

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JOEMERSON OSÓRIO ROSADO

**ANÁLISE DE REDES DE INTERAÇÕES ENTRE DROGAS
QUIMIOTERÁPICAS USADAS NO TRATAMENTO DE CÂNCER GÁSTRICO:
EXPLORANDO PROTEÍNAS E PROCESSOS BIOLÓGICOS POR MEIO DE
FERRAMENTAS DE FARMACOLOGIA DE SISTEMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Prof. Dr. João A. P. Henriques

Orientador

Prof. Dr. Diego Bonatto

Orientador

Porto Alegre
Outubro - 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

--

JOEMERSON OSÓRIO ROSADO

Análise de redes de interações entre drogas quimioterápicas usadas no tratamento de câncer gástrico: explorando proteínas e processos biológicos por meio de ferramentas de farmacologia de sistemas

Prof. Dr. João A. P. Henriques

Orientador

Prof. Dr. Diego Bonatto

Orientador

BIOGRAFIA

Joemerson Osório Rosado nasceu na cidade de Pelotas/RS, em 05/07/1973. Possui Graduação em Medicina pela Universidade Federal de Pelotas/RS (1999), Especialização em Clínica Médica pelo Hospital Pompéia de Caxias do Sul/RS (2001) e Cancerologia Clínica (2003) pelo Hospital Nossa Senhora Conceição de Porto Alegre/RS. Atualmente, é Coordenador do Instituto do Câncer do Hospital Pompéia de Caxias do Sul/RS e Médico Gestor e Presidente da Comissão de Ética do mesmo. Possui experiência na área de Biologia Celular e em Cancerologia Clínica, atuando principalmente nas seguintes áreas: neoplasias do trato gastrointestinal, mama, pulmão e sistema nervoso central.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores , verdadeiros mestres , inquietos no descobrir , ensinar , orientar .
Agradeço aos Orientadores , Professor João A.P. Henriques e ao Professor Diego Bonatto, pelo constante empenho e motivação até a conclusão deste trabalho. Assim como, ao Professor Heitor Alberto Jannke e Professora Massako Takahashi Dourado, meus primeiros Orientadores na Iniciação Científica e catalisadores, ainda na graduação, sobre a importância de procurarmos algo mais, indo além. A todos os Mestres: muito obrigado.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a todos aqueles, que sofrem na luta diária contra esta doença, tão temida e mortal, quando não descoberta precocemente.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação tem como objetivo apresentar o uso de ferramentas de farmacologia de sistemas para o estudo das drogas quimioterápicas usadas no tratamento do câncer gástrico. A mesma inicia mostrando as diferentes drogas quimioterápicas usadas na prática diária e os seus respectivos mecanismos de ação. Na sequência, aborda as ferramentas de farmacologia de sistemas utilizadas e suas implicações. Como continuidade, apresenta-se a relação entre as referidas drogas e as ferramentas empregadas, a fim de se identificar proteínas e vias de interação entre as mesmas. Da mesma forma, buscou-se correlacionar como as combinações das drogas quimioterápicas estudadas estão diretamente associadas com as proteínas envolvidas no câncer gástrico, além da busca de novos alvos de ação das drogas e possíveis mecanismos de resistência quimioterápica.

RESUMO GERAL

O câncer gástrico está entre as neoplasias com a mais alta mortalidade no mundo, sendo que as modalidades de tratamento envolvem a cirurgia, a quimioterapia e também a radioterapia. Na quimioterapia, o uso de drogas isoladas ou em conjunto enfrenta um dilema frequente nesta patologia: a quimiorresistência. Assim, torna-se essencial, na clínica, a necessidade de encontrar novos compostos ou alvos protéicos que sejam capazes de manter uma resposta por longos períodos de tempo de tratamento. Dessa forma, este estudo utilizou ferramentas de farmacologia de sistemas, avaliando as interações entre proteínas e pequenos compostos a partir de dados proteômicos já existentes para a espécie humana. Neste contexto, as drogas estudadas foram o 5-fluorouracil, a Capecitabina, a Oxaliplatina, o Irinotecan e o Docetaxel. Uma rede de interações entre proteínas (*physical protein-protein interactions*; PPPI) e proteínas-quimioterápico (*physical compound-protein interaction*; PCPI) foi obtida, seguida da definição de cinco sub-redes, representando os diferentes processos biológicos observados. Além disso, foram empregadas análises de centralidade para buscar os principais componentes da rede e as suas interações, denominados de gargalos (*bottlenecks*), os quais regulam o fluxo de informação dentro da rede. Assim, o estudo demonstrou que as drogas atualmente em uso clínico convergem para processos biológicos semelhantes, o que explicaria o desenvolvimento de quimiorresistência a médio e longo prazo. Além disso, foram identificados sete novos gargalos, que representam novos alvos de proteínas e pequenos compostos capazes de interferir no controle e na comunicação entre outros vértices na própria rede. Esses dados poderão ser utilizados no desenvolvimento de novas combinações de drogas com o objetivo de melhorar os protocolos utilizados no tratamento quimioterápico do câncer gástrico.

Palavras-chave: câncer gástrico; biologia de sistemas; ciclo celular; proteínas; quimioterapia

ABSTRACT

Gastric cancer is among the cancers with the highest mortality in the world, and treatment modalities involve surgery, chemotherapy and radiotherapy. In chemotherapy, the drugs alone or in combination face a dilemma common in this disease: the chemoresistance. Thus, it becomes essential in the clinic, the need to find new protein target or compounds that are capable of maintaining a response for long periods of treatment.

Thus, this studied used tools of systems pharmacology, evaluating the interactions between proteins and small compounds from existing proteomic data for the human species. In this context, the study drugs were 5-fluorouracil, capecitabine, oxaliplatin, irinotecan and docetaxel. A network of protein interactions and protein-chemotherapy (PPPI-PCPI, respectively) was obtained, followed by the definition of five sub-networks, representing different biological processes observed. Moreover, centrality analysis were used to search the main network components and their interactions, called bottlenecks , which regulate the flow of information within the network. Thus, the study showed that the drugs currently in clinical use converge to similar biological processes, which would explain the development of chemoresistance in the medium and long term. Furthermore, we identified seven new bottlenecks that represent new target proteins and small compounds able to interfere in the control and communication between other nodes in the network itself. These data could be used to develop new combinations of drugs with the aim of improving the protocols used in chemotherapy of gastric cancer.

Key words – gastric cancer; system biology; cellular cycle; proteins; chemotherapy.

INTRODUÇÃO

O câncer, por definição, é uma doença complexa, envolvendo inúmeros fatores moleculares, celulares e teciduais que presumem uma iniciação mutagênica capaz de provocar futuras metástases. Vários estudos epidemiológicos relatam que, em sua maioria, os cânceres são originados pela exposição contínua a agentes mutagênicos e carcinogênicos, sendo que a susceptibilidade individual pode depender da predisposição genética, de diferenças no hábito nutricional e no estilo de vida. Deve ser salientado que as alterações demográficas relacionadas com a redução das taxas de mortalidade e de natalidade levaram ao aumento da taxa de expectativa de vida e o envelhecimento populacional, o que levou a um aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas e o câncer (VERAS, 2007). Assim sendo, o câncer é responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo, onde mais de sete milhões de pessoas morrem da doença anualmente. Como a expectativa de vida tem melhorado gradativamente, a incidência de câncer, estimada em 2002 em 11 milhões de casos novos, alcançará quase 20 milhões em 2020, segundo a União Internacional Contra o Câncer (UICC). Associado a tal fato, o câncer possui um forte impacto na sociedade, debilitando indivíduos produtivos, tanto no âmbito social quanto no econômico, além de constituir um sério problema de saúde pública (FERLAY et al. 2001).

O câncer gástrico ocupou uma posição de liderança nas estatísticas de mortalidade por câncer no mundo todo até meados de 1980 quando, então, foi ultrapassado pelo câncer de pulmão (PARKIN et al. 1998). Entretanto, o câncer gástrico ainda ocupa uma posição indesejável nas estatísticas das neoplasias malignas, sendo uma das mais comuns formas de câncer no mundo todo. Anualmente, contabilizam-se cerca de 870.000 casos novos, onde cerca de 75% destes pacientes irão a óbito (FERLAY et al. 2001). Em 2006, nos EUA, a estimativa de casos novos foi de

aproximadamente 21.860, sendo que cerca de 50% destes evoluíram para o óbito (JEMAL et al. 2006). No Brasil, no ano de 2008, a estimativa de casos novos foi de cerca de 21.800 (INCA, 2010). Atualmente, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as formas de neoplasia maligna mais comuns no mundo são o de pulmão (12,3%), mama (10,4%) e de cólon e reto (9,4%), sendo que a mortalidade por câncer se dá pelo de pulmão em primeiro lugar (17,8%), seguido pelo câncer gástrico (10,4%) e de fígado (8,8%) (STEWART, 2003).

O declínio no número de pacientes com câncer gástrico observado nos últimos anos se deu, em parte, pelo reconhecimento de certos fatores de risco como a dieta e a infecção pelo microrganismo *Helicobacter pylori*. A maior parte dos casos diagnosticados ocorre em pessoas com mais de 50 anos de idade, principalmente próximo aos 70 anos, com um pico de incidência em homens. Porém, observa-se em grupos de pacientes jovens um aumento da incidência de câncer gástrico, o que pode ser decorrente da introdução de algum outro fator de risco. Na China, por exemplo, a doença atinge mais jovens quando comparado com a incidência ocidental (JEMAL et al. 2006). Outro fator importante para a diminuição do número de casos de câncer gástrico foi a introdução de refrigeradores domésticos e industriais, o qual resultou na melhor conservação de alimentos e uma necessidade cada vez menor de uso de preservativos químicos (COGGON et al. 1989; LA VECCHIA et al,1990).

A incidência do câncer gástrico possui uma distribuição geográfica peculiar, onde se observa uma redução das estatísticas em países como os Estados Unidos, a Inglaterra e no restante do continente europeu. No entanto, em outros países como os da América Latina, entre eles Colômbia, Costa Rica e Chile, a incidência de câncer gástrico e a mortalidade ainda são elevadas. O país que ainda desponta nas incidências é o Japão, com cerca de 780 casos por 100.000 habitantes (KAKIZOE, 1993).

No Rio Grande do Sul, o câncer gástrico representa a terceira causa da doença nos homens e a quinta nas mulheres, com a estimativa para este ano em mais de 1.000 casos novos desta doença (INCA, 2010).

Considerando a prevalência dos diferentes tipos de câncer gástrico, observa-se que mais de 90% das neoplasias gástricas são adenocarcinomas. Na década de 1930, a maioria dos casos originava-se do estômago em sua porção distal. A partir de então, os tumores desta localização foram declinando e os adenocarcinomas de junção gastroesofágica e proximal têm aumentado consideravelmente (FERLAY et al. 2001).

O aumento da incidência de casos tem se elevado em paralelo ao número de casos adenocarcinomas de esôfago. Parece que há uma distinção entre os tumores da transição esôfago gástrica, esôfago distais e dos gástricos distais. A resposta ao tratamento, história natural e prognóstico parece ser similar. A incidência crescente dos adenocarcinomas de esôfago distal, de transição e de estômago proximal pode apresentar um paralelo com o aumento da incidência de esôfago de Barret, obesidade e de colonização estomacal pelo microrganismo *H. pylori* (LAU et al, 2006).

Dessa maneira, a elevada incidência de câncer em populações humanas tem motivado pesquisadores de todo o mundo na busca de novos alvos terapêuticos para o tratamento desta doença. Devido à grande variabilidade nos tipos de tumores existentes, cujas características morfológicas, genótípicas, fisiológicas e de invasão tecidual são distintas, faz-se necessário uma abordagem de tratamento multidirecional, empregando-se drogas quimioterápicas citotóxicas com diferentes mecanismos de ação. Desse modo, e conforme o caso clínico, podem ser utilizados antimetabólitos, agentes alquilantes, inibidores de topoisomerasas e agentes antiangiogênicos, em associações que se mostrem eficazes para a evolução favorável do quadro clínico do paciente (MICHAEL et al. 2008). Além disso, a descoberta de novas drogas quimioterápicas mais eficazes,

potentes e seletivas, capazes de interferir com a reparação de DNA, tornou-se um dos principais alvos de pesquisas de grandes centros e companhias farmacêuticas.

A quimioterapia citotóxica é a modalidade mais efetiva no tratamento dos pacientes com doença metastática gástrica, sendo utilizada para aliviar disfagia, além de outros sintomas, como náuseas, dor, obstrução, perfuração ou até eventos de sangramento quando de uma doença mais localmente avançada. Por outro lado, outras modalidades terapêuticas podem ser utilizadas também no tratamento de câncer gástrico, como cirurgia e/ou radioterapia (FERLAY et al. 2001).

Deve ser salientado que muitos dos agentes antitumorais empregados estimulam respostas biológicas, como o bloqueio do ciclo celular, os quais ativam a maquinaria de reparação do DNA ou ainda ativam o processo de morte celular por apoptose (SLUYSER 2005). A primeira resposta celular ao DNA danificado é o bloqueio do ciclo celular, em uma tentativa de reparar o dano. Entretanto, conforme a severidade e extensão deste dano, uma cascata de sinalização aciona mecanismos alternativos que podem inibir a proliferação celular e ativar vias de morte celular (DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S, 2008).

Outro aspecto a ser considerado no tratamento quimioterápico de câncer gástrico é o desenvolvimento de quimiorresistência, tornando as células tumorais refratárias ao tratamento. Nesse sentido, a ideia de estudar e aplicar combinações ou esquemas de drogas quimioterápicas tem como propósito melhorar a eficácia do tratamento e torná-lo menos tóxico ao paciente. Além disso, as combinações quimioterápicas visam evitar o desenvolvimento da quimiorresistência em células tumorais (CLETON, 2008).

1 A QUIMIOTERAPIA COMO MODALIDADE ANTITUMORAL

Atualmente, a maioria dos agentes quimioterápicos empregados visa induzir a morte das células tumorais por diferentes mecanismos e processos biológicos. Algumas destas drogas são pouco seletivas e extremamente citotóxicas, enquanto que outras, sintetizadas para atuarem em alvos específicos, apresentam uma menor citotoxicidade e alta eficiência. Entretanto, observa-se que as células tumorais são muito heterogêneas em termos bioquímicos e genéticos, o que torna a eficiência do tratamento quimioterápico dependente do tipo de tumor que está sendo tratado. Assim, entender e explorar as razões genéticas pelas quais alguns tumores respondem a determinados tratamentos e outros não é papel central da pesquisa biológica e médica. Como a quase totalidade dos agentes antitumorais convencionais não são seletivos para as células cancerosas, os pacientes em tratamento com essas drogas geralmente apresentam uma diversidade de efeitos indesejáveis (ALLWOOD et al. 2002).

Nesse sentido, elucidar os mecanismos de ação dos quimioterápicos utilizados no tratamento dos diferentes tipos de câncer é de extrema importância para alicerçar o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos, cujas combinações de drogas mostrem-se cada vez mais eficazes para evitar a progressão do crescimento tumoral e, ao mesmo tempo, diminuir os efeitos colaterais clínicos. Para tal, faz-se necessária uma compreensão mais detalhada sobre o mecanismo de ação de tais drogas, a fim de que sejam mais eficientemente administradas ao paciente, contribuindo de forma efetiva como terapia contra o câncer. As drogas quimioterápicas empregadas no tratamento do câncer gástrico podem ser classificadas conforme seu mecanismo de ação mais conhecido. Nesse contexto se tem: (a) inibidores de topoisomerasas, cujo efeito impede o relaxamento do estresse gerado pela torção da molécula de DNA durante a replicação e a transcrição, levando a quebras no DNA; (b) inibidores da mitose e da divisão

celular; (c) agentes alquilantes, que formam ligações covalentes com o DNA, resultando na formação de adutos e de pontes intra e intercadeia e (d) antimetabólitos, que interferem na síntese de precursores de DNA e RNA (MICHAEL et al. 2008).

No câncer gástrico, como a histologia mais frequente é de adenocarcinomas, a maioria dos regimes iniciais de drogas foi baseado na associação de 5-fluouracil (5-FU) mais uma Antraciclina (como a Epirrubicina), onde mais tarde também se associou a Platina (esquema ECF, com Epirrubicina, Cisplatina e 5-FU), demonstrando-se a superioridade da Cisplatina em relação aos esquemas sem Cisplatina. Da mesma forma, várias outras moléculas foram adicionadas ao arsenal quimioterápico, cujas características serão brevemente discutidas neste trabalho.

2 DROGAS QUIMIOTERÁPICAS EMPREGADAS NO CÂNCER GÁSTRICO

2.1 AGENTES INIBIDORES DE TOPOISOMERASE I

2.1.1. Irinotecan

O Irinotecan é um derivado semissintético da camptotecina, um alcaloide quinolínico citotóxico extraído da espécie *Camptotheca acuminata*. Inativo em sua forma inicial, o Irinotecan é convertido pela enzima carboxilesterase para a forma metabolicamente ativa denominada de SN-38 (Fig. 1).

