

**Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina**

**Expressão do receptor c-MET, seu ligante HGF e VEGF como
marcadores tumorais no câncer gástrico dos tipos intestinal e
difuso na população brasileira: estudo piloto para padronização
da técnica de PCR quantitativo**

Bianca Della Croce Vieira Cota

**Belo Horizonte
2016**

BIANCA DELLA CROCE VIEIRA COTA

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR c-MET, SEU LIGANTE HGF E VEGF COMO
MARCADORES TUMORAIS NO CÂNCER GÁSTRICO DOS TIPOS INTESTINAL E
DIFUSO NA POPULAÇÃO BRASILEIRA: ESTUDO PILOTO PARA
PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho.

Coorientadora: Profa. Dra. Mônica Maria Demas Álvares Cabral

Belo Horizonte – MG

Faculdade de Medicina da UFMG

2016

C843e Cota, Bianca Della Croce Vieira.
Expressão do receptor c-MET, seu ligante HGF e VEGF como marcadores tumorais no câncer gástrico dos tipos intestinal e difuso na população brasileira [manuscrito]: estudo piloto... / Bianca Della Croce Vieira Cota. - - Belo Horizonte: 2016.
58f.: il.
Orientador: Luiz Gonzaga Vaz Coelho.
Coorientador: Mônica Maria Demas Álvares Cabral.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Neoplasias Gástricas. 2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 3. Proteínas Proto-Oncogênicas c-met 4. Receptores de Fatores de Crescimento do Endotélio Vascular. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Coelho, Luiz Gonzaga Vaz. II. Cabral, Mônica Maria Demas Álvares. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título. WI 320

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez

Vice-Reitora: Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dr. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitora de Pesquisa: Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor: Prof. Dr. Humberto José Alves

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Profa. Dra. Sandhi Maria Barreto

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Profa. Dra. Ana Cristina Cortes

Chefe do Departamento de Clínica Médica: Prof. Dr. Unai Tupinambás

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

Coordenadora: Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenador: Profa. Dra. Suely Meireles Rende

Colegiado de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto:

Representantes Docentes:

Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Profa. Dra. Valéria Maria Azeredo Passos

Profa. Dra. Gilda Aparecida Ferreira

Prof. Dr. Paulo Caramelli

Profa. Dra. Rosângela Teixeira

Prof. Dr. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Profa. Dra. Andréa de Lima Bastos

Dedico este trabalho aos meus pais, responsáveis por
minha formação, meu crescimento e pelo apoio durante
todos esses anos acadêmicos;

Aos meus amigos, pelo companheirismo, pelos grandes
momentos de alegria juntos e pela compreensão nos
momentos de ausência;

Aos meus orientadores, pelas inúmeras lições aprendidas,
pelo incentivo e a constante disposição e disponibilidade
para me auxiliar,
gratidão!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho, pela sabedoria, dedicação, compartilhamento do conhecimento e experiência, pela calma e bons conselhos, inclusive nos momentos difíceis;

À Profa. Dra. Mônica Maria Demas Álvares Cabral, coorientadora do trabalho, pelo tempo despendido e abnegação;

Ao Prof. Dr. André Márcio Murad, pela idealização desse projeto e contribuição no estudo;

Ao Prof. Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier, por transmitir seus conhecimentos, sempre com boa vontade e disponibilidade;

Ao Prof. Dr. Alfredo José Afonso Barbosa, pela colaboração, ensinamentos e carinho para comigo;

À Karine Sampaio Lima, pelo constante apoio, atenção, disponibilidade e participação ativa na pesquisa;

À Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal, pela valiosa e cuidadosa contribuição na minha qualificação;

À Faculdade de Medicina e ao Hospital das Clínicas da UFMG, professores, funcionários e todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram da minha formação científica;

Aos integrantes do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, em especial ao Osmar, Marcelo e Luciene, pela convivência, força, solicitude e assistência, mesmo durante o cotidiano extenso de cada um;

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado e torceram pela conclusão deste trabalho,

Aos meus familiares, pelo constante apoio e carinho;

Aos pacientes, sem os mesmos, este trabalho não seria possível.

EPÍGRAFE

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

RESUMO

INTRODUÇÃO: O carcinoma gástrico (CG) é a terceira causa de morte, entre os tumores malignos, no mundo, provocando, aproximadamente, 900.000 mortes/ano. Alterações em oncogenes que codificam receptores tirosina-quinase desempenham papel importante na patogênese do CG. O gene *MET* é um proto-oncogene que codifica o receptor tirosina-quinase c-MET e se faz necessário para desenvolvimento embrionário e reparo tecidual. O Fator de Crescimento Hepatocítico (HGF) é o único ligante conhecido para o receptor c-MET. A ativação oncogênica de *MET* suprime a apoptose e promove a sobrevivência da célula, proliferação, migração, diferenciação e angiogênese. Dentre os fatores angiogênicos, o VEGF é o regulador principal. Sua função biológica inclui promover a mitose de células endoteliais e estimular sua proliferação. A expressão desses biomarcadores no CG é relativamente recente e estudos de base populacional são necessários para definição do padrão de expressão.

OBJETIVOS: Padronizar a técnica qPCR para avaliar, quantitativamente, em amostras teciduais parafinadas, a presença de expressão dos genes *MET*, *HGF* e *VEGF* no CG dos tipos difuso e intestinal.

MÉTODOS: Foram estudados 20 pacientes com CG, sendo dez do tipo intestinal (idade média 72,1 anos) e dez do tipo difuso (idade média 50,1 anos). Em todos os pacientes foram analisadas amostras teciduais provenientes do tumor e de áreas distantes do tecido tumoral. A expressão relativa dos marcadores tumorais c-Met, HGF e VEGF foi realizada pela técnica de qPCR, através da comparação entre amostras tumorais e não tumorais, quando normalizados com o gene de referência constitutivo *GAPDH*.

RESULTADOS: Para c-Met, 18/20 (90%) pacientes expressaram esse marcador e 9/20 (45%) superexpressaram esse gene, sendo três pacientes com CG tipo intestinal e seis com CG tipo difuso. Para o HGF, apenas 7/20 (35%) expressaram esse gene, sendo o mesmo superexpresso em 4/20 (20%) pacientes, sendo dois pacientes com CG tipo intestinal e dois pacientes com CG do tipo difuso. Para o VEGF, 20/20 (100%) pacientes expressaram esse marcador e em 12/20 (60%) pacientes foi observada superexpressão, sendo oito pacientes com CG tipo difuso e quatro com CG tipo intestinal. **CONCLUSÕES:** A técnica de qPCR foi padronizada e se mostrou viável para análise de expressão dos genes *MET*, *HGF* e *VEGF* nas amostras parafinadas de CG do tipo intestinal e difuso. A continuidade desse estudo, com maior amostragem, será conduzida para a caracterização do padrão de expressão desses biomarcadores no CG humano na população brasileira.

Palavras-chave: Neoplasias gástricas. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Proteínas Proto-oncogênicas c-Met. Receptores de Fatores de Crescimento do Endotélio Vascular.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Gastric cancer (GC) is the third leading cause of death among malignant tumors worldwide, causing approximately 900,000 deaths / year. Changes in oncogenes that encode tyrosine kinase receptors play an important role in the pathogenesis of GC. *MET* gene is a proto-oncogene which encodes a tyrosine kinase receptor c-MET and it is required for embryonic development and tissue repair. The hepatocyte growth factor (HGF) is the only known ligand for c-Met receptor. The *MET* oncogene activation suppresses apoptosis and promotes cell survival, proliferation, migration, differentiation and angiogenesis. Among the angiogenic factors, VEGF is the main regulator. Its biological function includes promoting mitosis of endothelial cells and stimulate their proliferation. The expression of these biomarkers in GC is relatively recent, population-based studies are needed to define the expression pattern. **OBJECTIVES:** Technical standardization of qPCR to evaluate quantitatively, in paraffin tissue samples, the presence of gene expression of the *MET*, *HGF* and *VEGF* in GC diffuse and intestinal types. **METHODS:** 20 GC patients were studied, ten patients were GC of intestinal type (average age 72.1 years) and ten of the diffuse type (average age 50.1 years). In all patients, tissue samples were analyzed from the tumor and distant areas of the tumor tissue. The relative expression of the tumor markers c-Met, HGF and VEGF was performed by qPCR technique by comparing tumor and non-tumor samples and they were normalized with the constitutive gene *GAPDH*. **RESULTS:** For c-Met, 18/20 (90%) patients expressed the marker and 9/20 (45%) overexpressed this gene, in which three were intestinal GC patients and six were diffuse GC patients. For HGF, only 7/20 (35%) express this gene and it was overexpressed in 4/20 (20%) patients, in which two were intestinal GC patients and two were diffuse GC patients. For VEGF, 20/20 (100%) patients expressed this marker and in 12/20 (60%) patients was observed overexpression, in which eight patients had diffuse GC and four had intestinal GC. **CONCLUSIONS:** The qPCR technique was standardized and suitable for expression analysis of the biomarkers c-Met, HGF and VEGF using paraffin embedded tissue samples. The continuation of this study, with more samples will be conducted to characterize the expression pattern of these biomarkers in the human CG in the Brazilian population.

HEADINGS: Stomach neoplasms. Real time Polymerase Chain Reaction. Proto-Oncogene Proteins c-Met. Vascular Endothelial Growth Factor.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínico-patológicas dos 20 pacientes incluídos no estudo.....	31
Tabela 2. Expressão relativa de c-Met através do delta CT de amostras tumorais e não tumorais nos 20 pacientes.....	33
Tabela 3. Expressão relativa de HGF através do delta CT de amostras tumorais e não tumorais nos 20 pacientes.....	34
Tabela 4. Expressão relativa de VEGF através do delta CT de amostras tumorais e não tumorais nos 20 pacientes.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação do receptor c-Met por HGF	19
Figura 2. Possíveis formas de alterações em <i>MET</i>	20
Figura 3. Microfotografia de estômago de paciente com adenocarcinoma do tipo intestinal de Laurén (T) e amostra adjacente não-tumoral (NT). Em NT (A), camada muscular (H&E, aumento original, 100x) e em NT (B), mucosa gástrica (H&E, aumento original, 50x).....	24
Figura 4. Microfotografia de estômago de paciente com adenocarcinoma do tipo difuso de Laurén, com células em anel de sinete (T) e amostra adjacente não-tumoral (NT). Em NT (A), camada muscular (H&E, aumento original, 100x); em NT (B), mucosa gástrica (H&E, aumento original 50x).....	26
Figura 5. Fotografia de cortes dos blocos de parafina em microtubos.....	27
Figura 6. Fotografia da secagem das amostras em temperatura ambiente.....	27
Figura 7. Fotografia de DNase.....	28
Figura 8. Fotografia do Nanodrop 2000.....	28
Figura 9. Fotografia do Concentrator 5301.....	28
Figura 10. Condições para uso no termociclador para realização da transcrição reversa.....	29
Figura 11. Gráfico de valores de $\Delta\Delta CT$, em pacientes com carcinoma gástrico (CG), para os três biomarcadores.....	36
Figura 12. Gráfico de valores da expressão relativa (RE), em pacientes com carcinoma gástrico (CG), para os três biomarcadores.....	37
Figura 13. Comparação entre delta CT de amostras tumorais (T) do tipo intestinal (Int) e do tipo difuso (Dif), por teste T entre 2 amostras, para c-Met (A), HGF (B) e VEGF (C).....	38

Figura 14. Comparação entre delta CT de amostras não tumorais (NT) provenientes de pacientes com CG do tipo intestinal (Int) e tipo difuso (Dif), por teste T entre 2 amostras, para c-Met (A), HGF (B) e VEGF (C).....	40
Figura 15. Comparação entre delta CT de amostras tumorais (T) e não tumorais (NT) do tipo intestinal, por teste T entre 2 amostras, para c-Met (A), HGF (B) e VEGF (C).....	41
Figura 16. Comparação entre delta CT de amostras tumorais (T) e não tumorais (NT) do tipo difuso, por teste T entre 2 amostras, para c-Met (A), HGF (B) e VEGF (C).....	42
Figura 17. Comparação entre delta CT de amostras tumorais (T) do tipo intestinal e do tipo difuso e suas respectivas amostras não tumorais (NT), por teste T entre 2 amostras, para c-Met (A), HGF (B) e VEGF (C).....	43
Figura 18. Comparação entre expressão relativa (RE) intestinal (Int) e difuso (Dif), por teste T entre 2 amostras, para c-Met (A), HGF (B) e VEGF (C)e (D).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg Micrograma

µL Microlitros

APM Anatomia Patológica e Medicina Legal

cDNA Ácido desoxirribonucleico complementar

CG Carcinoma gástrico

COEP Comitê de Ética em Pesquisa

CT *Cycle threshold*

Dif Difuso

DNA Ácido desoxirribonucleico

DNase Desoxirribonuclease

EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor*

EUA Estados Unidos da América

GAPDH *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

HC Hospital das Clínicas

HGF *Hepatocyte Growth Factor*

H&E Hematoxilina-eosina

H. pylori *Helicobacter pylori*

IAG Instituto Alfa de Gastroenterologia

INCA Instituto Nacional do Câncer

Int Intestinal

LP-TGI Laboratório em Pesquisa do Trato Gastrointestinal

Máx Máximo

min. Minuto

mín Mínimo

mRNA Ácido ribonucleico mensageiro

ng Nanograma

NT Não tumoral

OMS Organização Mundial de Saúde

PCR Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

qPCR Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RE Expressão relativa

RNA Ácido ribonucleico

RNase Ribonuclease

rpm Rotação por minuto

RT Transcriptase reversa

seg. Segundo

T Tumoral

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Temp Temperatura

TGF- α *Transforming growth factor alfa*

TGI Trato gastrointestinal

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Carcinoma Gástrico	15
1.2. Angiogênese e VEGF	17
1.3. Oncogene <i>MET</i>, ligante HGF e a carcinogênese	18
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS DA PESQUISA	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivo específico	21
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	22
4.1. Características gerais do estudo	22
4.2. Sujeitos da pesquisa e desenho do estudo	22
4.2.1. Critérios de inclusão:	26
4.2.2. Critérios de exclusão:	26
4.3. Procedimentos	27
4.3.1. EXTRAÇÃO DE RNA:	27
4.3.2. Síntese de cDNA	29
4.3.3. PCR quantitativo (qPCR)	29
4.4. Aspectos éticos	30
4.5. Análise estatística	30
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	50
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	51
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
APÊNDICES E ANEXOS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma Gástrico

O carcinoma gástrico (CG) é uma neoplasia maligna epitelial oriunda da mucosa do estômago sendo, portanto, de origem glandular, conhecida também por adenocarcinoma (1). É a neoplasia gástrica epitelial mais frequente, responsável por 95% dos tumores malignos que acometem o estômago humano. Embora a incidência do carcinoma gástrico venha declinando de uma maneira contínua e regular nas últimas décadas, ele constitui a terceira causa de óbito por câncer no mundo, com registro de mais de 900.000 novos casos ao ano (2). Em geral, sua magnitude é de duas a três vezes maior nos países em desenvolvimento e sua frequência maior no sexo masculino que no feminino. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou em 20.520 os novos casos de CG no país para o ano de 2016, sendo 12.920 homens e 7.600 mulheres. Já a estimativa de novos casos, para o CG, na região sudeste, é de 5.710 homens e 3.420 mulheres (3).

