

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**TUMOR DO ESTROMA GASTRINTESTINAL CANINO: PERFIL
GÊNICO E ALVOS PREDITIVOS**

JULIANO NÓBREGA

Botucatu – SP

Junho de 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**TUMOR DO ESTROMA GASTRINTESTINAL CANINO: PERFIL
GÊNICO E ALVOS PREDITIVOS**

JULIANO NÓBREGA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Titular Renée Laufer Amorim
Departamento de Clínica Veterinária

Botucatu – SP

Junho de 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Nóbrega, Juliano.

Tumor do estroma gastrintestinal canino : perfil gênico e alvos
preditivos / Juliano Nóbrega. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Renée Laufer Amorim
Capes: 50503006

1. Expressão gênica. 2. Tumores do Estroma Gastrointestinal.
3. Reposicionamento de Medicamentos. 4. Regulação de expressão
gênica.

Palavras-chave: Expressão gênica global; GIST; Reposicionamento de
drogas; Reversão de expressão gênica.

Nome do Autor: Juliano Nóbrega

Título: TUMOR DO ESTROMA GASTRINTESTINAL CANINO: PERFIL GÊNICO
E ALVOS PREDITIVOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Titular Renée Laufer Amorim
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu, SP

Prof. Ass. III Rodrigo de Francisco Strefezzi
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
FZEA – USP – Pirassununga, SP

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves
Membro
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu, SP

Profa. Assistente Dra. Juliany Gomes Quitzan
Membro
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu, SP

Profa. Titular Maria Lucia Zaidan Dagli
Membro
Departamento de Patologia
FMVZ – USP – São Paulo, SP

Botucatu – SP

Junho de 2023

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estudos que analisaram o perfil global de expressão gênica em tumores caninos (Morris, 2016 – adaptação).	p.8
Tabela 2	Especificação dos anticorpos primários utilizados na imuno-fenotipagem das amostras selecionadas para expressão gênica global.	p.10
Tabela 3	Características clínicas e histopatológicas das amostras de GIST incluídas no estudo (n=7).	p.13
Tabela 4	Genes diferencialmente expressos entre os tumores e os tecidos normais com expressão aumentada e maiores valores de <i>fold change</i> .	p.16
Tabela 5	Genes diferencialmente expressos entre os tumores e os tecidos normais com expressão diminuída e maiores valores de <i>fold change</i> .	p.16
Tabela 6	Drogas identificadas pela plataforma LINCS L1000FWD e seus mecanismos de ação.	p.23
Tabela 1 (Anexo)	Genes diferencialmente expressos entre tumores e tecidos normais (FC < -2 ou > 2, $p < 0,05$).	p.34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspectos macroscópicos de GISTs. (a) jejuno; (b) duodeno; (c) íleo; (d) ceco. Fonte: MORINI et al., 2022.	p.4
Figura 2	Aspectos microscópicos de GISTs. (a) estoriforme; (b) fascicular; (c) epitelióide; (d) mixóide. Fonte: MORINI et al., 2022.	p.5
Figura 3	IHQ. Marcação positiva das células tumorais para os anticorpos <i>DOG1</i> (A), <i>CD117</i> (B) e <i>α-SMA</i> (C) (40x) e negativa para <i>DESM</i> (D) (40x). DAB, Hematoxilina de Harris.	p.11
Figura 4	Gráfico da <i>PCA</i> representando o agrupamento das amostras de GISTs e de tecidos normais segundo o perfil de expressão gênica global.	p.14
Figura 5	Análise de clusterização hierárquica dos dados de expressão gênica global entre amostras de GIST caninos e tecidos normais.	p.15
Figura 6	Ontologia gênica (processos biológicos) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão aumentada ($p < 0,05$). Gráfico de barras gerado pelo <i>software</i> EnrichR.	p.17
Figura 7	Ontologia gênica (processos biológicos) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão diminuída ($p < 0,05$). Gráfico de barras gerado pelo <i>software</i> EnrichR.	p.18
Figura 8	Ontologia gênica (funções moleculares) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão aumentada ($p < 0,05$). Gráfico de barras gerado pelo <i>software</i> EnrichR.	p.18
Figura 9	Ontologia gênica (funções moleculares) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão diminuída ($p < 0,05$). Gráfico de barras gerado pelo <i>software</i> EnrichR.	p.18
Figura 10	Ontologia gênica (processos biológicos) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão aumentada ($p < 0,05$). Gráfico gerado pelo <i>software</i> REVIGO.	p.19
Figura 11	Ontologia gênica (processos biológicos) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão diminuída ($p < 0,05$). Gráfico gerado pelo <i>software</i> REVIGO.	p.19
Figura 12	Ontologia gênica (funções moleculares) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão aumentada ($p < 0,05$). Gráfico gerado pelo <i>software</i> REVIGO.	p.20
Figura 13	Ontologia gênica (funções moleculares) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão diminuída ($p < 0,05$). Gráfico gerado pelo <i>software</i> REVIGO.	p.20
Figura 14	Rede de interação proteína-proteína dos genes diferencialmente expressos com expressão aumentada.	p.21
Figura 15	Rede de interação proteína-proteína dos genes diferencialmente expressos com expressão diminuída.	p.22

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS.....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
4.1 Comitê de Ética e Uso dos Animais (CEUA).....	9
4.2 Amostras.....	9
4.3 Extração de RNA	11
4.4 Expressão gênica global	12
4.5 Enriquecimento.....	12
4.6 Identificação de drogas a partir da assinatura de expressão gênica reversa dos GISTs	13
5. RESULTADOS.....	13
5.1 Dados epidemiológicos.....	13
5.2 Avaliação do perfil de expressão gênica global.....	14
5.2.1 Análise de Componente Principal (<i>Principal Component Analysis, PCA</i>)	14
5.2.2 Análise do transcriptoma	15
5.2.3 Análise da ontologia gênica.....	16
5.2.4 Análise da interação proteína-proteína.....	21
5.3 Identificação de drogas a partir da assinatura de expressão gênica reversa dos GISTs.....	23
6. DISCUSSÃO.....	24
7. CONCLUSÕES.....	27
8. BIBLIOGRAFIA.....	29
ANEXO.....	35

NOBREGA, J. Tumor do estroma gastrointestinal canino: perfil gênico e alvos preditivos. Botucatu, 2023. 56p. Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

FOs tumores do estroma gastrointestinal representam 1% das neoplasias que acometem o trato gastrointestinal dos seres humanos. Apesar de raros, são os tumores de origem mesenquimal mais frequentes em cães também, sendo o diagnóstico baseado na marcação imuno-histoquímica das proteínas CD117 (KIT) e DOG1. As terapias convencionais não são totalmente eficazes para alguns subtipos tumorais. Portanto, o reposicionamento de drogas é uma abordagem promissora que maximiza o potencial terapêutico de medicamentos existentes e que pode acelerar o processo de desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil global de expressão gênica do GIST canino, informações inéditas na literatura, e a partir desses dados, identificar novos compostos terapêuticos para estes tumores. Para tal, foram utilizadas sete amostras de GIST intestinal canino *FFPE* (*formalin-fixed, paraffin-embedded*), comparadas com cinco amostras de intestino normal de cães. Utilizaram-se o GeneChip® Canine Gene 1.0 ST Arrays (*Thermo Fisher Scientific*, CA, EUA) e o software *Transcriptome Analysis Console 4.0.2.15* (*Thermo Fisher Scientific*). Foram encontrados 109 genes *up regulated* e 252 *down regulated* envolvidos em vias como regulação da migração celular e da proliferação da população celular. A partir da plataforma LINCS L1000FWD obtivemos os agonistas dos receptores de glicocorticóides como um dos potenciais grupos de fármacos de reversão da assinatura gênica dos GISTs caninos. Este estudo contribui para o desenvolvimento de novas terapias e para uma melhor compreensão dessa neoplasia nos cães, um bom modelo natural para estudos em oncologia comparada.

Palavras-chave: GIST; expressão gênica global; reposicionamento de drogas; reversão de expressão gênica.

NOBREGA, J. Canine gastrointestinal stromal tumor: gene expression profile and predictive targets. Botucatu, 2023. 56p. Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

43 **ABSTRACT**

44

45 Gastrointestinal stromal tumors represent 1% of neoplasms that affect the human
46 gastrointestinal tract. Although rare, they are the most frequent tumors of
47 mesenchymal origin in dogs as well, and the diagnosis is based on
48 immunohistochemical marking of CD117 (KIT) and DOG1 proteins. Conventional
49 therapies are not fully effective for some tumor subtypes. Therefore, drug
50 repositioning is a promising approach that maximizes the therapeutic potential of
51 existing drugs and can accelerate the process of developing new cancer
52 treatments. The objective of this study was to evaluate the global gene
53 expression profile of canine GIST, unpublished information in the literature, and
54 from these data, identify new therapeutic compounds for these tumors. For this
55 purpose, seven samples of FFPE (formalin-fixed, paraffin-embedded) canine
56 intestinal GIST were compared with five samples of normal intestine from dogs.
57 The GeneChip® Canine Gene 1.0 ST Arrays (Thermo Fisher Scientific, CA, USA)
58 and the Transcriptome Analysis Console 4.0.2.15 software (Thermo Fisher
59 Scientific) were used. There were 109 up regulated and 252 down regulated
60 genes involved in pathways such as regulation of cell migration and cell
61 population proliferation. When these genes were inserted into the LINCS
62 L1000FWD platform, glucocorticoid receptor agonists were observed as one of
63 the potential groups of drugs to reverse the gene signature of canine GISTs. This
64 study contributes to the development of new therapies and to a better
65 understanding of this neoplasm in dogs, a good natural model for studies in
66 comparative oncology.

67

68 **Key-words:** GIST; global gene expression; drug repositioning; gene expression
69 reversion

70 1. INTRODUÇÃO

71

72 Os tumores do estroma gastrointestinal (GISTs, na sigla em inglês) são
73 neoplasias mesenquimais que afetam o sistema digestório de diferentes
74 espécies, incluindo cães e seres humanos (CORLESS e HEINRICH, 2008). A
75 sintomatologia é variável, podendo ser considerados achados acidentais ou
76 apresentarem complicações como obstrução intestinal e perfuração gástrica
77 (SERPA e SANTOS, 2022; TREGGIARI et al., 2023).

78 A patogênese destes tumores está relacionada às mutações ativadoras
79 que ocorrem, na maioria das vezes, nos genes *c-KIT* ou *PDGFRA* (CORLESS e
80 HEINRICH, 2008). Morini et al. (2022) avaliaram a mutação dos genes *c-KIT* e
81 *PDGFRA* em 17 GISTs caninos, observando que em 47% dos tumores havia
82 mutação do *c-KIT* e um caso apresentou a mutação do *PDGFRA*. Também
83 correlacionaram a mutação do *c-KIT* com comportamento biológico mais
84 agressivo, como presença de metástase ao diagnóstico.

85 A descoberta destas mutações proporcionou o desenvolvimento dos
86 inibidores de tirosina quinase (TKIs, na sigla em inglês) e revolucionou o
87 tratamento dos humanos com GISTs inoperáveis ou metastáticos, uma vez que
88 estes tumores são resistentes à quimioterapia e radioterapia convencionais
89 (RUBIN et al., 2007; FREZOULIS e HARPER, 2022). Por outro lado, em cães, o
90 tratamento de eleição continua sendo a excisão cirúrgica, visto que ainda são
91 incipientes os estudos que avaliaram a eficácia dos TKIs nestes tumores
92 (DAILEY et al., 2015; FREZOULIS e HARPER, 2022).

93 Em pacientes humanos, apesar do tratamento com TKIs ser uma
94 realidade, cerca de 10 a 15% dos GISTs não apresentam mutações nos genes
95 *c-KIT* ou *PDGFRA* ou, devido às mutações secundárias, desenvolvem
96 resistência aos TKIs e, portanto, necessitam de estratégias terapêuticas
97 alternativas (CORLESS, 2014). Para suprir esta necessidade e otimizar o tempo
98 e custo do processo de desenvolvimento de novos fármacos, o chamado
99 reposicionamento de drogas possibilitou a identificação de medicamentos
100 aprovados ou sob investigação fora da indicação original, beneficiando pacientes
101 com câncer e aumentando o número de novas indicações terapêuticas para
102 medicamentos não oncológicos ou melhorando a eficácia de tratamentos
103 personalizados (ASHBURN e THOR, 2004). O LINCS L1000FWD (*Library of*

104 *Integrated Network-Based Cellular Signatures L1000 Fireworks Display*) é um
105 exemplo de ferramenta capaz de identificar compostos químicos com perfis de
106 expressão gênica semelhantes ou opostas aos de doenças específicas (WANG
107 et al., 2018). Nos últimos anos, seu uso tem possibilitado a identificação de
108 compostos terapêuticos promissores, reduzindo a necessidade de experimentos
109 extensivos *in vitro* e *in vivo* (PUSHPAKOM et al., 2019).

110 Portanto, a identificação de possíveis novos alvos terapêuticos a partir da
111 expressão gênica em larga escala neste estudo representa um avanço na
112 pesquisa veterinária pela produção de dados que auxiliarão pesquisas futuras
113 sobre os tumores do estroma gastrintestinal na população canina. Ainda, por se
114 tratar de um tumor com desenvolvimento espontâneo, com as mesmas
115 mutações encontradas nos GISTs humanos, o cão se torna um bom modelo
116 experimental no qual poderiam ser descobertos novos alvos terapêuticos para o
117 tratamento dos GISTs nas demais espécies (GREGORY-BRYSON et al., 2010).
118

119 2. REVISÃO DE LITERATURA 120

121 Os tumores do estroma gastrintestinal (GISTs) são neoplasias
122 mesenquimais que se originam das células intersticiais de Cajal (HIROTA et al.,
123 1998; KITAMURA, 2008; DEL ALCAZAR et al., 2021; TREGGIARI et al., 2023).
124 Estas células atuam como marca-passo, coordenando os movimentos
125 peristálticos do trato gastrintestinal (HIROTA et al., 1998; KITAMURA, 2008;
126 ABBAS et al., 2016; DEL ALCAZAR et al., 2021). Acometem diversas espécies
127 como cães, humanos, felinos, equinos e primatas não-humanos (FROST et al.,
128 2003; FUJIMOTO et al., 2006; BROWN et al., 2007; RUSSEL et al., 2007;
129 BOMMINEMI et al., 2009; MURAVNICK et al., 2009; GREGORY-BRYSON et al.,
130 2010; HAYES et al., 2013; DAILEY et al., 2015).

131 Apesar de representarem cerca de apenas 1% das neoplasias que
132 acometem o trato gastrintestinal dos seres humanos, os GISTs são os tumores
133 de origem mesenquimal mais frequentes (BRČIĆ et al., 2021). Acometem
134 pacientes idosos e não apresentam predisposição sexual (GREGORY-BRYSON
135 et al., 2010). Hayes et al. (2013) observaram que os GISTs caninos também
136 foram mais prevalentes entre os pacientes idosos, com idade média de 10 anos,

137 e que as fêmeas foram as mais afetadas, embora não seja observada
138 predisposição sexual significativa.