A conversão do Irinotecan até o metabólito ativo SN-38 ocorre inicialmente no fígado. Entretanto, essa conversão pode também se dar no plasma e na mucosa intestinal. Uma vez formado, o SN-38 é conjugado hepaticamente a um metabólito glucuronida, que é essencialmente inativo. Em solução aquosa, o anel lactona do SN-38 é hidrolisado para a forma carboxilato, onde somente 45%-64% do metabólito ativo SN-

38 está presente na forma de lactona ativa até uma hora após a administração da droga. A maior rota de eliminação do Irinotecan e do SN-38 são as fezes e a bile, ocorrendo 50%-70% do *clearance*. Menos do que 1% do SN-38 é eliminado pela urina e a meia vida do Irinotecan e SN-38, considerando a metabolização, é de 8 horas e de 14 horas, respectivamente (DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S, 2008; MICHAEL et al. 2008).

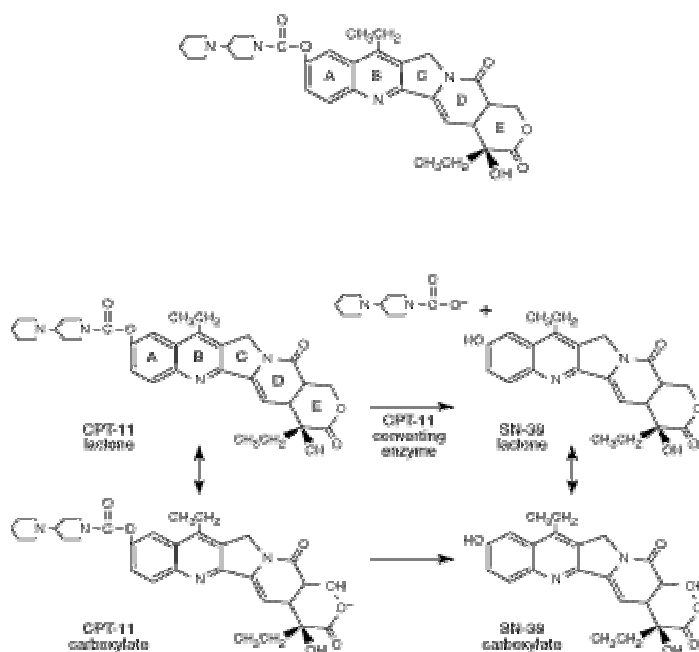


Figura 1. Esquema do mecanismo de ação do irinotecan (modificado de DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S, 2008).

A resistência celular ao irinotecan pode se dar pela diminuição da expressão de topoisomerase I ou por mutações na enzima topoisomerase I, que diminuem a afinidade pela droga. Por outro lado, o aumento da expressão de fenótipos resistentes a várias drogas por meio da superexpressão de glicoproteína P170 (gp170) leva a um aumento do efluxo de Irinotecan e menor acúmulo intracelular da mesma. Outra forma de resistência é observada através da menor atividade e/ou expressão da enzima

carboxilesterase, resultando na diminuição de atividade da SN-38 (DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S, 2008).

2.2 INIBIDORES DA MITOSE E DA DIVISÃO CELULAR

2.2.1. Docetaxel

O docetaxel é um taxano semissintético (Fig. 2) derivado do extrato de *Texus brevifolia*, um teixo raro do Pacífico. Tal composto possui alta afinidade por microtúbulos, estabilizando a sua estrutura devido a um incremento na polimerização da tubulina. Essa estabilização resulta na inibição da mitose e da divisão celular.

O docetaxel possui uma distribuição sistêmica, com ligação extensa (>90%) nas proteínas plasmáticas e celulares, sendo metabolizado pelo sistema hepático microsomal p450. Observou-se que cerca de 75% da droga é excretada por via fecal e menos de 10% é eliminada por via renal. A eliminação plasmática é exponencial, com a meia vida terminal de 11 horas (DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S, 2008; MICHAEL et al. 2008).

Diversos mecanismos de resistência estão relacionados ao docetaxel. Dentre eles: (i) alterações na estrutura tri-dimensional da tubulina com diminuição da afinidade pela droga; (ii) desenvolvimento do fenótipo de resistência-multidroga (MDR-1) com aumento da expressão da gp170, resultando em aumento do efluxo da droga e (iii) resistência cruzada com outros produtos naturais, incluindo alcaloides da vinca, antraciclinas, taxanos e etoposídeos (DE VITA; ROSENBERG'S 2008).

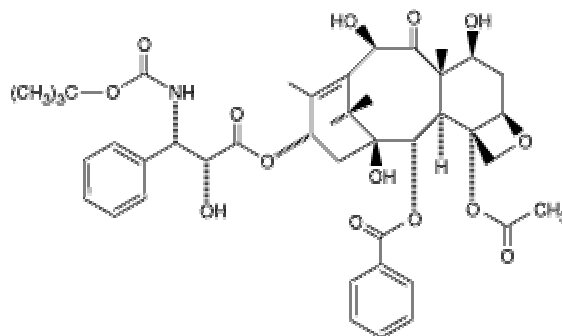


Figura 2. Formula estrutural do docetaxel (modificado de DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S 2008).

2.3 AGENTES ALQUILANTES PLATINADOS

2.3.2 Cisplatina e Oxaliplatina

A cisplatina é um agente alquilante platinado e cuja estrutura é formada por um complexo planar da platina com duas moléculas de amônia e dois íons de cloreto (Fig. 3). Na espécie farmacologicamente ativa ocorre uma substituição dos cloretos pela hidroxila antes da formação da ligação platina-nitrogênio com as bases nitrogenadas do DNA. A estereoquímica do complexo formado possibilita que apenas o isômero *cis*, e não o *trans*, forme ligações covalentes platina-nitrogênio, primariamente nas posições N-7 de desoxiguanilatos, levando à formação de adutos. Quando a interação é com dois desoxiguanilatos adjacentes do DNA, ocorre a formação de pontes intracadeias (*intrastrand DNA crosslink*) em 90% das vezes. Por outro lado, quando estas ligações ocorrem com guaninas de cadeias opostas, formam-se pontes intercadeias (*interstrand DNA crosslinks*). Este último tipo de aduto leva à inibição da síntese de DNA e da transcrição (DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S 2008).

Por sua vez, a oxaliplatina é um derivado da platina de terceira geração e possui uma atividade e toxicidade diferente da cisplatina. O uso da oxaliplatina é uma prática

comum em tratamentos de tumores do trato digestivo, especialmente câncer colo-retal. The continuum of care: a paradigm for the management of metastatic colorectal cancer (GOLDBERG et al. 2007).

No entanto, o potencial terapêutico da oxaliplatina também está sendo explorado em outros cânceres, como de mama, ovário e próstata (CASCINU et al. 2002).

As comparações *in vitro* de oxaliplatina com cisplatina mostraram que a oxaliplatina é capaz de inibir a proliferação celular, formando menos lesões ao DNA em relação à cisplatina (WOYNAROWSKI et al. 2000).

Em um estudo utilizando a linhagem celular de câncer colo-retal HCT-116, a oxaliplatina induziu uma forte inibição da expressão das proteínas CDK1 e ciclina B, o que provocou parada do ciclo celular na transição das fases G₂/M (VOLAND et al. 2006).

Outro estudo utilizando HT-116 mostrou que a oxaliplatina também induziu parada em G₂/M e apoptose através da translocação da proteína pró-apoptótica Bax à mitocôndria e liberação do citocromo c no citosol (ARANGO, et al. 2004).

No entanto, resultados antagônicos acerca dos efeitos da oxaliplatina na progressão do ciclo celular têm sido reportados. Por exemplo, linhagens de células de câncer de ovário OVCA-429 tratadas com oxaliplatina mostraram bloqueio no ciclo celular em G₁ quando proficientes em p53, enquanto que células mutantes em p53 mostraram parada em G₂/M (ARANGO et al. 2004).

Nesse contexto, investigações sobre o efeito de oxaliplatina no ciclo célula, bem como a identificação de genes alvo relacionados à parada do ciclo celular, são essenciais.

Em termos farmacodinâmicos, a cisplatina é distribuída para todos os tecidos, encontrando-se em altas concentrações no fígado e rins (menos de 10% da cisplatina inicialmente administrada permanece no plasma após uma hora decorrida da infusão). A

Oxaliplatina, por sua vez, distribui-se de uma forma complexa no organismo. Cerca de 85% da dose total de oxaliplatina está ligada às proteínas plasmáticas cinco horas após a infusão da droga. Um fato interessante é que uma quantidade expressiva da oxaliplatina é retida nas hemácias após sua administração (DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S 2008).

A eliminação completa da cisplatina e da oxaliplatina do plasma ocorre lentamente devido à ligação covalente destes compostos com proteínas séricas, assim como albumina, transferrina e gama globulina. Aproximadamente 10%-40% da dose administrada de cisplatina é excretada na urina após 24 horas, e com 35%-50% é excretada após 5 dias da administração. Foi também observado que 15% do total da droga administrada é excretada de forma inalterada pelo organismo (DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S 2008).

Um aspecto interessante relacionado com os aspectos farmacodinâmicos da cisplatina e da oxaliplatina é a sua capacidade de reagir com íons cloreto. Nesse sentido, no citoplasma, baixas concentrações de cloreto favorecem a reação de troca do íon cloreto da cisplatina por moléculas de água, resultando na formação de espécies altamente reativas de cloro.

Em termos de quimiorresistência, tem se verificado que a resistência celular à cisplatina e oxaliplatina pode se dar pela diminuição do reparo por excisão de bases, reparo de bases erroneamente pareadas (*MMR – mismatch repair*) e sistema de reparo de excisão de nucleotídeos (BAKER et al. 2007). Considerando este último mecanismo de quimiorresistência, alguns estudos demonstraram que as células que apresentam alterações no sistema de reparação do DNA são mais resistentes à cisplatina e a oxaliplatina (VAN LEUKEN et al. 2009). Exemplos de proteínas que podem tornar a célula mais resistente a estes dois compostos são aquelas pertencentes ao sistema de reparação por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair; NER*). Por exemplo,

o aumento da expressão do gene ERCC1 (*excision repair cross-complementing 1*), que participa diretamente na via NER, está relacionado à resistência de linhagens celulares de cânceres humanos ao tratamento com agentes platinados. Também foi demonstrado que a expressão de ERCC1 em linhagens de células de câncer colo-retal é capaz de prever a sensibilidade das células ao tratamento com oxaliplatina. Além de estudos *in vitro*, a determinação da expressão de ERCC1 também tem sido utilizada amplamente na clínica. Em um estudo recente, os pacientes portadores de câncer de bexiga com baixa expressão do gene ERCC1 mostraram maior período de sobrevivência do que pacientes com expressão aumentada (AZUMA et al. 2007; GOSSAGE & MADHUSUDAN, 2007; ARNOULD et al. 2003).

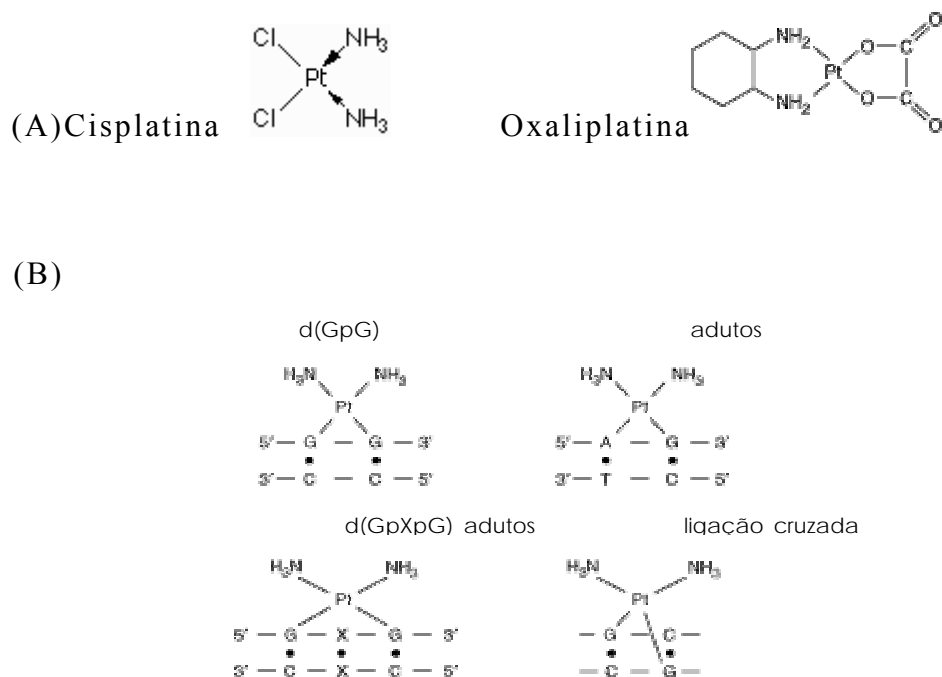
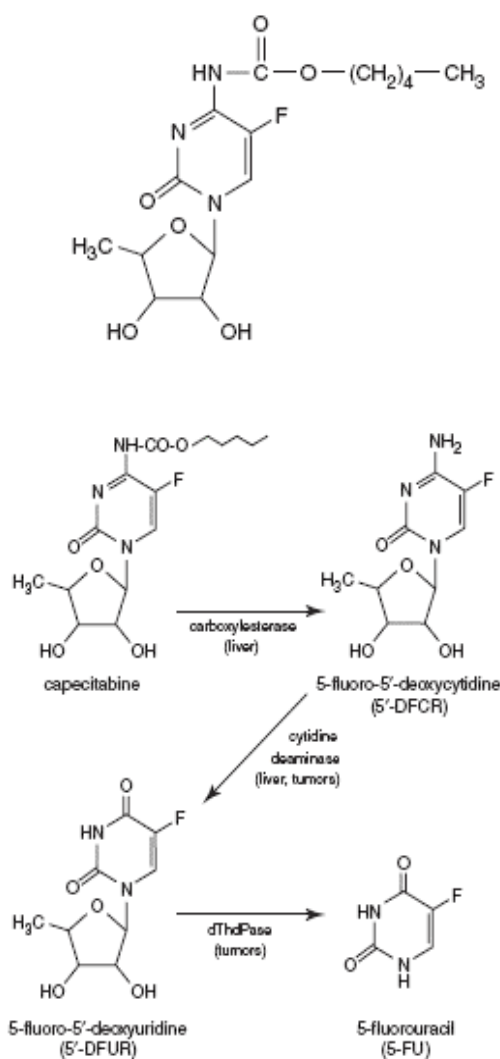


Figura 3. Formula estrutural da cisplatina e oxaliplatina (A), bem como os adutos formados no DNA (B) (modificado de DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S 2008)

2.4 AGENTES ANTIMETABÓLICOS

2.4.1 5-Fluorouracil e Capecitabina

Os agentes quimioterápicos 5-fluorouracil e capecitabina (Figs. 4 e 5) pertencem a um dos principais grupos de quimioterápicos empregados na clínica para o tratamento do câncer. Tanto o 5-FU quanto a capecitabina pertencem ao subgrupo dos nucleotídeos análogos às pirimidinas, sendo capazes de bloquear a progressão do ciclo celular, especialmente durante a fase S. Uma diferença fundamental entre 5-FU e capecitabina é o fato deste último composto ser uma pró-droga administrada oralmente, a qual, no trato gastrointestinal, é convertida para 5-FU (DE VITA; Capecitabine N; ROSENBERG'S 2008).



Figuras 4. Formula estrutural do capecitabine, assim como metabolismo (modificado de DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S 2008).

Dessa forma, o 5-FU é um antimetabólito análogo pirimídico que tem sido prescrito no tratamento de adenocarcinomas de mama, trato gastrointestinal e ovário. A citotoxicidade desta droga é atribuída a três diferentes mecanismos: (i) incorporação de fluoronucleotídeos ao DNA; (ii) incorporação de fluoronucleotídeos ao RNA e (iii) inibição da enzima timidilato sintase (TS ou TYMS). A TS é uma das principais enzimas que atuam na síntese de pirimidinas, agindo de forma essencial na replicação do DNA (LE, et al. 2005). Essa enzima metila o deoxiuracilmonofosfato (dUMP) em deoxitiminamonofosfato (dTMP), e a presença de 5-FU no ambiente intracelular resulta em um mecanismo de inibição da TS por competição direta com dUMP. Esta inibição da TS leva ao desbalanço no *pool* de nucleotídeos intracelular, diminuindo a concentração de dTTP e aumentando a de dUTP (GREM, 1997).

Essa forma de estresse genotóxico pode ativar vias de morte celular programada, resultando na fragmentação do DNA. Além disso, o desbalanço dos dNTPs também atua no sentido de induzir várias enzimas, como endonucleases específicas, que causam danos ao DNA e ativam as proteínas que atuam diretamente nas vias apoptóticas (PETERS et al. 2000; VIOLETTE et al. 2000).

Adicionalmente, o 5-FU pode resultar na morte da célula devido à incorporação direta do metabolito FdUTP na molécula de DNA e de RNA, resultando em alterações no mecanismo de replicação (inibição da síntese de DNA), de transcrição (inibição da síntese de RNA e alterações pós-transcricionais) e, posteriormente, na inibição da própria tradução protéica (DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S 2008).

A capecitabina é uma pró-droga que, ao ser administrada oralmente, é convertida a 5-FU no trato gastrointestinal, possuindo o mesmo mecanismo de ação. Entretanto, a sua metabolização é mais complexa. Uma vez administrada, a Capecitabina é metabolizada no fígado para 5'-desoxi-5-fluorocitidina (5'-DFCR) pela enzima

carboxilesterase e, então, em 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR) pela enzima citidina deaminase, de natureza hepática e também expressa em tecidos tumorais. Uma vez formada, a 5'-DFUR é convertida para 5-FU pela enzima timidina fosforilase, expressa em altos níveis nos tecidos tumorais (DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S 2008).