A razão mortalidade/incidência do CG é consideravelmente alta em todas as partes do mundo. Na maioria dos países em desenvolvimento, registra-se baixa taxa de sobrevida relativa em cinco anos, cerca de 20%. Apesar dos valores ainda elevados de mortalidade, há uma tendência de melhoria das taxas de sobrevida com os avanços da endoscopia digestiva e conseqüente detecção de tumores cada vez mais precoces. Entretanto, observações epidemiológicas realizadas no Brasil permitem afirmar que, infelizmente, essas tendências de melhoria são menos pronunciadas em nosso meio, onde os diagnósticos são, em geral, tardios e, por conseguinte, os pacientes apresentam habitualmente CG em estágios avançados. Portanto, são justificados todos os esforços na tentativa de aproximar o perfil brasileiro ao dos países mais desenvolvidos em relação ao diagnóstico e tratamento desta neoplasia (3).

O prognóstico do CG baseia-se essencialmente no seu estadiamento em relação à profundidade de invasão tumoral e à presença de metástases linfonodais. Estas características, aliadas a outros aspectos patológicos, definem os rumos do tratamento. Portanto, a abordagem cirúrgica com propósitos curativos, envolvendo gastrectomia com linfadenectomia, é considerada, até agora, a única intervenção capaz de prolongar a sobrevida (4).

A gênese do CG é complexa e ainda não totalmente elucidada em seus vários aspectos. Os fatores de risco mais conhecidos são: infecção pelo *Helicobacter pylori*, notadamente por

suas amostras mais virulentas e, comumente, adquirida na infância; gênero masculino e idade avançada; dieta rica em sal: seus efeitos estão associados a alterações inflamatórias e de reparo, com conseqüente indução de atrofia na mucosa gástrica. O sal em excesso também contribui para aumentar a capacidade mutagênica de alimentos ricos em nitrosaminas, que são compostos químicos cancerígenos e são produzidos a partir de nitratos e nitritos, presentes em alguns alimentos, quando em condições fortemente ácidas tais como a do interior do estômago humano. Além da dieta rica em sal, uma dieta pobre em alimentos de origem vegetal que contenham antioxidantes e/ou ácido ascórbico e alimentos com conservantes também está associado ao CG. Outros fatores de risco são tabagismo, consumo de álcool, presença de condições pré-cancerosas como gastrite crônica atrófica, metaplasia intestinal, pólipos adenomatosos gástricos com displasia e baixo grau e história familiar de CG (5-7).

Diversos sistemas de classificação foram propostos para o CG, porém os mais utilizados são as classificações histológicas da Organização Mundial de Saúde (OMS) e de Laurén (1,8). Ambas baseiam-se em aspectos morfológicos característicos do CG, identificados apenas ao exame histopatológico. Segundo Laurén, as neoplasias podem ser classificadas em dois tipos principais: intestinal ou difuso.

O CG do tipo intestinal forma glândulas claramente identificáveis, cuja diferenciação varia de pouco a bem diferenciadas, além de predominar nas populações de alto risco para CG e em países em desenvolvimento. Pacientes do sexo masculino são mais acometidos, numa média de idade de 60 anos. A progressão do seu processo de carcinogênese geralmente se verifica em etapas sequenciais, a partir de infecção crônica da mucosa gástrica pelo *Helicobacter pylori*, evoluindo para condições pré-cancerosas como, gastrite crônica atrófica e metaplasia intestinal e, então, para displasias de baixo e alto grau e, finalmente, para CG *in situ* e invasor (8-11).

O CG tipo difuso consiste na proliferação de células isoladas, emanel de sinete, com tendência a acúmulo de muco intracelular que infiltra a parede gástrica individualmente, sem formação glandular e acomete mais frequentemente populações de baixo risco. Acomete igualmente ambos os sexos, em faixa etária mais jovem, com idade média em torno dos 50 anos, apresentando, geralmente, um pior prognóstico (8-10). O processo de carcinogênese do CG tipo difuso está mais associado a fatores genéticos, sendo menos influenciado ou modulado por fatores ambientais que o CG do tipo intestinal (12).

O padrão de crescimento tumoral e a forma de disseminação do CG diferem também entre os tipos intestinal e difuso. O tipo intestinal apresenta um crescimento predominantemente exofítico e tende a invadir o fígado por disseminação hematogênica. Em contraste, o tipo difuso tende a exibir um crescimento úlcero-infiltrativo, de caráter mais invasivo, acometendo toda a espessura da parede gástrica, com disseminação predominantemente peritoneal (4). Esse crescimento é dependente de fatores angiogênicos, sendo o Fator de Crescimento Vascular Endotelial- VEGF- o regulador principal (13,14).

1.2. Angiogênese e VEGF

A angiogênese consiste no crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de um vaso pré-existente. Primeiramente, ocorre ativação de células endoteliais do vaso pré-existente pela ação de um estímulo angiogênico, tal como a liberação de VEGF e de outros fatores de crescimento. Posteriormente, ocorre a migração e proliferação de células endoteliais em direção ao local do estímulo e, finalizando o processo, ocorre a maturação das células endoteliais. O vaso se torna estável após a migração de células mesenquimais (pericítos ou células musculares lisas) para a região perivascular, com sua deposição ao redor dos vasos neoformados (15).

Habitualmente, a angiogênese é controlada através do equilíbrio entre a liberação de fatores pró e anti-angiogênicos. Este equilíbrio pode ser rompido em processos tumorais, em que o tumor depende da constante formação de novos vasos para garantir a oxigenação e a perfusão de nutrientes, além de eliminar produtos metabólicos. Diferentemente do tecido normal, em que a angiogênese é estritamente controlada, no tecido neoplásico a mesma é descontrolada e imatura (16). Dessa forma, representa uma etapa essencial na proliferação, expansão e metástase tumoral. No início do desenvolvimento, os tumores são geralmente não-angiogênicos e, após um período variável, adquirem o fenótipo angiogênico (17).

1.3. Oncogene *MET*, ligante HGF e a carcinogênese

Informações genéticas e moleculares recentes sobre os mecanismos da carcinogênese gástrica têm demonstrado que constitui processo multifatorial, com interação entre fatores predisponentes (como, por exemplo, presença de infecção por *H. pylori*) e anormalidades genéticas e epigenéticas (incluindo ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor), resultando em crescimento descontrolado e disseminação de células (18-20).

Estudos mais atuais têm sugerido que alterações em oncogenes que codificam receptores tirosina-quinase têm um importante papel na patogênese do CG (21). *MET* é um proto-oncogene, localizado no cromossomo 7, que codifica o receptor tirosina-quinase c-MET. O receptor possui duas subunidades, alfa (extracelular) e beta (transmembrana), ligadas por ponte dissulfeto. O domínio intracelular contém três porções funcionais com resíduos de aminoácidos importantes para a modulação de sinais. Estes resíduos são fosforilados quando ocorre a dimerização com seu ligante HGF (22). O Fator de Crescimento Hepatocítico (HGF) é o único ligante conhecido para o receptor c-MET e é expresso principalmente por células de origem mesenquimal (14, 23-25), enquanto o receptor c-MET é expresso por células epiteliais e endoteliais (23).

Sob condições normais, c-MET dimeriza e autofosforila através da ligação com seu ligante, gerando uma cascata de sinais. Os processos que ocorrem com essa ativação fazem parte de um programa biológico definido por “crescimento invasivo”. É um programa fisiológico que age principalmente no desenvolvimento embrionário, crescimento tecidual e reparo de tecidos (23). Tal ativação gera uma variedade de respostas biológicas que induz ao aumento do crescimento celular, motilidade, disseminação, proteção contra apoptose e angiogênese, conforme pode ser visto na Figura 1 (25).

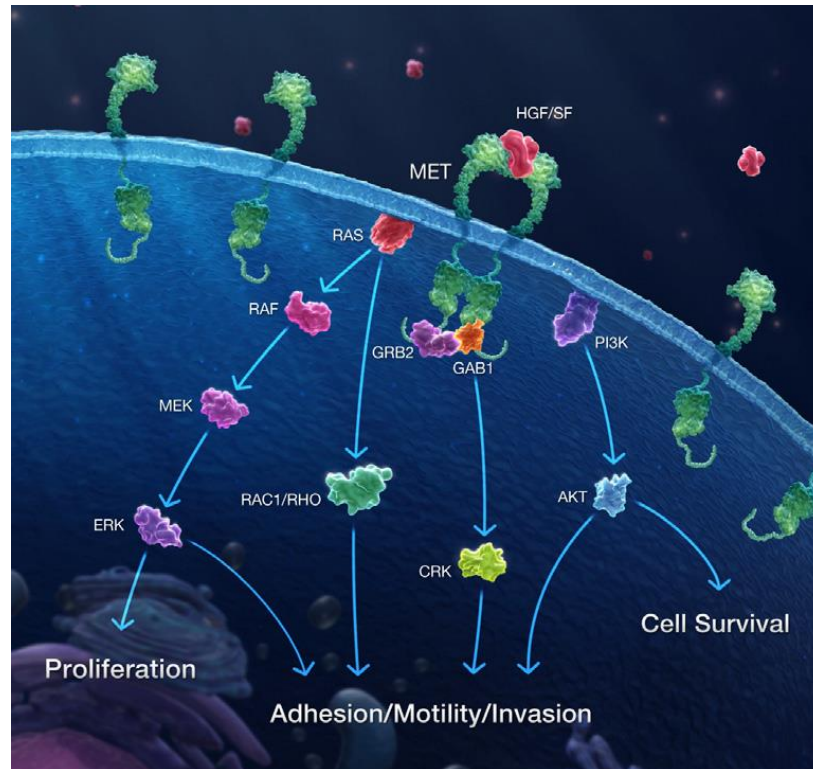


Figura 1- Ativação do receptor c-Met por HGF

Fonte: Hack *et al* 2014

Entretanto, sob condições patológicas, a ativação imprópria de c-MET por HGF pode conferir habilidades proliferativas, invasoras, metastáticas e de sobrevivência a células cancerosas (23,26). A ativação aberrante de HGF/c-Met ocorre em uma variedade de tumores, via mecanismos como ganho no número de cópias do gene, seja por amplificação gênica ou por polissomia e mutações pontuais no gene *MET*, estes, entretanto, são raros, ocorrendo em até 5% dos casos. Em maior parte, cerca de 18-82% dos tumores gástricos, a ativação de *MET* é resultado de uma super regulação da transcrição, que leva à uma superexpressão protéica (19, 25).

Na Figura 2, podemos observar as várias formas de alterações em c-Met, seja no DNA, com o ganho no número de cópias do gene ou mutações pontuais; em seu transcrito - mRNA- que pode se encontrar superexpresso ou em sua forma protéica, que também pode estar superexpressa.

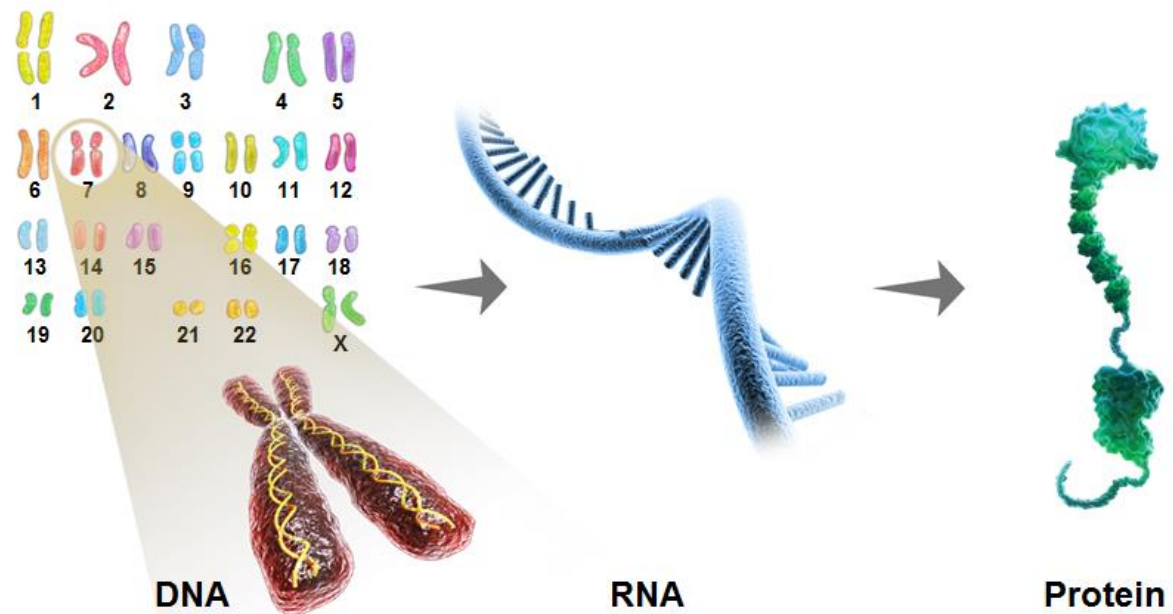


Figura 2- Possíveis formas de alterações em *MET*

Fonte: modificado Hack *et al* 2014

A transcrição de *MET* pode ser mantida por mecanismos ativados por alterações genéticas frequentes no câncer, como mutação em *RAS* (oncogene) e perda de p53 (supressor de tumor). Além disso, a transcrição desse gene é induzida por fatores de crescimento secretados pelo estroma adjacente, incluindo o próprio HGF, ou pela deficiência de oxigênio (hipóxia), uma ocorrência frequente no crescimento acelerado do tecido tumoral (22).

Sua superexpressão tem sido correlacionada com a profundidade de invasão do tumor, metástases linfonodais, estadiamento mais avançado e menor sobrevida (26-28). Um estudo nacional envolvendo 482 casos de câncer gástrico analisou, por imunohistoquímica, 28 proteínas, entre elas, c-MET, que foi expresso em 92% dos CG do tipo intestinal e em 84% do tipo difuso (29).

Anticorpos e pequenas moléculas inibidoras estão sendo avaliadas clinicamente contra HGF e/ou c-Met e previnem a interação ligante-receptor e, conseqüentemente, impactam na sinalização desse receptor através da inibição da fosforilação e recrutamento de proteínas efetoras de sinais. Alguns dos anticorpos monoclonais testados encontram-se em estudos de fase III, como o rilotumumab e onartuzumab, e a hipótese testada em ambos estudos é se essa terapia, associada à quimioterapia padrão, melhora a sobrevida de pacientes com superexpressão de c-Met. Em um dos estudos, foi encontrada uma maior sobrevida nos pacientes com superexpressão de c-Met tratados com anticorpo monoclonal e quimioterapia

que no grupo de pacientes tratados apenas com quimioterapia. Entretanto, os pacientes que não possuíam superexpressão desse receptor, obtiveram piores desfechos clínicos quando comparados aos pacientes que receberam apenas a quimioterapia padrão. Tal resultado indica que a análise de expressão desse marcador poderia ser utilizada como preditivo para seleção de pacientes para uso da terapia com anticorpos monoclonais (25).

