staging: an essential addition?	114
	Surgery Treatment: Paradigms and Challenges	115
	<i>Early disease – local surgery</i>	115
	Surgery alone is not enough	117
	Chemotherapy	118
	Conclusions	124
	Acknowledgements	124
	References	125
8	CAPÍTULO V. Artigo Original 3: A bad outcome on hepatocellular carcinoma with extra-hepatic HCV infection caused by mutations in TP53, CTNNB1 and FBXW7 genes	
	Abstract	130
	Introduction	131
	Methods	132
	<i>Samples</i>	132
	<i>Genotype Profile</i>	133
	Results	133
	Discussion	134
	Acknowledgments	137
	Ethical Approval	137
	References	137
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	143
	REFERÊNCIAS	144

ANEXO A - Parecer do comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS /UFPE.	164
ANEXO B - Artigo produzido enquanto realização do doutorado, em tema distinto	166



1 INTRODUÇÃO

A epigenética constitui, como visto, um tema de extrema relevância na atualidade tendo em vista a heterogeneidade interindividual de várias doenças, dentre elas o câncer. As modificações das histonas, proteínas que participam do empacotamento do DNA no núcleo e que atuam na regulação gênica, tem implicações relevantes em processos biológicos e patológicos. As sirtuínas constituem uma proteína com propriedade histona deacetilase que tem sido associada a processos de envelhecimento e sobrevivência celular. Em tecidos neoplásicos apresenta um papel dual, ora como facilitadora de oncogenes ora de genes supressores a depender do sítio tumoral.

Trazer a temática da epigenética para uma doença como o câncer se reveste de maior importância tendo em vista se tratar de um problema de saúde pública com altas taxas de incidência, prevalência e mortalidade. O câncer gástrico bem se enquadra nesse contexto. Além disso, pode se apresentar com variações sejam demográficas, fenotípicas ou genotípicas.

Ademais, as sirtuínas como atuantes no processo de regulação de oncogenes, genes supressores de tumor e até genes de reparo, podem deflagrar ou progredir a o processo de carcinogênese. E ainda, sua participação no metabolismo peculiar da célula tumoral deve ser avaliada. Assim, estudos que avaliem o seu padrão de expressão no câncer gástrico, neoplasia com elevada heterogeneidade clínica e molecular, são necessários, auxiliando a entender o seu comportamento em populações diversas.

Além disso, como dito anteriormente, fatores oxidativos podem também contribuir para o desenvolvimento do fenótipo maligno, e sua participação, como o do

PGC1- alfa e o HIF1- alfa, isoladamente ou associado às sirtuínas, ainda não foi estudado em nossa população.

Até o momento não há dados na literatura que avaliem a expressão de sirtuínas e de fatores oxidativos, e sua associação com fatores clínicos e patológicos no câncer gástrico. Ou ainda, se esses exercem alguma influência na sua patogênese, sobretudo em ocidentais, ainda é um dado incerto.

Aspectos subcelulares da doença devem participar dessa heterogeneidade clínica e perfis moleculares distintos podem identificar subgrupos com prognósticos diversos. Como dito anteriormente, a busca de um biomarcador que justifique essas evoluções distintas é fundamental. O conhecimento de uma base molecular que tenha impacto no prognóstico e



tratamento dos pacientes é imperioso. Nesse diapasão, cenários tanto genéticos quanto epigenéticos devem ser estudados.

Ressalte-se que, como veremos adiante, no capítulo referente a uma revisão sistemática do tema epigenética e câncer gástrico, poucos estudos que tentam responder a essa questão foram todos realizados em pacientes de origem oriental.

A busca por um marcador biológico potencialmente eficaz que permita avaliar o prognóstico do paciente oncológicos tem sido uma prioridade mundial. Caso a expressão de sirtuínas associada a fatores oxidativos em pacientes com câncer gástrico se mostre como um biomarcador adequado na avaliação do prognóstico dos pacientes, o desenvolvimento de drogas que atuem nesses mecanismos pode ser concebido com o intuito de permitir o controle da progressão tumoral.

O presente trabalho foi proposto para tentar avaliar esses questionamentos. Para tanto, o dividimos em três capítulos. O primeiro deles, objetiva a realização de uma revisão sistemática dos estudos que avaliaram a associação da epigenética no CG, porém mais especificamente no que concerne ao tema sirtuínas e câncer gástrico nos últimos dez anos.

O segundo capítulo, apresenta um estudo original, desenvolvido no laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco – LIKA/UFPE, avaliando o papel das sirtuínas na oncogênese gástrica e sua associação com biomarcadores oxidativos em pacientes com câncer gástrico submetidos a tratamento cirúrgico no Hospital das Clínicas da UFPE. Tal estudo, fundamentou a concepção original dessa tese, e seus resultados são fundamentalmente apresentados no capítulo três dessa tese, bem como uma discussão mais aprofundada e as conclusões atingidas. No entanto, dados suplementares e não menos relevantes são apresentados ainda nesse capítulo dois.

Por fim, no terceiro capítulo, apresentamos dois artigos submetidos a periódicos internacionais indexados que versam sobre o papel das sirtuínas e fatores oxidativos, relatados no capítulo dois e um outro de atualização do tratamento gástrico, seus desafios atuais e horizontes a serem desbravados, esse último em parceria com a University College of London (UCL) Medical School, Royal Free Campus, London, United Kingdom.

Nessa tese, avaliamos a expressão de moléculas que podem, de alguma maneira, interferir, através de mecanismos epigenéticos, no prognóstico desses pacientes. Dessa maneira, abordaremos a seguir conceitos e mecanismos que fundamentam o fenômeno da epigenética e suas possíveis inserções na carcinogênese.

2 REVISÃO DA LITERATURA

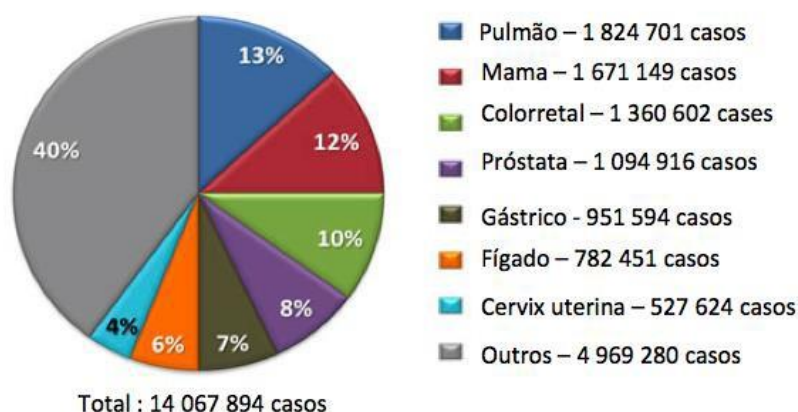
2.1 Câncer gástrico

2.1.1 Epidemiologia

O câncer gástrico representa, dentro de um contexto de saúde pública, um problema de escala mundial. Apesar de sua incidência ter apresentado declínio desde a década de 30 do século passado, ainda representa uma das maiores causas de morte por câncer nos Estados Unidos, por exemplo (SIEGEL et al., 2016). Essa alta taxa de mortalidade é multifatorial, mas se deve, sobretudo à elevada prevalência de doença avançada à apresentação (AGBOOLA et al., 1994; AVITAL, 2011). Em series populacionais do ocidente, a taxa de sobrevivência para pacientes completamente ressecado é de aproximadamente 70% a 75%, enquanto que decresce sobremaneira para no máximo 35% se diagnosticado a partir do estágio II (AGBOOLA et al., 1994; AVITAL, 2011).

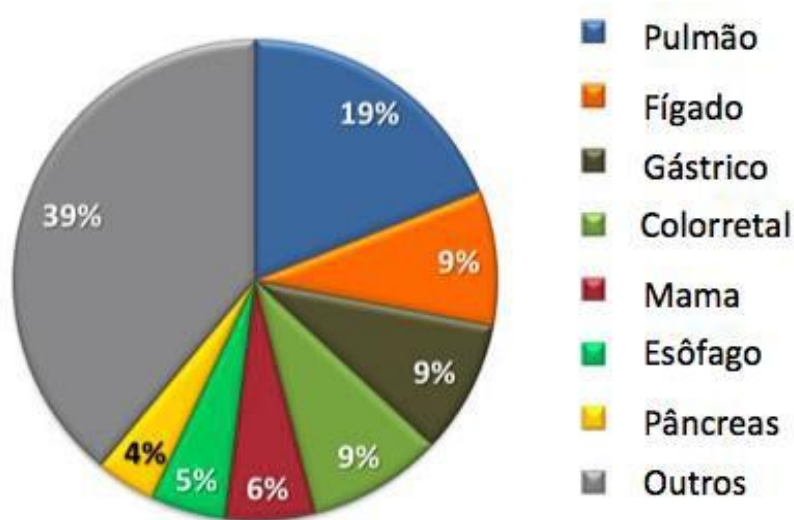
Anualmente, cerca de novecentas mil pessoas são diagnosticadas com câncer gástrico no mundo e dessas em torno de 738 mil evoluem para óbito relacionada à doença, fazendo com que responda pela quarta ou quinta posição em termos de incidência de câncer em geral e a segunda ou terceira maior causa de morte por câncer a depender no ano analisado (GLOBOCAN, 2008; FERLAY et al., 2010; JEMAL et al., 2010, GLOBOCAN 2012). (Figura 1 e 2). Nos Estados Unidos, as taxas de incidência e mortalidade por ano mais recentes são de 26.240 e 10.800, respectivamente (SIEGEL et al., 2018).

Figura 1: Incidência estimada de câncer, em ambos os gêneros, por topografia, no mundo



FONTE: GLOBOCAN 2012.

Figura 2: Mortes por câncer, em ambos os gêneros, por topografia, no mundo



FONTE: GLOBOCAN 2012.

Sua incidência é mais comum em homens que mulheres em todo o mundo (FERLAY et al., 2010). Acima de 70% dos CG ocorrem em países em desenvolvimento, mas variações epidemiológicas são demonstradas com diferentes regiões geográficas, sendo as taxas mais elevadas concentradas no leste asiático, leste europeu e América do Sul, enquanto as mais baixas observadas na América do Norte e maior parte da África (FORMAN et al., 2006; JEMAL et al., 2011).

Em estudos ocidentais, a taxa de sobrevida mediana é de 2 anos, com uma taxa de recidiva de até 65% e sobrevida em 5 anos de até 30% (WANEBO et al., 1993), enquanto esta última pode atingir o patamar de mais de 60% (DICKEN et al., 2005) na literatura oriental. Assim, apesar de o oriente ter o número de casos novos maior a cada ano, também apresenta maiores taxas de sobrevida, talvez em parte, pela maior incidência de tumores proximais no ocidente, que são tumores mais agressivos historicamente, e ao diagnóstico precoce realizado (programas de rastreamento estreitos) mais frequentemente em serviços orientais (NOGUCHI et al., 2000).

No Brasil, a situação é da mesma forma alarmante. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer do Brasil - INCA, o número de casos novos de câncer gástrico estimados para o Brasil no ano de 2018 é de 21.290, sendo 13.540 homens e 7.750 mulheres por ano (INCA, 2018), apesar de uma leve queda em relação aos números de 2006, que era de 23.200 novos casos (INCA 2016).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de estômago em homens é o segundo mais frequente nas Regiões Norte (11.62/100 mil) e Nordeste (10.67/100 mil). Nas Regiões Sul (17.13/100 mil) e Centro-Oeste (11.50/ 100 mil) é o quarto mais frequente. Já na Região Sudeste (13.79/100 mil) ocupa a quinta posição. Para as mulheres, é o quarto mais frequente na Região Norte (5.82/100 mil). Nas Regiões Sul (8.71/100 mil) e Nordeste (6.73/100 mil), ocupa a quinta posição. Nas demais Regiões, Sudeste (7.82/100 mil) e Centro- Oeste (6.35/100 mil), ocupa a sexta posição (INCA, 2016).

Figura 3: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, por sexo, exceto pele não-melanoma. Números arredondados por múltiplos de 10.

Localização primária	casos novos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

FONTE: INCA, 2016.

2.1.2 Câncer gástrico no mundo ocidental e oriental

Como abordado anteriormente, as diferenças epidemiológicas quando são comparadas em países ocidentais e orientais, se refletem também na história natural da doença. Variações na localização do tumor (alta prevalência no terço proximal no ocidente), nas condutas cirúrgicas (abordagens mais agressivas em países asiáticos) e de tratamento adjuvante têm sido usadas para explicar tais diferenças. Se a influencia da biologia tumoral e de sua patogênese podem ser impactadas para além de fatores genéticos, por aspectos ambientais, como por exemplo mecanismos epigenéticos, é um tema que permanece incerto na literatura.

2.1.3 Etiologia, Fatores de risco e fatores prognósticos

O CG é uma doença multifatorial e tanto fatores ambientais (modificáveis, como infecção pelo *H. pylori*, fumo e cirurgia ou não modificáveis como idade, gênero, tipo sanguíneo (EL-OMAR et al., 2000; ZINTZARAS, 2006; EDREN et al., 2010), anemia perniciosa (VANNELLA et al., 2013), cirurgia gástrica prévia (AHN et al., 2008; TAKENO et al., 2014), como fatores genéticos (YASUI et al., 2001; BANI-HANI et al., 2005;



CLEMENTS et al., 2002; SMITH et al., 2006; XIAO et al., 2006; KAURAH et al., 2007; HOWLADER et al., 2011; WORTHLEY et al., 2012) e epigenéticos (NAKAJIMA et al., 2006; LEAL et al., 2007; BERNAL et al., 2008) tem seu papel na etiologia da doença.

Os fatores de risco podem sofrer influência também na topografia da lesão tumoral. Aqueles, por exemplo, que são comuns tanto para tumores de cárdia como não-cárdia incluem idade mais avançada (HOWLADER et al., 2011), tabaco (LADEIRAS-LOPES et al., 2008; IARC, 2010), gênero masculino (BROWN et al., 2002), radiação prévia (MORTON et al., 2013; HENDERSON et al., 2012) e história familiar (BERNINI et al., 2006; YAGHOUBI et al., 2010; VAN DER POST et al., 2015). Por outro lado, fatores associados a tumores de cárdia isoladamente são obesidade (ALEMÁN et al., 2014; LAUBY-SECRETAN et al., 2016) e doença do refluxo gastresofágico (RUBENSTEIN et al., 2010). Já infecção pelo *H. pylori*, sobretudo em países ocidentais, baixas condições socio-econômicas com fatores dietéticos associados (WARREN et al., 1983; KAMANGAR et al., 2011; GE et al., 2012; UTHMAN et al., 2013) são mais frequentes em tumores de região não-cárdia.

O prognóstico dos pacientes com câncer gástrico é determinado principalmente pelo estágio da doença à apresentação. Aqueles com doença em estágios precoces, limitados à mucosa e submucosa por exemplo, são tratados cirurgicamente e apresentam taxa de sobrevida em cinco anos em torno de 70 a 95% (SUE-LING, 1993; SASAKO, 1997). No outro extremo, casos em que as células tumorais ultrapassam a submucosa gástrica, o risco de metástase linfonodal aumenta e as taxas de sobrevida livre de doença diminuem sobremaneira (CUNNINGHAM, 2006). Estudos populacionais no ocidente mostram que a maioria dos pacientes se apresenta com doença que ultrapassa a camada submucosa; nestes casos, a taxa de sobrevida em cinco anos é de 20 a 30% (SIEWERT, 1993).

No entanto, a história natural da doença é bastante heterogênea. É curioso o fato que alguns pacientes respondem significativamente a certos regimes quimioterápicos enquanto outros apresentam modestas respostas e outros nem sequer respondem. As taxas de sobrevida podem, ainda, apresentar uma ampla variação entre populações de fenótipos relativamente semelhantes. A busca por um biomarcador ideal que justifique essa heterogeneidade interindividual é constante, mas os até o momento descritos, não têm determinado os fundamentos da biologia subjacente da doença, que tenham impacto no prognóstico (CUNNINGHAM, 2007).

Outros fatores prognósticos são ainda descritos. O grau de diferenciação tumoral tem se relacionado à agressividade da neoplasia (CRAWFORD, 1994). Nesse contexto, os tumores são classificados como bem, moderado ou mal diferenciado (Graus 1, 2 e 3,



respectivamente). Por outro lado, resultados contraditórios de alguns estudos retrospectivos não evidenciam ser este um fator prognóstico independente (ADACHI et al., 2000, TAKAHASHI et al., 2000; KIM et al., 2000).

Também dentro dessa perspectiva, o tamanho tumoral, tem sido implicado. Algumas séries retrospectivas e prospectivas, têm demonstrado uma estreita associação entre o volume tumoral, a presença de metástase linfonodal e a taxas de sobrevida em cinco anos inferiores, sendo o tamanho tumoral no maior diâmetro um fator prognóstico independente em análise multivariada (SIEWERT et al., 1998; MSIKA et al., 2000; YOKOTA et al., 2000; ADACHI et al., 2000).

A localização tumoral representa outro fator que tem impacto tanto na escolha do tratamento como no prognóstico do CG. Tumores do terço proximal, por exemplo, têm uma maior frequência de invasão da parede, de presença de metástase linfonodal e de doença mais avançada a montante (PINTO-DE SOUSA et al., 2001). Além disso, a topografia da lesão, delineia qual a técnica cirúrgica mais adequada (CANCER.ORG., 2018).

A presença de invasão linfática e vascular parecem atuar no prognóstico dos pacientes. Êmbolos neoplásicos, em vasos peritumorais, nesse contexto, tem sido associado a pior evolução, mesmo em pacientes sem metástase linfonodal (YOKOTA et al., 1999; PINTO-DE SOUSA et al., 2001).

Marcadores tumorais mais antigos como p53, E-cadherina, CD-34, c-ErbB2, CA 72– 4, CEA têm ainda significado incerto, mas alguns estudos têm evidenciado associação com maior taxa de recorrência e menor sobrevida (STARZYNSKA et al., 1996; ALLGAYER et al., 2000; PINTO-DE SOUSA et al., 2001; GASPAR et al., 2001), não servindo, portanto para escolha do tratamento, exceto no que concerne à hiperexpressão da proteína c-ErbB2. Nesse caso, apenas os pacientes metastáticos que apresentam tal característica molecular têm indicação para o uso de anticorpo monoclonal específico anti-Her2, o trastuzumabe, associado a quimioterapia com evidência científica comprovada em estudo de fase III (BANG et al., 2010).

2.1.4 Classificações histológicas

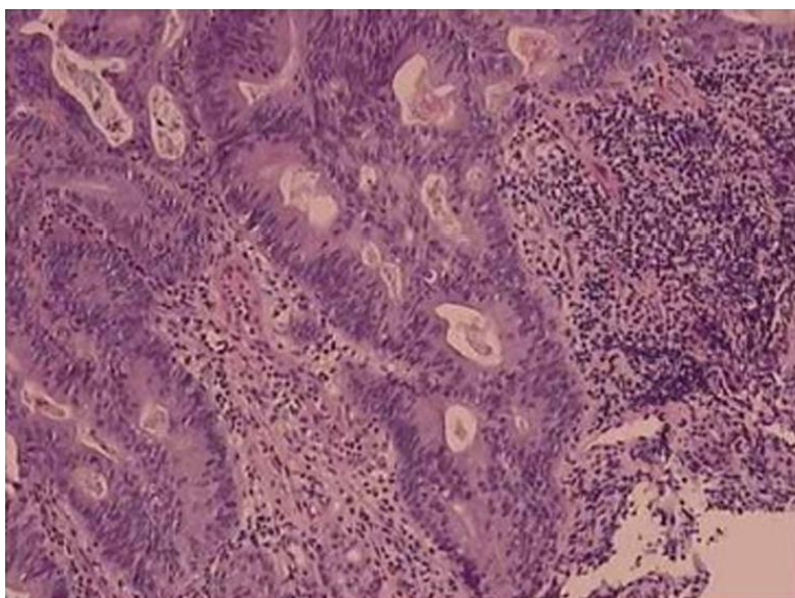
Quando nos referimos a câncer gástrico ou neoplasia maligna gástrica podemos incluir os diversos tipos histológicos descritos com suas respectivas frequências: adenocarcinoma (90% a 95%), linfomas (1%), tumores do estroma gastro-intestinal (2%), carcinóide (1%), adenoacantoma (1%) e carcinoma de células escamosas (1%) (Avital, 2011). No entanto, para fins de análise no presente trabalho, quando fizermos menção a câncer

gástrico (CG), estaremos abordando a histologia adenocarcinoma. Esse, por sua vez, é assim classificado através de achados histológicos, macroscópicos, ou mais recentemente moleculares.

Apresentando assim importante heterogeneidade arquitetural e citológica, para o CG são descritas algumas classificações, como de Lauren, da OMS, a macroscópica (Bormann) e mais recentemente a molecular. Desde 1965, a classificação utilizada era baseada nos critérios de Lauren (LAUREN, 1965) através dos quais pode-se determinar duas espécies principais (Quadro 1), adenocarcinoma tipo intestinal e tipo difuso, além de um outro subtipo indeterminado com frequência de apresentação de 54%, 32% e 15%, respectivamente (POLKOWSKI et al., 1999).

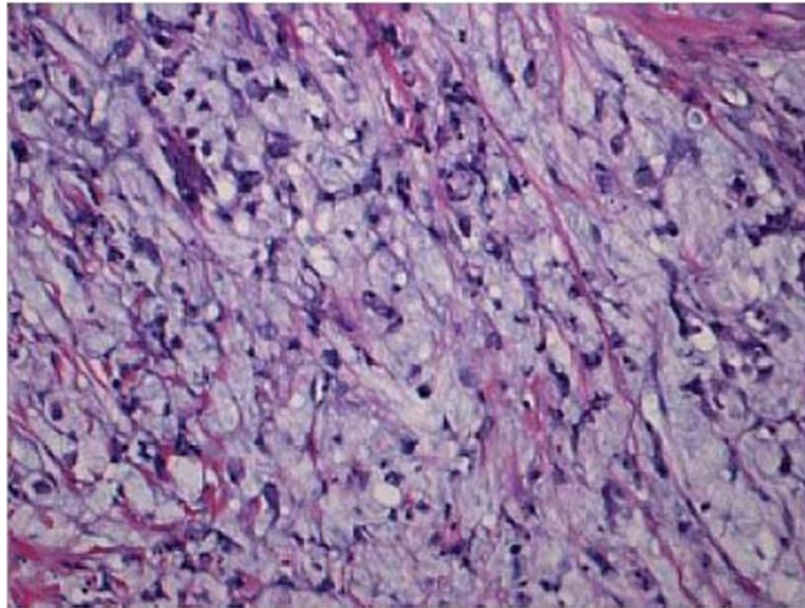
Apenas 45 anos após, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu quatro padrões histológicos distintos: tubular, mucinoso, papilar e em anel de sinete, além de outras variantes menos comuns (LAUWERS et al., 2010). Tal classificação se baseia no padrão histológico predominantemente presente (Quadro 1 e Figuras 4, 5 e 6).

Figura 4: Adenocarcinoma subtipo tubular



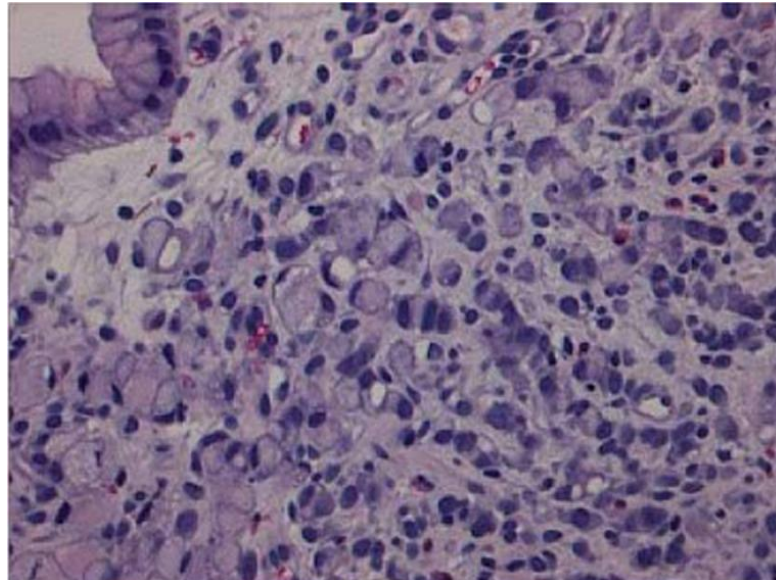
FONTE: Adaptado de HU et al., 2012.

Figura 5: Adenocarcinoma subtipo mucinoso



FONTE: Adaptado de HU et al., 2012.

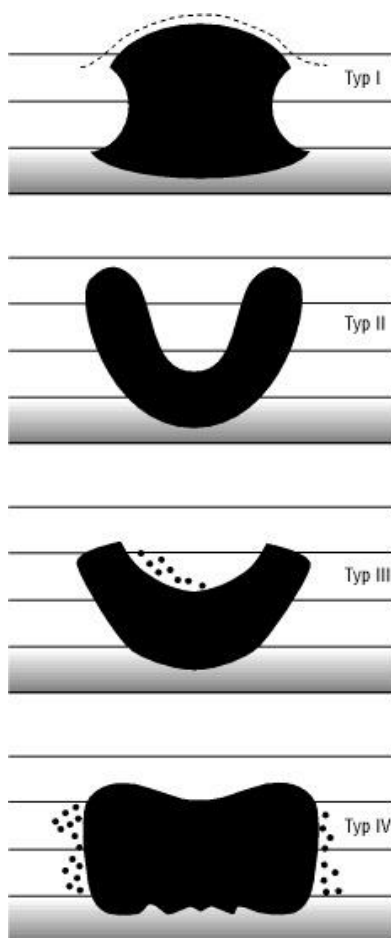
Figura 6: Adenocarcinoma subtipo anel de sinete



FONTE: Adaptado de HU et al., 2012.

Outro sistema de classificação macroscópica bastante antigo foi proposto por Borrmann em 1926, portanto anterior à de Lauren, ainda hoje é mundialmente aceita e usada na prática clínica por cirurgiões, patologistas e endoscopistas. O autor identificou o CG através de quatro tipos: I, polipóide; II, ulcerativo com bordas elevadas; III, ulcerativo com bordas não definidas e IV, difuso, com bordas indistiguíveis (BORRMANN, 1926). Já estudo publicado em 2009 demonstrou o que já se presumia na prática clínica, a classificação de Borrmann tinha valor preditivo para detecção de metástase linfonodal e sobrevida em pacientes portadores de GC avançado (LI et al., 2009) (Figura 7).

Figura 7: Classificação macroscópica do cancer gástrico segundo Borrmann.

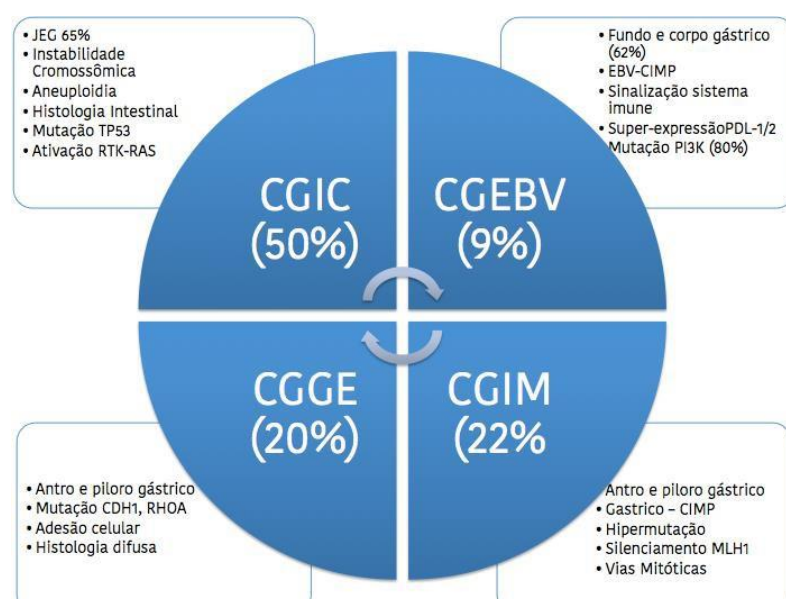


FONTE: Adaptado de HOLZHEIMER et al, 2001.

Com os conceitos oriundos da genômica e da epigenômica e de sequenciamento de DNA, uma nova classificação, agora do ponto de vista molecular foi descrita e publicada em 2014. O grupo *the Cancer Genome Atlas (TCGA) network*, ou atlas genômico do câncer (AGC), propôs quatro subtipos moleculares com características subcelulares peculiares a cada um deles com predileções por gênero e topográficas dentro do próprio estômago: i. Epstein Barr Virus (EBV) positivo; ii. instabilidade microssatélite; iii. estabilidade genômica e iv. instabilidade cromossômica (Figura 8).

O subtipo positivo para EBV apresenta mutações do *PIK3CA* e ampliações do *JAK2* e *ERBB2*, além de ter alta prevalência de hipermetilação de DNA e predileção pelo corpo e fundo gástrico (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014; Chia et al., 2016). O mais frequente deles, respondendo por cerca de 50% dos casos é o câncer gástrico de instabilidade cromossômica (CGIC), que se apresenta com maior prevalência na junção gastro-esofágica, com aneuploidia, histologia do subtipo intestinal, mutação do TP53 e ativação do RTK-RAS. Respectivamente, o câncer gástrico de instabilidade de microssatélite (CGIM), o câncer gástrico genomicamente estável (CGGE) e o câncer gástrico associado ao vírus Epstein-Barr, respondem por 22%, 20% e 9% dos casos. O CGGE e CGIM apresentam ambos predileção pelo antro e corpo gástrico, enquanto que o CGEBV tem maior prevalência no fundo e corpo gástrico. Figura 8

Figura 8: Classificação Molecular do câncer gástrico pelo AGC.



Legenda: JEG, junção gastro-esofágica; CGIC, cancer gástrico instabilidade cromossômica; CGGE, cancer gástrico genomicamente estável; CGEBV, cancer gástrico associado ao vírus Epstein-Barr; CGIM, cancer gástrico instabilidade de microssatélite; AGC, atlas genômico do câncer.

Quadro 1: Classificações histológicas distintas e subtipos histológicos correspondentes

Bormman (1926)	Lauren (1965)	OMS (2010)	TCGA (2014)	Outros
I: polipoide	Tipo Intestinal	Adenocarcinoma papilar Adenocarcinoma papilar Adenocarcinoma Mucinoso	Epstein Barr Virus (EBV)	Linfomas
II: ulcerativo com bordas elevadas	Tipo Difuso	Carcinoma Células Anel de Sinete Outros Carcinomas pobre coesão	instabilidade microssatélite,	GIST
III: ulcerativo com bordas não definidas	Tipo Indeterminado	Carcinoma Misto	estabilidade genômica	Tumor neuroendócrino
IV: difuso, com bordas indistiguíveis		Carcinoma Adenoescamoso Carcinoma de Células Escamosas Carcinosarcoma Carcinoma Indiferenciado Tumor sinus endodermal Adenocarcinoma Oncocítico Outros	instabilidade cromossômica	Sarcomas

2.1.5 Patogênese câncer gástrico subtipo intestinal e subtipo difuso

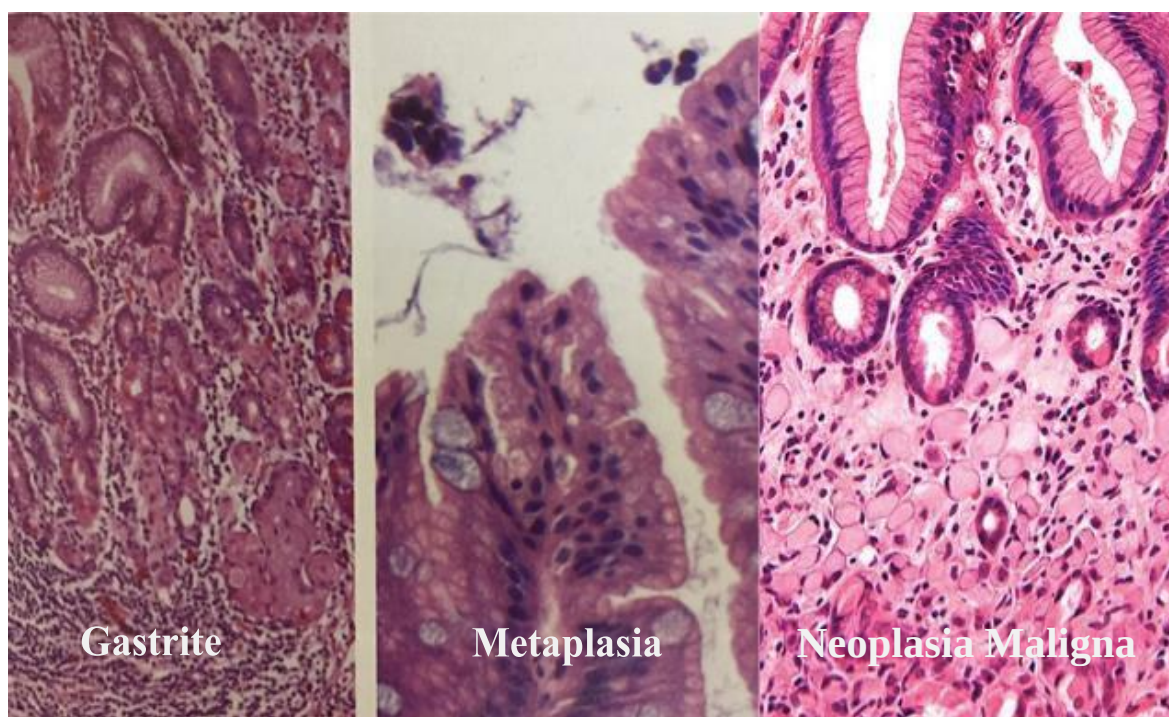
Com agentes deflagradores distintos e sistema de propagação de na adesão celular, deve-se analisar a patogênese do subtipo intestinal e do difuso separadamente. No tipo intestinal, as células tumorais são aderidas umas às outras e tendem a se estruturarem em padrão tubular ou glandular, enquanto que no difuso, ocorre uma falta de moléculas de adesão e as células individualmente tendem a crescer e invadir as estruturas adjacentes sem formar túbulos ou glândulas (SHAH et al., 2011).

Câncer gástrico subtipo intestinal - Há cerca de 20 anos, a International Agency for Research on Cancer (IARC), um segmento da Organização Mundial de Saúde (OMS), determinou a infecção pelo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) como a causa mais importante para a deflagração e propagação de um processo inflamatório que não tratado, pode levar progressivamente a um quadro de gastrite crônica ativa, sendo esta um fator de risco para o adenocarcinoma gástrico tanto do tipo intestinal ou quanto difuso (IARC, 1994; SOLCIA et al., 1996). Apesar disso, a infecção crônica está mais associada predominante ao tipo intestinal e fatores genéticos ao difuso (CARNEIRO et al., 2004). Mais recentemente, e em menor escala, outro agente infeccioso, o Epstein-Barr virus (EBV), tem sido associado ao CG sobretudo aqueles localizados nas porções proximais e corpo gástrico. Apesar disso, papel enquanto agente deflagrador da carcinogênese gástrica, não está completamente definido (TAKADA, 2000; KORIYAMA et al., 2004).

Para a infecção pelo *H. pylori* culminar com o desenvolvimento do subtipo de câncer intestinal é preciso um período bastante prolongado de exposição ao agente, usualmente de

quarto a mais décadas. As lesões pré-neoplásicas que se desenvolvam a partir da mucosa normal, seguem uma sequência de eventos que percorre o quadro de gastrite crônica não atrófica ativa, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, carcinoma invasivo (CORREA et al., 1975; CORREA, 1992) (Figura 9 e 10).

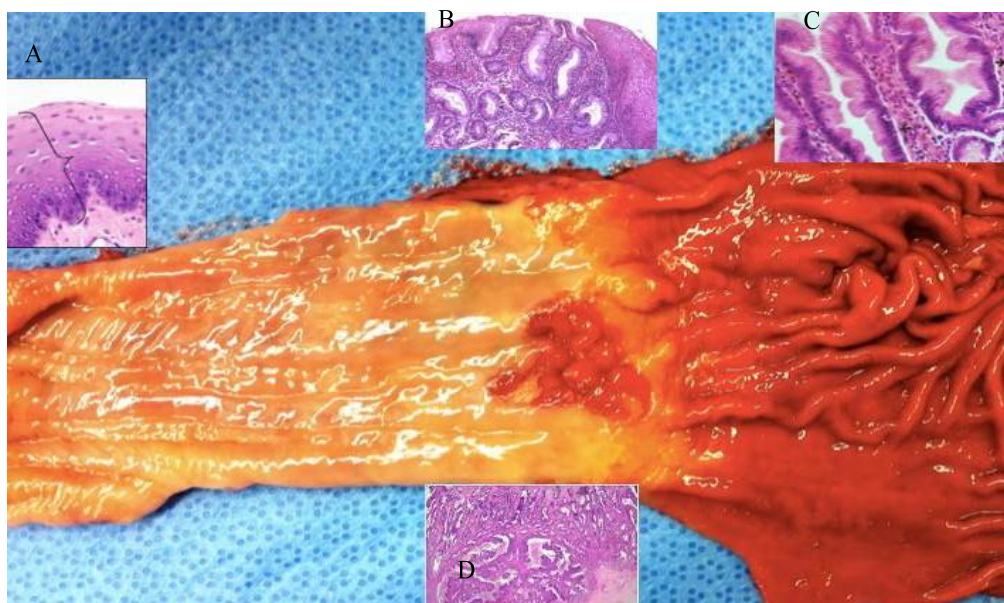
Figura 9: Alterações histológicas na patogênese do câncer gástrico. Alterações consecutivas na carcinogênese gástrica desde gastrite (esquerda), passando por metaplasia intestinal (meio) e atingido até estágio de neoplasia maligna (direita).



FONTE: Adaptado de Robbins and Cotran, 2010).

A progressão através de consecutivos percussores histológicos é acompanhado por um acúmulo de mutações (MOSS et al., 2005) e por um recrutamento e ativação de células sanguíneas inflamatórias e citocinas, quimiocinas, radicais livres que iniciam e perpetuam a resposta inflamatória. Os radicais livres, por exemplo, contribuem para a transformação maligna através da indução de mutações, e essas, através de informações truncadas, podem levar à síntese de proteínas aberrantes com modificações químicas na sua própria estrutura ou ainda pós-translacionais (HUSSAIN et al., 2003) (Figura 11).

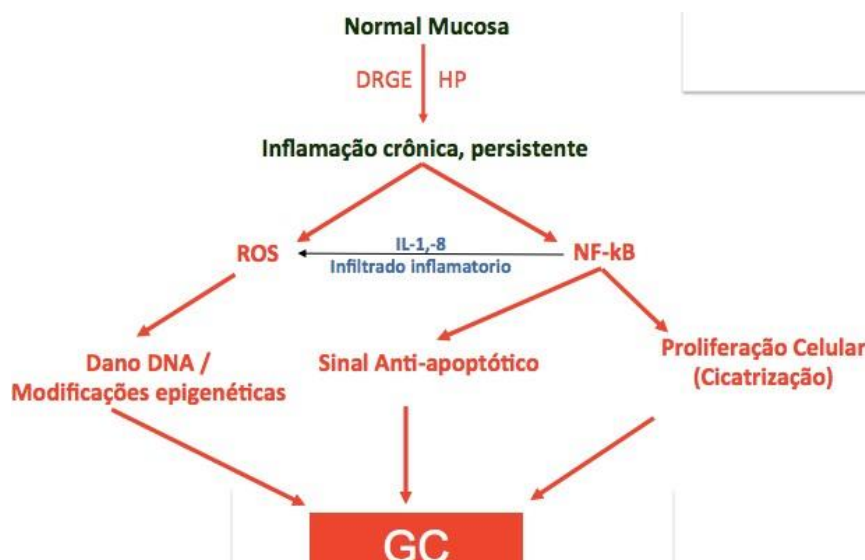
Figura 10: Produto de esôfago-gastrectomia, peça macroscópica e correspondência histológica. Pode-se observar em uma mesma peça cirúrgica, tecido esofageano normal (A), alterações histológicas compatíveis com Esôfago de Barrett, com células caliciformes, que sinaliza metaplasia intestinal (B), mucosa gástrica normal (C) e adenocarcinoma de junção gastro-esofágica padrão de crescimento cribriforme (D).



O acúmulo constante de mutações, pode levar a alterações fenotípicas das células que por sua vez podem seguir dois caminhos evolutivos: ou a eliminação do agente deflagrador da inflamação, o *H. pylori*, ou um segundo percurso que seria a progressão da cascata até o desenvolvimento do fenótipo maligno (HAHN et al., 2002).

Além das alterações histológicas acima descritas, o dano persistente causado pela inflamação crônica às células epiteliais pode ainda estimular o processo de apoptose e de hiperproliferação reativa que por sua vez podem promover mutações, reiniciando toda a cascata carcinogênica (PRESTON-MARTIN et al., 1990; MANNICK et al., 1996) (Figura 11).

Figura 11: Representação esquemática da patogênese do câncer gástrico. Esquema ilustrando possíveis vias que podem ser percorridas diante de um estímulo crônico (infecção pelo *H. pylori*, por exemplo), até deflagração de processo carcinogênico.



Legendas: DRGE, doença do refluxo gastro esofágico; HP, *Helicobacter pylori*; IL, interleucina; ROS, Reactive Oxygen Species; DNA, ácido desoxirribonucleico; NF-kB, fator nuclear kappa B; CG, câncer gástrico.

Alterações gênicas e modificações epigenéticas podem acompanhar a carcinogênese gástrica, desde lesões pré-malignas até tecido tumoral propriamente dito. Porém, nem sempre as alterações gênicas estão estruturadas em arranjo sequencial, sendo alguns genes expressos em etapas precoces e outros em fases tardias. Podem estar acometidos oncogenes, genes de supressão tumoral, genes que codificam receptores captadores ou transmissores de sinais ou próprios fatores de crescimento além de genes reguladores do ciclo celular (YASUI et al., 2006).

Como exemplo de mutação em oncogene presente já em fases precoces podemos citar a mutação do *K-ras* ou do oncogene *c-met*, este amplificado em 19% dos CG tipo intestinal e 39% do tipo difuso. Apesar dessa predileção pelos estágios iniciais, porém também encontrado em pacientes com doença mais avançada à apresentação (SMITH et al., 2006).

Por outro lado, os genes de supressão tumoral são descritos em até 50% dos casos do tipo intestinal, como alterações do *TP53*, *TP73*, *APC* (adenomatous polyposis coli), TFF (trefoil factor family), *DCC* (deleted in colon cancer), e *FHIT* (fragile histidine triad) (YOKOZAKI et al., 1999; NOGUCHI et al., 1999; SATO et al., 2001; MORGAN et al., 2003; YASUI et al., 2006).

Se por um lado, as alterações gênicas estão presentes em diversas fases da evolução do CG, por outro lado modificações epigenéticas podem também contribuir no processo. A



metilação do DNA em regiões promotoras, por exemplo, pode silenciar a expressão de determinados genes, como CDH1, no tipo intestinal (LEAL et al., 2007). Essa metilação aberrante dessa região do gene pode inclusive já estar presente desde a infecção pelo *H. pylori*, elevando sobremaneira o risco de câncer invasivo. Esse efeito, no entanto, parece ser reversível, após a bactéria ser removida (NAKAJIMA et al., 2006; PEEK et al., 2006; TAHARA et al., 2007; PERRI et al., 2007).