Considerando a questão do desenvolvimento de quimiorresistência, diferentes estudos têm sido conduzidos a fim de investigar os mecanismos de ação e de resistência ao 5-FU. Nesse sentido, os mecanismos de resistência ao tratamento com o 5-FU estão relacionados à diminuição da atividade das enzimas que convertem a droga em seus metabólitos ativos (principalmente o FdUMP), bem como à inibição incompleta da enzima TS pela droga e seu metabólito e, ainda, ao aumento dos níveis de diidropirimidina desidrogenase, enzima que cataboliza a droga para metabólitos menos tóxicos (DEL TACCA, 2004; DE ANGELIS et al. 2006)

De modo geral, baixos níveis de expressão da enzima TS conferem maior sensibilidade ao tratamento com 5-FU, ao passo que altos níveis de expressão de TS geram resistência (LONGLEY et al. 2003).

Para aumentar a resposta ao tratamento, 5-FU é usado em combinação com outras drogas, como a ciclofosfamida e metotrexato (para o câncer de mama), cisplatina (para os cânceres de cabeça e pescoço) ou oxaliplatina e leucovorin (para o câncer colorretal) (MELEN-MUCHA, 2001; CHEN et al. 2002).

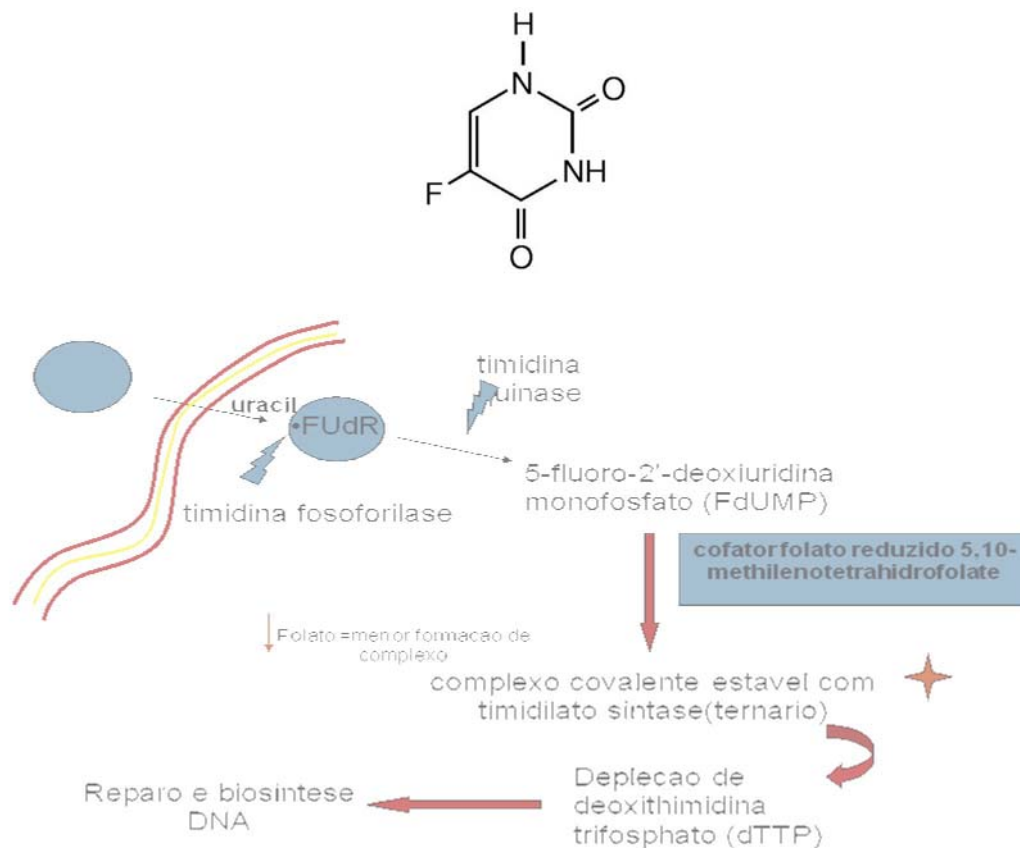


Figura 5. Forma estrutural do 5-fluouracil e ilustração do metabolismo intracelular da droga e os alvos de atuação.

Em termos farmacodinâmicos, a absorção oral destes agentes quimioterápicos é variável e errática, com uma bioavaliabilidade que varia de 40% a 70% para o 5. A capecitabina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, e o pico plasmático se dá em 1,5 horas com o máximo em 2 horas após ingestão oral. A taxa de absorção é reduzida pela alimentação. Após administração endovenosa, o 5-FU é distribuído aos tecidos, com altas concentrações na mucosa do trato gastrointestinal, na medula óssea e no fígado. Um aspecto importante do 5-FU é que este atravessa a barreira hematoencefálica e distribui-se no líquido e tecido cerebral. A ligação às proteínas plasmáticas não está bem caracterizada, mas observou-se que a ligação da capecitabina em proteínas plasmáticas, como albumina, é menor que 60% (mais de 90% da dose de 5-

FU/capecitabina administrada é eliminada pela urina e pelos pulmões) (DE VITA; HELLMANN; ROSENBERG'S 2008).

3 ESQUEMAS QUIMIOTERÁPICOS USADOS PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER GÁSTRICO

A combinação de quimioterápicos, ao contrário do uso isolado de drogas antitumorais, apresenta uma série de vantagens no tratamento de câncer, especialmente o gástrico, pois diferentes mecanismos de ação são utilizados, evitando-se o desenvolvimento de quimiorresistência. A combinação de drogas tem sido comparada em poucos ensaios clínicos. Entretanto, os dados têm mostrado que a combinação possui melhores taxas de resposta sem impacto na sobrevida do paciente (BLEIBERG et al. 1997; OHTSU et al. 2003; KOIZUMI et al. 2008).

Uma meta-análise que incluiu ensaios clínicos realizados em pacientes com câncer gástrico avançado (predominantemente com esquemas combinatórios mais antigos) concluiu que a combinação em primeira linha foi associada com uma modesta melhora na sobrevida, quando comparada com agente isolado. A razão de chance para morte foi de 0,83 a favor da combinação, mas esta melhora foi de apenas um mês de vantagem na sobrevida, indicando que, apesar de serem superiores ao tratamento com pequenas moléculas únicas, as combinações ainda estão longe do ideal para o tratamento de câncer gástrico (WAGNER et al. 2006).

Atualmente, as combinações mais usadas são aquelas que empregam 5-FU/capecitabina, cisplatina, oxaliplatina, docetaxel e irinotecan, apesar de outras drogas também serem utilizadas em combinação, especialmente antraciclinas (COONLEY et al. 1994).

3.1 CISPLATINA E 5-FU

A combinação de cisplatina e 5-FU tem sido uma das mais usadas em câncer gástrico metastático devido à sua atividade e efeitos colaterais já bem estabelecidos. Em um ensaio clínico de fase II, 88 pacientes com doença localmente avançada ou metastática foram submetidos à cisplatina isolada em um braço, e no outro braço foram usadas cisplatina e 5-FU por infusão de cinco dias a cada 21 dias. A taxa de resposta foi o dobro a favor da combinação (35% × 19%), mas a média de sobrevida (33 × 28 semanas) e a taxa de sobrevida em um ano (34% × 27%) não foram estatisticamente significativas (BLEIBERG et al. 1997).

3.2 CAPECITABINA ASSOCIADA

A eficácia comparável de regimes que substituíram o 5-FU em infusão contínua por capecitabina foi diretamente estudada no ensaio REAL-2 em um estudo fase III com 1002 pacientes portadores de câncer gástrico, onde não foi demonstrada inferioridade entre a infusão contínua de 5-FU em relação à troca por capecitabina.

Nesse estudo, os pacientes em ambos os grupos não obtiveram respostas inferiores em taxas de resposta (41, 42, 46, e 48 %) com epirrubicina, oxaliplatina e 5-FU (EOF), epirrubicina, cisplatina e 5-FU (ECX) e epirrubicina, oxaliplatina e capecitabina (EOX), respectivamente ou sobrevida livre de progressão. Inclusive, houve melhora na sobrevida global nos grupos submetidos a capecitabina quando comparados ao 5-FU (razão de chance para morte - *hazard ratio* - de 0,86, 95% CI 0,8 para 0,99) em favor da droga via oral, com efeitos colaterais semelhantes. Os efeitos tóxicos dos esquemas foram similares e os autores concluíram que a substituição da infusão

contínua por capecitabina não comprometeu os resultados (CUNNINGHAM et al. 2008).

Assim, a ausência de bombas de infusão de 5-FU e acessos endovenosos centrais, necessários para as infusões contínuas, são vantagens que a capecitabina apresenta em relação ao 5-FU infusional. Em contrapartida, o custo elevado da capecitabina, bem como a sua restrição de aplicação em pacientes com um trato gastrointestinal que tolere o tratamento, são gargalos que impedem o uso amplo deste quimioterápico.

3.3 TAXANOS COMBINADOS

Alguns regimes quimioterápicos para câncer gástrico aplicam taxanos em associação com outras drogas. Neste trabalho, abordar-se-á apenas o uso de docetaxel, por ser um dos principais taxanos usados em quimioterapia gástrica. Deve ser salientado que não há uma superioridade comprovada entre qualquer um dos taxanos quando comparado a qualquer outro regime de drogas quimioterápicas combinadas, até porque existem poucos ensaios clínicos realizados até o momento (AJANI et al. 2005; THUSS-PATIENCE et al. 2005; VAN CUTSEM et al. 2006; ROTH et al. 2007).

3.3.1 DOCETAXEL COMBINADO

As combinações de docetaxel com cisplatina, 5-FU, capecitabina ou irinotecan são ativos em câncer gástrico, embora o perfil de toxicidade os torne algumas vezes problemáticos (AJANI et al. 2005; THUSS-PATIENCE et al. 2005; VAN CUTSEM et al. 2006; ROTH et al. 2006; TAKAHASHI et al. 2010).

Uma das combinações de docetaxel empregada é a chamada DCF, a qual usa docetaxel, cisplatina e 5-FU. A superioridade da DCF em relação ao 5-FU e à cisplatina apenas foi estudada no ensaio clínico (TAX-325) (VAN CUTSEM et al. 2006), que envolveu 457 pacientes. O grupo que recebeu docetaxel teve uma melhora nas taxas de resposta (37% x 25%), no tempo de sobrevida livre de progressão (5,6 x 3,7 meses) e na sobrevida em dois anos (18% x 9%). Porém, alguns efeitos colaterais se salientaram na associação com docetaxel, com diarreia grau III e IV (20% x 8%) e neutropenia (30% x 14%), sendo que, de forma geral, as toxicidades grau III e IV foram superiores na associação de docetaxel (81% x 75%).

Por outro lado, a combinação DCF foi significativamente superior ao 5-FU e à cisplatina em tempo de piora do estado geral (mediana de 6,1 x 4,8 meses) e a duração da qualidade de vida preservada. Também se documentou uma melhora no ganho de peso e apetite (AJANI et al. 2007).

Baseado nesses dados, o esquema DCF foi aprovado nos Estados Unidos e na Europa para o tratamento do câncer gástrico avançado.

3.4 OXALIPLATINA COMBINADA

As combinações de oxaliplatina têm sido estudadas extensivamente para câncer colo-retal, mas também demonstram atividade no câncer gástrico. Uma variedade de regimes diferentes tem sido estudada em ensaios fase II (oxaliplatina, 5-FU, ácido folínico-FOLFOX; epirrubicina, oxaliplatina, 5-FU-EOF; capecitabina, oxaliplatina-XELOX [CAPOX]) e, em todas as associações, as combinações demonstram taxas de resposta em torno de 40% a 67%, com sobrevida mediana entre 8 e 15 meses (LOUVET, 2002; AL-BATRAN et al. 2004; LORDICK et al. 2005; JATOI et al. 2005; PARK et al. 2006; NERI et al. 2007; DI LAURO et al. 2007; VAN MEERTEN et al. 2007; QIN 2009; LIU et al. 2008).

Dois ensaios clínicos fase III compararam diretamente os regimes baseados na oxaliplatina e os regimes que contém cisplatina (por exemplo, epirrubicina, cisplatina, 5-FU-ECF). Ambos demonstraram eficácia semelhante quando a oxaliplatina é substituída pela cisplatina (CUNNINGHAM et al. 2008; AL-BATRAN et al. 2008).

3.5 IRINOTECAN COMBINADO

A comparação de esquemas contendo Irinotecan versus regimes sem esta droga (principalmente contendo 5-FU e cisplatina) não demonstraram uma sobrevida estatisticamente superior quando se fez uso de Irinotecan (razão de chance para morte de 0,88, 95% CI 0,73-1,06) (ILSON, 1999/2004; AJANI et al. 2002; SHIRAO et al. 1997; BOKU et al. 1999; WAGNER et al. 2006).

Não há ensaios clínicos fase III comparando o irinotecan em combinação versus os esquemas mais modernos com três drogas baseados na platina, como ECF, DCF ou EOX.

4 USO DE FERRAMENTAS DE BIOLOGIA E FARMACOLOGIA DE SISTEMAS PARA A COMPREENSÃO DE TUMORES GÁSTRICOS E DO MECANISMO DE AÇÃO DE QUIMIOTERÁPICOS

A aplicação de conhecimentos relacionados às características químicas e aos processos biológicos envolvidos com diferentes doenças é fonte de inúmeras pesquisas e estudos, e o mesmo é observado em relação ao estudo do câncer gástrico. Porém, os dados são gerados, muitas vezes, em ensaios isolados, tentando estudar as características biológicas da doença e a atividade de drogas quimioterápicas. Dessa forma, o desenvolvimento da neoplasia deve estar relacionado não somente à ação de um único

processo ou molécula, mas sim provavelmente à consequência de inúmeras interações encontradas nas células neoplásicas (FARATIAN et al. 2010; PUJOL et al. 2010).

O grande desafio, em doenças como a neoplasia gástrica, é definir métodos mais pontuais que possam ajudar a desenvolver drogas mais específicas para esta patologia. Além disso, torna-se fundamental minimizar efeitos colaterais e a resistência aos tratamentos quimioterápicos empregados com uso de agentes isolados ou até mesmo em combinações a serem desenvolvidas. Considerando tais pontos, a Biologia e a Farmacologia de Sistemas são dois campos de pesquisas que possibilitam integrar os componentes de um sistema biológico e seus respectivos processos, gerando uma série de hipóteses que possam ser estudadas e validadas, posteriormente, por meio de ensaios em bancada. A extração destes dados que se encontram disponíveis em extensos bancos de dados requer análises de bioinformática (BERGER, 2009; IYENGAR, 2009).

A Biologia de Sistemas emergiu como uma consequência dos projetos de larga escala (ou “ômicos”), sendo considerada como um conjunto de análises matemáticas que visam complementar ou mesmo substituir a visão tradicional de pesquisa biológica, em sua maioria restrita a um nível de complexidade. Os “sistemas” ou “níveis de complexidade” da Biologia de Sistemas podem ser categorizados como a interação entre duas moléculas necessárias para realizar uma determinada função na célula, seguida das interações observadas entre todos os componentes celulares que compõem um tecido até as interações observadas entre indivíduos em um contexto ecológico (FREEMAN, 2008). Assim, a Biologia de Sistemas integra as ferramentas computacionais disponíveis para as análises dos bancos de dados que constituem a fonte primordial de informações a respeito das interações funcionais relacionadas às principais macromoléculas, como proteínas, DNA e RNA. Apesar do crescimento dramático dos bancos de dados de informações biológicas nesses últimos anos, a sua exploração no sentido de gerar informações úteis apresenta um importante desafio computacional. A fim de suplantar

este desafio, uma das principais formas computacionais utilizadas para integrar todas estas informações está presente na Teoria dos Grafos, um ramo da matemática que lida com os fundamentos das chamadas redes de integração (GUSEV et al. 2007; FREEMAN 2008). As redes de integração são estruturas complexas, formadas pelos seus elementos unitários (ou também conhecido por nós) ligados por conectores e que permitem descrever uma ampla variedade de sistemas, sejam esses biológicos, tecnológicos ou sociais (FREEMAN, 2008). Os nós podem representar genes, proteínas, pequenas moléculas, drogas, doenças ou qualquer outra entidade capaz de interagir em um sistema. Os conectores representam a natureza da interação e podem ser diretos ou indiretos, representando interações físicas diretas, ativações, inibições, co-regulação ou qualquer outra relação entre os nós. Os nós e os conectores podem ter vários atributos e anotações. Dessa maneira, uma célula pode ser descrita como uma complexa rede de substâncias químicas (nós) conectadas por reações químicas (conectores). A Internet é uma rede complexa de roteadores e computadores (nós) unidos por ligações físicas (conectores), onde a rede mundial de computadores é uma enorme rede virtual de páginas (nós) conectadas por *hyperlinks* (conectores). Cada um destes sistemas altamente integrados pode ser assim definido como um módulo proteico, em uma analogia bastante precisa com o termo “módulo” usado pelas engenharias. Cada módulo tem a capacidade de integrar-se a outro módulo, e o conjunto de módulos proteicos define as inúmeras vias bioquímicas que compõem uma célula (BERGER, 2009; IYENGAR, 2009).