O presente estudo faz parte de plataforma de pesquisa intitulada “Avaliação do proto-oncogene *c-MET* em amostras de pacientes portadores de carcinoma gástrico no Brasil: metodologia, prevalência, valor prognóstico e alvo terapêutico”, envolvendo pesquisadores do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, do Banco de Tumores e Tecidos do Instituto Alfa de Gastroenterologia e do Serviço de Oncologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

2. JUSTIFICATIVA

Em uma doença multifatorial como o CG, é frequente a presença de alterações no padrão de expressão gênica das células no processo de carcinogênese, e envolve oncogenes, fatores de crescimento e fatores angiogênicos. O conhecimento da expressão dos genes *MET*, *HGF* e *VEGF* torna-se relevante na prática clínica, podendo conferir maior precisão ao estadiamento da neoplasia e, conseqüentemente, uma melhor definição do prognóstico dos pacientes, além do potencial estabelecimento de alvo terapêutico pelo emprego de substâncias anti-*c-MET* e anti-*VEGF*.

3. OBJETIVOS DA PESQUISA

3.1. Objetivo geral

- Padronizar a técnica de qPCR para avaliar, em amostras parafinadas, a expressão dos genes *MET*, *HGF* e *VEGF*.

3.2. Objetivo específico

- Selecionar e classificar amostras de CG em tipos difuso e intestinal de Laurén;
- Otimizar protocolos de extração e amplificação dos genes *MET*, *HGF* e *VEGF* a partir de amostras parafinadas do tumor e do tecido não-tumoral;

- Quantificar a expressão relativa dos genes *MET*, *HGF* e *VEGF* nas amostras selecionadas;
- Comparar a expressão relativa dos genes *MET*, *HGF* e *VEGF* das amostras tumorais com as amostras não-tumorais.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Características gerais do estudo

O estudo foi realizado nas dependências do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do HC-UFMG.

4.2. Sujeitos da pesquisa e desenho do estudo

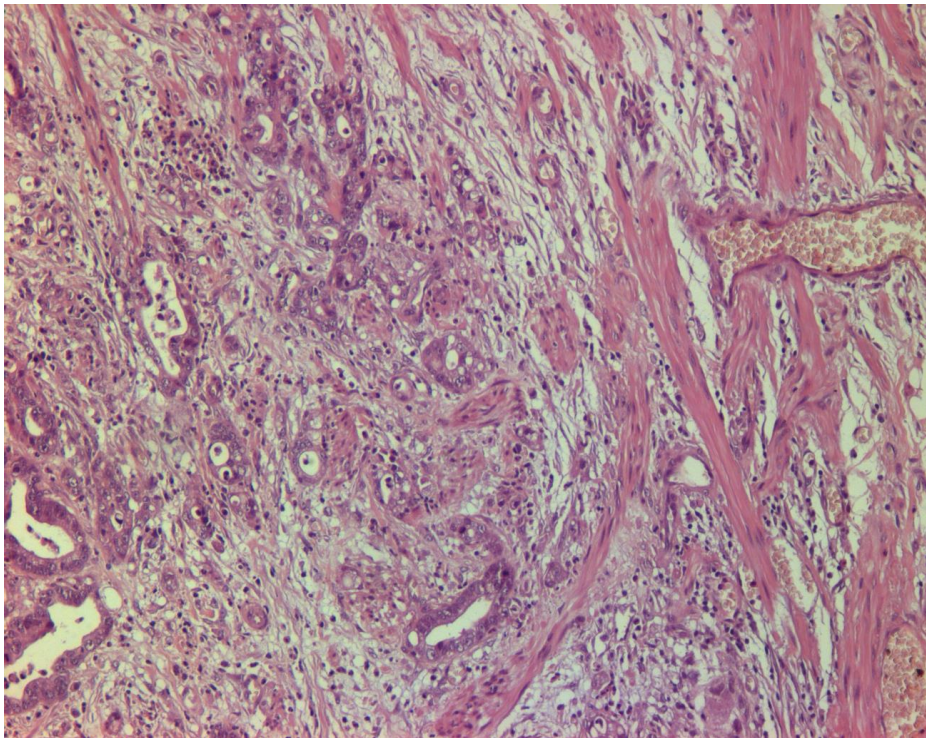
Foram estudados retrospectivamente 20 casos selecionados de pacientes portadores de CG diagnosticados e tratados cirurgicamente no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). Foram utilizados blocos de tecidos em parafina armazenados no Laboratório de Pesquisa em Patologia do Trato Gastrointestinal (LP-TGI) do Serviço de Anatomia Patológica (APM) do HC-UFMG provenientes de pacientes submetidos à gastrectomia total, subtotal ou parcial. A triagem e seleção dos casos foi realizada inicialmente pela análise dos dados do protocolo anatomopatológico do LP-TGI, que se encontram informatizados.

A seleção dos casos foi feita previamente por meio de exame histopatológico das lâminas de vinte casos de CG, coradas pela coloração de rotina (Método de Hematoxilina-Eosina, H&E), para confirmar a presença de tumor nas amostras e o tipo de CG presente: intestinal ou difuso (8). Foram também selecionadas, histopatologicamente, vinte lâminas, destes mesmos casos, representativas de áreas da mucosa gástrica não-tumoral, distantes do tumor. As Figuras 3 e 4 exibem exemplos de amostras de dois pacientes (n° 3 e n° 7) com CG tipo intestinal e sua amostra adjacente não tumoral e com CG tipo difuso e amostra não-tumoral, respectivamente.

A partir das lâminas escolhidas, os blocos de parafina foram selecionados e compostos em dois grupos:

Grupo T (tumor) - vinte amostras parafinadas do tumor: dez provenientes de pacientes com CG do tipo intestinal e dez de pacientes com CG do tipo difuso.

Grupo NT (Não-tumor) - vinte amostras parafinadas de mucosa gástrica não-tumoral, coletadas de áreas de mucosa gástrica distantes do tumor, dos vinte pacientes constituintes do grupo T.

**T**

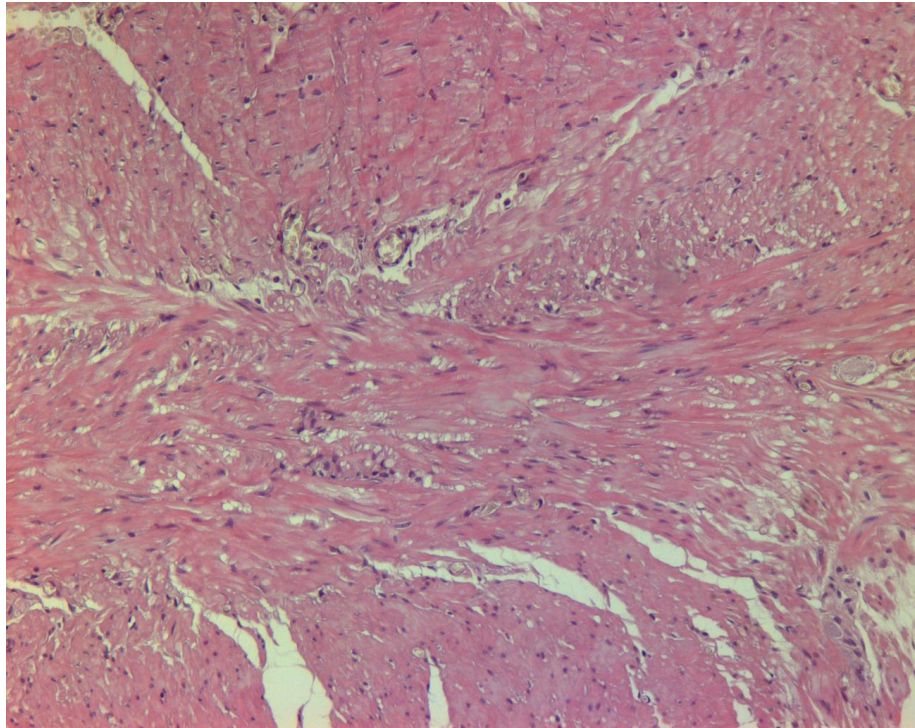
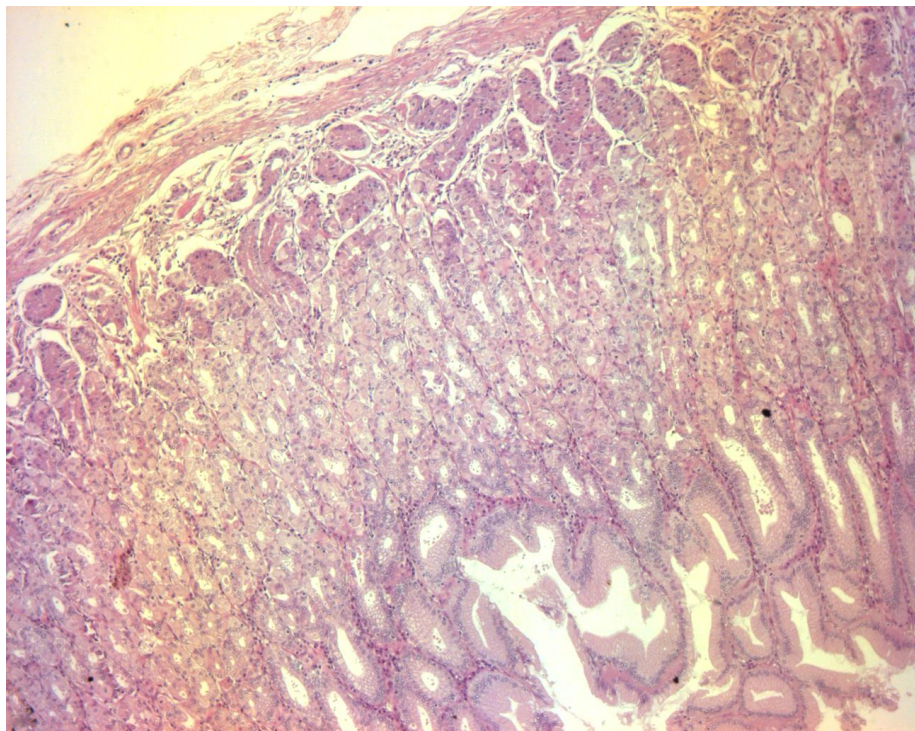
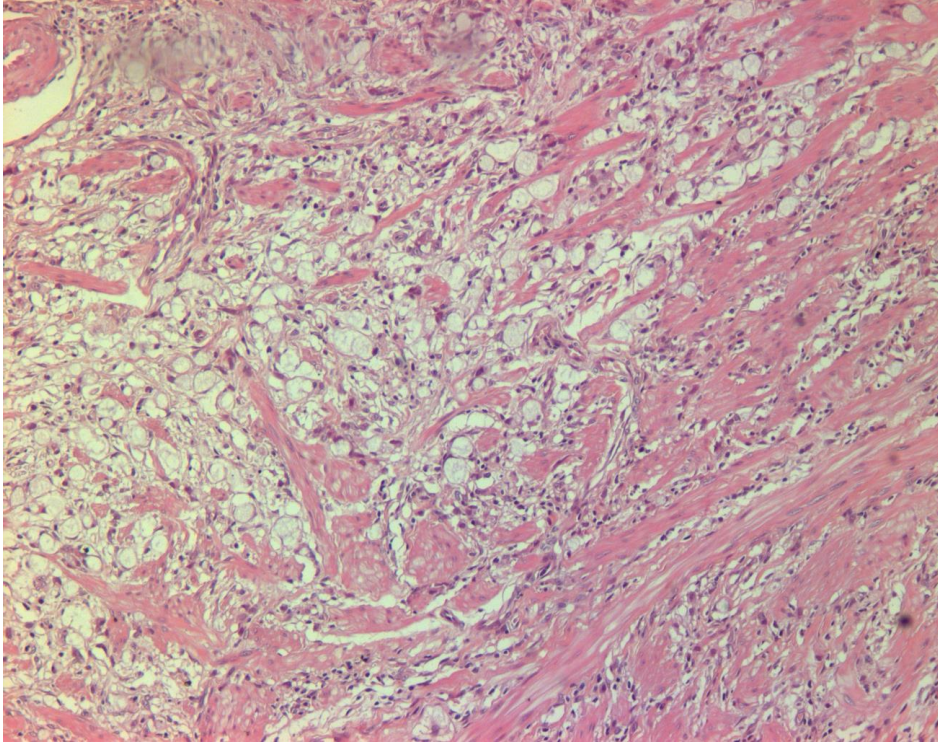
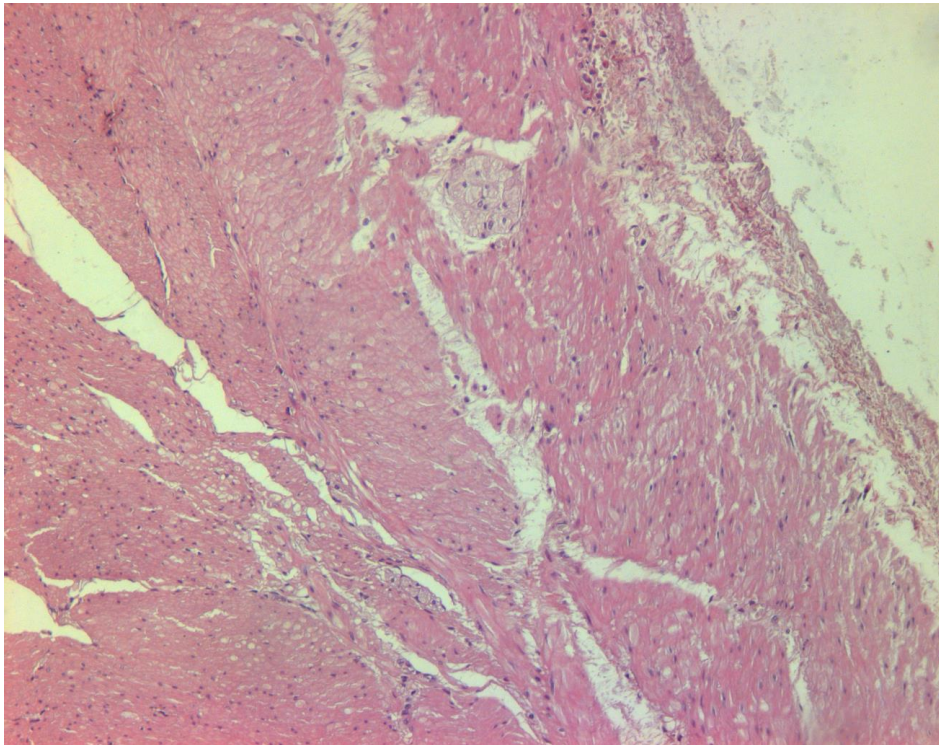
**NT (A)****NT (B)**

Figura 3- Microfotografia de estômago de paciente com adenocarcinoma do tipo intestinal de Laurén (T) e amostra adjacente não-tumoral (NT). Em NT (A), camada muscular (H&E, aumento original, 100x) e em NT (B), mucosa gástrica (H&E, aumento original, 50x).