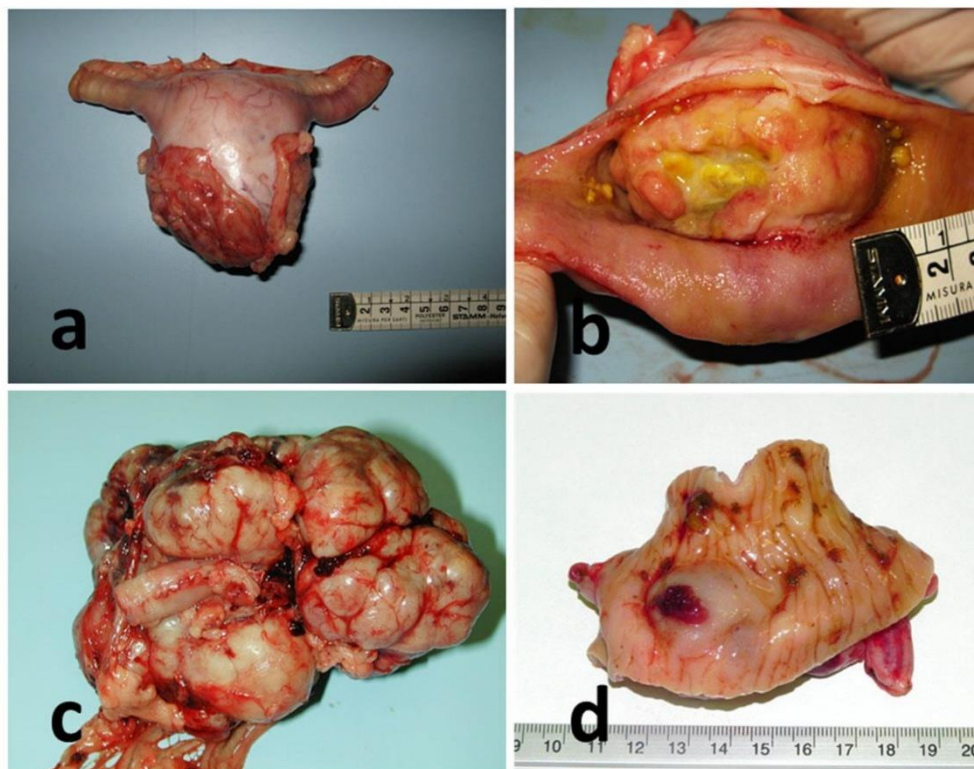
139 Na espécie canina, os GISTs têm maior incidência no jejuno, ceco e cólon
140 (76%) quando comparado ao estômago (19%), enquanto nos humanos, o
141 estômago é mais acometido (70%) comparado ao intestino (20%) (BETTINI et
142 al., 2003; DEL ALCAZAR et al., 2021; FROST et al., 2003; MIETTINEN et al.,
143 2003; RUSSEL et al., 2007; BRČIĆ et al., 2021; INCA, 2022; TREGGIARI et al.,
144 2023). Podem apresentar comportamento indolente e serem relatados como
145 achados incidentais ou então causar quadro clínico semelhante ao observado na
146 obstrução gastrointestinal com sinais como abdominalgia, êmese, diarreia,
147 anorexia, perda de peso e até mesmo perfuração gástrica (FROST et al., 2003;
148 DEL PIERRO et al., 2001; SERPA e SANTOS, 2022; TREGGIARI et al., 2023).

149 O surgimento dos GISTs é esporádico e está relacionado, na maioria das
150 vezes, às mutações com ganho de função nos genes *c-KIT* ou *PDGFRA* das
151 células intersticiais de Cajal (FROST et al., 2003; BACHET et al., 2009;
152 GREGORY-BRYSON et al., 2010; SETOGUCHI et al., 2011; MORINI et al.,
153 2022). *c-KIT* e *PDGFRA* são proto-oncogenes que codificam os receptores
154 tirosina quinase que, por sua vez, regulam diversos processos vitais como
155 proliferação, diferenciação celular e apoptose. Portanto, sua desregulação pode
156 levar à proliferação descontrolada e à sobrevivência das células neoplásicas
157 (NOCKA et al., 1990; TSAI et al., 1991; WEBSTER et al., 2006; LONDON, 2009).

158 Mutações no gene *c-KIT* foram observadas em 85% dos GISTs humanos
159 e em 47% dos GISTs caninos (HIROTA et al., 1998; MIETTINEN et al., 1999;
160 LUX et al., 2000; LONGLEY et al., 2001; FROST et al., 2003; WEBSTER et al.,
161 2006; ABBAS et al., 2016; MORINI et al., 2022). Em ambas as espécies, essas
162 mutações ocorreram, na maioria das vezes, no éxon 11, em seu domínio
163 justamembrana (HIROTA et al., 1998; LUX et al., 2000; FROST et al., 2003;
164 GREGORY-BRYSON et al., 2010). Já as mutações no gene *PDGFRA* foram
165 relatadas em 35% dos GISTs humanos (HEINRICH et al., 2016) e em um caso
166 de GIST canino (MORINI et al., 2022).

167 Macroscopicamente, os GISTs são bem circunscritos, possuem coloração
168 rósea à superfície de corte, contendo áreas de necrose ou degeneração cística
169 e seu tamanho pode variar de 1 a 40 cm (CORLESS e HEINRICH, 2008; MORINI
170 et al., 2022) (Figura 1). O comportamento destes tumores é variável e há risco

171 de desenvolvimento de metástases para o fígado, omento, linfonodos
172 mesentéricos e cavidade peritoneal, conferindo prognóstico desfavorável ao
173 paciente (BETTINI et al., 2003; FROST et al., 2003; MAAS et al., 2007; RUSSEL
174 et al., 2007; GREGORY-BRYSON et al., 2010; HAYES et al., 2013).



175
176 **Figura 1.** Aspectos macroscópicos de GISTs. (a) jejuno; (b) duodeno; (c) íleo;
177 (d) ceco. Fonte: MORINI et al., 2022.

178

179 Histologicamente, os GISTs podem ser classificados em quatro tipos
180 tumorais: estoriforme ou fusiforme, mixoide, fascicular e epitelióide (Figura 2).
181 Tanto no homem como nos cães o tipo mais frequente é o fusiforme (MIETTINEN
182 e LASOTA, 2001; RIDDLE et al., 2003; MORINI et al., 2022). Este tipo é
183 morfológicamente caracterizado por faixas de células mesenquimais fusiformes,
184 entrelaçadas com fibras colágenas, e possuem núcleos alongados com formato
185 de charuto (MIETTINEN e LASOTA, 2001). Estas características são similares a
186 outras neoplasias fusocelulares e, dessa forma, os GISTs podem ser
187 confundidos com tumores da musculatura lisa ou schwannomas (STEIGEN e
188 EIDE, 2009; MORINI et al., 2011; HAYES et al., 2013).

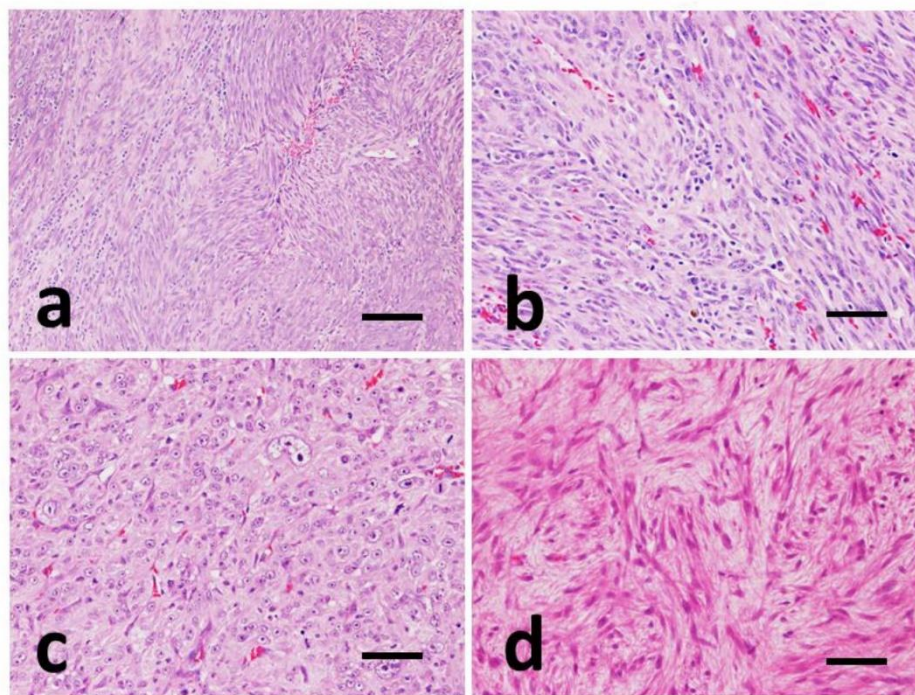


Figura 2. Aspectos microscópicos de GISTs. (a) estoriforme; (b) fascicular; (c) epiteliode; (d) mixode. Fonte: MORINI et al., 2022.

A descoberta de que a maioria dos GISTs apresenta mutação no gene *c-KIT* e expressão aumentada da proteína CD117 (KIT) revolucionou também o diagnóstico desses tumores (HIROTA et al., 1998). Maas et al. (2007) reclassificaram em GISTs 85% dos tumores caninos de seu estudo, anteriormente diagnosticados como leiomiomas ou leiomiossarcomas. Outro marcador descrito foi o DOG1 (*discovered on gastrointestinal stromal tumors protein 1*), que apresenta, segundo a literatura, maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico quando comparado ao CD117, uma vez que pode detectar os GISTs que são *c-KIT* negativos (LIEGL et al., 2009; HAYES et al., 2013; DAILEY et al., 2015; DEL ALCAZAR et al., 2021). Sendo assim, o uso de marcadores imuno-histoquímicos se faz necessário para o diagnóstico acurado dos GISTs tanto na medicina humana quanto na veterinária (HAYES et al., 2013).

Caracterizar o gene DOG1

Os fatores prognósticos e de potencial metastático descritos pela literatura são variáveis, entre eles: tamanho tumoral, localização, índice mitótico e a presença da mutação no gene *c-KIT* (FLETCHER et al., 2002; WONG et al.,

210 2003; MIETTINEN e LASOTA, 2005; MIETTINEN et al., 2006). Nos cães, Del
211 Alcazar et al. (2021) definiram o número de mitoses e as margens cirúrgicas
212 como importantes fatores prognósticos, associando maior risco de morte e
213 metástase nos casos com mais de **nove figuras de mitose**. Quantos campos?

214 O tratamento de eleição é a excisão cirúrgica, no entanto, a utilização de
215 terapia alvo com a utilização de inibidores dos receptores tirosina quinase (TKIs),
216 como o mesilato de imatinib (Gleevec), malato de sunitinib (Sutent) e fosfato de
217 toceranib (Palladia) já são realidades no tratamento de GISTs em humanos
218 (FROST et al., 2003; FOO et al., 2012; HAYES et al., 2013; DAILEY et al., 2015).

219 Entretanto, na medicina veterinária, os estudos com o uso de TKIs para o
220 tratamento dos GISTs ainda são incipientes (WITHROW et al., 2013). Nos
221 últimos anos, o mesilato de imatinib (Gleevec) e o fosfato de toceranib (Palladia)
222 foram avaliados no tratamento de GISTs em cães e apresentaram resultados
223 promissores (KOBAYASHI et al., 2013; IRIE et al., 2015; ELLIOTT et al., 2017;
224 BERGER et al., 2018). Treggiari et al. (2023) relataram o tratamento cirúrgico e
225 quimioterápico com mesilato de imatinib para doença residual, metastática ou
226 recorrente, em três cães com GIST. Dois cães apresentavam tumores gástricos
227 e no terceiro animal, o GIST se localizava no ceco. O diagnóstico foi confirmado
228 por exame histopatológico, imuno-histoquímica e mutação do *c-KIT*, sendo que
229 somente um dos casos apresentava mutação neste gene. Os autores
230 observaram resposta favorável, com doença estável e sem evidências de
231 recorrência, abrindo novas perspectivas para o uso desse inibidor tirosina
232 quinase em cães.

233 A identificação de GISTs sem mutações no gene *c-KIT* e,
234 consequentemente, resistentes aos inibidores dos receptores tirosina quinase,
235 representa um desafio na medicina humana, uma vez que estes tumores
236 apresentam características biológicas distintas (BOIKOS et al., 2016). Estão
237 frequentemente associados a mutações com perda da função nas subunidades
238 do complexo succinato desidrogenase *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* e *SDHD*,
239 recebendo, nestes casos, o nome de GIST tipo selvagem (BRČIĆ et al., 2021).
240 Ainda, há relatos que associam a ocorrência dos GISTs com síndromes como a
241 neurofibromatose tipo 1, conhecida também como doença de von
242 Recklinghausen, GISTs familiares, tríade de Carney e síndrome de Carney-
243 Stratakis (GUPTA e RATERIA, 2020; BRČIĆ et al., 2021).

244

245 A expressão gênica global é uma importante ferramenta que permite a
246 compreensão das bases moleculares do câncer, além de fornecer informações
247 valiosas para a identificação de biomarcadores, diagnóstico acurado e para o
248 desenvolvimento de terapias mais eficazes e personalizadas (VARALLO et al.,
249 2019; KIM et al., 2020). Na medicina humana, esta abordagem já foi realizada
250 no estudo de neoplasias de mama, prostáticas, osteossarcomas, linfomas, entre
251 outros (VARALLO et al., 2019). Na veterinária, o estudo do perfil de expressão
252 gênica também já foi empregado em diversos estudos. Morris (2016) realizou um
253 levantamento de estudos com esta abordagem em diversos tipos de tumores em
254 cães (Tabela 1). No entanto, na literatura consultada, não foram encontrados
255 dados de expressão gênica nos GISTs caninos, sendo este um estudo inédito.

256 Avanços recentes na área da bioinformática têm permitido o
257 desenvolvimento de novas ferramentas e abordagens para identificação de
258 novos fármacos ou compostos terapêuticos, como o LINCS L1000FWD (*Library*
259 *of Integrated Network-Based Cellular Signatures L1000 Fireworks Display*)
260 (PUSHPAKOM et al., 2019). Essa ferramenta permite a descoberta de fármacos
261 aprovados pelo US FDA (*United States Food and Drug Administration*) com base
262 na análise comparativa de assinaturas gênicas.

263 O LINCS L1000FWD possui um vasto conjunto de dados de expressão
264 gênica coletados por meio de tecnologias como microarranjos de DNA e
265 sequenciamento de RNA e permite a identificação de compostos químicos
266 candidatos com perfis de expressão gênica semelhantes aos de fármacos já
267 conhecidos e aprovados ou doenças específicas, permitindo o desenvolvimento
268 de estratégias terapêuticas mais especializadas (WANG et al., 2018), como no
269 caso dos GISTs sem mutação no gene *c-KIT*.

270 **Tabela 1.** Estudos que analisaram o perfil global de expressão gênica em tumores caninos (Morris, 2016 – adaptação).

Tipo do tumor	Plataforma	Referências
Linfoma	Microarray Canine Genome 2.0 (Affymetrix)	Frantz et al. (2013); Richards et al. (2013); Mudaliar et al. (2013)
Neoplasia mamária	Microarray Dog specific cDNA	Rao et al. (2009); Pawlowski et al.(2013b, 2013c)
	Microarray Oligo-microarray (Agilent Technologies)	Pawlowski et al. (2013a)
	Microarray Canine Genome 2.0 GeneChip (Affymetrix)	Klopfleisch et al. (2010b)
	Microarray Canine Genome 2.0 GeneChip (Affymetrix)	Klopfleisch et al. (2011)
	NGS (Illumina)	Liu et al. (2014)
	Microarray Canine Genome 2.0 GeneChip (Affymetrix)	Wensman et al. (2009)
Sarcoma de tecidos moles	Microarray Canine Genome 2.0 GeneChip (Affymetrix)	Klopfleisch et al. (2013)
Sarcoma histiocítico	Microarray Canine Gene Expression V1 (Agilent Technologies)	Boerkamp et al. (2013)
	Microarray Canine Gene Expression V1 (Agilent Technologies)	Boerkamp et al. (2014)
Hemangiossarcoma	Microarray Canine Genome 2.0 GeneChip (Affymetrix)	Tamburini et al. (2010)
	Microarray Canine Gene Expression (Agilent Technologies) e NGS (Illumina)	Gorden et al. (2014)
Osteossarcoma	Microarray Canine Genome v1.0 e Human Genome U133A (Affymetrix)	Paoloni et al. (2009)
	Microarray Dog specific cDNA	Selvarajah et al. (2009)
	Microarray Canine Genome 2.0 GeneChip (Affymetrix)	Scott et al. (2011)
Mastocitoma	Microarray Canine Gene Expression V2 (Agilent Technologies)	Giantin et al. (2014)

271 3. OBJETIVOS

272

273 **Geral:** Avaliar o perfil de expressão gênica global de tumores do estroma
274 gastrointestinal canino;

275

276 **Específicos:** 1) Avaliar os genes diferencialmente expressos com expressão
277 aumentada e diminuída nos tumores do estroma gastrointestinal comparado ao
278 tecido intestinal normal; 2) Comparar a assinatura de expressão gênica dos
279 GISTs com os perfis de expressão gênica reversa induzidos por drogas
280 presentes no banco de dados da plataforma LINCS L1000FWD para
281 identificação de novos alvos terapêuticos.