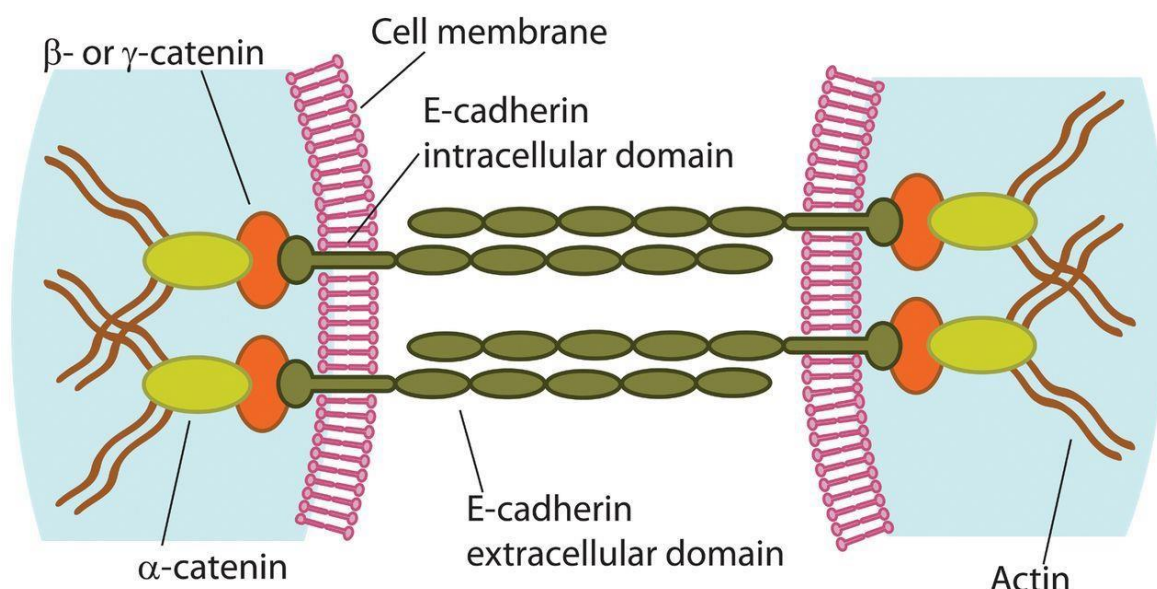
Câncer gástrico subtipo difuso - A patogênese do subtipo difuso baseia-se principalmente em anormalidades moleculares a nível de adesão celular. A maior representante desse tipo de alteração é aquela encontrada quando da baixa expressão da molécula de adesão E-caderina. O gene CDH-1 codifica essa proteína de adesão transmembrana, que possui um domínio intra e outro extra-celular. Sua porção citoplasmática (intracelular) interage com as cateninas, formando um citoesqueleto e assegurando o complexo de adesão célula-célula (GRAZIANO et al., 2003) (Figura 12).

O gene CDH-1 tem função como supressor tumoral e mutações germinativas localizadas no cromossomo 16q22.1, representa um risco de desenvolvimento de de CG acima de 80%, sendo indicado gastrectomia como tratamento profilático. A mutação também pode ser observada em tumores esporádicos (GUILFORD et al., 1998; HUMAR et al., 2002; FITZGERALD et al., 2010).

Representa um tipo de câncer de potencial altamente metastático, caracterizado por progressão acelerada e pior prognóstico se comparado ao subtipo intestinal (YASHIRO et al., 1995; KUNZ et al., 2012), apresentando-se com elevada taxa de invasão da parede gástrica.

Do ponto de vista histológico, as células tumorais estão dispostas sem formação glandular. A produção de mucina, frequentemente observada nesse tipo tumoral, se acumulada ao redor do núcleo das células individuais, resultando na chamada células em anel de sinete, que constitui um fator prognóstico desfavorável (RIBEIRO et al., 1998; PIESSEN et al., 2009).

Figura 12: Representação esquemática da E-caderina. E-caderina, proteína transmembrânica com função de adesão e sinalização celular expressa em células epiteliais.



FONTE: Adaptado de PERRY et al, 2009.

2.2 Fatores oxidativos e câncer gástrico

Diferentes mecanismos moleculares e metabólicos podem ainda estar envolvidos no desenvolvimento e progressão do CG. O estresse oxidativo, por exemplo, deve desempenhar um papel importante, uma vez que a patogênese sobretudo do subtipo intestinal, inclui um processo inflamatório crônico subjacente que induz a expressão elevada de espécimes de oxigênio reativo. O excesso na produção desses, promove diretamente dano ao DNA, lipídios e proteínas e indiretamente ativa uma série de cascata de sinalizações e modula a atividade de vários fatores de transcrição, resultando em alterações na expressão de genes envolvidos no controle da sobrevivência da célula, proliferação, angiogênese, invasão e metástase (FU et al., 2016).

Alguns fatores oxidativos, por seu turno, podem trabalhar em concurso com outros reguladores metabólicos como as sirtuínas. Dentre alguns fatores oxidativos conhecidos destacamos o *oxidative-related factors peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha* (PGC1- alpha) e o *hypoxia-inducible factor-1 alpha* (HIF1- alpha) (CHIO et al., 2016; YANG et, 2016; EDWARD et al., 2016).

O papel coletivo de determinadas sirtuínas, como uma histona deacetilase (HDAC) e o PGC1- alfa e HIF-1 alfa, como fatores oxidativos relacionados, no câncer gástrico é incerto.



PGC1- α é um coativador transcricional multi-funcional que regula a atividade de múltiplos receptores nucleares e fatores transcricionais envolvidos no metabolismo mitocondrial. Sendo um membro da família peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1, está fortemente expresso em tecidos ricos em mitocôndria ou que tenham alta demanda de energia (YANG et al., 2016). Desempenha um papel importante na manutenção do balanço entre açúcar, gordura e energia e na regulação da biossíntese mitocondrial. Alguns estudos têm mostrado que baixa expressão de PGC1- α está provavelmente envolvida na progressão maligna de alguns tumores, como mama, cólon e ovário (WATKINS et al., 2004; FEILCHENFELDT et al., 2004; ZHANG et al., 2007; CORMIO et al., 2009; REN et al., 2015).

Como o PGC1- α , as sirtuínas (proteína do tipo histona deacetilase, membro de uma família de 7 integrantes nominada de 1 a 7 e envolvida na regulação gênica como um dos mecanismos epigenéticos, mais à frente descrito), sobretudo a 3, (localizada primordialmente nas mitocôndrias) (CHEN et al., 2013), são participantes do metabolismo energético celular. Assim, seu papel e eventuais interações necessitam de maior investigação.

Por outro lado, sabe-se que baixas tensões de oxigênio (hipóxia) é um marcador de fenótipo maligno que exerce influência na célula tumoral. Um dos fatores liberados em resposta ao ambiente hipóxico é o HIF. Estudo recente, o descreve como um componente do microambiente tumoral que altera a matriz extra-celular, modula resposta imune e induz à angiogênese (Edward et al., 2016).

A ativação do HIF-1 desempenha papel na resposta adaptativa da célula tumoral ao auxiliá-la na captação de glicose através da via glicolítica, com vista à manutenção de seu estoque energético (efeito Warburg). O HIF1 tem participação no metabolismo tumoral ao induzir enzimas envolvidas na via glicolítica e na expressão elevada de transportadores de glicose, aumentando sua captação no ambiente celular. Por outro lado, o HIF1 induz a transcrição de fatores pró-angiogênicos como o vascular endothelial growth factor (VEGF), que estimula o desenvolvimento de novos vasos, sendo assim fundamental para fornecimento de oxigênio às células tumorais e seu desenvolvimento (CONWAY et al., 2001; CHIO et al., 2016).

O HIF ainda promove, através da ativação de fatores de transcrição como o *transforming growth factor beta3* (TGF- β 3) e o *epidermal growth factor* (EGF) que por sua vez estão envolvidos no processo de metástase (CONWAY et al., 2001, LADEROUTE et al., 2002). Constitui, assim um fator chave no mecanismo adaptativo da célula tumoral ao ambiente de hipóxia (WEINHOUSE et al., 1956; SEMENZA, 2001; CONWAY et al., 2001;



LADEROUTE et al., 2002; DENKO, 2008; MASOUD et al., 2015).

Evidências da literatura demonstram uma elevada expressão do HIF1 no CG em humanos; em roedores, é sabido que a inibição do HIF1- alfa tem atividade anti-tumoral. Assim, sua relevância no fenótipo malignos do adenocarcinoma permanece incerto (KITAJIMA, 2013), sobretudo se associarmos a outros marcadores metabólicos.

Dessa forma, a prevalência ainda elevada dessa neoplasia, as diferenças de comportamento tumoral em decorrências de variações geográficas, as taxas elevadas de mortalidade associada, suscitam muitas dúvidas quanto patogênese. Fatores genéticos são descritos, mas a influência de mecanismos epigenéticos são menos estudados e várias questões continuam em aberto. Um dos mecanismos epigenéticos envolvidos na patogênese de vários tipos de câncer é o processo de deacetilação das histonas. As sirtuínas atuam como uma histona deacetilase, trazendo a cromatina nuclear para uma conformação mais condensada, impedindo ou dificultando o acesso de fatores de transcrição e, conseqüentemente a expressão de determinados genes. A real importância das sirtuínas na carcinogênese ainda não está completamente definido, muitas vezes atuando com um papel dual, ora ativando/silenciando um proto-oncogene ora ativando/silenciando um gene de supressão tumoral (BOSCH-PRESEGUÉ L et al., 2011). Sua atuação no metabolismo da célula tumoral é descrita, porém sua interação com outros fatores oxidativos como o PGC1- alfa e o HIF1- alfa é fato desconhecido sobretudo no câncer CG.

Ademais, até o momento, não existem dados da literatura que avaliem sua expressão e seu papel em pacientes com CG no mundo ocidental. Os poucos artigos da literatura nesse contexto estão restritos para investigação de pacientes no mundo oriental. E isso se reveste de importância sobretudo na oncologia do século XXI, onde neoplasias, por exemplo, de pulmão (ZHOU et al., 2011) e gástricas (KIM et al., 2013) apresentam variações iminentemente biológicas, se comparadas diferentes regiões geográficas, que podem ser determinantes na escolha do tratamento com impacto em desfechos clínicos e patológicos.

2.3 Epigenética

2.3.1 Histórico e definição

Em 1939, Conrad Waddington foi quem primeiro hipotetizou a noção de epigenética conceituando-a como “a interação causal entre genes e seus produtos” (WADDINGTON, 1939). Apenas quadro décadas após, Riggs et al a definiram como “o estudo de alterações herdáveis mitótico e/ou meioticamente na função gênica que não pode ser explicada por mudanças na sequência de DNA” (RIGGS et al., 1996).



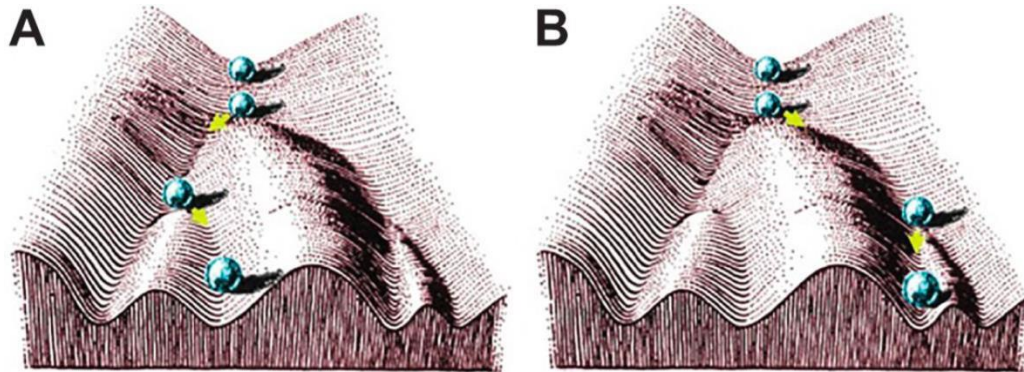
Atualmente, seu significado foi ampliado para as alterações herdáveis, transitórias/reversíveis na expressão gênica não acompanhada por alteração na sequência de DNA (FU, 2015).

Em células normais, as modificações epigenéticas permitem que aquelas com a mesma sequência de DNA apresentem funções distintas uma da outra, ou seja, uma célula neuronal com a função de transmissão do impulso nervoso, enquanto que uma célula do miocárdio com as funções de cronotropismo e automatismo, por exemplo. Esse processo foi didaticamente presumido já em 1956 através da figura que ficou conhecida como a plataforma de Waddington ou *Waddington's landscape* (NOBLE, 2015).

Através da dedução de Waddington, pode-se demonstrar que para avaliar o processo de herança de características adquiridas, há de se descobrir primariamente quais possíveis formas de adaptativas do desenvolvimento que já existem em uma população. Ou ainda, como o ambiente pode exercer influência nessas características. O autor, dessa forma, pode desenvolver teorias a partir da qual seria possível imitar um caminho que a própria evolução poderia ter tomado (NOBLE, 2015).

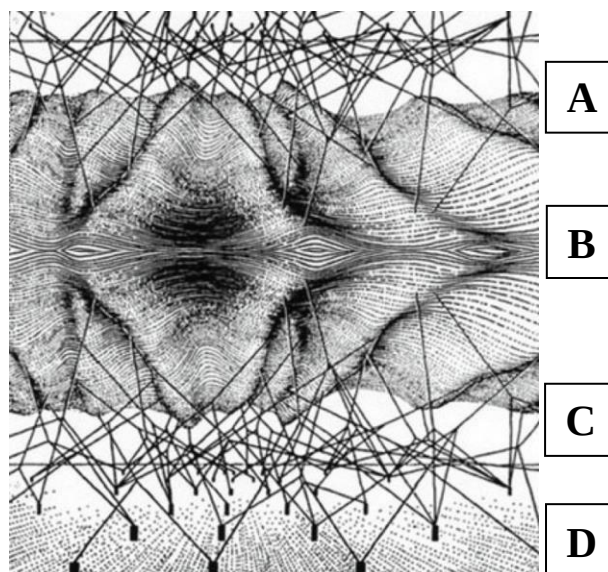
O processo de desenvolvimento seria então representado por uma série de caminhos alternativos que poderiam ser delineados como "vales" em uma determinada plataforma (*landscape*) (Figura 13 e 14). Em estudos prévios o autor, avaliando o desenvolvimento de embriões de moscas, demonstrou que com a simples mudança da temperatura do ambiente ou ainda através de determinado estímulo químico, esses embriões poderiam se desenvolver com diferentes estruturas do tórax e da asa. Na figura da sua plataforma do desenvolvimento, isso pode ser representado como uma pequena inclinação que conduziria a um canal "escolhido" em detrimento de outro, de modo que o adulto poderia exibir um fenótipo diferente a partir do mesmo genótipo.

Figura 13: Diagrama da plataforma do desenvolvimento de Waddington. A paisagem e a esfera no topo são do diagrama original. A posição subsequente da esfera foi adicionada à ilustração para representar dois sentidos que ela pode tomar (A e B). A plasticidade para que isso aconteça já existe na população.



FONTE: Adaptado por K. Mitchell). Sítio <http://jeb.biologists.org/content/218/6/816>. Acesso em 02/11/2016.

Figura 14: Diagrama de Waddington. Diagrama demonstrando como a plataforma do desenvolvimento (B) relaciona-se com genes (D) através de interações ou redes funcionais (C) complexas no organismo. Desde que foi evidenciada a influência do ambiente externo na condução do desenvolvimento, ao diagrama foi adicionado a rede superior representando as influências ambientais (A). A combinação delas pode levar a alterações evolucionárias, porém sem mutações ou alterações na sequência do DNA.



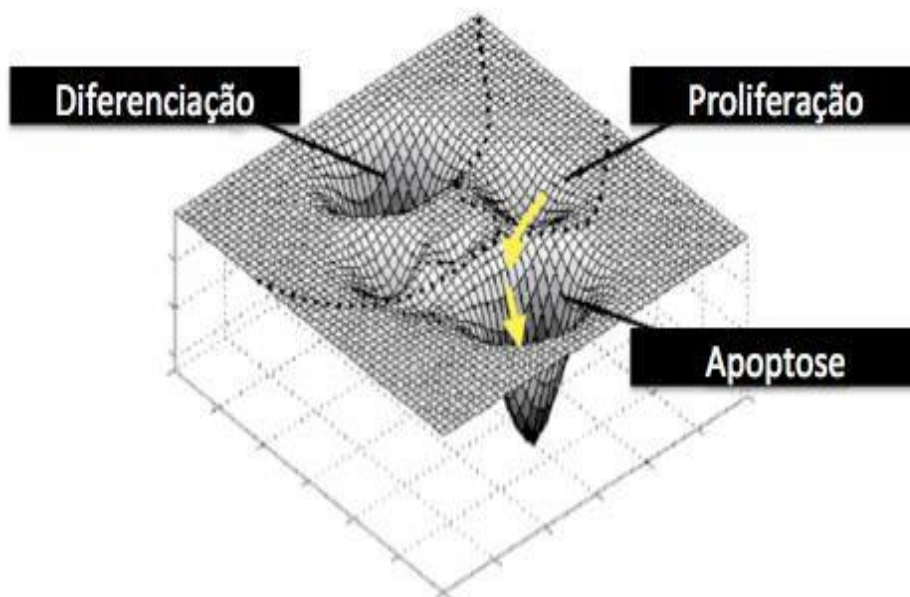
FONTE: Adaptado de Waddington, 1957). Sítio <http://jeb.biologists.org/content/218/6/816>. Acesso em 02/11/2016.

Pesquisas em epigenética podem elucidar, por exemplo, como mesmo apresentando a mesma sequência de DNA, as células podem se diferenciar em tipos celulares distintos. E mais, como essas células mantêm o seu status diferenciado permanentemente (AACR, 2008; AENISCH et al., 2008). Assim, a epigenética poderia ser considerada uma ponte entre

apresentação genotípica e fenotípica de uma determinada célula (AARON et al., 2007; BIRD, 2007; BRADLEY et al., 2007; JAENICH et al., 2004; REIK, 2007).

Se considerarmos o raciocínio de escolha por determinadas rotas ou vales, utilizando a plataforma de Waddington e adaptarmos para o processo carcinogênico, podemos dizer que se uma das esferas for conduzida para uma alça de proliferação sem oposição de apoptose subsequente, a célula pode se transformar em um fenótipo maligno (Figura 15).

Figura 15: Representação esquemática da plataforma de Waddington modificado para a carcinogênese. Possíveis rotas que uma determinada célula pode seguir em função de diferentes fatores genéticos, epigenéticos e/ou ambientais que podem determinar um fenótipo maligno se a escolha se der pela alça da proliferação sem que haja uma contrapartida em apoptose, por exemplo.



FONTE: Adaptado de INGBER, 2003.

Vale ressaltar que os termos epigenética e epigenoma têm conotações distintas. Aquele, refere-se a alterações em genes únicos ou ainda grupo de genes, enquanto esse, reflete ao estado epigenético geral da célula, ou seja, à análise global de marcadores epigenéticos frente a todo o seu genoma (BRADLEY et al., 2007; AACR, 2008). Dessa sorte, é fundamental mapear o padrão de modificação epigenética ou determinar o epigenoma de uma determinada célula. Ambos achados podem ser usados como marcadores epigenéticos de valor preditivo, diagnóstico, prognóstico ou de resposta a determinado tratamento (LAIRD, 2003; OZANNE, 2007; ESTELLER, 2008; MULERO-NAVARRO et al., 2008).

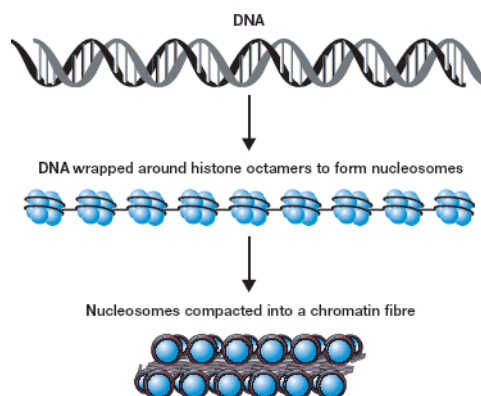
Quando falamos em alterações ou modificações epigenéticas, três mecanismos são descritos: os micro-RNAs não codificantes, metilação do DNA e remodelamento da

cromatina via modificações das histonas. O entendimento desses mecanismos tem contribuído para a elucidação de diferentes atividades biológicas, a partir da estrutura da cromatina até o processo que leva a atividades transcricionais (REIK, 2007; ENCODE, 2007; FEINBERG, 2004;).

2.3.2 Estrutura da cromatina

A molécula de DNA em eucariontes possui cerca de 2 metros (O'DONNELL ET AL., 2013) e, para se acomodar no interior microscópico de um núcleo celular, necessita de um processo de empacotamento, que reduza sua dimensão para se adequar ao ambiente nuclear. Esse empacotamento é realizado por proteínas especializadas denominadas histonas, formando um complexo proteína/DNA conhecido como cromatina (Figura 16).

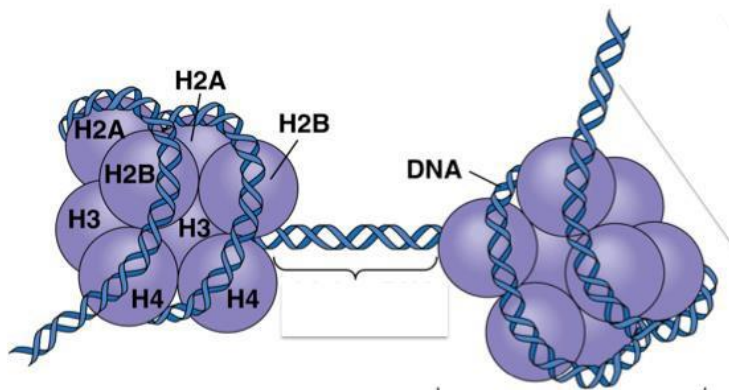
Figura 16: Estrutura da cromatina: A dupla hélice de DNA no plano superior, e para se adequar ao ambiente nuclear, é envolto em octâmeros de histonas para formar os nucleossomos (plano intermédio), e os nucleossomos por sua vez são compactados em fibras de cromatina.



FONTE: Adaptado do sítio: <http://www.abcam.com/cms/displayImage.cfm?intImageID=4228>. Acesso, 30/01/2018.

A unidade básica da cromatina é o nucleossomo, que por sua vez é constituído por cerca de 140 pares de bases do DNA ao redor de um octâmero formado por 4 unidades de histonas (H2A, H2B, H3, and H4). As unidades de histonas são empacotadas em regiões globulares, com a cauda amino terminal que se estende a partir da região globular, permitindo-as serem acessíveis a enzimas que participam de modificações de histonas (Figura 17 e 18) (LUGER et al., 1997). Outra proteína, denominada histona H1, interage com a molécula do DNA através de comunicações entre os nucleossomos (LUGER et al., 1997; GROTH et al., 2007; ROUTH et al., 2008;).

Figura 17: Representação esquemática do nucleossomo e modificações das histonas. As histonas são a base do nucleossomo, a unidade básica da estrutura da cromatina. O domínio do nucleossomo é composto por um octâmero de histonas [(H2A-H2B)×2, (H3-H4)×2]. A dupla hélice do DNA está assim envolta pelo octâmero.



FONTE: Site: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-18/18_21.jpg, acesso em 02/11/2016.

Em células que não estão em divisão, a cromatina pode ser dividida em dois padrões funcionais, eucromatina e heterocromatina (JENUWEIN, 2001; KOUZARIDES, 2007; ENCODE, 2007). A eucromatina é a região onde o DNA é acessível, apresentando-se em conformação aberta devido ao estado relaxado do arranjo do nucleossomo. As regiões genômicas da eucromatina são mais flexíveis, e contêm genes em estado transcripcional ativo ou inativo (JENUWEIN, 2001; ENCODE, 2007, KOCH, 2007). Por outro lado, as heterocromatinas são áreas onde o DNA é empacotado em uma forma bastante condensada de forma que se torna inacessível a fatores de transcrição ou a proteínas associadas à cromatina (JENUWEIN, 2001; HUANG et al., 2004; TALBERT et al., 2006) (Figura 17 e 18).

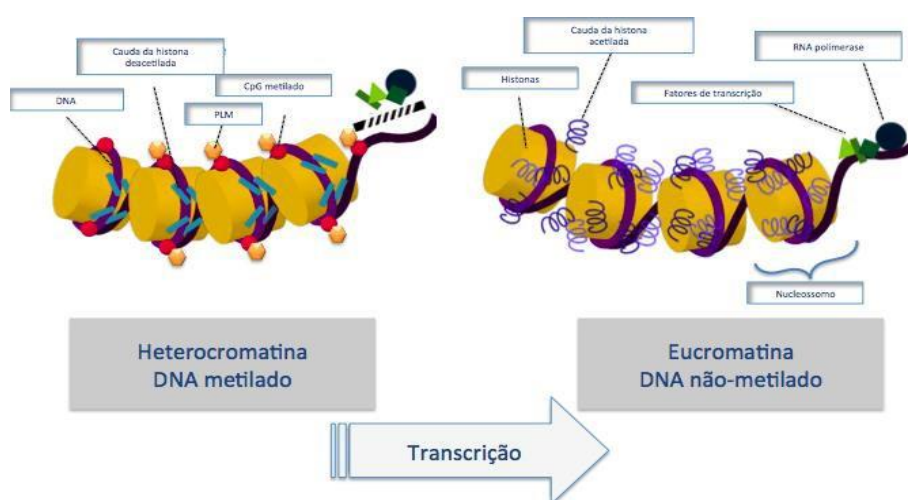
A heterocromatina além de ser o estado mais prevalente, apresenta funções importantes no controle da estabilidade cromossômica e prevenção de mutações e translocações (TALBERT et al., 2006; MUEGGE et al., 2005; HUANG et al., 2004). Da mesma forma, as regiões genômicas em seu interior são constituídas primariamente por genes silenciados relacionados à morfologia e diferenciação celular (FEINBERG et al., 2004; REIK, 2007).

A estrutura dinâmica da cromatina além de atuar no processo de empacotamento do DNA e de regular a informação genética, é responsável também pela ativação e função do genoma, influenciando assim o comportamento celular (JENUWEIN, 2001; KOUZARIDES, 2007; LI et al., 2007). O projeto ENCODE demonstrou que a conformação da cromatina, na qual o genoma é organizado em territórios “abertos” ou “fechados” representam, na verdade, domínios funcionais com diferentes padrões de marcadores epigenéticos. (ENCODE, 2007;

KOCH et al., 2007; AACR, 2008). Sua composição nos diversos estágios do ciclo celular, por exemplo, é regulada por mecanismos epigenéticos (AARON et al., 2007; RUTTENBURG et al., 2007; GROTH et al., 2007).

A cromatina é molécula chave para analisamos os principais mecanismos epigenéticos conhecidos, quais sejam, os microRNAs, a metilação do DNA e modificações das histonas (Figura 18). A associação desses com a deflagração e desenvolvimento de diversas doenças tem sido avaliada, dentre elas o câncer.

Figura 18: Estrutura da cromatina e controle epigenético. A heterocromatina, forma mais presente da cromatina, encontra-se mais condensada, dificultando acesso de fatores de transcrição e consequentemente expressão gênica. Com o DNA, envolto às estruturas das histonas, e metilado na região CpG através de proteínas ligantes do grupo metil (PLM), a heterocromatina mantém o estado de silenciamento gênico. Com a acetilação da cromatina, na topografia da cauda da histone, e o DNA não metilado, a cromatina, agora chamada eucromatina, encontra-se mais “frouxa” permitindo o acesso de fatores de transcrição e da RNA polimerase, por exemplo.



FONTE: Sítio <http://www.bioindians.org/tutorials/biology/genegenome.html>, box structure of DNA. Acesso em 03/11/2016.

2.3.3 Mecanismos Epigenéticos

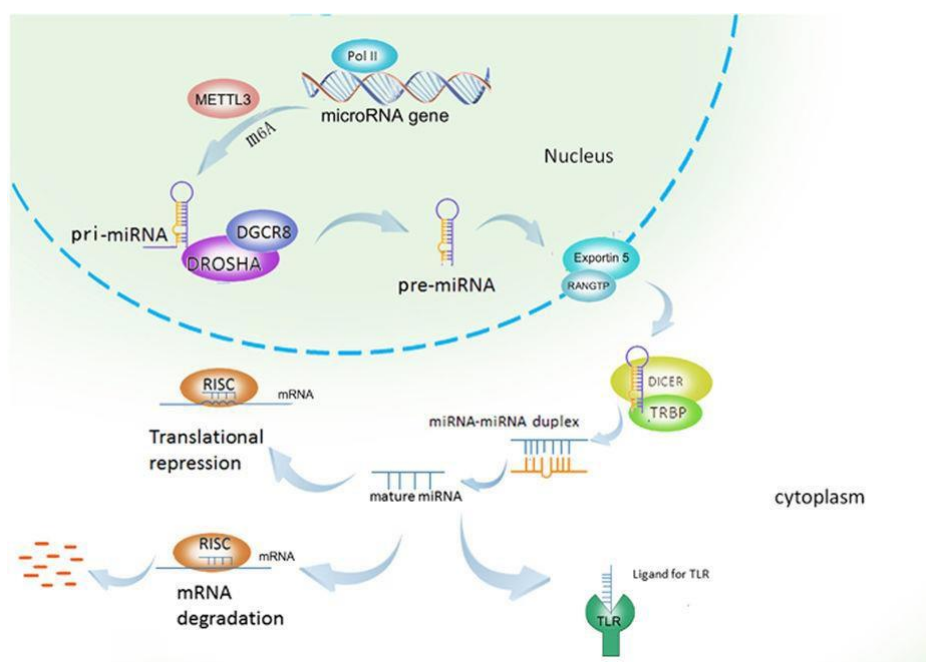
2.3.3.1 *microRNAs não codificantes - miRNA*

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes, cuja principal função é estabelecer e manter o estado diferenciado dos diversos tipos celulares. Estão ainda envolvidos na regulação de genes relacionados à proliferação celular e apoptose (BARTEL, 2004; BUSHATI et al., 2007; BRACKEN C. et al., 2016). Sua localização no genoma é variada, podendo estar em regiões intergênicas ou ainda em regiões intrônicas (KIM, 2005).

O controle da expressão do miRNA normalmente está associado a expressão do gene hospedeiro, onde ambos se encontram sujeitos à mesma região promotora e ainda leva a

degradação da sequência a qual ele se liga (RODRIGUEZ, 2004). Estando sujeito ao controle transcricional da RNA polimerase II, são produzidos a partir de um transcrito primário (pri-miRNA). Após um processo de clivagem do mesmo, formando duplas de miRNAs, onde uma delas atuará no processo de silenciamento pós transcricional, enquanto a outra é degradada (SCHOOF, 2011) (Figura 19).

Figura 19: Formação dos mRNAs. Os genes dos miRNA são transcritos pela RNA polymerase II, produzindo transcritos primários (pri-MRNAs) que são degradados por em estruturas proteicas formando os pre-miRNA no núcleo. São então transportados para o citoplasma e processados para uma dupla de miRNA/miRNA*. Após o desalinhamento da dupla, o miRNA maduro é incorporado em um complexo proteico, RISC, que media silenciamento gênico pela clivagem do mRNA e degradação ou repressão translacional dependendo da complementariedade entre o miRNA e o transcrito de mRNA alvo. Além disso, os miRNAs podem se ligar diretamente ao Toll-like receptor (TLR), deflagrando cascatas de sinalizações.



FONTE: Adaptado de Yong et al., 2016.

A expressão de miRNA em linhagens celulares, amostras teciduais e soro sanguíneo tem revelado alguns deles como possíveis biomarcadores no câncer gástrico (GUO et al., 2009; ZHU et al., 2012; SONG et al., 2012; SHRESTHA et al., 2014).

2.3.3.2 Metilação do DNA

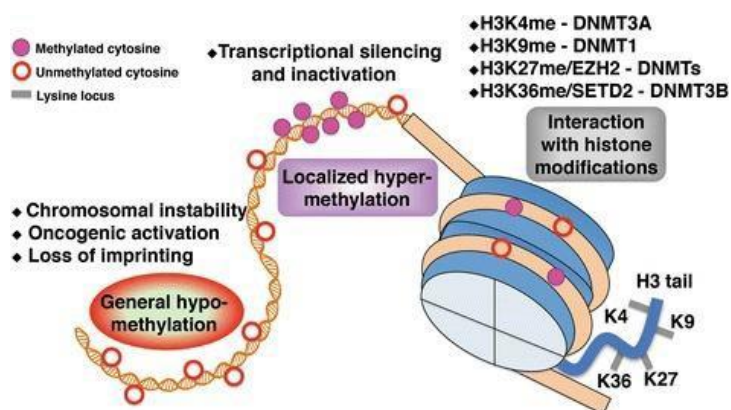
A metilação do DNA consiste em uma modificação química reversível da citosina na região promotora gênica do DNA – ilhas CpG, e catalisada pela enzima DNA metiltransferase. Tal processo, não altera a informação gênica, apenas modifica o arranjo do DNA, inativando o gene correspondente e seu transcrito, sendo o padrão de metilação herdável (TISCHOFF et al., 2006).

A metilação do DNA é um processo epigenético importante, regulando expressão gênica, *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X e gênese tumoral. DNMT1, DNMT3A e DNMT3B, tipos de DNA metiltransferases (DNMTs), participam do fenômeno da metilação (ZHANG et al., 2017) (Figura 20).

Desempenha função importante em etapas do controle celular, como desenvolvimento embrionário, transcrição e inativação do cromossomo X (ROBERTSON, 2005).

Em geral, a metilação da região CpG está associada ao silenciamento gênico. Sabe-se que 94% das ilhas CpG em condições normais não são encontradas na forma metilada e que a região promotora uma vez metilada recruta deacetilases de histonas e outros fatores envolvidos no silenciamento gênico (HIRST et al., 2009).

Figure 20: DNMTs e gênese tumoral. Geralmente o genoma de uma célula tumoral, como um todo, é hipometilado com regiões de hipermetilação. Epigenetic alterations involving DNMTs in tumorigenesis. Alterações epigenéticas envolvendo DNMTs e as histonas metiltransferase, como por exemplo, EZH2 e SETD2, participa ativamente de modificações epigenéticas



FONTE: Adaptado de ZHANG et al., 2017.



Em células tumorais, esse processo pode desenvolver em espectros diferentes, desde uma hipometilação global do genoma (FAN, 2004), até hipermetilação localizada. É descrita a ocorrência de uma relação direta entre hipometilação e progressão de uma determinada lesão de fenótipo benigno para o maligno (NAKAJIMA et al., 2008; HIRST et al., 2009). No entanto, um aumento na instabilidade genômica, com promoção de deleções, translocações e instabilidade cromossômica são mecanismos que a partir dos quais a hipometilação do DNA pode induzir à transformação maligna (HIRST et al., 2009).

Por outro lado, hipermetilação localizada, tipicamente em genes de supressão tumoral, induz sua inativação. Dessa forma, a perda do controle supressivo tumoral, induz a proliferação celular contínua, constituindo um dos eventos mais importantes da carcinogênese (HIRST et al., 2009).

Além disso, a hipermetilação das ilhas CpG também é responsável pelo silenciamento de miRNAs em células tumorais. Esses, como dito, constituem regiões de RNA não codificante que regulam etapas de proliferação celular, apoptose e diferenciação (CHEN, 2005; CALIN et al., 2006;).

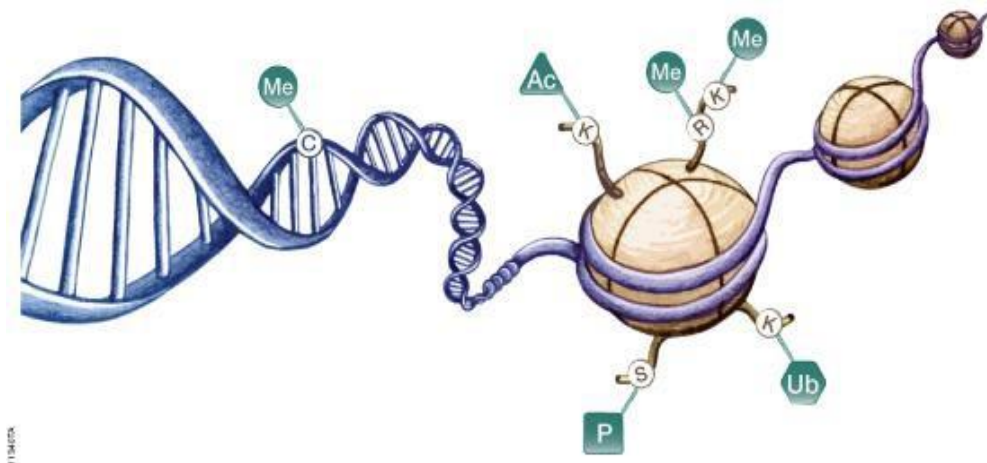
Alguns exemplos de genes participantes da tumorigênese por silenciamento epigenético são aqueles envolvidos: i. na regulação do ciclo celular (p16NK4a, p15INK4b e p14ARF); ii. no reparo do DNA [human mutL homolog 1 (hMLH1) e methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)]; na adesão celular (E-cadherin, H-cadherin e adenomatous polyposis coli); apoptose [death-associated protein kinase (DAPK), e angiogênese [thrombospondin-1 (THBS-1) e p73] (Fan, 2004).

A avaliação epigenética do genoma demonstra que as regiões de cromatina ativas estão acetiladas pelas histonas com DNA hipometilado, enquanto histonas metiladas associadas com cromatina inativa e DNA metilado estão presentes em regiões supressoras (ZHANG et al., 2017).

2.3.3.3 Modificações das histonas

As histonas constituem proteínas que possuem uma cauda amino-terminal e um domínio que media sua interação com o nucleossomo (HIRST, 2009). Essa região pode sofrer diversas modificações pós-translacionais como metilação, acetilação, forforilação, ribosilação, ubiquitinação, sumoilação, carbonilação e glicosilação (Figura 19) (HIRST, 2009; MULERO-NAVARRO et al., 2008; HINSHELWOOD et al., 2008) (Figura 21).

Figura 21. Mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação da expressão gênica. Resíduos e citosina do DNA podem ser metilados, e resíduos de lisina e arginina das histonas podem sofrer modificações, quais sejam: Me= metilação, Ac=acetilação, P=fosforilação e Ub=ubiquitinação.



FONTE: Sítio <https://www.promega.com.br/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/epigenetics/>. Acesso em 02/11/2016.

Em células normais, um balanço preciso mantém as moléculas do nucleossomo/DNA na sua forma ativa/acetilada ou na forma inativa/deacetilada. Esse equilíbrio adequado é controlado por enzimas acetilantes ([histona acetiltransferases (HATs)] e deacetilantes [histona deacetilases (HDACs)]. As outras modificações como metilação do resíduo arginina e lisina das histonas são catalisadas pelas enzimas histona metiltransferase (HMT) e a depender da região envolvida pode acarretar silenciamento ou ativação gênica da mesma forma (MULERO-NAVARRO et al., 2008; TAKASHI et al., 2011) (Figura 22).

A acetilação dos resíduos de lisina das histonas 3 e 4 tem sido um dos processos mais estudados de modificações pós-translacionais. O nível de acetilação é resultado do balanço das atividades das enzimas histona acetiltransferase (HAT) e das histonas deacetilases (HDAC). Tal fenômeno desempenha papel importante no remodelamento da cromatina e na regulação da transcrição gênica (ROPERO et al., 2007). A presença de lisina acetilada na cauda das histonas está associada a um estado de cromatina relaxada e, por conseguinte, maior exposição e ativação da transcrição gênica. A deacetilação dos resíduos de lisina está associada, por outro lado, a uma cromatina mais condensada e, consequentemente, menor exposição e silenciamento gênico (JOHNSTONE, 2002; IIZUKA et al., 2003).

É sabido que a interação entre a carga positiva das histonas e a carga negativa da molécula do DNA é o mecanismo químico subjacente que proporciona o empacotamento da cromatina. A remoção de grupo acetil das histonas aumenta essa interação, tornando-a mais

compacta. Uma vez compactada, a transcrição gênica é limitada ao se impedir o acesso de fatores de transcrição como E2f, Stat3, p53, pRb, NF- κ B, TFIIE (POLO et al., 2005; VIDANES et al., 2005; LIN et al., 2006) (Figura 22).

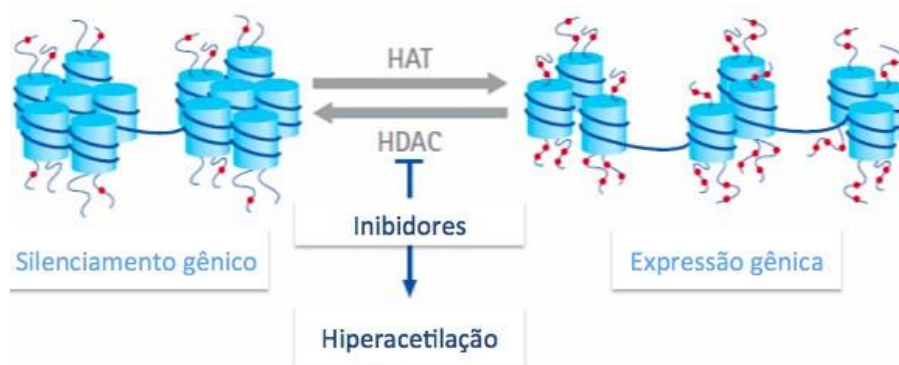
Modificações das histonas decorrentes ou não do processo de metilação da região CpG podem também participar do desenvolvimento tumoral, estando envolvidas em etapas de replicação e reparo do DNA além de condensação da cromatina (HIST, 2009).

Convém frisar que as HDACs não estão só envolvidas na regulação da cromatina, mas também de proteínas ditas não-histonas. Essas regulam importantes funções da homeostase celular como ciclo celular, diferenciação e apoptose (MINUCCI et al., 2006).

Cerca de dezoito HDACs tem sido identificadas e podem ser subdivididas de acordo com suas respectivas homólogas em leveduras. Assim, tem-se a de classe I, que inclui HDACs 1, 2, 3, e 8, e apresenta localização nuclear. As de classe II, que se subdivide em IIa (HDAC 4, 7, e 9) e IIb (HDAC 6 e 10). Essas apresentam localização nuclear e citoplasmática, o que sugere que devem estar envolvidas na acetilação de proteínas não histonas. É descrita ainda a HDAC1, homóloga às de classe I e II.

As HDACs de classe III, ou sirtuínas, inclui uma família composta por sete membros (SIRT1-7), que são homólogas a SIRT2 de leveduras (ROPERO et al., 2007).

Figura 22: Acetilação e deacetilação das histonas e relação com silenciamento ou expressão gênica. Esquema demonstrando processo de acetilação e deacetilação das histonas, como mecanismos epigenéticos. Uma vez catalisada pelas histonas acetilases (HAT) um grupo acetil é incorporado á molécula da proteína, fazendo com que a cromatina fique mais relaxada, permitindo assim o acesso de fatores transcrpcionais e a expressão gênica. Do contrário, uma histona deacetilase (HDAC) atua removendo o grupo acetil, tornando a cromatina mais compactada, permitindo assim o silenciamento gênico. Inibidores da HDAC atuam favorecendo estado de hiperacetilação e apoptose.





2.3.4 Sirtuínas como um tipo de histona deacetilase

Nas últimas décadas, classes de proteínas com atividade enzimática têm sido estudada na oncogênese de algumas neoplasias. A família das Sirtuínas é uma delas. O primeiro membro dessa família, o Sir2p de leveduras, foi originalmente identificado em *Saccharomyces cerevisiae* (SHORE, 1984). No entanto, estão presentes desde bactérias até em humanos (VAQUERO, 2009). Apresentam ainda, sete isoformas com localização, atividade e funções distintas (MISHICITA, 2005; HAIGIS, 2006; SAUNDERS, 2007; VAQUERO, 2007) (Quadro 2).

Quadro 2: Atividade e localização de cada sirtuína. Adaptado de He et al., 2012.

Sirtuína	Atividade	Localização
SIRT1	Deacetilase	Núcleo e Citoplasma
SIRT2	Deacetilase	Citoplasma
SIRT3	Deacetilase ADP-ribosil transferase	Mitocôndria
SIRT4	ADP-ribosil transferase	Mitocôndria
SIRT5	Deacetilase	Mitocôndria
SIRT6	ADP-ribosil transferase	Núcleo
SIRT7	Deacetilase	Nucléolo

Diferem ainda em suas especificidade e atividade catalítica. Os sete membros das sirtuínas (denominado SIRT1-7) compartilham um domínio do núcleo catalítico conservado. Apesar desta homologia, as sirtuínas têm atividades enzimáticas divergentes com SIRT1-3 e SIRT7 atuando principalmente como lisina deacetilases, SIRT4 como adeno-sinediphospho (ADP) - ribosiltransferase, SIRT5 como deacetilase e desacetilase e SIRT6 como ADP-ribosiltransferase e deacetilase. Além disso, a localização primária destas proteínas na célula varia significativamente, refletindo a distinção funcional dos membros das sirtuínas (ROTH, 2013).