T=amostra tumoral; NT=amostra não tumoral



T



NT (A)

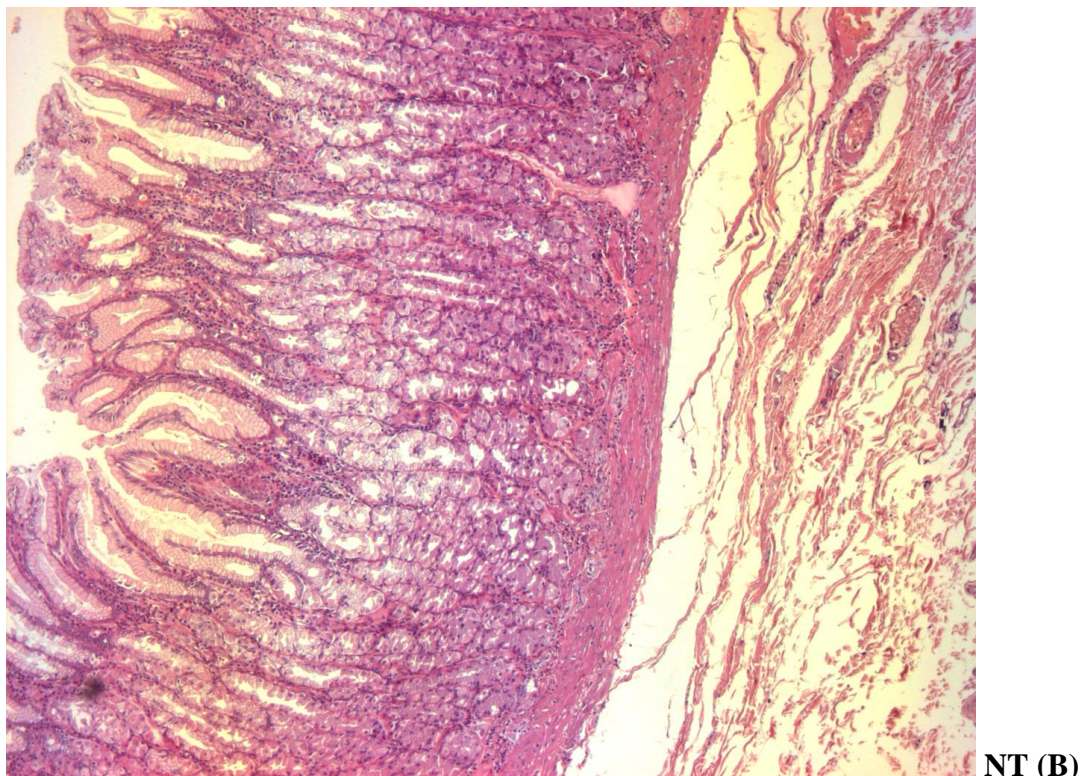


Figura 4- Microfotografia de estômago de paciente com adenocarcinoma do tipo difuso de Laurén, com células em anel de sinete (T) e amostra adjacente não-tumoral (NT). Em NT (A), camada muscular (H&E, aumento original, 100x); em NT (B), mucosa gástrica (H&E, aumento original 50x).

T=amostra tumoral; NT=amostra não tumoral

O estudo da expressão dos genes *MET*, *HGF* e *VEGF* foi realizado em todas as quarenta amostras pela técnica de qPCR.

4.2.1. Critérios de inclusão:

Amostras representativas do tumor e da mucosa gástrica histologicamente normal (não tumoral), disponíveis em blocos de parafina nos arquivos do LP-TGI do APM-HC-UFMG.

4.2.2. Critérios de exclusão:

Foram excluídos deste estudo todos aqueles casos sem informações disponíveis no protocolo anatomopatológico ou cujos blocos de parafina não tenham sido encontrados no

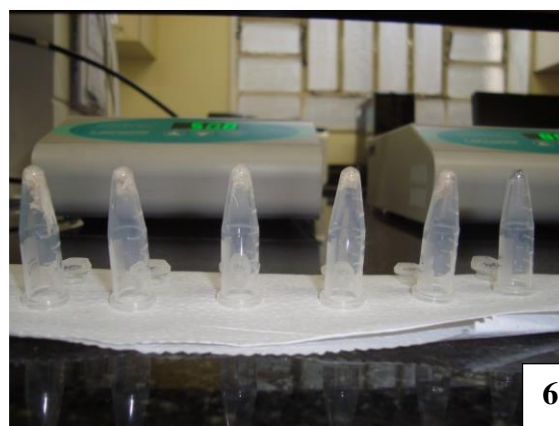
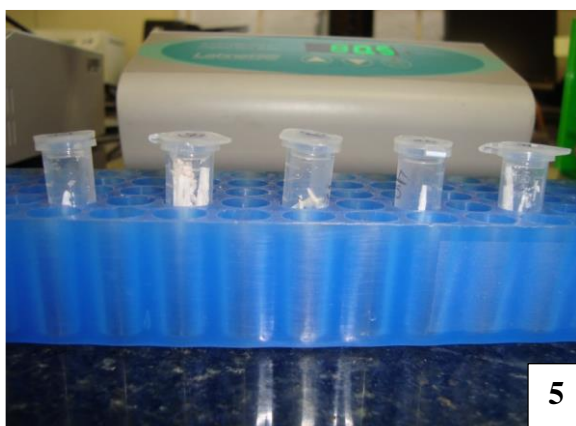
arquivo ou, ainda, blocos de parafina selecionados que não apresentassem quantidade suficiente de tecido para os procedimentos previstos.

4.3. Procedimentos

4.3.1. Extração de RNA:

O protocolo de extração de RNA total foi realizado com o kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, EUA).

O passo inicial constituiu-se da realização de quatro cortes de 20 μm de cada bloco de parafina em micrótomo que foram transferidos para um tubo de 1,5 mL com pinça estéril (Figura 5). Foi utilizada uma lâmina por bloco para que não houvesse contaminação entre as amostras. Após, iniciou-se a desparafinização dos cortes com xilol seguido da lavagem com etanol 100% para acelerar a secagem do tecido e remover o xilol presente (Figura 6). Após a secagem, ocorreu a digestão enzimática proteolítica com uma incubação a 50°C por 30 min e outra a 80°C por 15 min, seguida da purificação da amostra utilizando uma metodologia de filtro de fibra de vidro que incluiu sucessivas lavagens com tampões específicos e centrifugações a 10.000 rpm por 30 seg e tratamento com DNase (Figura 7). A eluição da amostra contendo o RNA foi realizada com centrifugação a 13.000 rpm por 1 min. O RNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) utilizando 2 μL de cada amostra (Figura 8).



Figuras 5 e 6- Fotografias de cortes dos blocos de parafina em microtubos (5) e secagem das amostras em temperatura ambiente (6)



Figuras 7 e 8- Fotografias de DNase (7) e Nanodrop 2000 (8)

Após essa etapa, as amostras foram submetidas a um concentrador a vácuo (Concentrator 5301, da Eppendorf) (Figura 9) por 25 minutos para aumentar a concentração do ácido ribonucléico e foram novamente quantificadas e analisadas sua qualidade com o cálculo da razão 260/280 por Nanodrop (entre 1,71-2,03), como pode ser visto no Apêndice A.



Figura 9- Fotografia do Concentrator 5301

4.3.2. Síntese de cDNA

Para a transcrição reversa do RNA, o kit utilizado foi High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA). A quantidade de RNA total foi uniformizada a 300 ng/20 μ L para cada amostra para a síntese de cDNA. O termociclador utilizado foi o Veriti (Applied Biosystems, EUA) e as condições da reação são otimizadas para o uso desse kit, conforme Figura 10:

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatura ($^{\circ}$ C)	25	37	85	4
Tempo	10 min	120 min	5 min	∞

Figura 10- Condições para uso no termociclador para realização da transcrição reversa

Fonte: Protocolo do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription

PROCOLO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

Resumo:

Preparo do master mix de transcrição reversa 2x

↓

Adição do RNA total ao RT master mix 2x

↓

Transcrição reversa em termociclador

↓

Armazenamento a -20° C

4.3.3. PCR quantitativo (qPCR)

Uma vez sintetizado o cDNA, este foi submetido à amplificação pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para quantificação da expressão de c-MET, HGF e VEGF através do termociclador Step One Plus (Applied Biosystems, EUA).

As amplificações pela PCR foram realizadas em triplicata utilizando 30 ng de cDNA por reação. As condições da reação foram 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min e 40 repetições de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min.

Para análise da expressão, foi utilizado o TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, EUA), de acordo com o protocolo. O ensaio utilizado para análise de expressão do c-MET é Hs01565584_m1. Para HGF, Hs00300159_m1 e para VEGF, Hs00900055_m1. O gene constitutivo (controle) utilizado foi o GAPDH, e seu ensaio Hs03929097_g1. Todos os ensaios eram inventoriados, isto é, são ensaios pré-desenhados e que a empresa garante a eficiência de 100% do mesmo.

Todas as reações foram submetidas às mesmas condições e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de possíveis flutuações na leitura decorrentes de variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valor de CT (*cycle threshold*), se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. O CT é a medida relativa da concentração de um alvo na reação de PCR.

Foi calculada a média aritmética dos CTs de cada amostra, para os genes alvo e gene de referência, sendo os dados transferidos para planilhas para realização da análise estatística.

4.4. Aspectos éticos

O estudo foi executado após aprovação em 04/07/2013 pelo COEP-UFMG e registrado na Plataforma Brasil, **CAAE:** 16476713.0.0000.5149 (Anexo A).

4.5. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando técnicas de estatística descritiva (tabelas e porcentagens). Foram utilizados os *softwares* Microsoft Excel (2010), para a montagem do banco de dados e os testes T, entre duas proporções, através do Minitab 17 (2015), sendo consideradas significativas diferenças estatísticas para valores (p) inferiores a 0,05.

5. RESULTADOS

A Tabela 1 exhibe os tipos de CG intestinal e difuso, distribuição etária e sexo dos 20 pacientes incluídos no estudo, sendo observada uma idade média superior (22 anos), com significância estatística ($p= 0,00$), nos pacientes com CG do tipo intestinal.

Tabela 1- Características clínico - patológicas dos 20 pacientes incluídos no estudo

Câncer gástrico Tipo	Idade média em anos (mín-máx)	Sexo (%)	
		Masculino	Feminino
Difuso (n=10)	50,1 (32-63)	6 (60)	4 (40)
Intestinal (n=10)	72,1 (60-86)	7 (70)	3 (30)
Total (n=20)	61,1 (32-86)	13 (65)	7 (35)

Expressão relativa dos biomarcadores c-Met, HGF e VEGF

Para o cálculo da expressão relativa dos biomarcadores, foi utilizado o método que se vale da determinação da intersecção da linha do limiar de detecção da reação (*threshold*), com a linha da amplificação gênica de cada amostra. Essa intersecção é denominada CT e é comparada com o CT do gene constitutivo na mesma amostra. O gene constitutivo GAPDH foi expresso em todas as amostras e em todos os ensaios realizados. O cálculo da Expressão Relativa (RE) foi efetuado de acordo com as equações abaixo:

Cálculo para Expressão Relativa (RE):

a- $\Delta CT = \text{média de CT (gene teste)} - \text{média CT (gene referência GAPDH)}$

b- $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{tumor}) - \Delta CT (\text{não tumor})$

c- $RE = 2^{-\Delta\Delta CT}$

A interpretação do cálculo da RE adotou as seguintes regras:

Caso $\Delta\Delta CT > 0$; $\Delta CT (\text{tumor}) > \Delta CT (\text{não tumor}) \rightarrow RE < 1$

Caso $\Delta\Delta CT = 0$; $\Delta CT (\text{tumor}) = \Delta CT (\text{não tumor}) \rightarrow RE = 1$

Caso $\Delta\Delta CT < 0$; $\Delta CT (\text{tumor}) < \Delta CT (\text{não tumor}) \rightarrow RE > 1$

Esse cálculo foi feito para todos os pares de amostras (tumoral e não tumoral) para cada paciente.

A Tabela 2 exibe a expressão relativa de c-Met, a Tabela 3 do HGF e a Tabela 4 do VEGF.

Na Tabela 2, em dois pacientes (nº5 e nº14, ambos com CG tipo intestinal) o CT foi indeterminado. Entre os 18 pacientes estudados, nove (50%) apresentaram superexpressão ($RE < 1$) de c-Met.

Tabela 2- Expressão relativa de c-Met através do delta CT de amostras tumorais e não tumorais nos 20 pacientes

Paciente	Tipo de CG	Delta CT Tumoral	Delta CT Não tumoral	RE c-Met
1	difuso	7,809	9,259	2,740
2	intestinal	8,371	6,903	0,360
3	intestinal	8,613	7,473	0,450
4	difuso	7,625	6,136	0,360
5	intestinal	-	-	-
6	intestinal	6,970	7,651	1,600
7	difuso	7,098	6,501	0,660
8	difuso	8,388	8,101	0,820
9	difuso	8,515	5,778	0,150
10	difuso	7,914	8,144	1,170
11	difuso	7,977	7,319	0,630
12	difuso	5,251	6,917	3,170
13	intestinal	8,043	8,579	1,450
14	intestinal	7,34	-	-
15	intestinal	7,864	7,998	1,100
16	intestinal	7,163	8,822	3,160
17	difuso	5,606	7,522	3,770
18	difuso	8,968	8,642	0,800
19	intestinal	8,754	6,717	0,240
20	intestinal	7,335	8,570	2,350

RE= expressão relativa; CT= cycle threshold; CG= carcinoma gástrico

Na Tabela 3, sete entre os 20 (35%) pacientes com CG expressaram HGF, sendo quatro do tipo difuso e três do tipo intestinal. Entre estes sete pacientes, houve superexpressão ($RE < 1$) de HGF em quatro deles.

Tabela 3- Expressão relativa de HGF através do delta CT de amostras tumorais e não tumorais nos 20 pacientes

Paciente	Tipo de CG	Delta CT Tumoral	Delta Ct Não tumoral	RE HGF
1	difuso	9,334	-	-
2	intestinal	-	9,446	-
3	intestinal	-	9,805	-
4	difuso	-	9,254	-
5	intestinal	-	-	-
6	intestinal	-	-	-
7	difuso	7,090	9,042	3,870
8	difuso	9,896	10,623	1,650
9	difuso	11,365	9,829	0,340
10	difuso	-	-	-
11	difuso	12,701	10,422	0,210
12	difuso	-	-	-
13	intestinal	-	-	-
14	intestinal	-	-	-
15	intestinal	11,196	12,693	2,820
16	intestinal	12,479	10,836	0,320
17	difuso	-	-	-
18	difuso	-	10,843	-
19	intestinal	10,618	-	-
20	intestinal	12,340	10,632	0,310

RE= expressão relativa; CT= cycle threshold; CG= carcinoma gástrico

Na Tabela 4, todos os 20 pacientes com CG (100%) expressaram VEGF e em doze deles podemos observar superexpressão ($RE < 1$), sendo quatro do tipo intestinal e oito do tipo difuso.