282

283 4. MATERIAIS E MÉTODOS

284

285 4.1 Comitê de Ética e Uso dos Animais (CEUA)

286

287 O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais
288 (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, protocolo de número 0183/2020.

289

290 4.2 Amostras

291

292 Foram avaliadas sete amostras de tumor gastrointestinal canino (GIST)
293 fixados em formalina e embebidos em parafina (*FFPE*), cedidas pelo Laboratório
294 VetMol, Consultoria e Diagnóstico em Patologia Molecular Veterinária e
295 Pesquisa, Botucatu – SP. Cinco amostras de tecido intestinal sem alterações,
296 coletadas de diferentes segmentos (intestino delgado e grosso), foram obtidas
297 de cães encaminhados para necropsia em até 4 horas *post mortem*, no Serviço
298 de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
299 Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Após a colheita, estas amostras
300 foram fixadas em formol tamponado a 10% durante 24 horas e processadas para
301 inclusão em blocos de parafina.

302 Todas as amostras tumorais tiveram o diagnóstico histopatológico
303 confirmado como GIST por painel imuno-histoquímico, de acordo com protocolo

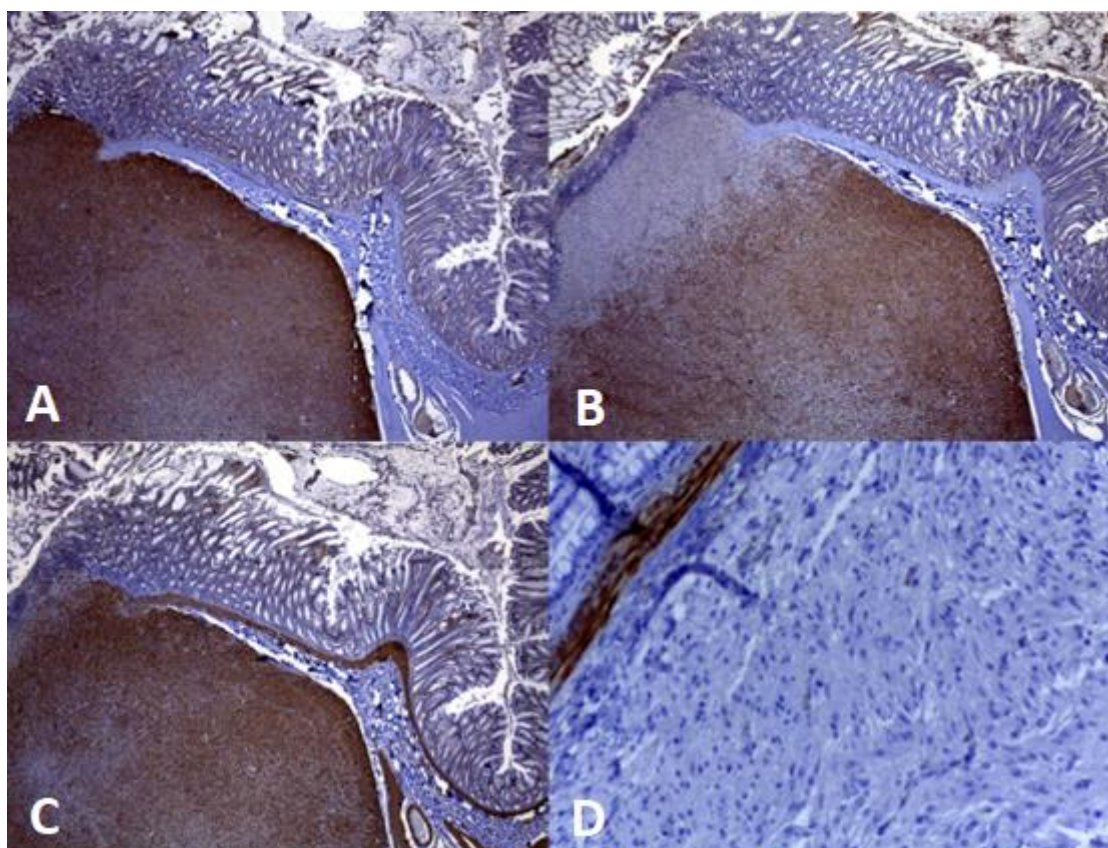
do Laboratório VetMol (Tabela 2), com marcação positiva para DOG1, CD117 (KIT) e α -SMA e negativa para DESM (Figura 3).

Dados epidemiológicos como raça, idade, sexo, tamanho e localização tumorais foram obtidos a partir das requisições do exame histopatológico, quando disponíveis.

Tabela 2. Especificação dos anticorpos primários utilizados na imunofenotipagem das amostras selecionadas para expressão gênica global.

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição	Recuperação	Tempo de incubação	Secundário	Cromógeno
DOG1	Cell Marque, Rocklin, CA	SP31	1:300	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB
CD117	Dako, Glostrup, Denmark	CD117Pol	1:400	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB
Smooth Muscle Actin	Dako, Glostrup, Denmark	IA4	1:1000	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB
Desmin	Dako, Glostrup, Denmark	D33	1:50	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB

313



314

315 **Figura 3.** IHQ. Marcação positiva das células tumorais para os anticorpos DOG1
316 (A), CD117 (B) e α-SMA (C) (40x) e negativa para DESM (D) (40x). DAB,
317 Hematoxilina de Harris.

318

319 4.3 Extração de RNA

320

321 As amostras tumorais e normais *FFPE* foram cortadas em cinco lâminas
322 não coradas de 10 µm de espessura. As regiões ricas em tecido neoplásico
323 foram macrodissecadas dos cortes histológicos com o uso de agulha estéril de
324 16G e com uma lâmina corada por HE como guia. As amostras de intestino sem
325 alterações foram macrodissecadas em sua totalidade. Posteriormente, estes
326 materiais foram submetidos à extração de *RNA* utilizando-se o *RecoverAll™*
327 *Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Ambion, CA, EUA) de acordo com o protocolo
328 estabelecido pelo fabricante. A quantificação foi realizada por meio do
329 espectrofotômetro *Nanodrop™* (ND-8000, *Thermo Scientific*) com padrões de
330 qualidade 260/280 e 260/230 aceitáveis.

4.4 Expressão gênica global

Foram utilizados 20 ng de RNA total extraído das amostras tumorais e normais. A síntese, amplificação e a marcação do DNA complementar (cDNA) seguiram os protocolos do fabricante (*SensationPlus™ FFPE Amplification and WT Labeling*, Thermo Fisher Scientific). Para a hibridização foi utilizado o *GeneChip® 1.0 ST Array* (Santa Clara, CA, EUA) para a espécie canina. Os *CanGene* foram lavados na *Thermo Fisher Scientific Fluidics Station 450*, escaneados pelo *GeneChip Scanner 7000* e os dados obtidos foram normalizados (algoritmo *Robust Multiarray Analysis*) com o software *Gene Expression Console* (Thermo Fisher Scientific) e, posteriormente, analisados por meio do software *Transcriptome Analysis Console 4.0.2.15* (Thermo Fisher Scientific). Para a seleção dos genes diferencialmente expressos foram usados os seguintes parâmetros: *fold change* (FC) < -2,0 e > 2,0 e $p < 0,05$. A clusterização hierárquica e a análise de componente principal foram geradas pelo software *Transcriptome Analysis Console 4.0.2.15* (Thermo Fisher Scientific) no dia nove de junho de 2023.

4.5 Enriquecimento

Os genes diferencialmente expressos entre os GISTs e intestinos normais foram enriquecidos utilizando o software *EnrichR* (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) e organizados e visualizados de acordo com a ontologia gênica (processos biológicos e funções moleculares), utilizando *Revigo* (<http://revigo.irb.hr>). Para a avaliação da interação proteica, foi utilizada a ferramenta online *STRING* (<https://string-db.org/>), considerando interações de alta confiança (0,700) e as seguintes fontes de interações ativas: *databases*, *coexpression*, *neighborhood* e *cooccurrence*.

4.6 Identificação de drogas a partir da assinatura de expressão gênica reversa dos GISTs

Os genes diferencialmente expressos nos GISTs com expressão aumentada e diminuída foram selecionados ($p < 0,02$ e maiores valores de FC) a partir da análise de ontologia gênica para o rastreamento de alvos terapêuticos utilizando a plataforma LINCS L1000FWD (<http://amp.pharm.mssm.edu/L1000FWD>). O perfil de expressão gênica dos GISTs foi comparado com o banco de dados de assinaturas gênicas induzidas por drogas da própria plataforma, utilizando como critério o atributo de mecanismo de ação (MOA) com probabilidade $\geq 50\%$.

5. RESULTADOS

5.1 Dados epidemiológicos

As características clínicas e histopatológicas das amostras tumorais selecionadas estão descritas na Tabela 3. A maioria das amostras foram obtidas de cães de pequeno porte (6/7 = 85,7%) e com idade superior a 10 anos (5/7 = 71,4%), sendo que uma amostra não tinha o dado de idade disponível. O segmento intestinal acometido pela neoplasia não foi especificado em quatro amostras.

Tabela 3. Características clínicas e macroscópica das amostras de GIST incluídas no estudo (n=7).

Amostra	Raça	Sexo	Idade (anos)	Local	Tamanho (mm)
G2	Dachshund	Macho	7	Intestino	Não informado
G3	Poodle	Fêmea	11	Intestino	46x27x25
G7	Cocker	Fêmea	13	Intestino (ceco)	Não informado
G16	Poodle	Fêmea	14	Intestino	20x18x12
G18	Yorkshire	Macho	12	Intestino (duodeno)	26x19x12
G22	Golden	Macho	10	Intestino	47x37x30
G23	Poodle	Macho	-	Intestino (cecocólica)	27x19x18

387 5.2 Avaliação do perfil de expressão gênica global

388

389 Os GISTs revelaram 361 genes diferencialmente expressos descritos na
390 literatura, sendo 109 com expressão aumentada e 252 com expressão diminuída
391 (Tabela 1 - Anexo).

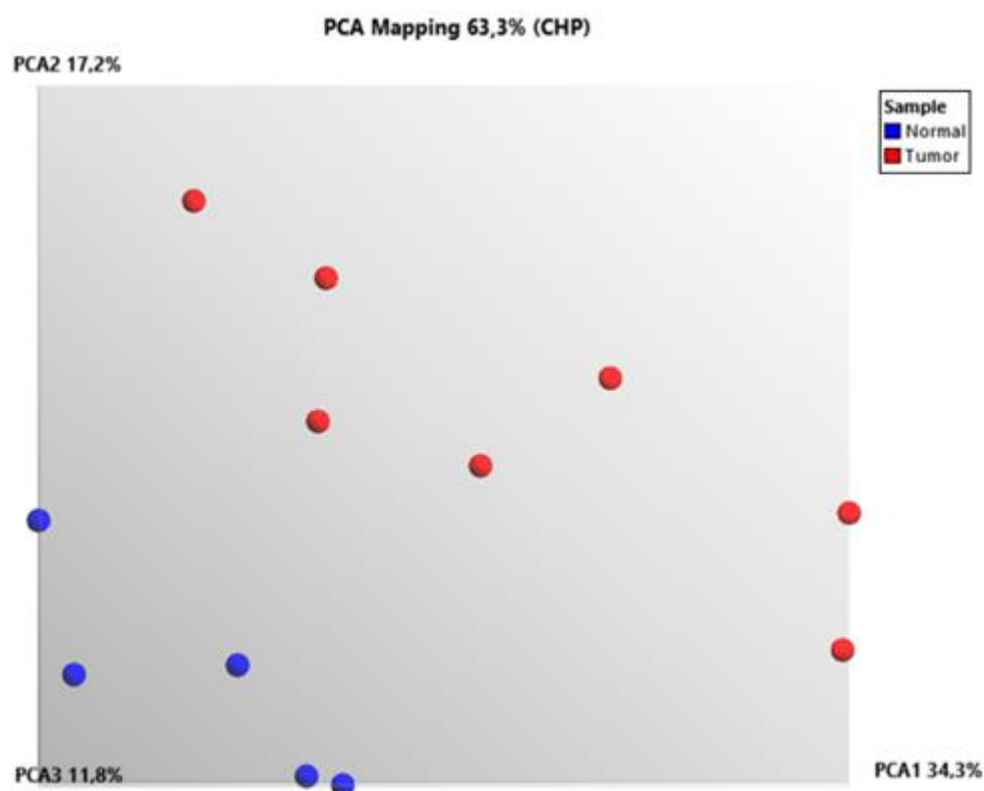
392

393 5.2.1 Análise de Componente Principal (*Principal Component Analysis*, 394 *PCA*)

395

396 A análise de *PCA* mostrou dois agrupamentos distintos que separam
397 totalmente os tumores dos tecidos normais, indicando perfis de expressão de
398 transcritos distintos em cada grupo (Figura 4).

399



400 **Figura 4.** Gráfico da *PCA* representando o agrupamento das amostras de GISTs
401 e de tecidos normais segundo o perfil de expressão gênica global.

402

403

404

5.2.2 Análise do transcriptoma

Semelhante ao observado na *PCA*, a análise de clusterização hierárquica mostrou dois grupos principais, sendo um grupo composto por todas as amostras dos GISTs e o outro pelos tecidos normais (Figura 5). ALTERAR

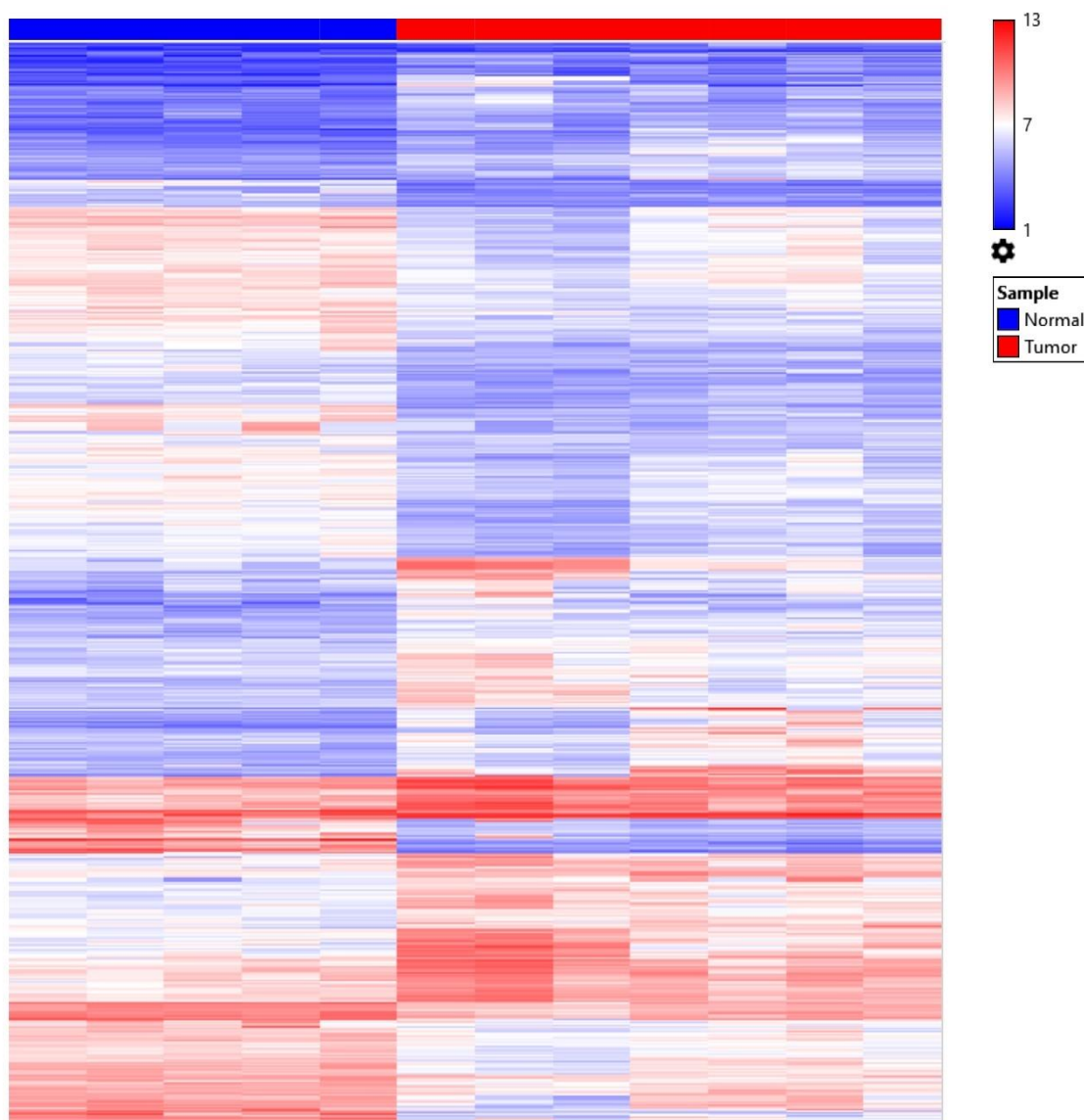


Figura 5. Análise de clusterização hierárquica dos dados de expressão gênica global entre amostras de GIST caninos e tecidos normais.