Algumas sirtuínas, como SIRT2 e SIRT6, parecem funcionar como supressores de tumor, mas outros, como SIRT1, são aparentemente bifuncional: operam ora como supressores tumorais e ora oncogênicos, dependendo do contexto e das condições de estudo. Os mecanismos subjacentes a essas atividades, aparentemente contraditórios, não são bem

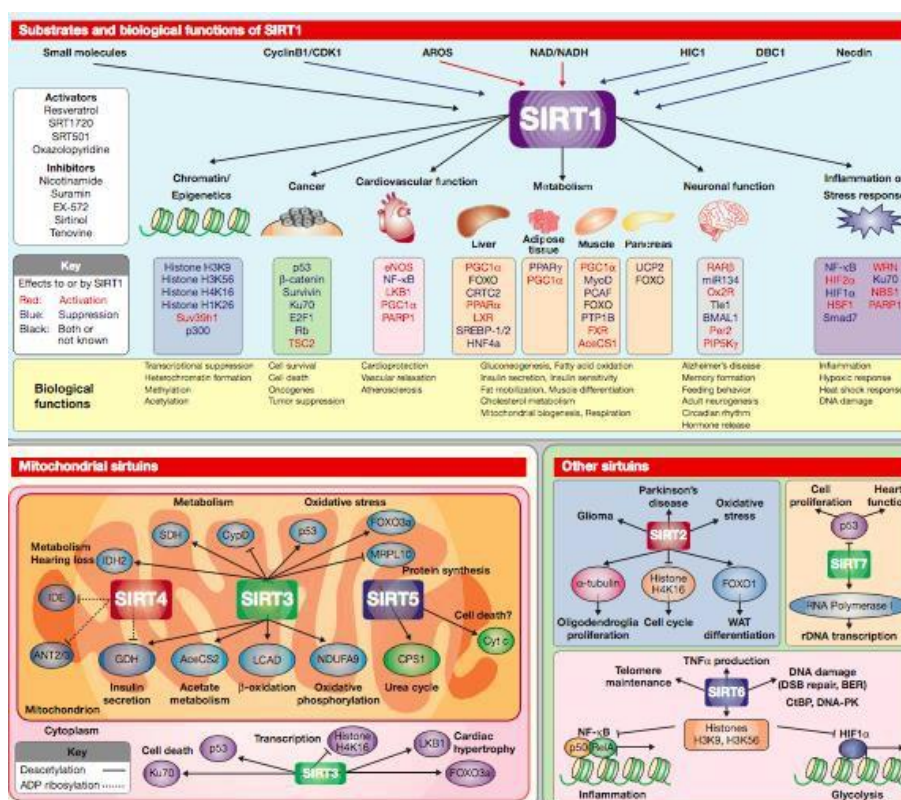


compreendidos, mas descobertas recentes sugerem que eles podem realmente apresentar esse dualismo funcional.

Embora algumas apresentem um amplo espectro de substratos proteicos sobre histonas e não histonas, algumas delas apresentam estritamente atividade de histona deacetilase, enquanto outras parecem ter como alvo proteínas não histonas (FRYE, 1999; FRYE, 2000; HAIGIS, 2006; VAQUERO, 2007; SAUNDERS, 2007).

Ao longo da última década, as sirtuínas, têm sido descritas como um dos principais atores na resposta metabólica ao stress ao atuarem como verdadeiros sensores da percepção e coordenação de resposta ao estresse. Detectam alterações do metabolismo (restrição calórica, jejum), regulando-o. Estudos iniciais em leveduras descrevem a isoforma 1 da sirtuína (SIRT1) como um agente promotor da estabilidade genômica e do aumento da sobrevivência celular. Por outro lado, a SIRT1 tem sido associada ao processo de envelhecimento, à plasticidade neural, memória, assim como a síndromes metabólicas, a processos inflamatórios, neurodegenerativos e a câncer (Figura 23). Evidências da literatura têm imputado as sirtuínas dos mamíferos no processo de carcinogênese, embora os mecanismos envolvidos parecem ser mais diversificados e complexos do que anteriormente previsto (NOGUCHI, 2013; STUNKEL, 2011).

Figura 23: Família das sirtuínas e funções. SIRT1 a SIRT 7, regulam a expressão de uma série de moléculas que participa de atividades em diversos órgãos, como coração, fígado, tecido adiposo, músculo, pâncreas e ainda resposta ao estresse, processos inflamatórios e câncer, como a SIRT 1. Além disso participa ativamente do processo de ativação ou desativação da cromatina atuando como uma histona deacetilase, permitindo assim a exposição do DNA a fatores de transcrição e consequentemente expressão ou silenciamento gênico. Nesse sentido, alguns ativadores ou inibidores das sirtuínas são descritos (parte superior da figura). Outras sirtuínas SIRT4, SIRT3 e SIRT5, de localização mitocondrial, da mesma forma da regulação de síntese de proteínas, estresse oxidativo, morte celular (parte inferior a esquerda). E, finalmente, as SIRT2, SIRT7 e SIRT6 têm implicações em processos inflamatórios, neurodegenerativos (doença de Parkinson), glicólise com a co-participação do HIF1- alfa, e gênese tumoral como o dos gliomas (parte inferior a direita).



FONTE: Adaptado de Takashi et al., 2011.

A deflagração e progressão do câncer em sentido amplo é um processo resultante de uma acumulação de alterações moleculares no genoma de células somáticas. As células tumorais possuem algumas características peculiares que incluem auto-suficiência para crescimento e insensibilidade à sinalização anti-crescimento, evasão do mecanismo de apoptose, angiogênese sustentada, potencial replicativo ilimitado, invasão tecidual e metástases (HANAHA, 2000).

Outras características relacionadas incluem desregulação da energia celular, instabilidade genômica e inflamação (HANAHA et al., 2011).



Estudos têm revelado que as sirtuínas devem desempenhar um papel importante nesses processos. Porém, essas proteínas exibem uma dualidade de funções também na carcinogênese. O entendimento desses mecanismos é uma etapa fundamental para o desenvolvimento de drogas antineoplásicas baseada em sirtuínas.

No entanto, os estudos que avaliam a função da SIRT1 no câncer são escassos e contraditórios, alguns sugerindo um papel ora promotor ora de supressor tumoral (TURKI, 2013).

A expressão de SIRT1 é variável e está elevada em certos tumores (próstata, carcinoma hepatocelular, mama, ovário, gástrico, colorretal e melanoma) e de diminuída em outros (bexiga, cólon, glioblastoma, ovário e próstata), (STUNKEL, 2011)

In vivo, a presença ou ausência de certas mutações no tecido tumoral pode participar da determinação da função da SIRT1. Além disso, a SIRT1 pode proteger a célula de uma transformação oncogênica ou, por outro lado, a via de sinalização da SIRT1 pode participar da promoção do crescimento tumoral. Dessa forma, infere-se que a função da SIRT1 é contexto dependente (STUNKEL, 2011).

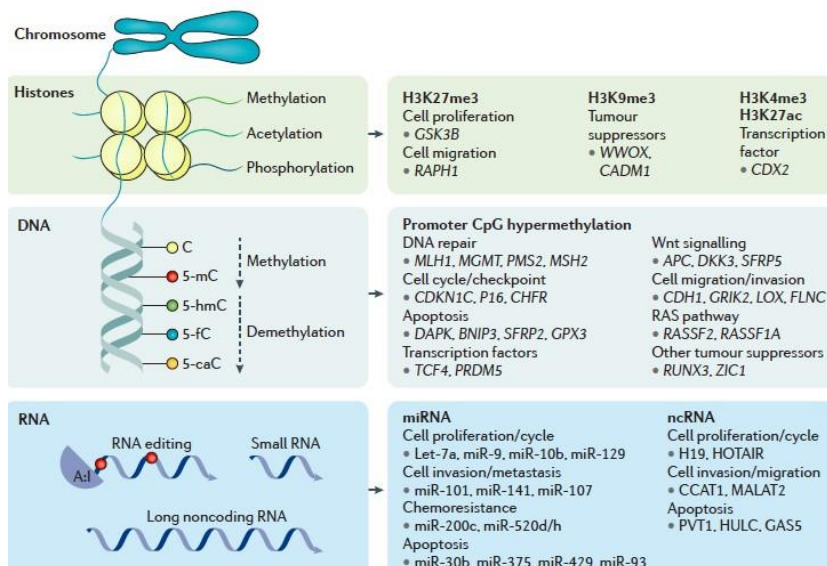
2.3.5 Alterações epigenéticas no câncer gástrico

Apesar da maior parte dos estudos moleculares em CG avaliarem mutações em proto-oncogenes ou genes de supressão tumoral (THACKER, 2005; KIM et al, 2008; MANCINO et al., 2008), mais recentemente alguns biomarcadores associados a mecanismos de epigenética têm sido identificados nesse sentido (FORN et al., 2015; BAE et al., 2015; NG et al., 2015). É sabido que se por um lado quase metade dos genes de supressão tumoral estão envolvidos em câncer de origem familiar, por outro lado a inativação por hipermetilação da região promotora pode estar associado a câncer esporádico (HINSHELWOOD et al., 2008).

Como discutido anteriormente, a classificação molecular dos CGs (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014), a depender do subtipo tumoral pode apresentar diferentes espectros de hipermetilação das ilhas CpG, chamada de CIMP - CpG island methylator phenotype (CIMP). Os tumores desse grupo apresentam alto índice de metilação em detrimento de outros subtipos (FAN, 2004).

Outros estudos como An et al em 2005 demonstraram que a hipermetilação de genes promotores está associada a um subtipo molecular de CG, MSI (AN et al., 2005), ou que a metilação de múltiplos genes, estava relacionada a aumento de sobrevida, porém sem apresentar impacto no prognóstico como fator independente (PANANI, 2008).

Figura 24: Epigenética e cancer gástrico, biomarcadores. Fenômenos epigenéticos e respectivas alterações no epigenoma gástrico relacionados à carcinogênese. A, adenosina; C, citosina; 5-caC, 5-carboxicitosina; 5-fC, 5-formilcitocina; 5-hmC, 5-hidroximetilcitocina; I, inosina; 5-mC, 5-metilcitosina; miRNA, microRNA; ncRNA, RNA não codificador



FONTE: Adaptado de NISHA et al., 2017.

Uma série de genes silenciados ou ativados através de mecanismos epigenéticos têm sido identificados como possíveis marcadores moleculares de detecção precoce, ou de desenvolvimento e progressão do câncer (Figura 24).

Faz parte do escopo dessa tese, uma revisão da literatura dos estudos que avaliaram o papel de um dos mecanismos epigenéticos envolvidos na carcinogênese gástrica. Até o momento não há dados que avaliem a expressão de sirtuínas e de fatores oxidativos, e sua associação com fatores clínicos e patológicos no câncer gástrico. Ou ainda, se esses exercem alguma influência na sua patogênese, sobretudo em ocidentais, ainda é um dado incerto.



3 OBJETIVOS

- Realização de uma revisão da literatura dos estudos que avaliaram a associação da epigenética no CG, porém mais especificamente no que concerne ao tema sirtuínas e CG (Capítulo 1).
- Avaliar o papel das sirtuínas na oncogênese gástrica e sua associação com biomarcadores oxidativos em pacientes com câncer gástrico submetidos a tratamento cirúrgico no Hospital das Clínicas da UFPE (Capítulo 2).



4 CAPÍTULO I

Revisão da literatura: câncer gástrico e sirtuínas

Introdução

Embora a incidência do câncer gástrico tenha diminuído nos últimos vinte anos em países mais industrializados, ainda representa a segunda causa de morte por câncer no mundo. Com incidência alta no Japão, Korea, China e leste Europeu, em países como os Estados Unidos a incidência é considerada (BICKENBACH et al., 2012).

Alterações genéticas e epigenéticas têm sido estudadas como mecanismos participantes do processo carcinogênico. Modificações genéticas do epigenoma podem contribuir para a transformação maligna como um mecanismo epigenético além de causar mutações em oncogenes ou genes de reparo de DNA. Essa interação entre genoma e epigenoma pode oferecer novas oportunidades de tratamento do câncer (SADIKOVIC et al., 2008; TALLEN AND RIABOWOL, 2014).

Alterações epigenéticas ocorrem independente da sequência de DNA e incluem expressão de miRNA não codificantes, metilação de DNA, modificações das histonas. Uma vez que podem ser reversíveis (BLAIR et al., 2012), estudos clínicos que busquem um marcador que permita conhecer melhor a patogênese da doença bem como o desenvolvimento de novas drogas para um melhor controle da neoplasia é imperioso.

Dentre as modificações das histonas, a acetilação e a deacetilação é um tema de grande importância na regulação da expressão gênica em várias doenças dentre elas o câncer (ROPERO et al., 2007).

Há mais de uma década, as sirtuínas foram descobertas como uma enzima NAD dependente e cuja primeira função descrita foi a de prolongar a sobrevivência em organismos inferiores. Em mamíferos, atuam como reguladores de respostas oxidativas e metabólicas influenciando uma série de patologias, dentre elas o câncer (MARTINEZ-PASTOR et al., 2012). No câncer gástrico seu papel é pouco definido e poucos artigos na literatura têm colocado em questão sua influência na gênese, propagação e prognóstico dos pacientes.



Metodologia

Objetivo primário foi realizar uma análise de dados de ensaios selecionados em uma revisão da literatura sobre estudos em pesquisa básica e clínica entre a associação câncer gástrico e sirtuínas.

Eligibilidade

- Critérios de inclusão dos estudos:
 - Estudos selecionados em uma revisão da literatura a nível de pesquisa básica e clínicos versando sobre a associação câncer gástrico e sirtuínas. Os estudos deveriam ser:
 - artigos originais;
 - em língua Inglesa, porém em qualquer país de origem;

Critérios de exclusão dos estudos

- Artigos de revisão;
- Língua não inglesa.

Identificação dos Estudos (*electronic database search*)

Os descritores foram selecionados por uma base de dados identificadas através de um sistema de metadados médicos em língua inglesa que se apoia em questões da nomenclatura e baseia-se na indexação de artigos no campo das ciências da saúde, o MeSH (*Medical Subject Headings*). Tal sistema se baseia na plataforma do PubMed. Além desse, utilizados a base da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Foram incluídos todos os sinônimos separados pelo termo “AND”, como descrito abaixo:^[1] “*Epigenetic AND Gastric Cancer, Epigenetic AND Gastric Cancer AND Histones, Gastric Cancer AND Histones, Gastric Cancer AND Sirtuins*” – Sítio MeSH, PubMed e CAPES. Acesso em 15/01/2018.

A busca contemplou os artigos publicados nos últimos 10 anos. Na base CAPES e “*Pubmed*” foram encontrados ao final 32 resultados com os termos *Gastric Cancer AND Sirtuins*”; uma nova exclusão foi realizada por apresentaram ainda artigos de revisão, resultado para análise de dados final 26 artigos.



Seleção dos Estudos

Os estudos foram selecionados a partir dos descritores acima mencionados, nas duas plataformas de busca, sendo excluídos aqueles em duplicats, além dos estudos de revisão e os que não se enquadravam nos critérios de inclusão

Resultados

Após uma busca inicial nos bancos de dados da CAPES e Medline, com os descritores *Epigenetic AND Gastric Cancer* plataforma, encontramos 1602 e 876 artigos, respectivamente, totalizando 2478, no período de 2008 a 2018. Desses, excluímos 382 artigos repetidos. Dos 2096 restantes, fizemos uma nova busca, agora com os descritores *Epigenetic AND Gastric Cancer AND Histones*, e detectamos 147 artigos. Desses, 95 foram excluídos por não serem artigos originais ou incluírem como mecanismos epigenéticos apenas metilação, sem associação com histonas especificamente. Dos 52 restantes, 21 ainda foram excluídos por não fazerem referência a sirtuínas. E uma última exclusão de 8 artigos, por não serem originais, mas sim de revisão apenas. Assim, dentre um total de 31, restaram para análise final 23 artigos (Figura 1).

Em primeira análise, os estudos que versavam sobre sirtuínas e CG totalizaram 23, oriundos de países orientais com resultados acerca de prognóstico favorável em 39% ou desfavorável em 44.4%.

Dos artigos incluídos para a análise, dezoito deles (78.3%) eram trabalhos desenvolvidos na China, outros dois (8.7%), realizados no Japão, e em Taiwan e Korea, um estudo em cada país. Apenas 1 havia sido realizado na Grã-Bretanha (4.34%).

Vale ressaltar que esse único trabalho oriundo do mundo ocidental objetivou a busca de uma assinatura de vários genes que apresentassem impacto com o desfecho sobrevida dentre 42 mil genes avaliados, sendo um deles era o da SIRT1.

Todos os 23 artigos haviam sido publicados no período de 2009 a 2017, e os membros da família das sirtuínas estudados foram Sirtuína 1 em 73.4%, Sirtuína 3 em 17%, Sirtuína 4 e Sirtuína 2 em 4.34% dos casos, cada (Quadro 1).

Em 13 artigos (56.5%) a molécula analisada foi a proteína, sobretudo por imunohistoquímica e 11 (47.8%) dos 23 artigos incluíram apenas material biológico oriundo de pacientes. O restante utilizou cultura de associado ou não a fragmentos tumorais humanos ou ainda modelo animal isoladamente.

Das séries que analisaram material de humanos, o que recrutou maior número de pacientes foi o publicado por Kang et al. em 2012. De 452 amostras tumorais de paciente avaliados, a



expressão de SIRT1 foi associada a baixo grau histológico, subtipo intestinal e menor volume tumoral pT ($p < 0.001$) e linfonodal pN (SIRT1, $p < 0.001$). Ainda, a associação entre ausência de invasão linfática e SIRT1 também foi observada ($p = 0.001$). Os autores concluem que SIRT1 pode ser considerada um fator de bom prognóstico em adenocarcinoma gástrico naquela população avaliada (KANG et al., 2012).

A análise da expressão entre o nível da molécula estudada e o prognóstico associado revelou dados bastante discrepantes. Em 3 estudos (LU et al., 2014; HIRAI et al., 2014 e YANG et al., 2013, só se avaliou o prognóstico entre favorável ou desfavorável, 2 e 1, respectivamente, sem fazer associação com nível de expressão de sirtuínas.

Se analisarmos a expressão de determinada sirtuína com o desfecho favorável ou desfavorável, detectamos que em 8 deles houve uma associação benéfica (34.8%), e em contrapartida em 15 estudos (65.2%) essa associação foi deletéria (Figura 2).

Figura 1: Fluxograma de seleção de trabalhos a partir plataformas de bancos de dados. Plataformas – CAPES e PubMed, publicados na literatura, para seleção e análise de dados daqueles que versavam câncer gástrico e sirtuínas.

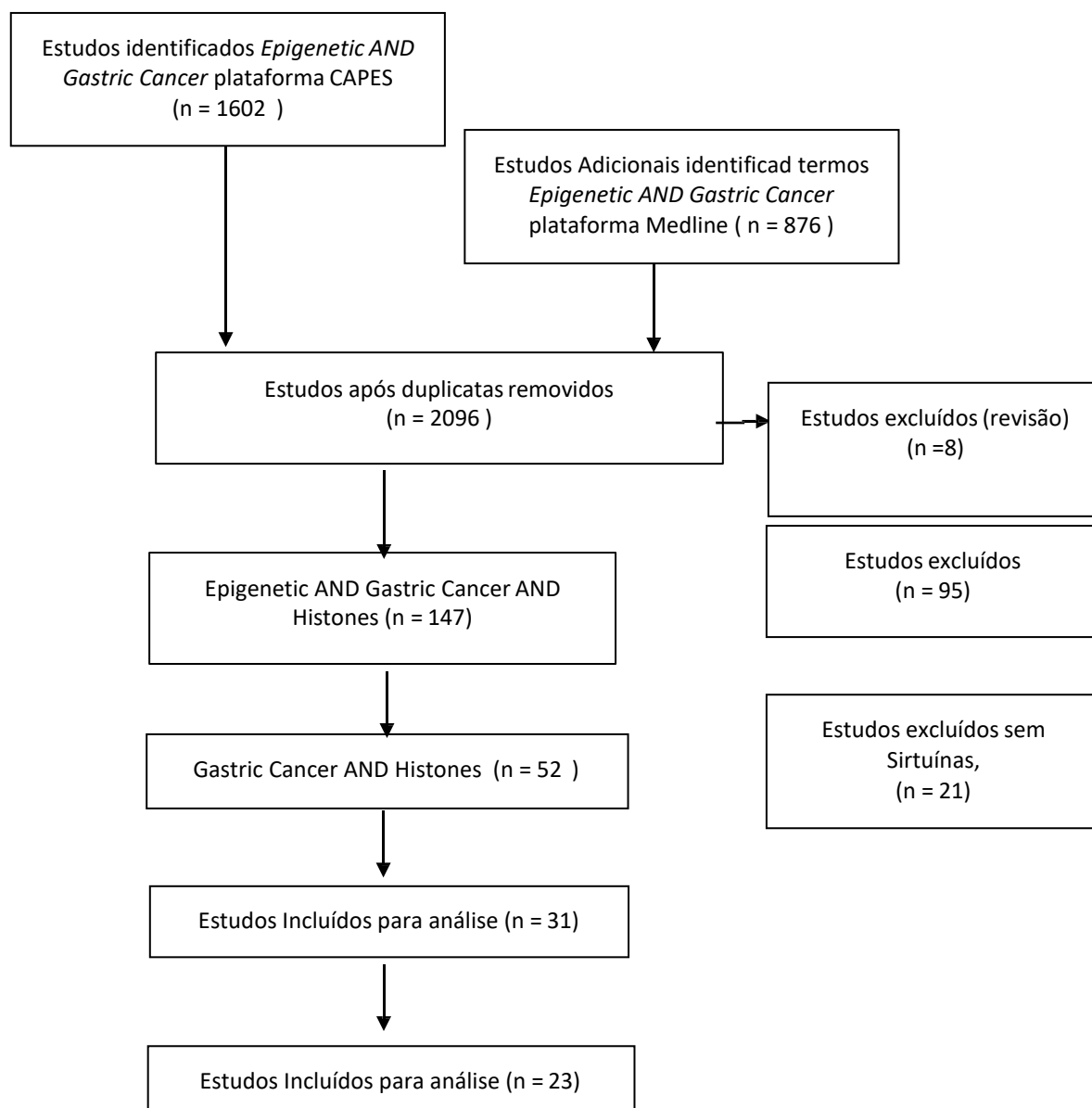
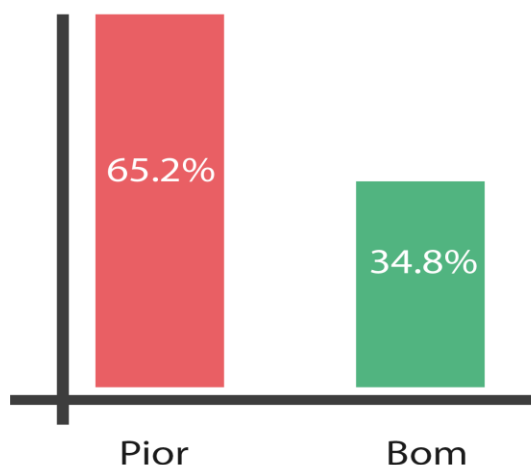


Figura 2: Gráfico de associação entre expressão de sirtuínas e prognóstico. Em termos percentuais e desfecho favorável (bom) ou desfavorável (pior).



Discussão

O câncer gástrico continua sendo um dos grandes desafios em termos de saúde pública. Apesar de em algumas regiões sua incidência tem diminuindo, ainda continua a provocar milhares de mortes em todo o mundo (GLOBOCAN 2012; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER 2016).

Além disso, trata-se de uma neoplasia com comportamento clínico bastante heterogêneo em termos de variações fenotípicas inter-individual e genotípica. O conhecimento de mecanismos envolvidos na sua etiologia, patogênese e progressão através da busca de possíveis vias de sinalização e biomarcadores deve ser fonte de pesquisa contínua.

A epigenética e os mecanismos nela envolvidos é uma área de conhecimento, pelo menos em sua aplicabilidade clínica, relativamente recente. E sua participação em várias etapas do desenvolvimento de uma série de doenças vem mobilizando todo o mundo. No câncer, a situação se reveste ainda mais importância tendo em vista se tratar de uma doença desafiadora, que juntamente com outras doenças degenerativas podem ter um componente tanto genético quanto epigenético associados.

Nessa revisão da literatura, analisamos um dos mecanismos epigenéticos conhecidos, o da modificação das histonas, e, dentre elas o processo de deacetilação. Nesse sentido, a deacetilase pesquisada foi a sirtuína.

Como primeiro ponto a ser discutido, ressaltamos quão escassa é a literatura sobre a questão. E mais, detectamos ainda a completa ausência de dados acerca de estudos em uma população ocidental, sendo o artigo original que é parte integrante dessa tese, o primeiro a analisar especificamente esse ponto em um país do ocidente.



Dados da literatura indicam comportamentos biológicos e fenotípicos bastante heterogêneo se analisarmos diversos tipos de tumor em regiões diferentes do mundo, sobretudo entre asiáticos e não asiáticos. Como exemplo podemos citar o hepatocarcinoma (CHOO et al., 2016), câncer de pulmão (ZHOU et al., 2011) e câncer gástrico (YAMAMOTO et al., 2015).

Essa heterogeneidade se verifica desde dados epidemiológicos, de etiologia, de mecanismos genéticos e mais recentemente epigenéticos envolvidos, além de resposta e de toxicidade ao tratamento e prognóstico.

Assim, é de fundamental importância a realização de estudos com populações de origens distintas para avaliar se a raça ou a região demográfica ou até mudanças de habitação tornam os indivíduos mais ou menos susceptíveis a determinadas neoplasias ou os pacientes já com neoplasia diagnosticada, se apresentam diferenças significativas que determinem individualizar seus manejos clínicos.

Conclusão

Os estudos da literatura até o momento publicados acerca da associação entre câncer gástrico e sirtuínas são bastante escassos, seus resultados são conflitantes, sendo 95.8% deles oriundos do mundo oriental. Fazem-se necessários estudos em populações diversas para detectar eventuais diferenças que possam ter impacto no prognóstico desses pacientes.



Quadro 1. Apresentação dos estudos em câncer gástrico e sirtuína acesso em 15/01/2018

Autor	País	Ano	Sirtuína Membro	Molécula Analisada	Material CC/P(n)/MA	Expressão Nível	Prognóstico / desfecho
Chen HY	China	2017	SIRT 1	Proteína	CC	baixo	Apoptose induzida por oxaliplatona
Zhang S	China	2017	SIRT 1	miR132	CC	Alta	Pior
Zang et al	China	2017	SIRT 1	miR-132	CC	na	Pior (resistência a cisplatina)
Qiu G	China	2016	SIRT 1	Proteína	P	Alta	Pior
Wang F	China	2016	SIRT 1	mRNA	CC	Alta	Bom
Li et al	China	2016	SIRT 1	miR-543	CC/P	Alta	Bom
Wang et al	China	2015	SIRT 3	mRNA e proteína	CC	Alta	Bom
Cui et al	China	2015	SIRT 3	proteína	CC	Alta	Pior
Huang et al	China	2015	SIRT 4	proteína	P	Baixo	Pior
Lu et al	China	2014	SIRT 1	mRNA	CC	na	Bom
Noguchi et al	Japan	2014	SIRT 1	proteína	P	Alta	Pior
Hirai et al	Japão	2014	SIRT 1	---	CC	---	Pior
Huang et al	Taiwan	2014	SIRT 3	proteína	P (221)	Alta	Bom
Yang et al	China	2014	SIRT 3	mRNA e proteína	P (65)	baixa	pior
Yang et al	China	2013	SIRT 1	---	CC/MA	---	Bom
Yang et al	China	2013	SIRT 1	mRNA e proteína	P	Baixa	Pior
Zhang et al	China	2013	SIRT 1	proteína	P (176)	Alta	Pior
Li et al	China	2013	SIRT 1	proteína	MA	Alta	Pior
Zhang et al	China	2013	SIRT 1	miR204	CC	Baixo	Pior
Kang et al	China	2012	SIRT 1	proteína	P (452)	Alta	Bom
Feng et al	China	2011	SIRT 1	proteína	P (176)	Alta	Pior
Peters et al	GB	2010	SIRT 2	Seq/Ass gênico	75 (CE/CG)	Alta	Bom
Cha et al	Korea	2009	SIRT 1	proteína	P (177)	Alta	Pior

Estudos sobre a associação de câncer gástrico e sirtuínas. Legenda: GB, Grã-Bretanha; SIRT 1, Sirtuína 1; SIRT 3, Sirtuína 3; miR, microRNA; mRNA, RNA mensageiro; Seq/Ass, sequenciamento/assinatura gênica; CC, cultura de células; P(n), pacientes (número de pacientes avaliados); MA, Modelo animal; na, não avaliado; CE/CG, Câncer de esôfago/Câncer gástrico).



5 CAPÍTULO II

Estudo Original

Epigenética e Câncer Gástrico: Papel das sirtuínas na oncogênese e sua associação com biomarcadores oxidativos

Objetivos

Primário

- Avaliar o padrão de expressão da SIRT1 e SIRT3 em pacientes com câncer gástrico e comparar com aqueles sem neoplasia maligna;
- Avaliar o padrão de expressão *do peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha* (PGC-1 alpha) e do *hypoxia-inducible factor-1 alpha* (HIF-1 alpha), como fatores oxidativos em pacientes com câncer gástrico e comparar com aqueles sem neoplasia maligna através de reação de cadeia de polimerase ou *in real time* e imunofluorescência.

Secundário

- Relacionar a expressão da SIRT1, SIRT3, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha* (PGC-1 alpha) e do *hypoxia-inducible factor-1 alpha* (HIF-1 alpha) com variáveis clínico e patológicas.

Metodologia

Eligibilidade

Crítérios de Inclusão

1. Pacientes de qualquer idade;
2. Grupo controle: pacientes submetidos a gastrectomia redutora de peso com diagnostico histológico de mucosa gástrica normal
3. Grupo experimental: Pacientes com diagnostico histológico confirmado de adenocarcinoma de estômago ou do terço inferior do esôfago em estágio submetidos a gastrectomia.



Amostras

Fragmentos de tecido gástrico foram obtidos através de biópsias parafinadas do banco de tumores do serviço de patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco de diagnosticados com câncer gástrico subtipo adenocarcinoma e para o braço controle mucosa gástrica de pacientes sem neoplasia maligna. O diagnóstico de adenocarcinoma gástrico foi baseado em histopatologia. O presente estudo foi submetido para análise e aprovação do comitê de ética Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Histologia e imunofluorescência

Tecidos para exame microscópico foram fixados por imersão por 18h em 10% de tampão fosfato de formalina e depois processadas para obtenção de blocos de parafina. Lâminas com sessões de 5 um forão cortadas e coradas com hematoxilina e eosina. Para análises de imunofluorescência, lâminas com sessões de parafina foram desparafinizadas e pré-aquecidas com antígeno-retrieval (DAKO). Os tecidos foram incubados durante 1 h à temperatura ambiente, com anticorpo primário seguido de incubação com anticorpo secundário por 30 min e coloração com DAPI por 10 min. Os anticorpos primários utilizados foram SIRT1, SIRT3, PGC1- alfa e HIF1- alfa. Os anticorpos secundários utilizados foram Alexa Fluor 594 anti-rato IgG (abcam) e Alexa Fluor 488 anti-coelho IgG (abcam).

Extração de RNA de blocos de parafina e PCR quantitativo em tempo real (Q-PCR)

O RNA total foi extraído de tecidos parafinizados usando o kit ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep System (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O transcrito obtido foi quantificado pelo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e transcrito através do kit Reverse Transcription (Qiagen). PCR quantitativo para PGC1- alfa e HIF1- alfa foi realizado em duplicata a partir de 25 ng de cDNA e primers específicos utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de ciclagem foram 50°C - 2 min, 95°C- 15 min, e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Os resultados foram representados graficamente como expressão relativa e os dados foram analisados estatisticamente pelo teste T de Student.



Análise Estatística

Para os objetivos propostos consideramos: rever

- i. Razões de risco foram calculadas através do modelo de regressão de Cox. As variáveis categóricas serão comparadas com o uso de teste do qui-quadrado. As medidas tumorais foram comparadas com o uso do teste não paramétrico de Mann-Whitney.
- ii. Para a análise estatística da etapa molecular do estudo o melhor valor de corte para segregarmos pacientes em categorias (exemplo, considerados como alta ou baixa expressão do mRNA ou da proteína estudada) foi obtido por análise de curva ROC, com a melhor sensibilidade e especificidade para cada característica estudada.
- iii. Comparações entre médias foram efetuadas com o teste *t* pareado. Frequências foram comparadas com o teste exato de Fisher ou qui-quadrado, conforme o caso. Para correlacionar (medida de associação) variáveis discretas (como escore H, por exemplo), utilizamos a correlação de Spearman.
- iv. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$ para os testes bicaudados.
- v. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa MedCalc (MedCalc, Mariakerk, Bélgica), versão 9.3.2.0

Resultados

Os resultados dos experimentos também estão descritos na forma de artigo original submetido para publicação, constante no capítulo III, e que são destrinchadas a seguir.

Características clínicas e patológicas

As características clínicas e patológicas dos 64 pacientes com CG são resumidas na Tabela 1. Sessenta e quatro por cento dos pacientes eram do sexo masculino e a idade média era de 59,5 anos (faixa de 23 a 84 anos). Estes pacientes apresentaram nos estádios I e II de TNM em quase 30% dos casos, e no estágio III de TNM em aproximadamente 40% dos casos (quase 3% estavam no estágio IV e o estágio clínico não estava disponível para os demais pacientes). Quase 20% dos pacientes tinham de sete a 15 linfonodos envolvidos por metástase e cerca de um terço dos casos apresentava classificação histológica de 3 (pouco diferenciada).



Tabela 1. Achados demográficos e patológicos em tecidos sem neoplasia (controles) de indivíduos obesos submetidos a gastroplastia redutora e pacientes com câncer gástrico (CG).

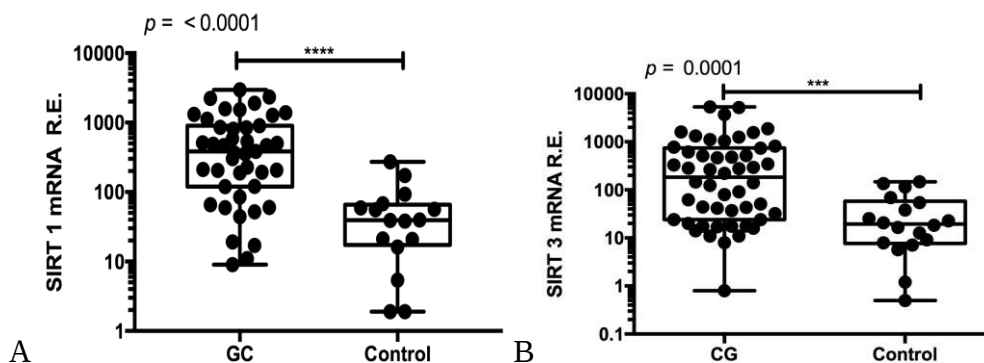
Características	Controle (n=18)	CG (n=64)
Idade mediana (extremos), anos	36 (21-60)	59.5 (23-84)
Homens/Mulheres (%)	18/82	64/36
Tumor characteristics		
Estagio, %		
I/II/III/IV	NA	9.8/20.8/41.7/2.8
Envolvimento linfonodal, %	NA	
0		20
1-2		14.3
3-6/		17.1
7-15		20
>15	NA	1.4
Grau Histológico, %	NA	
G1/G2/G3	NA	14.1/12.7/32.4

G1, G2, G3 = bem, moderadamente e mal diferenciado. NA = Não aplicável

Expressão de sirtuínas e fatores oxidativos

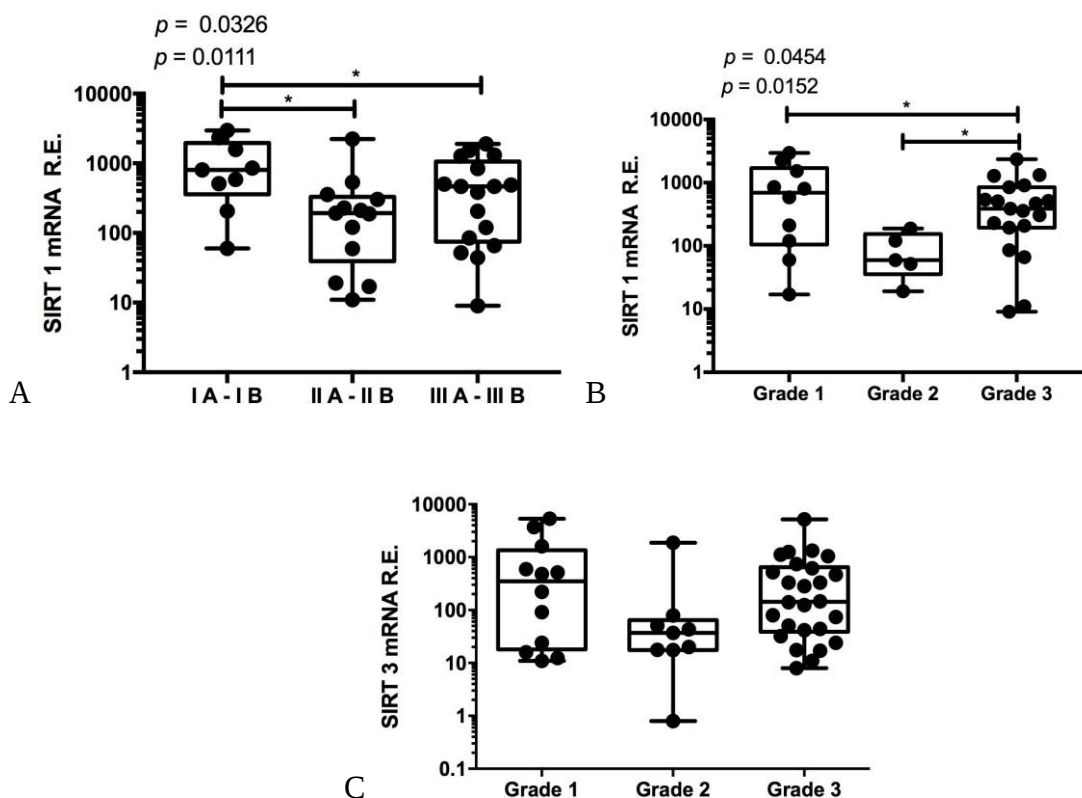
Nas amostras teciduais de pacientes com câncer gástrico submetidos a gastrectomia no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, a expressão de ambas as sirtuínas, SIRT1 e SIRT3, apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle ($p < 0.0001$ para ambas). Gráfico 1 A e B; Figuras Suplementares 1-4.

Gráfico 1: Expressão de SIRT1 (A) e SIRT3(B) em pacientes com CG comparados com grupo controle.



Detectamos ainda uma tendência a maior elevação da expressão de SIRT1 em mulheres acima de 60 anos, quando comparadas àquela com idade inferior a 60 anos e ainda significância estatística na expressão em estágios 0-IB comparados a estágios IIA-IIB ($p < 0.011$) e uma tendência a elevação da expressão da mesma sirtuína em estágios mais avançados (IIIA-IV), mas com significância estatística para presença de linfonodos comprometidos (elevação da expressão para o grupo de 0 e de 3-6 linfonodos e decréscimo para os grupos de 1-2 e acima de 7 linfonodos comprometidos. Um padrão similar foi visto, porém sem significância estatística, para a elevação da expressão de SIRT3 em graus histológicos 1 e 3 e decréscimo em graus 2. Gráfico 2 A, B e C.

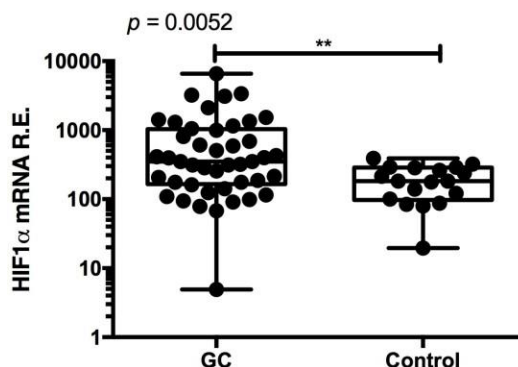
Gráfico 2: Expressão de SIRT1 e estadiamento (A), SIRT1 e grau histológico (B) e SIRT3 e grau histológico (C)



No tocante aos marcadores oxidativos, não verificamos diferença ou ao menos tendência na expressão de PGC1- alfa em pacientes com CG comparados ao controle. No entanto, quando analisados isoladamente, demonstramos elevação de PGC1- alfa nos grupos com 0 e 3-6 linfonodos comprometidos e queda nos grupos de 1-2 e mais de 7 linfonodos comprometidos.

Quanto à expressão de HIF1- alfa, nossos resultados demonstraram elevação da expressão estatisticamente significativa em pacientes com CG comparados ao controle ($p < 0.005$) – Gráfico 3, uma tendência a elevação em pacientes com estadiamento I e III e queda em estágio II, e ainda elevação estatisticamente significativa para graus histológicos I e III e decréscimo para grau II ($p < 0.033$ para comparação entre grau I e II) e alta expressão para 0 e 3-6 linfonodos comprometidos e baixa expressão para os grupos de 1-2 e mais de 7 linfonodos envolvidos pela neoplasia ($p < 0.04$ para comparação entre 0 e 1-2 linfonodos).

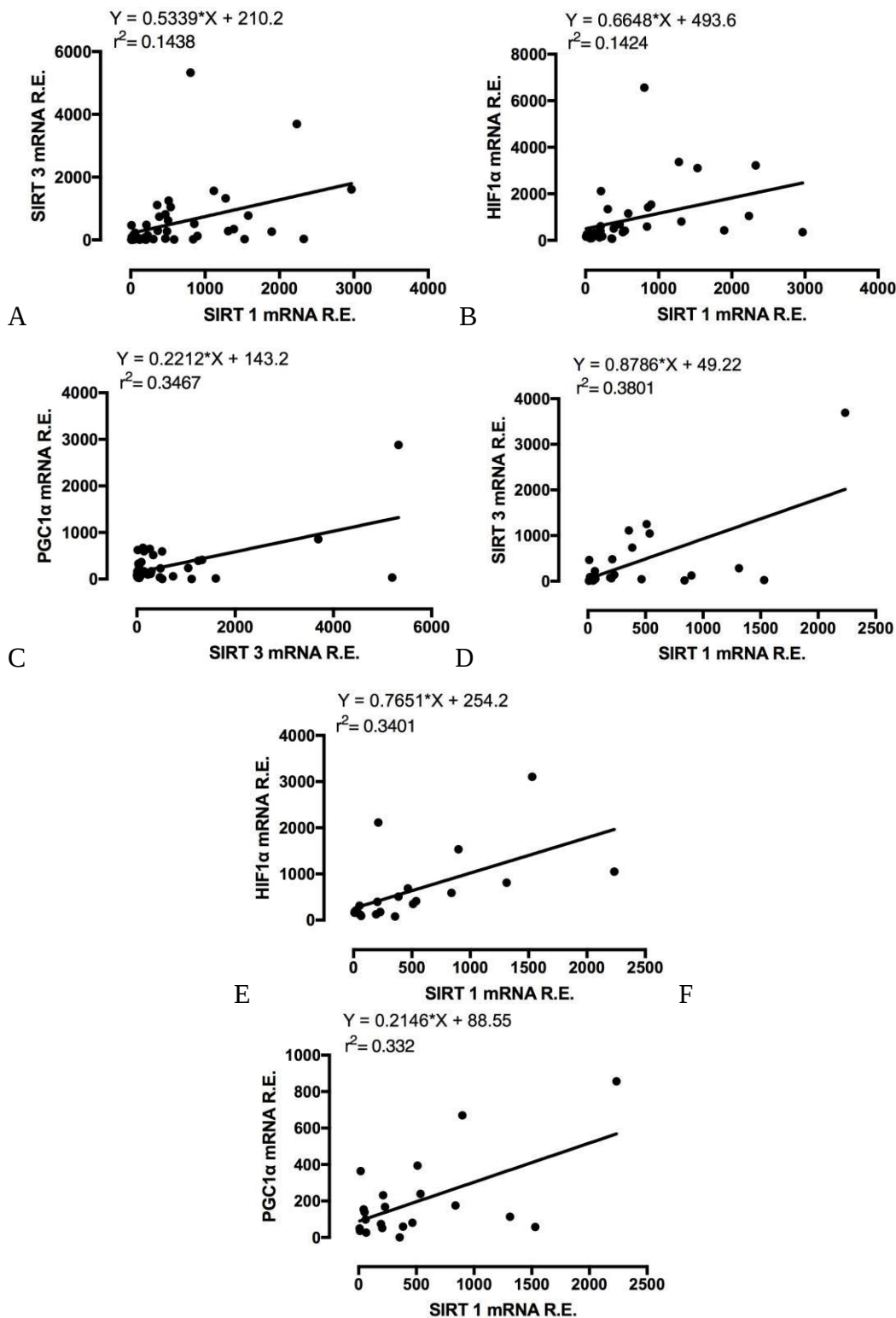
Gráfico 3: Expressão de HIF1- alfa em pacientes com CG e controle.