Tabela 4- Expressão relativa de VEGF através do delta CT de amostras tumorais e não tumorais nos 20 pacientes

Paciente	Tipo de CG	Delta CT Tumoral	Delta Ct Não Tumoral	RE VEGF
1	difuso	6,007	5,597	0,750
2	intestinal	3,621	5,192	2,970
3	intestinal	4,735	5,122	1,310
4	difuso	5,809	4,996	0,570
5	intestinal	4,496	4,224	0,830
6	intestinal	4,773	5,649	1,830
7	difuso	4,896	3,708	0,440
8	difuso	5,707	5,396	0,810
9	difuso	5,904	5,486	0,750
10	difuso	6,121	5,968	0,900
11	difuso	6,562	4,383	0,220
12	difuso	4,925	5,165	1,180
13	intestinal	4,848	3,962	0,540
14	intestinal	5,321	4,660	0,630
15	intestinal	4,458	6,827	5,160
16	intestinal	5,537	6,257	1,650
17	difuso	3,928	4,891	1,950
18	difuso	8,869	5,501	0,090
19	intestinal	4,121	4,918	1,730
20	intestinal	6,042	3,931	0,230

RE= expressão relativa; CT= cycle threshold; CG= carcinoma gástrico

A Figura 11 exibe os valores de $\Delta\Delta CT$, para c-Met, HGF e VEGF, em pacientes com CG tipo intestinal e difuso. Os valores acima de zero correspondem aos pacientes que tiveram uma maior expressão do marcador na amostra tumoral que na amostra não tumoral.

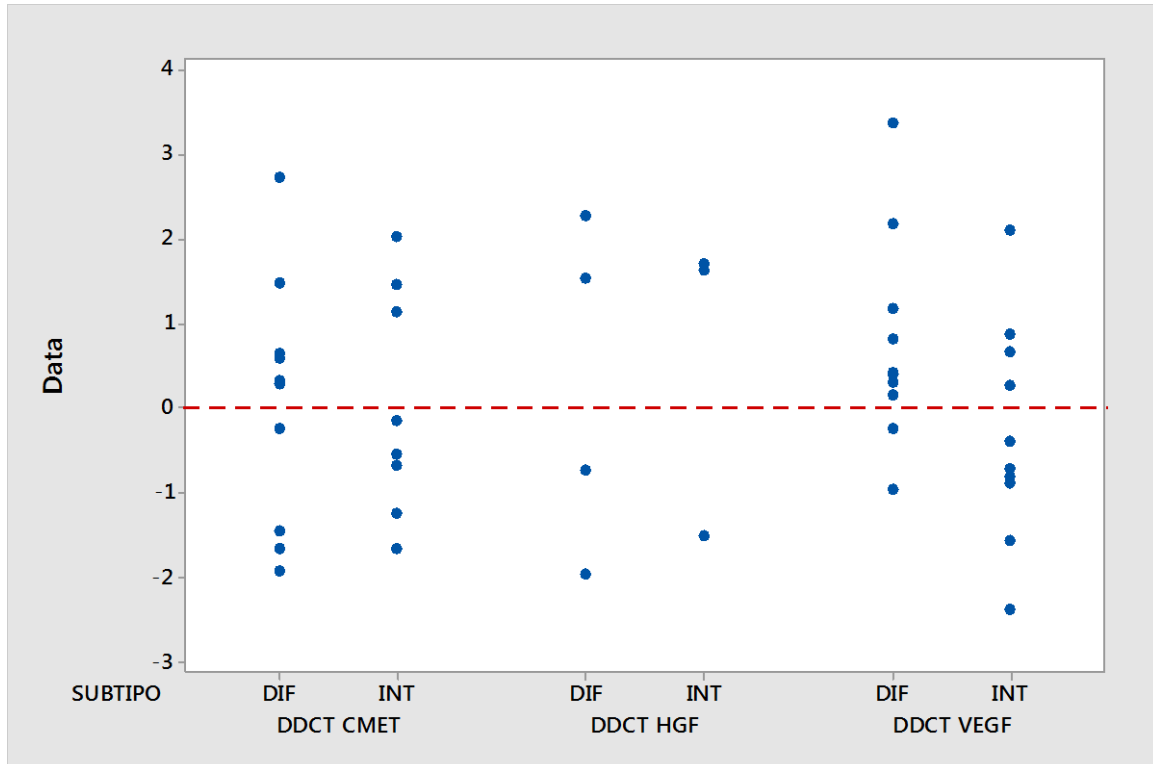


Figura 11- Gráfico de valores de $\Delta\Delta CT$, em pacientes com carcinoma gástrico (CG), para os biomarcadores c-MET, HGF e VEGF

A Figura 12 mostra os valores de RE dos pacientes com CG tipo intestinal e difuso, para os três biomarcadores. Os valores abaixo de um correspondem aos mesmos pacientes que obtiveram $\Delta\Delta CT$ maior que zero na Figura 11, isto é, expressão maior do marcador na amostra tumoral que na amostra não tumoral.

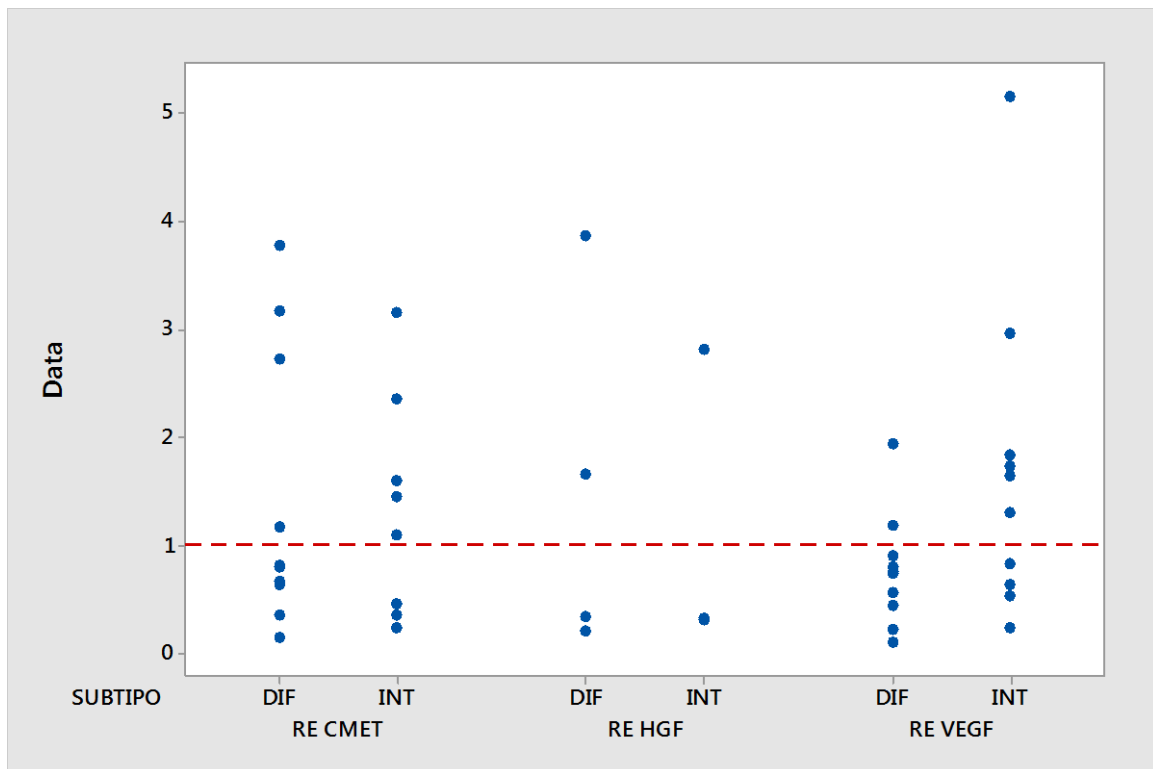


Figura 12- Gráfico de valores da expressão relativa (RE), em pacientes com carcinoma gástrico (CG), para os biomarcadores c-MET, HGF e VEGF

A Figura 13 exibe a comparação entre delta CT de amostras tumorais do tipo intestinal e do tipo difuso para os três biomarcadores estudados. Em A, na avaliação do c-Met, pode-se observar a média de delta CT (7,889) pouco maior no grupo de pacientes com CG intestinal (n=8) que no CG difuso (7,52; n=10) (p=0,423). Em B, na avaliação do HGF, a média de delta CT (10,26) para o grupo com CG difuso (n=4) foi inferior àquela observada (12,005) para o grupo com CG intestinal (n=3), porém também sem significância estatística (p=0,264). Em C, na avaliação do VEGF, foi observada uma média (5,87) significativamente maior no grupo com CG difuso (n=10) que a média (4,795) observada no grupo com CG intestinal (n=10) (p=0,038).

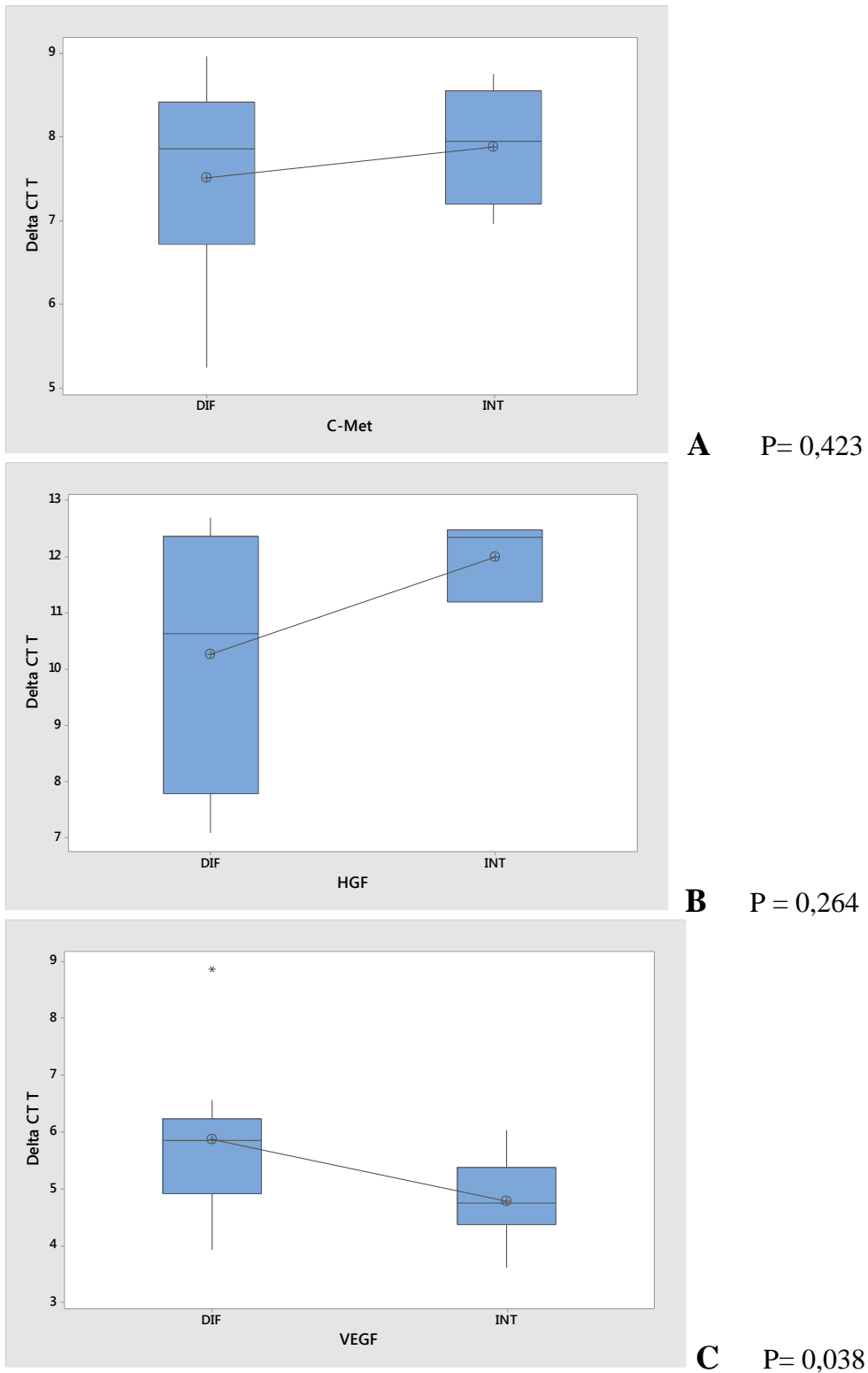
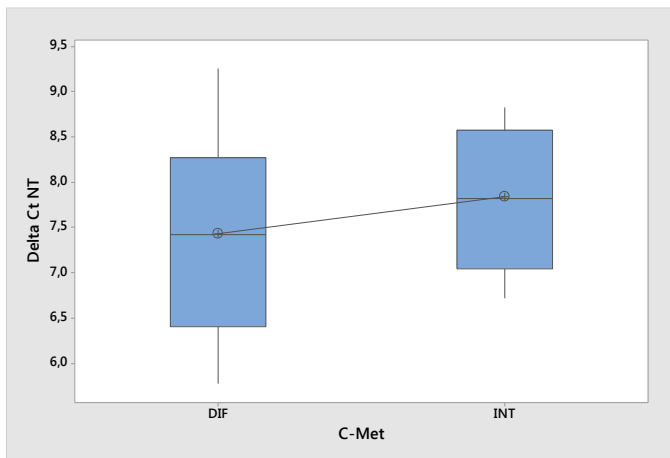
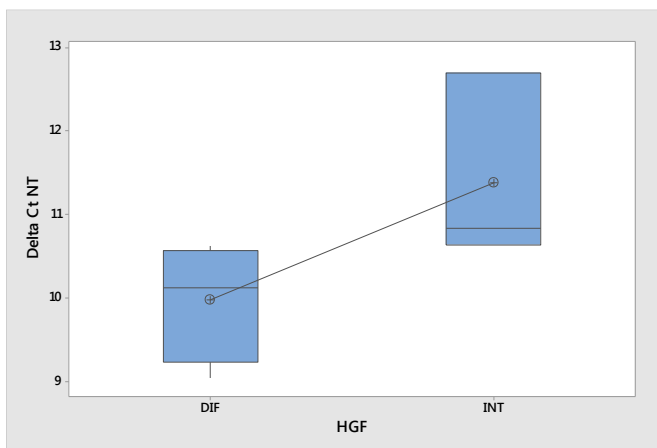


Figura 13- Comparação entre delta CT de amostras tumorais (T) do tipo intestinal (Int) e do tipo difuso (Dif), por teste T entre 2 amostras, para c-Met (A), HGF (B) e VEGF (C).

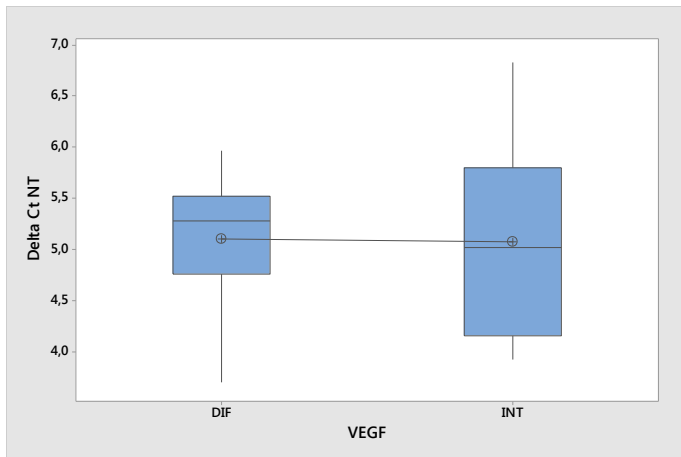
A Figura 14 mostra a comparação entre delta CT de amostras não tumorais provenientes de pacientes com CG do tipo intestinal e tipo difuso para os três biomarcadores. Em A, o grupo de CG tipo difuso (n=10) apresentou um valor médio (7,43) enquanto no grupo de CG tipo intestinal (n=8) foi encontrado um valor médio de 7,839 (p=0,382). Em B, no grupo com CG difuso (n=4), a média foi de 9,979, enquanto no grupo com CG intestinal (n=3) foi observada uma média de 11,39 (p=0,155). Em C, no grupo tipo difuso (n=10), a média observada foi de 5,109, comparada com 5,074 para o grupo tipo intestinal (n=10) (p=0,926).