4.1 A QUESTÃO DA MODULARIDADE BIOLÓGICA

Uma consequência inesperada da Biologia de Sistemas foi a observação de que as redes de interações entre moléculas são formadas por inúmeras sub-redes distintas,

também chamadas de módulos (BERGER, 2009; IYENGAR, 2009). Um módulo é definido, na área da engenharia, como uma estrutura funcional e padronizada que pode ser unida a outros módulos iguais ou que possuam características diferentes para a construção de um objeto mais complexo. Aparentemente, grupos de genes, proteínas ou metabólitos são capazes de formarem módulos específicos, onde a união destes módulos constitui processos biológicos fundamentais para que uma célula consiga exercer uma determinada função. Estes processos biológicos, também denominados de ontologias gênicas, constituem um importante campo de pesquisas dentro da Biologia de Sistemas e são de extrema importância para a visualização do funcionamento de uma rede no contexto celular. Assim, os módulos, como uma consequência matemática da Teoria dos Grafos, são vistos em inúmeros sistemas, como os círculos de amizades em redes sociais ou páginas da Internet que tratam de tópicos similares. Como salientado anteriormente, uma estrutura altamente modular é um componente fundamental de sistemas de engenharia complexos, como aviões modernos ou processadores de computadores (FREEMAN, 2008).

Seguindo esta linha de raciocínio, a biologia está repleta de exemplos de modularidade. Os complexos de proteína-proteína ou proteína-RNA que são estáveis e que variam muito pouco em termos de interação constituem o núcleo central de muitas funções básicas biológicas, desde a síntese de ácidos nucleicos até a degradação proteica. De um modo similar, os grupos de moléculas que são co-regulados temporalmente são conhecidos por atuarem em vários passos do ciclo celular, na transdução de sinais externos em bactérias para a quimiotaxia ou nas vias de resposta a feromônios em leveduras. De fato, a maioria das moléculas em uma célula faz parte de um complexo intracelular com atividade modular, como os ribossomos (WUTCHY, 2003; STADLER, 2003; YU et al. 2007; BERGER, 2009; IYENGAR, 2009). Dessa maneira, para que seja possível estudar a natureza modular de uma rede, bem como se

os módulos estão relacionados a um determinado mecanismo fisiológico, são necessários ferramentas e métodos de medida que são fornecidos pela Teoria dos Grafos. Assim, de uma forma bastante simplificada, um módulo ou agrupamento aparece em uma rede como um grupo de nós altamente interconectados (FREEMAN, 2008).

4.2 O USO DE CENTRALIDADES EM BIOLOGIA E FARMACOLOGIA DE SISTEMAS

Algumas ferramentas matemáticas são frequentemente usadas para estudar diferentes tipos de redes. Elas incluem a análise de uma estrutura global de rede, a presença de motivos ou módulos, agrupamentos e centralidade (MILO et al. 2002; WUTCHY et al. 2003; HOLME et al. 2003).

As centralidades constituem um conjunto de ferramentas matemáticas que permitem identificar aqueles nós que possuem uma posição relevante na arquitetura global da rede (BORGATTI et al. 2005). Dessa forma, foram desenvolvidos alguns conceitos que definem a importância desses nós na rede como, por exemplo, o grau do nó, intermedialidade (*betweenness*), *eigenvectors*, assim como outros (BORGATTI et al. 2005). Tais conceitos podem ser aplicados a diversas redes de natureza tecnológica, biológica e de infraestrutura. É importante salientar que as centralidades têm sido estudadas em sistemas biológicos para identificar proteínas que são essenciais para um organismo ou que possuem uma posição importante em um determinado processo biológico (ARANGO et al. 2004; BORGATTI et al. 2005).

Entre as medidas de centralidade, o grau (*degree*) representa quanto o nó está conectado a outros nós adjacentes. Em outras palavras, o grau do nó representa a “popularidade” de um determinado nó em uma rede estudada. Nós com alto grau de conectividade são denominados de *hubs*, sendo proteínas cujas alterações resultam em

sérios problemas fisiológicos para o organismo. Por sua vez, o *stress* é uma medida de centralidade que representa quanto um nó é literalmente atravessado por um número elevado de rotas ideais ou vias curtas de uma rede. Já o termo de intermedialidade (*betweenness*) representa uma medida similar ao *stress* e revela o quanto um nó específico está entre todos os outros nós na rede ou entre determinados processos. De forma geral, o grau, o *stress* e o *betweenness* demonstram a influência de um nó em uma rede na propagação de uma informação por toda a rede. Outro conceito de centralidade é o da chamada proximidade (*closeness*), que indica o nível de proximidade de um nó relacionado a outros nós ou motivos. Por fim, o gargalo (*bottleneck*) é uma medida de centralidade que define todos aqueles nós com altos valores de intermedialidade, configurando-se como pontos centrais que controlam a propagação de informação para outros nós integrantes da rede. Os gargalos também indicam todos nós que estão entre agrupamentos altamente interconectados, onde a sua remoção destes pode dividir a rede inteiramente (HOGUE, 2003; ARANGO et al. 2004; ESTRADA, 2006; YU et al. 2007; BERGER, 2009; IYENGAR, 2009; BADER, 2010; ESTRADA, 2010; HATANO, 2010).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo geral analisar como as principais combinações quimioterápicas para o tratamento de câncer gástrico atuam em termos de redes de interação entre proteínas e pequenas moléculas, e como tal relação está associada ao surgimento de quimiorresistência. Esta pesquisa também tem como objetivo geral a identificação de novos alvos potenciais para o tratamento quimioterápico de câncer gástrico usando ferramentas de farmacologia de sistemas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Prospeccionar bancos de dados proteômicos e de interação de pequenas moléculas-proteínas de *Homo sapiens* para a busca dos principais interatores associados com as drogas quimioterápicas utilizadas para o tratamento de câncer gástrico, como 5-FU, Cisplatina, Docetaxel, Oxaliplatina, Irinotecan e Capecitabina.
2. Construir redes de interação a partir da prospecção interatômica realizada usando o programa Cytoscape versão 2.6.3.
3. Analisar a topologia das redes de interação por meio da busca de motivos principais, utilizando o algoritmo descrito no programa MCODE.
4. Verificar quais são os processos biológicos super-representados nos motivos observados por meio do programa BiNGo.
5. Buscar novos alvos proteicos com potencial para tratamento quimioterápico por meio da análise de centralidades de redes usando os algoritmos descritos nos programas Centiscape e Cyto-Hubba.

6. Definir, dentro da rede de interação, quais nós são considerados *bottlenecks* e a sua utilidade para a busca de novos regimes combinados de quimioterapia.

CAPÍTULO 1

A systems pharmacology analyses of major chemotherapy combination regimens used in gastric cancer treatment: discovering potential new protein targets and drugs

Artigo submetido para publicação

A systems pharmacology analysis of major chemotherapy combination regimens used in gastric cancer treatment: discovering potential new protein targets and drugs

Joemerson Osório Rosado^{1,2}, João Antonio Pêgas Henriques^{1,3} and Diego Bonatto^{1,3,*}

¹Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS, Brasil

²Instituto do Câncer do Hospital Pompéia, Hospital Pompéia, Caxias do Sul, RS, Brasil

³Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil

Running Head: Gastric cancer and systems pharmacology

*** Address to which correspondence should be sent**

Diego Bonatto

Centro de Biotecnologia da UFRGS - Sala 219

Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Avenida Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43421

Caixa Postal 15005

Porto Alegre – Rio Grande do Sul

BRAZIL

91509-900

Phone: (+55 51) 3308-6080

Fax: (+55 51) 3308-7309

E-mail: diegobonatto@gmail.com

Contract/grant sponsor: CNPq; FAPERGS

Abstract

Gastric cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide, and treatment options include surgery and chemotherapy. Because of its prevalence, chemotherapy for gastric cancer treatment represents an active area of pharmacology research, and different small compounds have been used as single treatments or in combination therapy. Unfortunately, chemoresistance is a common phenomenon in gastric cancer cells, and the current arsenal of small compounds used in chemotherapy is not effective for long periods of treatment. Thus, to understand how gastric cancer cells develop chemoresistance and also to find new protein targets and small compounds for gastric cancer treatment, a systems pharmacology-based study was performed using the proteomic and small compounds-protein interaction data available for *Homo sapiens*. A major physical protein-protein and chemo-protein interaction (PPPI-PCPI) network was obtained, and five subnetworks representing different biological processes were observed. Interestingly, the small compounds currently used to treat gastric cancer converge on the same biological processes, potentially resulting in the development of chemoresistance. This analysis was followed by a network centrality study, which allows for selection of protein targets and/or small compounds, termed bottlenecks, that are defined as central nodes. The bottlenecks control the flow of biological information within the network, and their disruption can break the entire network into small components. From ten major bottlenecks observed within the network, seven bottlenecks represent new protein targets that are suitable for the development of new combinatory drug regimens for gastric cancer treatment.

Keywords: Drug convergence; Gastric cancer; network centralities; serine/threonine kinase inhibitors; small compound inhibitors; systems pharmacology.

Introduction

Gastric cancer is among the most common malignancies in the world [1]. In addition, gastric cancer is the leading cause of cancer-related deaths because the majority of cases are diagnosed in the advanced stages of disease [2]. The prognosis for patients with gastric cancer is poor, with 5-year survival rates in the range of 5-15% [3], and the primary modality of management is surgery. Unfortunately, up to 80% of patients will develop new tumor foci [4, 5]. Considering these statistics, many clinical trials have analyzed the role of chemotherapy over the best supportive care to treat advanced gastric cancer [6]. However, gastric cancer becomes refractive to chemotherapy drugs over time, requiring new small compounds or multi-drug combinations [7].

Modern gastric cancer chemotherapy is mainly based on combination therapy rather than single agent treatment in order to maximize the tumor-killing effect and limit drug-specific toxicity, allowing for more efficient treatment [8]. Studies have shown the benefit of combination regimens, such as infusional 5-fluorouracil (iFU), doxorubicin and methotrexate (FAMTX) [9] or etoposide, folinic acid and iFU (ELF) [6]. Other combination regimens investigated include: (i) epirubicin, cisplatin and iFU (ECF) [10]; (ii) iFU plus cisplatin (FUP) [11]; (iii) iFU, folinic acid and irinotecan (FOLFIRI) [11]; (iv) iFU, folinic acid and oxaliplatin (FOLFOX) [11]; (v) docetaxel, iFU and cisplatin (DCF) [11] and (vi) capecitabine (a fluoropyrimidine precursor of 5-FU orally administered), folinic acid and oxaliplatin (XELOX) [12]. Interestingly, some of these combination regimens, like FAMTX, ELF and ECF (defined as classical or old combination regimens) [13] yield overall response rates (ORRs) of up to 51%, but the median survival time in patients with advanced disease has remained below 10 months [13]. Other combination regimens, like those regimens containing docetaxel in first or second-line treatments, appear to improve the ORRs [14]. However, the median survival

time is still below 10 months with the introduction of docetaxel or other agents such as oxaliplatin and irinotecan [14].

Thus, one important point about the use of combination regimens is that each drug has different molecular targets in the cell, so increasing the number of targets may improve the treatment [15]. Surprisingly, this result is not currently observed with the actual drug combinations, and many different mechanisms are used to explain the development of gastric cancer resistance, including multiple-drug resistance (MDR), micro-environment remodeling, hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) upregulation and intra-tumor genetic heterogeneity [15].

Based on these facts, the use of other techniques that could aid in the development of new drugs for combination therapy becomes essential, and this search involves targeting different proteins and/or biological processes in gastric cancer cells in order to avoid MDR. Currently, the massive volume of “omic” information (genomic, transcriptomic, proteomic, and others) generated by different technological approaches is being explored using systems biology tools that integrate all of this information in graphs or biological networks [16] using computational tools. The study of biological networks using a systems biology approach has been successfully applied to tumor research [16]. The use of systems biology to analyze how small compounds (including chemotherapy drugs) interact with proteins or other macromolecules has led to the development of the systems pharmacology field [17]. Systems pharmacology allows us to understand how drugs act in different tissues and cell types, as well as the effects of multiple actions within a single cell type that are due to the presence of several interacting pathways [16, 17]. These studies are important from a translational perspective because they help identify new drug targets and predict adverse events, and they can improve the safety and efficacy of existing drugs and/or combination schemas [18].

In this study, a systems pharmacology approach was applied to verify how the current major drugs used in chemotherapy combination schemas (5-FU, cisplatin, oxaliplatin, irinotecan, docetaxel, and capecitabine) for gastric cancer treatment integrate in the context of chemo-protein and protein-protein interaction networks. Moreover, clustering analyses of the major biological processes derived from the networks were conducted to evaluate the molecular and cellular mechanisms underlying the action of major chemotherapy drugs used for gastric cancer treatment. Additional network centralities analyses allowed us to determine new potential protein targets and identify small compounds that could be used in new drug combinations in gastric cancer treatment.

Materials and Methods

Interactome network design and global topological analysis

The data mining, screening, and network design of the PCPI and PPPI networks between 5-fluorouracil, cisplatin, oxaliplatin, irinotecan, docetaxel, and capecitabine with potential protein targets was performed using Cytoscape software, version 2.6.3 [19]. For this purpose, the interactome protein-protein and small compounds-protein data available for *Homo sapiens* was used. These data were downloaded from the STITCH 2.0 (<http://stitch.embl.de/>) and STRING 8.3 (<http://string.embl.de>) databases using the following parameters: active prediction methods all enabled except text mining; no more than 50 interactions; high confidence score (0.700); and network depth equal to 2. All searches were made to saturation. The interactome networks obtained from this first screening for each chemotherapy combination schema were then combined in a unique interactome network by employing the union function of the Cytoscape core plugin Merge Networks [<http://www.cytoscape.org/plugins2.php>] (Fig. 1). This major interactome network was then analyzed with Molecular Complex Detection (MCODE) software [20], a Cytoscape plugin available at

<http://www.cytoscape.org/plugins2.php>, to detect the major subnetworks that compose the major interactome network. The parameters used for MCODE to generate the subnetworks were: loops included; degree cutoff 2; deletion of single connected nodes from cluster (haircut option enabled); expansion of cluster by one neighbor shell allowed (fluff option enabled); node density cutoff 0.1; node score cutoff 0.2; kcore 2; and maximum depth of network 100. A MCODE score was calculated for each protein/small compound present in the interactome networks.

Network centralities and local topological analyses

Major network centralities (node degree, stress, closeness, and betweenness) were computed from the PCPI and PPPI networks using the Cytoscape plugin CentiScaPe 1.0 [21]. The local topologies of the network (HB, H-NB, NH-B, and NH-NB) were defined considering the threshold generated by each centrality calculated by CentiScaPe 1.0. In this sense, HB was defined as a node with a value above the threshold calculated for node degree and betweenness, H-NB is a node with high node degree and low betweenness, NH-B is a node with low node degree and high betweenness, and NH-NB is a node with both low node degree and betweenness. A PCPI-PPPI subnetwork containing the 100 major nodes with the highest HB and NH-B scores was drawn using the Cytoscape plugin Cyto-Hubba [22] and is available at <http://hub.iis.sinica.edu.tw/cytoHubba>.

Gene ontology analysis

Gene ontology (GO) clustering analysis was performed using Biological Network Gene Ontology (BiNGO) [23] software, a Cytoscape plugin available at http://chianti.ucsd.edu/cyto_web/plugins/index.php. The degree of functional enrichment for a given cluster and category was quantitatively assessed (p value) by hypergeometric distribution [24] and a multiple test correction was applied using the false discovery rate (FDR) [25] algorithm, fully implemented in BiNGO software.

Overrepresented biological process categories were generated after FDR correction, with a significance level of 0.05.

Results and discussion

Analyzing the protein partners for the major chemotherapy drugs currently used in gastric cancer treatment (5-fluorouracil, cisplatin, oxaliplatin, irinotecan, docetaxel, and capecitabine), using the available data about the physical interactions between different human proteins and small compounds, results in a large network composed of 417 nodes and 3,830 edges (Fig. 1 and Supplementary material S1). These nodes are distributed among five interconnected subnetworks and unclustered proteins/small compounds as identified by the MCODE program (Fig. 1; Tables 1 and 2). The subnetworks represent five discrete biological processes, as identified by gene ontology (GO) analysis (Tables 1 and 2): (i) chromosome segregation and ubiquitin-protein ligase regulation; (ii) nucleobase, nucleoside and nucleotide metabolic processes/DNA replication; (iii) DNA replication/RNA transcription, apoptosis, and steroid metabolism; (iv) apoptosis activation; and (v) glutathione/alkene/leukotriene metabolism.

As expected, unclustered proteins/small compounds that could not be classified into any subnetwork were also identified in the network (Fig. 1). These unclustered proteins/small compounds, when submitted for GO analyses, belonged to the following groups: DNA damage response, apoptosis induction, cell cycle checkpoint, and response to steroids (Table 2).

Considering these preliminary results, both the network and its subnetworks were subjected to a more detailed analysis to gather information about the proteins and their biologically associated processes.

The chromosome segregation and ubiquitin-protein ligase regulation subnetwork

The chromosome segregation and ubiquitin-protein ligase regulation subnetwork gathered from the major network of physical chemo-protein and protein-protein interactions (PCPI and PPPI networks, respectively) (Figs. 1 and 2) is represented by proteins that are essential for the control of the mitotic phase of the cell cycle, specifically metaphase. We observed that this subnetwork contains approximately 25% of the total nodes and 56% of the total edges found in the major PCPI-PPPI network and thus is an important motif. Moreover, the topological and motif analysis of the proteins that comprise this subnetwork indicated that it can be defined as a clique, a subset of nodes in which every possible pair of points is directly connected by a line [26].