Analizamos ainda a associação entre as expressões de SIRT1, SIRT3, PGC1- alfa e HIF1- alfa entre si e de acordo com algumas variáveis patológicas. Associação positiva foram encontradas entre SIRT1/SIRT3 geral (Gráfico 4 A), SIRT1/HIF1- alfa (Gráfico 4 B), SIRT3/PGC1- alfa (Gráfico 4 C) em pacientes com CG, mas nenhuma dessas associações no grupo controle. Interessantemente, detectamos ainda uma forte associação positiva entre SIRT1/SIRT3 ($r^2=0.38$), SIRT1/PGC1- alfa ($r^2=0.33$), SIRT1/HIF1- alfa ($r^2=0.34$) em pacientes com CG com invasão angiolinfática, que não foi demonstrada em pacientes sem invasão angiolinfática (Gráfico 4D, E e F, respectivamente). Ao contrário, esse padrão não foi demonstrado entre a associação de SIRT3/PGC1- alfa e SIRT3/HIF1- alfa em pacientes com invasão angiolinfática, mas uma diferença estatisticamente significativa em pacientes sem invasão angio-linfática. Gráfico 4 A-F.



Gráfico 4 A a F: Associação entre níveis de expressão por regressão linear.





Discussão

A carcinogênese gástrica é um processo complicado, que requer a coordenação de inúmeros eventos moleculares, incluindo reprogramação epigenética, tal como modificações das histonas. Pacientes com CG podem apresentar discrepâncias em seu modelo biológico e sua apresentação clínica. Múltiplos fatores prognósticos devem estar envolvidos. Em nossa população, nós analisamos o impacto de fatores clínicos e patológicos clássicos (estadiamento, grau histológico, invasão de linfonodos ou angiolinfáticas e perineural) sobre a expressão de sirtuínas e fatores oxidativos, PGC1- alfa e HIF1- alfa.

Nossa amostra de pacientes tinha uma idade mediana de 59.5 anos, o que é esperado de acordo com o Instituto nacional de Câncer que revela que cerca de 65% dos pacientes têm mais de 50 anos (INCA, 2018). Eles ainda se apresentavam com estadiamento entre I e III em cerca de 70% dos casos e em 20% com 7 a 15 linfonodos comprometidos. É demonstrado que nos Estados Unidos, cerca de 25% dos pacientes com CG se apresentam com doença localizada e 31% com doença regional (AVITAL, 2011). Embora o estadiamento é mais acurado se determinado por patologia cirúrgica, o estadiamento clínico direciona o manejo terapêutico inicial do paciente.

Verificamos que a expressão de SIRT1, SIRT3 e HIF1- alfa está estatisticamente elevada em pacientes com CG comparados ao grupo controle, e ainda está associado com fenótipo maligno menos agressivo. Adicionalmente, nós detectamos que essa elevação da expressão foi vista em vários subgrupos como: SIRT1 em homens ($p < 0,0006$) e mulheres ($p < 0,002$) vs. controle; SIRT1 em pacientes com menos de 60 anos ($p < 0,002$) ou maiores de 60 anos ($p < 0,0009$) vs controle; SIRT 3 em mulheres vs. controle ($p < 0,001$) e homens ($p < 0,008$); SIRT3 naqueles abaixo de 60 anos ($p < 0,0006$) e uma tendência para aqueles com mais de 60 anos ($p < 0,007$).

Uma tendencia clara a elevação de SIRT1 e SIRT3, respectivamente, em idosos e mulheres jovens foi demonstrada. Na prática clínica, verificamos em geral um comportamento mais agressivo em pacientes jovens em vários tipos de tumor. Por exemplo, estudos têm demonstrado que câncer colo-retal em pacientes com menos de 50 anos tende a ser mais agressivo que em pacientes mais idosos, o que evidencia diferença genética que pode direcionar tratamentos e estratégias distintas no combate da doença em pacientes mais jovens (PITTS et al, 2015; PANZA et al., 2017).

A análise da expressão de ambas proteínas em diferentes variáveis patológicas demonstrou através de relação positiva uma associação entre fenótipo menos agressivo e



expressão de sirtuínas, pelo menos em fases precoces da doença. Tumores com grau histológico 1, por exemplo, comparados com grau 2 tende a ser associado com elevada expressão de SIRT1, enquanto significância estatística entre grau 2 e 3, favorecendo grau 3 foi observada. Ainda foi detectada uma significância estatística entre a associação de SIRT1 em estadiamentos precoces e menos invasão linfonodal. Estudos prévios demonstram tais variáveis como fatores prognósticos e alguns deles com impacto em sobrevida (CRAWFORD et al., 1994; YOKOTA ET AL., 1999; PINTO DE SOUSA, 2001; CUNNINGHAM et al., 2006;). O porquê de nossas amostras apresentarem uma tendência a alta expressão em fases precoces da doença e uma recrudescência em fenótipos mais agressivos (grau 3 e linfonodos comprometidos), requer uma explicação.

O alvo das HDACS em cancer tem se despertado grande interesse, dado a frequência de modificações das histonas em células malignas e expressão de HDACs em tuores humanos (FRAGA et al., 2005; WEICHERT, 2009; WEST et al., 2014). A família das sirtuínas em mamíferos parecem estar envolvidas em diferenrentes situações patológicas, como câncer e doenças neurodegenerativas. Além disso, evidências crescentes determinam o uso potencial de inibidores das sirtuínas para o tratamento do câncer (CARAFA et al., 2016). SIRT1 foi o primeiro membro da família a ser descoberto, sendo ainda o mais estudado. As primeiras observações associando SIRT1 a tumorigênese vieram de dois estudos mostrando a deacetilação de p53 e sua inibição pelas HDACs, promovendo morte celular programada (LUO et al., 2001; VARIZI et al., 2001). Estudos posteriores têm sugerido que SIRT1 desempenha um papel dual, agindo como um promotor ou supressor de tumor, similarmente para impacto em sobrevida (DENG, 2009; BOSCH-PRESEGUE et al., 2011), enquanto outros membros da família das, como SIRT4, comporta-se como supressor tumoral em adenocarcinoma gástrico (HUANG et al., 2015). Desde que SIRT1 é uma enzima que regula a deacetilação NAD⁺ dependente de substratos alvos, e porque o balanço celular entre NAD⁺ e NADH está altamente relacionado a estados catabólicos, tem sido postulado que SIRT1 pode agir como um sensor que conecta perturbações metabólicas e vias transcrpcionais. Contudo, o papel regulatório de SIRT1 deve ser mais complexo, e sua atividade depende dos níveis intracelulares de nicotinamida, o produto natural da reação catalisada pelas sirtuínas, bem como modificações pós-translacionais ou ainda interações com outras proteínas. Adicionalmente, a regulação da localizacao intracellular da SIRT1 e como variações de NAD⁺/NADH em comparyimentos celulares distintos podem afetar sua atividade, não está completamente elucidado (CANTO et al., 2009). Alguns estudos têm hipotetizado o envolvimento de sirtuínas na progressão do câncer. SIRT3 primeiramente inibe a produção



mitochondrial de radicais livres de oxigênio, mas também deacetila e ativa algumas proteínas mitocondriais, regulando assim taxas de proliferação, diferenciação celular e sobrevivência. SIRT3 ainda pode agir como um supressor tumoral através da inibição da glicólise após deacetilação e ativação da piruvato desidrogenase; assim, o papel da SIRT3 no câncer também é motivo de debate (CARAFA et al., 2016).

De nota, esse estudo é o primeiro a demonstrar a expressão de sirtuínas em uma população ocidental. Nossos achados de elevada expressão de SIRT 1 e SIRT3 em CG, comparado a tecidos sem malignidade, está em conflito com estudos prévios demonstrado por Yang et al. (YANG et al., 2014), mas são consistentes com Cha and colleagues (CHA et al., 2009). Esses achados conflitantes podem refletir as dúvidas sobre a implicação das sirtuínas na carcinogênese gástrica. Além disso, fatores como etnia, localização geográfica ou infecção pelo *H. pylori* podem influenciar esses achados. A associação entre o metabolismo da célula maligna e sirtuínas é da mesma forma questionada. Perda da atividade das sirtuínas podem resultar em elevação da susceptibilidade ao câncer e, paradoxalmente, tumores estabelecidos que expressam altos níveis de sirtuínas podem apresentar vantagens em termos de sobrevivência. Por outro lado, a perda da atividade das sirtuínas tem sido relacionada a carcinogênese em numerosos estudos, por exemplo em knockout ratos em certas sirtuínas (NOGUEIRAS et al., 2012). Além disso, SIRT1 pode estar associada a pior prognóstico em CG (NOGUCHI et al., 2012). Importante frisar, a superexpressão de SIRT1 em epitélio intestinal foi relacionada a supressão da tumorigênese em modelos animais de câncer de colon, enquanto outros apresentaram conclusões opostas; mais estudos são necessários para esclarecer essas diferenças (GERMAN et al., 2015). Interessantemente, tem sido sugerido que miRNA pode ainda tornar um fenótipo mais agressivo em menos agressivo induzido por SIRT1 em cultura de células de CG (ZHANG et al., 2013).

Associação entre sirtuínas e fatores oxidativos

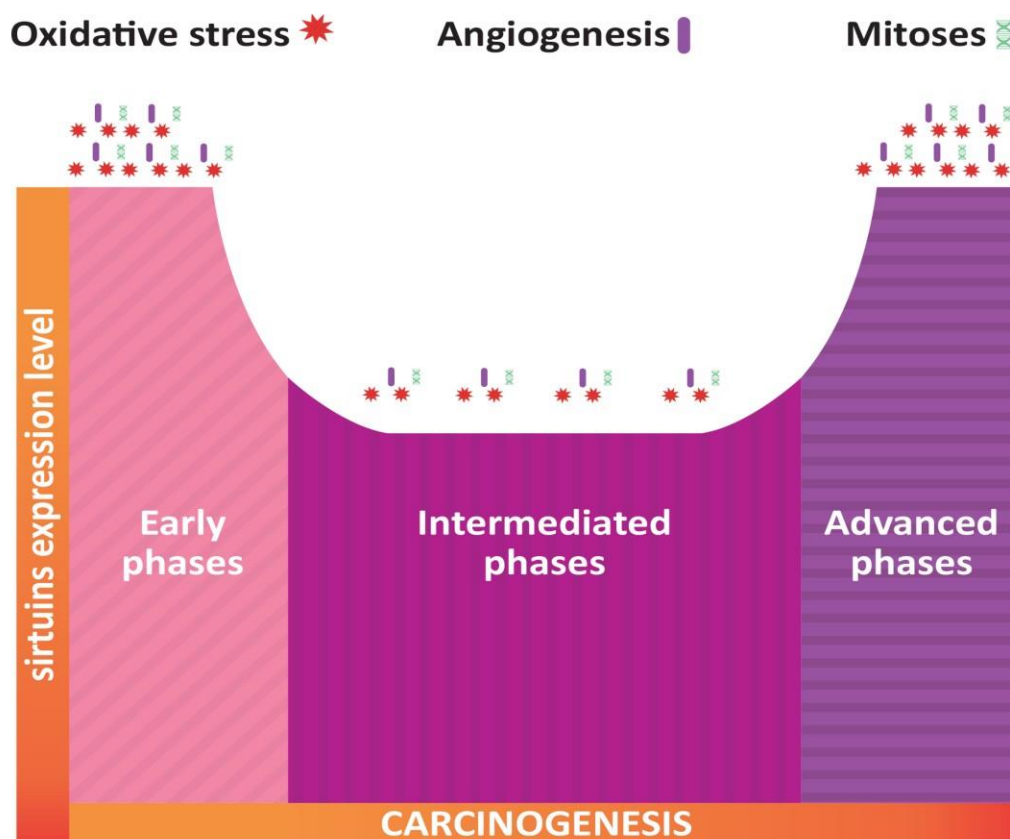
Analisando a expressão de fatores oxidativos, PGC1- α e HIF1- α , detectamos resultados provocativos, tais como elevação de HIF1- α estatisticamente significativa em pacientes com CG, comparados com o grupo controle ($p < 0.005$), assim como em homens ($p < 0.01$) e idade inferior a 60 anos ($p < 0.01$), ambos comparando com grupo controle. Por outro lado, não verificamos alta expressão do coativador PGC1- α nos pacientes com CG. Apesar disso, em análise por regressão linear, encontramos uma associação positiva entre a expressão de SIRT 1 e SIRT3, PGC1- α e HIF1- α .



O processo de carcinogênese é resultado de múltiplas etapas com implicações genéticas e ambientais. O gatilho é geralmente desconhecido, mas estratégias têm sido empregadas para prevenir a transformação celular mesmo diante de um estímulo maligno. Agentes de quimioprevenção ou outros mecanismos têm sido estudados, tais como aspirina, microbiota e substâncias derivadas de plantas.

Nesse ponto, hipotetizamos que as sirtuínas podem agir em estágios precoces da doença, pelo menos em modelos de cancer. Isso poderia justificar nossos resultados de elevação de sirtuínas e fases precoces, com fenótipo menos agressivo, até uma fase onde o próprio câncer pode se sobrepor ao efeito protetor ou inicial das sirtuínas. Durante a carcinogênese, enquanto o tumor se desenvolve, vários processos são deflagrados para manutenção do fenótipo maligno, como estresse oxidativo, angiogênese e múltiplas mutações, que por sua vez dependem da expressão de genes relacionados. Isso pode indicar um novo envolvimento das sirtuínas em estágios mais avançados da doença. Em nossos pacientes, pudemos detectar outro fato interessante. Apenas naqueles pacientes com invasão angiolinfática, portanto relacionados a vasos peritumorais, foi vista uma associação estatisticamente significativa entre a expressão de SIRT1/SIRT3, SIRT1/PGC1- α e SIRT1/HIF1- α , através de regressão linear. Esse padrão não foi demonstrado em pacientes sem invasão angiolinfática. Isso poderia indicar a participação de sirtuínas no processo de angiogênese, por exemplo, dependendo do ambiente celular e context molecular (DREW et al., 2016; SCOTT, 2016; HOWITZ et al., 2003; HONG CAI et al., 2015). Figura 1.

Figura 1: Múltiplos passos da carcinogênese. À medida que o tumor cresce, a demanda de oxigênio e grau de diferenciação também progride, o estresse oxidativo, angiogênese e presença de mutações. Os níveis de sirtuínas seguem esse padrão, de acordo com nossos resultados.

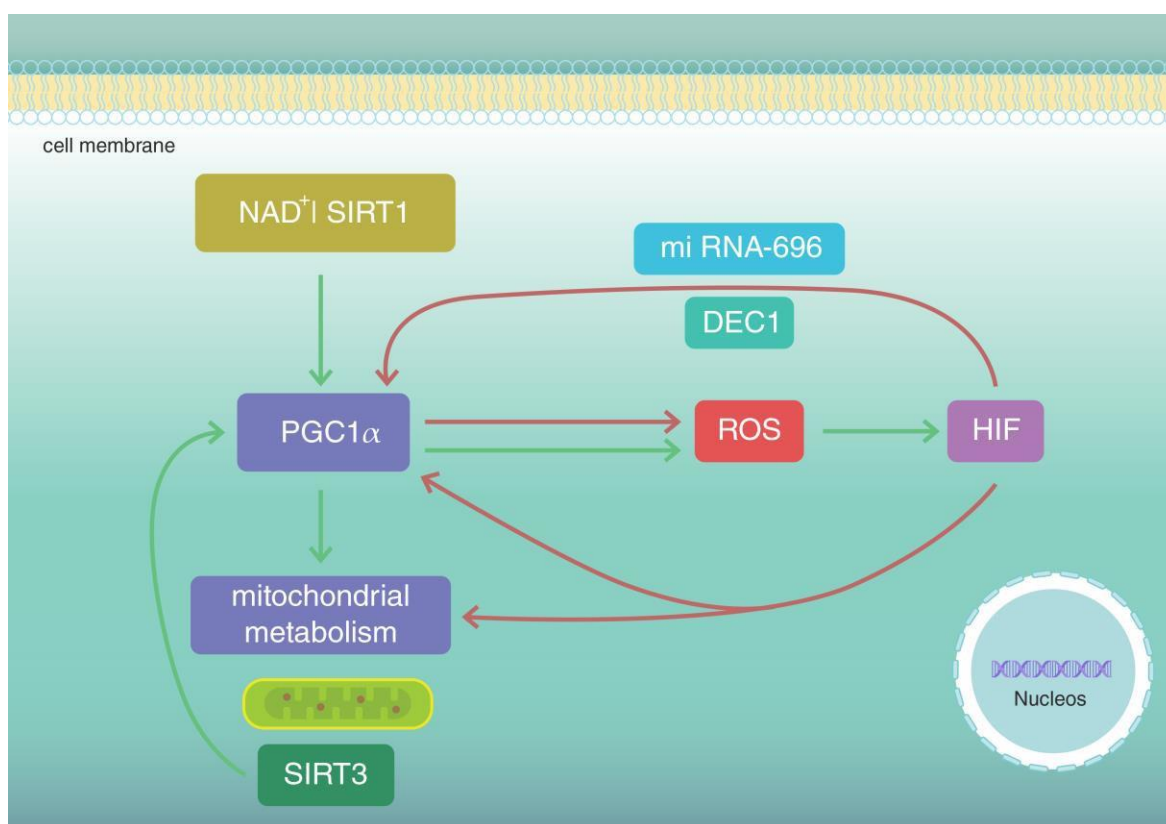


PGC1- alfa é um coativador multiuncional que regula a atividade de receptores nucleares e atores de transcrição envolvidos no metabolismo mitocondrial. Em nosso estudo, verificamos uma expressão não estatística de PGC1- alfa em pacientes com CG comparados ao grupo controle. A única diferença foi demonstrada entre os grupos de 1-2 vs. 3-6 linfonodos comprometidos. Existe evidência que indica que a SIRT1 regula a atividade de PGC1- alfa, desempenhando assim um papel relevante nas adaptações metabólicas no metabolismo energético em diferentes tecidos. No fígado, SIRT1 é reconhecida como controladora da atividade gliconeogênica através da modulação de PGC1- alfa (NOGUEIRAS et al., 2012). Estudos recentes têm demonstrado que a expressão de PGC1- alfa está diminuída em vários tipos de câncer, talvez justificando nossos resultados, e sugerindo que a queda da biogênese mitocondrial pode contribuir para a tumorigênese e/ou progressão de tumores malignos em humanos, e que a regulação do número de mitocôndrias pode induzir a efeitos antitumorais em células tumorais (ONISHI et al., 2014).

Nosso estudo ainda indica a possibilidade de SIRT1 ter participação importante em uma via regulatória envolvendo PGC1- alfa e outras moléculas, como *peroxisome*

proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) e *lipin-1*. Esse modelo foi descrito por Sugden et al., que demonstraram que SIRT1 controla a resposta metabólica em resposta a determinados nutrientes e sinais fisiológicos via um mecanismo comum mediado por modificações pós-translacionais (deacetilação, por exemplo) de PPARα e PGC1- alfa (SUGDEN et al., 2010). Figura 2.

Figura 2: Interação entre SIRT1, SIRT3 e fatores oxidativos. SIRT1, uma desacetilase dependente de NAD⁺ regula positivamente a expressão de PGC1 alfa que participa do metabolismo mitocondrial, onde SIRT3 é localizada. O PGC1- alfa ainda, como um sensor de exigência de oxigênio, atua como um agente antioxidante ou oxidante, promovendo o acúmulo de ROS. HIF também atua indiretamente inibindo PGC1 via ação de mRNA e expressão de Dec1 ou miRNA696 ou diretamente no metabolismo mitocondrial



Legendas: NAD: nicotinamide adenine dinucleotide; SIRT 1: sirtuin 1; PGC1 alfa : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator subunit 1; SIRT3: sirtuin 3; ROS: Reactive oxygen species; miRNA: microRNA. green arrow means positive stimulus and red negative stimulus.

Por outro lado, os níveis de HIF1- alfa estavam elevados em tumores sólidos malignos, mas não em tecidos não neoplásicos ou tumores com baixa taxa de replicação. Em tumores malignos com elevada velocidade de crescimento, HIF1- alfa está envolvido na ativação de uma série de processos celulares, incluindo resistência a apoptose, angiogênese, hiper-expressão de canais de efluxo transmembrânico de drogas, remodelamento vascular e



metástase. HIF1- alfa está frequentemente superexpresso em CG em humanos, mas enquanto a inibição de HIF1- alfa tem efeito antitumoral em roedores, a relevância de HIF1- alfa para o fenótipo de CG permanece incerto (ROHWER et al., 2009). Em nosso estudo, detectamos uma elevada expressão de HIF1- alfa, particularmente em estágios precoces do CG, como nos casos e tumores com grau de diferenciação 1 e menos envolvimento linfonodal.

A superexpressão de SIRT3 inibe e estabilização de HIF1- alfa durante o processo de hipóxia a atenua a elevação da atividade de HIF1- alfa. Elevação de SIRT3 ainda diminui tumorigênese e em modelos animais, mesmo quando a indução de sirtuínas ocorre após o início do processo maligno (BELL et al., 2011).. Esses dados sugerem que SIRT3 age suprimindo o crescimento tumoral, pelo menos através de sua habilidade em suprimir produção de radicais livres de oxigênio e HIF1- alfa. Nossos achados de elevada expressão de HIF1- alfa em casos de achados patológicos menos avançados são conflitados com aqueles de Rohwer et al., que demonstraram que a elevada expressão de HIF1- alfa estava associada com processo de migração celular, invasão e aderência, participando assim do desenvolvimento de doença mais avançada (ROHWER et al., 2009). Se a expressão de sirtuínas, especialmente SIRT3, favorece a queda da expressão e/ou atividade de HIF1- alfa é uma questão que merece ser elucidada. Além disso, evidências da literatura apontam para uma forte associação entre sobrevivência de uma série de seres vivos e restrição calórica, produção de radicais livres e oxigênio, metabolismo tumoral, efeito Warburg e expressão de sirtuínas, HIF1- alfa e PGC1- alfa. (Fig. 11), sugerindo que vias multiúncionais devem ser avaliadas no processo maligno.

Como demonstrado, existe uma associação entre SIRT1, que age como deacetilase, e PGC1- alfa. Esse, por sua vez, é um coativador, presente em uma grande quantidade em tecidos ricos em mitocôndrias. Regularmente, PGC1- alfa age diminuindo níveis de radicais livres de oxigênio, mas em outros modelos pode elevar seus níveis. Está bem estabelecido que radicais livres de oxigênio estimulam a expressão de HIF1- alfa que por sua vez estimula a glicólise e diminui a fosforilação oxidativa. Por outro lado, HIF pode ainda inibir a expressão de PGC1- alfa através da atuação de microRNAs como miRNA 696 e ainda Dec1. Figura 2. Queiroz et al, recentemente, demonstraram que o estresse metabólico associado a disfunção mitocondrial leva a expressão de microRNA 696 que por sua vez diminui a expressão de PGC1- alfa, impactando assim a função mitocondrial em células musculares. (QUEIROZ, 2016). Esses dados podem justificar a baixa expressão de PGC1- alfa em nossos pacientes. Similarmente, é bem descrito que o papel de HIF1- alfa no processo de hipóxia. Contudo, evidências têm demonstrado que o fator transcricional Dec1 é um gene induzido por hipóxia que pode suprimir PGC1- alfa. Em estudos anteriores, Dec1 suprime PPARgamma2 e PGC1-



alfa durante a estabilização de HIF1- alfa e miogênese, e outros autores sugerem a mesma regulação em tecidos tumorais, como no câncer renal. Consistente com um papel essencial do Dec1 como um efetor de HIF mediado pela supressão de PGC1- alfa, a inibição genética de Dec1 inibe a supressão de PGC1- alfa no processo de hipóxia. Assim, Dec1 é inversamente correlacionado com PGC1- alfa no câncer (EDWARD et al., 2015).

Nossos dados dão suporte a essa lógica, apesar da alta expressão de HIF1- alfa em nossos pacientes, nós não demonstramos correspondência com elevação de PGC1- alfa. Assim, HIF reprime a expressão de PGC1- alfa através da elevada expressão de miRNA-696 and/or Dec1 segundo os dados da literatura e que podem também ter ocorrido em nossos pacientes.

Conclusão

Em conclusão, nossos dados sugerem que as expressões de SIRT1 e SIRT3 em amostras de GC humanas na população ocidental estão associadas a fenômenos malignos menos agressivos na fase precoce e avançada da doença. Além disso, os altos níveis de expressão de SIRT1 e SIRT3 estão associados com a expressão de PGC-1 alfa e HIF-1 alfa, sugerindo novamente o papel das sirtuínas no processo oxidativo em células de câncer gástrico.

Perspectivas

Consideramos esses resultados como pelo menos provocativos e geradores de hipóteses. São necessários mais estudos para replicar esses achados e determinar suas implicações na prática clínica. Outras questões precisam ser abordadas em estudos futuros, como diferenças no padrão de expressão de sirtuínas e fatores oxidativos entre populações ocidentais e orientais, especialmente se considerarmos a influência ambiental nas modificações epigenéticas. Julgamos ainda, a necessidade de investigações mais aprofundadas, um papel causador do estresse oxidativo no câncer continua a ser uma das questões mais sólidas a serem abordadas. Nosso estudo demonstrou que as sirtuínas estão intimamente ligadas à célula cancerígena gástrica e ao metabolismo oxidativo. Avançando, será importante desenvolver modelos clínicos e experimentais nos quais os níveis de outros biomarcadores, além de PGC1 alfa e HIF1 alfa, como o miRNA 696 e Dec1 e as atividades das sirtuínas podem ser moduladas com precisão para determinar se as mesmas têm um prognóstico favorável ou não. Esperamos futuros estudos que, sem dúvida, elucidarão muitas dessas questões importantes.

Figuras Suplementares

Figura suplementar 3. Padrão histológico de tumor gástrico maligno. x40.

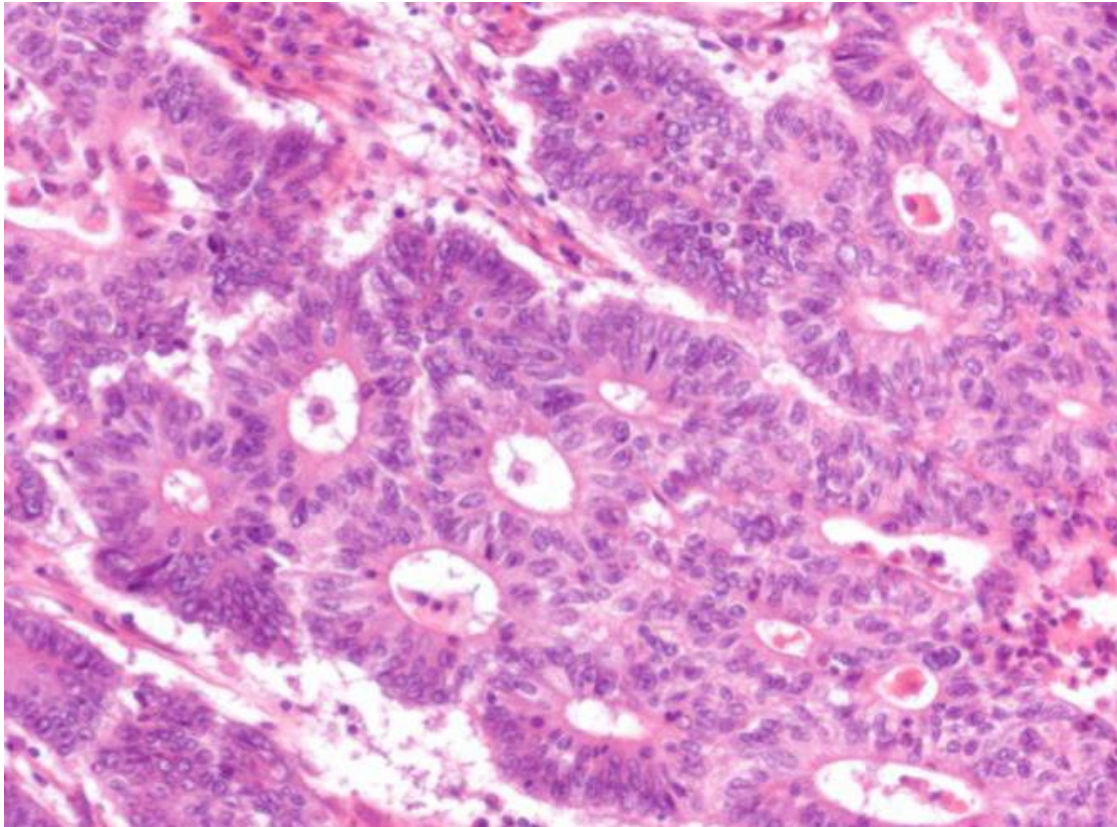


Figura suplementar 4. SIRT1 está hiperepressa no câncer gástrico humano (CG). Os espécimes de CG foram analisados quanto à expressão SIRT1 usando imunofluorescência (A-C). A expressão SIRT1 é corada em vermelho e as células epiteliais são coradas em verde, magnificatina original, x20. A: Pan-Keratina / DAPI, GC; B: SIRT1 / DAPI, GC; C: merge, x20

A

B

C

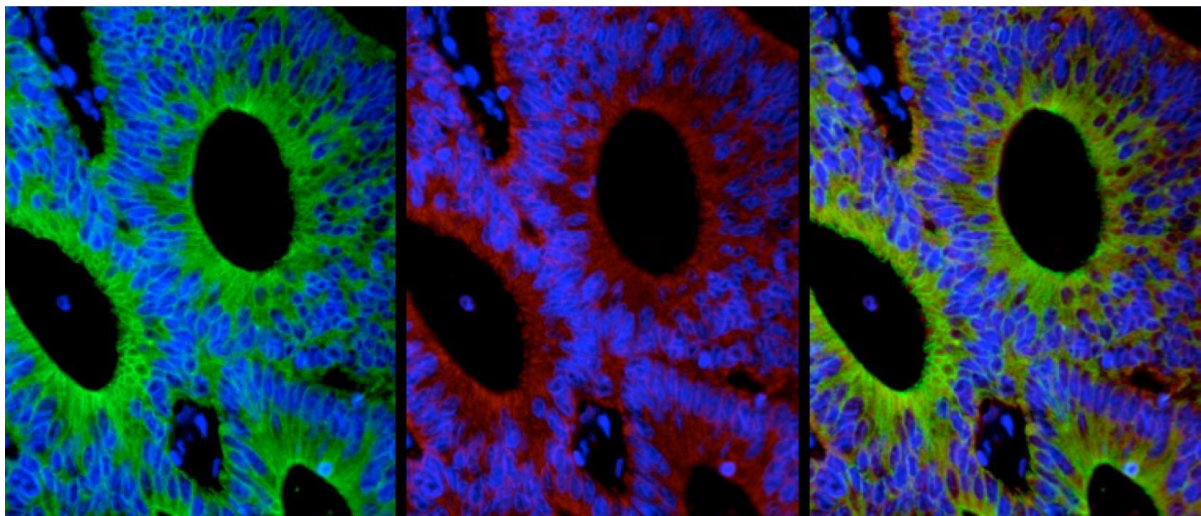


Figura suplementar 5. O SIRT3 está hiperexpresso no câncer gástrico humano (CG). Os espécimes de tecido de CG foram analisados para a expressão de SIRT3 usando imunofluorescência (A-C). A expressão SIRT3 é corada em vermelho e as células epiteliais são coradas em verde, magnificatina original, x20. A: SIRT3 / DAPI, GC; B: Pan-queratina / DAPI, GC; C: Merge, x20.

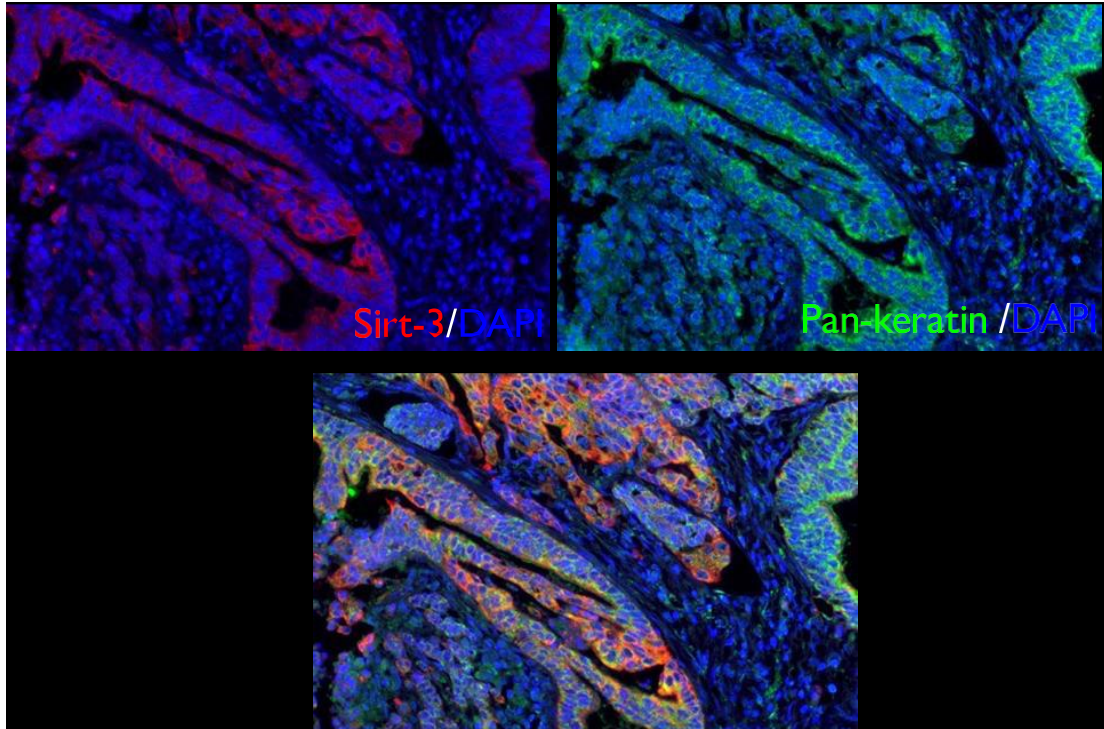
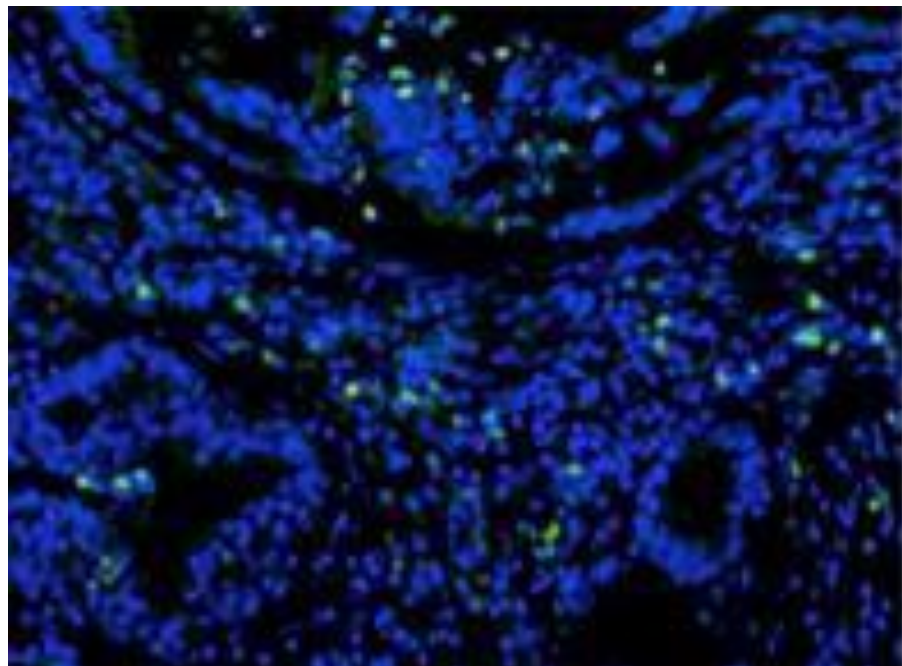


Figura suplementar 6. Expressão de PGC1- alfa em câncer gástrico. PGC1- alfa marcado em verde, Original magnificatin, x20 . PGC1alpha/DAPI, GC,20x.





6 CAPÍTULO III

Artigo Original 1[□]

Epigenetics and gastric cancer in Western populations: are sirtuins and associated oxidative-related factors potential biomarkers?

Mattos-Jr LAR¹

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco

Address for correspondence

Luiz Alberto Reis Mattos Jr, MD
Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA)
Federal University of Pernambuco
Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária
50670-901 – Recife – Brazil
Phone: +55 81 2126-8000
E-mail: luizalbertomattos@uol.com.br

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by grants from FACEPE and CNPq.

[□]Artigo baseado em projeto realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco – LIKA/UFPE em amostras de pacientes com câncer gástrico submetidos a tratamento cirúrgico no Hospital das Clínicas da UFPE. Tal estudo, fundamentou a concepção original dessa tese, e seus resultados são fundamentalmente apresentados neste capítulo, bem como a discussão conclusões atingidas. No entanto, dados suplementares e não menos relevantes são apresentados ainda capítulo dois dessa tese.



Abstract

Gastric cancer is one of the most common malignancies worldwide. Somewhat different features appear to characterize gastric cancer in Eastern and Western countries. Although alterations in sirtuins and other regulators of metabolic activity seem to play a role in the pathogenesis of gastric cancer, their collective role is incompletely understood. We assessed the mRNA expression levels of SIRT1, SIRT3, PGC1-alpha, and HIF1-alpha in 64 samples from patients with gastric cancer and 18 individuals undergoing bariatric surgery. The expression of sirtuins was significantly higher in cancer than in non-cancer tissue. Moreover, sirtuin expression in cancer patients was significantly associated with age, lymphovascular, and perineural invasion. In cancer tissue, PGC1-alpha expression significantly correlated with SIRT1, whereas HIF1-alpha significantly with correlated SIRT3 in earlier stages. Our findings suggest that the expressions of SIRT1 and SIRT3 in human gastric cancer in a Western population are associated with a less aggressive malignant phenotype. Moreover, the high expression levels of SIRT1 and SIRT3 are correlated with the expression of PGC1-alpha and HIF1-alpha, respectively, suggesting a role for sirtuins in oxidative processes in gastric cancer cells.

Keywords (MeSH): Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; sirtuins; stomach neoplasms; transcription factors.



Introduction

Gastric cancer (GC) is one of the most common malignancies worldwide [1]. In Brazil, nearly 20 thousand new cases were expected in 2016 alone [2]. GC is characterized by clinical heterogeneity, with many patients developing advanced disease for which they require immediate treatment and due to which they have a relatively short survival time, while other patients live for years without a recurrence after surgical resection. Before the advent of molecular profiling, GC was classified based solely on histological criteria. More recently, four molecular subtypes of gastric adenocarcinoma have been described according to genetic, epigenetic and immunologic profiling: Epstein-Barr-virus-positive tumors, microsatellite unstable tumors, genomically stable tumors, and tumors with chromosomal instability [3]. Identification of these subtypes provided a potentially useful roadmap for patient stratification and for novel trials with targeted therapies [3–5].

As in other malignancies, prognosis in GC likely depends on demographic features, disease staging, and the molecular profile of the tumor. Of note, somewhat different features appear to characterize GC in Eastern and Western countries. These include differences in incidence (highest in many Eastern countries) and in tumor location (with a higher prevalence of proximal third of the stomach in Western countries); moreover, survival outcomes differ considerably between Eastern and Western populations, with better overall survival reported in Eastern series. The role played by a more aggressive surgical approach or differential use of adjuvant treatment versus tumor features on these different outcomes remains uncertain [6].

Despite efforts to improve diagnostic techniques and patient management, there has been relatively little progress in improving the survival of patients with advanced GC, which remains highly lethal despite initially effective chemotherapy and targeted therapy [7–10]. Thus, further research is needed to understand the physiopathology of GC and to translate such knowledge into effective therapies. In addition to genetic alterations, epigenetic mechanisms should be interesting targets, especially because many epigenetic changes are potentially reversible. Epigenetic phenomena lead to heritable changes in gene expression that do not affect the nucleotide sequence but impact the conformation of the DNA, thus influencing which genes are expressed by which cell types, and when [11,12].

Epigenetic alterations are also a hallmark of cancer [13], and one of the most well documented alteration is histone modification by histone deacetylases (HDAC), which can remove acetyl groups from histone tails, leading to chromatin condensation and gene expression regulation [14]. A total of 18 HDAC isoenzymes divided into four classes have



been identified. Sirtuins comprise a family of seven class III NAD⁺-dependent HDACs that play a role in response to stress and in longevity, and which also seem to be associated with carcinogenesis [15,16]. Deregulation of sirtuin function has been observed in several malignancies [15]. Furthermore, sirtuins appear to work in concert with other regulators of metabolic activity, including the oxidative-related factors peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha (PGC1-alpha) and the hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF1-alpha) [17,18].

The collective role of sirtuin 1 (SIRT1), sirtuin 3 (SIRT3), PGC1-alpha and HIF1- alpha in gastric cancer is incompletely understood. Furthermore, there is no data in the Western literature about the role of sirtuins in patients with GC, which is of importance because of the different features of GC according to geographical area. We therefore analyzed the expression of these molecules and their associations with other disease features in gastric tumors, highlighting a potential link between histone deacetylation and oxidative-related factors.

Methods

Tissue samples

Gastric fragments were obtained from paraffin-embedded tissue blocks stored at the tissue bank of Clinics Hospital, Federal University of Pernambuco. Samples were from patients with pathologically confirmed GC (n=64) and from a control group of cancer-free individuals deemed to have normal histological findings after gastric surgery for weight reduction (n=18). Patients with GC were staged according to the changes proposed to the seventh edition of the Tumor, Node, Metastasis (TNM) system for GC [19]. After surgery, tissues specimens from GC patients and obese patients were fixed by immersion for 18 hours in 10% phosphate buffered formalin and then processed for storage in paraffin blocks. Section of 5 µm were cut and stained with hematoxylin and eosin for histopathological examination. This study was approved by the Health Science Center Ethics Committee at Federal University of Pernambuco, who waived informed consent from patients due to the nature of the study. The database of our study is available upon request.

Histology and immunofluorescence

For immunofluorescence analysis, paraffin sections were deparaffinized and pre- heated for antigen retrieval (DAKO). The tissues were incubated for 1 hour at room temperature with the primary antibody, which was followed by incubation with the secondary



antibody for 30 minutes and stained with diamidino-2-phenylindole for 10 minutes. The primary antibodies were SIRT1 to SIRT7 (Bioss), and the secondary antibodies were Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG (Abcam).

RNA extraction and quantitative real-time polymerase chain reaction

Total RNA from tissue samples was isolated from paraffin-embedded tissue samples using ReliaPrep FFPE Kit Total RNA Miniprep System (Promega), according to the manufacturer's instructions. For each sample, total RNA obtained was quantified by NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) and transcribed through the Reverse Transcription kit (Qiagen). Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) for SIRT1 to SIRT7, PGC-1 alpha and HIF-1-alpha were performed in duplicate using 25 ng of cDNA using specific primers and SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The PCR cycling conditions were 50°C for 2 minutes, 95°C for 15 minutes, and 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Relative levels of expression were calculated using beta-actin gene as endogenous control. The results were plotted as relative expression for statistical analysis.

Statistical analysis

Data are reported as median $\pm$ standard error for different groups. Such means were compared using Student's t-test and Mann-Witney for parametric and non-parametric distribution, respectively, and one-way analysis of variance (ANOVA), as appropriate. Pearson's correlation coefficient was used to assess the relationship between quantitative variables when appropriate. P values <0.05 were considered as statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 7.0 for Macintosh (GraphPad Software).