A P = 0,382



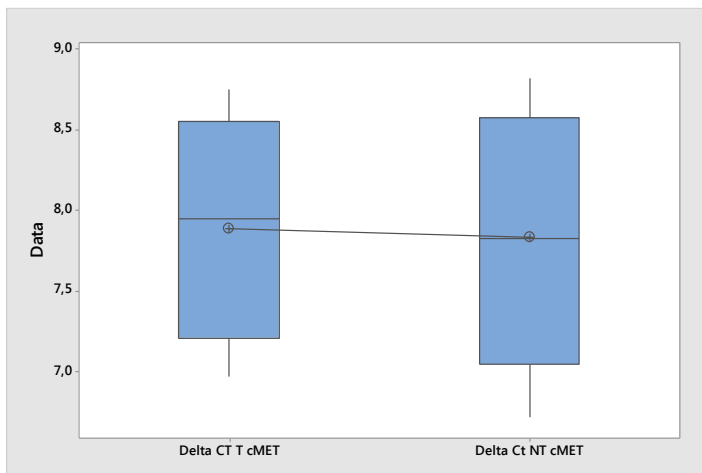
B P = 0,155



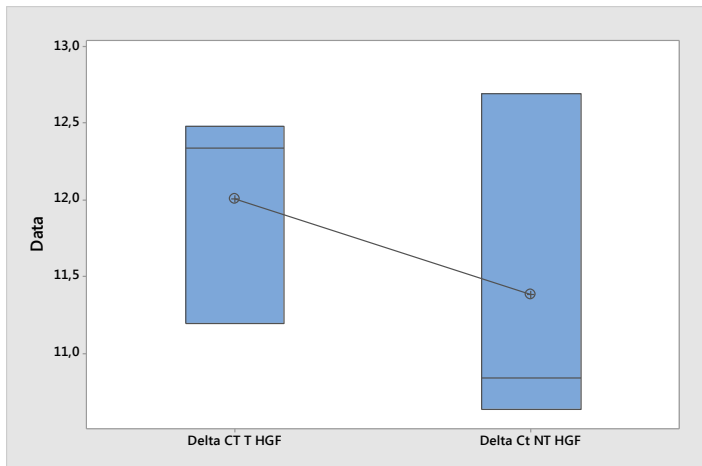
C P= 0,926

Figura 14- Comparação entre delta CT de amostras não tumorais (NT) provenientes de pacientes com CG do tipo intestinal (Int) e tipo difuso (Dif), por teste T entre 2 amostras, para c-Met (A), HGF (B) e VEGF (C).

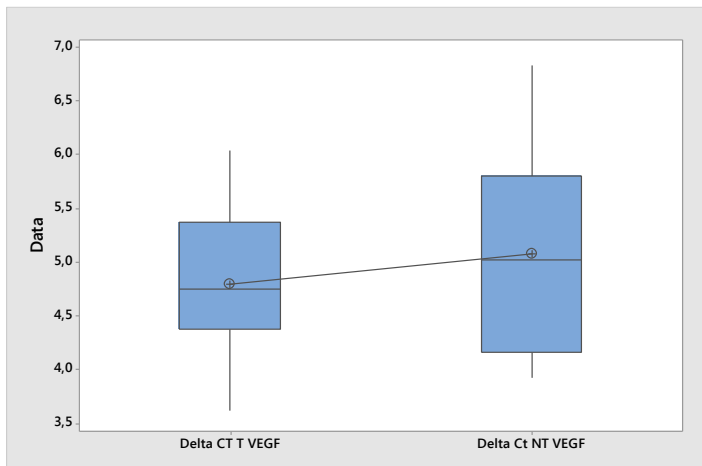
A Figura 15 mostra comparação entre delta CT de amostras tumorais e não tumorais dos pacientes com CG tipo intestinal. Em A, podemos observar as médias de delta CT entre os grupos tumoral (7,889) e não tumoral (7,839), sendo $n=8$ ($p=0,894$). Em B, a média para o grupo tumoral é 12,005 e não tumoral 11,39 ($n=3$) ($p=0,482$). Em C, a média para o grupo não tumoral foi maior, 5,074, enquanto para o tumoral foi 4,795 ($n=10$) (0,469).



A P = 0,894



B P = 0,482



C P = 0,469

Figura 15- Comparação entre delta CT de amostras tumorais (T) e não tumorais (NT) do tipo intestinal, por teste T entre 2 amostras, para c-Met (A), HGF (B) e VEGF (C)

Na Figura 16, podemos observar a comparação entre delta CT de amostras tumorais e não tumorais dos pacientes com CG tipo difuso. Em A, n=10 e a média de delta CT para o grupo tumoral é 7,52 e para o não tumoral, 7,43 (p=0,875). Em B, n= 4 e a média de delta CT para o grupo tumoral é 10,26 e não tumoral é 9,979 (p=0,835). Em C, n=10 e a média observada para o grupo tumoral é 5,87 enquanto para o grupo não tumoral é 5,109 (p=0,121).

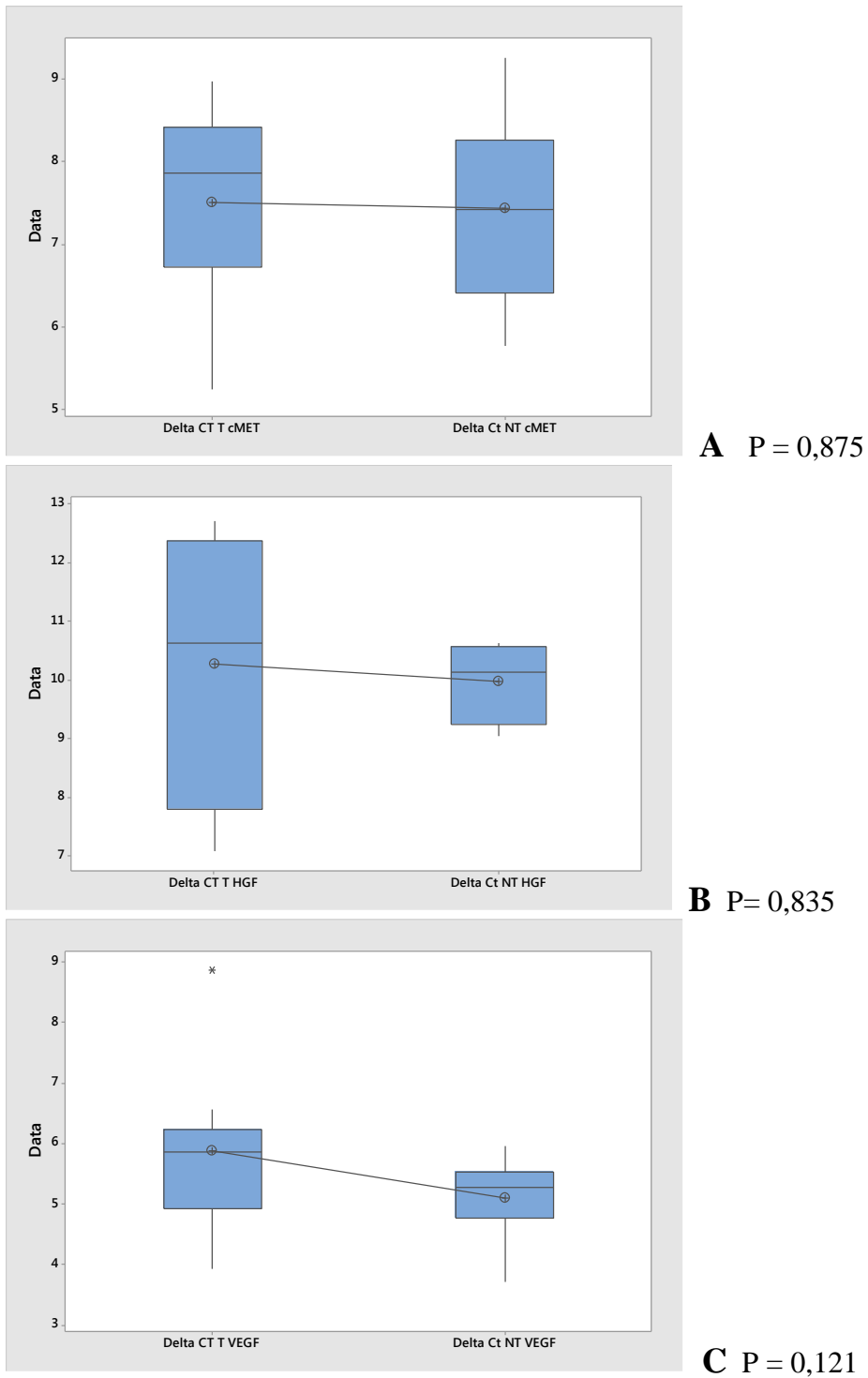


Figura 16- Comparação entre delta CT de amostras tumorais (T) e não tumorais (NT) do tipo difuso, por teste T entre 2 amostras, para c-Met (A), HGF (B) e VEGF (C).

Podemos observar, na Figura 17, a comparação entre delta CT de amostras tumorais dos pacientes com CG dos tipos intestinal e difuso e suas respectivas amostras não tumorais. Em A, o grupo tumoral apresentou um valor médio de 7,68 enquanto o não tumoral 7,613, sendo $n=18$ ($p=0,838$). Em B, $n=7$ e a média para o grupo tumoral é 11,01 e não tumoral é

10,58 ($p=0,631$). Em C, $n=20$ e a média observada para o grupo tumoral é 5,33 e para o grupo não tumoral é 5,092 ($p=0,447$).

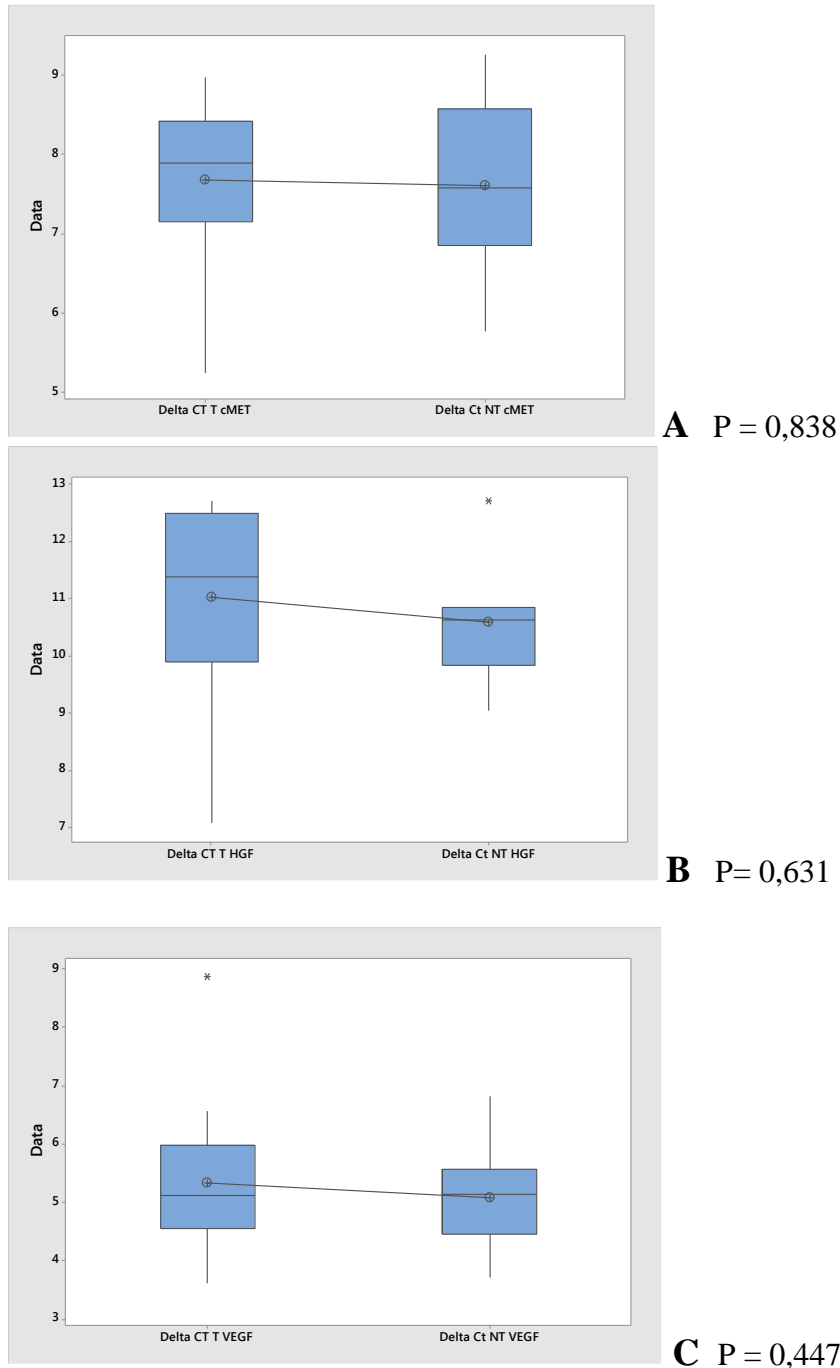
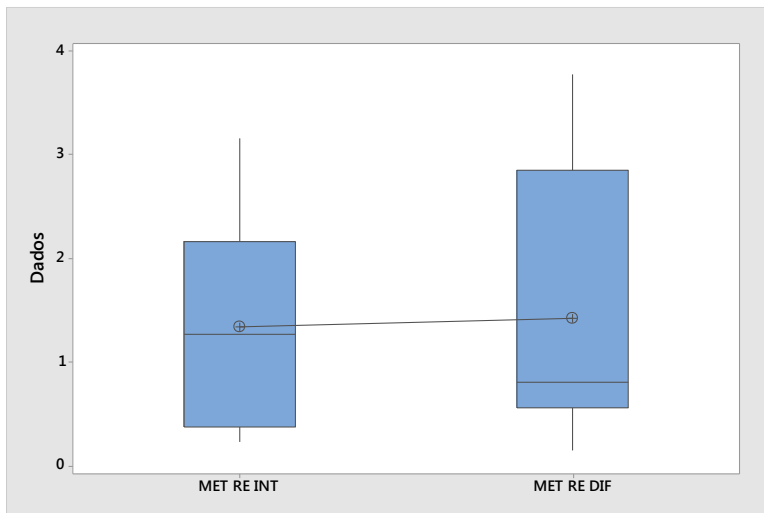


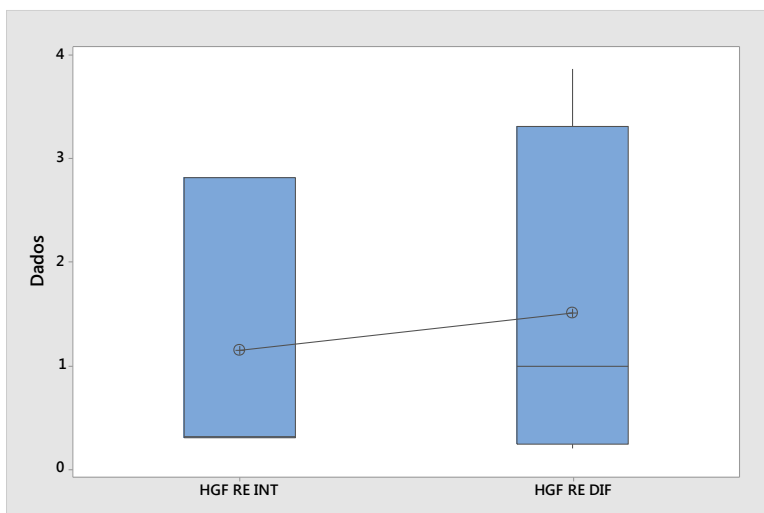
Figura 17- Comparação entre delta CT de amostras tumorais (T) do tipo intestinal e do tipo difuso e suas respectivas amostras não tumorais (NT), por teste T entre 2 amostras, para c-Met (A), HGF (B) e VEGF (C).