Thus, many of the proteins that participate in the spindle and kinetochore assembly/disassembly were found within the chromosome segregation and ubiquitin-protein ligase regulation subnetwork, including KIF23, ZWINT, BUB1B, NDC80, AURKA, AURKB, STMN1, and UBE2C (Fig. 2 and Table 1). In metaphase, both spindle formation and kinetochore organization are necessary to ensure the correct segregation of sister chromatin, leading to completion of karyokinesis [27]. Our systems pharmacology analysis also indicated the presence of proteins that regulate ubiquitin-ligase activity during mitosis (Table 1). Some of these proteins, like ANAPC2, FZR1, CDC20, CDC16, CDC27, PSMD11, PLK1, and BUB1B, directly participate in the formation and regulation of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C), a large multiprotein E3 ubiquitin ligase that targets key mitotic regulators for destruction by the proteasome [28]. Additionally, the activity of the APC/C complex is fundamental for the degradation of many proteins that participate in mitotic spindle and kinetochore assembly, like aurora kinases (AURKA and AURKB; Fig. 2 and Table 1) and polo-like kinase 1 (PLK1; Fig. 2 and Table 1) [28, 29].

The formation and disassembly of the mitotic spindle and kinetochore and its regulation by the APC/C complex is a very well-orchestrated process that is not well

understood in eukaryotic cells, despite intense research in the field [28-30]. In gastric cancer cells, some kinetochore proteins, like BUB1, BUBR1, and BUB3, that participate in the metaphase checkpoint and ensure the correct segregation of chromosomes to the daughter cells were overexpressed in up to 80% of gastric cancer cases [31]. It is virtually unknown how the APC/C mechanism works on gastric cancer cells, and it is therefore becoming an important target for future studies in gastric oncology.

The drugs conventionally used to treat gastric cancer and explored in this work do not target any protein of this subnetwork, with the exception of docetaxel. Docetaxel is a second generation taxane [32] and appears to interact with and inhibit the NDC80/HEC1 protein (Fig. 2). However, the literature regarding this association is very limited [33].

The nucleobase, nucleoside and nucleotide metabolic processes/DNA replication subnetwork

The second subnetwork associated with the major PCPI-PPPI network is related to the metabolism of nucleotides and DNA replication (Table 1 and Fig. 3). The presence of this subnetwork was not surprising because 5-FU, a fluoropyrimidine analog widely used in gastric cancer treatment [34, 35], is metabolized by specific nucleotide metabolism proteins that appear in the subnetwork, including UPP1, UPP2, UMPS, and ECGF1 (Table 1 and Fig. 3). Briefly, the drug 5-FU is metabolized to 5-fluoro-uridine-5'-triphosphate (FUTP) and/or 5-fluoro-2'deoxyuridine-5'-monophosphate (FdUMP), which are the active compounds responsible for the therapeutic properties of 5-FU [35-37]. Once formed, FUTP is incorporated into RNA, while FdUMP suppresses the activity of thymidylate synthase (TYMS; Table 1), an essential DNA *de novo* synthetic enzyme that catalyzes the methylation of deoxyuridine monophosphate (dUMP) to deoxythymidine monophosphate (dTMP) [35, 38]. FdUMP

and TYMS form covalent ternary complexes with 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-CH₂-FH₄), which subsequently inhibits DNA synthesis [38]. Other proteins that are necessary for nucleotide metabolism, including those related to purine nucleotides (Table 1), were also present in the subnetwork (Fig. 3), but their relationship with 5-FU toxicity and the other drugs observed in this work is unknown at the present moment.

In addition to purine- and pyrimidine-associated enzymes, another group of proteins associated with nucleotide metabolism, the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (ENTPDase or ENTPDs) were found within the subnetwork (Table 1 and Fig. 3). The ENTPD family comprises ectoenzymes that hydrolyze extracellular nucleoside tri- and diphosphates, as well as nucleoside analogue monophosphates [39-41]. Consequently, a relationship between nucleotidase activity and clinical response to nucleoside analogues has been shown, suggesting a role for nucleotidases in MDR, as observed in acute myeloid leukemia [42, 43]. Strikingly, the analysis of ENTPD expression and/or activity during 5-FU treatment has not been reported until now for gastric cells.

Two closely related subnetworks: DNA replication/RNA transcription, apoptosis, and steroid metabolism and apoptosis activation mechanisms

The third and fourth subnetworks observed in our work comprise proteins related to DNA replication, RNA transcription, apoptosis, and steroid metabolism (Table 1 and Figs. 4 and 5) (Table 1 and Fig. 5). Some of the drugs analyzed in this work (e.g., 5-FU, irinotecan, oxaliplatin, and cisplatin) act directly on DNA replication and RNA transcription mechanisms, inhibiting those processes and culminating in cell death by apoptosis (Table 1 and Fig. 4). For example, oxaliplatin, a diamminocyclohexane (DACH) platinum agent, and cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) induce intrastrand crosslinks between two adjacent guanines or two adjacent guanine and adenine adducts in DNA [44-46]. These crosslinks interfere with DNA replication and

RNA transcription, leading to apoptosis by a caspase-dependent mechanism [44-46]. Platinum agents can induce a chemical knock-down of BCL2 activity [47], blocking the anti-apoptotic mechanism that is responsible for tumor resistance to conventional chemotherapeutic treatment. Another compound, irinotecan, is a camptothecin derivative that inhibits topoisomerase I, an essential protein that controls and alters the topologic states of DNA during DNA replication and RNA transcription [48] and also induces apoptosis by a FAS-dependent pathway [49]. The other compounds analyzed in this work, 5-FU, docetaxel, and capecitabine, can also inhibit DNA replication and RNA transcription in gastric tumors, activating the apoptotic program in those cells [11, 32, 35, 50].

One intriguing aspect of the third subnetwork is the presence of processes associated with steroid metabolism, which include proteins related to sterol/cholesterol homeostasis and cholesterol efflux (Table 1 and Fig. 4). In gastric tumors, the importance of steroid metabolism is not clear in the pathogenesis of disease. However, some research has indicated that the development of MDR by tumor cells includes the activation of a caveolin (CAV1)-dependent cholesterol efflux pathway that helps to deliver the chemotherapeutic drugs from intracellular membranes to the cytoplasmic membrane against a concentration gradient [51]. This active transport mechanism results in the delivery of the chemotherapy drug to the extracellular space by drug efflux pumps such as P-glycoprotein (P-gp), a product of the human MDR1 gene 2 [51]. Additionally, overexpression of APOE (Table 1), a glycoprotein that participates in lipoprotein metabolism and cellular lipid transport, can negatively regulate the activity of caspase 3 (CASP3; Table 1) [52], thus contributing to the development of tumor-associated apoptosis resistance [53, 54]. The ABCA1 protein (Table 1 and Fig. 4), an ATP-binding cassette transporter type 1 that is related to cholesterol efflux [55] and is associated with the MDR process, binds to both apolipoprotein A1 (APOA1; Table 1

and Fig. 4) and CAV1 (Table 1 and Fig. 5) and acts as a structural platform for the maintenance of cholesterol efflux-associated caveolins [55].

Subnetwork four (Table 1 and Fig. 5), which is related to the control and induction of the apoptotic mechanism, clearly shows the participation of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins and overlaps with proteins that belong to subnetwork three (Figs. 1 and 5). In subnetwork four, CAV1 is directly connected to RIPK1, a serine-threonine kinase involved in the transduction of tumor necrosis factor (TNF) signaling that controls both the inflammation mechanism mediated by the I- κ B kinase/NF- κ B cascade and apoptosis induced by TNF [56]. The NF- κ B cascade, of which some proteins can be found within subnetwork four (Table 1 and Fig. 5), is constitutively activated in human gastric cancer cells [57], allowing the expression of genes that suppress apoptosis and promote cell growth in tumor cells [57]. Another important aspect of subnetwork four is the presence of proteins associated with the induction of apoptosis by death domain receptors (Table 1 and Fig. 5), which includes the FAS-associated death domain (FADD) protein, an apoptotic adaptor molecule that recruits caspase 8 (CASP8; Table 1 and Fig. 5) or caspase-10 to the activated FAS or TNFR-1 receptors [58]. FADD is also a protein that appears as two major intracellular isoforms: phosphorylated FADD (pFADD) and non-phosphorylated FADD [59], which control different pathways that lead to apoptosis and inflammation [60]. For gastric cancer cells, the intracellular location of pFADD is different when compared to non-tumoral gastric cells, but the significance of this observation is not clear [59].

Finally, docetaxel is strongly linked to proteins that control the apoptotic program (Fig. 5), including BH3-interacting domain death agonist (BID; Fig. 5), CASP3 (Fig. 5), and poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1; Fig. 5). Docetaxel enhanced the PARP-1 cleavage and caspase activation in prostate cancer cells that were

further treated with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [61].

Considering all of the information that supports subnetworks three and four, we speculate that cholesterol efflux has a major role in the development of MDR and the activation of the anti-apoptosis and inflammatory mechanisms in gastric cancer. Additional data should clarify the role of these processes in gastric cancer.

The glutathione/alkene/leukotriene metabolism subnetwork

The data gathered from subnetwork five indicated that metabolism of glutathione (GSH) and alkenes/leukotrienes are two important pathways related to gastric cancer chemotherapy drug-associated treatment (Table 1 and Fig. 6). GSH metabolism is represented by different proteins in the subnetwork, including (i) the GSH S-transferase α 1 and 2 (GSTA1/GSTA2; Table 1 and Fig. 6), (ii) the microsomal GSH S-transferase 1 (MGST1; Table 1 and Fig. 6), (iii) the GSH S-transferase μ 1 and 2 (GSTM1/GSTM2; Fig. 6), (iv) the GSH S-transferase π 1 (GSTP1; Fig. 6), and (v) the GSH S-transferase θ 1 (GSTT1; Fig. 6).

All GSH transferases (GSTs) can be classified into two groups: cytosolic GSTs and mitochondrial GSTs [62]. The cytosolic GSTs comprise the great majority of GSTs and are divided in α , μ , σ , π , σ , θ , and ζ classes [62]. Considering the gastrointestinal tract (GIT), GSTP1, GSTA1, and GSTA2 are the major components expressed [63, 64].

Another small group of GSTs, termed microsomal GSTs or MAPEG (membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) proteins, are important mediators in drug detoxification and antioxidative protection of the phospholipid components of biological membranes [65].

An important point about the mechanism of action of GSTs is that these proteins induce MDR in cancer cells by making chemotherapy drugs less reactive and more soluble in water [66] after the nucleophilic attack of the sulfur atom of GSH on the

electrophilic group of the drug, which increases the drug's clearance from the organism [66]. Other mechanism of detoxification are associated with the activities of MDR proteins (MRPs) [67]. These processes are related to a number of examples in the literature about the synergism between MRPs and GSTs, including the synergism between GSTA1 and either MRP1 [68] or MRP2 [69] transporters that remove chemotherapy drug conjugates.

Another interesting aspect of the network is the connection of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2L2; Fig. 6) with GSTA2 (Fig. 6). NFE2L2 (also named NFR2; <http://www.genecards.org>) belongs to the basic-leucine zipper NF-E2 family of transcription factors, which regulate expression of globin genes during erythroid development and also activate the expression of phase 2 detoxifying enzymes, including GSTs [70]. Data gathered from NFR2-deficient mice demonstrated that the levels of GSTs are diminished, making the animal more susceptible to drugs that induce carcinogenesis [70]. Another important connection observed within this subnetwork is the association of Fanconi anemia group C protein (FANCC) and mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8) with GSTP1 (Fig. 6). The importance of the association of FANCC with GSTP1 is observed in the myeloid progenitor cell line, and this association prevents the induction of apoptosis after factor deprivation [71]. Curiously, the same association has not been studied in gastric cancer cells. On the other hand, the association of MAPK8 and GSTP1 has been detected by biochemical assays (<http://string.embl.de>), but the significance of this link is virtually unknown despite studies showing that MAPK signaling may be involved in the activation of GST gene expression by butyrate [72].

Among all connections observed for GSTs, their links with different isoforms of cytochrome P450 proteins (CYPs; Table 1 and Fig. 6) are highlighted here. CYPs appear to be important for the detoxification of all drugs analyzed in this work,

including docetaxel, which is metabolized through hydroxylation by CYP2C8, CYP3A4, and CYP3A5 [73], which are all represented in our subnetwork. CYP3A4 and CYP3A5 also mediate irinotecan detoxification in gastric cancer [73]. The literature about the interactions of CYPs and GSTs is mainly restricted to gene polymorphism studies [73], and little is known about these interactions in gastric cancer. However, the metabolism of leukotrienes/alkenes mediated by CYPs (Table 1 and Fig. 6) and by arachidonate 5-lipoxygenase protein (LOX5; Table 1 and Fig. 6) may connect CYPs and GSTs. Polyunsaturated fatty acids, such as arachidonic acid (AA), are esterified at the sn-2 position of membrane phospholipids and are released following activation of phospholipase A2 and subsequent metabolization by the cyclooxygenase (COX), LOX, and CYP pathways. This process generates a family of biologically active mediators called eicosanoids [74]. The five mammalian LOXs (LOX1 to 5) form compounds called hydroperoxyeicosatetraenoic acids (HPETEs), which are then converted to hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) via glutathione peroxidases, especially GSTs [74]. In this sense, LOX5 induces the formation of 5(S)-HETE and leukotrienes, and 5-HETE is involved in cell growth induction, inhibition of apoptosis, cell adhesion and invasiveness by extracellular matrix (ECM) destruction [74]. While the action of 5-HETE in gastric cancer is not well known, LOX5 expression, induced in colon cells by cigarette smoking, promotes the synthesis of pro-inflammatory markers, which are an essential step in the development of cancer [75].

Two other proteins associated with CYPs are aldehyde dehydrogenase 3 (ALDH3; Fig. 6) and UDP glucuronosyltransferase 2 polypeptide B7 (UGT2B7; Fig. 6), both acting in the detoxification of drugs [76, 77], but their roles in the progression of gastric cancer are still not clear.

Unclustered proteins and almost all drugs used against gastric cancer are associated with DNA damage response and apoptosis

The unclustered proteins and small compounds subnetwork includes proteins that are associated with the induction of apoptosis by DNA damage, DNA repair by homologous recombination, activation of cell cycle checkpoints, and response to a steroidal stimulus (Table 2).

Some of the major proteins found within this subnetwork are the breast cancer type 1 (BRCA1) and type 2 susceptibility proteins, two nuclear phosphoproteins that play a role in maintaining genomic stability and act as tumor suppressors [78]. In gastric cancer, a single-nucleotide polymorphism (SNP) in BRCA1 improves the overall survival of patients treated with docetaxel and cisplatin [79], but other work has demonstrated that some BRCA1/BRCA2-associated SNPs increase the incidence of gastric cancer in the population [80]. In addition, both BRCA1 and BRCA2 interact with RAD51 to promote the repair of DNA double-strand breaks (DSBs) by homologous recombination [78]. The repair of DSBs induced by cisplatin, oxaliplatin, 5-FU, or irinotecan requires the activation of a cell cycle checkpoint pathway, which is represented in the subnetwork by the proteins cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A; Table 2), checkpoint-like protein kinase 2 (CHK2; Table 2), ataxia telangiectasia mutated (ATM; Table 2), and BRCA1 itself (Table 2). Cell cycle checkpoints are necessary to allow the repair of DSBs, and there is accumulating evidence that gastric carcinogenesis frequently involves abnormalities in the expression of cyclins and other cell cycle-related genes [81], resulting in a defective cell cycle checkpoint. In addition, a defective cell cycle checkpoint in gastric cancer cells could be related to an increase in genomic instabilities such as chromosome imbalances, which are commonly observed in gastric cancer cells [82].

Other biological processes, including response to a steroid hormone stimulus and β -tubulin folding, are also represented in this unclustered subnetwork (Table 2). The effect of steroid hormones on the progression and/or inhibition of gastric cancer is

controversial, but some studies have indicated that progesterone protects against gastric cancer, especially in women before menopause [83-85]. Here, the interplay of steroid hormones with some proteins that are represented in the unclustered subnetwork, like BRCA1 and hepatocyte growth factor (HGF; Table 2), are also not well understood [85, 86]. On the other hand, the importance of β -tubulin-folding proteins (represented by TBC sequences in the unclustered subnetwork; Table 2) have not been implicated in gastric cancer progression. However, the overexpression of the isoform TBCC in human breast cancer cells increases its sensitivity to chemotherapy drugs [87]. Thus, the role of TBC proteins in gastric cancer remains unknown.

Strikingly, the drugs cisplatin, oxaliplatin, 5-FU (and capecitabine), and irinotecan appear to converge on the same biological processes (apoptosis induction by DNA damage, among other processes; Table 2) despite their different mechanisms of action in the cell. The mechanism of drug convergence has been described for small compounds that are used to treat gastric ulcers [88] but not for gastric cancer treatment. Docetaxel targets biological processes other than those processes targeted by commonly used, previously cited drugs (M phase of cell cycle, stabilization of mitotic fuse), which contributes to its increased use in oncology and its efficacy [32]. Considering the observations made with respect to this subnetwork, we speculate that drug convergence could be a major factor that leads to the development of cancer resistance in current chemotherapy treatment. Considering the problems of drug convergence and of further development of MDR to the conventional chemotherapy regimens by gastric cancer cells, it is necessary to find other protein targets associated with different biological processes than those commonly targeted by conventional chemotherapy drugs. In this sense, it is also desirable that: (i) these new protein targets should be overexpressed in tumor cells and (ii) the small compounds that are selective for these protein targets have

been synthesized, have been tested *in vitro* and/or *in vivo* and show low cytotoxicity and few side effects.