Results

Clinical and pathological features

The clinical and pathological characteristics of the 64 patients with GC are summarized in Table 1. Sixty-four percent of the patients were males, and the median age was 59.5 years (range, 23 to 84 years). These patients presented in TNM stages I and II in nearly 30% of the cases, and in TNM stage III in approximately 40% of cases (nearly 3% were in stage IV, and the clinical stage was not available for the remaining patients). Nearly 20% of the patients had



seven to 15 lymph nodes involved by metastasis, and about one-third of cases had a histological grade of 3 (poorly differentiated).

Sirtuin expression

Our results showed a clearly high expression level of SIRT1, SIRT3 and HIF1-alpha in patients with GC comparing with control group (Fig. 1). We show still SIRT1 and SIRT3 expression using immunofluorescence stained (Fig. complementary). In general, it was seen an association between high expression of both sirtuins and the presence of less aggressive malignance phenotype, significant or not, at least in early phases of the natural history of disease.

As the disease progresses, the distribution of expression level had distinct evolutions. Sometimes, there is a decrease in the levels followed by a new elevation. High expressions are persistent, for example, if we analyze the majorities of clinical characteristics studied and compare with control group, for example gender. Otherwise, when we analyze their expression in patients with different clinical characteristics, we detected distinct result. Indeed, in women older than 60 years, it is seen a tendency of high expression of SIRT1 ($p < 0,007$) comparing to under 60 years. For SIRT3 expression, an increased in women older comparing to under 60 years ($p < 0.04$), comparing again with under 60 years, and a tendency in pathological grade tumour (grade 2 vs. grade 3, $p < 0.006$).

According to staging and pathological aspects we demonstrated a high expression of SIRT1 for stages 0 and IB comparing with stages IIA and IIB ($p < 0.011$) followed by a novel grown tendency for late stages – IIIA and IV (Fig. 2A). This pattern was also shown for histological grade (grade 1 vs. grade 2, $p < 0.055$, and grade 2 vs grade 3, $p < 0,015$) – Fig. 2B) and number of compromised lymph-nodes, with statistical significance, as well – Figure 10). We did not detect statistical difference for SIRT3 expression and staging or lymph-nodes compromised, but a clearly tendency for high expression in histological Grade 1, 2 and 3 (Fig. 2C).

Associations between sirtuins and oxidative-related factors

Analyzing expression of oxidative factors, PGC1a and HIF1a, the followed results was demonstrated. High expression of HIF1-alpha ($p < 0,005$), but not PGC1-alpha in GC comparing to non-cancer gastric tissue was seen. For PGC1-alpha we only detected statistical difference or tendency lymph-nodes compromised in early and late phases of disease. If we stratify the HIF1 alpha expression with clinical variables, we detected statistical difference in



male and age under 60 years comparing to control. For staging, histologic grade and lymph-nodes compromised, the pattern is again seen, with high expression in phenotype less aggressive followed by disease more aggressive.

Finally, statistically significant association were found between the expression levels of SIRT1/SIRT3, SIRT1- alpha/PGC1 alpha, SIRT1/HIF1 alpha, SIRT3/PGC1 alpha, but none of this association was seen in non-cancer gastric tissue (Fig. 3). Of note, a strong association of SIRT1/SIRT3($r^2=0.38$), SIRT1/PGC1 alpha ($r^2=0.33$), SIRT1/HIF 1 alpha ($r^2=0.34$) in GC patients with angio-lymphatic invasion comparing to patients without angio- lymphatic invasion. Interestingly, this pattern was not demonstrated when we associated of SIRT3/PGC1-alpha and SIRT3/ HIF1-alpha in GC patient with angio-lymphatic invasion, but a statistically significant difference in patient without angio-lymphatic invasion ($p<0.0001$ and $p<0.0003$).

The supplementary material provides figures of the histological pattern of expression of SIRT1, SIRT3 and PGC1-alpha by immunoflorescence in primary malignant gastric tumors.

Discussion

Gastric carcinogenesis is a complicated process requiring the coordination of a large number of molecular events, including epigenetic reprogramming such as histone modifications. Some GC patients present discrepancies between their biological status and their clinical evolution. Multiple prognostic factors must be taken into account. In our study population, we analysed the impact of classical clinical and pathological factors (stage, histological grade, and invasion of lymph nodes, angiolymphatic vessels, and perineural) on the expression of sirtuins and the oxidative factors PGC1-alpha and HIF1-alpha.

Our sample of GC patients had a median age of 59.5 years, what is expected according to National Cancer Institute that show about 65% of patients are older than 50 years [20]. They still presented with staging I to III in about 70% of cases and in 20% with 7 to 15 lymph-nodes compromised. It is demonstrated that in the United States, about 25% of GC patients presents with localized disease and 31% present with regional disease [21]. Although staging is most accurately determined through surgical pathology, clinical staging directs the initial approach to therapy.

We found that SIRT1, SIRT3, HIF1-alpha expression in human GC samples is statistically increased when compared to non- cancer gastric tissue and is correlated to with a less aggressive malignant phenotype. Additionally, we could detect that this increasing



expression was seen in various subgroups such as SIRT1 in male ($p < 0,0006$) and female ($p < 0,002$) vs. control; SIRT1 in under ($p < 0,002$) or older 60 years ($p < 0,0009$) vs control; SIRT 3 in female vs. control ($p < 0,001$) and male ($p < 0,008$); SIRT3 in under 60 years ($p < 0,0006$) and a tendency to older 60 years ($p < 0,007$); We believe our findings suggest that sirtuins play a role in oxidative processes, and they should be further explored as potential biomarkers.

A clear tendency to high expression of SIRT1 and SIRT3 levels, respectively, in older and younger female patients was seen. In clinical practice, we often see a more aggressive behavior in young patients in many types of cancer. For example, previous studies have shown that colorectal cancer in patients younger than 50 years tends to be more aggressive than in older patients, which provides evidence of genetic differences that may possibly direct different treatments and strategies in combating the disease in younger patients [22,23]

Analyses of expression of both proteins and the pathological characteristics, as showed a positive relation between a less aggressive phenotype and sirtuin expression, at least in early phase of disease. Tumor grade 1, for example, comparing with grade 2 trends to be associated with expression levels of SIRT 1, while a statistically significant expression between grade 2 and grade 3, favouring grade 3. There was still a statistically significant association levels of SIRT1 for early staging and less invasion of lymph-nodes but not for invasion of lymphatic vessels and perineural. Previous studies have shown that these parameters are prognostic factors, some of them with survival impact [24–27]. Why in our samples there was a tendency do high expression in early phase of disease but a recrudescence of high levels in phenotype more aggressive (grade 3 and more lymph-nodes compromised), needs to be explained.

Targeting HDACs in cancer has become of utmost interest given the frequency of histone modifications in cancer cells and aberrant expression of HDACs in human tumors [16,28,29]. The mammalian sirtuin family of HDACs appears to be involved in different disorders, such as cancer and neurodegenerative diseases. Moreover, increasing evidence supports the potential use of sirtuin inhibitors for the treatment of cancer [30]. SIRT1 was the first sirtuin family member to be discovered and is still the most studied. The first observations linking SIRT1 to tumorigenesis came from two studies showing p53 deacetylation and inhibition by this HDAC, thus promoting cancer cell death [31,32]. Subsequent studies have suggested that SIRT1 plays a dual role, acting as both a tumor promoter and tumor suppressor, similarly to surviving [33,34], whereas others sirtuin members, such as SIRT4, behave as tumor supressor as well in gastric adenocarcinoma [35].



Since SIRT1 is an enzyme that mediates NAD⁺-dependent deacetylation of target substrates, and because the cellular redox balance of NAD⁺ and NADH is highly related to catabolic states, it has been postulated that SIRT1 could act as a sensor that connects metabolic perturbations and transcriptional outputs. However, the regulatory role of SIRT1 may be more complex, as its activity also depends on intracellular levels of nicotinamide, the natural product of the reaction catalyzed by sirtuins, as well as on post-translational modifications or interaction with other proteins. Additionally, the regulation of the intracellular location of SIRT1 and how NAD⁺/NADH variations in distinct cellular compartments may affect its activity are not yet fully understood [18]. A number of studies also hypothesize the involvement of sirtuins in cancer progression. SIRT3 firstly inhibits mitochondrial production of reactive oxygen species but also deacetylates and activates many mitochondrial proteins, thus regulating proliferation, differentiation, and survival. SIRT3 can act as a tumor suppressor by inhibiting glycolysis after the deacetylation and activation of pyruvate dehydrogenase; thus, also the role of SIRT3 in cancer is debatable [30].

To our knowledge, this study is the first to report on the expression of sirtuins in a Western population. Our findings of high expression of SIRT1 and SIRT3 levels in GC, compared with non-cancer tissue, conflict with previous results reported by Yang *et al.* [36], but are consistent with data from Cha and colleagues [37]. These conflicting findings may reflect the doubts about the implication of sirtuins in gastric carcinogenesis. Moreover, factors such as race, geographical location or even the *H. pylori* infection may influence these findings. The association between cancer metabolism and sirtuins is often questioned. Loss of sirtuin activity may result in increased susceptibility to cancer and, paradoxically, established tumors that express high levels of some sirtuins may present survival advantages. On the one hand, loss of sirtuin activity has been shown to contribute to carcinogenesis in numerous studies, for example in knockout mice deficient in several sirtuins [38]. Furthermore, SIRT1 expression can be associated with poor prognosis in gastric cancer [38]. Of note, overexpression of SIRT1 in intestinal epithelium was found to suppress tumorigenesis in a mouse model of colon cancer, while other studies reached opposite conclusions; thus, further research is needed to clarify this discrepancy [39]. Interestingly, it has been suggested that microRNA can even down-regulate a more aggressive malignant phenotype induced by SIRT1 in gastric cancer cell [40].

Analyzing expression of oxidative factors, PGC1-alpha and HIF1-alpha, we detect provocative results, such as high HIF1-alpha expression statistical significant in patient with GC comparing to control group ($p < 0.005$), as well as in male ($p < 0.01$) and under 60 years



($p < 0.01$), both comparing to control group. On the other hand, we did not find high expression of the coactivator PGC1- α in GC group. Despite that, at regression linear model, we found a positive association between the expression of these sirtuins, PGC1- α and HIF1- α .

The carcinogenesis is results of a multistep process with genetic and environment implication. The trigger is often unknown, but efforts have been employed to prevent cell transformation even in the face of a malignant stimulus. Chemopreventive agents or others mechanism has been studied such as aspirin, microbiota and plant-derived substances [41,42]. It is well described a role of a plant-derived polyphenol, the resveratrol, widely promoted as a potential cancer chemopreventive agent. It is can stimulate yeast Sir2 and mammalian Sirt1, acting as a small molecule activators of sirtuins extending *Saccharomyces cerevisiae* lifespan [43,44].

At this point, we hypothesized that sirtuins should act in early stages, at least in model cancer (Fig. 4). This could justify our results of increasing sirtuins levels in earlier stages, with a less aggressive phenotype, up to a phase where the cancer itself can overcome the protective or initial effect of sirtuins. During the carcinogenesis, as the tumor grows, several processes are triggered to keep the malignance phenotype, such as angiogenesis, oxidate stress and multiple mutations, which in turn depends on the expression of related genes. This could indicate a new involvement of sirtuins in the more advanced stages of the disease. In our GC patients, we could visualize another interesting finding. Only in that with angio-lymphatic invasion, therefore related to peri-tumoral vessels, at pathologic sample, was seen a statistically significant association between the expression of SIRT1/SIRT3, SIRT1/PGC1- α and SIRT1/HIF1- α , through linear regression analysis. This pattern was not reproducible at patients without angio-lymphatic invasion. This fact could indicate the participation of sirtuins in angiogenesis process, for example, depending on the distinct cellular and molecular context.

PGC1- α is a multi-functional transcriptional coactivator that regulates the activities of multiple nuclear receptors and transcriptional factors involved in mitochondrial metabolism. In our study, we found non-statistic expression of PGC1- α in GC patients comparing to control group. The only difference was demonstrated between groups of 1-2 vs. 3-6 lymph-nodes compromised. There is evidence to indicate that SIRT1-mediated regulation of PGC-1 α activity may play a major role in the metabolic adaptations to energy metabolism in different tissues. In the liver, SIRT1 is known to control gluconeogenic activity by modulation of PGC-1 α [38]. Recent studies have found that PGC-1 α expression



decreases in various cancers, perhaps justifying our results, suggesting that decreased mitochondrial biogenesis may contribute to tumorigenesis and/or progression of human malignancies, and that the regulation of mitochondrial numbers may induce antitumor effects on malignant tumor cells [45].

Our study still reinforces the possibility that SIRT1 lies at the heart of a regulatory loop involving PGC1-alpha and other molecular players, such as peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) and lipin-1. This issue was addressed by Sugden and colleagues, who showed that SIRT1 controls the metabolic response to some nutrient and physiological signals via a common mechanism mediated by post-translation modifications (deacetylation) of both PPAR α and PGC-1 [46].

On the other side, HIF-1 alpha is found in high levels in malignant solid tumors, but not in non-cancer tissues or slow-growing tumors. In malignance tissues with high growth rates, HIF1-alpha is involved in the activation of numerous cellular processes, including resistance to apoptosis, over-expression of drug efflux membrane pumps, vascular remodelling, angiogenesis, and metastasis. HIF1-alpha is frequently overexpressed in human GC, but while inhibition of HIF1-alpha has antitumor activity in rodent models, the relevance of HIF1-alpha for the metastatic phenotype of gastric adenocarcinoma remains uncertain [47].

In our study, we detected a high expression of HIF1-alpha, particularly in early-stage GC, such as cases with grade 1 differentiation and less lymph-nodes involvement. Of note, overexpression of SIRT3 inhibits the stabilization of HIF1-alpha protein in hypoxia and attenuates increases in HIF1-alpha transcriptional activity. Overexpression of SIRT3 decreases tumorigenesis in xenografts, even when induction of the sirtuin occurs after tumor initiation [48]. These data suggest that SIRT3 acts to suppress the growth of tumors, at least in part through its ability to suppress reactive oxygen species and HIF1-alpha. Our findings of a high expression of HIF-1 alpha in cases with less advanced pathological features conflict with those reported by Rohwer et al., who found that high expression of the HIF1-alpha was associated with migration, invasion and adherence, thus, a probably more aggressive and advanced disease [47]. If the high expression of sirtuins, especially SIRT3, favours the decreasing expression and/or activity of HIF1-alpha is a question that requires further studies for clarification. Furthermore, there is substantial evidence in the literature pointing to a strong association between the lifespan of a broad range of living beings and calorie restriction, production of oxidative radical species, tumor metabolism, Warburg effect and expression of sirtuins, HIF1-alpha and PGC1-alpha suggesting this is a multifactorial pathway that should be evaluated in most types of cancer (Fig. 5).



As demonstrated, there was an association between SIRT1, that act as a deacetylase, and PGC1-alpha. This, in turn, is as a coactivator, present in great quantity in tissues rich in mitochondria. Regularly, PGC1-alpha acts decreasing levels of reactive oxygen species (ROS), but in other cases may increase it level. It is well established that ROS stimulate the expression of HIF which acts stimulating glycolysis and decreasing oxidative phosphorylation. On the other hand, HIF1-alpha can still inhibit the expression of PGC1- alpha through microRNA such as miRNA 696 and Dec1 [49].

Queiroz et al, recently, demonstrated that the metabolic stress associated a mitochondrial function leads to expression of microRNA mir-696 which decrease de expression of PGC1 alpha, impairing mitochondrial function in muscle cells [49]. These data could justify the low expression level of PGC1-alpha in our patients. Similarly, it is well described the role of HIF1-alpha in the process of hypoxia. However, some evidence has demonstrated that a helix-loop transcription factor Dec1 is a hypoxia inducible gene that could repress the PGC1-alpha. In previous studies. Dec1 supress PPARGama2 and PGC1- alpha during HIF-stabilition and myogenesis, and other evidence suggest this same regulation at cancer, such as renal cancer. Consistent with an essential role for Dec1 as an effector of HIF-mediated PGC1-alpha suppression, genetic inhibition Dec1 abrogated suppression of PGC-1alpha expression in hypoxia. Supporting this idea, Dec1 is inversely correlated to PGC1 alpha in cancer [50].

Our data can support this logic, since despite the high expression of HIF in our patients, we did not find correspondence with elevation of PGC1 alpha. Thus, HIF would repress the expression of PGC1 alpha through high expression miRNA-696 and/or Dec1 (Fig. 6).

Conclusion

In conclusion, our data suggest that the expressions of SIRT1 and SIRT3 in human GC samples in a Western population are associated with less aggressive malignant phenotype at early phase of disease. Moreover, the high expression levels of SIRT1 and SIRT3 are correlated with the expression of PGC1-alpha and HIF1-alpha, suggesting again a role in the oxidative process in gastric cancer cells. We consider these results not definitive but at least provocative and hypotheses-generating. Further studies are needed to replicate these findings and to determine their implication in clinical practice. Other questions need to be addressed in future studies, such as differences in the expression pattern of sirtuins and oxidative factors



between Western and Eastern populations, especially if we consider the environmental influence on epigenetic modifications.

Perspective

While we considerable more investigations required, a causative role for oxidative stress in cancer remains one of the most solid questions to be addressed. Our study has demonstrated that sirtuins are intimately linked to the gastric cancer cell and oxidative metabolism. Moving forward, it will be important to develop clinical and experimental models in which the levels of other biomarkers, beyond PGC1 alpha and HIF1 alpha, such as miRNA 696 and Dec1 and the activities of sirtuins can be precisely modulated to determine if sirtuins have a prognostic favorable or not. We look forward to future studies that will undoubtedly address many of these important questions.

References

- [1] World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 2012.
- [2] Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil 2016.
- [3] Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014;513:202–9. doi:10.1038/nature13480.
- [4] Riquelme I, Saavedra K, Espinoza JA, Weber H, García P, Nervi B, et al. Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathway-driven targeted therapy. *Oncotarget* 2015;6:24750–79. doi:10.18632/oncotarget.4990.
- [5] Chia N-Y, Tan P. Molecular classification of gastric cancer. *Ann Oncol* 2016;27:763– 9. doi:10.1093/annonc/mdw040.
- [6] Bickenbach K, Strong VE. Comparisons of gastric cancer treatments: East vs. West. *J Gastric Cancer* 2012;12:55–62. doi:10.5230/jgc.2012.12.2.55.
- [7] Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro- oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): An international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2014;383:31–9.



- doi:10.1016/S0140-6736(13)61719-5.
- [8] Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, et al. Phase III Study of Docetaxel and Cisplatin Plus Fluorouracil Compared With Cisplatin and Fluorouracil As First-Line Therapy for Advanced Gastric Cancer: A Report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol* 2006;24:4991–7. doi:10.1200/JCO.2006.06.8429.
- [9] Cunningham D, Starling N, Rao S, Iveson T, Nicolson M, Coxon F, et al. Capecitabine and Oxaliplatin for Advanced Esophagogastric Cancer. *N Engl J Med* 2008;358:36–46. doi:10.1056/NEJMoa073149.
- [10] Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376:687–97. doi:10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
- [11] Beyond the genome. *Nature* 2015;518:273.
- [12] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6–21. doi:10.1101/gad.947102.6.
- [13] Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: Beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22:50–5. doi:10.1016/j.gde.2012.02.008.
- [14] Workman JL, Kingston RE. Alteration of Nucleosome Structure As a Mechanism of Transcriptional Regulation. *Annu Rev Biochem* 1998;67:545–79. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.545.
- [15] Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* 2009;277:8–21. doi:10.1016/j.canlet.2008.08.016.
- [16] Weichert W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett* 2009;280:168–76. doi:10.1016/j.canlet.2008.10.047.
- [17] Joo HY, Yun M, Jeong J, Park ER, Shin HJ, Woo SR, et al. SIRT1 deacetylates and stabilizes hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) via direct interactions during hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;462:294–300. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.119.
- [18] Cantó C, Auwerx J. PGC-1 β , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 2009;20:98–105. doi:10.1097/MOL.0b013e328328d0a4.
- [19] Warneke VS, Behrens H-M, Hartmann JT, Held H, Becker T, Schwarz NT, et al. Cohort study based on the seventh edition of the TNM classification for gastric cancer: proposal of a new staging system. *J Clin Oncol* 2011;29:2364–71.



- doi:10.1200/JCO.2010.34.4358.
- [20] INCA. Instituto Nacional de Câncer 2018.
- [21] Avital I. Regional chemotherapy for pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 2011;104:453. doi:10.1002/jso.21975.
- [22] Pitts TM, Kim J, Tan A-C, You YN, Eng C, Eckhardt SG, et al. Emerging transcriptional landscape and putative therapeutic strategies in young patients with metastatic colorectal cancer (CRC). *J Clin Oncol* 2015;33:e14627–e14627. doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.e14627.
- [23] Panza S, Santoro M, De Amicis F, Morelli C, Passarelli V, D'Aquila P, et al. Estradiol via estrogen receptor beta influences ROS levels through the transcriptional regulation of SIRT3 in human seminoma TCam-2 cells. *Tumor Biol* 2017;39:0–7. doi:10.1177/1010428317701642.
- [24] Alleles R, Identified MS, Study G. *New England Journal. J Med* 2007;11–20. doi:10.1056/NEJMoa1201161.
- [25] Crawford J. The gastrointestinal tract. In: Robbins SLCR, Kumar V, Schoen FJ. *Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia WB Saunders Co 1994:755–783.
- [26] Yokota T, Kunii Y, Teshima S, Yamada Y, Saito T, Takahashi M, Kikuchi S YH. Significant prognostic factors in patients with node-negative gastric cancer. *Int Surg* 1999;84:331–6.
- [27] Pinto-de-Sousa J, David L, Seixas M, Pimenta A. Clinicopathologic Profiles and Prognosis of Gastric Carcinomas from the Cardia, Fundus/Body and Antrum. *Dig Surg* 2001;18:102–10.
- [28] West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest* 2014;124:30–9. doi:10.1172/JCI69738.30.
- [29] Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 2005;37:391–400. doi:10.1038/ng1531.
- [30] Carafa V, Rotili D, Forgione M, Cuomo F, Serretiello E, Hailu GS, et al. Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic. *Clin Epigenetics* 2016;8. doi:10.1186/s13148-016-0224-3.
- [31] Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 2001;107:149–59.
- [32] Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001;107:137–48.



- doi:10.1016/S0092-8674(01)00524-4.
- [33] Bosch-Presegué L, Vaquero A. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes and Cancer* 2011;2:648–62. doi:10.1177/1947601911417862.
- [34] Deng CX. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *Int J Biol Sci* 2009;5:147–52. doi:10.7150/ijbs.5.147.
- [35] Huang G, Cui F, Yu F, Lu H, Zhang M, Tang H, et al. Sirtuin-4 (SIRT4) is downregulated and associated with some clinicopathological features in gastric adenocarcinoma. *Biomed Pharmacother* 2015;72:135–9. doi:10.1016/j.biopha.2015.04.013.
- [36] Yang B, Fu X, Shao L, Ding Y, Zeng D. Aberrant expression of SIRT3 is conversely correlated with the progression and prognosis of human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;443:156–60. doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.068.
- [37] Cha EJ, Noh SJ, Kwon KS, Kim CY, Park B-H, Park HS, et al. Expression of DBC1 and SIRT1 Is Associated with Poor Prognosis of Gastric Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:4453–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3329.
- [38] Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, et al. Sirtuin 1 and Sirtuin 3: Physiological Modulators of Metabolism. *Physiol Rev* 2012;92:1479–514. doi:10.1152/physrev.00022.2011.SIRTUIN.
- [39] Yang G, Sau C, Lai W, Cichon J, Li W. *HHS Public Access* 2015;344:1173–8. doi:10.1126/science.1249098.Sleep.
- [40] Zhang L, Wang X, Chen P. MiR-204 down regulates SIRT1 and reverts SIRT1- induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells. *BMC Cancer* 2013;13:1. doi:10.1186/1471-2407-13-290.
- [41] Drew DA, Cao Y, Chan AT. Aspirin and colorectal cancer: The promise of precision chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 2016;16:173–86. doi:10.1038/nrc.2016.4.
- [42] Bultman SJ. The Microbiome and Its Potential as a Cancer Preventive Intervention. *Semin Oncol* 2017;43:97–106. doi:10.1053/j.seminoncol.2015.09.001.The.
- [43] James M, Howells L, Ognibene T, Malfatti M, Hemingway D, Steward WP, et al. Less is more for cancer chemoprevention: evidence of a non-linear dose response for the protective effects of resveratrol in humans and mice. *Sci Transl Med* 2016;7:1–27. doi:10.1126/scitranslmed.aaa7619.Less.
- [44] Zheng W, Zhang H, Jin Y, Wang Q, Chen LLL, Feng Z, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2014;19:191–6. doi:10.1038/nature01965.1.



- [45] Onishi Y, Ueha T, Kawamoto T, Hara H, Toda M, Harada R, et al. Regulation of mitochondrial proliferation by PGC-1 α induces cellular apoptosis in musculoskeletal malignancies. *Sci Rep* 2014;4:4–11. doi:10.1038/srep03916.
- [46] Sugden MC, Caton PW, Holness MJ. PPAR control: It's SIRTainly as easy as PGC. *J Endocrinol* 2010;204:93–104. doi:10.1677/JOE-09-0359.
- [47] Rohwer N, Lobitz S, Daskalow K, Jöns T, Vieth M, Schlag PM, et al. HIF-1 α determines the metastatic potential of gastric cancer cells. *Br J Cancer* 2009;100:772– 81. doi:10.1038/sj.bjc.6604919.
- [48] Bell EL, Emerling BM, Ricoult SJH, Guarente L. SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1 α and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene* 2011;30:2986–96. doi:10.1038/onc.2011.37.
- [49] QUEIROZ AL. O microRNA miR-696 regula a expressão da proteína PGC-1 α e induz à disfunção mitocondrial em células musculares de camundongos através do sistema SNARK/miR-696/PGC-1 α [online], Ribeirão Preto: , Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2016.
- [50] LaGory EL, Wu C, Taniguchi CM, Ding C-KC, Chi J-T, Eyben R von, et al. Suppression of PGC-1 α is critical for reprogramming oxidative metabolism in renal cell carcinoma. *Cell Rep* 2015;12:116–27. doi:10.1039/C5RA11250H.Thermal.



TABLE

Table 1. Demographic and pathological features of histological non-gastric cancer tissue (control) from obese individuals and patients with gastric cancer (GC).

Patient characteristics	Control (n=18)	GC (n=64)
Mean age (range), years	36 (21-60)	59.5 (23-84)
Males/females (%)	18/82	64/36
Tumor characteristics		
Stage, %		
I/II/III/IV	NA	9.8/20.8/41.7/2.8
Lymph-node involvement, %	NA	
0/1-2/3-6/7-15/>15	NA	20/14.3/17.1/20/1.4
Histological grade, %	NA	
G1/G2/G3	NA	14.1/12.7/32.4

G1, G2, G3 = well, moderately and poorly differentiated. NA = Non-applicable

FIGURES

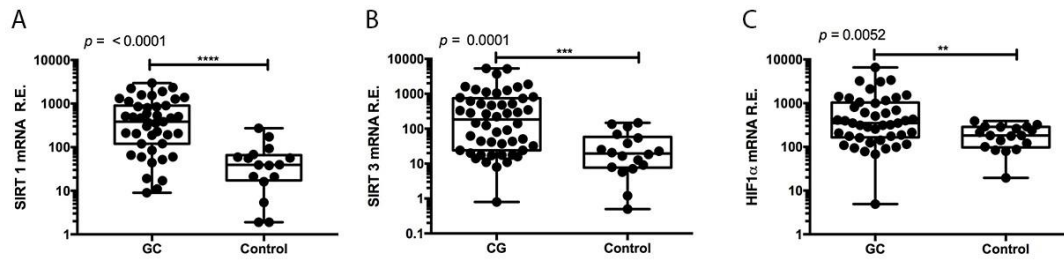


Figure 1. mRNA relative expression of SIRT1 (A), SIRT3 (B) and HIF1- α (C) of gastric cancer patients in comparison of non-cancer patients.

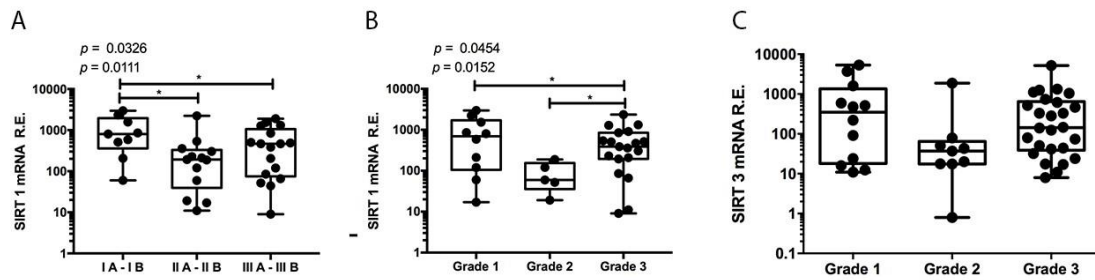


Figure 2: mRNA relative expression of SIRT1 and staging (A), SIRT1 and histologic grade (B) and SIRT3 and histologic grade (C).

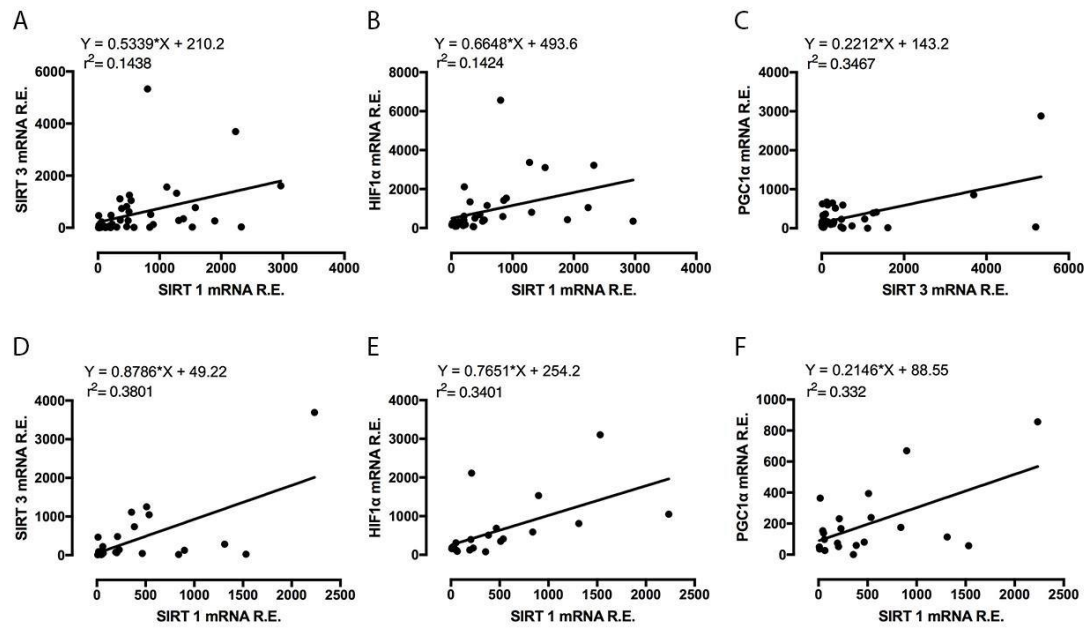


Figure. 3: Association between sirtuins and oxidative factors by linear regression

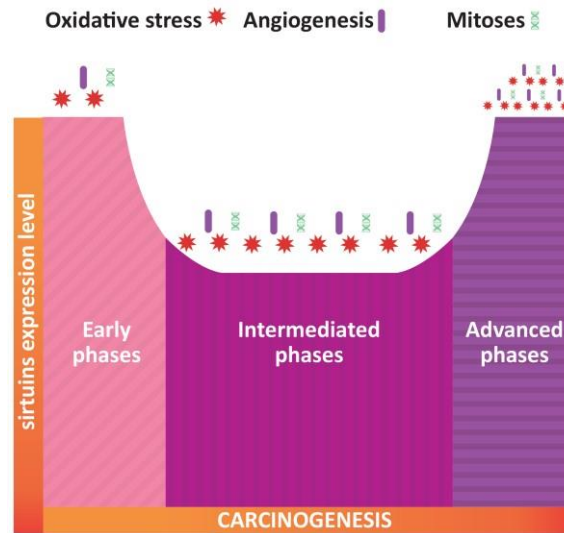


Figure 4: Multistep of carcinogenesis. As the tumor volume, the demand for oxygen and degree of differentiation increases, the oxidative stress, angiogenesis and the presence of mutations elevate, as well. The sirtuin level follow this pattern, according to our results.

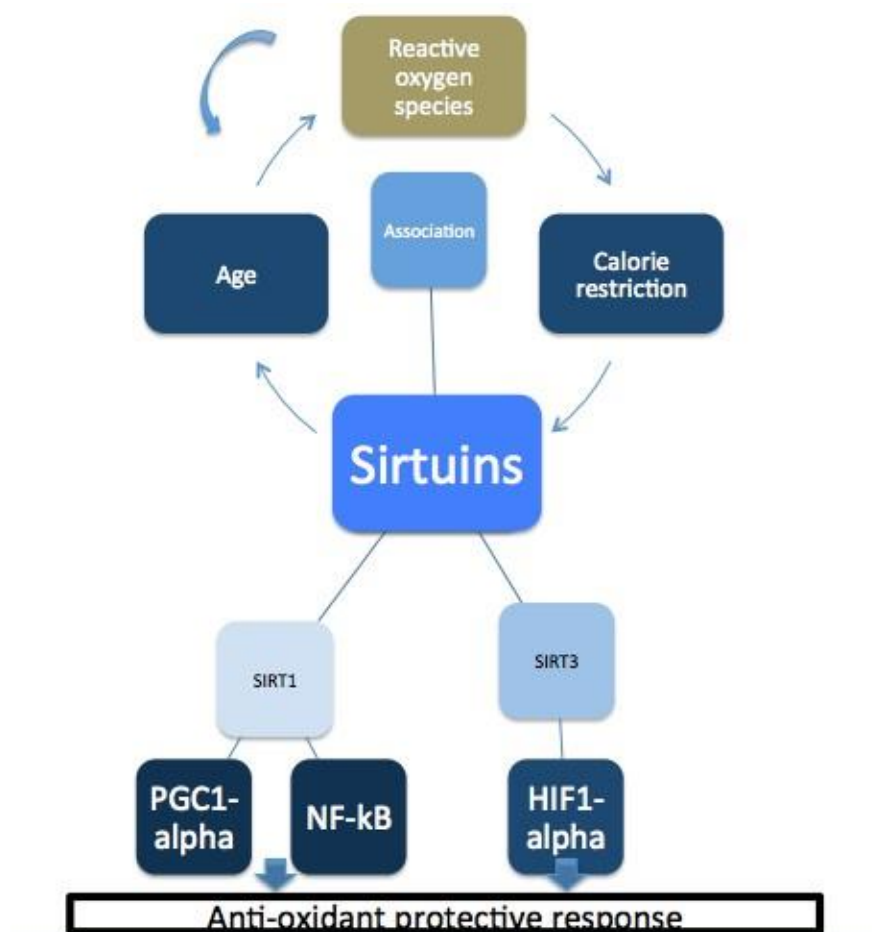


Figure 5. Sirtuins and their association with age, calorie restriction and production of reactive oxygen species. Sirtuins are important regulators of lifespan and caloric restriction, leading to longevity from yeast to mammals. Caloric restriction decreases the production of reactive oxygen species, thus minimizing oxidative damage, leading to the hypothesis that caloric restriction extends the lifespan by counteraction of aging. Besides that, SIRT1 and SIRT3 are epigenetic regulators of PGC1 alpha, NF-kB and HIF1 alpha, thus having a pivotal role in the anti-oxidant protective response, contributing to increasing cell survival and caloric restriction, directly or indirectly.

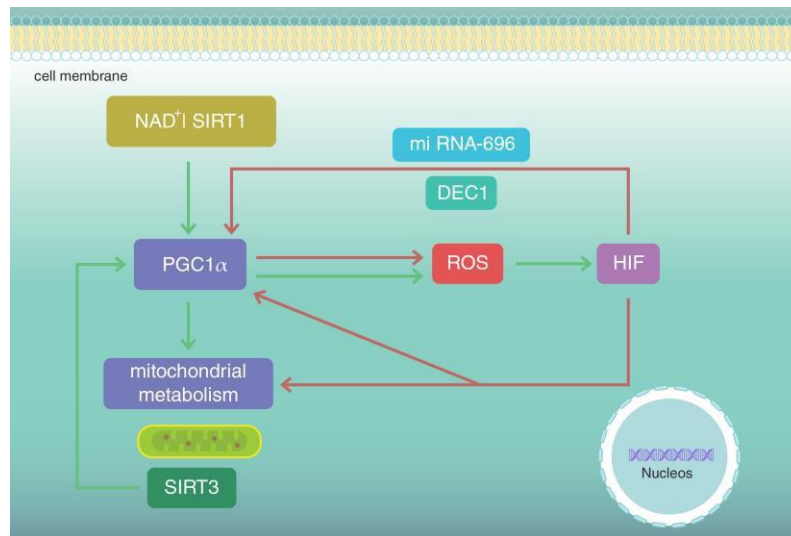


Figure 6: Integration between SIRT1, SIRT3, PGC1 alpha and HIF1 alpha. SIRT1, a NAD⁺ dependent deacetylase regulates positively the expression of PGC1 alpha which participate of metabolism mitochondrial, where SIRT3 is localized. PGC1 alpha still, acting as a sensor of requirement of oxygen can acts as an anti- or oxidant agent, promoting accumulation of ROS. HIF also acting indirectly by inhibiting PGC1 via mRNA action and expression of Dec 1 or directly on mitochondrial metabolism. Legends: NAD: nicotinamide adenine dinucleotide; SIRT 1: sirtuin 1; PGC1 apha : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator subunit 1; SIRT3: sirtuin 3; ROS: Reactive oxygen species; miRNA: microRNA. green arrow means positive stimulus and red negative stimulus.

SUPPLEMENTARY FIGURES

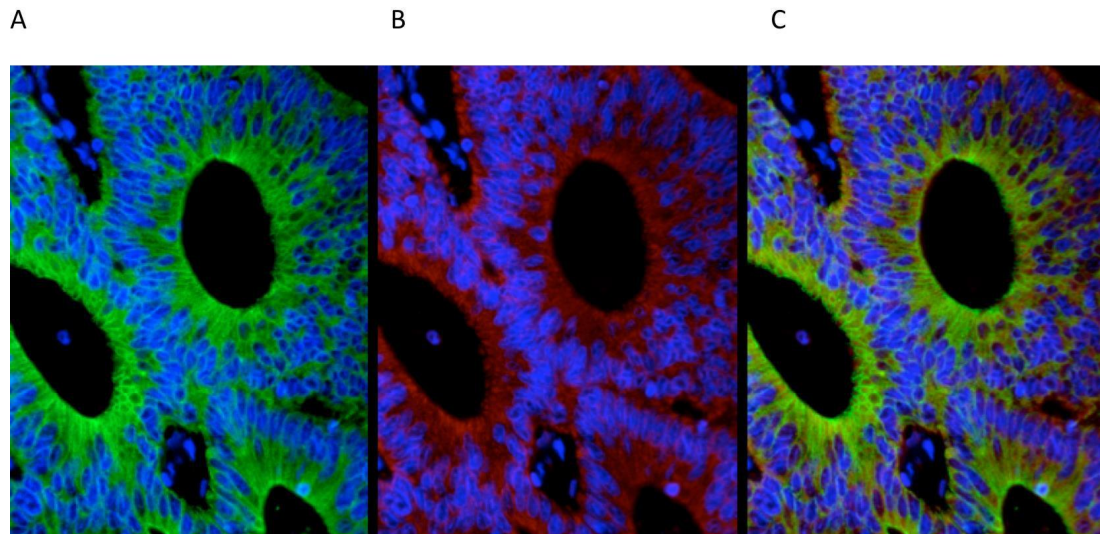


Figure 7. SIRT1 is upregulated in human gastric cancer (GC). A-C, GC tissue specimens were analyzed for SIRT1 expression using immunofluorescence. SIRT1 expression is stained in red and epithelial cells are stained in green, Original magnification, x20. A: Pan-Keratin/DAPI, GC; B: SIRT1/DAPI, GC; C: Merge, x20.

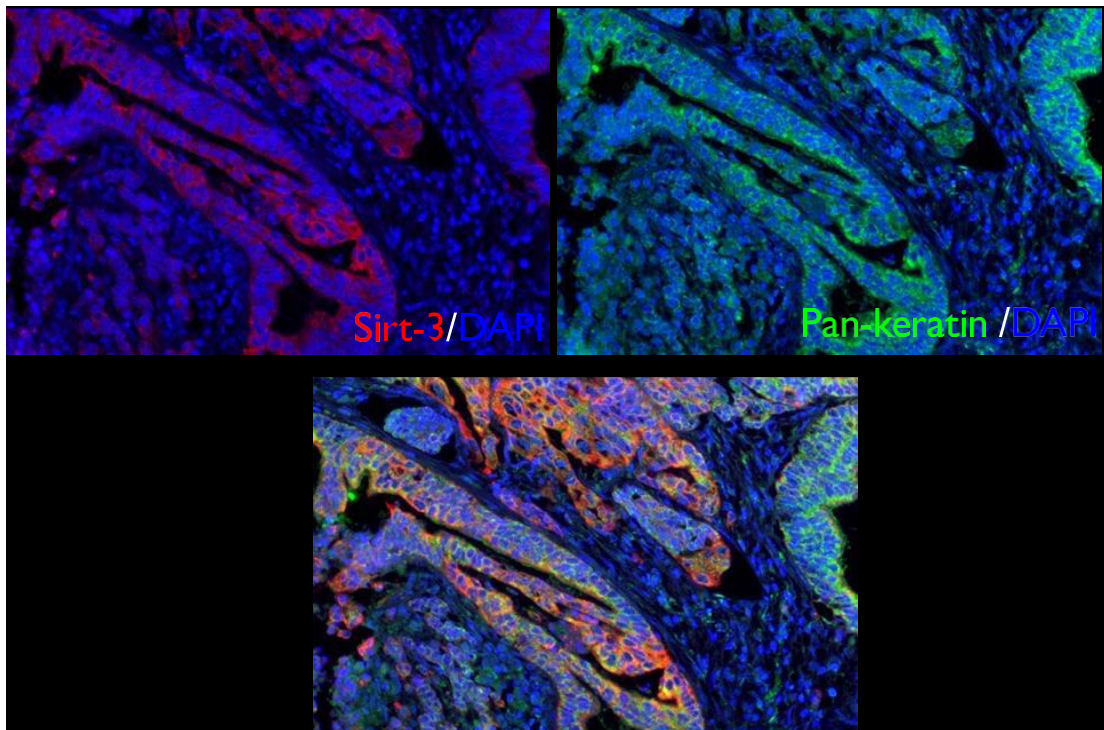


Figure 8: . SIRT3 is upregulated in human gastric cancer (GC). A-C, GC tissue specimens were analyzed for SIRT3 expression using immunofluorescence. SIRT3 expression is stained in red and epithelial cells are stained in green, Original magnification, x20. A: Pan-Keratin/DAPI, GC; B: SIRT1/DAPI, GC; C: Merge, x20



7 CAPÍTULO IV

Artigo Original 2[□]

Medical Treatment of Gastric Cancer: New Challenges, New Horizons

Luiz Alberto Mattos-Jr.,¹

¹*Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife - PE - CEP: 50670-901, Brazil.*

²*Division of Medicine, University College London (UCL) Medical School, Royal Free Campus, London NW3 2PF, United Kingdom.*

Correspondence should be addressed to: Luiz Alberto Mattos-Jr.;
luizalbertomattos@uol.com.br

[□]Esse artigo trata de uma atualização do tratamento gástrico, seus desafios atuais e horizontes a serem desbravados, desenvolvido em co-autoria com a *University College of London (UCL) Medical School, Royal Free Campus, London, United Kingdom.*



Abstract

The treatment of gastric cancer has changed in recent years. Progress in surgical management of the primary tumor, and an increased understanding of the genomics and cellular biology of the disease, have led to new rational therapeutic strategies. The introduction of extended lymphadenectomy has improved primary tumour management, while application of perioperative chemotherapy has increased overall survival. By contrast, the value of radiotherapy has been questioned and treating early or advanced disease with new agents that target the tumor vasculature or suppress activation of intracellular oncogenic pathways has not always altered outcomes, except use of Trastuzumab in HER2-expressing cancers. Here, we summarize data from recent key studies on the surgical management and systemic treatment of gastric cancer to provide a present-day summary of the histology, genomics, staging and prognosis of the disease, control of the primary tumor and an overview of mainstay therapeutics. The review concludes with a description of exciting new data from a class of immunomodulatory agents currently in clinical trials; these have potential to be the basis of new treatment approaches for patients with advanced gastric cancer.