O gene *FABP1* (*fatty acid binding protein*) foi detectado com o maior *fold change* (FC=12,23) e o gene *GKN1* (*gastrokine 1*) apresentou o menor valor de FC (FC=-116,4). Os 10 genes com maiores e menores expressões nos tumores em relação aos tecidos normais estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos entre os tumores e os tecidos normais com expressão aumentada e maiores valores de *fold change*.

Gene	Descrição	<i>Fold change</i>	Valor de <i>p</i>
FABP1	fatty acid binding protein 1, liver	12,23	0,0172
LOC102151306	mucin-2-like	10,27	0,0046
SI	sucrase-isomaltase (alpha-glucosidase)	7,96	0,0306
CLCA4	chloride channel accessory 4	5,83	0,0242
ZG16	zymogen granule protein 16	5,62	0,0201
SI	sucrase-isomaltase (alpha-glucosidase)	5,37	0,0186
ENPEP	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)	5,18	0,0105
FAM198B	family with sequence similarity 198, member B	5,11	0,0028
MUC17	mucin 17, cell surface associated	4,95	0,0154
SPINK4	serine peptidase inhibitor, Kazal type 4	4,48	0,0108

Tabela 5. Genes diferencialmente expressos entre os tumores e os tecidos normais com expressão diminuída e maiores valores de *fold change*.

Gene	Descrição	<i>Fold change</i>	Valor de <i>p</i>
GKN1	gastrokine 1	-116,4	0,001
GKN2	gastrokine 2	-108,28	0,0006
LOC611675	pepsin B-like	-97,28	0,0003
PGA	pepsinogen 5, group I (pepsinogen A)	-94,63	0,0003
PGB	progastricsin (pepsinogen C)	-84,88	0,0004
LIPF	lipase, gastric	-75,22	0,0029
ANXA10	annexin A10	-38,53	0,0003
TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	-33,91	0,0034
GP2	glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	-29,37	0,0151
PIK3C2G	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 gamma	-29,16	0,0005

5.2.3 Análise da ontologia gênica

A análise da ontologia gênica pelo *software* EnrichR revelou os processos biológicos e funções moleculares associados aos genes diferencialmente

expressos nos GISTs com expressão aumentada e diminuída (Figuras 6, 7, 8 e 9).

Após a utilização do *software* REVIGO para melhor visualização dos termos enriquecidos obtidos pelo EnrichR, os processos biológicos destacados entre os genes diferencialmente expressos com expressão aumentada e diminuída foram, respectivamente, regulação da migração celular e regulação da proliferação da população celular (Figuras 10 e 11). Já as funções moleculares que se destacaram foram ligação da proteína quinase B e ativação da proteína tirosina quinase nos genes com expressão aumentada e diminuída, respectivamente (Figuras 12 e 13).

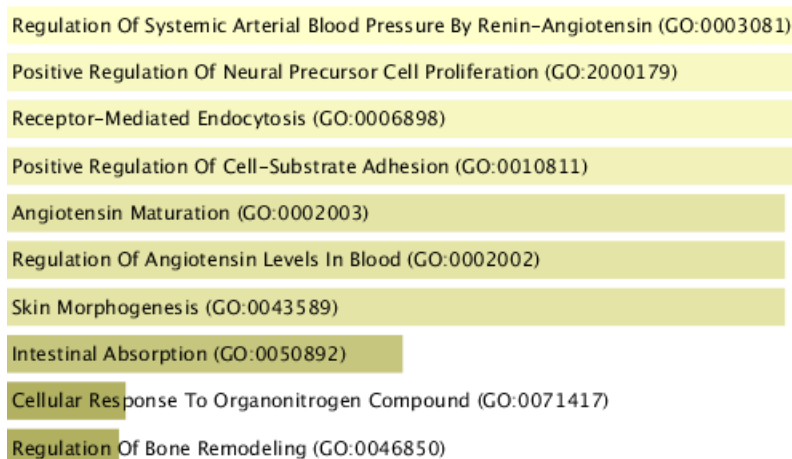


Figura 6. Ontologia gênica (processos biológicos) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão aumentada ($p < 0,05$). Gráfico de barras gerado pelo *software* EnrichR.

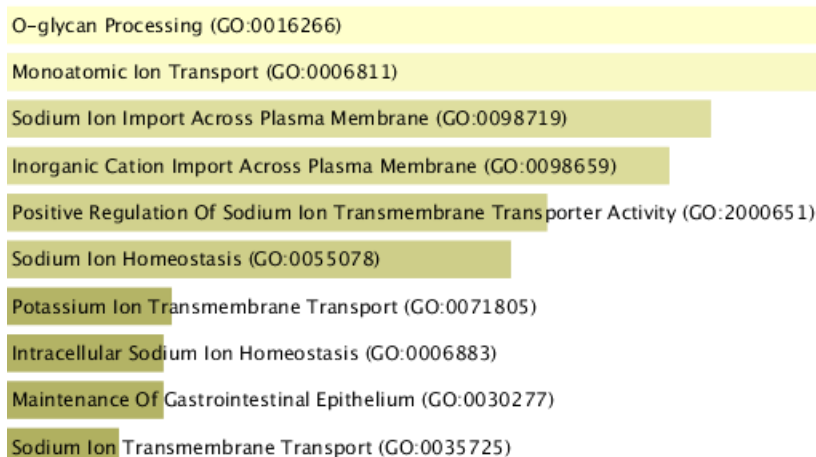


Figura 7. Ontologia gênica (processos biológicos) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão diminuída ($p < 0,05$). Gráfico de barras gerado pelo *software* EnrichR.

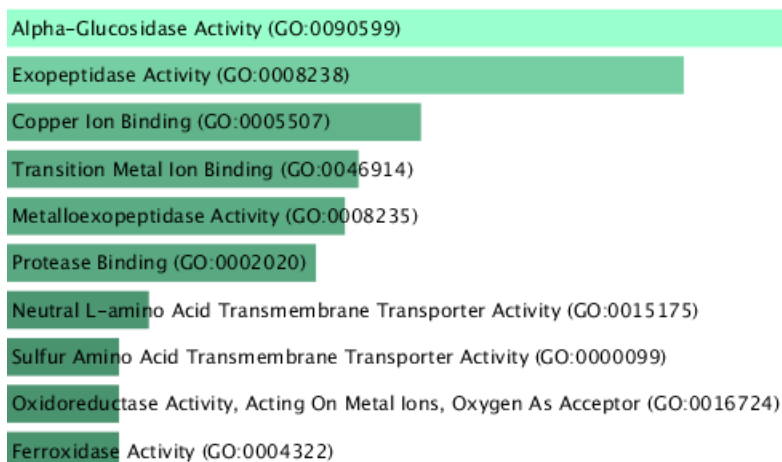


Figura 8. Ontologia gênica (funções moleculares) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão aumentada ($p < 0,05$). Gráfico de barras gerado pelo *software* EnrichR.

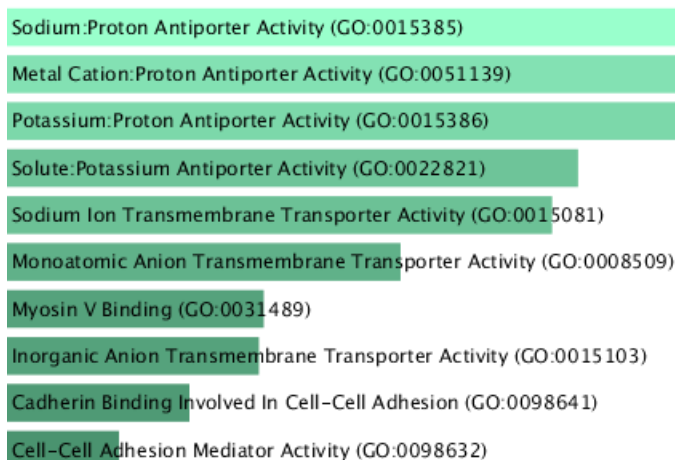


Figura 9. Ontologia gênica (funções moleculares) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão diminuída ($p < 0,05$). Gráfico de barras gerado pelo *software* EnrichR.

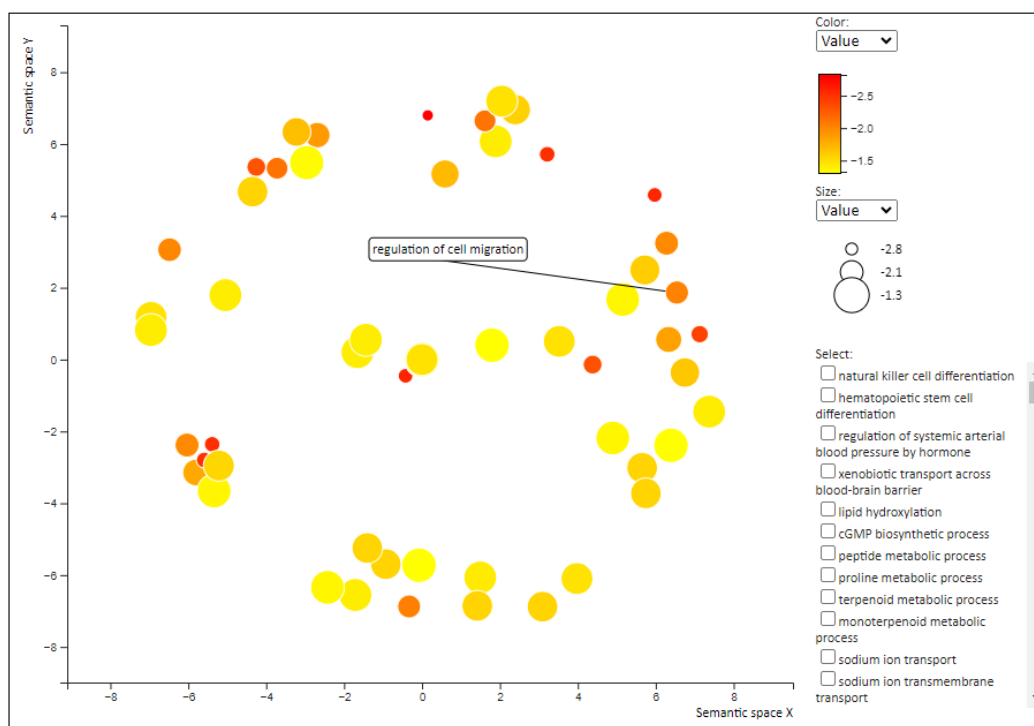


Figura 10. Ontologia gênica (processos biológicos) dos genes diferentemente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão aumentada ($p < 0,05$). Gráfico gerado pelo *software* REVIGO.

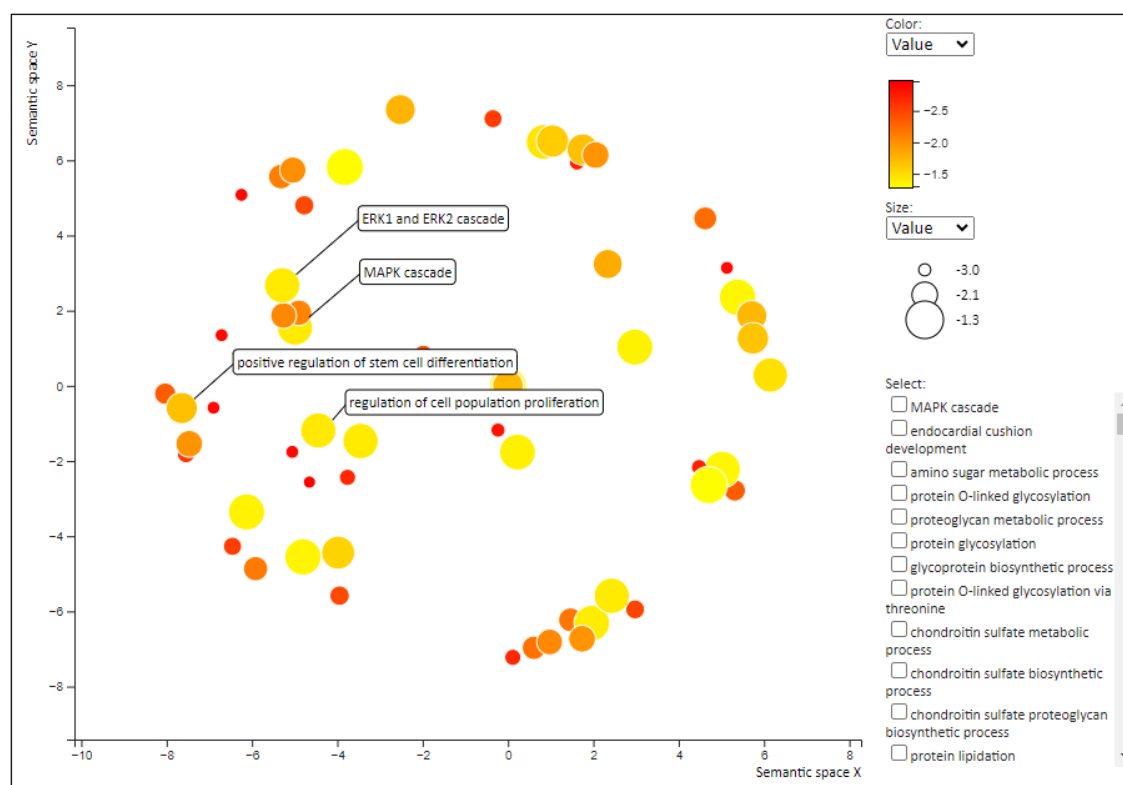


Figura 11. Ontologia gênica (processos biológicos) dos genes diferentemente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão diminuída ($p < 0,05$). Gráfico gerado pelo *software* REVIGO.