The use of network centralities defines new protein targets and drug combinations for gastric cancer treatment

The solutions for drug convergence and the selection of new protein targets associated with little-explored biological processes in gastric cancer can be found by applying some mathematical tools frequently used to study different types of networks. These mathematical tools include the analysis of the global network structure [89], the presence of network motifs [90], network clustering [91], and network centralities [92].

Network centralities allow us to identify nodes that have a relevant position in the overall network architecture [93]. In this sense, many network centralities have been developed to evaluate the importance of a node for a given network, e.g., node degree, betweenness, and eigenvector measures [93]. Centralities have been recently applied to quantify the centrality and prestige of actors in social networks [93] and to understand the structure and properties of complex biological, technological and infrastructural networks [94, 95]. Many of the nodes in a given network that show elevated values of centrality are important points of vulnerability, indicating that any attack to these nodes could introduce strong perturbations in the network. This graph principle has been exploited to identify proteins that are essential for an organism or that occupy a central position in a biological process [26, 93]. Thus, in this work, five major network centralities that could be associated with the PCPI-PPPI network were evaluated: node degree, stress, betweenness, closeness, and bottleneck (Figs. 7A to 7C).

Node degree represents the simplest centrality measure in a given network, corresponding to the number of nodes adjacent to a given node, where adjacent means directly connected [21]. The node degree represents the “popularity” of a given node, and highly connected nodes in a network are termed hubs. Hubs can be classified into

party hubs (nodes that interact with most of their partners simultaneously, like those found within cliques) and date hubs (nodes that interact asynchronously with other nodes, like those found between motifs) [26]. Next, stress is a centrality measure that represents how much a node is traversed by a high number of ideal routes or short paths in a network. Nodes that are traversed with great numbers of short paths are more stressed than nodes that are traversed by fewer short paths [21]. In this sense, betweenness is a measure similar to stress centrality [96] and indicates to what extent a specific node is between all other nodes within the network [96]. In a general sense, stress and betweenness show the influence of a node over the spread of information throughout the network. Currently, stress and betweenness can be used together to gain information about the importance of a node for two connected nodes [21]. On the other hand, closeness is a centrality measure that indicates the level of proximity of a node to other nodes [21, 96]. Here, closeness indicates how long it will take the information to spread from a given node to other nodes in the network [21]. Finally, bottleneck defines all nodes with high betweenness values, indicating that those nodes are central points that control the communication between other nodes within the network. Bottleneck also indicates all nodes that are “between” highly interconnected subgraph clusters, and removing a bottleneck could divide a network [26, 97].

The measures of betweenness and node degree allow us to define four major groups of nodes within a network: (i) hub-bottleneck (HB), (ii) non-hub-bottleneck (NH-B), (iii) hub-non-bottleneck (H-NB), and non-hub-non-bottleneck (NH-NB) [26]. Nodes that belong to the HB group tend to correspond to highly central proteins that connect several complexes or are peripheral members of central complexes, while nodes that belong to the NH-B group correspond to proteins that are important communication points between two complexes [26]. Interestingly, HB and NH-B nodes tend to be essential proteins in a network [26].

By applying specific algorithms to detect bottlenecks, we identified the 10 major bottlenecks in the PCPI-PPPI network (Fig. 1), which are the small compounds docetaxel, 5-FU, and irinotecan as well as the proteins NDC80, RXRA, AURKB, GRB2, RASA1, TP53, MAPK8, and STMN1 (Supplementary material S2). These results prompted us to analyze the importance of these bottlenecks considering the other centrality parameters, closeness, betweenness, stress, and node degree. When stress was combined with the betweenness score calculated from all nodes of the PCPI-PPPI network (Fig. 1), the same nodes identified as bottlenecks showed high values of stress and betweenness (above the calculated threshold for each centrality; Fig. 7A). These data indicated the overall importance of the observed nodes for the network, but other nodes also had high values of stress and betweenness (Supplementary material S2). Thus, to define whether the bottleneck nodes belong to the HB or the NH-B group, an analysis of betweenness and node degree was performed (Fig. 7B). The data indicated that RASA1 and STMN1 can be defined as NH-B nodes, while NDC80, AURKB, GRB2, TP53, MAPK8, RXRA, and the small compounds docetaxel, 5-FU, and irinotecan, are all HB nodes (Fig. 7B and Supplementary material S2). Finally, the analysis of betweenness and closeness (indicating the overall importance of the bottleneck nodes to the flow of the information in the network) showed that the 10 selected bottleneck nodes appear to be important for the PCPI-PPPI network, among others bottleneck nodes (Fig. 7C and Supplementary material S2).

The data obtained from the centrality analysis allows us to get more detailed information about the network topology of selected HB and NH-B nodes. The selected HB and NH-B proteins compose a small network formed by 100 nodes and 375 edges (Fig. 8), which comprise proteins from all subnetworks observed. Interestingly, seven HB and NH-B proteins observed from centrality data (Fig. 8 and Table 3) consist of elements that control the M phase of the cell cycle, regulating mitotic spindle fusion and

kinetochore formation (AURKB, STMN1, CDC2, and NDC80; Table 3) or that influence different aspects of cell signaling (GRB2, RASA1, and MAPK8; Table 3).

Aurora B (AURKB; Figure 8 and Table 3), which belongs to the family of Aurora serine/threonine kinases (AURKA, AURKB, and AURKC) [98] is defined as a chromosomal passenger protein (CPP) that is composed of the chromosomal passenger complex (CPC) together with three other proteins: INCENP, borealin, and survivin [98]. The CPC proteins act during the M phase of the cell cycle. They are present in the centromeres during prophase, they participate in anaphase with the spindle, and they are finally found in the cleavage furrow during cytokinesis. In addition, AURKB is required for phosphorylation of histone H3 [98, 99] and is also a fundamental protein for the correct orientation and alignment of chromosomes, contributing to spindle checkpoint function [98, 100]. Strikingly, AURKA has been implicated in protecting cells from apoptosis induced by traditional chemotherapy agents, including mainstay cytotoxic agents like cisplatin and paclitaxel [101, 102]. Moreover, different tumor cell types showed overexpression of AURK proteins [103, 104], making it an interesting target for gastric cancer treatment. To this end, some very potent and selective inhibitors of the AURKB protein have been developed [105]. For example, the small compounds ZM447439 [106], hesperadin [107] and VX-680 [108] are the best characterized inhibitors of AURKB [108], while the drug ZM447439 shows a 20-fold selectivity for AURKB over AURKA and is used as a tool for study of AURKB functions [105]. Similarly, hesperadin has been used extensively to probe AURKB [105]. The small compound VX-680 is a dual A/B inhibitor that acts mainly in AURKB and induces the mitotic driver phenotype, which is characterized by cells that bypass the mitotic spindle checkpoint, resulting in an aberrant mitosis [105].

Another interesting HB protein identified in this work is the NDC80/HEC1 node (Fig. 8 and Table 3). NDC80/HEC1 is a component of the essential kinetochore

associated complex that modulates the proper mitotic spindle formation between kinetochores and centrosomes [110]. Overexpression of NDC80/HEC1 has been associated with poor clinical outcomes in primary breast cancers and in cases with multiple cancers [111, 112]. Additionally the phosphorylation of NDC80/HEC1 by NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2 protein (NEK2) is critical for mitosis and cell survival [113, 114]. Moreover, the activity of NDC80/HEC1 may be regulated by AURKB [115]. Unfortunately, just a few NDC80/HEC1 inhibitors are known, termed INH1 and INH2, which appear to effectively suppress tumor cell growth in culture and *in vivo* [116].

The HB protein CDC2 (Fig. 8 and Table 3) is an important serine/threonine kinase that controls different aspects of the cell cycle [117]. A specific inhibitor of CDC2 has been developed, termed CGP-74514A, which appears to induce apoptosis in human leukemia cells [117].

Another important HB protein identified in this work is GRB2 (Fig. 8 and Table 3). GRB2 is a ubiquitously expressed adapter protein that provides a critical link between cell surface growth factor receptors (such as EGF receptor [EGFR] and HER2) and intracellular signaling pathways [118]. The upregulation of GRB2 expression in human tumors contributes to a loss of cell cycle control and enhanced proliferation as well as increased cell motility and invasion through multiple intracellular pathways [118]. Interestingly, GRB2 appears overexpressed in gastric cancer cells [119]. A specific and selective small compound inhibitor of GRB2 was developed, termed CGP78850 (Fig. 8 and Table 3), which has been demonstrated to be a potent anti-mitogenic in some tumor cell lines [120].

Considering cell signaling pathways, two other proteins that were found to be HB and NH-B nodes act directly in cell signaling: the RAS p21 protein activator (RASA1; Table 3 and Fig. 8) and mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8; Table 3

and Fig. 8), respectively. The importance of RASA1 in tumor development is not very well understood, despite work showing that deficiencies in RASA1 protein are associated with basal carcinomas [121]. Unfortunately, there are no small compounds that can modulate the activity of RASA1. On the other hand, MAPK8 is a protein whose importance for gastric cancer cell proliferation is known [122]. Moreover, this protein has a broad tissue distribution [123] and regulates different biological processes (e.g., cell death and inflammation). Based on the importance of MAPK8 to cell signaling, the small molecule compound SP600125, an anthrapyrazolone derivative, was developed, and this compound has anti-inflammatory properties and induces apoptosis *in vitro* and *in vivo* [123].

Finally, the retinoid X receptor α (RXRA; Table 3 and Fig. 8) and stathmin 1 (STMN1; Table 3 and Fig. 8) are HB and NH-B proteins, respectively, that regulate cell signaling and cell cycle progression. The protein RXRA is a nuclear receptor of retinoic acid and plays a critical role in the regulation of growth and differentiation in normal and tumor cells [124]. Interestingly, SNPs and epigenetic modifications of the RXRA protein have been associated with tumor progression [124], but their roles in gastric cancer are unclear until now. A small molecule inhibitor of RXRA, fenretinide (a retinide derivative) [125], was developed and shows a broad mechanism of action against different tumor cell types, alone or in combination [126, 127]. Another protein, STMN1, is a phosphoprotein that destabilizes microtubules [127] (Table 3) and is overexpressed in many tumor types [127]. However, only a few inhibitors have been developed against STMN1. The small molecule GDP366 (Table 3) selectively inhibits STMN1 and survivin, inducing senescence and cell cycle arrest in *in vitro* and *in vivo* models [128].

None of these proteins or small compounds identified by network centrality analysis and systems pharmacology tools were thoroughly studied in gastric cancer

cells. This fact highlights the benefits of a new method for the development of combinatorial drug regimens that can make use of different biological processes (Fig. 8), avoid drug convergence, and improve chemotherapy efficacy.

Taking into account the data gathered in this work, we formulated some working hypotheses that can be applied for both *in vivo* and *in vitro* models of gastric cancer:

1. A combination of AURKB and NDC80 inhibitors together with docetaxel (Fig. 8) should induce the mitotic driver phenotype, culminating in cell senescence and death. Considering the fact that AURKB and NDC80 are two proteins commonly overexpressed in cancer cells, we hypothesize that this combination should improve the selectivity and efficacy of chemotherapeutic treatment.
2. This same selectivity and efficacy should be expected in a combination regimen of AURKB, NDC80, and CDC2 inhibitors. In this case, the drug regimen should induce a strong cell cycle arrest followed by apoptosis. The combination of these inhibitors with 5-FU and docetaxel should potentiate the chemotherapeutic effect of these drugs, taking into account the fact that almost all biological processes observed in the network (Fig. 8) should be disturbed.
3. The association of RXRA and CDC2 inhibitors is also interesting because they affect the cell cycle and signaling pathways (Fig. 8 and Table 3). This combination, along with 5-FU and docetaxel, should strongly activate different apoptotic mechanisms, culminating in cell death.

Of course, other working hypotheses can be formulated based on the data gathered in this work. Considering the number of bottlenecks (HB and NH-B) and small compounds potentially found in a determined cancer-associated network, the number of

combinations will follow a combinatorial pattern. The numbers of combinations should increase when dose concentration are considered in the combinatorial analyses.

Conclusions

Systems pharmacology and its associated tools can improve and accelerate the development of new drug combination regimens for gastric tumor treatment. Moreover, systems pharmacology also strongly stimulates the development of single compounds that can target important and little-studied bottleneck nodes in a specific network associated with gastric cancer or with another type of tumor.

Acknowledgments

This work was supported by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Grant number 471769/2007-0), Programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT de Processos Redox em Biomedicina-Redoxoma; Grant number 573530/2008-4), and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência-PRONEX (FAPERGS/CNPq; Grant number 10/0044-3).

References

- [1] Parkin, D. M.; Bray, F.; Ferlay, J.; Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* **2005**, *55*, 74-108.
- [2] Roder, D. M. The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer* **2002**, *5 Suppl 1*, 5-11.
- [3] Janunger, K. G.; Hafstrom, L.; Nygren, P.; Glimelius, B. A systematic overview of chemotherapy effects in gastric cancer. *Acta Oncol.* **2001**, *40*, 309-326.
- [4] Gunderson, L. L.; Sosin, H. Adenocarcinoma of the stomach: areas of failure in a re-operation series (second or symptomatic look) clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1982**, *8*, 1-11.
- [5] Meyerhardt, J. A.; Fuchs, C. S. Chemotherapy options for gastric cancer. *Semin.*

Radiat. Oncol. **2002**, *12*, 176-186.

- [6] Glimelius, B.; Ekstrom, K.; Hoffman, K.; Graf, W.; Sjoden, P. O.; Haglund, U.; Svensson, C.; Enander, L. K.; Linne, T.; Sellstrom, H.; Heuman, R. Randomized comparison between chemotherapy plus best supportive care with best supportive care in advanced gastric cancer. *Ann. Oncol.* **1997**, *8*, 163-168.
- [7] Lage, H. Molecular analysis of therapy resistance in gastric cancer. *Dig. Dis.* **2003**, *21*, 326-338.
- [8] Larsson, D. E.; Hassan, S.; Larsson, R.; Oberg, K.; Granberg, D. Combination analyses of anti-cancer drugs on human neuroendocrine tumor cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2009**, *65*, 5-12.
- [9] Wils, J. Treatment of gastric cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **1998**, *10*, 357-361.
- [10] Kim, S. T.; Kang, W. K.; Kang, J. H.; Park, K. W.; Lee, J.; Lee, S. H.; Park, J. O.; Kim, K.; Kim, W. S.; Jung, C. W.; Park, Y. S.; Im, Y. H.; Park, K. Salvage chemotherapy with irinotecan, 5-fluorouracil and leucovorin for taxane- and cisplatin-refractory, metastatic gastric cancer. *Br. J. Cancer* **2005**, *92*, 1850-1854.
- [11] Catalano, V.; Labianca, R.; Beretta, G. D.; Gatta, G.; de Braud, F.; Van Cutsem, E. Gastric cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2009**, *71*, 127-164.
- [12] Quek, R.; Lim, W. T.; Foo, K. F.; Koo, W. H.; A, A. M.; Toh, H. C. Capecitabine and oxaliplatin (XELOX) is safe and effective in patients with advanced gastric cancer. *Acta Oncol.* **2007**, *46*, 1032-1034.
- [13] Rosati, G.; Ferrara, D.; Manzione, L. New perspectives in the treatment of advanced or metastatic gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **2009**, *15*, 2689-2692.
- [14] Pozzo, C.; Barone, C. Is there an optimal chemotherapy regimen for the treatment of advanced gastric cancer that will provide a platform for the introduction of new biological agents? *Oncologist* **2008**, *13*, 794-806.

- [15] Kitano, H. A robustness-based approach to systems-oriented drug design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 202-210.
- [16] Wist, A. D.; Berger, S. I.; Iyengar, R. Systems pharmacology and genome medicine: a future perspective. *Genome Med.* **2009**, *1*, 11.
- [17] Berger, S. I.; Iyengar, R. Network analyses in systems pharmacology. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2466-2472.
- [18] Pujol, A.; Mosca, R.; Farres, J.; Aloy, P. Unveiling the role of network and systems biology in drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 115-123.
- [19] Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498-2504.
- [20] Bader, G. D.; Hogue, C. W. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* **2003**, *4*, 2.
- [21] Scardoni, G.; Petterlini, M.; Laudanna, C. Analyzing biological network parameters with CentiScaPe. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2857-2859.
- [22] Lin, C. Y.; Chin, C. H.; Wu, H. H.; Chen, S. H.; Ho, C. W.; Ko, M. T. Hubba: hub objects analyzer--a framework of interactome hubs identification for network biology. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W438-443.
- [23] Maere, S.; Heymans, K.; Kuiper, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 3448-3449.
- [24] Rivals, I.; Personnaz, L.; Taing, L.; Potier, M.-C. Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test? *Bioinformatics* **2007**, *23*, 401-407.
- [25] Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* **1995**, *57*, 289-300.