Introduction

In 2012, there were an estimated 1 million new cases of gastric cancer diagnosed worldwide, a 139,000 in the USA where it is estimated that this will increase by about 26,000 in 2016 [1-3]. In all European countries, there were approximately 140,000 new cases in 2010, making it the sixth commonest cancer to be diagnosed. Perhaps, more importantly, it remains the fourth commonest cause of cancer-related death, being responsible for 107,000 deaths annually [4].

Despite a gradual decline in the worldwide incidence of gastric cancer, there has been a relative increase in the incidence of tumors of the gastro-oesophageal junction (GOJ) and gastric cardia. There is a marked geographic variation, with the highest rates reported in East Asia, South America and Eastern Europe and the lowest rates in the USA and Western Europe [5].

Usually, many clinical trials when evaluating gastric cancer include GOJ cancer as well, while other trials addressing oesophageal cancer include patients with gastric cancer. Thus, at least regarding to the most important trials have included patients of both diseases, we will follow the same approach in this review. Nevertheless, it should be recognized that some evidence shows important differences between gastric cancer and GOJ cancer, while the first is usually divided into four types each one with distinct gene and molecular expression patterns (see below), the latter has some genic differences as well, if we analyze in detail its three topographic types.

Classification beyond Histological Criteria: Molecular Subtypes

In clinical practice, we have seen gastric cancer patients with apparent phenotypic similarities in which tumour behaviour, aggressiveness and response to treatment are totally different. Indeed, the frequent diagnosis in young patients, many under 25 years old, might indicate an unknown mechanism of carcinogenesis beyond genetic mutations, perhaps, for example, involving epigenetic factors.

Emerging findings at the molecular level is beginning to change the management of patients with gastric cancer, and will have further impact in the future. Until two years ago, the pathological classification of gastric cancer adenocarcinoma was based on two histological subtypes, intestinal versus diffuse with the latter having a worse prognosis. This changed in 2014 when The Cancer Genome Atlas Research Network proposed a molecular characterization dividing gastric cancers into four distinct subtypes: (i) tumors with

chromosomal instability (about 50% of all cases), which show marked aneuploidy and focal amplification of receptor tyrosine kinases, intestinal histology, RTK-RAS activation and association with TP53 mutations; (ii) gastric cancer with microsatellite instability and increased mutation rates (22% of patients), including mutations in genes encoding targetable oncogenic signalling proteins; (iii) genomically stable tumors (20% of cases), which associate with the diffuse histological variant, mutations of RHOA and CDH1, or fusions involving RHO-family GTPase-activating proteins; and (iv) those positive for Epstein-Barr virus (9% with a higher prevalence in males), most present in the gastric fundus or body with a strong link to PIK3CA mutations (80%) and immune cell signaling (Figure 1). This new molecular and pathological classification is expected to inform future study designs, and hence provide a road map for patient stratification and clinical trials of targeted therapies that address the underlying molecular aberration in individual patients [6].

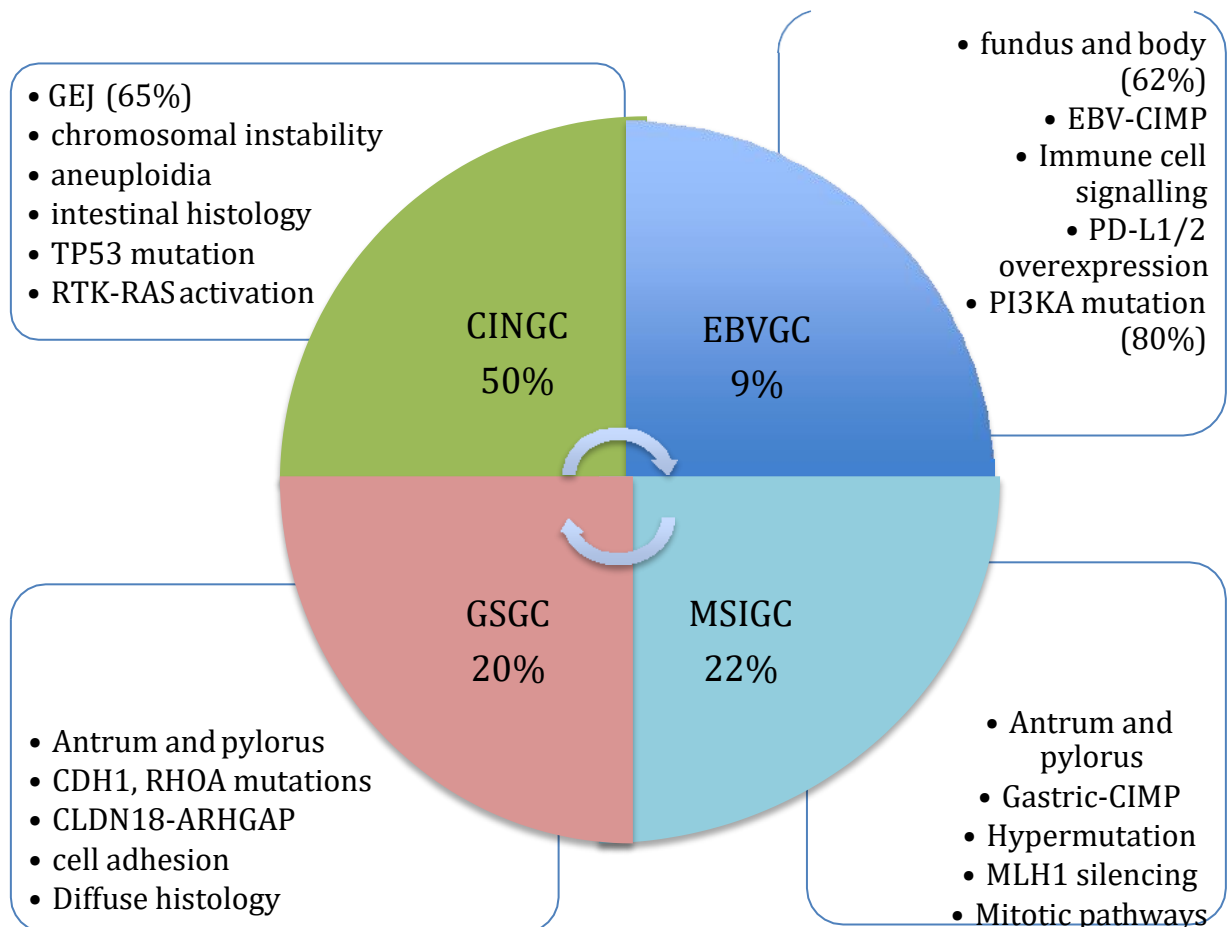


FIGURE 1: Molecular classification of gastric cancer. GOJ, gastro-oesophageal junction cancer; CINGC, chromosomal instability gastric cancer; GSGC, genomically stable gastric cancer; MSIGC, microsatellite instability gastric cancer; EBVGC, Epstein–Barr virus gastric cancer.



Staging: an essential addition?

While a histological and molecular combination is proving of great value for accurate diagnosis and classification of gastric cancers, it is also essential to include the detailed staging of disease. Indeed, histopathological examination and staging, the two initial diagnostic steps, are likely crucial for effective patient management to avoid over-, or even, under-treatment.

The International Union Against Cancer (now called Union for International Cancer Control, UICC) adopted in 1997 a new classification system for lymph node metastases [7] which, unlike the Japanese system, was based on the number of positive nodes, not their anatomical location [8]. It was recommended that at least 15 lymph nodes should be removed and examined for proper staging [9] (Tables 1 and 2).

TABLE 1. TNM classification of gastric cancer

Primary tumor (T)	
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial tumor without invasion of the lamina propria
T1	Tumor invades lamina propria, muscularis mucosae, or submucosa
T1a	Tumor invades lamina propria or muscularis mucosae
T1b	Tumor invades submucosa
T2	Tumor invades muscularis propria
T3	Tumor penetrates subserosal connective tissue without invasion of visceral peritoneum or adjacent structures
T4	Tumor invades serosa (visceral peritoneum) or adjacent structures
T4a	Tumor invades serosa (visceral peritoneum)
T4b	Tumor invades adjacent structures
Regional lymph nodes (N)	
NX	Regional lymph node(s) cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in 1-2 regional lymph nodes
N2	Metastasis in 3-6 regional lymph nodes
N3	Metastasis in seven or more regional lymph nodes
N3a	Metastasis in 7-15 regional lymph nodes
N3b	Metastasis in 16 or more regional lymph nodes
Distant metastasis (M)	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis



TABLE 2. Anatomic stage/prognostic groups

Stage	0	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IV
T	Tis	T1	T2 T1	T3 T2 T1	T4a T3 T2 T1	T4a T3 T2	T4b T4b T4a T3	T4b T4b T4a	Any T
N	N0	N0	N0 N1	N0 N1 N2	N0 N1 N2 N3	N1 N2 N3	N0 N1 N2 N3	N2 N3 N3	Any N
M	M0	M0	M0 M0	M0 M0 M0	M0 M0 M0 M0	M0 M0 M0	M0 M0 M0 M0	M0 M0 M0	M1

Today, upper endoscopy and a computerized tomography scan of chest and upper abdomen are mandatory prior to any treatment. Additional imaging examinations are generally guided by symptoms. The value of endoscopic ultrasonography (EUS) remains uncertain and physicians should be aware that EUS performance is low in diagnosing superficial tumors (T1a versus T1b) and defining lymph node status (positive versus negative) [10]. Nevertheless, EUS is helpful in determining the proximal and distal extent of the tumour and in further assessment of the T and N stages, although it is less useful in antral tumours according to a recent European Society of Medical Oncology (ESMO) guideline [11].

Increasingly, positron emission tomography (PET) imaging is proving valuable for accurate staging through increased detection of involved lymph nodes/metastatic disease, for monitoring response to therapy, and for detecting cancer recurrence. However, not all types of gastric cancer have a high affinity for fluorodeoxyglucose, the commonly used radionuclide tracer; for example, a PET scan is often uninformative in many patients with mucinous tumors [11]. Notwithstanding, several studies favour use of this evolving imaging technology [12].

The importance of staging laparoscopy to give precise patient information without morbidity is evident from recognition that in 20% to 30% of cases peritoneal involvement can be found, even though imaging examinations do not demonstrate advanced disease. This confirms its importance in staging gastrointestinal malignancies, and will also limit the number of unnecessary laparotomies for carcinomatosis or occult metastasis. Currently, laparoscopy ($\pm$ peritoneal washings for malignant cells, see below) is recommended in all stage IB to III gastric cancers that are considered resectable to exclude the presence of occult metastatic disease [11, 13, 14].

Surgery Treatment: Paradigms and Challenges

Early disease – local surgery

The world-wide standard of care for curable gastric cancer is open gastric resection with complete D2 lymphadenectomy. Nevertheless, a long-standing debate on the extent of



lymphadenectomy continues, although some endoscopic techniques, such as submucosal dissection, are recognized as appropriate for selected patients with T1 tumors [15]. Controversies still persist, however, regarding laparoscopic gastric resection (LGR) and sentinel node mapping, in those patients unfit for endoscopic resection or who have more advanced tumors. Other points to be clarified are how to proceed if peritoneal washes are positive, how to overcome the high rate of local and distant recurrences (only 25-30% of patients are disease free at 5 years when all surgical cases are grouped independently of stage), and finally what role should surgery have in advanced disease.

Gastric carcinoma shows a high tendency to lymph node metastasis. The risk of regional nodal involvement increases with deep penetration through the gastric wall [16], and nodal extension of the cancer takes place gradually, radiating from its primary location via the lymphatic system [17, 18]. Nodal metastases are observed in 3% to 5% of gastric carcinomas that are limited to the mucosa, in 11% to 25% of those that extend to the submucosa, in 50% of those that reach the muscularis (T2), and in 83% of those that extend to the serosa (T3) [19, 20]. After curative radical resection, local recurrence is represented, in 87.5% of cases, by nodal metastases to local or regional lymph node stations [21, 22].

In Western countries, the prognostic value of D2 over D1 lymphadenectomy is still controversial, while in Asian countries D2 procedures are considered standard and likely to become more common. Indeed, Japanese surgeons have not evaluated adjuvant radio-chemotherapy when comparing D1 and D2 lymphadenectomies, on the grounds that D1 dissections are unethical. Data indicate that D2 dissection is an adequate and potentially beneficial staging and treatment approach, provided operative mortality is avoided. Dissections extended to para-aortic lymph nodes do not show significant advantages in terms of survival. Splenectomy and distal pancreatectomy increase operative morbidity and mortality. D2 dissection is considered a difficult procedure, and should be performed by experienced surgeons in specialized centers. Surgeons are also recommended to perform at least 200 gastrectomies while supervised by an experienced colleague to ensure expertise in D2 lymphadenectomies with acceptable morbidity and mortality rates [9, 23].

Minimally-invasive surgical methods, such as laparoscopy or robotic platforms, are relatively new technologies for treating gastric cancers with surgeons from Asian countries pioneering their introduction and development. In particular, results from robotic surgery are promising with the procedure viewed as safe, reproducible and easy to learn. Selection of the best technique for individual patients with gastric cancer remains a challenge, while the difficulty in studying homogeneous patient groups in terms of staging, comorbidities and



(neo)adjuvant therapies makes it hard to establish a clear indication for robotic gastrectomy. Weighing treatment options is likely to assume increasing importance as more groups report acceptable results for robotic surgery [24].

Positive peritoneal washes. Peritoneal cytology in patients with gastric cancer is a controversial issue, especially as the 7th edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC)/UICC TNM staging system classifies a positive cytology result as distant metastasis [25].

The diagnostic accuracy is always another challenge when we analyze the role of peritoneal washing cytology, which usually depends on some factors such as the method adopted and reporting pathologist. It is described that 7.8% of cytologically negative patients initially, had in subsequent analyze peritoneal metastasis (PM), while about half of PM patients had negative cytology [26]. These proportions might be interpreted as false- negatives. However, cytological differentiation of cancer cells from mesothelial cells requires a highly qualified and experienced pathologist; in addition, a detailed method for pathological examination of peritoneal cytology was not described in the 7th staging manual edition [25].

The staging system should be uniformly applied internationally and show consistent survival results. This should allow communication and standardization of treatment, although the N classification of the 7th staging manual edition was considered inappropriate, perhaps because of an ethnicity difference [27]. In a retrospective study in patients with gastric cancer, Lee et al [28] found a positive peritoneal washing cytology to be a negative prognostic factor for those with, and also those without, overt peritoneal metastases. However, resection of clinical stage N0–2 tumours was suggested for patients with positive cytology without overt peritoneal metastases.

Surgery alone is not enough

In Western countries, the 5-year survival rates for advanced gastric carcinoma treated with potentially curative surgery range between 25% and 30% [29]. Recurrences occur in the abdomen in 40% to 60% of the cases, both as the only site and as part of a systemic diffusion of disease [21, 30, 31]. The most frequent abdominal site of recurrence is the area previously occupied by the tumor, the anastomosis and the non-resected regional lymph nodes. These data show that surgery, as a single modality treatment, cannot detect and remove the satellite micrometastases around the primary tumor, nor the tumor cells disseminated during the operative manoeuvres. Pre-, intra- and post-operative treatments have been developed over the last few decades to improve locoregional control of disease and long term survival, using



chemotherapy and/or radiotherapy.

Trials have shown that locoregional recurrence rates in a surgery alone arm are in the order of 20% [30] to 70% [33] depending on the quality and extent of the surgery. Even if we consider trials with a high compliance for D2 dissections, locoregional recurrence remains a significant problem with a range of 32-42% [34]. This pattern of recurrence suggests good potential for chemo- or radiotherapy alone, or in combination, to play major roles in optimizing the management of patients with locally advanced gastric cancer [35]. The effectiveness of such adjuvant therapy has been confirmed as illustrated in Table 3.

TABLE 3: Pattern of recurrence following surgery alone in selected randomized trials. RT, radiotherapy; CT, chemotherapy; CRT, chemoradiotherapy.

Study	Patient numbers	Locoregional recurrence	
Hartgrink <i>et al.</i> [36]	D2 vs. D1 dissection 331 vs. 380	D2 31.8% (95/299)	DI 42.2% (154/365)
Zhang <i>et al</i> [37]	Preoperative RT vs. surgery alone 171 vs. 199	Preoperative RT 38.6%	Surgery 51.7% (P<0.025)
Cunningham <i>et al.</i> [32]	Preoperative CT vs. surgery alone 250 vs. 253	Perioperative CT 14.4% (36/250)	Surgery 20.6% (52/253)§
Macdonald <i>et al.</i> [33, 34]	Postoperative CRT vs. surgery alone 120 vs. 177	Postoperative CRT 65.0% (78/120)	Surgery 71.8% (127/177)

Chemotherapy

Early studies: 1993-2010. Can systemic treatment alone be used to prevent latter recurrence? Between 1993 and 2010 five meta-analysis studies addressed the role of adjuvant chemotherapy *versus* surgery alone for gastric cancer. In 1993, Hermanns *et al* [38] evaluated data from 11 trials with 2096 patients involved, but demonstrated no significant benefit with odds ratio of 0.88 (95% confidence interval [CI], 0.78 to 1.08), albeit it tending towards support of adjuvant treatment. Whether the use of drugs and/or chemotherapy regimens from these 11 older studies (each more than 25 years; 1982-1991) studies can explain the negative finding is a valid discussion point.

By contrast, four subsequent meta-analysis publications had different findings, each showing a small but positive survival benefit with this adjuvant strategy. Earle *et al* in 1999 [38] and Mari *et al* in 2000 [39] evaluated 13 and 20 trials, respectively, demonstrated marginal survival benefits, more evident in node-positive patients [39], but both had



limitations and emphasized the need for further trials. The next two reports of meta-analysis in 2002 [40] and 2010 [41] were larger, each with more than 3800 patients included; these also showed survival benefit with odds ratio from 0.84 to 0.82, even though the data was obtained from very heterogeneous trial groups.

Of particular note was the finding of Janunger et al [40] that survival was only prolonged in Asian patients and not Westerners, with odds ratio of 0.58 and 0.96, respectively. This observation may suggest some differences in disease biology in respect to ethnicity, though as indicated above survival benefits were relatively small and other factors may have an influence. These include a heterogeneous population or low patient numbers or inclusion of many node-negative patients in certain individual trials; or the use of non-standard surgical procedures, chemotherapy regimens with poor completion or response rates, and patients in which less than 10% had advanced disease.

Modern drug studies. Chemotherapy using the modern drugs, capecitabine and oxaliplatin, was assessed in a recent phase III adjuvant trial (the CLASSIC study). Patients with stage II-III B gastric cancer who had had curative D2 gastrectomy were randomly assigned to receive adjuvant chemotherapy of eight 3-week cycles of oral capecitabine (1000 mg/m² twice daily on days 1 to 14 of each cycle) plus intravenous oxaliplatin (130 mg/m² on day 1 of each cycle) for 6 months, or surgery only. Three years disease-free survival was 74% (95% CI 69-79) in the chemotherapy and surgery group and 59% (53-64) in the surgery only group (Hazard Ratio [HR] 0.56, 95% CI 0.44-0.72; p<0.0001). It was suggested, therefore, that adjuvant capecitabine plus oxaliplatin therapy after curative D2 gastrectomy should be considered as a treatment option for patients with operable gastric cancer [42].

Another strategy mainly used in Europe is perioperative chemotherapy, the pivotal MAGIC trial published in 2006. Here, 250 patients were randomized in an experimental arm that received 3 cycles of ECF chemotherapy (each 3-week cycle comprised: epirubicin 50mg/m² IV day 1 + cisplatin 60mg/m² IV day 1 + 5-fluorouracil 200mg/m²/day as a continuous infusion for 21 days) followed by surgery and 3 additional cycles of the same ECF chemotherapy; the control arm was surgery alone. The primary endpoint was overall survival and secondary, progression-free survival, surgical resectability and quality of life. The 5 years survival increased from 23% to 36% in control *versus* the ECF chemotherapy arm, respectively with a 25% reduction of death risk (P=0.009). By multivariate analysis, experimental treatment effectiveness was unchanged after adjustment for age, gender, surgery performance or primary tumor site. Similarly, the progression-free survival was statistically significant in the experimental arm (HR 0.66; P=0.0001) [31].



In 2011, another phase III trial confirmed the MAGIC results using a similar study design except that the chemotherapy regimen omitted epirubicin. Instead, cisplatin 100mg/m² was infused on day 1 and 5-fluorouracil 800mg/m² on days 1-5 for 2 to 3 preoperative cycles and then for 3 to 4 cycles post-operative; again the comparison group was surgery alone. After eight years of data accrual and a median follow-up of 5.7 years, the authors reported an improved 5 years survival rate from 24% to 38% (HR 0.69; P=0.021) [43]. Previously, a third trial also using cisplatin and 5-fluorouracil had reported a more modest gain in 5 years survival rate (8% *versus* 13% to 14%) with a HR of 0.84 (P=0.03) [44]. Based on these three studies, perioperative CF chemotherapy is now a care standard, though mainly introduced in European countries.

Modern drug studies and staging. A recent ECF MAGIC-style perioperative chemotherapy trial compared tumour regression grades with survival rates and found a direct relationship.

The single variable, through the multivariate analysis, which was considerate an independent factor for disease-specific survival was the completion of perioperative chemotherapy (HR: 0.25; 95%CI: 0.08 – 0.79; p = 0.019). But, when analyzed T3 and T4 tumors and more than 4 positive lymph nodes this protective effect was not kept (HR: 1.16; 95%CI: 1.02–1.32; p = 0.029). In univariate analysis, on the other hand, the degree of tumor regression showed a light but statistical significance difference if compared major vs. minor responders. The 5 years overall and disease-specific survival rates were 18% and 22%, respectively. Thus, after preoperative chemotherapy, the percentage of major responder tumors was considerate low and only patients with gastric carcinomas T3 and T4 (with no invasion of the subserosa) with less than 4 positive lymph nodes may benefit [45].

Thus, perioperative chemotherapy improves overall and disease-free survival, induces tumour downstaging and may increase the R0 resection rate. Moreover, data from well-conducted randomized trials show that chemotherapy is better tolerated pre- than post-operative, though further research on biological predictive factors is needed to identify at diagnosis which patients will have benefit in terms of survival using multidisciplinary approach such as chemo pre- and/or post-operative.

5.2. Chemotherapy plus or minus radiotherapy. In the USA, at least, adjuvant chemoradiotherapy remains the standard care after surgery. The milestone that underpins this treatment strategy is the multicentre trial of Intergroup 0116 (SWOG 9008). First published in 2001 [30], with an updated analysis in 2012 [34], this trial randomized over 600 patients after surgery to chemoradiotherapy (bolus fluorouracil and leucovorin before, during and after



radiotherapy) *versus* no post-operative treatment. In the 10 years follow-up, the HRs for overall survival and for relapse-free survival were better for the experimental group (HR=1.32, P=0.004 and HR=1.51, P=0.001, respectively) than for controls. Recurrence rates were significantly (P<0.001) reduced in the experimental group with lower incidences at both local and regional levels (19% vs 29% and 65% vs 72%, respectively). Subset analyses confirmed these strong treatment benefits, the sole exception being patients with diffuse tumour histology, a feature more common in women. Nevertheless, this trial was criticized as the adjuvant treatment was considered to simply compensate for the minor lymphadenectomy employed. Hence, the proportion of patients undergoing D0 or DI surgery, considered by many to be a suboptimal procedure, could explain the benefit of radiotherapy.

Two recent trials have sought to specifically assess whether addition of radiotherapy can further enhance the benefits of curatively resected gastric cancer plus adjuvant chemotherapy. The first was the ARTIST trial, a phase III study in patients with resected gastric cancer and D2 lymph node dissection, and compared 6 cycles of capecitabine + cisplatin *versus* 2 + 2 identical cycles separated by 2 cycles of capecitabine with concurrent radiotherapy [46]. Overall, the ARTIST trial did not demonstrate survival benefit by combining radiotherapy with chemotherapy, though subgroup analysis did show increased disease-free survival in patients with node-free disease and with intestinal-type gastric cancers.

The second, the on-going CRITICS trial first reported in June 2016 at the annual American Society of Clinical Oncology meeting [47]. This was a multicentre phase III trial in which patients with stage Ib to IVa resectable gastric cancer were randomized after diagnosis. Neoadjuvant chemotherapy was prescribed in both arms and consisted of 3 courses of epirubicin, cisplatin/ oxaliplatin or capecitabine (ECC/ EOC). After gastric cancer resection, patients received another 3 courses of ECC/ EOC or CRT (45 Gy in 25 fractions combined with weekly cisplatin and daily capecitabine). Primary endpoint was overall survival while secondary endpoints were disease-free survival, a low toxicity profile and quality of life. Initial data have demonstrated a 5-year survival rate of 41.3% for chemotherapy and 40.9% for chemoradiotherapy and hence no significant difference in overall survival (P=0.99). Also relevant is that only 47% and 52% of patients completed treatments in the adjuvant chemotherapy and chemoradiotherapy arms, respectively, perhaps reflecting high toxicities which were mainly haematological (grade III or higher: 44% vs. 34%; P=0.01) and gastrointestinal (grade III or higher: 37% vs. 42%; P=0.14).



In addition, a small but intriguing 2016 study has suggested that preoperative chemoradiotherapy has important impact in achieve favorable histopathological features and in 5 years overall survival rate (more than 70% of GC patients are benefited). Subsequently, the authors have to assess the pattern of histopathological regression after chemoradiotherapy and its impact on survival. With 80 patients analyzed, those which were submitted to preoperative chemotherapy (n=34) or chemoradiation (n=46), had a higher likelihood of achieving a good response (58 vs 32%, $P=0.001$), a grade D nodal regression (30 vs 6%, $P=0.009$) and a favourable pathological response (23 vs 3%; $P=0.019$), that in combined treatment arm. In terms of 5-year overall survival, patients with negative lymph nodes had no additional benefit if compared the type of preoperative therapy received (5-year OS; ChT vs CRT, 58 vs 51%, $P=0.92$). [48].

Summary and future perspectives. When evaluating outcomes of any clinical trial, several factors need to be considered. Full clinical assessment and proper staging of patients are mandatory, as management of gastric cancer necessitates multidisciplinary team discussions. When such criteria have been in place, a number of notable trials have emphasized that multimodal gastric cancer treatment employing adjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy frequently improves survival when compared to surgical resection alone (Table 4).

To date, perioperative chemotherapy has emerged as a standard of care for all patients with clinical stage II and III, acting to reinforce the only curative strategy of surgical resection. A detailed pathology examination of the resected tumor sample is mandatory to estimate risk of recurrence. Additionally, if tolerated, post-operative chemotherapy is also important, and while the benefit of radiotherapy is uncertain it should be considered if the risk of locoregional recurrence is high; for example, in cases of D1 surgery, positive margins and/or if a high level of lymph nodes positive remain, even after preoperative chemotherapy.



TABLE 4. Completed randomized controlled trials of multimodal gastric cancer treatment. S, surgery resection; OS, overall survival; PFS/DFS, progression-free survival/disease-free survival; MM, multimodal therapy; CT, chemotherapy; CRT, chemoradiotherapy; n.s., non-significant.

Trial	Regimen	Treatment arms	OS, <i>P</i>	PFS/DFS, <i>P</i>
Neoadjuvant CT				
MAGIC	CT perioperative	S vs. MM	0.009	<0.001
FFCD 9703	CT perioperative	S vs. MM	0.021	0.003
EORTC 40954	CT perioperative	S vs. MM	0.466 n.s	0.2 n.s.
Neoadjuvant CRT				
POET	C(R)T preoperative	Multi-CRT vs. Multi-CT	0.07 n.s	0.06 n.s.
CROSS	CRT preoperative	S vs. MM	0.003	<0.001
Adjuvant CT				
ACTS-GC	CT postoperative	S vs. MM	0.002	<0.001
CLASSIC	CT postoperative	S vs. MM	0.049	<0.0001
Adjuvant CRT				
INT 0116	CRT postoperative	S vs. MM	0.005	<0.001
ARTIST	CRT postoperative	S vs. MM	0.005	<0.001



Conclusions

Some lessons about advanced disease management show chemotherapy improves overall survival when compared to best supportive care from only 4 months [49] to up 13.8 months [50], when used for example, poli-chemotherapy in patients who hyperexpress her-2 receptor.

The advanced and metastatic gastric remains an incurable disease, and the base of the treatment is chemotherapy even if possible in first and second line, using drugs combination. Based upon superiority trials drugs such as 5-fluorouracil, cisplatin, docetaxel, trastuzumabe and more recently ramucirumabe are some of them. Others, can be used but based upon non-inferiority trials such as oxaliplatin, capecitabine, S-1 and irinotecan. Up to 2016, monoclonal antibodies often used in colorectal cancer such as anti-VEGF, bevacizumabe, and anti-EGFR, cetuximab, have not demonstrated any benefit gastric cancer or even detrimental effects. Some results are waited with the use of check-point inhibitors as immunotherapy strategy. A recent but small trial (n=39) showed partial response or even stable disease in up to 36 % in chemo refractory gastric cancer patients with the use of pembrolizumabe [51].

However, if immunotherapy will benefit GC patients considered curable, we do not know yet. The oncology of the 21st century, has been dedicated to search a biomarker that act as predictive and prognostic factor. Unfortunately, the results have been disappointing in gastric cancer. Some molecules, transcription factors, receptors and signaling pathways have been described as potential therapeutic targets [52], but so far, no significant results to change clinical practice. Another one, has focused on molecular mechanisms of chemoresistance as an strategy to overcoming treatment failure [53].

In perspective, improving the knowledge of pathways signalization, screening population mainly if suspect of genetic background, staging incorporating more than only tumors size, better surgical technics and drugs more efficacy should be some strategy to decrease the incidence and mortality of GC in West and East countries in future.

Acknowledgements

Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil and University College London (UCL) Medical School, Royal Free Campus, London, United Kingdom., FACEPE and CNPQ.



References

- [1] International Agency for Research on Cancer (IARC)/World Health Organization. GLOBOCAN 2012: Stomach Cancer Fact Sheet. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Accessed: 05/09/2016.
- [2] Cancer Research UK. Stomach Cancer Incidence Statistics. Available from: <<http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/stomach-cancer/incidence>>. Accessed: 05/09/2016.
- [3] National Cancer Institute. Gastric Cancer Treatment–Health Professional Version (PDQ®). Available from: <http://www.cancer.gov/types/stomach/hp/stomach-treatment-pdq#link/_166_toc>. Accessed: 05/09/2016.
- [4] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent et al. “Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012”. *European Journal of Cancer*, vol. 49, no. 6, pp. 1374–1403, 2013.
- [5] D. Forman, and V.J. Burley. “Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors”. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, vol. 20, no. 4, pp. 633–649, 2006.
- [6] Cancer Genome Atlas Research Network. “Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma”. *Nature*, vol. 7517, pp.202-209, 2014.
- [7] L.H. Sobin, and C.H. Wittekind, editors. “TNM classification of malignant tumours”. International Union Against cancer. New York: John Wiley & Sons; 1997. 5th ed.
- [8] M. Nishi, Y. Omori, and K. Miwa K, editors. “Japanese classification of gastric carcinoma”. *Japanese Research Society for Gastric Cancer*. Tokyo: Kanehara & Co; 1995. 1st ed.
- [9] A. Giuliani, M. Miccini, and L. Basso. “Extent of lymphadenectomy and perioperative therapies: Two open issues in gastric cancer”. *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no.14, pp. 3889–3904, 2014.
- [10] S. Mocelli, and S. Pasquali. “Diagnostic accuracy of endoscopic ultrasonography (EUS) for the preoperative locoregional staging of primary gastric cancer”. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 6, no. 2, 2015.
- [11] T. Waddell, M. Verheij, W. Allum, D. Cunningham, A. Cervantes, and D. Arnold. “ESMO–ESSO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up”. *Annals of Oncology*, vol. 24, (Supplement 6), pp. vi57–vi63, 2013.
- [12] N. Malibari, M. Hickeson, and R. Lisbona. “PET/Computed Tomography in the Diagnosis and Staging of Gastric Cancers”. *PET Clinics*, vol. 10, no. 3, pp. 311-326, 2015.



- [13] J. Nath, K. Moorthy, P. Tanriere et al. “Peritoneal lavage cytology in patients with oesophagogastric adenocarcinoma”. *British Journal of Surgery*, vol. 95, pp. 721–726, 2008.
- [14] G.W. Graaf, A.A. Ayantundede, S.L. Parsons, J.P. Duffy, and N.T. Welch. “The role of staging laparoscopy in oesophagogastric cancers”. *European Journal of Surgical Oncology*, vol. 33, pp. 988–992, 2007.
- [15] M. Goldfarb, S. Brower, and S. D. Schwaitzberg. “Minimally invasive surgery and cancer: controversies part 1”. *Surgical Endoscopy*, vol. 24, pp. 304–334, 2010.
- [16] J. D. Lawson, J. K. Sicklick, and P.T. Fanta. “Gastric cancer”. *Curr Probl Cancer*, Vol. 35, pp. 97–127, 2011.
- [17] K. C. Peeters, S. A. Hundahl, E. K. Kranenbarg, H. Hartgrink and C.J. Van de Velde. “Low Maruyama index surgery for gastric cancer: blinded reanalysis of the Dutch D1-D2 trial”. *World J Surg*, Vol. 29, pp.1576–1584, 2005.
- [18] P. McCulloch, M. E. Nita, H. Kazi, J. J. Gama-Rodrigues. “WITHDRAWN: Extended versus limited lymph nodes dissection technique for adenocarcinoma of the stomach”. *Cochrane Database Syst Rev*, Vol. 1:CD001964, 2012.
- [19] L. F. Oñate-Ocaña, V. Aiello-Crocifoglio, R. Mondragón-Sánchez, and J. M. Ruiz-Molina. “Survival benefit of D2 lymphadenectomy in patients with gastric adenocarcinoma”. *Ann Surg Oncol*, Vol. 7, pp. 210–217, 2000.
- [20] C. J. de Gara, J. Hanson and S. Hamilton. “A population-based study of tumor-node relationship, resection margins, and surgeon volume on gastric cancer survival”. *Am J Surg*, Vol. 186, pp. 23–27, 2003.
- [21] L. L. Gunderson and H. Sosin. “Adenocarcinoma of the stomach: areas of failure in a reoperation series (second or symptomatic look) clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy”. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Vol. 8, pp. 1–11, 1982.
- [22] J. D. Lawson, J. K. Sicklick and P. T. Fanta. “Gastric cancer”. *Curr Probl Cancer*, Vol. 35, pp. 97–127, 2011.
- [23] C. W. Wu, M. C. Hsieh, S. S. Lo. “Morbidity and mortality after radical gastrectomy for patients with carcinoma of the stomach”. *J Am Coll Surg*, Vol. 181, pp. 26–32, 1995.
- [24] L. Procopiuc, Ș. Tudor, M. Mănuc, M. Diculescu, and C. Vasilescu. “Robot-assisted surgery for gastric cancer”. *World J Gastrointest Oncol*, Vol. 8, No. 1, pp. 8–17, 2016.
- [25] S. B. Edge, D. R. Byrd, C. C. Compton et al., eds. *AJCC Cancer Staging Handbook*. New York: Springer-Verlag; 2010. 7th ed.



- [26] X. Paoletti, K. Oba, T Burzykowski. “GASTRIC (Global Advanced/Adjuvant Stomach Tumor Research International Collaboration Group)”. *JAMA*, Vol. 303, No. 17, pp. 1729-37, 2010.
- [27] H. M. Yoon, K. W. Ryu, B. H. Nam et al. “Is the new seventh AJCC/UICC staging system appropriate for patients with gastric cancer?”. *J Am Coll Surg*, Vol. 214, pp. 88–96, 2012.
- [28] S. D. Lee, K. W. Ryu, B. W. Fom, J. H. Lee, M. C. Kook, and Y. M. Kim. “Prognostic significance of peritoneal washing cytology in patients with gastric cancer”. *Br J Surg*, Vol. 99, no.3, pp. 397-403, 2012.
- [29] J. R. Siewert, K. Böttcher, J. D. Roder, R. Busch, P. Hermanek, and H. J. Meyer. “Prognostic relevance of systematic lymph node dissection in gastric carcinoma. German Gastric Carcinoma Study Group”. *Br J Surg*, Vol. 80, pp. 1015–1018, 1993.
- [30] J. S. Macdonald, S. R. Smalley, J. Benedetti, et al. “Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction”. *N Engl J Med*, Vol. 345, pp. 725–730, 2001.
- [31] D. Cunningham, W. H. Allum, S. P. Stenning et al. “Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer”. *N Engl J Med*, Vol. 355, pp.11–20, 2006.
- [32] D. Cunningham, L. M. Jost, G. Purkalne et al. “ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of gastric cancer”. *Ann Oncol*, Vol. 16, Suppl 1:i, pp. 22-23, 2005.
- [33] J. S. Macdonald. “Role of post-operative chemoradiation in resected gastric cancer”. *J Surg Oncol*, Vol. 90, pp. 166-170, 2005.
- [34] S. R. Smalley, J. K. Benedetti, D. G. Haller et al. “Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection”. *J Clin Oncol*, Vol. 30, pp. 2327- 2333, 2012.
- [35] K. Rebecca, S. Wong, R. Jang, and G. Darling. “Postoperative chemoradiotherapy vs. preoperative chemoradiotherapy for locally advanced (operable) gastric cancer: clarifying the role and technique of radiotherapy”. *J Gastrointest Oncol*, Vol. 6, No. 1, pp. 89–107, 2015.
- [36] H. H. Hartgrink, C. J. Van de Velde, H. Putter et al. “Extended lymph node dissection for gastric cancer: who may benefit? Final results of the randomized Dutch gastric cancer group trial”. *J Clin Oncol*, Vol. 22, pp. 2069-2077, 2004.



- [37] Z. X. Zhang, X. Z. Gu, W. B. Yin et al. “Randomized clinical trial on the combination of preoperative irradiation and surgery in the treatment of adenocarcinoma of gastric cardia (AGC)--report on 370 patients”. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Vol. 42, pp. 929- 34, 1998.
- [38] J. Hermans, J. J. Bonenkamp, and M. C. Boon. “Adjuvant therapy after curative resection for gastric cancer: meta-analysis of randomized trials”. *J Clin Oncol*, Vol. 11, No. 8, pp. 1441-7, 1993.
- [39] C. C. Earle and J. A. Maroun. “Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer in non-Asian patients: revisiting a meta-analysis of randomised trials”. *Eur J Cancer*, Vol. 35, No. 7, pp. 1059-64, 1999.
- [40] K. G. Janunger, L. Hafstrom, and B. Glimelius. “Chemotherapy in gastric cancer: a review and updated meta-analysis”. *Eur J Surg*, Vol. 168, No. 11, pp. 597-608, 2002.
- [41] X. Paoletti, K. Oba, T Burzykowski, S. Michiels, Y. Obashi, J. P. Pignon, P. Rougier, J. Sakamoto, D. Sargent, M. Sasako, E. Van Cutsen, and M. Buyse. “GASTRIC (Global Advanced/Adjuvant Stomach Tumor Research International Collaboration Group)”. *JAMA*, Vol 303, No. 17, pp. 1729-1737, 2010.
- [42] Y. J. Bang, Y. W. Kim, and H. K. Yang. “Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial”. *Lancet*, Vol. 379, No.9813, pp.315-321, 2012.
- [43] M. Ychou, V. Boige, and J. P. Pignon. “Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial”. *J Clin Oncol*, 2011 Vol. 29, No. 13, pp.1715-1721, 2011.
- [44] W. H. Allum, S. P. Stenning, J. Bancewicz, P. I. Clack, and R. E. Langley. “Long-term results of a randomized trial of surgery with or without preoperative chemotherapy in esophageal cancer”. *J Clin Oncol*, Vol. 27, No.30, pp.5062-5067, 2009.
- [45] F. Mingol, J. Gallego, and A. Orduña. “Tumor regression and survival after perioperative MAGIC-style chemotherapy in carcinoma of the stomach and gastroesophageal junction”. *BMC Surg*, Vol. 15, pp.66, 2015.
- [46] J. Lee, D. H. Lim, and S. Kim. “Phase III trial comparing capecitabine plus cisplatin versus capecitabine plus cisplatin with concurrent capecitabine radiotherapy in completely resected gastric cancer with D2 lymph node dissection: the ARTIST trial”. *J Clin Oncol*, Vol.30, No. 3, pp .268-73, 2012.
- [47] V. Marcel, P. M Jansen Edwin, and C. Annemieke. “A multicenter randomized phase III trial of neo-adjuvant chemotherapy followed by surgery and chemotherapy or by



surgery and chemoradiotherapy in resectable gastric cancer: First results from the CRITICS study”. *J Clin Oncol*, Vol. 34, suppl; abstr 4000, 2016.

- [48] P. Martin-Romano, J. J. Sola, and J. A. Diaz-Gonzalez. “Role of histological regression grade after two neoadjuvant approaches with or without radiotherapy in locally advanced gastric cancer”. *British Journal of Cancer*, Vol. 115, pp. 655–663, 2016. doi:10.1038.
- [49] A. D. Wagner, W. Grothe, J. Haerting, G. Kleber, A. Grothey, and W. E. Fleig. “Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data”. *J Clin Oncol*, Vol. 24, No.18, pp.2903-2909, 2006.
- [50] Y. J. Bang, E. Van Cutsem, and A. Feyereislova. “Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial”. *Lancet*, Vol. 376, No. 9742, pp. 687-697, 2010. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
- [51] K. Muro, H. C. Chung, and V3. “Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial”. *Lancet Oncol*, Vol. 6, pp.717-726, 2016. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00175-3.
- [52] S. D. Lee, K. W. Ryu, B. W. Eom, J. H. Lee, M. C. Kook, and Y. W. Kim. “Prognostic significance of peritoneal washing cytology in patients with gastric cancer”. *Br J Surg*, Vol. 99, No. 3, pp. 397-403, 2012. doi: 10.1002/bjs.7812.
- [53] M. Matboli, S. El-Nakeep, and N. Hossam. Exploring the role of molecular biomarkers as a potential weapon against gastric cancer: A review of the literature”. *World J Gastroenterol*, Vol. 22, No. 26, pp. 5896-5908, 2016.
- [54] W. J. Shi and J. B. Gao. “Molecular mechanisms of chemoresistance in gastric cancer”. *World J Gastrointest Oncol*, Vol. 8, No.9, pp. 673-681, 2016.



8 CAPÍTULO V

Artigo Original 3

A bad outcome on hepatocellular carcinoma with extra-hepatic HCV infection caused by mutations in TP53, CTNNB1 and FBXW7 genes

Luiz A. Mattos¹,

1- Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco

Address reprint requests to Dr. Martins at, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Av. Prof. Moraes Rego 1235, 50670-901, Cidade Universitária, Recife - PE, Brazil, or at bruneska@prospecmol.org

*MSc Borba and MD Mattos contributed equally to this article.

Brief Description: This paper describes a genetic profiling study of four patients diagnosed with Hepatocellular carcinoma and highlights a new synergistic pathway enrolling mutated TP53, FBXW7 and β -catenin and the accumulation of oncogenes, disrupting cell cycle and leading to a poor patient outcome.

Conflict Of Interest

None



Abstract

Purpose: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most lethal cancers. Its etiology is related to Hepatitis Virus infections and genetic alterations, becoming difficult to treat although largely preventable. In this paper, we evaluated the mutation profile of patients with HCC and its effect for clinical parameters and outcome.

Methods/Patients: A Mutation PCR Array was used to evaluate the presence of 85 mutations in liver tissue obtained from four patients diagnosed with HCC and referred to liver transplantation.

Results: Only one patient presented a mutation profile with five variants in three genes (TP53, CTNNB1, and FBXW7) associated to regulatory pathways, and never observed together in a patient. The synergic effect of the mutated genes over the metabolism could explain the extra-hepatic HCV infection and also the patient's poor outcome.