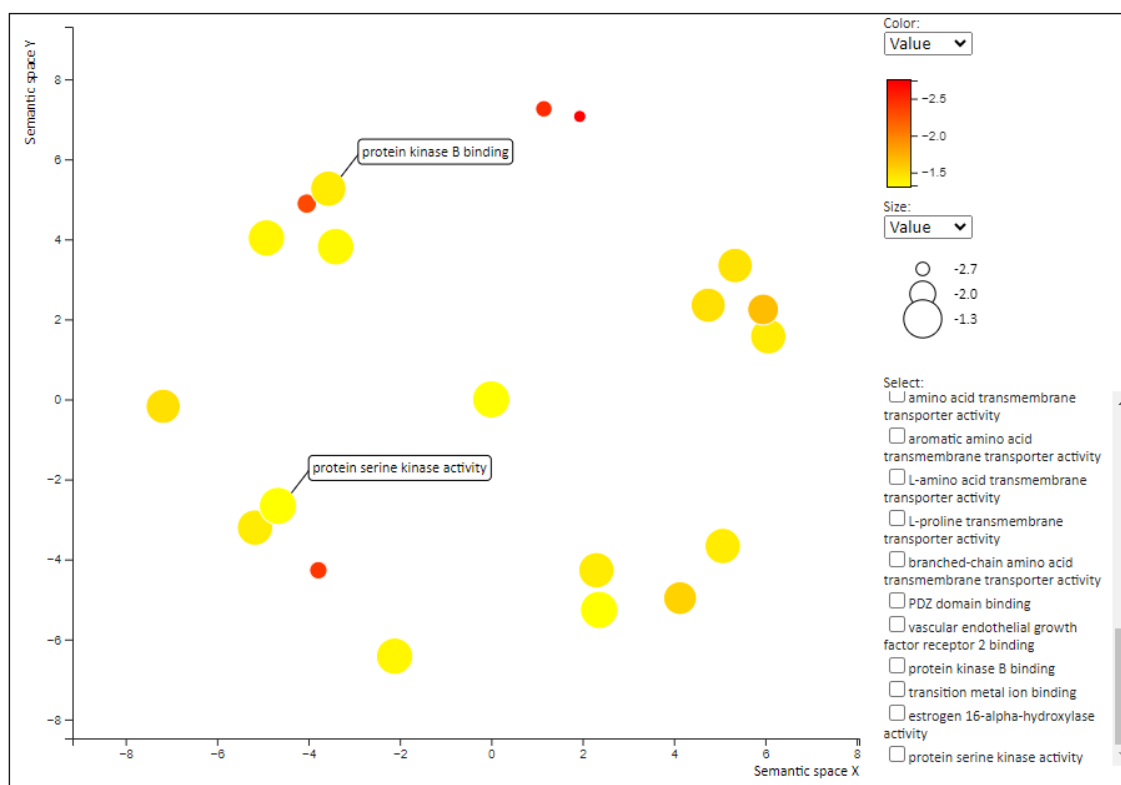


Figura 12. Ontologia gênica (funções moleculares) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão aumentada ($p < 0,05$). Gráfico gerado pelo software REVIGO.

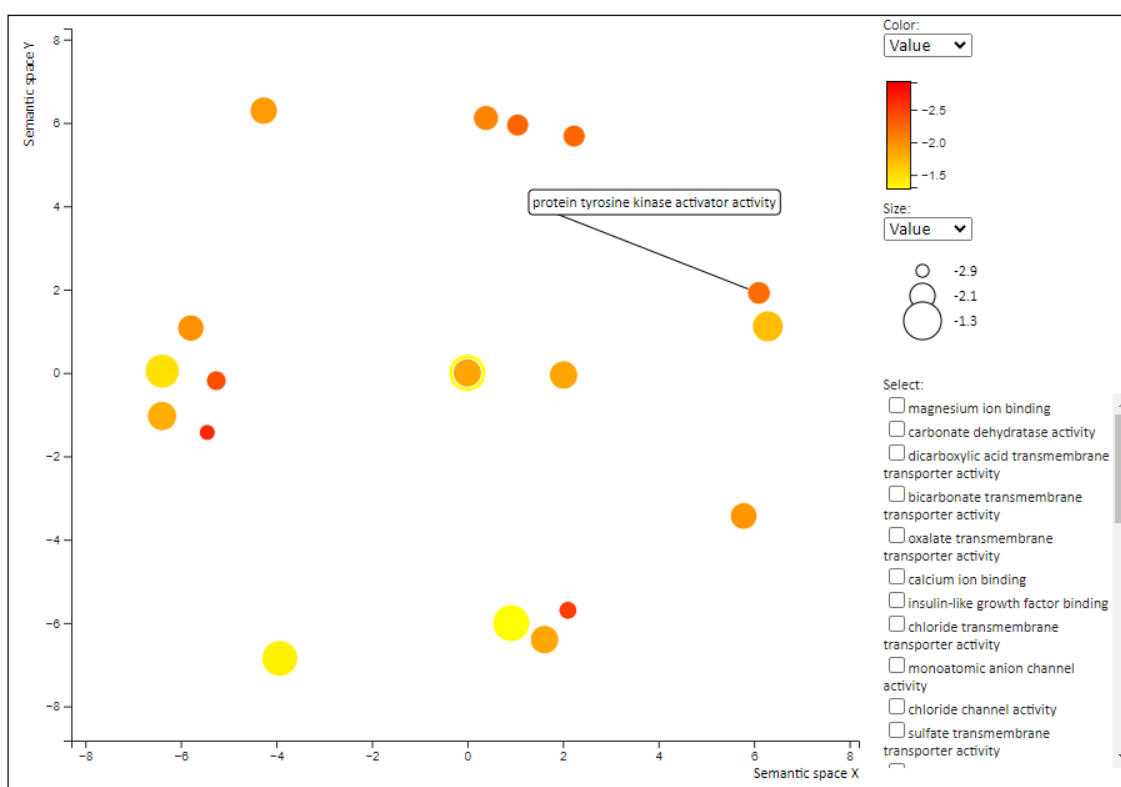


Figura 13. Ontologia gênica (funções moleculares) dos genes diferencialmente expressos entre GISTs e tecidos normais com expressão diminuída ($p < 0,05$). Gráfico gerado pelo software REVIGO.

5.2.4 Análise da interação proteína-proteína

A análise da interação proteína-proteína foi realizada com os genes diferencialmente expressos com expressões aumentada e diminuída entre os tumores e o grupo controle. A análise revelou 76 nodos e 8 interações nos genes com expressão aumentada (Figura 14) e 249 nodos e 42 interações nos genes com expressão diminuída (Figura 15).

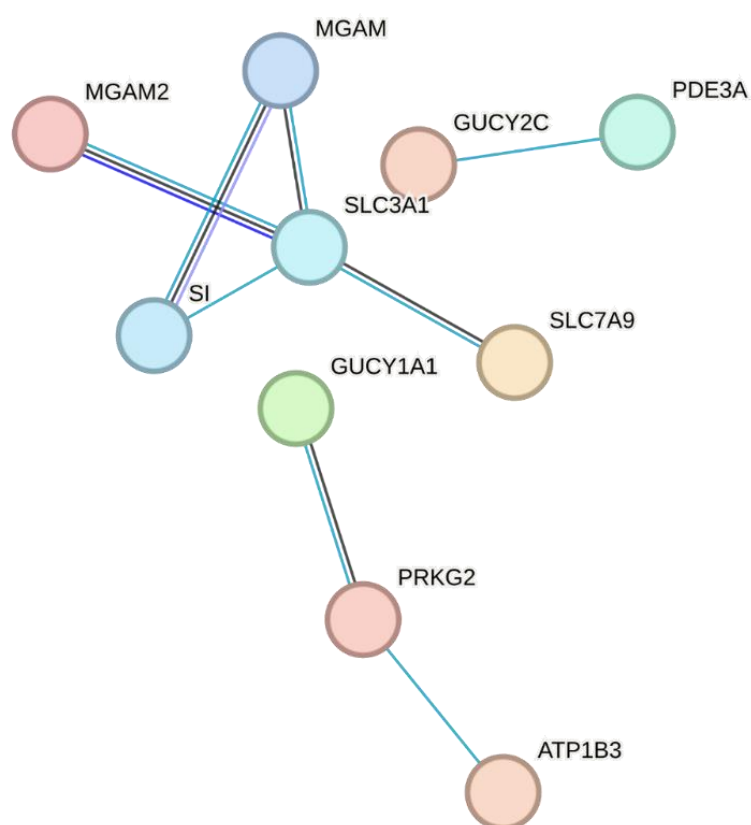
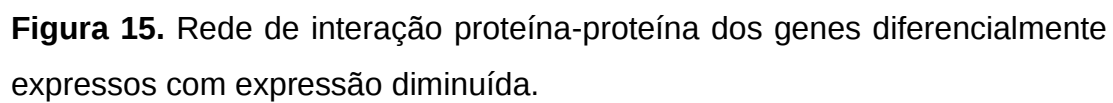


Figura 14. Rede de interação proteína-proteína dos genes diferencialmente expressos com expressão aumentada.



5.3 Identificação de drogas a partir da assinatura de expressão gênica reversa dos GISTs

A comparação do perfil de expressão gênica dos genes diferencialmente expressos nos GISTs com o banco de dados de assinaturas gênicas induzidas por drogas da plataforma LINCS L1000FWD revelou a existência de 16 drogas e/ou compostos terapêuticos com os critérios adotados (Tabela 6), sendo os agonistas de receptor de glicocorticóides os que apresentaram mecanismo de ação mais frequente.

Tabela 6. Drogas e compostos terapêuticos identificados pela plataforma LINCS L1000FWD e seus mecanismos de ação.

Droga	Mecanismo de ação	Probabilidade
Fludrocortisona	Agonista do receptor de glicocorticóide	0,9954
Halometasona	Agonista do receptor de glicocorticóide	0,9949
Ciclohexamida	Inibidor da síntese protéica	0,9921
Equilino	Antagonista do receptor de estrógeno	0,9859
Medrisona	Agonista do receptor de glicocorticóide	0,9794
SA-1478088	Inibidor HDAC	0,9772
Sinvastatina	Agonista do receptor de glicocorticóide	0,9553
Purvalanol-A	Inibidor CDK	0,9518
Epinefrina	Antagonista do receptor adrenérgico	0,9372
Mometasona	Agonista do receptor de glicocorticóide	0,8178
10-DEBC	Antagonista do receptor de dopamina	0,7995
CGP-60474	Inibidor CDK	0,797
F-1566-0341	Inibidor RAF	0,6672
Clorprotixeno	Antagonista do receptor de histamina	0,6082
BRD-A94567954	Antagonista do receptor adrenérgico	0,6
BRD-K08307026	Inibidor HDAC	0,5073

6. DISCUSSÃO

Reconhecer que o fator limitante foi utilizar as amostras normais integralmente.

A compreensão do perfil de expressão gênica dos GISTs caninos é inédita na literatura consultada, sendo fundamental para identificar alvos moleculares potenciais e desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes, principalmente no caso dos tumores que não apresentam mutação no gene *c-KIT* (BRČIĆ et al., 2021). A similaridade da biologia tumoral permite que os cães sejam utilizados em estudos translacionais para o entendimento dos GISTs na espécie humana (KLOSOWSKI et al., 2023). Detalhar mais.

Neste estudo foram empregadas técnicas moleculares de expressão gênica em larga escala para identificação de genes diferencialmente expressos nos GISTs utilizando *softwares* como *Transcriptome Analysis Console 3.0*, *EnrichR*, *Revigo* e *STRING*. Recentemente, o uso *in silico* de *softwares* permitiu o avanço do conhecimento científico com necessidades cada vez menores de experimentos extensivos *in vitro* e *in vivo* (PUSHPAKOM et al., 2019).

O enriquecimento dos genes diferencialmente expressos nos GISTs pelo *software* EnrichR revela processos biológicos e funções moleculares envolvidos, principalmente, no transporte de moléculas e íons. As proteínas transportadoras de íons estão relacionadas com o processo carcinogênico desde a iniciação até a metástase, envolvendo diferentes funções como trocas, bombeamento e receptores celulares e de membrana, que atuam de forma dinâmica (DJAMGOZ, 2022).

Após a otimização dos termos pelo *software* Revigo, foram identificados processos biológicos e funções moleculares mais relacionados à tumorigênese, tais como a regulação da migração celular e proliferação da população celular. A ativação normal dos receptores da tirosina quinase está relacionada com funções fisiológicas como sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação celular (vias Ras-Raf-Mek-Erk, PI-3K-AKT e Rho-Rac-JNK). Além disso, o KIT é essencial para diferenciação e proliferação das células intersticiais de Cajal no intestino (CANDELARIA et al., 2005). Portanto, os resultados sugerem que os

processos encontrados nos GISTs possam desempenhar papel importante em sua patogênese (HANAHAHAN, 2022). Retirar frases vagas

Tanto em humanos como em cães, a maioria dos GISTs apresenta mutação no gene *c-KIT* e possuem a expressão da proteína codificada por ele (CD117), além da expressão da proteína DOG1, codificada pelo gene *ANO1* (HIROTA et al., 1998; LIEGL et al., 2009). No entanto, neste estudo, apesar dos genes *c-KIT* e *ANO1* terem sido diferencialmente expressos nos GISTs, eles não atenderam aos critérios adotados (*fold change* = -1,14 e *p* = 0,1 para *c-KIT* e *fold change* = 1,2 e *p* = 0,08 para *ANO1*). As proteínas utilizadas no diagnóstico imuno-histoquímico não são exclusivas do tecido tumoral, e por isso os resultados dos genes diferencialmente expressos podem não ser significativos.

O gene com maior valor de *fold change* expresso nos GISTs foi o *FABP1* (*fatty acid binding protein 1*), responsável por codificar uma proteína presente em diversos tipos celulares, inclusive células intestinais, cuja função é o metabolismo lipídico, além de proteção contra o estresse oxidativo (WANG et al., 2015). Este gene já foi relacionado ao desenvolvimento de diversas enfermidades hepáticas, além de tumores pancreáticos e colorretais (SHARAF et al., 2011; ZHANG et al., 2019).

Em um estudo experimental “*in vivo*” em modelo murino, demonstrou-se o papel do aumento de expressão de *FABP1* no desenvolvimento de câncer intestinal, uma vez que a proteína FABP1 forma canais lipídicos que alimentam o crescimento tumoral. Ainda, a ablação genética de FABP1 protege a tumorigênese no intestino delgado (ABBASI et al., 2020). Nossos achados vão ao encontro em relação ao aumento de expressão de *FABP1* e desenvolvimento de câncer intestinal em cães.

CARACTERIZAR MELHOR OS DEGS

O gene com menor valor de *fold change* expresso foi o *GKN1* (*gastrokine 1*), que atua como supressor tumoral nos cânceres gástricos e é responsável por codificar uma proteína cuja função é a proteção da mucosa gástrica (YOON et al., 2011). Alarcon-Millan et al. (2019) revisaram a literatura disponível sobre o papel do GKN1 no câncer gástrico, concluindo que a diminuição ou ausência de expressão dessa proteína é importante no carcinoma gástrico, tanto em

582 pacientes humanos com ou sem *H. pylori*. Os mecanismos envolvidos com a
583 menor expressão de GNK1 não estão elucidados, porém descrevem o controle
584 pós-transcricional por alguns mi-RNAs (miR544a, miR548d-3p, miR1245b-3p e
585 miR892c-5p), mecanismos de metilação e fatores de transcrição como NKX6.3.

586 A análise de interação proteína-proteína revelou uma rede complexa de
587 interações entre as proteínas codificadas pelos genes diferencialmente
588 expressos entre os GISTs e o grupo controle. Essas interações fornecem dados
589 importantes para pesquisas futuras com objetivo de desenvolvimento de
590 estratégias terapêuticas mais direcionadas (SKWARCZYNSKA e OTTMANN,
591 2015).

592 O reposicionamento de drogas é uma abordagem que permite que alguns
593 fármacos usados originalmente para outras condições clínicas sejam
594 investigados quanto ao seu potencial para o tratamento do câncer (CARVALHO
595 et al., 2021). A identificação de 361 genes diferencialmente expressos no
596 presente estudo possibilitou a comparação do perfil de expressão gênica dos
597 GISTs com o banco de dados de assinaturas gênicas induzidas por drogas ou
598 compostos terapêuticos já conhecidos da plataforma LINCS L1000FWD.