Na Figura 18, podemos observar a expressão relativa entre CG tipo difuso e intestinal. Em A, a média da expressão relativa do grupo intestinal ($n=8$) é 1,34 e difuso ($n=10$) é 1,43

($p=0,874$); em B, o grupo intestinal ($n=3$) tem como média 1,15 e o grupo difuso ($n=4$) tem como média 1,52 ($p=0,773$). Em C, para cada grupo temos $n=10$ e podemos observar dois pontos fora do gráfico por serem mais extremos (RE= 5,16 e RE= 0,09). Nessas circunstâncias, a média para os pacientes do grupo de CG tipo intestinal é 1,69 e para aqueles do grupo do tipo difuso 0,766. Em D, foram retirados os dois pontos mais extremos, conhecidos como *outliers*, sendo $n=9$, portanto, tanto para o grupo de pacientes com CG tipo intestinal quanto para o tipo difuso. O grupo com CG tipo intestinal apresenta média da expressão relativa 1,302 e o grupo com CG difuso difuso 0,634 e essa diferença mostrou-se significativa ($p= 0,053$).



A $P= 0,874$



B $P= 0,773$

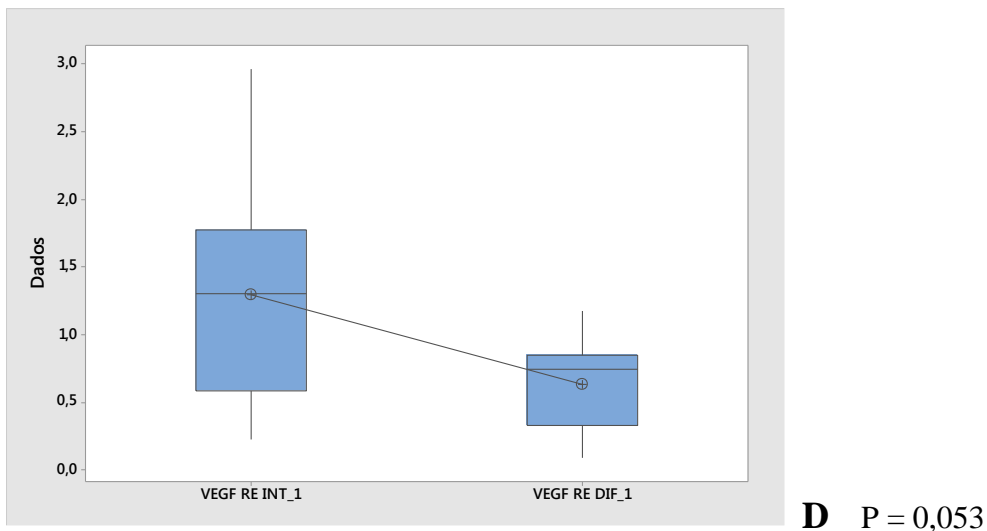
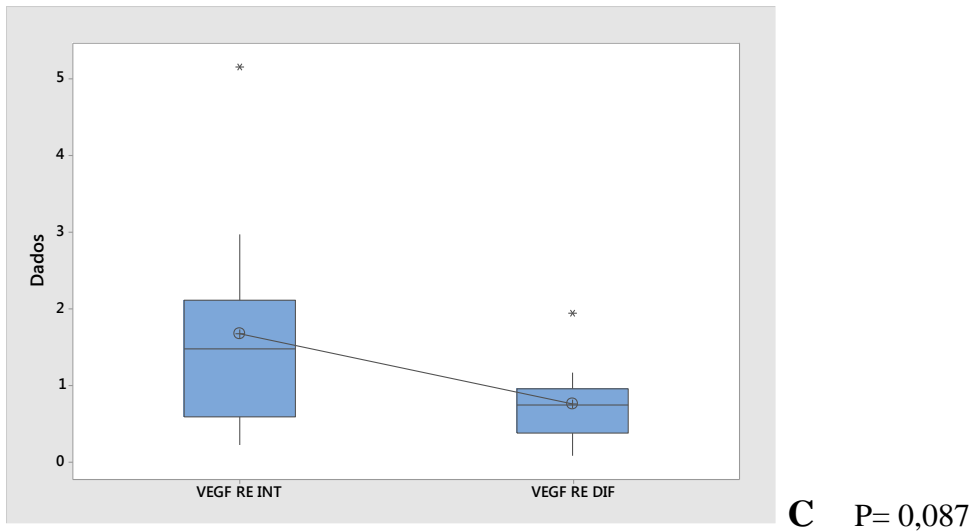


Figura 18- Comparação entre expressão relativa (RE) intestinal (Int) e difuso (Dif), por teste T entre 2 amostras, para c-Met (A), HGF (B) e VEGF (C) e (D).

Comparando as proporções de hiperexpressão e normoexpressão relativas dos CG tipo difuso e intestinal, foram observados resultados estatisticamente significativos para o gene *VEGF* ($p=0,046$). Entretanto, não foram observados resultados significativos para os genes *MET* ($p=0,330$) e *HGF* ($p=0,652$).

6. DISCUSSÃO

Nosso estudo piloto foi capaz de avaliar, pela técnica de qPCR, a expressão relativa gênica dos três biomarcadores, c-Met, HGF e VEGF entre as amostras tumorais e não tumorais dos pacientes com CG tipos intestinal e difuso. É uma técnica eficaz para esse objetivo, principalmente se tratando de amostras parafinadas, em que há menor concentração de ácido nucléico.

Comparando a qPCR com a IHQ, grande parte dos estudos que realizam esta última técnica, não possuem um consenso no critério de score para testes em c-Met. Além disso, essa técnica resulta em um alto grau de variabilidade. Exemplos potenciais dessa variabilidade incluem o uso de diferentes tipos de amostras, com tamanhos variados, variação entre observadores, anticorpos primários e secundários, protocolos de coloração, métodos utilizados para o score e diferenças no processamento e armazenamento das amostras. Além disso, os reagentes de IHQ utilizados costumam variar a sua especificidade e sensibilidade. Todos esses fatores trazem implicações para o uso de c-Met e seu ligante no método de IHQ (25).

Nosso achado em relação à idade média dos pacientes com CG dos tipos intestinal (72,1 anos) e difuso (50,1 anos) está de acordo com o descrito por Laurén, segundo o qual há uma maior incidência de CG do tipo intestinal em faixa etária mais avançada (8).

Dentre os três marcadores, o HGF foi o que apresentou menor expressão gênica em nossas amostras, ou seja, em apenas sete dos vinte pacientes. Foi observada uma expressão maior do biomarcador nos casos de CG tipo difuso (n=4) que naqueles do tipo intestinal (n=3), porém essa diferença não foi significativa ($p=0,773$). No estudo de Amemiya *et al* (2010), foram analisados 40 pacientes com CG através da IHQ. Na imunorreação das células tumorais observou-se que metade dos pacientes não expressaram HGF, enquanto 15 pacientes tiveram reação com intensidade de uma cruz (+), correspondente a 1-24% de células neoplásicas marcadas; três pacientes apresentaram imunorreação com intensidade igual a três cruces (+++), significando que 50 a 74% de células foram marcadas positivamente, enquanto que somente dois pacientes apresentaram imunorreação igual a quatro cruces (++++), o que equivale a 75% ou mais de células positivas. Esse resultado mostra que em 50% dos casos analisados houve a produção de HGF por células tumorais, sugerindo que o HGF produzido pelas células tumorais induzem sua própria atividade proliferativa por via autócrina. Já em relação às células estromais do estômago, foi observada forte marcação de HGF em todos os pacientes analisados. Essa observação sugere que no câncer gástrico, a produção de HGF

pelas células estromais estimulam a proliferação e migração das células cancerosas por via parácrina (30). Concordando com esses achados, no estudo de Toiyama *et al* (2012), com 100 pacientes com CG, sendo 73 homens e 27 mulheres, foi utilizada também a IHQ e observou-se que o HGF foi predominantemente expresso no citoplasma das células tumorais, enquanto o c-Met foi mais imunorreativo na membrana, indicando uma possível sinalização autócrina. Os mesmos autores também utilizaram qPCR para análise de expressão relativa e obtiveram como resultado uma correlação da expressão de HGF com a de c-Met nas amostras de CG, além de correlacionar com a progressão tumoral. A expressão de HGF e c-Met foi significativamente maior em pacientes com disseminação peritoneal que naqueles sem a disseminação e foi associado a uma redução na sobrevida e a um pior prognóstico (26).

O HGF também pode ser avaliado através de análises sorológicas com utilização do método de ELISA. Estudo publicado em 2015, enfocando 110 pacientes com CG submetidos à cirurgia e à coleta e análise de soro no período pré-operatório, mostrou diferenças significativas na comparação com o grupo controle, constituído de voluntários saudáveis e pacientes com doença benigna. Dentre os 110 pacientes, 50 casos foram submetidos à análise IHQ de HGF e c-Met com o intuito adicional de comparar com a análise sorológica. Desses 50 pacientes, 36 (72%) foram positivos para HGF e 14 (28%) negativos. Em relação ao c-Met, 25 (50%) foram positivos e 25 (50%) foram negativos. Apesar desses achados, não foi observada correlação significativa entre os níveis séricos com a imunorreação de c-Met e HGF. Tal fato poderia ser explicado devido aos mecanismos parácrinos e autócrinos do HGF nas células tumorais (31).

Quanto à análise de c-Met realizada no presente estudo, observamos sua expressão em 18 dos 20 pacientes, ou seja, em 90% dos casos. Dentre esses 18 pacientes, oito apresentavam CG do tipo intestinal e 10 CG do tipo difuso. Houve tendência de maior expressão relativa observada para o tipo difuso, porém não significativa ($p=0,874$). Nossos resultados são semelhantes ao estudo de Lee *et al* (2012) em que também encontraram maior expressão de c-Met no CG tipo difuso, porém, foi analisado a expressão protéica, através da IHQ. Nele, foram analisados 438 pacientes com CG e foi encontrada uma significância estatística na expressão de c-Met entre os tipos histológicos ($p<0,001$). Dos casos ($n=10$) que deram três cruces (+++), 70% eram CG do tipo difuso e 30% CG tipo intestinal. Já os casos ($n=94$) que apresentaram imunorreação duas cruces (++) , 67% eram pacientes com CG tipo intestinal contra 33% de pacientes com CG tipo difuso. Os pacientes que foram imunorreativos para três

cruzes (+++) apresentaram uma menor sobrevida quando comparados aos pacientes com marcação negativa (32).

Janjigian *et al* (2011) analisaram por qPCR 15 amostras de CG, encontrando expressões significativamente maiores de c-Met no tumor do que no tecido normal e, ao se comparar essa expressão entre os dois tipos de CG, o tipo intestinal foi aquele que mostrou expressão significativamente maior. Além da qPCR, 38 amostras de pacientes com CG foram examinadas por meio da IHQ sendo que dentre estas amostras, 24 foram positivas para c-Met, 15 no CG tipo intestinal e 9 no CG tipo difuso ou misto (33). Concordando com estes resultados e também utilizando IHQ, Sotoudeh *et al* (2012) analisaram 124 casos de pacientes com CG e obtiveram maior expressão de c-Met em amostras do tipo intestinal (77%) que no tipo difuso (52%). O c-Met também foi mais expresso (80%) em tumores avançados, invasores da parede gástrica nos estágios pT3 e pT4 quando em comparação à expressão observada (44%) nos tumores gástricos em estágios iniciais (20).

Por outro lado, em outras pesquisas, os autores Chi *et al* (2012), Amemiya *et al* (2013) e Huang *et al* (2001) não especificaram os tipos histológicos do CG intestinal e difuso para correlacioná-los com os níveis de expressão de c-Met. Encontraram, porém, altos níveis de expressão de c-Met nas amostras de CG e conseguiram correlacioná-los com os casos nos quais havia maior profundidade de invasão na parede gástrica, aumento de metástase nos linfonodos, maior frequência de tumores pouco diferenciados ou indiferenciados e estadiamento mais avançado do CG (34-36).

Nossos achados da expressão relativa de c-Met e HGF não se mostraram similares nos pacientes, mesmo sendo receptor e seu respectivo ligante. Enquanto 18 pacientes expressaram c-Met, apenas sete pacientes expressaram HGF. Uma hipótese sugerida seria a transativação ou *cross-talk*, mecanismo pelo qual um ligante ativa, indiretamente, um receptor tirosina-quinase pelo qual não é um agonista direto. O c-Met é alvo de transativação por alguns ligantes, sendo um deles o Fator de Crescimento Transformador- α (TGF- α) através do Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) (37). Segundo Jo *et al* (2000), em um de seus estudos, foi observado que em células epiteliais hepáticas de ratos, que expressavam constitutivamente TGF- α , o c-Met se apresentava continuamente fosforilado, mesmo na ausência de seu ligante HGF. Então se propuseram a testar a transativação entre EGFR/ TGF- α e c-Met/HGF em linhagens celulares humanas de hepatocarcinoma e carcinoma epidermóide. A exposição ao TGF- α e EGF exógeno fez aumentar a fosforilação de c-Met. O

aumento da ativação de c-Met foi inibido utilizando anticorpos anti-TGF- α e/ou para EGFR. Esse resultado indicou que a fosforilação constitutiva de c-Met, nas linhagens celulares testadas, foi devido à transativação via EGFR (38).

Dentre os marcadores testados, o VEGF foi o único marcador expresso em todas as 20 amostras (100%) além de ter obtido uma maior expressão relativa, estatisticamente significativa, no CG do tipo difuso ($p=0,046$). Tais achados poderiam estar relacionados com a história natural e comportamento biológico desse tipo tumoral, que, por ser mais agressivo que o CG do tipo intestinal, propiciaria uma maior formação neovascular (9).

Correa propôs, em 1992, que a carcinogênese gástrica é um processo que envolve uma sequência de mudanças histológicas que levam ao adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal. Dentre esses passos estão gastrite crônica, atrofia, metaplasia intestinal e displasia, sendo essas lesões associadas à infecção por *H. pylori*. Já o CG tipo difuso não é associado à infecção e é possível surgir na mucosa gástrica que contenha um grande número de células pouco diferenciadas, porém sem envolver um padrão de carcinogênese específico (6). Logo, o tecido adjacente não tumoral sofre maiores mudanças genéticas e epigenéticas no tipo intestinal que no difuso, fazendo a diferença entre biomarcadores no tecido não-tumoral e tumoral ser maior no tipo difuso.