Conclusion: The findings highlight the importance of precision medicine as molecular tool for assisting clinical decisions in HCC treatment.

KEYWORDS: Hepatocellular carcinoma; p53; FBXW7; β -catenin



Introduction

Liver cancer is a challenge in public health, with 39,230 new cases estimated to 2016, combined with intrahepatic bile duct cancer [1]. Hepatic carcinogenesis starts with external liver stimuli leading to hepatocytes alterations, followed by cell death and cellular proliferation (regeneration). Chromosomal alterations, telomere shortening, mutations and deregulated gene expression were observed for TP53, CTNNB1, JAK, STAT, AXIN1, PTEN, CDKN2A and TERT genes, leading to activation of oncogenic pathways in Hepatocellular Carcinoma (HCC) [2].

The ‘Precise Medicine’ era has emerged to achieve successful treatment for each patient based on their personal characteristics, once each tumor has its own characteristics [3]. Furthermore, the improvement of current available data on both genetics and therapeutics fields is continuously required to also improve patient’s life quality. Even though a sensitive advance had been achieved in the genetic field concerning to HCC genesis and evolution, it had not been translated to clinical practice [4]. Therefore, our study evaluates the genetic profile of four HCC patients that underwent liver transplantation, highlighting the importance of genetic tests for understanding the biochemical changes that can support the clinical decisions.

Methods

Samples

Formalin fixed paraffin embedded tissue (FFPE) was obtained from four patients referred to orthotopic liver transplantations (OLT) at Liver Institute of Pernambuco, Brazil. Patients enrolled in this study signed Informed Consent before collecting clinical sample and data.



Genotype Profile

Three slides of 10µm FFPE tissue were used for DNA purification through QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Eluted DNA was evaluated in Nanodrop 2000 (Thermo Scientific - Waltham, Massachusetts, EUA) prior to the genotype analysis, that was performed through qBiomarker Somatic Mutation PCR Array Human Liver Cancer (SMH-034A) (Qiagen, Hilden, Germany). This assay evaluates 85 mutations in 9 genes (BRAF, CTNNB1, ERBB2, FBXW7, HF1A, KRAS, NRAS, PIK3CA, TP53).

Results

Four patients referred to OLT were selected for this study, one woman and three men over 60 years old with hepatitis C and cirrhosis history (**Table 1**). Patients #2 and #3 had good outcome and no genetic mutations were found in these patients. Patient #1 showed a synchronic gallbladder carcinoma as an incidental finding during the OLT. No mutations were found, but surgery complications triggered his death 23 days after the transplantation. By another hand, patient #4 showed increased AFP levels 3 months after OLT, with bad outcome within 18 months. He had 2 mutations in CTNNB1, 2 mutations in TP53 and 1 mutation in FBXW7 (**Table 1**). Further analysis revealed history of arterial hypertension, splenomegaly, schistosomiasis and use of illicit drugs. Histological evaluation showed fibrosis (**Figure 1A**), an extensive area of necrosis (**Figure 1B**) and inflammatory infiltrate (**Figure 1C**) in explanted liver. Alpha-fetoprotein monitoring after OLT showed abnormal profile (**Figure 1D**), with a membranous glomerulonephritis diagnosed with nephrotic levels, extra-hepatic focus of HCV, with complement consumption but negative cryoglobulinemia.

In CTNNB1, two mutation lead to a change in two Serines (p.Ser37Phe and p.Ser45Ala) of the β -catenin, both important for its regulation. In TP53, p.Arg342* mutation leads to the complete loss of p53 function once introduces an early stop codon, while p.Met246Val



affects the site for DNA-binding and repair (**Figure 2A**). In FBXW7, p.Arg465Cys changes a strong basic residue by a neutral one, affecting the local charge in this site which increases the hydrophobic surface and reduces its ability to bind to the substrates (**Figure 2B**). The genomic background of patient #4 could have lead to a biochemical impairment (**Figure 3**) that, combined with the presence of extra-hepatic HCV, contributed to the clinical deterioration.

Discussion

In this analysis, we conducted a genetic evaluation in four patients diagnosed with HCC to determine the influence of mutations in the clinical parameters. Only one patient presented mutation in the PCR Array for Human Liver Cancer and, in face of patient's relapse, his genomic background seems to have contributed to a biochemical impairment and bad outcome.

HCV is know to cause chronic hepatitis in 80% of the cases and has up to 20 times more chances of causing liver cirrhosis, due to the ability of C, NS3, NS5A and NS5B viral proteins to impair DNA repair, and apoptosis mechanisms. The NS3 protein is able to directly bind and inhibit p53 and p21 proteins, contributing to HCV carcinogenesis. The viral C protein also promotes cell proliferation through the inhibition of p53 synthesis [5]. TP53 gene encodes for p53 transcription factor responsible for regulating genes with a broad range of functions, notably: DNA repair, cell cycle arrest, apoptosis, and senescence. The p.Arg342* mutation leads to complete loss of p53, avoiding its tumor-suppressing activity. In addition, p.Met246Val mutation may also lead to a loss of function, once it change the structure of Loop-3 (residues 237 to 250) in the DNA-binding domain (DBD) core structure, affecting the DNA binding and repair [6].



The acute and chronic HCV infection was also associated to 5 to 10 times increase in mutation occurrence in TP53 and CTNNB1 genes, although mutations in these genes were assumed as mutually exclusive [7]. Regarding their etiology, TP53 mutations are more common in HBV-related HCC while CTNNB1 mutations appears more often in alcohol-related HCC [5]. Curiously, the patient #4 presented both genes mutated and critical AFP increment (monitor response to treatment and relapse detection), an evidence already associated with more TP53 mutations, less CTNNB1 mutations, with larger tumors, vascular invasion and early recurrence [8]. Nevertheless, this patient had no history of HBV infection or abusive alcohol intake.

Mutations in CTNNB1 were reported in up to 25% of HCC patients, frequently associated with the infection by hepatitis C virus [9]. This gene codifies for β -catenin, a key molecule in Wnt pathway, involved in the transcriptional activation of genes related to cell proliferation, differentiation, angiogenesis, and cancer. This pathway remains inactivated in adult cells due the presence of Frizzled receptor antagonists or through β -catenin inhibition. It occurs in the Wnt canonical pathway through phosphorylation of β -catenin residue Ser45 mediated by Casein Kinase 1 (CK1) upon Axin binding to β -catenin; followed by successive phosphorylation at residues Ser33, Ser37 and Ser41, mediated by glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β). These events allow β -catenin to be transferred from Axin to adenomatous polyposis coli (APC) molecule, signaling to proteasome degradation [10]. The two mutations found on patient #4 result in loss of Ser45 and Ser37 residues in β -catenin, avoiding the phosphorylation cascade and increasing β -catenin nuclear translocation and gene transcription. In patient #4, the HCV infection could also contribute for activating Wnt pathway through NS5A protein, which binds and stabilizes β -catenin [5].

FBXW7, the third gene mutated on patient #4, has an important role in avoiding HCV genome replication, once it is involved in the ubiquitization of NS5B, targeting it to



proteasome degradation [11]. In non-cancer cells FBXW7 is involved in many cellular and physiological functions, mostly related to cell cycle regulation [12], and its downregulation leads to accumulation of Myc, Notch and Cyclin E, and tumorigenesis promotion [13]. Mutations in FBXW7 are hotspots for cancer already, which p.Arg465Cys is reported at 29% frequency in HCC patients [14], the same found on patient #4. It is located at the β -propeller surface, a symmetrical fold composed of WD40 domains repeated in four-stranded antiparallel β -sheet and involved in protein-protein interactions [12]. The Arginine residues positively charged are responsible for interacting with the phosphorylated substrates, and mutation in Arg465 and Arg479 residues avoids the proper bind to Cyclin E and leads to substrate accumulation [14,15]. Thus, it could have contributed to the cell cycle deregulation and also prevented the NS5B proteasomal degradation, allowing its accumulation in cell and inducing genome replication.

An integrative overview shows that in normal cells p53 induces FBXW7 expression [16], while β -catenin inhibits it [17] and FBXW7 protein degrades β -catenin through ubiquitization, inhibiting Wnt pathways [18]. The cumulative effect of the mutations on patient #4 results in poor or inefficient function of p53, reducing the expression of FBXW7 that will show a reduced ability to bind to oncoproteins and β -catenin. This event avoids the oncoproteins degradation in proteasome and, together with the lack of β -catenin phosphorylation and inhibition, also induces the β -catenin translocation to the nucleus to induce genes related to cell proliferation and differentiation, and angiogenesis. Therefore, the effect of the mutations in TP53, CTNNB1 and FBXW7 genes, combined with the presence of extra-hepatic HCV, contributed to the hepatocellular carcinoma development and the fast clinical deterioration of this patient.

This molecular scenario could be a key for understanding the patient's bad outcome, even after liver transplantation. Nevertheless, this knowledge could have been used to revert β -



catenin activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) administration, based on a crosstalk with Wnt pathway through prostaglandin E2 (PGE2) inhibition [19]. It is also important to know that patient #4 would benefit from 5-flourouracil or cisplatin oncotherapy, but not Doxorubicin due to the lack of efficiency already reported for patients with p53 mutation in L3 [20]. Our study demonstrates the importance of implementing molecular genetic panels in HCC treatment for increasing the patient's life quality through a supportive precise medicine.

Acknowledgments

To Vinícius Tigre for figures design.

Ethical Approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was performed according to the protocol approved by Research Ethics Committee at Human Health Centre of the Federal University of Pernambuco, Brazil.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2016;66:7–30.
2. Kan Z, Zheng H, Liu X, Li S, Barber TD, Gong Z, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2013;23:1422–33.
3. Borba MACSM, Castelletti CHM, Filho JL de L, Martins DBG. Point-of-care devices: the next frontier in personalized chemotherapy. *Futur. Sci. OA*. Future Science Ltd London, UK;



2017;3:FSO219.

4. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. Elsevier Ltd; 2015;149:1226–39.
5. Tornesello ML, Buonaguro L, Izzo F, Buonaguro FM. Molecular alterations in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C infections. *Oncotarget*. 2016;7:25087–102.
6. Bullock AN, Henckel J, Fersht AR. Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene*. 2000;19:1245–56.
7. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad I Ben, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet*. 2012;44:694–8.
8. Peng SY, Chen WJ, Lai PL, Jeng YM, Sheu JC, Hsu HC. High α -fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: Significance of hepatitis virus infection, age, p53 and β -catenin mutations. *Int. J. Cancer*. 2004;112:44–50.
9. Wang W, Pan Q, Fuhler GM, Smits R, Peppelenbosch MP. Action and function of Wnt/ β -catenin signaling in the progression from chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol*. Springer Japan; 2016;1–13.
10. Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis - A look outside the nucleus. *Science* (80). 2000;287:1606–9.
11. Chen J, Wu X, Chen S, Chen S, Xiang N, Chen Y, et al. Ubiquitin ligase Fbw7 restricts the replication of hepatitis C virus by targeting NS5B for ubiquitination and degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2016;470:697–703.
12. Uddin S, Bhat AA, Krishnankutty R, Mir F, Kulinski M, Mohammad RM. Involvement of



F-BOX proteins in progression and development of human malignancies. *Semin. Cancer Biol.* Elsevier Ltd; 2016;36:18–32.

13. Xu W, Taranets L, Popov N. Regulating Fbw7 on the road to cancer. *Semin. Cancer Biol.* Elsevier Ltd; 2016;36:62–70.

14. Akhoondi S, Sun D, Von Der Lehr N, Apostolidou S, Klotz K, Maljukova A, et al. FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Res.* 2007;67:9006–12.

15. Singh T. Functionalization of cancer-associated mutant alleles of human CDC4 (FBXW7). [Vancouver]: The University of British Columbia; 2013.

16. Kimura T, Gotoh M, Nakamura Y, Arakawa H. hCDC4b, a regulator of cyclin E, as a direct transcriptional target of p53. *Cancer Sci.* Blackwell Publishing Ltd; 2003;94:431–6.

17. Wu WJ, Shi J, Hu G, Yu X, Lu H, Yang ML, et al. Wnt/b-catenin signaling inhibits FBXW7 expression by upregulation of microRNA-770 in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol.* 2016;37:6045–51.

18. Jiang J, Sun C, Tian S, Yu C, Chen M, Zhang H. Tumor suppressor Fbxw7 antagonizes WNT signaling by targeting β -catenin for degradation in pancreatic cancer. *Tumor Biol.* Springer Netherlands; 2016;37:13893–902.

19. Ahmed K, Shaw H V., Koval A, Katanaev VL. A second WNT for old drugs: Drug repositioning against WNT-dependent cancers. *Cancers (Basel).* 2016;8:1–27.

20. Geisler S, Lønning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge Ø, Haugen DF, et al. Influence of TP53 Gene Alterations and c-erbB-2 Expression on the Response to Treatment with Doxorubicin in Locally Advanced Breast Cancer. *Am. Assoc. Cancer Res.* 2001;61:2505–12.

FIGURE LEGENDS

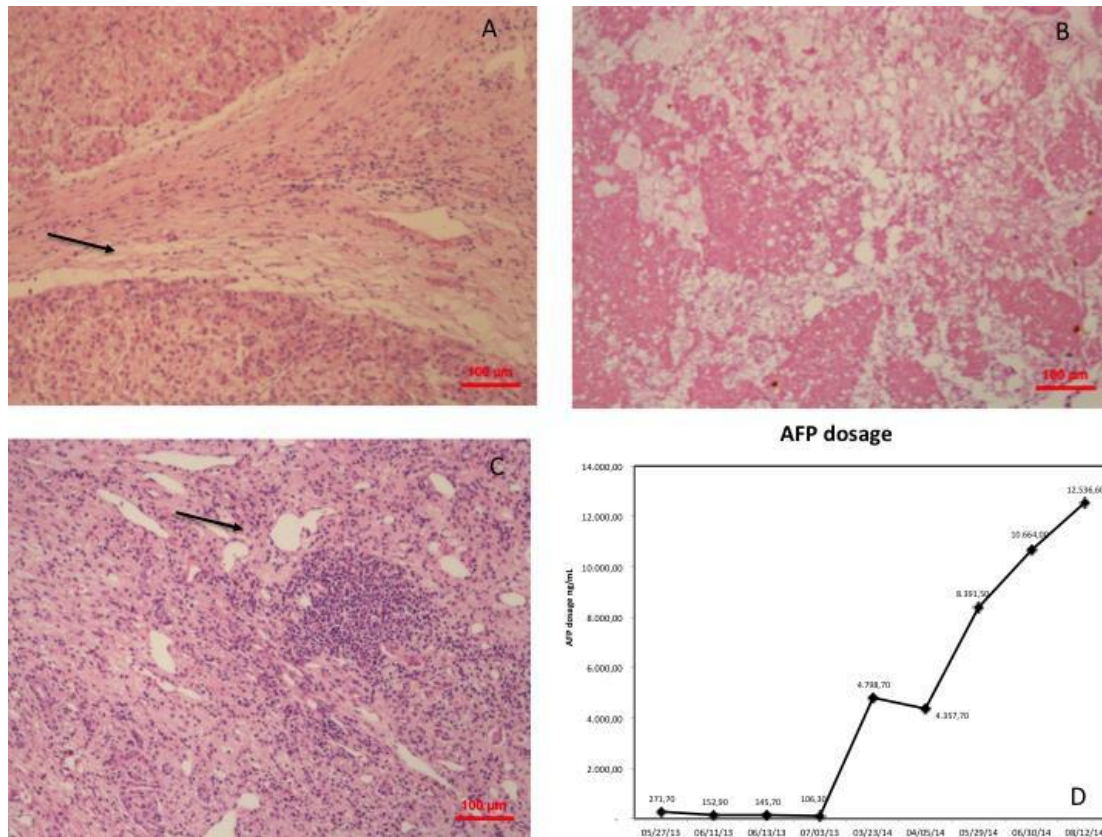


Fig.1 Histological analysis of HCC tissue, and Alpha-fetoprotein dosage evolution observed in patient #4. Panel A shows the liver tissue medium differentiation with fibrosis (black arrow); Panel B shows the extensive necrosis post-TACE; Panel C shows the presence of inflammatory infiltrate (black arrow); Panel D is the graphic representation of AFP levels during patient evolution post-TACE. Tissue images were obtained with optical microscopy ZEISS Imager.M2m (50x magnification) coupled with ZEISS AxioCam HRC.

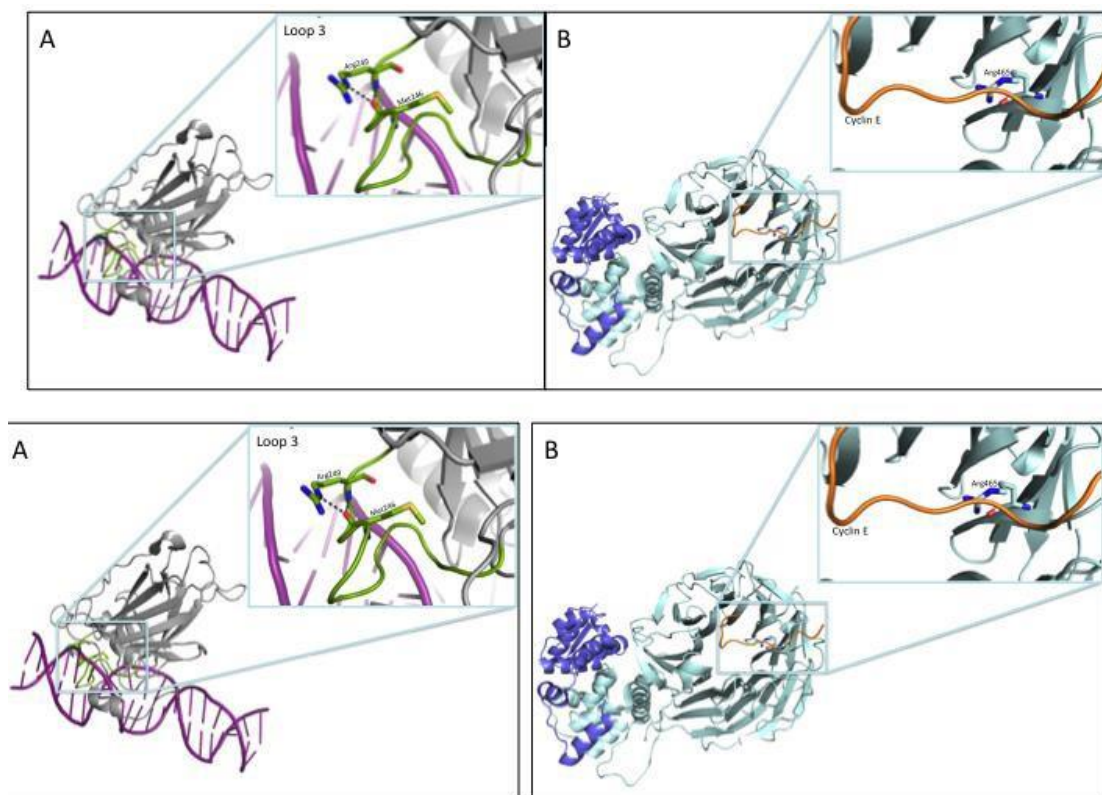


Fig.2 Tridimensional structure of p53 and FBXW7 regions related to the missense polymorphisms. Panel A shows the p53 residue Met246 establishing two hydrogen bonds (black) with Arg249 to stabilize L3 (green) in DBD of p53 molecule (gray); DNA is presented in purple. The presence of p.Met246Val mutation at p53 leads to reduced ability for DNA interacting. Panel B shows FBXW7 (light blue) binding with SCF (a complex of F-box + Skp1, Cullin 1 and Roc1/Rbx1/Hrt1) and a fragment of the substrate Cyclin E (orange). The residue Arg465 is positively charged, and interacts with phosphorylated substrates through electrostatic affinity, but p.Arg465Cys mutation prevents FBXW7 proper function. PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4, Schrödinger, LLC, NY, USA) was used to assess 3D conformation of the crystallographic structures of the molecules p53 (PDB: 5LGY) and FBXW7 (PDB: 2OVQ).

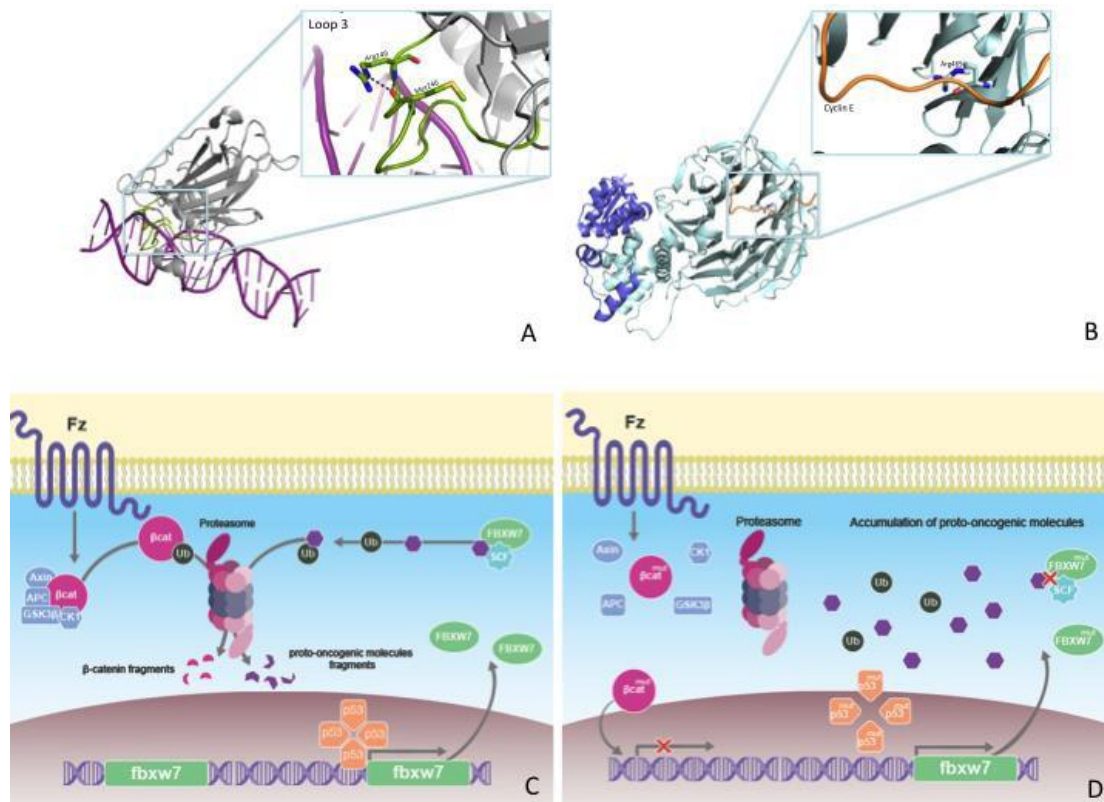


Fig.3 Pathway interaction of p53, β-catenin, and FBXW7 proteins. The Panel A shows the regular crosstalk between p53, β-catenin and FBXW7 functions. Panel B represents the scenario of the molecular pathways interaction between the three proteins mutated on patient #4, which could lead to FBXW7 downregulation and defective function with consequent oncoprotein accumulation in the cell. The pathways design was made based on literature review using the terms “Hepatocellular carcinoma”, “HCV”, “TP53”, “CTNNB1” and “FBXW7”.



9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância do estudo da epigenética associada a possíveis mecanismos de deflagração e propagação do câncer deve ser cada vez mais avaliado frente à heterogeneidade inter-individual e intratumoral de vários tipos tumorais. Como as taxas de câncer de origem hereditária é de cerca de 10% (ASCO Guideline), e que esses geralmente acometem pacientes em idades mais precoces, como explicar o aumento de pacientes com neoplasias malignas agressivas nessa faixa etária. É provável que alguns mecanismos epigenéticos estejam envolvidos e atuem como resposta a influências ambientais. Ao lado disso, se avolumam a discussão de estabelecer diferenças clínicas e moleculares entre pacientes de origem ocidental e oriental, sobretudo em câncer gástrico onde as diferenças são bastante dispare. Assim, nosso trabalho buscou avaliar desde os dados constantes da literatura acerca de um mecanismo epigenético específico, identificando total ausência de dados no mundo ocidental, sendo o nosso o primeiro a fazer essa avaliação que parece ser provocativa e geradora de hipóteses, devendo ser confirmadas em estudos clínicos. Além disso, avaliamos em trabalho original, em pacientes oriundos de Hospital Universitário público portadores de neoplasia gástrica, associando prática clínica com experimentos de bancada, a associação entre a expressão de sirtuínas e fatores oxidativos em câncer gástrico. Nossos resultados sugeriram uma associação desses biomarcadores com fenótipos menos agressivos. E para referendar nosso trabalho enviamos para publicação um artigo original com os arrazoados, objetivos, metodologias utilizadas, demonstração de resultados, discussão correspondente e conclusões de projeto concebido para essa tese. Produzimos também um artigo, também enviado para publicação, de revisão sobre o estado da arte em câncer gástrico em colaboração com a University College of London, UCL, como mecanismos de estreitar e realizar intercâmbio de conhecimento e informações entre a nossa Universidade Federal de Pernambuco e uma das mais conceituadas Universidades do Mundo localizada em Londres, na Inglaterra.

Para nós, foi de um imensurável aprendizado para uma área integrativa entre a prática clínica e conceitos e experimentos de bancada / moleculares e instigante da mesma forma. Assim, continuaremos a fazer perguntas quando estivermos diante de casos clínicos que fogem ao comportamento habitual e tentar respondê-las com tecnologia de ponta através de experimentos laboratoriais em um laboratório de grande importância como o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.



REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH HUMAN EPIGENOME TASK FORCE: EUROPEAN UNION. Moving AHEAD with an international human epigenome project. *Nature*, England, v. 454, n. 7205, p. 711-715, 2008.

AARON, D. G.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, United States, v. 128, n. 4, p. 635-638, 2007.

ADACHI, Y. et al. Most important lymph node information in gastric cancer: multivariate prognostic study. *Annals of Surgical Oncology*, United States, v.7, n. 7, p. 503-507, 2000.

ALLGAYER, H. et al. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *Journal of Clinical Oncology*, United States, v. 18, n. 1, p. 2201-2209, 2000.

AGBOOLA, O. Adjuvant treatment in gastric cancer. *Cancer Treatment Reviews*, Netherlands, v. 20, n. 3, p. 217, 1994.

AHN, H. S. et al. Clinicopathological features and surgical outcomes of patients with remnant gastric cancer after a distal gastrectomy. *Annals of Surgical Oncology*, United States, v. 15, n. 6, p. 1632-1639, 2008.

ALEMÁN, J. O. et al. Mechanisms of obesity-induced gastrointestinal neoplasia. *Gastroenterology*, United States, v. 146, n. 2, p. 357-3573, 2014.

AN, C. et al. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research*, United States, v. 11, n. 2 pt. 1, p.656-663, 2005

ASCO Guideline. Disponível em: [sítio https://www.asco.org/practice-guidelines/practice-management-issues/genetics-toolkit/understanding-hereditary-cancer](https://www.asco.org/practice-guidelines/practice-management-issues/genetics-toolkit/understanding-hereditary-cancer). Acesso em 11 nov 2016.

AVITAL, I. et al. authors. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

BAE, J. H. et al. Identification of radiation-induced aberrant hypomethylation in colon cancer. *BioMed Central Genomics*, England, v. 16, n. 6, p. 56, 2015.



BANG, Y. J. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-esophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, England, v. 376, n. 9742, p.687-697, 2010.

BANI-HANI, K. E. et al. Combined evaluation of expressions of cyclin E and p53 proteins as prognostic factors for patients with gastric cancer. *Clinical Cancer Research*, United States, v. 11, n. 4, p.1447, 2005.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, United States, v. 116, n. 2, p. 281-297, jan. 2004.

BERNAL, C. et al. Reprimo as a potential biomarker for early detection in gastric cancer. *Clinical Cancer Research*, United States, v. 14, n. 19, p.6264-6269, 2008.

BERNINI, M. et al. Family history of gastric cancer: a correlation between epidemiologic findings and clinical data. *Gastric Cancer*, Japan, v. 9, n. 1, p. 9-13, 2006.

BICKENBACH, K.; STRONG, E. V. Comparisons of gastric cancer treatments: east vs. West. *Journal of Gastric Cancer*, Korea, v. 12, n. 2, p. 55-62, 2012.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. *Nature*, England, v. 447, n. 5, p. 396-398, 2007.

BLAIR, L. P.; Yan, Q. Epigenetic mechanisms in commonly occurring cancers. *DNA Cell Biology*, United States, v. 31, suppl 1, p.S49-61, 2012.

BORRMANN, R. *Geschwulste des margens*. In: HENKE, F.; LUBARSCH, O. editors. *Handbuch spez pathol anat und histo*. Berlim: Springer-Verlag. p. 864-871, 1926.

BOSCH-PRESEGUÉ, L.; VAQUERO, A. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes and Cancer*, United States, v.2, n. 6, p. 648-652, 2011.

BRADLEY, E.; MEISSNER A.; LANDER, E. S. The mammalian epigenome. *Cell*, United States, v. 128, n. 4, p. 669-681, 2007.

BRACKEN, C.; SCOTT, H.; GOODALL, G. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nature Reviews Genetics*, England, v. 17, n. 12, p.719-732, 2016.



ROWN, L. M.; DEVESA, S. S. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. *Surgical Oncology Clinics*, United States, v. 11, n. 2, p. 235-256, 2002.

BUSHATI, N.; COHEN, S. M. microRNA functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, United States, v. 223, p.175-205, 2007.

CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews. Cancer*, England, v.6, n. 11, p.857-866, nov. 2006.

CANCER. *We're sorry*. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/treating/types-of-surgery.html>>. Acesso em: 06 fev 2018.

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

CARNEIRO, F. et al. Model of the early development of diffuse gastric cancer in E-cadherin mutation carriers and its implications for patient screening. *The Journal of Pathology*, England, v. 203, n. 2, p. 681-697, 2004.

CHA, E. J. et al. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis of gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research*, United States, v. 15, n. 13, p. 4453-4459, 2009.

LUO, C.; WIDLUND, H. R.; PUIGSERVER, P. PGC-1 Coactivators: Shepherding the Mitochondrial Biogenesis of Tumors. *Trends in Cancer*, United States, v. 2, n. 10, p. 619-631, 2016.

CHOO, S. P. et al. Comparison of hepatocellular carcinoma in Eastern versus Western populations. *Cancer*, United States, v.1, n.1, p.3430-3446, 2016.

CHA, E. J. et al. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis of gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research*, United States, v.15, n.13, p.4453-4459, 2009.

CHEN, C. Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *The New England Journal of Medicine*, United States, v.353, n.17, p.1768-1771, 2005.

CHEN, Y. et al. Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell Death and Disease*, England, v.5, n. 2, p.e1047, 2014.



CHIA, N. Y.; TAN, P. Molecular classification of gastric cancer. *Annals of Oncology*, v. 27, n. 5, p.763-769, may. 2016.

CLRMRNTS, W. M. et al. Beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Research*, United States, v.62, n. 12, p.3503, 2002.

CONWAY, E. M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research*, England, v. 49, n. 3, p. 507-521, 2009.

CORMIO, A.; GUERRA, F.; CORMIO, G. The PGC-1alpha dependent pathway of mitochondrial biogenesis is upregulated in type I endometrial cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 390, n. 4, p.1182-1185, 2009.

CORREA, P. et al. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet*, England, v.2, n. 7924, p. 58-60, 1975.

_____. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Research*, v. 52, n. 24, p. 6735, 1992.

CRAWFORD, J. *The gastrointestinal tract*. In: ROBBINS, S. L. C. R.; KUMAR, V.; SCHOEN, F. J. eds. *Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: WB Saunders; 1994. p. 755-783.

CUNNINGHAM, D M.D. et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *The New England Journal of Medicine*, United States, v.355, n. 1, p.11-20, 2006.

CUNNINGHAM, D.; CHUA, Y. J. East meets west in the treatment of gastric cancer. *The New England Journal of Medicine*, United States, v. 357, n. 18, 1863-1865, 2007.

CUI, Y. et al. SIRT3 Enhances Glycolysis and Proliferation in SIRT3-Expressing Gastric Cancer Cells. *Public Library of Science One*, United States, v.10, n. 6, p.e0129834, 2015.

DENG, J. et al. Prognostic value of perineural invasion in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Public Library of Science One*, United States, v. 9, n. 2, p.e88907, 2014.

DENKO, N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer*, England, v. 8, n. 9, p. 705-713, 2008.



DICKEN, B. J. et al. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Annals of Surgery*, United States, v.241, n. 1, p.27-39, 2005.

EDGREN, G. et al. Risk of gastric cancer and peptic ulcers in relation to ABO blood type: a cohort study. *American Journal of Epidemiology*, United States, v.172, n. 11, p.1280-1285, 2010.

LaGORY, E. L; GIACCIA, A. J. The ever-expanding role of HIF in tumor and stromal biology. *Nature Cell Biology*, England, v.18, n.4, p. 356-365, 2016.

EL-OMAR, E. M. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, England, v. 404, n. 6776, p. 398-402, 2000.

ENCODE. The ENCODE Project Consortium. *Nature*, England, v. 447, n. 1, p.799-816, 2007.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine*, United States, v. 358, n. 3, p. 1148-1159, 2008.

FAN, C. Y. Epigenetic alterations in head and neck cancer: Prevalence, clinical significance, and implications. *Current Oncology Reports*, United States, v. 6, n. 2, p.152-161, 2004.

FEILCHENFELDT, J. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and associated transcription factors in colon cancer: reduced expression of PPARgamma-coactivator 1 (PGC-1). *Cancer Lett*, Ireland, v. 203, n. 1, p.25-33, 2004.

FENG, A. N. et al. Expression of SIRT1 in gastric cardiac cancer and its clinic pathologic significance. *International Journal of Surgical Pathology*, United States, v.19, n. 6, p. 743-750, 2011.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews, Cancer*, England, v. 4, n. 2, p.143-53, 2004.

FERLA, Y. J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, United States, v.127, n. 12, p.2893-2917, 2010.

_____. *Reproduced with permission from: STEWART, B.; KLEIHUES, P. eds. World Cancer Report. Lyon: IARC Press; 2003.*



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

FORMAN, D.; BURLEY, V. J. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. *Best Practice and Research. Clinical Gastroenterology*, Netherlands, v. 20, n. 4, p. 633-649, 2006.

FORN, M. et al. Overlapping DNA methylation dynamics in mouse intestinal cell differentiation and early stages of malignant progression. *Public Library of Science One*, United States, v. 10, n. 5, p.e0123263, 2015.

FU, D. G. Epigenetic alterations in gastric cancer. *Molecular Medicine Reports*, Greece, v. 12, n. 3, p.3223-3230, 2015.

FU, N. et al. Role of oxidative stress in Hepatitis C Virus induced hepatocellular carcinoma. *Current Cancer Drug Targets*, Netherlands, v. 17, n. 6, p.498-504, 2017.

GASPAR, M. J. et al. Prognostic value of carcinoembryonic antigen, CA 19-9 and CA 72-4 in gastric carcinoma. *Tumour Biology*, United States, v. 22, n. 5, p. 318-322, 2001.

GE, S. et al. Association between Habitual Dietary Salt Intake and Risk of Gastric Cancer: A Systematic Review of Observational Studies. *Gastroenterology Research and Practice*, Egypt, 808120, 2012.

GLOBOCAN. 2012. *International Agency for Research on Cancer* 2016. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>. Acesso em: 12 out 2016.

GROTH, A. et al. Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell*, United States, v. 128, n. 4, p. 721-733, 2007.

GUO, J. et al. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. *Journal Gastroenterology Hepatology*, Austrália, v. 24, n. 4, p. 652-657, 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, United States, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.



HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Rules for making human tumor cells. *The New England Journal of Medicine*, United States, v. 347, n.11, p. 1593-1603, 2002.

HE, W. J. et al. Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, United States, v. 23, n. 9, p.467-476, 2012.

HENDERSON, T. O. et al. Secondary gastrointestinal cancer in childhood cancer survivors: a cohort study. *Annals of Internal Medicine*, United States, v.156, n. 11, p.757-766, 2012.

HINSHELWOOD, R. A.; CLARK, S. J. Breast cancer epigenetics: normal human mammary epithelial cells as a model system. *Journal of Molecular Medicine*, Germany, v. 86, n. 12, p. - 1328, 2008.

HIRAI, S. et al. Antitumor effects of a sirtuin inhibitor, tenovin-6, against gastric cancer cells via death receptor 5 up-regulation. *Public Library of Science One*, United States, v. 9, n. 7, p. e102831, 2014.

HIRST, M.; MARRA, M. A. Epigenetics and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, United States, v. 41, n. 1, p. 136-146, 2009.

HOLZHEIMER, R. G.; MANNICK, J. A. *Surgical treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*. Editors Source Munich: Zuckschwerdt; 2001.

HOWLADER, N. et al. SEER cancer statistics review, 1975-2008. *National Cancer Institute*, Bethesda; 2011. p. 19.

HUANG, J. et al. Lash, an epigenetic guardian of repetitive elements. *Nucleic Acids Research*, England, v. 32, n. 17, p. 5019-5028, 2004.

HU, B. et al. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, China, v. 3, n. 3, p. 251-261, 2012.

HUANG, G. et al. Sirtuin-4 (SIRT4) is downregulated and associated with some clinicopathological features in gastric adenocarcinoma. *Biomédecine & Pharmacothérapie*, France, v. 72, n. 5, p.135-139, 2015.

HUANG, K. H. et al. SIRT3 expression as a biomarker for better prognosis in gastric cancer. *World Journal of Surgery*, United States, v. 38, n. 4, p. 910-917, 2014.



HUMAR, B. et al. Association of CDH1 haplotypes with susceptibility to sporadic diffuse gastric cancer. *Oncogene*, England, v.21, n. 53, p. 8192-8195, 2002.

HUSSAIN, S. P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C. C. Radical causes of cancer. *Nature reviews. Cancer*, England, v. 3, n. 4, p. 276-285, 2003.

IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, France, v.6, n. 1, p.1-241, 1994.

IARC. ARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, France, v. 94, n. 1, p.412, 2010.

IARC. Working Group. Body Fatness and Cancer-Viewpoint of the IARC Working Group. *The New England Journal of Medicine*, United States, v. 375, n. 8, p.794-798, 2016.

IIZUKA, M.; SMITH, M. M. Functional consequences of histone modifications. *Current Opinion in Genetics and Development*, England, v.13, n.2, p. 154-160, 2003.

INGBER, D. E. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *Journal of Cell Science*, England, v. 116, pt. 8, p. 1397-1408, 2003.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2016*. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>. Acesso em 10/11/2016

INCA. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2018*. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago>. Acesso em 02/02/18.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, United States, v.33, suppl. 1, p.245-54, 2003.

JAENISCH, R.; YOUNG, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, United States, v. 132, n. 4, p. 567-582, 2008.

JANSEN, A.; VERSTREPEN, K. J. Nucleosome Positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, United States, v. 75, n. 2, p. 301-320, 2011.



JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. *Science*, United States, v. 293, n. 5532, p. 1074-1080, 2001.

JEMAL, A. et al. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer epidemiology, Biomarkers and Prevention*, United States, v.19, n. 8, p.1893-1907, 2010.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, United States, v. 61, n. 2, p. 69, 2011.

JIN, L. et al. Crystal structures of human SIRT3 displaying substrate-induced conformational changes. *The Journal of Biological Chemistry*, United States, v. 284, n. 36, p. 24394-24405, 2009.

JOHNSTONE, R.W. et al. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, United States, v.1, n. 4, p.287-299, 2002.

KANG, Y. et al. Expression of SIRT1 and DBC1 in Gastric Adenocarcinoma. *Korean Journal of Pathology*, Korea, v. 46, n. 6, p.523-531, 2012.

KAMANGAR, F.; SHEIKHATTARI, P.; MOHEBTASH, M. *Helicobacter pylori* and its effects on human health and disease. *Archives of Iranian Medicine*, Iran, v. 14, n. 3, p.192-199. 2011.

KAURAH, P. et al. Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *Journal of the American Medical Association*, United States, v. 297, n. 21, p. 2360-2372, 2007.

KIM, T. H. et al. Perigastric lymph node status can be a simple prognostic parameter in patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology*, Greece, v. 47, n. 35, p.1475-1478, 2000.

KIM, K. et al. Gene profiling of colonic serrated adenomas by using oligonucleotide microarray. *Clinical and Molecular Gastroenterology and Surgery*, Germany, v. 23, n. 6, p. 569-580, 2008.

KIM, R. et al. Geographic differences in approach to advanced gastric cancer: Is there a standard approach? *Critical Reviews in Oncology Hematology*, Netherlands, v. 88, n. 2, p. 416-426, 2013.



KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, England, v. 6, n. 5, p. 376-385, 2005.

KITAJAMA, Y.; MIYAZAKI, K. The Critical Impact of HIF-1 α on Gastric Cancer Biology. *Cancers*, Switzerland, v. 5, n. 1, p. 15-26, 2013.

KOCH, C. M. et al. The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Research*, United States, v. 17, n. 6, p. 691-707, 2007.

KORIYAMA, C. et al. Histology-specific gender, age and tumor-location distributions of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Japan. *Oncology Reports*, Greece, v. 12, n. 3, p. 543, 2004.

KOUZARIDES, T. et al. Chromatin modifications and their function. *Cell*, United States, v. 128, n. 4, p. 693-705 2007.

KUNZ, P. L. et al. Long-term survivors of gastric cancer: a California population-based study. *Journal of Clinical Oncology*, United States, v. 30, n. 28, p. 3507-3515, 2012.

LADEIRAS-LOPES, R. et al. Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes and Control*, Netherlands, v. 19, n. 7, p. 689-701, 2008.

LAID, P. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews. Cancer*, England, v. 3, n. 4, p. 253-266, 2003.

LADEROUTE, K. R. et al. The response of c-Jun/AP-1 to chronic hypoxia is hypoxia-inducible factor 1 α dependent. *Molecular and Cellular Biology*, United States, v. 22, n. 8, p. 2515-2523, 2002.

LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and called intestinal type. An attempt at a histological classification. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica.*, Denmark, v. 64, n. 1, p. 31-49, 1965.

LAUWERS, G. Y.; CARNEIRO, F.; GRAHAM, D. Y. *Gastric carcinoma*. In: BOWMAN F. T.; CARNEIRO, F. HRUBAN, R. H. eds. *Classification of Tumours of the Digestive System*. Lyon: IARC; 2010.



LEAL, M. et al. Promoter hypermethylation of CDH1, FHIT, MTAP and PLAGL1 in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil. *World Journal of Gastroenterology*, United States, v. 13, n. 18, p. 2568, 2007.

LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. L. The role of chromatin during transcription. *Cell*, United States, v. 128, n. 4, p.707-719, 2007.

LI, C. et al. Macroscopic Borrmann type as a simple prognostic indicator in patients with advanced gastric cancer. *Oncology*, Switzerland, v. 77, n. 3-4, p. 197-204, 2009.

LIN, H.Y. et al. Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, United States, v. 26, n. 4, p. 397-413, 2006.

LI, H. J. et al. Diet-induced obesity promotes murine gastric cancer growth through a nampt/sirt1/c-myc positive feedback loop. *Oncology Reports*, Greece, v. 30, n. 5, p.2153-60, 2013.

_____. miR-543 promotes gastric cancer cell proliferation by targeting SIRT1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, United States, v. 469, n. 1, p. 15-21, 2016.

LU, J. et al. SIRT1 counteracted the activation of STAT3 and NF- κ B to repress the gastric cancer growth. *International Journal of Clinical & Experimental Medicine*, United States, v.7, n. 12, p. 5050-5058, 2014.

MANNICK, E. E. et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Research*, United States, v. 56, n. 14, p. 3238,1996.

MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews. Cancer*, England, v. 6, n. 1, p.v38-51, 2006.

MANCINO, M. et al. Regulation of human Cripto-1 gene expression by TGF-beta1 and BMP-4 in embryonal and colon cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, United States, v. 1, n. 1, p. 215-203, 2008.

MARTINEZ-PASTOR, B.; MOSTOSLAVSKY, R. *Sirtuins*, Metabolism, and Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, Switzerland, v. 3, n. 2, p.22, 2012.



MASOUD, G. N.; WEI, L. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica*, Netherlands, v. 5, n. 5, p. 378-389, 2015.