599 Buscar literatura, elaborar mais, sugerir mecanismo dessas drogas no
600 gist, A comparação revelou a existência de 16 compostos candidatos, sendo os
601 agonistas do receptor de glicocorticóides (fludrocortisona, halometasona,
602 medrisona, sinvastatina e mometasona) os que apresentaram mecanismo de
603 ação mais frequente, sugerindo que essa classe de drogas possa ter potencial
604 terapêutico no tratamento de GISTs caninos a partir da reversão da assinatura
605 gênica destes tumores.

606 De acordo com Chahal et al. (2018), a Fludrocortisona pode ser
607 empregada como terapia adjuvante no tratamento de cânceres causados pela
608 desregulação da via Hedgehog (Hh) como o câncer colorretal. Winter et al.
609 (2008) descreveram a Mometasona como um inibidor da proteína que causa
610 resistência a múltiplas drogas (MDR-1, também conhecida como glicoproteína P
611 ou ABCB1) servindo como adjuvante ao aumentar a eficácia da quimioterapia.
612 Duarte et al. (2021) revisaram a literatura e encontraram diversos estudos que

613 descrevem as propriedades da Sinvastatina, como o controle do crescimento
614 tumoral, uma vez que esta droga é capaz de modular a proliferação e apoptose.

615 Já no grupo dos inibidores das histonas desacetilases (HDACi), o SA-
616 1478088, também conhecido como metaloprotease, foi encontrado como
617 possível fármaco para o tratamento do GIST, a semelhança do que já foi descrito
618 por Li e Seto (2016) como opção para o tratamento de câncer gástrico e
619 colorretal.

620 As quinases dependentes de ciclina (CDKs) são proteínas quinases que
621 estão envolvidas no ciclo celular, bem como na regulação da transcrição, sendo
622 assim, alterações nos genes que as codificam estão relacionadas ao
623 desenvolvimento de diversas neoplasias, incluindo orais e esofágicas. O
624 Purvalanol A é um dos inibidores específicos das CDKs (CDK2, CDK4 e CDK5)
625 e, de acordo com Coker-Gurkan et al. (2014), pode induzir a apoptose das
626 células neoplásicas de câncer de cólon.

627 Outro grupo de fármacos encontrado como possível alternativa para o
628 tratamento de GISTs neste estudo foi o dos antagonistas dos receptores
629 adrenérgicos. Em seus estudos, Kraboth e Kalman (2023) e Moreno-Smith et al.
630 (2010) relacionaram a tumorigênese, angiogênese e metástase de neoplasias
631 (ovário, próstata, mama e pulmão) ao estresse crônico e a ativação dos
632 receptores adrenérgicos. Sendo assim, os antagonistas dos receptores
633 adrenérgicos como os beta-bloqueadores, comumente utilizados em doenças
634 como a hipertensão, poderiam também ser utilizados para o tratamento do
635 câncer.

636

637 7. CONCLUSÕES

638

- 639 ✓ Foram obtidos dois grupos distintos de amostras submetidas às técnicas
640 de análise da expressão gênica global (tumores e normais);
- 641 ✓ As análises revelaram 361 genes diferencialmente expressos já descritos
642 na literatura, sendo 109 com expressão aumentada e 252 com expressão
643 diminuída quando comparados ao tecido normal;

644 ✓ O uso da plataforma LINCS L1000FWD permitiu a identificação de drogas
645 e/ou compostos terapêuticos que podem ser explorados como opções de
646 tratamento potenciais para GISTs, como os agonistas de receptores de
647 glicocorticóides, inibidores das histonas desacetilases (HDAC), inibidores
648 das quinases dependentes de ciclina (CDK) e antagonistas dos receptores
649 adrenérgicos.
650

8. BIBLIOGRAFIA

- ABBAS, F.; WASEEM, R.D.; MUZAMIL, L.; SUMMYIA, F.; MANZOOR, A.P.; PEERZADA, Z.; NAJEEB ULLAH, S.; DAR, I. Gastrointestinal Stromal Tumors: A Review. *Journal of Molecular Imaging & Dynamics*, v.6, n.1, p.1-3, 2016.
- ABBASI, N.; LONG, T.; LI, Y.; YEE, B.A.; CHO, B.S.; HERNANDEZ, J.E.; MA, E.; PATEL, P.R.; SAHOO, D.; SAYED, I.M.; VARKI, N.; DAS, S.; GHOSH, P.; YEO, G.W.; HUANG, W.J.M. DDX5 promotes oncogene C3 and FABP1 expressions and drives intestinal inflammation and tumorigenesis. *Life Science Alliance*, v.3, n.10, 2020.
- ALARCÓN-MILLÁN, J.; MARTÍNEZ-CARRILLO, D.N.; PERALTA-ZARAGOZA, O.; FERNÁNDEZ-TILAPA, G. Regulation of GKN1 expression in gastric carcinogenesis: A problem to resolve (Review). *International Journal of Oncology*, v.55, n.3, p.555-569, 2019.
- ASHBURN, T.T.; THOR, K.B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.3, p.673-683, 2004.
- BACHET, J.B.; HOSTEIN, I.; LE CESNE, A.; BRAHIMI, S.; BEAUCHET, A.; TABONE- EGLINGER, S.; SUBRA, F.; BUI, B.; DUFFAUD, F.; TERRIER, P.; COINDRE, J.M.; BLAY, J.Y.; EMILE, J.F. Prognosis and predictive value of KIT exon 11 deletion in GISTs. *British Journal of Cancer*, v.101, p.7-11, 2009.
- BERGER, E.P.; JOHANNES, C.M.; JERGENS, A.E.; ALLENSPACH, K.; POWERS, B.E.; DU, Y.; MOCHEL, J.P.; FOX, L.E.; MUSSER, M.L. Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia®) use in the treatment of gastrointestinal stromal tumors of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.32, n.6, p.2045-2053, 2018.
- BETTINI, G.; MORINI, M.; MARCATO, P.S. Gastrointestinal spindle cell tumours of the dog: Histological and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Pathology*, v.129, n.4, p.283-29, 2003.
- BOIKOS, S.A.; PAPPO, A.S.; KILLIAN, J.K.; LAQUAGLIA, M.P.; WELDON, C.B.; GEORGE, S.; TRENT, J.C.; VON MEHREN, M.; WRIGHT, J.A.; SCHIFFMAN, J.D.; RAYGADA, M.; PACAK, K.; MELTZER, P.S.; MIETTINEN, M.M.; STRATAKIS, C.; JANEWAY, K.A.; HELMAN, L.J. Molecular Subtypes of KIT/PDGFRA Wild-Type Gastrointestinal Stromal Tumors: A Report From the National Institutes of Health Gastrointestinal Stromal Tumor Clinic. *JAMA Oncology*, v.2, n.7, p.922-928, 2016.
- BOMMINENI, Y.R.; DICK, E.J.; HUBBARD, G.B. Gastrointestinal stromal tumors in a baboon, a spider monkey, and a chimpanzee and a review of the literature. *Journal of Medical Primatology*, v.38, p.199-203, 2009.
- BRČIĆ, I.; ARGYROPOULOS, A.; LIEGL-ATZWANGER, B. Update on molecular genetics of gastrointestinal stromal tumors. *Diagnostics*, v.11, n.2, 2021.
- BROWN, C.C.; BAKER, D.C.; BARKER, I.K. The Alimentary System. In: MAXIE, G. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 5.ed., v.2. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007.
- CANDELARIA, M.; DE LA GARZA, J.; DUENAS-GONZALEZ, A. A clinical and biological overview of gastrointestinal stromal tumors. *Medical Oncology*, v.22, p.1-10, 2005.
- CARVALHO, R.F.; DO CANTO, L.M.; CURY, S.S.; FRØSTRUP HANSEN, T.; JENSEN, L.H.; ROGATTO, S. R. Drug repositioning based on the reversal of gene expression signatures identifies top2a as a therapeutic target for rectal cancer. *Cancers*, v.13, n.21, 2021.
- CHAHAL, K.K.; PARLE, M.; ABAGYAN, R. Dexamethasone and Fludrocortisone inhibit hedgehog signaling in embryonic cells. *ACS omega*, v.3, n.9, p.12019-12025, 2018.
- COKER-GURKAN, A.; ARISAN, E.D.; OBAKAN, P.; GUVENIR, E.; UNSAL, N.P. Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates purvalanol-induced apoptosis in Bax

- deficient HCT 116 colon cancer cells. *Experimental Cell Research*, v.328, n.1, p.87-98, 2014.
- CORLESS, C.L.; HEINRICH, M.C. Molecular Pathobiology of Gastrointestinal Stromal Sarcomas. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v.3, p.557-586, 2008.
- CORLESS, L.C. Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now?. *Modern Pathology*, v.27, p.1-16, 2014.
- DAILEY, D.D.; EHRHART, E.J.; DUVAL, D.L.; BASS, T.; POWERS, B.E. DOG1 is a sensitive and specific immunohistochemical marker for diagnosis of canine gastrointestinal stromal tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.27, n.3, 2015.
- DEL ALCAZAR, C.M.; MAHONEY, J.A.; DITTRICH, K.; STEFANOVSKI, D.; CHURCH, M.E. Outcome, prognostic factors and histological characterization of canine gastrointestinal sarcomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, v.19, n.3, p.578–586, 2021.
- DEL PIERO, F.; SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; MANDELLI, G.; BLOMME, E.A. Gastrointestinal stromal tumors in equids. *Veterinary Pathology*, v.38, n.6, p.689–697, 2001.
- DJAMGOZ, M.B.A. Ion Transporting Proteins and Cancer: Progress and Perspectives. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, v.183, p.251-277, 2022.
- DUARTE, J.A.; DE BARROS, A.L.B.; LEITE, E.A. The potential use of simvastatin for cancer treatment: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.141, p.111858, 2021.
- ELLIOTT, J.W.; SWINBOURNE, F.; PARRY, A.; BAINES, L. Successful treatment of a metastatic, gastrointestinal stromal tumour in a dog with toceranib phosphate (Palladia). *Journal of Small Animal Practice*, v.58, n.7, p.416–418, 2017.
- FLETCHER, C.D.; BERMAN, J.J.; CORLESS, C.; GORSTEIN, F.; LASOTA, J.; LONGLEY, B.J.; MIETTINEN, M.; O'LEARY, T.J.; REMOTTI, H.; RUBIN, B.P.; SHMOOKLER, B.; SOBIN, L.H.; WEISS, S.W. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Human Pathology*, v.33, n.5, p.459-465, 2002.
- FOO, W.C.; LIEGL-ATZWANGER, B.; LAZAR, A.J. Pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Clinical Medicine Insights: Pathology*, v. 5, p.23-33, 2012.
- FREZOULIS, P.; HARPER, A. The role of toceranib phosphate in dogs with non-mast cell neoplasia: A systematic review. *Veterinary and Comparative Oncology*, v.20, p.362-371, 2022.
- FROST, D.; LASOTA, J.; MIETTINEN, M. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases. *Veterinary Pathology*, v.40, p.42-54, 2003.
- FUJIMOTO, H.; SHIBUTANI, M.; KUROIWA, K.; INOUE, K.; WOO, G.H.; U, M.; HIROSE, M. A case report of a spontaneous gastrointestinal stromal tumor (GIST) occurring in a F344 rat. *Toxicologic Pathology*, v.34, p.164-167, 2006.
- GREGORY-BRYSON, E.; BARTLETT, E.; KIUPEL, M.; HAYES, S.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Canine and human gastrointestinal stromal tumors display similar mutations in c-KIT exon 11. *BioMed Central Cancer*. v.10, p. 559, 2010.
- GUPTA, S.K.; RATERIA, N. Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST): an Overview. *Indian Journal of Surgery*, 2020.
- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, v.12, n.1, p.31-46, 2022.
- HAYES, S.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; GREGORY-BRYSON, E.; KIUPEL, M. Classification of canine nonangiogenic, nonlymphogenic, gastrointestinal sarcomas based on microscopic, immunohistochemical, and molecular characteristics. *Veterinary Pathology*, v.50, n.5, p.779–788, 2013.
- HEINRICH, M.C.; CORLESS, C.L.; DUENSING, A.; MCGREEVEY, L.; CHEN, C.; JOSEPH, N.; SINGER, S.; GRIFFITH, D.J.; HALEY, A.; TOWN, A.; DEMETRI, G.D.; FLETCHER, C.D.M.; FLETCHER, J.A. PDGFRA Activating mutations in

- gastrointestinal stromal tumors. *American Association for the Advancement of Science*, v.299, n.5607, p.708–710, 2016.
- HIROTA, S.; ISOZAKI, K.; MORIYAMA, Y.; HASHIMOTO, K.; NISHIDA, T.; ISHIGURO, S.; KAWANO, K.; HANADA, M.; KURATA, A.; TAKEDA, M.; TUNIO, G.M.; MATSUZAWA, Y.; KANAKURA, Y.; SHINOMURA, Y.; KITAMURA, Y. Gain-of-function mutations of *c-kit* in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*, v.279, n.5350, p.577–580, 1998.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estatísticas de câncer. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>, 2019. Acesso em 06/12/2022.
- IRIE, M.; TAKEUCHI, Y.; OHTAKE, Y.; SUZUKI, H.; NAGATA, N.; MIYOSHI, T.; KAGAWA, Y.; YAMAGAMI, T. Imatinib mesylate treatment in a dog with gastrointestinal stromal tumors with a *c-kit* mutation. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v.77, n.11, p.1535, 2015.
- KIM, T.M.; YANG, I.S.; SEUNG, B.J.; LEE, S.; KIM, D.; HA, Y.J.; SEO, M.K.; KIM, K.K.; KIM, H.S.; CHEONG, J.H.; SUR, J.H.; NAM, H.; KIM, S. Cross-species oncogenic signatures of breast cancer in canine mammary tumors. *Nature Communications*, v.11, n.3616, 2020.
- KITAMURA, Y. Gastrointestinal stromal tumors: past, present, and future. *Journal of Gastroenterology*, v.43, p.499-508, 2008.
- KLOSOWSKI, M.; HAINES, L.; ALFINO, L.; McMELLEN, A.; LEIBOWITZ, M.; REGAN, D. Naturally occurring canine sarcomas: Bridging the gap from mouse models to human patients through cross-disciplinary research partnerships. *Frontiers in Oncology*, 2023.
- KOBAYASHI, M.; KUROI, S.; ITO, K.; YASUDA, A.; SAWADA, H.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M. Imatinib-associated tumour response in a dog with a non-resectable gastrointestinal stromal tumour harbouring a *c-kit* exon 11 deletion mutation. *The Veterinary Journal*, v.198, n.1, p.271–274, 2013.
- KRABOTH, Z.; KALMAN, B. β -Adrenoreceptors in Human Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, v.24, n.4, p.3671, 2023.
- LI, Y.; SETO, E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v.6, n.10, p.a026831, 2016.
- LIEGL, B.; HORNICK, J.L.; CORLESS, C.L.; FLETCHER, D.M. Monoclonal antibody *DOG1.1* shows higher sensitivity than *KIT* in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes. *The American Journal of Surgical Pathology*, v.33, n.3, p.437–446, 2009.
- LONDON, C.A. Tyrosine Kinase Inhibitors in Veterinary Medicine. *Topics in Companion Animal Medicine*, v.24, n.3, p.106–112, 2009.
- LONGLEY, B.J.; REGUERA, M.J.; MA, Y. Classes of *c-KIT* activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leukemia Research*, v.25, n.7, p.571–576, 2001.
- LUX, M.L.; RUBIN, B.P.; BIASE, T.L.; CHEN, C.J.; MACLURE, T.; DEMETRI, G.; XIAO, S.; SINGER, S.; FLETCHER, C.D.M.; FLETCHER, J.A. *KIT* extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *The American Journal of Pathology*, v.156, n.3, p.791–795, 2000.
- MAAS, C.P.H.J.; TER HAAR, G.; VAN DER GAAG, I.; KIRPENSTEIJN, J. Reclassification of small intestinal and cecal smooth muscle tumors in 72 dogs: clinical, histologic, and immunohistochemical evaluation. *Veterinary Surgery*, v.36, n.4, p.302–313, 2007.
- MIETTINEN, M.; SARLOMO-RIKALA, M.; LASOTA, J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Human Pathology*, v.30, n.10, p.1213–1220, 1999.
- MIETTINEN, M.; LASOTA, J. Gastrointestinal stromal tumors e clinical, histological, immunohistochemical and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Archives*, v.438, p.1-12, 2001.