- [26] Yu, H.; Kim, P. M.; Sprecher, E.; Trifonov, V.; Gerstein, M. The importance of bottlenecks in protein networks: correlation with gene essentiality and expression dynamics. *PLoS Comput. Biol.* **2007**, *3*, e59.
- [27] Tanaka, T. U. Bi-orienting chromosomes on the mitotic spindle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 365-371.
- [28] Baker, D. J.; Dawlaty, M. M.; Galardy, P.; van Deursen, J. M. Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex. *Cell Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 589-600.
- [29] van Leuken, R.; Clijsters, L.; van Zon, W.; Lim, D.; Yao, X.; Wolthuis, R. M.; Yaffe, M. B.; Medema, R. H.; van Vugt, M. A. Polo-like kinase-1 controls Aurora A destruction by activating APC/C-Cdh1. *PLoS One* **2009**, *4*, e5282.
- [30] Lindon, C.; Pines, J. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J. Cell Biol.* **2004**, *164*, 233-241.
- [31] Grabsch, H.; Takeno, S.; Parsons, W. J.; Pomjanski, N.; Boecking, A.; Gabbert, H. E.; Mueller, W. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer--association with tumour cell proliferation. *J. Pathol.* **2003**, *200*, 16-22.
- [32] Nishiyama, M.; Wada, S. Docetaxel: its role in current and future treatments for advanced gastric cancer. *Gastric Cancer* **2009**, *12*, 132-141.
- [33] Le, X. F.; Lammayot, A.; Gold, D.; Lu, Y.; Mao, W.; Chang, T.; Patel, A.; Mills, G. B.; Bast, R. C., Jr. Genes affecting the cell cycle, growth, maintenance, and drug sensitivity are preferentially regulated by anti-HER2 antibody through phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2092-2104.
- [34] Ghoshal, K.; Jacob, S. T. An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 1569-1575.
- [35] Ichikawa, W. Prediction of clinical outcome of fluoropyrimidine-based chemotherapy for gastric cancer patients, in terms of the 5-fluorouracil metabolic

- pathway. *Gastric Cancer* **2006**, *9*, 145-155.
- [36] Danenberg, P. V. Thymidylate synthetase - a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *473*, 73-92.
- [37] Pinedo, H. M.; Peters, G. F. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J. Clin. Oncol.* **1988**, *6*, 1653-1664.
- [38] Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 330-338.
- [39] Galmarini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* **2001**, *15*, 875-890.
- [40] Gray, T.; Morrey, E. L.; Gangadharan, B.; Sumter, T. F.; Spychala, J.; Archer, D. R.; Spencer, H. T. Enforced expression of cytosolic 5'-nucleotidase I confers resistance to nucleoside analogues in vitro but systemic chemotherapy toxicity precludes in vivo selection. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 117-128.
- [41] Carson, D. A.; Kaye, J.; Wasson, D. B. The potential importance of soluble deoxynucleotidase activity in mediating deoxyadenosine toxicity in human lymphoblasts. *J. Immunol.* **1981**, *126*, 348-352.
- [42] Galmarini, C. M.; Graham, K.; Thomas, X.; Calvo, F.; Rousselot, P.; El Jafaari, A.; Cros, E.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. Expression of high Km 5'-nucleotidase in leukemic blasts is an independent prognostic factor in adults with acute myeloid leukemia. *Blood* **2001**, *98*, 1922-1926.
- [43] Kawasaki, H.; Carrera, C. J.; Piro, L. D.; Saven, A.; Kipps, T. J.; Carson, D. A. Relationship of deoxycytidine kinase and cytoplasmic 5'-nucleotidase to the chemotherapeutic efficacy of 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood* **1993**, *81*, 597-601.
- [44] Ahmad, S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 543-566.

- [45] Cvitkovic, E. Ongoing and unsaid on oxaliplatin: the hope. *Br. J. Cancer* **1998**, *77 Suppl 4*, 8-11.
- [46] Chaney, S. G.; Campbell, S. L.; Bassett, E.; Wu, Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2005**, *53*, 3-11.
- [47] Thomadaki, H.; Scorilas, A. Breast cancer cells response to the antineoplastic agents cisplatin, carboplatin, and doxorubicin at the mRNA expression levels of distinct apoptosis-related genes, including the new member, BCL2L12. *Ann. N Y Acad. Sci.* **2007**, *1095*, 35-44.
- [48] Rasheed, Z. A.; Rubin, E. H. Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs. *Oncogene* **2003**, *22*, 7296-7304.
- [49] McDermott, U.; Longley, D. B.; Galligan, L.; Allen, W.; Wilson, T.; Johnston, P. G. Effect of p53 status and STAT1 on chemotherapy-induced, Fas-mediated apoptosis in colorectal cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 8951-8960.
- [50] Deeks, E. D.; Scott, L. J. Docetaxel: in gastric cancer. *Drugs* **2007**, *67*, 1893-1901.
- [51] Liscovitch, M.; Lavie, Y. Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways? *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 530-534.
- [52] Elliott, D. A.; Kim, W. S.; Jans, D. A.; Garner, B. Macrophage apolipoprotein-E knockdown modulates caspase-3 activation without altering sensitivity to apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 145-153.
- [53] Chen, Y. C.; Pohl, G.; Wang, T. L.; Morin, P. J.; Risberg, B.; Kristensen, G. B.; Yu, A.; Davidson, B.; Shih Ie, M. Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 331-337.
- [54] Yokoyama, Y.; Kuramitsu, Y.; Takashima, M.; Iizuka, N.; Terai, S.; Oka, M.; Nakamura, K.; Okita, K.; Sakaida, I. Protein level of apolipoprotein E increased in human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2006**, *28*, 625-631.
- [55] Chao, W. T.; Tsai, S. H.; Lin, Y. C.; Lin, W. W.; Yang, V. C. Cellular localization

- and interaction of ABCA1 and caveolin-1 in aortic endothelial cells after HDL incubation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *332*, 743-749.
- [56] Baker, S. J.; Reddy, E. P. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* **1998**, *17*, 3261-3270.
- [57] Li, Q.; Yu, Y. Y.; Zhu, Z. G.; Ji, Y. B.; Zhang, Y.; Liu, B. Y.; Chen, X. H.; Lin, Y. Z. Effect of NF-kappaB constitutive activation on proliferation and apoptosis of gastric cancer cell lines. *Eur. Surg. Res.* **2005**, *37*, 105-110.
- [58] Xiao, C.; Yang, B. F.; Asadi, N.; Beguinot, F.; Hao, C. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in glioma cells. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25020-25025.
- [59] Yoo, N. J.; Lee, S. H.; Jeong, E. G.; Lee, J. W.; Soung, Y. H.; Nam, S. W.; Kim, S. H.; Lee, J. Y. Expression of nuclear and cytoplasmic phosphorylated FADD in gastric cancers. *Pathol. Res. Pract.* **2007**, *203*, 73-78.
- [60] Chen, G.; Bhojani, M. S.; Heaford, A. C.; Chang, D. C.; Laxman, B.; Thomas, D. G.; Griffin, L. B.; Yu, J.; Coppola, J. M.; Giordano, T. J.; Lin, L.; Adams, D.; Orringer, M. B.; Ross, B. D.; Beer, D. G.; Rehemtulla, A. Phosphorylated FADD induces NF-kappaB, perturbs cell cycle, and is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2005**, *102*, 12507-12512.
- [61] Yoo, J.; Park, S. S.; Lee, Y. J. Pretreatment of docetaxel enhances TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells. *J. Cell Biochem.* **2008**, *104*, 1636-1646.
- [62] Townsend, D. M.; Tew, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7369-7375.
- [63] Coles, B. F.; Chen, G.; Kadlubar, F. F.; Radominska-Pandya, A. Interindividual variation and organ-specific patterns of glutathione S-transferase alpha, mu, and pi expression in gastrointestinal tract mucosa of normal individuals. *Arch. Biochem.*

- Biophys.* **2002**, *403*, 270-276.
- [64] Pool-Zobel, B. L.; Selvaraju, V.; Sauer, J.; Kautenburger, T.; Kiefer, J.; Richter, K. K.; Soom, M.; Wolfl, S. Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 1064-1076.
- [65] Holm, P. J.; Bhakat, P.; Jegerschold, C.; Gyobu, N.; Mitsuoka, K.; Fujiyoshi, Y.; Morgenstern, R.; Hebert, H. Structural basis for detoxification and oxidative stress protection in membranes. *J. Mol. Biol.* **2006**, *360*, 934-945.
- [66] Morrow, C. S.; Goldsmith, M. E.; Cowan, K. H. Regulation of human glutathione S-transferase pi gene transcription: influence of 5'-flanking sequences and trans-activating factors which recognize AP-1-binding sites. *Gene* **1990**, *88*, 215-225.
- [67] Sau, A.; Pellizzari Tregno, F.; Valentino, F.; Federici, G.; Caccuri, A. M. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *500*, 116-122.
- [68] Paumi, C. M.; Ledford, B. G.; Smitherman, P. K.; Townsend, A. J.; Morrow, C. S. Role of multidrug resistance protein 1 (MRP1) and glutathione S-transferase A1-1 in alkylating agent resistance. Kinetics of glutathione conjugate formation and efflux govern differential cellular sensitivity to chlorambucil versus melphalan toxicity. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7952-7956.
- [69] Smitherman, P. K.; Townsend, A. J.; Kute, T. E.; Morrow, C. S. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) in alkylating agent detoxification: MRP2 potentiates glutathione S-transferase A1-1-mediated resistance to chlorambucil cytotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *308*, 260-267.
- [70] Ramos-Gomez, M.; Kwak, M. K.; Dolan, P. M.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Talalay, P.; Kensler, T. W. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective

- efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2001**, 98, 3410-3415.
- [71] Cumming, R. C.; Lightfoot, J.; Beard, K.; Youssoufian, H.; O'Brien, P. J.; Buchwald, M. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nat. Med.* **2001**, 7, 814-820.
- [72] Scharlau, D.; Borowicki, A.; Habermann, N.; Hofmann, T.; Klenow, S.; Miene, C.; Munjal, U.; Stein, K.; Gleit, M. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat. Res.* **2009**, 682, 39-53.
- [73] Park, D. J.; Lenz, H. J. Determinants of chemosensitivity in gastric cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6, 337-344.
- [74] Moreno, J. J. New aspects of the role of hydroxyeicosatetraenoic acids in cell growth and cancer development. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, 77, 1-10.
- [75] Ye, Y. N.; Liu, E. S.; Shin, V. Y.; Wu, W. K.; Cho, C. H. Contributory role of 5-lipoxygenase and its association with angiogenesis in the promotion of inflammation-associated colonic tumorigenesis by cigarette smoking. *Toxicology* **2004**, 203, 179-188.
- [76] Maruo, Y.; Iwai, M.; Mori, A.; Sato, H.; Takeuchi, Y. Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and drug metabolism. *Curr. Drug Metab.* **2005**, 6, 91-99.
- [77] Sladek, N. E.; Kollander, R.; Sreerama, L.; Kiang, D. T. Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, 49, 309-321.
- [78] Scully, R.; Livingston, D. M. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* **2000**, 408, 429-432.

- [79] Shim, H. J.; Yun, J. Y.; Hwang, J. E.; Bae, W. K.; Cho, S. H.; Lee, J. H.; Kim, H. N.; Shin, M. H.; Kweon, S. S.; Kim, H. J.; Chung, I. J. BRCA1 and XRCC1 polymorphisms associated with survival in advanced gastric cancer treated with taxane and cisplatin. *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 1247-1254.
- [80] Friedenson, B. BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian. *MedGenMed* **2005**, *7*, 60.
- [81] Sugai, T.; Tsukahara, M.; Endoh, M.; Shioi, Y.; Takebe, N.; Mue, Y.; Matsushita, H.; Toyota, M.; Suzuki, K. Analysis of cell cycle-related proteins in gastric intramucosal differentiated-type cancers based on mucin phenotypes: a novel hypothesis of early gastric carcinogenesis based on mucin phenotype. *BMC Gastroenterol.* **2010**, *10*, 55.
- [82] Noguchi, T.; Wirtz, H. C.; Michaelis, S.; Gabbert, H. E.; Mueller, W. Chromosomal imbalances in gastric cancer. Correlation with histologic subtypes and tumor progression. *Am. J. Clin. Pathol.* **2001**, *115*, 828-834.
- [83] Furukawa, H.; Iwanaga, T.; Koyama, H.; Taniguchi, H. Effect of sex hormones on carcinogenesis in the stomachs of rats. *Cancer Res.* **1982**, *42*, 5181-5182.
- [84] Palli, D.; Cipriani, F.; Decarli, A.; Galli, M.; Saieva, C.; Fraumeni, J. F., Jr.; Blot, W. J.; Buiatti, E. Reproductive history and gastric cancer among post-menopausal women. *Int. J. Cancer* **1994**, *56*, 812-815.
- [85] Nylander-Koski, O.; Kiviluoto, T.; Puolakkainen, P.; Kivilaakso, E.; Mustonen, H. The effect of nitric oxide, growth factors, and estrogen on gastric cell migration. *J. Surg. Res.* **2007**, *143*, 230-237.
- [86] Hu, Y. BRCA1, hormone, and tissue-specific tumor suppression. *Int. J. Biol. Sci.* **2009**, *5*, 20-27.
- [87] Hage-Sleiman, R.; Herveau, S.; Matera, E. L.; Laurier, J. F.; Dumontet, C. Tubulin binding cofactor C (TBCC) suppresses tumor growth and enhances

- chemosensitivity in human breast cancer cells. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 135.
- [88] Watanabe, T.; Kamisaki, Y.; Timmerman, H. Convergence and divergence, a concept for explaining drug actions. *J. Pharmacol. Sci.* **2004**, *96*, 95-100.
- [89] Albert, R.; Barabasi, A.-L. Statistical mechanics of complex networks. *Rev. Mod. Phys.* **2002**, *74*, 47.
- [90] Milo, R.; Shen-Orr, S.; Itzkovitz, S.; Kashtan, N.; Chklovskii, D.; Alon, U. Network motifs: simple building blocks of complex networks. *Science* **2002**, *298*, 824-827.
- [91] Holme, P.; Huss, M.; Jeong, H. Subnetwork hierarchies of biochemical pathways. *Bioinformatics* **2003**, *19*, 532-538.
- [92] Wuchty, S.; Stadler, P. F. Centers of complex networks. *J. Theor. Biol.* **2003**, *223*, 45-53.
- [93] Borgatti, S. P. Centrality and network flow. *Soc. Networks* **2005**, *27*, 55-71.
- [94] Estrada, E. Virtual identification of essential proteins within the protein interaction network of yeast. *Proteomics* **2006**, *6*, 35-40.
- [95] Estrada, E.; Hatano, N. A vibrational approach to node centrality and vulnerability in complex networks. *Phys. A* **2010**, *389*, 3648-3660.
- [96] Newman, M. E. J. A measure of betweenness centrality based on random walks. *Soc. Networks* **2005**, *27*, 39-54.
- [97] Girvan, M.; Newman, M. E. Community structure in social and biological networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, *99*, 7821-7826.
- [98] Kaestner, P.; Stolz, A.; Bastians, H. Determinants for the efficiency of anticancer drugs targeting either Aurora-A or Aurora-B kinases in human colon carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 2046-2056.
- [99] Hirota, T.; Lipp, J. J.; Toh, B. H.; Peters, J. M. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin.

Nature **2005**, 438, 1176-1180.

- [100] Vader, G.; Maia, A. F.; Lens, S. M. The chromosomal passenger complex and the spindle assembly checkpoint: kinetochore-microtubule error correction and beyond. *Cell Div.* **2008**, 3, 10.
- [101] Anand, S.; Penrhyn-Lowe, S.; Venkitaraman, A. R. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* **2003**, 3, 51-62.
- [102] Yang, H.; He, L.; Kruk, P.; Nicosia, S. V.; Cheng, J. Q. Aurora-A induces cell survival and chemoresistance by activation of Akt through a p53-dependent manner in ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer* **2006**, 119, 2304-2312.
- [103] Landen, C. N., Jr.; Lin, Y. G.; Immaneni, A.; Deavers, M. T.; Merritt, W. M.; Spanuth, W. A.; Bodurka, D. C.; Gershenson, D. M.; Brinkley, W. R.; Sood, A. K. Overexpression of the centrosomal protein Aurora-A kinase is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 4098-4104.
- [104] Keen, N.; Taylor, S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 927-936.
- [105] Keen, N.; Taylor, S. Mitotic drivers--inhibitors of the Aurora B Kinase. *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, 28, 185-195.
- [106] Ditchfield, C.; Johnson, V. L.; Tighe, A.; Ellston, R.; Haworth, C.; Johnson, T.; Mortlock, A.; Keen, N.; Taylor, S. S. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J. Cell Biol.* **2003**, 161, 267-280.
- [107] Hauf, S.; Cole, R. W.; LaTerra, S.; Zimmer, C.; Schnapp, G.; Walter, R.; Heckel, A.; van Meel, J.; Rieder, C. L.; Peters, J. M. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in

- maintaining the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 281-294.
- [108] Harrington, E. A.; Bebbington, D.; Moore, J.; Rasmussen, R. K.; Ajose-Adeogun, A. O.; Nakayama, T.; Graham, J. A.; Demur, C.; Hercend, T.; Diu-Hercend, A.; Su, M.; Golec, J. M.; Miller, K. M. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 262-267.
- [109] Taylor, S.; Peters, J. M. Polo and Aurora kinases: lessons derived from chemical biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 77-84.
- [110] Ciferri, C.; Musacchio, A.; Petrovic, A. The Ndc80 complex: hub of kinetochore activity. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2862-2869.
- [111] van't Veer, L. J.; Dai, H.; van de Vijver, M. J.; He, Y. D.; Hart, A. A.; Mao, M.; Peterse, H. L.; van der Kooy, K.; Marton, M. J.; Witteveen, A. T.; Schreiber, G. J.; Kerkhoven, R. M.; Roberts, C.; Linsley, P. S.; Bernards, R.; Friend, S. H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **2002**, *415*, 530-536.
- [112] Glinsky, G. V.; Berezovska, O.; Glinskii, A. B. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1503-1521.
- [113] Chen, Y.; Riley, D. J.; Zheng, L.; Chen, P. L.; Lee, W. H. Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49408-49416.
- [114] Du, J.; Cai, X.; Yao, J.; Ding, X.; Wu, Q.; Pei, S.; Jiang, K.; Zhang, Y.; Wang, W.; Shi, Y.; Lai, Y.; Shen, J.; Teng, M.; Huang, H.; Fei, Q.; Reddy, E. S.; Zhu, J.; Jin, C.; Yao, X. The mitotic checkpoint kinase NEK2A regulates kinetochore microtubule attachment stability. *Oncogene* **2008**, *27*, 4107-4114.
- [115] Tien, J. F.; Umbreit, N. T.; Gestaut, D. R.; Franck, A. D.; Cooper, J.; Wordeman,