Badescu *et al* (2012) analisaram 28 pacientes com CG, cujas biópsias foram processadas em parafina e realizaram imunohistoquímica com anticorpo anti-VEGF, tendo como amostras controle mucosa gástrica normal. Dentre as 28 amostras de CG, 10 eram do tipo difuso e 18 do tipo intestinal. A imunorreação foi positiva para VEGF em 80% (8/10) dos casos de CG tipo difuso e 55,5% (10/18) dos casos de CG tipo intestinal. O CG tipo difuso é uma forma histológica associada a uma intensa atividade angiogênica e os resultados desse estudo sugerem que, quanto mais intensa a angiogênese no tipo difuso, maior o potencial metastático que quando comparado ao tipo intestinal.

Ao contrário, Boussioutas *et al* (2003) relataram resultados em que as amostras do CG do tipo intestinal apresentaram alta expressão para marcadores proliferativos. Embora seja esperado que células tumorais expressem genes envolvidos na divisão celular, as amostras do CG do tipo difuso não mostraram um aumento similar desses marcadores (39).

Em um outro estudo, Takahashi Y *et al* (1996) observaram que a expressão de VEGF foi também maior no CG tipo intestinal que no tipo difuso, sugerindo que o VEGF seja um

dos principais fatores angiogênicos que induza a neovascularização no CG tipo intestinal. Esses autores acreditam ainda que neste tipo de CG, o processo de crescimento e metástase seja mais dependente da angiogênese que no tipo difuso (13).

No estudo de Mysliwiec *et al* (2009), o VEGF foi analisado no soro e plasma. Foi encontrado um aumento significativo de VEGF no plasma de pacientes com CG, de ambos os tipos histológicos, intestinal e difuso, quando comparado ao grupo controle, composto por indivíduos sem CG ($p < 0.05$). Quando comparado o VEGF no plasma e soro com os tipos histológicos de CG, foi encontrado um valor maior de VEGF no soro que no plasma. No tipo intestinal, a diferença entre plasma e soro foi de 10 vezes, enquanto para o tipo difuso, a diferença encontrada foi de apenas três vezes (40).

Algumas limitações de nosso estudo devem ser registradas. Por se tratar de um estudo piloto, este apresenta limitações inerentes à sua própria natureza, como uma amostragem pequena. Além disso, o emprego de amostras parafinadas resulta em baixa concentração de ácidos nucleicos, sendo mais favorável a utilização de amostras frescas. Outra limitação foi a ausência de comparação com metodologias que analisem a expressão protéica dos mesmos biomarcadores, como a IHQ, para promover a correlação entre a expressão do mRNA com a expressão da proteína correspondente. Outro fator limitante foi a utilização de amostras de regiões não-tumorais de pacientes com CG ao invés de amostras de pacientes saudáveis, como amostras controle.

7. CONCLUSÃO

O desenvolvimento do presente estudo e análise dos resultados obtidos nos permitem concluir que:

- A técnica de qPCR foi viável para análise de expressão dos genes *MET*, *HGF* e *VEGF* nas amostras parafinadas de CG do tipo intestinal e difuso;
- Foram observadas nas amostras parafinadas de CG do tipo intestinal e difuso a expressão e superexpressão de c-Met, HGF e VEGF em 90 e 45%, 35 e 20% e 100 e 60%, respectivamente;
- Foi observada diferença no padrão de expressão dos marcadores tumorais c-MET, HGF e VEGF entre amostras de CG do tipo intestinal e tipo difuso, embora não estatisticamente significativa;

- Novos estudos, com amostragem maior de casos, devem ser realizados para melhor caracterização do padrão de expressão desses biomarcadores no CG humano na população brasileira. Estes estudos seriam de grande interesse no cenário atual das pesquisas em CG, com vistas à definição de sua prevalência e eventual valor prognóstico e, conseqüentemente, no desenvolvimento de compostos terapêuticos anti-c-Met e anti-VEGF.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo piloto servirá como referência para o trabalho “Caracterização do padrão de expressão do proto-oncogene *MET* e do Fator de Crescimento Hepatocítico (HGF) em carcinoma gástrico humano: prevalência e valor prognóstico”. Além disso, faz parte de uma plataforma de pesquisa com pesquisadores do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, do Banco de Tumores e Tecidos do Instituto Alfa de Gastroenterologia e do Serviço de Oncologia do Hospital das Clínicas da UFMG que envolve outras metodologias para avaliação do valor terapêutico desses marcadores e sua aplicação na prática médica serão realizadas.

A capacidade de utilização de amostras parafinadas pela técnica de qPCR abre inúmeras possibilidades de estudo para novos testes e marcadores através do emprego dos blocos de parafina do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hamilton SR, Aaltonen, L A. World Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. IARC Press: Lyon 2000
2. Parkin D., et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108.
3. Instituto Nacional do Câncer. Inca. Estimativa/2014. Disponível em <<http://www1.inca.gov.br>>. Acesso em 14/01/2016.
4. Coelho LGV, Albuquerque W, Savassi-Rocha PR. Adenocarcinoma gástrico. In: Zaterka S & Eisig JN eds. *Tratado de Gastroenterologia*. São Paulo: Editora Atheneu 2011; 551-566.
5. Zilberstein B, Malheiros C, Lourenço LG, et al. Brazilian consensus in gastric cancer: guidelines for gastric cancer in Brazil. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2013; 26: 2-6.
6. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 24: 6735-40
7. Correa P, Haenszel W, Cuello C, et al. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975; 7924: 58-60
8. Laurén P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49.
9. Laurén P. Histogenesis of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. *Scand J Gastroenterol Suppl* [S.I.] 1991; 180: 160-164.
10. Laurén P, Nevalainen T. Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. A time-trend study in Finland with comparison between studies from high- and low-risk areas. *Cancer [S.I.]* 1993; 71: 2926-33.
11. Correa P, Piazeulo M. Natural history of Helicobacter pylori infection. *Dig Liver Dis* [S.I.] 2008; 40: 490-6.
12. Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ* [S.I.] 2004; 157: 327-49.
13. Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2(10): 1679–84.
14. Badescu A, Georgescu CV, Vere CC, et al. Correlations between Her2 oncoprotein, VEGF expression, MVD and clinicopathological parameters in gastric cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2012; 53(4): 997–1005.

15. Yoshida W. B. Angiogenesis, arteriogenesis and vasculogenesis: treatment of the future for lower limb critical ischemia?. *Jornal Vascular Brasileiro* 2005; 4: 316-318.
16. Folkman J, Long DM JR., Becker FF. Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* 1963; 16: 453-67.
17. Bamias A, Dimopoulos MA. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. *Eur J Intern Med* 2003; 14(8): 459-469.
18. Catalano V, Labianca R, Beretta GD, *et al.* Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009; 71: 127-64.
19. Anderson C, Nijagal A, Kim J. Molecular markers for gastric adenocarcinoma: an update. *Mol Diagn Ther* 2006; 10: 345-52.
20. Sotoudeh K, Forough H, Zahra M, *et al.* The clinicopathologic association of c-MET overexpression in Iranian gastric carcinomas; an immunohistochemical study of tissue microarrays. *Diagnostic Pathology* 2012; 7: 1-7.
21. Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. *Cancer* 1995; 75: 1410-17.
22. Luraghi P, Schelter F, Kruger A, *et al.* The MET oncogene as a therapeutic target in cancer invasive growth. *Frontiers in Pharmacology* 2012; 3(164): 1-6.
23. Sierra J, Tsao MS. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2011; 3: S21-S35.
24. Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev*; 2008; 27: 85-94.
25. Hack S, Bruey JM, Koeppen H. HGF/MET-directed therapeutics in gastroesophageal cancer: a review of clinical and biomarker development. *Oncotarget* 2014; 5 (10): 2866-80.
26. Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, *et al.* Co-expression of hepatocyte growth factor and c-Met predicts peritoneal dissemination established by autocrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling in gastric cancer. *Int J Cancer* 2012; 130: 2912-21.
27. Nakajima, M, Sawada H, Yamada Y, *et al.* The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* 1999; 85(9): 1894-902.
28. Tanigushi, K, Yonemura Y, Nojima N, *et al.* The relation between the growth patterns of gastric carcinoma and the expression of hepatocyte growth factor receptor (c-met), autocrine motility factor receptor, and urokinase-type plasminogen activator receptor. *Cancer* 1998; 82(11): 2112-22.

29. Begnami M.D, Fregnani JH, Brentani H, *et al.* Identification of protein expression signatures in gastric carcinomas using clustering analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27 (2): 378-84.
30. Amemiya H, Menolascino F, Peña A. Papel de la expresión del receptor c-Met em la progresión del câncer gástrico. *Invest Clin* 2010; 51(3): 369-80.
31. Noguchi E, Saito N, Kobayashi M, *et al.* Clinical significance of hepatocyte growth factor/c-Met expression in the assessment of gastric cancer progression. *Molecular Medicine Reports* 2015; 11: 3423-31.
32. Lee H, Kim MA, Lee HS, *et al.* MET in gastric carcinomas: comparison between protein expression and gene copy number and impact on clinical outcome. *British Journal of Cancer* 2012; 107: 325–33.
33. Janjigian YY, Tang LH, Coit DG, *et al.* MET Expression and Amplification in Patients with Localized Gastric Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20: 1021-7.
34. Chi F, Fu D, Zhang X, *et al.* Expression of the c-Met proto-oncogene and integrin $\alpha 5\beta 1$ in human gastric cardia adenocarcinoma. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76 (8): 1471-6.
35. Amemiya H, Peña A, Chiurillo M, *et al.* Incremento em la expresión del ARNm del receptor c-Met em el câncer gástrico. *Invest Clin* 2013; 54(3): 284-98.
36. Huang TJ, Wang JY, Lin SR, *et al.* Overexpression of the c-met Protooncogene in Human Gastric Carcinoma- correlation to clinical features. *Acta Oncol* 2001; 40(5): 638–43.
37. Reznik TE, Sang Y, Ma Y, *et al.* Transcription-Dependent Epidermal Growth Factor Receptor Activation by Hepatocyte Growth Factor. *Mol Cancer Res* 2008; 6(1): 139-50.
38. Jo M, Stolz DB, Esplen JE, Dorko K, *et al.* Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J Biol Chem.* 2000, 275(12): 8806-11.
39. Boussioutas A, Li H, Liu J, *et al.* Distinctive Patterns of Gene Expression in Premalignant Gastric Mucosa and Gastric Cancer. *Cancer Res* 2003, 63: 2569–77.
40. Mysliwiec P, Pawlak K, Bandurski R, *et al.* Soluble angiogenesis markers in gastric tumor patients. *Folia Histochem Cytobiol* 2009; 47(1): 81-6.

APÊNDICE E ANEXOS**APÊNDICE A- Tabela de amostras e razão 260/280 após secagem das mesmas**

Amostras	260/280
1	1,92
2	1,89
3	1,84
4	1,72
5	1,89
6	1,96
7	1,83
8	1,92
9	1,96
10	1,82
11	1,90
12	1,91
13	1,99
14	2,00
15	1,89
16	1,91
17	1,96
18	1,96
19	1,90
20	2,01
21	1,94
22	1,89
23	1,93
24	1,80
25	1,83
26	1,90
27	1,87
28	1,79
29	1,94
30	1,76
31	2,01
32	1,86
33	1,95
34	1,75
35	1,92
36	2,03
37	1,71
38	1,91
39	1,84
40	2,00

ANEXO A- Folha de aprovação do Comitê de Ética

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 16476713.0.0000.5149

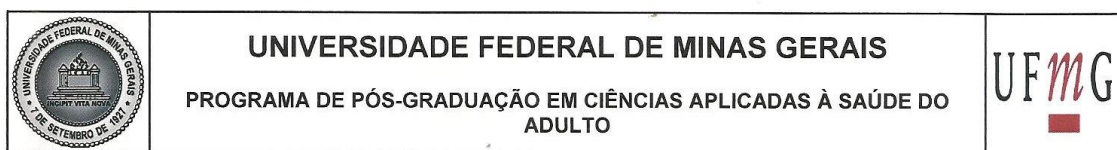
**Interessado(a): Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de julho de 2013, o projeto de pesquisa intitulado **"Expressão do receptor c-MET e seu ligante HGF, como marcadores tumorais, por PCR quantitativo e imunohistoquímica em câncer gástrico dos tipos intestinal e difuso na população brasileira: estudo piloto"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

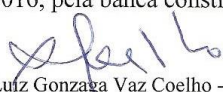
ANEXO B- Declaração de aprovação**FOLHA DE APROVAÇÃO**

EXPRESSÃO DO RECEPTOR C-MET, SEU LIGANTE HGF E VEGF COMO MARCADORES TUMORAIS NO CÂNCER GÁSTRICO DOS TIPOS INTESTINAL E DIFUSO NA POPULAÇÃO BRASILEIRA: ESTUDO PILOTO QUANTITATIVO POR PCR


BIANCA DELLA CROCE VIEIRA COTA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS AO APARELHO DIGESTIVO.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Lufz Gonzaga Vaz Coelho - Orientador
UFMG

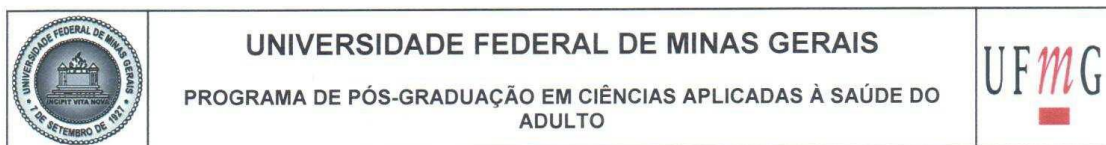

Prof. Mônica Maria Demas Álvares Cabral - Coorientadora
UFMG


Prof. Paula Vieira Teixeira Vidigal
UFMG


Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier
UFMG

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2016.

ANEXO C- Ata da defesa



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA BIANCA DELLA CROCE VIEIRA COTA

Realizou-se, no dia 23 de fevereiro de 2016, às 08:30 horas, Sala 340, 3º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **EXPRESSÃO DO RECEPTOR C-MET, SEU LIGANTE HGF E VEGF COMO MARCADORES TUMORAIS NO CÂNCER GÁSTRICO DOS TIPOS INTESTINAL E DIFUSO NA POPULAÇÃO BRASILEIRA: ESTUDO PILOTO QUANTITATIVO POR PCR**, apresentada por **BIANCA DELLA CROCE VIEIRA COTA**, número de registro 2013654485, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho - Orientador (UFMG), Profa. Mônica Maria Demas Álvares Cabral - Coorientadora (UFMG), Profa. Paula Vieira Teixeira Vidigal (UFMG), Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

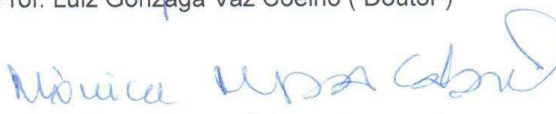
Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2016.


 Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho (Doutor)


 Profa. Mônica Maria Demas Álvares Cabral (Doutor)


 Profa. Paula Vieira Teixeira Vidigal (Doutor)


 Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier (Doutor)