- MIETTINEN, M.; KOPCZYNSKI, J.; MAKHLOUF, H.R.; SARLOMO-RIKALA, M.; GYORFFY, H.; BURKE, A.; SOBIN, L.; LASOTA, J. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *The American Journal of Surgical Pathology*, v.27, p.625-641, 2003.
- MIETTINEN, M.; LASOTA, J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, v.13, n.3, p.205–220, 2005.
- MIETTINEN, M.; MAKHLOUF, H.; SOBIN, L.H.; LASOTA, J. Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up. *The American Journal of Surgical Pathology*, v.30, n.4, p.477–489, 2006.
- MORENO-SMITH, M.; LUTGENDORF, S.K.; SOOD, A.K. Impact of stress on cancer metastasis. *Future Oncology*, v.6, n.12, p.1863-1881, 2010.
- MORINI, M.; GENTILINI, F.; PIETRA, M.; SPADARI, A.; TURBA, M.E.; MANDRIOLI, L.; BETTINI, G. Cytological, immunohistochemical and mutational analysis of a gastric gastrointestinal stromal tumour in a cat. *Journal of Comparative Pathology*, v.145, n.2–3, p.152-157, 2011.
- MORINI, M.; GENTILINI, F.; TURBA, M.E.; GOBBO, F.; MANDRIOLI, L.; BETTINI, G. Mutational Analysis of c-KIT and PDGFRA in Canine Gastrointestinal Stromal Tumors (GISTs). *Veterinary Sciences*, v.9, n.7, p.1–12, 2022.
- MORRIS, J.S. Genomic and proteomic profiling for cancer diagnosis in dogs. *The Veterinary Journal*, v.215, p.101-109, 2016.
- MURAVNICK, K.B.; PARENTE, E.J.; DEL PIERO, F. An atypical equine gastrointestinal stromal tumor. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.21, p.387-390, 2009.
- NOCKA, K.; BUCK, J.; LEVI, E.; BESMER, P. Candidate ligand for the c-kit transmembrane kinase receptor: KL, a fibroblast derived growth factor stimulates mast cells and erythroid progenitors. *The EMBO Journal*, v.9, n.10, p.3287–3294, 1990.
- PUSHPAKOM, S.; IORIO, F.; EYERS, P.A.; ESCOTT, K.J.; HOPPER, S.; WELLS, A.; DOIG, A.; GUILLIAMS, T.; LATIMER, J.; McNAMEE, C.; NORRIS, A.; SANSEAU, P.; CAVALLA, D.; PIRMOHAMED, M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.18, n.1, p.41-58, 2019.
- RIDDLE, R.H.; PETRAS, R.E.; WILLIAMS, G.T.; SOBIN, L.H. *Tumors of The Intestines*. 3.ed. Washington DC: Armed Forces Institute, 2003.
- RUBIN, B.P.; HEINRICH, M.C.; CORLESS, C.L. Gastrointestinal stromal tumor. *The Lancet*, v.369, n.9574, p.1731-1741, 2007.
- RUSSELL, K.N.; MEHLER, S.J.; SKORUPSKI, K.A.; BAEZ, J.L.; SHOFR, F.S.; GOLDSCHMIDT, M.H. Clinical and immunohistochemical differentiation of gastrointestinal stromal tumors from leiomyosarcomas in dogs: 42 cases (1990-2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.230, p.1329-1333, 2007.
- SERPA, P.B.S.; SANTOS, A.P. Incidental diagnosis of a spindle cell type gastrointestinal stromal tumor in a dog with ethylene glycol intoxication. *Veterinary Clinical Pathology*, v.50, n.S1, p.70–75, 2022.
- SETOGUCHI, T.; KIKUCHI, H.; YAMAMOTO, M.; BABA, M.; OHTA, M.; KAMIYA, K.; TANAKA, T.; BABA, S.; GOTO-INOUE, N.; SETOU, M.; SASAKI, T.; MORI, H.; SUGIMURA, H.; KONNO, H. Microarray analysis identifies versican and CD9 as potent prognostic markers in gastric gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Science*, v.102, n.4, p.883-889, 2011.
- SHARAF, R.N.; BUTTE, A.J.; MONTGOMERY, K.D.; PAI, R.; DUDLEY, J.T.; PASRICHA, P.J. Computational prediction and experimental validation associating FABP-1 and pancreatic adenocarcinoma with diabetes. *BMC Gastroenterology*, v.11, n.1, 2011.

- SKWARCZYNSKA, M.; OTTMANN, C. Protein-protein interaction as drug targets. *Future Medicinal Chemistry*, v.7, n.16, 2015.
- STEIGEN, S.E.; EIDE, T.J. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, v.117, n.2, 2009.
- TSAI, M.; TAKEISHI, T.; THOMPSON, H.; LANGLEY, K.E.; ZSEBO, K.M.; METCALFE, D.D.; GEISSLER, E.N.; GALLI, S.J. Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.88, n.14, p.6382–6386, 1991.
- TREGGIARI, E.; GIANTIN, M.; FERRO, S.; ROMANELLI, G. Canine gastrointestinal stromal tumours treated with surgery and imatinib mesylate: three cases (2018-2020). *Journal of Small Animal Practice*, v.64, p.161-167, 2023.
- VARALLO, G.R.; JARDIM-PERASSI, B.V.; ALEXANDRE, P.A.; FUKUMASU, H.; ZUCCARI, D.A.P.C. Global gene expression profile in canine mammary carcinomas. *Veterinary Journal*, 2019.
- WANG, G.; BONKOVSKY, H.L.; DE LEMOS, A.; BURCZYNSKI, F.J. Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *Journal of Lipidic Research*, v.56, n.12, p.2238-2247, 2015.
- WANG, Z.; LACHMANN, A.; KEENAN, A.B.; MA'AYAN, A. L1000FWD: fireworks visualization of drug-induced transcriptomic signatures. *Bioinformatics*, v.34, n.12, p.2150-2152, 2018.
- WEBSTER, J.D.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer*, v.6, n.85, 2006.
- WINTER, S.S.; LOVATO, D.M.; KHAWAJA, H.M.; EDWARDS, B.S.; STEELE, I.D.; YOUNG, S.M.; OPREA, T.I.; SKLAR, L.A.; LARSON, R.S. High-throughput screening for daunorubicin-mediated drug resistance identifies mometasone furoate as a novel ABCB1-reversal agent. *Journal of Biomolecular Screening*, v.13, n.3, p.185-193, 2008.
- WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier Inc, 2013. p.402-423.
- WONG, N.A.C.S.; YOUNG, R.; MALCOMSON, R.D.G.; NAYAR, A.G.; JAMIESON, L.A.; SAVE, V.E.; CAREY, F.A.; BREWSTER, D.H.; HAN, C.; AL-NAFUSSI, A. Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology*, v.43, p.118-126, 2003.
- YOON, J.H.; KANG, Y.H.; CHOI, Y.J.; PARK, I.S.; NAM, S.W.; LEE, J.Y.; LEE, Y.S.; PARK, W.S. Gastrophilin 1 functions as a tumor suppressor by inhibition of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancers. *Journal of Research in Clinical Oncology*, v.137, p.1697-1704, 2011.
- ZHANG, G.L.; PAN, L.L.; HUANG, T.; WANG, J.H. The transcriptome difference between colorectal tumor and normal tissues revealed by single-cell sequencing. *Journal of Cancer*, v.10, n.23, p.5883-5890, 2019.

ANEXO

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos entre tumores e tecidos normais (FC < -2 ou > 2, $p < 0,05$).

Gene	Descrição	Fold Change	Valor de p
FABP1	fatty acid binding protein 1, liver	12,23	0,0172
LOC102151306	mucin-2-like	10,27	0,0046
SI	sucrase-isomaltase (alpha-glucosidase)	7,96	0,0306
CLCA4	chloride channel accessory 4	5,83	0,0242
ZG16	zymogen granule protein 16	5,62	0,0201
SI	sucrase-isomaltase (alpha-glucosidase)	5,37	0,0186
ENPEP	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)	5,18	0,0105
FAM198B	family with sequence similarity 198, member B	5,11	0,0028
MUC17	mucin 17, cell surface associated	4,95	0,0154
SPINK4	serine peptidase inhibitor, Kazal type 4	4,48	0,0108
MAB21L2	mab-21-like 2 (C. elegans)	4,41	0,0035
LOC607401	leucine-rich repeat-containing protein 37A2	4,4	0,002
LOC102151133; LOC102151216	leucine-rich repeat-containing protein 37A3-like; leucine-rich repeat-containing protein 37B-like	4,25	0,0216
LOC491436	leucine-rich repeat-containing protein 37A-like	4,21	0,0085
LOC102151216	leucine-rich repeat-containing protein 37B-like	4,21	0,0085
LOC106557525	leucine-rich repeat-containing protein 37A3-like	4,21	0,0085
GUCY2C	guanylate cyclase 2C	4,04	0,0189
LOC100688091	uncharacterized LOC100688091	3,96	0,0056
AOC1	amine oxidase, copper containing 1	3,82	0,0149
LOC102157334; LOC102153199	leucine-rich repeat-containing protein 37A3-like	3,75	0,0119
NT5E	5-nucleotidase, ecto (CD73)	3,74	0,0152
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	3,64	0,0145

LYPD8	LY6/PLAUR domain containing 8	3,57	0,0136
ALDH1A1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	3,52	0,0088
LOC102154959	leucine-rich repeat-containing protein 37A2-like	3,46	0,0157
PDE3A	phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited	3,36	0,0133
LRRC19	leucine rich repeat containing 19	3,25	0,024
ACE2	angiotensin I converting enzyme 2	3,21	0,0404
MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	3,2	0,0231
MYO1A	myosin IA	3,13	0,0219
SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	3,11	0,0015
SLC5A1	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1	3,11	0,0094
DPP4	dipeptidyl-peptidase 4	3,03	0,0429
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7)	2,99	0,0149
MIR145	microRNA mir-145	2,93	0,0007
ANXA13	annexin A13	2,87	0,0172
MAGI2	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2	2,85	0,0082
RBP2	retinol binding protein 2, cellular	2,85	0,0454
LOC100682772	leucine-rich repeat-containing protein 37A3-like	2,78	0,02
TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	2,78	0,0096
TNC	tenascin C	2,75	0,0214
TMEM236	transmembrane protein 236	2,71	0,0112
QPCT	glutaminy-peptide cyclotransferase	2,69	0,0049
SLC6A14	solute carrier family 6 (amino acid transporter), member 14	2,69	0,0245
VCAN	versican	2,66	0,0428
REG4	regenerating islet-derived family, member 4	2,62	0,0459
CCDC88A	coiled-coil domain containing 88A	2,62	0,0026
MIR21	microRNA mir-21	2,61	0,0116
EPB41L3	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	2,61	0,0087
LOC102155907	leucine-rich repeat-containing protein 37A3-like	2,6	0,0071

CLDN7	claudin 7	2,59	0,0118
TPPP3	tubulin polymerization-promoting protein family member 3	2,56	0,0189
MOXD1	monooxygenase, DBH-like 1	2,52	0,0166
MIR1836	microRNA mir-1836	2,52	0,0066
COL1A2	collagen, type I, alpha 2	2,52	0,0054
CCDC80	coiled-coil domain containing 80	2,51	0,0049
LOC102152143	uncharacterized LOC102152143	2,5	0,0007
SLC7A9	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, bo,+ system), member 9	2,49	0,0115
FSTL1	folliculin-like 1	2,48	0,0042
LOC100687667	uncharacterized LOC100687667	2,48	0,0124
BNC2	basonuclin 2	2,44	8,12E-05
SVEP1	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1	2,43	0,0033
SULF1	sulfatase 1	2,42	0,0075
FABP2	fatty acid binding protein 2, intestinal	2,41	0,033
ATP1B3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 3 polypeptide	2,4	0,0251
FHL2	four and a half LIM domains 2	2,39	0,0094
LOC100686488	glutathione S-transferase theta-2B-like	2,37	0,0011
HOXD8	homeobox D8	2,35	0,0066
SERINC4; MFAP1	serine incorporator 4; microfibrillar-associated protein 1	2,35	0,0035
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (Junior blood group)	2,35	0,0106
HOXA5	homeobox A5	2,35	0,0134
CDHR2	cadherin-related family member 2	2,32	0,0481
TMIGD1	transmembrane and immunoglobulin domain containing 1	2,3	0,0453
OLFML2B	olfactomedin-like 2B	2,27	0,0053
FN1	fibronectin 1	2,26	0,0198
LOC488297	histone H2A type 1	2,24	0,0066
CPE	carboxypeptidase E	2,24	0,0087

C16H8orf4	chromosome 16 open reading frame, human C8orf4	2,23	0,0237
MGAM2	maltase-glucoamylase 2 (putative)	2,23	0,0188
MGAM2	maltase-glucoamylase 2 (putative)	2,23	0,0222
MIR143	microRNA mir-143	2,21	0,0001
ST3GAL4	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4	2,2	0,0418
LOC102152410	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial pseudogene	2,19	0,02
HEPH	hephaestin	2,18	0,0491
C17H1orf54	chromosome 17 open reading frame, human C1orf54	2,17	0,0034
PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1	2,16	3,16E-05
MGAM	maltase-glucoamylase	2,15	0,0293
ANKS4B	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 4B	2,14	0,0105
RFTN2	raftlin family member 2	2,14	0,0054
TESK2	testis-specific kinase 2	2,14	0,0023
LOC100688091	uncharacterized LOC100688091	2,13	0,0372
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	2,12	0,0276
PRKG2	protein kinase, cGMP-dependent, type II	2,12	0,008
HIC1	hypermethylated in cancer 1	2,11	0,0169
WSB1	WD repeat and SOCS box containing 1	2,11	0,0225
ETV1	ets variant 1	2,1	0,0327
FAM150A	family with sequence similarity 150, member A	2,1	0,0122
DNM3	dynammin 3	2,08	0,0026
HAPLN1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	2,08	0,0142
BCHE	butyrylcholinesterase	2,07	0,0222
SCARA3	scavenger receptor class A, member 3	2,06	0,0487
BNC2	basonuclin 2	2,06	0,0025
TSHZ2	teashirt zinc finger homeobox 2	2,05	0,0049
MEST	mesoderm specific transcript	2,05	0,0023

PDLIM7	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	2,05	2,66E-05
SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	2,03	0,0332
MIR30E	microRNA mir-30e	2,02	0,0139
ASPN	asporin	2,02	0,0033
MLXIPL	MLX interacting protein-like	2,02	0,0147
PDE8B	phosphodiesterase 8B	-2	0,0079
SMIM14	small integral membrane protein 14	-2	0,005
S100A8	S100 calcium binding protein A8	-2,01	0,0347
TMEM251	transmembrane protein 251	-2,01	0,0056
SLC9B2	solute carrier family 9, subfamily B (NHA2, cation proton antiporter 2), member 2	-2,02	0,0049
PERP	PERP, TP53 apoptosis effector	-2,02	0,0068
DUOXA2	dual oxidase maturation factor 2	-2,02	0,003
EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	-2,02	0,0056
PPM1L	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1L	-2,02	0,0005
LOC100855762	E3 ubiquitin-protein ligase RNF4 pseudogene	-2,02	0,0325
RHPN2	rhophilin, Rho GTPase binding protein 2	-2,03	0,001
RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family	-2,03	0,0093
CHGA	chromogranin A	-2,03	0,0185
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9	-2,03	0,008
ST6GAL1	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1	-2,03	0,0381
PRKAA2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	-2,04	0,0027
UQCR10	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X	-2,04	0,002
DAP	death-associated protein	-2,04	0,004
CREBL2	cAMP responsive element binding protein-like 2	-2,05	0,0049
FOXA2	forkhead box A2	-2,05	0,0014
LGALS9	lectin, galactoside-binding, soluble, 9	-2,06	0,0169
VTA1	vesicle (multivesicular body) trafficking 1	-2,06	0,0089