MSIKA, S. et al. Prognostic factors after curative resection of gastric cancer. A population-based study. *European Journal of Cancer*, England, v. 36, n. 3, p. 390-396, 2000.

MORGAN, C. et al. Detection of p53 mutations in precancerous gastric tissue. *British Journal of Câncer*, England, v.89, n. 7, p.1314, 2003.

MORTON, L. M. et al. Stomach cancer risk after treatment for hodgkin lymphoma. *Journal Clinical Oncology*, England, v. 31, n. 27, p. 3369-3377, 2013.

MOSS, S. F.; BLASER, M. J. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nature Clinical Practice. Oncology*, England, v. 2, n. 2, p.90-97,2005.

MUEGGE, K. Lsh, a guardian of heterochromatin at repeat elements. *Biochemistry and Cell Biology*, Canadá, v. 83, n. 4, p. 548-549, 2005.

MULERO-NAVARRO, S.; ESTELLER, M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Netherlands, v. 68, n. 1, p. 1-11, 2008.

NAKAJIMA, T. Higher methylation levels in gastric mucosae significantly correlate with higher risk of gastric cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, United States, v. 15, n. 11, p. 2317-2321, 2006.

NAKAJIMA, T.; ENOMOTO, S.; USHIJIMA, T. DNA methylation: A marker for carcinogen exposure and cancer risk. *Environmental Health and Preventive Medicine*, England, v. 13, n. 1, p. 8-15, 2008.

NG, J. M.; YU, J. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, Switzerland, v. 16, n. 2, p. 2472-2496,2015.

NISHA, P.; TOSHIKAZU, U.; PATRICK, T. How to stomach na epigenetic insult: the gastric cancer epigenome. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, England, v. 14, n. 8, p. 467-478, 2017.



NOBLE, D. Conrad Waddington and the origin of epigenetics. *Journal of Experimental Biology*, England, v. 218, pt. 6, p. 816-818, 2015.

NOGUSHI, Y. et al. Is gastric carcinoma different between Japan and the United States? *Cancer*, United States, v. 89, n. 11, p. 2237-2246, 2000.

NOGUCHI, A. et al. SIRT1 expression is associated with a poor prognosis, whereas DBC1 is associated with favorable outcomes in gastric cancer. *Cancer Medicine*, United States, v.3, n. 6, p.1553-1561, 2014.

NOGUCHI, T. et al. FHIT gene in gastric cancer: association with tumour progression and prognosis. *The Journal of Pathology*, England, v. 188, n. 4, p. 378, 1999.

O'DONNELL, M.; LANGSTON, L. E.; STILLMAN, B. Principles and Concepts of DNA Replication in Bacteria, Archaea, and Eukarya. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, United States, v. 5, n. 7, p. a010108, 2013.

OZANNE, S. E.; CONSTANCIA, M. Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nature clinical practice. Endocrinology and metabolism*, England, v. 3, n. 7, p. 539-546, 2007.

PANANI, A. D. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: Clinical implications. *Cancer Lett*, Ireland, v. 266, n. 2, p.99-115, 2008.

PDB. *A structural view of biology*. Disponível em:
<<http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?tabtoshow=Current&qrid=D73B059>>. Acesso em: 02 nov 2001.

PETERS, C. J. et al. A 4-gene signature predicts survival of patients with resected adenocarcinoma of the esophagus, junction, and gastric cardia. *Gastroenterology*, United States, v.139, n. 6, p.1995-2004, 2010.

PERRY, J. K. et al. Regulation of invasive growth: similar epigenetic mechanisms underpin tumour progression and implantation in human pregnancy. *Clinical Science*, England, v. 118, n. 7, p. 451-457, 2009.

PERRI, F. et al. Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of H. Pylori infected patients and effect of eradication. *The American Journal of Gastroenterology*, United States, v. 102, n. 7, p.1361, 2007.



PEEK, R. M. Jr.; SCHNEIDER, B. G.; CORREA, P. Coming unglued. *Clinical Cancer Research*, United States v. 12, n. 10, p. 2951, 2006.

PINTO-DE-SOUZA, J. et al. Clinicopathologic profiles and prognosis of gastric carcinoma from the cardia, fundus/body and antrum. *Digestive Surgery*, Switzerland, v. 18, n. 2, p. 102-110, 2001.

POLKWSKI, W. et al. Prognostic value of Laurén classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Annals of Surgical Oncology*, United States, v. 6, n. 3, p. 290-297, 1999.

POLO, S.E.; ALMOUZNI, G. Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer Lett*, Ireland, v. 220, n. 1, p. 1-9, 2005.

PRESTON-MARTIN, S. et al. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Research*, United States, v. 50, n. 23, p. 7415-7421, 1990.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, England, v. 447, n. 7143, p. 425-432, 2007.

REN, Z. et al. The effects of PGC-1alpha on the proliferation and energy metabolism of malignant endometrial cancer cells. *OncoTargets and Therapy*, New Zealand, v. 8, n. 1, p.769-774, 2015.

RIBEIRO, M. M. et al. Prognostic significance of Lauren and Ming classifications and other pathologic parameters in gastric carcinoma. *Cancer*, United States, v. 47, n. 1, p. 780, 1981.

RIGGS, A. D.; MARTIENSSEN, R. A.; RUSO, V. E. A. Epigenetic mechanisms of gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 1996.

ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. *Nature reviews. Genetics*, England, v. 6, p. 597-610, 2005.

RODRIGUEZ, A. et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, United States, v. 14, n. 10A, p. 1902-10, 2004.

ROBBINS & CONTRAN. *Pathologic basis of disease*. In: KUMAR, V. et al. eds. 8ª ed. Canadá: Elsevier; 2014.



ROPERO, S.; ESTELLER, M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology*, United States, v. 1, n. 1, p. 19-25, 2007.

ROUTH, A.; SANDIN, S.; RHODES, D. Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, v. 105, n. 26, p.8872-8877, 2008.

RUBENSTEIN, J. H.; TAYLOR, J. B. Meta-analysis: the association of oesophageal adenocarcinoma with symptoms of gastro-oesophageal reflux. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, England, v. 32, n. 10, p. 1222-1227, 2010.

RUTTENBURG, A. et al. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, England, v. 8, n. 12, p. 983-994, 2007.

SADIKOVIC, B. et al. Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Current Genomics*, Netherlands, v. 9, n. 6, p. 394-408, 2008.

SASAKO, M. et al. *Radical surgery*. In: SASAKO, M. editor. *Gastric cancer*. Oxford, England: Oxford University Press; 1997. p. 223.

STARZYNSKA, T. et al. The clinical significance of p53 accumulation in gastric carcinoma. *Cancer*, United States, v. 77, n. 1, p. 2005-2012, 1996.

SATO, K. et al. Frequent loss of expression without sequence mutations of the DCC gene in primary gastric cancer. *British Journal of Cancer*, England, v. 85, n. 2, p. 199, 2001.

SCHOOOF, C. R. G.
Análise da função dos microRNAs na regulação da expressão de DNMT3B/Dnmt3b eMECP2. [Disertação de Mestrado]. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

STRONG, V. E. et al. Comparison of gastric cancer survival following R0 resection in the United States and Korea using an internationally validated nomogram. *Annals of Surgery*, United States, v. 251, n. 4, p. 640-646, 2010.

SEMENZA, G. L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current Opinion in Cell Biology*, England, v. 13, n. 2, p. 167-171, 2001.



SHAH, M. A. et al. Molecular classification of gastric cancer: a new paradigm. *Clinical Cancer Research*, United States, v. 17, n. 9, p. 2693, 2011.

SHRETHA, S. et al. A systematic review of microRNA expression profiling studies in human gastric cancer. *Cancer Medicine*, United States, v. 3, n. 4, p. 878-888, 2014.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. *Cancer Journal for Clinicians*, United States, v. 66, n. 1, p. 7, 2016.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, United States, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.

SMITH, M. G. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, United States, v. 12, n. 19, p. 2979-2990, 2006.

SIEWERT, J. R. et al. Prognostic relevance of systematic lymph node dissection in gastric carcinoma. *British Journal of Surgery, England*, v. 80, n.8, p.1015-1018, 1993.

SIEWERT, J. R. et al. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Annals of Surgery*, United States, v. 228, n. 4, p. 449-461, 1998.

SOLCIA, E. et al. Intestinal and diffuse gastric cancers arise in a different background of *Helicobacter pylori* gastritis through different gene involvement. *The American Journal of Surgical Pathology*, v. 20, suppl 1, p. S8, 1996.

SONG, M. Y. et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. *Public Library of Science One*, United States, v.7, n. 3, p. e33608, 2012.

SUE-LING, H. M. et al. Gastric cancer: a curable disease in Britain. *British Medical Journal, United States*, v. 307, n. 1, p.591-6, 1993.

SCHWARTZ, L.; SUPURAN, C. T.; ALFAROUK, K. O. The Warburg effect and the Hallmarks of Cancer. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, Netherlands, v. 17, n. 2, p. 164-170, 2016.

TAHARA, T. et al. Risk prediction of gastric cancer by analysis of aberrant DNA methylation in nonneoplastic gastric epithelium. *Digestion*, Switzerland, v. 75, n. 1, p. 54-61, 2007.



TALBERT, P. B.; HENIKOFF, S. Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. *Nature Reviews. Genetics*, England, v.7, n. 10, p. 793-803. 2006.

TALLEN, G.; RIABOWOL, K. Keep-ING balance: tumor suppression by epigenetic regulation. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, England, v. 588, n. 16, p. 2728-2742, 2014.

TAKASHI, N.; GUARENTE, L. Sirtuins at a glance. *Journal of Cell Science*, England, v.124, pt. 6, p. 833-838. 2011

TAKAHASHI, I. MATSUSAKA, T.; ONOHARA, T. Clinicopathological features of long-term survivors of scirrhous gastric cancer. *Hepatogastroenterology*, Greece, v. 47, n. 35, p.1485-1488, 2000.

TAKADA, K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Molecular Pathology*, England, v. 53, n. 5, p. 255-261, 2000.

TAKENO, S. et al. Gastric cancer arising from the remnant stomach after distal gastrectomy: a review. *World Journal of Gastroenterology*, United States, v.20, n. 38, p.1334-1340, 2014.

TISCHOF, I.; WITTEKIND, C.; TANNAPFEL, A. Role of epigenetic alterations in cholangiocarcinoma. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, Japan, v. 13, n. 4, p. 274-279, 2006.

THACKE, J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Letters*, Ireland, v. 219, n. 2, p. 125-135, 2005.

UTHMAN, O. A.; JADIDI, E.; MORADI, T. Socioeconomic position and incidence of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Epidemiology and Community Health*, England, v. 67, n. 10, p. 854-860, 2013.

VAN DER POST, R. S. et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *Journal of Medical Genetics*, England, v. 52, n. 6, p.361-374, 2015.

VANNELLA, L. et al. Systematic review: gastric cancer incidence in pernicious anaemia. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, England, v.37, n. 4, p. 375-382, 2013.



VIDANES, G.M., BONILLA, C.Y.; TOCZYSKI, D. P. Complicated tails: histone modifications and the DNA damage response. *Cell*, United States, v. 121, n. 7, p. 973-976, 2005.

WADDINGTON, C. H. editor. *An Introduction to Modern Genetics*. London: Allen & Unwin; 1939.

WANG, L.; WANG, W. Y.; CAO, L. P. SIRT3 inhibits cell proliferation in human gastric cancer through down-regulation of Notch-1. *International Journal of Clinical & Experimental Medicine*, United States, v. 8, n. 4, p. 5263-5271.2015.

WARREN, J. R.; MARSHAL, L. B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, England, v. 1, n. 8336, p. 1273-1275, 1983.

WATKINS, G. et al. The localisation and reduction of nuclear staining of PPARgamma and PGC-1 in human breast cancer. *Oncology Reports*, Greece, v. 12, n. 2, p. 483-488, 2004.

WANEBO, H. J. et al. Cancer of the stomach: a patient care study by the American College of Surgeons. *Annals of Surgery*, United States, v. 218, n. 5, p.583-592, 1993.

WEI, Z.; CHRISTIANI, D. C. East meets west: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between east Asians and caucasians. *Chinese Journal of Cancer*, England, v.30, n. 5, p. 287-292, 2011.

WEINHOUSE, S. et al. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, United States, v. 124, n. 3215, p. 267-272,1956.

WELTI, J. et al. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, United States, v. 123, n. 8, p. 3190-3200, 2013.

WORTHLEY, D. L. et al. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. *Gut*, England, v. 61, n. 5, p. 774-779, 2012.

XIAO, Y. P. et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instabilities of fragile histidine triad gene in gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, United States, v. 12, n. 23, p.3766-3769, 2006.

YAN, Q. Epigenetic mechanisms in commonly occurring cancers. *DNA and Cell Biology*, United States, v. 31, suppl. 1, p.s49-61, 2012.



YASHIRO, M. et al. Establishment of two new scirrhous gastric cancer cell lines: analysis of factors associated with disseminated metastasis. *British Journal of Cancer*, England, v.72, n.5, p.1200-1210, 1995.

YASUI, W. et al. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer*, United States, v. 4, n. 3, p. 113-121, 2004.

_____. Molecular pathobiology of gastric cancer. *Scandinavian Journal of Surgery*, England, v. 95, n. 4, p. 225-231, 2006.

YAGHOOBI, M.; BIJARCHI, R.; NAROD, S. A. Family history and the risk of gastric cancer. *British Journal of Cancer*, England, v.102, n. 2, p. 237-242, 2010.

YAMAMOTO, M. et al. Surgical management of gastric cancer: the East vs. West perspective. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, China, v. 6, n. 1, p. 79-88, 2015.

YANG, B. et al. Aberrant expression of SIRT3 is conversely correlated with the progression and prognosis of human gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, United States, v. 443, n. 1, p.156-160, 2014.

YANG, H. et al. Knockdown of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha increased apoptosis of human endometrial cancer HEC-1A cells. *Oncotargets and Therapy*, New Zealand, v. 24, n.9, p.5329-5338, 2016.

YANG, Q. et al. Resveratrol inhibits the growth of gastric cancer by inducing G1 phase arrest and senescence in a Sirt1-dependent manner. *Public Library of Science One*, United States, v. 8, n. 11, p. e70627, 2013.

YANG, Q. et al. SIRT1 is downregulated in gastric cancer and leads to G1-phase arrest via NF-κB/Cyclin D1 signaling. *Molecular Cancer Research*, United States, v.11, n. 12, p. 1497-1507, 2013.

YOKOTA, T. et al. Significant prognostic factors in patients with node-negative gastric cancer. *International Surgery*, Italy, v. 84, n. 4, p. 331-336, 1999.

YOKOTA, T. et al. Significant prognostic factors in patients with early gastric cancer. *International Surgery*, Italy, v. 85, n. 4, p. 286-290, 2000.



YOKOZAKI, H. et al. Alterations of p73 preferentially occur in gastric adenocarcinomas with foveolar epithelial phenotype. *International Journal of Cancer*, United States, v. 83, n. 2, p. 192, 1999.

YONG, P.; CROCE, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, England, v.15004, p.1-9. 2016.

YUAN, H.; MARMORSTEIN, R. Structural basis for sirtuin activity and inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, United States, v. 287, n. 51, p. 42428-42435, 2012.

ZHOU, W.; CHRISTIANI, D. C. East meets West: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between East Asians and Caucasians. *Chinese Journal of Cancer*, England, v. 30, n. 5, p. 287-92, 2011.

ZHANG, L.; WANG, X.; CHEN, P. MiR-204 down regulates SIRT1 and reverts SIRT1-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells. *BMC Cancer*. England, v.13, n. 6, p. 290, 2013.

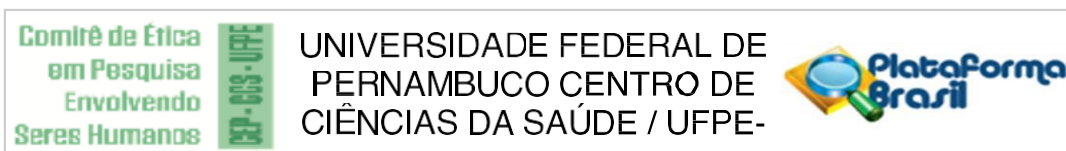
ZHANG, L. H. et al. Clinicopathological significance of SIRT1 and p300/CBP expression in gastroesophageal junction (GEJ) cancer and the correlation with E-cadherin and MLH1. *Pathology, Research and Practice*, Germany, v. 209, n. 10, p.611-617, 2013.

_____. Upregulated miR-132 in Lgr5+ gastric cancer stem cell-like cells contributes to cisplatin-resistance via SIRT1/CREB/ABCG2 signaling pathway. *Molecular Carcinogenesis*, United States, v.56, n. 9, p. 2022-2034, 2017.

_____. Co-ordinated overexpression of SIRT1 and STAT3 is associated with poor survival outcome in gastric cancer patients. *Oncotarget*, United States, v. 8, n. 12, p.18848-18860, 2017.



ANEXO A - Parecer do comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS /UFPE.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: LUIZ ALBERTO REIS MATTOS JUNIOR

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31575414.5.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 723.896

Data da Relatoria: 23/07/2014

Apresentação do Projeto:

Indicado no relatório inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado no relatório inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado no relatório inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado no relatório inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado no relatório inicial.

Recomendações:

s/recomendação;

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência:

Justificar o número de amostras, bem como, não foi indicado, esse número, na METODOLOGIA do projeto em WORD e também na PBrasil;

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

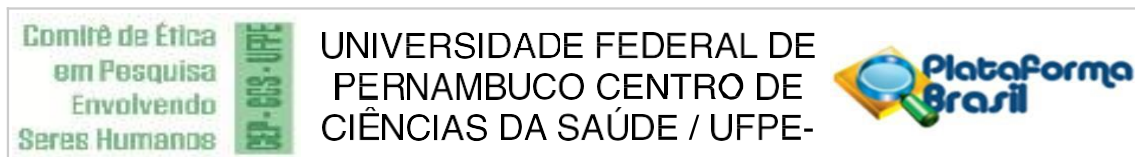
UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 681.552

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de “Notificação ” e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado .

.

RECIFE, 10 de Junho de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)



ANEXO B - Artigo produzido enquanto realização do doutorado, em tema distinto

USO DA GOSERELINA NA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE NA MULHER JOVEM
PORTADORA DE CÂNCER DE MAMA - UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
USO DA GOSERELINA NA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE NA MULHER JOVEM
PORTADORA DE CÂNCER DE MAMA - UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

GOSERELINA NA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE NA PORTADORA DE
CÂNCER DE MAMA

Autores

*FLÁVIO CHAGAS ALBUQUERQUE

**IOLANDA MATIAS GOMES

***LUIZ ALBERTO MATOS

****MARCIA

Local de realização do estudo: HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO - UC/UFPE

*Médico Ginecologista - Hospital da Mulher do Recife - Recife-PE

**Cirurgiã Oncológica do HC/UFPE

***Oncologista Clínico do HC/UFPE

****Professora do Departamento de Ginecologia - UFPE

Endereço para correspondência: flavioalbuquerque@gmail.com

RESUMO: A mulher jovem com câncer de mama sem prole definida e desejosa de gravidez representa um desafio clínico, pois a quimioterapia pode trazer danos irreversíveis às gonadas. A dosagem do Hormônio Antimülleriano é o mais promissor parâmetro de verificação da reserva ovariana. A Goserelina é administrada durante a quimioterapia, com fins de preservar a função reprodutiva, mas muitas mulheres não têm acesso a este medicamento. Neste trabalho os autores investigam o embasamento teórico deste manejo.



Métodos: Realizamos uma revisão bibliográfica de dez anos, selecionando trabalhos que objetivavam observar a preservação da fertilidade e as ferramentas e parâmetros utilizados.

Resultados: Nossa busca resultou em 16 trabalhos, sendo que oito foram excluídos, conforme critérios pré-estabelecidos. Os demais foram analisados.

Conclusão: Nos últimos dez anos, período em que se estabelece a indicação de Análogos de GnRH, sobretudo da Goserelina, não há relatos de trabalhos controlados, randomizados, duplo cego, que objetivem verificar a eficácia desta indicação. Os parâmetros utilizados para mensuração da preservação da fertilidade são muito variados e não validados, e o desfecho gravidez pouco explorado. Os autores acreditam que a indicação da de análogos para preservar a função reprodutiva deva ser esclarecida com trabalhos controlados, sobretudo evitando custos e riscos desnecessários às pacientes.

Palavras-Chaves: *câncer mama, Goserelina and Fertility*

INTRODUÇÃO

No Brasil o risco estimado de câncer de mama é de 56,20/100.000 mulheres, segundo o INCA - Instituto Nacional do Câncer. Além de fatores de fatores ambientais, dietéticos e consumo de bebida alcoólica, mutações nos Genes BRCA1 e BRCA2, são apontados como responsáveis pelo seu desenvolvimento². Seu aparecimento em mulheres na idade reprodutiva e sem prole definida é um desafio clínico que se impõe na atualidade.

Sabemos que a fertilidade da mulher cai progressivamente a partir dos 35 anos até atingir a menopausa, em torno dos 50 anos³. Dos 300 mil ovócitos viáveis na menarca, estima-se que a mulher usará cerca de 500 folículos primordiais. Na menopausa o ovário será formado por estroma denso e raros ovócitos ⁴.

A preservação da fertilidade em pacientes oncológicos é uma preocupação que mobiliza pesquisadores no mundo todo ⁵. Vários métodos têm sido desenvolvidos para que as chances d de engravidar após tratamento oncológico ⁶. A criopreservação, fertilização in vitro e o uso de medicação protetora do ovário durante a quimioterapia são exemplos disto.

A dosagem do Hormônio Folículo Estimulante - FSH no sangue periférico, cujos normal varia de 3,0 a 15,0 UI ⁷, assim como a dosagem da Inibina B ^{8,9} com níveis normais em torno de 100pg/ml, sendo que este pode predizer a queda da reserva ovariano, antes



mesmo do aumento do FSH 10. O Hormônio Antimülleriano - HAM ou Substância Inibitória Mülleriana, é considerado um marcador do declínio da função do ovário. Mulheres na pós-menopausa apresentam níveis indetectáveis dele 12. Seus valores normais situam-se em torno de 2,0ng/ml.

A Ultrassonografia Transvaginal - USG-TV, através da mensuração do volume ovariano e e da contagem de folículos antrais, podem auxiliar como indicadores da função reprodutiva 15. A medida do volume ovariano é considerada significativa para mau prognóstico reprodutivo se for menor que 3 cm 3. Segue-se que o volume ovariano na mulher no menagem esteja diretamente proporcional à população folicular remanescente 16. Mas o valor dessa medida não deve ser usado isoladamente, mas sim acompanhado de marcadores da reserva ovariana 17. Diz-se que junto mais folículos primordiais estiverem presentes, melhor é a capacidade reprodutiva 18,19,20. A contagem mínima de 20 folículos nos dois ovários são associadas a melhores taxas 20. A idade, entretanto, está em íntima relação com esses parâmetros 16,18.

OS danos causados por quimioterápicos sobre as gônadas femininas variam conforme o tratamento 21,22. Agentes alquilantes, usados no tratamento do câncer de mama são gonadotóxicos, induzindo a depleção de ovócitos e a deficiência hormonal 23. Seus efeitos podem ser transitórios, com amenorreia, ou permanentes causando menopausa precoce e esterilidade 24,25.

Para preservar os ovários desses efeitos colaterais, muitos autores propõem o uso concomitante de Agonista do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) 22. Considerado medicamentos de alto custo, essa droga é inacessível para boa parte da população.

O GnRH, que é um decapeptídeo de ação pulsátil no sistema porta-hipofisário, que induz um repouso ovariano através do aumento do hormônio Luteinizante -LH e do FSH. Isso paralisa o desenvolvimento dos folículos em fases imaturas 24. Outra ação do GnRH é a redução da irrigação ovariana, dificultando o acesso ovariano dos quimioterápicos 26. O agonista do LHRH (Hormônio liberador do Hormônio Luteinizante) a Goserelina, droga sintética que age na hipófise de forma não pulsátil, da mesma forma resulta num hipogonadismo 24,27 é usado para este fim.

A administração do GnRH é indicado para mulheres de até 40 anos em quimioterapia para o câncer de mama, além de outras indicações 22. A Goserelina é iniciada até 14 dias antes do início da quimioterapia, e mantida com intervalos de 28 dias, até duas semanas após o fim do tratamento 18,29. Um de seus efeitos colaterais é a redução da massa óssea 28. Em



virtude dos efeitos a longo prazo do análogos de GnRH não estão claramente elucidado, não são aprovados em pesquisa prospectiva pelos Comitês de Ética 30.

Este estudo se debruça sobre o uso do análogo na mulher jovem com câncer de mama, através de uma revisão dessa aplicação.

MÉTODOS

Realizamos uma revisão da literatura consultando artigos na base de dados PubMed, acessando artigos publicados até abril de 2016, utilizando as palavras-chaves: Breast câncer, Goserelina and Fertility, limitando os resultados ao título ou ao resumo, publicado nos últimos dez anos e em língua inglesa. Trabalhos outros que não se prestam à verificação de proteção ovariana foram excluídos do estudo.

RESULTADOS

Foram selecionados dezesseis artigos, dos quais oito deles entraram nos critérios de exclusão: Um artigo estava no idioma Japonês, outro abordou qualidade de vida no câncer de mama, um trabalho usava o Análogo Triptorelina. Um dele avaliou o impacto da supressão temporária ovariano na sobrevida livre de doença. Um relato de caso também foi excluído. Os três últimos tratavam-se de carta ao leitor.

DISCUSSÃO

Um estudo prospectivo dos autores Urruticoechea e cols. (2008), que estudou pacientes com câncer de mama em quimioterapia, onde 50 delas tiveram um acompanhamento pós-tratamento de 43 meses. Das 50 pacientes avaliadas, 45 (90%) recuperaram a menstruação (43 durante o primeiro ano de seguimento e 2 após o segundo ano de seguimento). O tempo médio para a recuperação da menstruação foi de 4 meses após o último curso de quimioterapia com um intervalo de 0-17 meses. Destas 45 pacientes, 34 tiveram os hormônios FSH, LH e estrógeno dosados. Apenas 10 pacientes do grupo tentavam engravidar, sete tiveram sucesso, e uma teve gestações em anos subsequentes.

Nesse estudo, os autores observam que apenas 10 tinham tentado engravidar. Uma justificativa dada pelo autor consiste no fato de que as pacientes com receptores estrogênio positivos foram aconselhadas a atrasar a gravidez e prolongar a supressão ovariana, com base nos dados emergentes apresentados nesta abordagem³⁸. Mesmo conscientes que a gestação pode não interferir no curso da doença, pois uma preocupação com o uso da Goserelina e a redução da ação do Tamoxifeno⁴⁰.

Esse estudo utilizou dosagem de Estrógeno e LH como marcador da função ovariana, mas não cita o momento da dosagem, como também não há conclusões sobre correlação de



níveis hormonais e fertilidade. Os autores dificuldades devido o tamanho amostral. Mesmo assim, concluem que a Goserelina é uma boa opção para redução do risco de insuficiência ovariana, mas que necessita de estudos controlados.

Badawy e cols, em 2008⁴¹, em estudo prospectivo randomizado, estudaram 80 mulheres com câncer de mama indicadas para quimioterapia, entre 18 e 40 anos, que receberam análogo de GnRH, em dose padrão mensal, por 6 meses. Dosagens de FSH, LH, estradiol, progesterona e prolactina foram realizadas mensalmente. A Ultrassonografia foi usada para medidas ovarianas e endometrial.

Dos parâmetros usados para mensurar a função ovariana, apenas o FSH, foi significativamente menor no grupo que recebeu o Análogo. Da amostra, 27 (68,2%) retornaram a ovulação espontânea dentro de 3-8 meses após o término do tratamento. No grupo controle 10 (25,6%) reestabeleceram a ovulação ($P < 0,001$). Os autores concluem que o uso de Análogo de GnRH preservam a função ovariana mas que estudos de longo prazo são necessários.

Em trabalho de revisão publicado em 2009⁴², Sonmezer e Oktay investigam o papel protetor do análogo de GnRH contra os danos causados pela quimioterapia e concluem que não há ausência de estudos prospectivos e randomizados que possam demonstrar sua eficácia.

Em publicação de 2010, Edgard Petru⁴³ aborda a preservação da fertilidade em pacientes jovens com câncer de mama, que precisam adiar a maternidade. O autor investiga quatro estudos randomizados com análogo de GnRH⁵³⁻⁵⁶. O tratamento de GnRH foi realizado durante um período de 2 anos em um dos estudos⁵⁶, enquanto nos outros três, houve um bloqueio ovariano durante a quimioterapia única⁵⁴⁻⁵⁶. Dois estudos mencionados não incluíram as taxas de gravidez precoce. A autor aborda ainda técnicas alternativas de remoção ovariana por videolaparoscopia e reimplante após 2 anos de finda a quimioterapia. Outras possibilidades como reserva de oócito por coleta transvaginal também são considerados.

O autor afirma que a gravidez após o tratamento de câncer de mama não piora o prognóstico, mas há um viés a ser considerado, pois mulheres jovens tendem a ter filhos saudáveis⁵⁰. Conclui que são necessários mais estudos de verificação da preservação ovariana, sabendo-se que o Hormônio Antimülleriano pode ser o melhor marcador para estimar a reserva ovariana.

Wong e cols⁴⁴, em 2012 estudaram o efeito da Goserelina usada concomitante à quimioterapia a jovens portadoras de câncer de mama, em um total de 125 mulheres tomando Análogo de GnRH concomitante a quimioterapia, a cada 28 dias⁴⁴. Dessas, 30 mulheres engravidaram. Concluem que o agonista de GnRH usado concomitante à quimioterapia em



paciente com câncer de mama está associado a um baixo risco de amenorreia induzida pelos efeitos nocivos dos quimioterápicos e uma alta probabilidade de gravidez. Observamos que seu grupo amostral foi bastante uniforme e que o reestabelecimento menstrual chegou até 43 meses.

Kim J. e cols.⁴⁵, em 2014, em estudo prospectivo visando determinar o impacto do agonista de GnRH concomitante à quimioterapia, relatam que a evidencia atual do papel do agonista na proteção ovariana tem dados conflitantes em ensaios randomizados^{44,45}. Esse estudo realizado no Centro de Câncer Samsung Medical Center em Seul na Coréia com mulheres entre 20 e 40 anos elegíveis para quimioterapia.

Das 1073 pacientes estudadas. 124 pacientes receberam o análogo de GnRH antes e durante a quimioterapia adjuvante, a cada 28 dias. Foram utilizados dois análogos de GnRH: a leuprorrelina 3,75mg em 105 mulheres e 3,6 mg de goserelina para 19 mulheres. O autor relata que diferentes formas de regimes quimioterápicos foram prescritos de acordo com o estágio da doença e período de tratamento e não houve diferença entre os grupos. Paciente tratadas com análogo de GnRH mostraram significativamente melhores resultados em doença não recidivante do que aquelas tratadas apenas com quimioterapia ($p = 0,034$), embora a taxa de sobrevida não foi diferente ($p = 0,413$). Os autores concluem que o tratamento quimioterápico com análogo de GnRH para pacientes jovens com câncer de mama é uma opção para a preservação da fertilidade.

Recchia e cols., em 2014⁴⁶, da mesma forma, estudou 200 pacientes com câncer de mama, tratadas com proteção ovariana com análogo de GnRH durante em quimitearapia⁴⁶. Cem paciente selecionadas receberam esquema trimestral de Goserelina na dose de 11,4mg, por 5 anos, suplemento de vitamina D, cálcio e de bifosfonato. Os autores concluem pela efetividade de preservação da função ovariana e ainda associam a desfechos de melhoria na sobrevida.

Lúcia Del Mastro e cols.⁴⁷, em 2015 relatam um estudo que envolve a associação do LH-RH com tamoxifeno e inibidores de aromatase. Aem metanálise que incluiu nove estudos, os autores concluem por desfcho favorável. Mas ainda em 2014, a publicação dos resultados de dois grandes ensaios de fase III fez esclarecer as dúvidas relacionadas sobre a real eficácia da preservação ovariana e a taxa de gravidez.

No estudo POEMS (Prevention of early menopause study), 257 mulheres selecionadas, em quimioterapia, receberam Análogo de GnRH. A conclusão foi que pacientes tratadas com análogo tinham melhorado as taxas de sobrevida livre de doenças ($p=0,04$) e sobrevida global ($p=0,05$). Os autores concluem pela recomendação da supressão temporária



do LH-RH como estratégia válida para pacientes com mama hormônio receptor negativo, mas não demonstra uma relação direta com a preservação da fertilidade.

Moore e cols.⁴⁸, em 2015 realizaram um ensaio clínico de fase III com pacientes de 18 e 49 anos com receptor hormonal negativo de estrogênio e progesterona, distribuídas em dois grupos, com e sem uso da Goserelina, randomizadas em dois grupos. E constratarem um taxa de falência ovariana foi de 8% no grupo da goserelina em comparação a 22% no grupo sem. E a taxa de gravidez foi mais alta primeiro grupo (21% vs. 11%, $p = 0,03$), assim como melhor sobrevida livre de doença ($p = 0,04$) e sobrevida global ($p = 0,05$). Os autores afirmam que o tratamento com o agonista de GnRH durante a quimioterapia parece proteger contra a falência ovariana, reduz o risco de menopausa precoce e melhora as perspectivas para a fertilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf> , acesso em julho de 2016.
2. Yoshida K., Miki Y., Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 2004 Nov; 95(11):866-71.
3. Silva HMS, Junqueira JPC, Pacheco F, et al. Gravidez depois dos 40. Belo Horizonte; 2004. [Citado 2007 maio 20]. Disponível em: http://www.materdei.com.br/qvc/informacoes/gravidez_40.jsp.
4. Freitas F. et al., 2011. Rotinas em obstetrician 6.ed. – Porto Alegre: Artmed 2011
5. Urruticoechea A, Arnedos M, Walsh G, Dowsett M, Smith IE. Ovarian protection with goserelin during adjuvant chemotherapy for pre-menopausal women with early breast cancer (EBC). *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Aug;110(3):411-6. Epub 2007 Sep 13.
6. Maltaris T, Seufert R, Fischl F, Schaffrath M, Pollow K, Koelbl H, Dittrich R. The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* n130:148-155,2007.
7. Chuang CC, Chen CD, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2003;79(1): 63-68.



8. Cobellis L, Luisi S, Pezzani I, Reis FM, De Leo V, Petraglia F. Serum inhibin A, inhibin B, and pro-alphaC levels are altered after surgically or pharmacologically induced menopause. *Fertil Steril*. 2002;77(4):745-9.
9. Sammel MD, Freeman EW, Liu Z, Lin H, Guo W. Factors that influence entry into stages of the menopausal transition. *Menopause*. 2009;16(6):1218-27.
10. De Vet A, Laven JSE, de Jong FH, Themmen APN, Fauser BCJM. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril*. 2002;77(2):357- 62.
11. Dechaud H. L'ovocyte: avancées fondamentales et thérapeutiques. Les tests dynamiques peuvent-ils prévoir la qualité ovocytaire? *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 2006;35(2):2S37-8.
12. Seifer DB, MacLaughlin DT. Mullerian Inhibiting Substance in an ovarian growth factor or emerging clinical significance. *Fertil Steril*. 2007;88(3):539-46.
13. Visser JA, de Jong FH, Laven JSE, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*. 2006;131(1):1-9.
14. Fiğicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as na indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2006;85(3):592-6.
15. Hendriks DJ, Kwee J, Mol BWJ, te Velde ER, Broekmans JM. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril*. 2007;87(4):764-75.
16. Wallace WH, Kelsey TW. Ovarian reserve and reproductive age may be determined from measurement of ovarian volume by transvaginal sonography. *Hum Reprod*. 2004;19(7):1612-7.
17. Maheshwari A, Fowler P, Bhattacharya S. Assessment of ovarian reserve – should we perform tests of ovarian reserve routinely? *Hum Reprod*. 2006;21(11): 2729-35.
18. Tufan E, Elter K, Durmusoglu F. Assessment of reproductive ageing patterns by hormonal and ultrasonographic ovarian reserve tests. *Hum Reprod*. 2004;19(11):2484-9
19. Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EMA, Groenewoud ER, Heineman MJ, et al. The number of small antral follicles (2-6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod*. 2007;22(7):1925-31
20. Avril C. L'ovocyte: avancées fondamentales et thérapeutiques. Peut-on prédire la qualité ovocytaire par l'échographie? *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 2006;35 (Cahier 2):2S42-3.
21. Kovacs P. Preserving Ovarian Function after Breast Cancer treatment *Fertil Steril* v91 n3:694-7; 2009. Publicado em 04/24/2009



22. Brougham M H F, Wallace W H B. Subfertility in children and young people treated for solid and haematological malignancies. *British Journal of Haematology* n131:143-155; 2005.
23. Del Mastro L et al. Prevention of chemotherapy-induced menopause by temporary ovarian suppression with goserelin in young, early breast cancer patients. *Annals of Oncology* n17:74-78; 2006.
24. Chang HJ, Suh CS. Fertility preservation for women with malignancies: current developments of cryopreservation. *J Gynecol Oncol.* 2008; 19(2): 99-107.
25. Blumenfeld Z. GnRH-agonists in fertility preservation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008;15:523-528.
26. Chen S. V, Yang Y. S. Slow freezing or vitrification of oocytes: Their effects on survival and Meiotic Spindles and the time schedule for clinical practice. *Journal Obstet Gynecol* v48 n1: 15-20; 2009.
27. Maltaris T, Beckman MW, Dittich R. Fertility preservation for young female cancer patients. *In vivo* 2009; 23:123-130.
28. Georgescu ES, Goldberg JM, du Plessis SS, Agarwal A. Present and future fertility preservation strategies for female cancer patients. *Obstet gynecol surv.* 2008; 63(11); 725-732
29. Oehninger S, Cabrera RA, Stadtmauer L, Mayer JF, Gibbons WE, Follicular phase serum levels of luteinizing hormone do not influence delivery rates in in vitro fertilization cycles down-regulated with a gonadotropin-releasing hormone agonist and stimulated with recombinant follicle-stimulating hormone.
30. Sonmezer M, Oktay K (2004) Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 10:251–266
31. Goldhirsch A, Gelber RD, Castiglione M (1990) The magnitude of endocrine effects of adjuvant chemotherapy for premenopausal breast cancer patients. The International Breast Cancer Study Group. *Ann Oncol* 1:183–188
32. Levine MN, Bramwell VH, Pritchard KI et al (1998). Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 16:2651–2658



33. Hortobagyi GN, Buzdar AU, Marcus CE et al (1986). Immediate and long-term toxicity of adjuvant chemotherapy regimens containing doxorubicin in trials at M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute. NCI Monogr 1:105–109
34. Valagussa P, Moliterni A, Zambetti M, et al (1993) Long-term sequelae from adjuvant chemotherapy. Recent Results Cancer Res 127:247–255
35. Bines J, Oleske DM, Cobleigh MA (1996) Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. J Clin Oncol 14:1718–1729
36. Sonmezer M, Oktay K (2004) Fertility preservation in female patients. Hum Reprod Update 10:251–266
37. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI et al (1999) Risk of menopause during the first year after breast cancer diagnosis. J Clin Oncol 17:2365–2370;
38. Baum M, Hackshaw A et al (2006) Adjuvant goserelin in premenopausal patients with early breast cancer: results from the ZIPP study. Eur J Cancer 42(7):895–904
39. Gelber S, Coates AS et al (2001) Effect of pregnancy on overall survival after the diagnosis of early-stage breast cancer. J Clin Oncol 19(6):1671–1675;
40. Albain K, Barlow W, O'Malley F et al (2004) Concurrent (CAFT) versus sequential (CAF-T) chemohormonal therapy (cyclophosphamide, doxorubicin, 5-fluorouracil, tamoxifen) versus T alone for postmenopausal, node-positive, estrogen (ER) and/or progesterone (PgR) receptor-positive breast cancer: mature outcomes and new biologic correlates on phase III intergroup trial 0100 (SWOG-8814). San Antonio Breast Cancer Symposium (abstract no. 37);
41. Ahmed Badawy, M.D., Aboubakr Elnashar, M.D., Mohamed El-Ashry, M.D., and May Shahat, M.D. Gonadotropin-releasing hormone agonists for prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: prospective randomized study. Fertil Steril. 2009 Mar;91(3):694-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.12.044.
42. Oktay K, Sönmezer M. Questioning GnRH analogs for gonadal protection in cancer patients. Fertil Steril. 2009 Aug;92(2):e32; author reply e34. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.06.004. No abstract available.
43. Petru E. Fertility preservation and infertility treatment in breast cancer patients. Fertility preservation and infertility treatment in breast cancer patients. Wien Med Wochenschr. 2010 Nov;160(19-20):487-92. doi: 10.1007/s10354-010-0833-y. Review.
44. Wong M, O'Neill S, Walsh G, Smith IE. Goserelin with chemotherapy to preserve ovarian function in pre-menopausal women with early breast cancer: menstruation and pregnancy outcomes. Ann Oncol. 2013 Jan;24(1):133-8. doi: 10.1093/annonc/mds250.



45. Kim J, Kim M, Lee JH, Lee H, Lee SK, Bae SY, Jun SY, Kil WH, Lee JE, Kim SW, Nam SJ. Ovarian function preservation with GnRH agonist in young breast cancer patients: does it impede the effect of adjuvant chemotherapy? *Breast*. 2014 Oct;23(5):670-5. doi: 10.1016/j.breast.2014.07.005.
46. Recchia F, Necozione S, Bratta M, Rosselli M, Guerriero G, Rea S. LH-RH analogues in the treatment of young women with early breast cancer: long-term follow-up of a phase II study. *Int J Oncol*. 2015 Mar;46(3):1354-60. doi: 10.3892/ijo.2014.2811.
47. Del Mastro L, Rossi G, Lambertini M, Poggio F, Pronzato P. New insights on the role of luteinizing hormone releasing hormone agonists in premenopausal early breast cancer patients. *Cancer Treat Rev*. 2016 Jan;42:18-23. doi: 10.1016/j.ctrv.2015.11.002. Review.
48. Moore HC, Unger JM, Phillips KA, Boyle F, Hitre E, Porter D, Francis PA, Goldstein LJ, Gomez HL, Vallejos CS, Partridge AH, Dakhil SR, Garcia AA, Gralow J, Lombard JM, Forbes JF, Martino S, Barlow WE, Fabian CJ, Minasian L, Meyskens FL Jr, Gelber RD, Hortobagyi GN, Albain KS; POEMS/S0230 Investigators. Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 2015 Mar 5;372(10):923-32. doi: 10.1056/NEJMoa1413204.
49. Blumenfeld Z. How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos. *Oncologist* 2007;12:1044–54.
50. Recchia F, Sica G, De Filippis S, Saggio G, Rosselli M, Rea S. Goserelin as ovarian protection in the adjuvant treatment of premenopausal breast cancer: a phase II pilot study. *Anticancer Drugs* 2002;13:417e24.
51. Munster PN, Moore AP, Ismail-Khan R, Cox CE, Lacevic M, Gross-King M, et al. Randomized trial using gonadotropin-releasing hormone agonist triptorelin for the preservation of ovarian function during (neo)adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:533e8.
52. Gerber B, von Minckwitz G, Stehle H, Reimer T, Felberbaum R, Maass N, et al. Effect of luteinizing hormone-releasing hormone agonist on ovarian function after modern adjuvant breast cancer chemotherapy: the GBG 37 ZORO study. *J Clin Oncol* 2011;29:2334e41
53. Gerber B, Stehle H, Ricardo F, et al. ZORO: a prospective randomized multicenter study to prevent chemotherapy-induced ovarian failure with the GnRH-agonist goserelin in



- young hormone-insensitive breast cancer patients receiving anthracycline containing (neo-)-adjuvant chemotherapy (GBG 37). *J Clin Oncol*, 15(Suppl): Abstr 526, 2009.
54. Badaway A, Elnashar A, El-Ashry M, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonists for prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: prospective randomized study. *Fertil Steril*, 91: 674–697, 2009.
55. Sverrisdottir A, Nystedt M, Johansson H, et al. Adjuvant goserelin and ovarian preservation in chemotherapy treated patients with early breast cancer: results from a randomised trial. *Breast Cancer Res Treat*, 117: 561–567, 2009.
56. Oktay K, Buyuk E, Libertella N, et al. Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. *J Clin Oncol*, 23: 4347–4353, 2005.