HACD3	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	-2,06	0,014
PLP2	proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched)	-2,06	0,0048
KYNU	kynureninase	-2,06	0,0006
CHCHD7	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7	-2,06	0,0047
SMIM19	small integral membrane protein 19	-2,06	0,0178
NMD3	NMD3 ribosome export adaptor	-2,06	0,0102
NDUFA6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6, 14kDa	-2,07	0,0017
RPL8	ribosomal protein L8	-2,07	0,0005
STX12	syntaxin 12	-2,07	0,0039
SLC9A3	solute carrier family 9, subfamily A (NHE3, cation proton antiporter 3), member 3	-2,08	0,018
IRF6	interferon regulatory factor 6	-2,08	0,0119
NDRG2	NDRG family member 2	-2,08	6,65E-05
PFKFB2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2	-2,08	0,0005
COPZ1	coatomer protein complex, subunit zeta 1	-2,09	0,0004
MAGOHB	mago homolog B, exon junction complex core component	-2,09	0,0218
PARD6B	par-6 family cell polarity regulator beta	-2,1	0,0185
SEMA3E	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E	-2,11	0,0049
C10H2orf40	chromosome 10 open reading frame, human C2orf40	-2,11	0,0356
MCEE	methylmalonyl CoA epimerase	-2,11	0,003
MYO5C	myosin VC	-2,11	0,0342
RPL36	ribosomal protein L36	-2,12	0,0164
OCLN	occludin	-2,12	0,0069
ANKRD22	ankyrin repeat domain 22	-2,13	0,0013
PDK2	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2	-2,13	0,0004
FMN1	formin 1	-2,13	0,0471
PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	-2,13	0,0168
PLVAP	plasmalemma vesicle associated protein	-2,15	0,0168

RAB29	RAB29, member RAS oncogene family	-2,15	0,0005
HSPB8	heat shock 22kDa protein 8	-2,16	0,0215
TINAGL1	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	-2,16	0,0165
BSPRY	B-box and SPRY domain containing	-2,17	0,0063
SDC4	syndecan 4	-2,17	0,0003
LOC478277	creatine kinase U-type, mitochondrial	-2,17	0,0266
SMPD3	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)	-2,17	0,0032
LSM10	LSM10, U7 small nuclear RNA associated	-2,18	0,0001
NFYC	nuclear transcription factor Y, gamma	-2,19	1,54E-05
TSPAN15	tetraspanin 15	-2,19	0,0216
SF3A1	splicing factor 3a, subunit 1, 120kDa	-2,19	0,0003
LYN	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	-2,2	0,008
SYPL1	synaptophysin-like 1	-2,2	0,0043
C11H9orf72	chromosome 11 open reading frame, human C9orf72	-2,2	0,0086
NAPA	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha	-2,2	1,00E-05
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	-2,21	0,0318
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	-2,21	0,0169
ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	-2,22	0,0019
HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	-2,23	0,0055
CDC42EP1	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1	-2,23	0,0003
BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2	-2,23	0,039
NUDT21	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 21	-2,23	0,0007
CHN2	chimerin 2	-2,24	0,0091
GALNT12	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12	-2,24	0,0322
LOC100683643	histone H2B type 1-F/J/L-like	-2,26	1,84E-05
ACPP	acid phosphatase, prostate	-2,27	0,0012

LOC482202	histone H2B type 3-B	-2,28	2,32E-05
DNAJC12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12	-2,28	0,0002
LOC100855574	histone H2B type 2-E	-2,3	6,66E-05
CA8	carbonic anhydrase VIII	-2,3	0,0073
PRKCI	protein kinase C, iota	-2,3	0,0093
LOC487080	MAGUK p55 subfamily member 7	-2,31	0,0056
LOC483169	histone H2B type 2-E	-2,31	2,30E-05
LOC483170	histone H2B type 2-E	-2,31	2,30E-05
SLC9A1	solute carrier family 9, subfamily A (NHE1, cation proton antiporter 1), member 1	-2,32	0,0009
GALNT6	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6	-2,32	0,0053
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	-2,32	0,0021
EZR	ezrin	-2,33	0,0042
RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	-2,33	0,0425
PRR15L	proline rich 15-like	-2,34	0,0001
SGCG	sarcoglycan, gamma (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	-2,34	0,0119
C12H6orf203	chromosome 12 open reading frame, human C6orf203	-2,35	0,0307
RRAGD	Ras-related GTP binding D	-2,35	0,008
CKB	creatine kinase, brain	-2,36	0,0029
TPD52	tumor protein D52	-2,36	0,0327
YIPF1	Yip1 domain family, member 1	-2,36	0,0013
CDH1	cadherin 1, type 1	-2,36	0,0136
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	-2,37	0,026
CHP1	calcineurin-like EF-hand protein 1	-2,37	0,0003
MAL2	mal, T-cell differentiation protein 2	-2,37	0,0241
SERINC2	serine incorporator 2	-2,38	0,0005

PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-2,38	0,0036
SNTB1	syntrophin, beta 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 1)	-2,39	0,0027
IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	-2,39	0,0011
C12H6orf132	chromosome 12 open reading frame, human C6orf132	-2,4	0,0074
BPHL	biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase)	-2,4	0,0073
PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-2,41	0,0096
SLC26A7	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 7	-2,41	0,0013
ETNPPL	ethanolamine-phosphate phospho-lyase	-2,42	0,0088
SULT1C2	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	-2,42	0,0252
ATP1B1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	-2,42	0,0057
AKAP11	A kinase (PRKA) anchor protein 11	-2,43	0,0144
FAM174B	family with sequence similarity 174, member B	-2,44	2,07E-05
TAGLN2	transgelin 2	-2,44	0,0014
MRPS21	mitochondrial ribosomal protein S21	-2,44	0,0164
HSD17B2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	-2,45	0,0008
AQP4	aquaporin 4	-2,45	0,0068
PLAC8	placenta-specific 8	-2,45	0,0373
TPD52L1	tumor protein D52-like 1	-2,46	0,0026
NOP10	NOP10 ribonucleoprotein	-2,48	1,29E-05
FAM3D	family with sequence similarity 3, member D	-2,48	0,004
KRT19	keratin 19, type I	-2,48	0,0103
TSPAN13	tetraspanin 13	-2,48	0,0076
GATA4	GATA binding protein 4	-2,49	0,0001
TESC	tescalcin	-2,54	0,0002
FUT2	fucosyltransferase 2 (secretor status included)	-2,55	0,0022
IQGAP2	IQ motif containing GTPase activating protein 2	-2,55	0,0446

GNG5	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5	-2,56	9,41E-05
MUC4; LOC102156197	mucin 4, cell surface associated; mucin-5AC-like	-2,58	0,0059
LOC102152620	N-acetylgalactosaminyltransferase 7	-2,59	0,0192
CCL28	chemokine (C-C motif) ligand 28	-2,59	0,0046
PET100	PET100 homolog	-2,59	9,29E-05
CSGALNACT1	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1	-2,59	0,0024
CTNNAL1	catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	-2,6	0,0099
CENPV	centromere protein V	-2,6	1,77E-05
SERPINB11	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 11	-2,61	0,0081
C1GALT1	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1	-2,62	0,0028
IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	-2,65	0,0061
RAB3D	RAB3D, member RAS oncogene family	-2,66	0,0005
ALDH6A1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	-2,67	0,0078
SLC37A1	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 1	-2,68	0,0016
HSP70	heat shock protein 70	-2,69	0,0372
FOXA1	forkhead box A1	-2,69	0,0018
SLC15A2	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 2	-2,7	0,0002
DSG2	desmoglein 2	-2,72	0,0397
ZDHHC2	zinc finger, DHHC-type containing 2	-2,74	0,0004
ANXA3	annexin A3	-2,74	0,0127
FUNDC1	FUN14 domain containing 1	-2,75	0,0048
GALNT7	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7	-2,76	0,0311
FAM107A	family with sequence similarity 107, member A	-2,77	9,54E-06
MUC20	mucin 20, cell surface associated	-2,8	0,0011
ENPP4	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4 (putative)	-2,82	0,0002

MFSD4	major facilitator superfamily domain containing 4	-2,83	2,82E-05
TSPAN8	tetraspanin 8	-2,83	0,0449
PDE6H	phosphodiesterase 6H, cGMP-specific, cone, gamma	-2,9	0,001
CWH43	cell wall biogenesis 43 C-terminal homolog	-2,9	7,40E-05
KIAA1324	KIAA1324 ortholog	-2,92	0,0007
CMTM8	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8	-2,93	0,0012
SLC26A9	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 9	-2,95	0,0005
CPN1	carboxypeptidase N, polypeptide 1	-2,96	0,0142
CCBL1	cysteine conjugate-beta lyase, cytoplasmic	-2,96	4,06E-05
RHOBTB1	Rho-related BTB domain containing 1	-2,98	0,0013
MTUS1	microtubule associated tumor suppressor 1	-3	0,0209
FER1L6	fer-1-like family member 6	-3,02	0,0148
SH3YL1	SH3 and SYLF domain containing 1	-3,03	0,0006
GPC4	glypican 4	-3,04	0,0136
WFDC2	WAP four-disulfide core domain 2	-3,07	0,0091
RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family	-3,12	0,0017
TC2N	tandem C2 domains, nuclear	-3,14	0,0142
KRT18	keratin 18, type I	-3,15	0,002
ESRP1	epithelial splicing regulatory protein 1	-3,16	0,0066
ERN2	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 2	-3,17	0,0032
CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)	-3,21	0,0191
RASEF	RAS and EF-hand domain containing	-3,23	0,0298
CCL19	chemokine (C-C motif) ligand 19	-3,23	0,0239
FA2H	fatty acid 2-hydroxylase	-3,24	4,00E-05
LIFR	leukemia inhibitory factor receptor alpha	-3,26	0,0025

DSC3	desmocollin 3	-3,27	0,0003
MBOAT1	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1	-3,27	0,0028
ARHGAP24	Rho GTPase activating protein 24	-3,27	0,0009
MAL	mal, T-cell differentiation protein	-3,28	0,0028
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	-3,28	0,0139
S100A14	S100 calcium binding protein A14	-3,32	0,0105
TSPAN1	tetraspanin 1	-3,38	0,0297
EIF5A2	eukaryotic translation initiation factor 5A2	-3,41	0,0004
IL7	interleukin 7	-3,45	0,002
LOC483656; MUC5AC	mucin-5B; mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming	-3,47	0,0088
LOC102152109	uncharacterized LOC102152109	-3,48	0,0012
FAM3C	family with sequence similarity 3, member C	-3,49	0,0033
VSIG2; ESAM	V-set and immunoglobulin domain containing 2; endothelial cell adhesion molecule	-3,57	6,21E-06
SLC5A5	solute carrier family 5 (sodium/iodide cotransporter), member 5	-3,57	0,0013
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	-3,68	0,0327
SST	somatostatin	-3,76	0,0027
GLUL	glutamate-ammonia ligase	-3,8	0,0002
CYSTM1	cysteine-rich transmembrane module containing 1	-3,81	7,25E-06
LOC486353	SEC14-like protein 4	-3,87	0,0023
PPY	pancreatic polypeptide	-3,89	0,0421
NUPR1	nuclear protein, transcriptional regulator, 1	-3,91	0,0009
SLC1A1	solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	-3,94	0,0048
SCNN1A	sodium channel, non voltage gated 1 alpha subunit	-3,98	0,0031
LOC476879	serum amyloid A protein	-3,99	0,0085
DEPTOR	DEP domain containing MTOR-interacting protein	-4	0,0015
BAIAP2L1	BAI1-associated protein 2-like 1	-4,09	0,0021

LOC490151	transmembrane protein 56	-4,18	0,0004
RAB11FIP2	RAB11 family interacting protein 2 (class I)	-4,19	0,0006
S100P	S100 calcium binding protein P	-4,23	0,0001
FAM107B	family with sequence similarity 107, member B	-4,56	0,0007
ENPP5	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative)	-4,69	0,0003
GCNT1	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2	-4,79	0,0003
AGR2	anterior gradient 2, protein disulphide isomerase family member	-4,81	0,025
FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	-4,91	0,0002
KCNE1	potassium channel, voltage gated subfamily E regulatory beta subunit 1	-5,13	6,28E-05
KCNJ15	potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 15	-5,29	9,21E-05
CTSE	cathepsin E	-5,54	0,0026
MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus	-5,83	0,0018
GPX2	glutathione peroxidase 2	-5,91	0,0242
LOC482068	prostate stem cell antigen	-6,42	8,12E-05
CYP7B1	cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1	-6,42	0,0005
SLC9A2	solute carrier family 9, subfamily A (NHE2, cation proton antiporter 2), member 2	-6,84	0,0002
CA2	carbonic anhydrase II	-7,49	0,014
KCNE2	potassium channel, voltage gated subfamily E regulatory beta subunit 2	-7,56	0,004
CST6	cystatin E/M	-7,64	7,11E-05
CA9	carbonic anhydrase IX	-8,35	0,0003
C4BPA	complement component 4 binding protein, alpha	-8,63	2,19E-05
FRZB	frizzled-related protein	-8,67	0,0045
FXYP3	FXYP domain containing ion transport regulator 3	-8,94	0,0002
GALNT3	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	-8,95	0,0007

CHST11	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11	-9,33	0,0016
GIF	gastric intrinsic factor (vitamin B synthesis)	-9,72	0,0077
TMEM97	transmembrane protein 97	-9,81	0,0006
ESRRG	estrogen-related receptor gamma	-9,83	2,32E-05
DPCR1	diffuse panbronchiolitis critical region 1	-10,11	0,0131
LOC100856444	mucin-6-like	-10,27	0,013
LOC100856533	alcohol dehydrogenase E chain	-10,43	8,41E-05
ATP4A	ATPase, H ⁺ /K ⁺ exchanging, alpha polypeptide	-10,52	0,0003
SLC9A4; SLC9A2	solute carrier family 9, subfamily A (NHE4, cation proton antiporter 4), member 4; solute carrier family 9, subfamily A (NHE2, cation proton antiporter 2), member 2	-11,83	0,0002
LOC608687	placenta-specific gene 8 protein	-12,57	4,86E-05
GHRL	ghrelin/obestatin prepropeptide	-16,04	0,0001
TFF1	trefoil factor 1	-18,92	9,93E-05
CLDN18	claudin 18	-20,87	2,04E-05
MUC1	mucin 1, cell surface associated	-22,61	0,0001
CLIC6	chloride intracellular channel 6	-24,08	0,0012
VSIG1	V-set and immunoglobulin domain containing 1	-24,27	0,0003
PIK3C2G	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 gamma	-29,16	0,0005
GP2	glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	-29,37	0,0151
TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	-33,91	0,0034
ANXA10	annexin A10	-38,53	0,0003
LIPF	lipase, gastric	-75,22	0,0029
PGB	progastricsin (pepsinogen C)	-84,88	0,0004
PGA	pepsinogen 5, group I (pepsinogen A)	-94,63	0,0003
LOC611675	pepsin B-like	-97,28	0,0003

GKN2	gastrokine 2	-108,28	0,0006
GKN1	gastrokine 1	-116,4	0,001