- L.; Gonen, T.; Asbury, C. L.; Davis, T. N. Cooperation of the Dam1 and Ndc80 kinetochore complexes enhances microtubule coupling and is regulated by aurora B. *J. Cell Biol.* **2010**, *189*, 713-723.
- [116] Wu, G.; Qiu, X. L.; Zhou, L.; Zhu, J.; Chamberlin, R.; Lau, J.; Chen, P. L.; Lee, W. H. Small molecule targeting the Hec1/Nek2 mitotic pathway suppresses tumor cell growth in culture and in animal. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 8393-8399.
- [117] Dai, Y.; Dent, P.; Grant, S. Induction of apoptosis in human leukemia cells by the CDK1 inhibitor CGP74514A. *Cell Cycle* **2002**, *1*, 143-152.
- [118] Dharmawardana, P. G.; Peruzzi, B.; Giubellino, A.; Burke, T. R., Jr.; Bottaro, D. P. Molecular targeting of growth factor receptor-bound 2 (Grb2) as an anti-cancer strategy. *Anticancer Drugs* **2006**, *17*, 13-20.
- [119] Yu, G. Z.; Chen, Y.; Wang, J. J. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2009**, *135*, 1331-1339.
- [120] Gay, B.; Suarez, S.; Caravatti, G.; Furet, P.; Meyer, T.; Schoepfer, J. Selective GRB2 SH2 inhibitors as anti-Ras therapy. *Int. J. Cancer* **1999**, *83*, 235-241.
- [121] Lappalainen, I.; Thusberg, J.; Shen, B.; Vihinen, M. Genome wide analysis of pathogenic SH2 domain mutations. *Proteins* **2008**, *72*, 779-792.
- [122] Shibata, W.; Maeda, S.; Hikiba, Y.; Yanai, A.; Sakamoto, K.; Nakagawa, H.; Ogura, K.; Karin, M.; Omata, M. c-Jun NH2-terminal kinase 1 is a critical regulator for the development of gastric cancer in mice. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 5031-5039.
- [123] Bennett, B. L.; Sasaki, D. T.; Murray, B. W.; O'Leary, E. C.; Sakata, S. T.; Xu, W.; Leisten, J. C.; Motiwala, A.; Pierce, S.; Satoh, Y.; Bhagwat, S. S.; Manning, A. M.; Anderson, D. W. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2001**, *98*, 13681-13686.
- [124] Lee, S. M.; Lee, J. Y.; Choi, J. E.; Lee, S. Y.; Park, J. Y.; Kim, D. S. Epigenetic

- inactivation of retinoid X receptor genes in non-small cell lung cancer and the relationship with clinicopathologic features. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2010**, *197*, 39-45.
- [125] Malone, W.; Perloff, M.; Crowell, J.; Sigman, C.; Higley, H. Fenretinide: a prototype cancer prevention drug. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, *12*, 1829-1842.
- [126] Brewer, M.; Ranger-Moore, J.; Satterfield, W.; Hao, Z.; Wang, J.; Brewer, E.; Wharton, J. T.; Bast, R.; Zou, C. Combination of 4-HPR and oral contraceptive in monkey model of chemoprevention of ovarian cancer. *Front. Biosci.* **2007**, *12*, 2260-2268.
- [127] Kuo, M. F.; Wang, H. S.; Kuo, Q. T.; Shun, C. T.; Hsu, H. C.; Yang, S. H.; Yuan, R. H. High expression of stathmin protein predicts a fulminant course in medulloblastoma. *J. Neurosurg. Pediatr.* **2009**, *4*, 74-80.
- [128] Shi, X.; Wang, D.; Ding, K.; Lu, Z.; Jin, Y.; Zhang, J.; Pan, J. GDP366, a novel small molecule dual inhibitor of survivin and Op18, induces cell growth inhibition, cellular senescence and mitotic catastrophe in human cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **2010**, *9*, 640-650.

Tables

Table 1. Specific gene ontology (GO) classes derived from physical protein-protein interactions observed in different subgraphs.

Subgraph number	GO biological process category	GO number	<i>p</i> -value	Corrected <i>p</i> -value ^a	k ^b	f ^c	Proteins
Subgraph 1	Mitotic cell cycle	278	3.42×10 ⁻⁶²	1.87×10 ⁻⁵⁹	50	298	KIF23;MAD1L1;KNTC1;AURKA;CD C16;AURKB;PTTG1;CUL3;KIF2B;KIF2C;CDCA8;NDE1;C18;ORF24;INCE NP;PSMD2;ZW10;ANAPC2;DSN1;SGOL1;UBE2C;DCTN2;MAD2L1;RCC2;ZWINT;NSL1;PSMA3;CLIP1;BUB1;STMN1;MAPRE1;MAD2L2;FZR1;SPC24;SPC25;BUB1;PAFAH1B1;UBE2D1;ZWILCH;BUB3;ERCC6L;NUF2;NDC80;CDC20;BIRC5;PMF1;CDC27;MIS12;SMC4;PSMD11;PLK1
	Chromosome segregation	7059	5.45×10 ⁻¹⁹	2.98×10 ⁻¹⁷	14	61	DSN1;SGOL2;SGOL1;NUF2;NDC80;PTTG1;PMF1;MIS12;SMC4;INCENP;ZWINT;NSL1;BUB3;ZW10
	Regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	51439	2.88×10 ⁻¹⁸	1.43×10 ⁻¹⁶	14	68	ANAPC2;FZR1;CDC20;CDC16;UBE2C;CDC27;MAD2L1;PSMD11;PLK1;PSMA3;PSMD2;BUB1B;UBE2D1;BUB3

Table 1 continued

Subgraph number	GO biological process category	GO number	<i>p</i> -value	Corrected <i>p</i> -value ^a	<i>k</i> ^b	<i>f</i> ^c	Proteins
Subgraph 1	Spindle organization and biogenesis	7051	1.71×10 ⁻¹¹	3.01×10 ⁻¹⁰	7	20	KIF23;ZWINT;BUB1B;NDC80; AURKA;STMN1;UBE2C
	Mitotic sister chromatid segregation	16359	1.09×10 ⁻⁶	1.17×10 ⁻⁵	5	31	ZWINT;NDC80;BUB3;SMC4;ZW10
	Kinetochores organization and biogenesis	51383	2.13×10 ⁻⁶	2.16×10 ⁻⁵	3	5	PMF1;MIS12;CENPH
Subgraph 2	Nucleobase, nucleoside and nucleotide metabolic process	55086	4.25×10 ⁻⁴⁶	1.97×10 ⁻⁴³	30	214	CMPK;ADSS;DTYMK;UPP1;UPP2; CAD;HPRT1;ADA;PPAT;TYMS; ATIC;NT5M;PDE4A;NT5C3;NT5C2; CDA;ENTPD3;IMPDH1;IMPDH2; NT5C;ADSSL1;ECGF1;GMPS; AMPD1;APRT;UMPS;ITPA;DHFR; ADSL; GUK1
	Purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	9168	1.70×10 ⁻¹⁹	5.65×10 ⁻¹⁸	9	17	ADSS;ADSSL1;ATIC;ADSL;GMPS; IMPDH1;IMPDH2;ADA;AMPD1
	Pyrimidine nucleotide metabolic process	6220	8.42×10 ⁻¹⁴	1.95×10 ⁻¹²	8	36	CMPK;TYMS;UMPS;ECGF1;NT5M; DTYMK;CAD;NT5C
	DNA replication	6260	2.38×10 ⁻⁵	2.26×10 ⁻⁴	6	198	RFC5;TYMS;ECGF1;NT5M;RRM1; POLA1

Table 1 continued

Subgraph number	GO biological process category	GO number	<i>p</i> -value	Corrected <i>p</i> -value ^a	<i>k</i> ^b	<i>f</i> ^c	Proteins
Subgraph 3	Interphase of mitotic cell cycle	51329	1.79×10^{-18}	1.16×10^{-15}	15	71	E2F1;E2F4;CDC2;POLA1;CDK6; RB1;CDK4;CDK2;CCNB1;CCNE1; CDKN1A;CCND1;CDKN1B;ABL1; TFDP1
	Steroid metabolic process	8202	1.27×10^{-12}	1.25×10^{-10}	15	170	SREBF1;SULT2A1;RXRA;NR0B2; ABCA1;UGT1A1;APOA1;APOE; CYP7A1;SCARB1;CETP;MBTPS1; NR1H4;CYP19A1;FABP6
	Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	6357	3.59×10^{-11}	2.36×10^{-9}	20	437	SREBF1;E2F1;PPARA;E2F4;E2F6; RXRA;SPI1;SMAD4;SMAD3;RB1; CDK7;NR0B2;ORC2L;HIF1A;SP1; MDM2;ABL1;MYC;NR1H4;TFDP1
	DNA replication	6260	1.49×10^{-10}	5.89×10^{-9}	14	198	CDC2;POLA1;MCM2;MCM4; CDC25A;MCM6;RPA1;TYMS; ORC2L;MCM7;ORC6L;RRM1; SUPT16H;ABL1
	Response to DNA damage stimulus	6974	1.15×10^{-8}	2.71×10^{-7}	15	325	CDC2;POLA1;CDK7;MCM2;SIRT1; RPA1;TYMS;CDKN1A;MCM7; BBC3;PCNA;SUPT16H;ABL1; CCNA2;FANCC
	Apoptotic program	8632	5.15×10^{-6}	5.64×10^{-5}	7	94	BBC3;BCL2;CASP7;SMAD3; MAPK8;APAF1;PMAIP1

Table 1 continued

Subgraph number	GO biological process category	GO number	<i>p</i> -value	Corrected <i>p</i> -value ^a	<i>k</i> ^b	<i>f</i> ^c	Proteins
Subgraph 3	Sterol homeostasis	55092	2.05×10 ⁻⁵	1.89×10 ⁻⁴	4	23	APOA1;APOE;CETP;ABCA1
	Cholesterol homeostasis	42632	2.05×10 ⁻⁵	1.89×10 ⁻⁴	4	23	APOA1;APOE;CETP;ABCA1
	Cholesterol efflux	33344	5.80×10 ⁻⁵	4.47×10 ⁻⁴	3	11	APOA1;APOE;ABCA1
Subgraph 4	Apoptotic program	8632	2.65×10 ⁻³³	1.24×10 ⁻³⁰	19	97	BID;FASLG;FADD;BCL2L1;BAD;STAT1;TL2;BCL2L11;TNFRSF10A;TNFSF10;CASP3;TNFRSF10B;RIPK1;BAX;BCL2;CASP8;MCH5;FAZ;BOD
	Activation of pro-apoptotic gene products	8633	8.79×10 ⁻³³	2.05×10 ⁻³⁰	14	23	BID;FASLG;FADD;BAD;TL2;BCL2L11;TNFSF10;TNFRSF10B;BCL2;RIPK1;CASP8;MCH5;FAS;BOD
	Regulation of programmed cell death	43067	7.95×10 ⁻²⁴	3.71×10 ⁻²²	22	516	BID;CFLAR;FASLG;FADD;BCL2L1;BAD;BIRC4;STAT1;TL2;BCL2L11;TNFRSF10A;TNFSF10;CASP3;TNFRSF10B;RIPK1;BAX;BCL2;CASP8;MCH5;FAS;BOD;LTA
	Induction of apoptosis	6917	3.84×10 ⁻²³	1.63×10 ⁻²¹	17	199	BID;CFLAR;FASLG;FADD;BAD;TL2;BCL2L11;TNFRSF10A;TNFSF10;CASP3;TNFRSF10B;BAX;CASP8;MCH5;FAS;BOD;LTA

Table 1 continued

Subgraph number	GO biological process category	GO number	<i>p</i> -value	Corrected <i>p</i> -value ^a	k ^b	f ^c	Proteins
Subgraph 4	Induction of programmed cell death	12502	4.19×10 ⁻²³	1.63×10 ⁻²¹	17	200	BID;CFLAR;FASLG;FADD;BAD;TL2;BCL2L11;TNFRSF10A;TNFSF10;CASP3;TNFRSF10B;BAX;CASP8;MCH5;FAS;BOD;LTA
	Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	43123	1.67×10 ⁻¹⁶	4.33×10 ⁻¹⁵	11	94	CFLAR;TNFRSF1A;TNFSF10;TNFRSF10B;RIPK1;CASP8;FASLG;FADD;MCH5;TL2;LTA
	Induction of apoptosis via death domain receptors	8625	9.19×10 ⁻⁹	1.53×10 ⁻⁷	4	11	TNFRSF10A;BID;TNFRSF10B;FADD
Subgraph 5	Glutathione metabolic process	6749	3.68×10 ⁻⁴	9.84×10 ⁻³	2	22	GSTA1;MGST1
	Alkene metabolic process	43449	4.03×10 ⁻⁴	9.84×10 ⁻³	2	23	CYP4F3;ALOX5
	Leukotriene metabolic process	6691	4.03×10 ⁻⁴	9.84×10 ⁻³	2	23	CYP4F3;ALOX5

^aValues calculated from *p*-value after FDR application.

^bTotal number of proteins found in the network that belong to a specific GO.

^cTotal number of proteins belonging to a specific GO.

Table 2. Specific gene ontology (GO) classes derived from physical protein-protein interactions observed in the unclustered nodes of the chronologic-replicative protein network.

GO biological process category	GO number	<i>p</i> -value	Corrected <i>p</i> -value ^a	k ^b	f ^c	Proteins
DNA damage response, signal transduction resulting in induction of apoptosis	8630	2.21×10 ⁻¹⁰	6.60×10 ⁻⁸	7	22	CHK2; TP53; BRCA2; CHEK2; BRCA1
Induction of apoptosis by intracellular signals	8629	3.34×10 ⁻¹⁰	6.60×10 ⁻⁸	8	37	CHK2; TP53; BRCA2; PKCA; CHEK2; BRCA1
Induction of programmed cell death	12502	4.98×10 ⁻⁹	5.83×10 ⁻⁷	13	200	CEBPB; TP53BP2; TP53; BRCA2; BNIP3; CHEK2; PKCA; BRCA1; CDKN2A; CHK2; TUBB1
β-tubulin folding	7025	1.73×10 ⁻⁸	1.68×10 ⁻⁶	4	5	TBCA; TBCD; TBCC; TBCE
Double-strand break repair via homologous recombination	724	4.94×10 ⁻⁸	3.04×10 ⁻⁶	5	14	BRCA2; H2AFX; BRCA1; RAD51
Cell cycle checkpoint	75	6.91×10 ⁻⁶	1.55×10 ⁻⁴	6	60	CDKN2A; CHK2; ATM; BRCA1
Response to steroid hormone stimulus	48545	1.98×10 ⁻⁵	3.69×10 ⁻⁴	5	43	BRCA2;CFTR;HGF; BRCA1

^aValues calculated from *p*-value after FDR application.

^bTotal number of proteins found in the network that belong to a specific GO.

^cTotal number of proteins belonging to a specific GO.

Table 3. List of the major hub-bottleneck (HB) and non-hub-bottleneck (NH-B) proteins identified by the topological network analysis as new potential targets for gastric cancer treatment.

Protein name	Description^a	Function^a	Small compounds inhibitors^b	Inhibition of gastric cancer development^c	HB/NH-B
AURKB	Aurora kinase B	Serine/threonine kinase involved in regulating the cleavage of polar spindle microtubules; key regulator for the onset of cytokinesis during mitosis.	ZM447439, Hesperadin, VX-680	ND	HB
NDC80	HEC1; highly expressed in cancer protein	Component of the essential kinetochore-associated NDC80 complex, which is required for chromosome segregation and spindle checkpoint activity. Required for kinetochore integrity and the organization of stable microtubule binding sites in the outer plate of the kinetochore	INH1	ND	HB
CDC2	CDK1; cell division cycle 2	Serine/threonine protein kinase; catalytic subunit of the M-phase promoting factor (MPF), which is essential for G1/S and G2/M phase transitions of eukaryotic cell cycle.	CGP-74514A	ND	HB
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	Adapter protein that provides a critical link between cell surface growth factor receptors and the Ras signaling pathway	CGP78850	ND	HB
RASA1	RAS protein activator p21	Inhibitory regulator of the Ras-cyclic AMP pathway.	ND	ND	NH-B

Table 3 continued

Protein name	Description ^a	Function ^a	Small compounds inhibitors ^b	Inhibition of gastric cancer development ^c	HB/NH-B ^d
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	Serine-threonine kinase that responds to environmental stress and pro-inflammatory cytokines by phosphorylating a number of transcription factors, primarily components of AP-1, such as JUN, JDP2 and ATF2, and thus regulates AP-1 transcriptional activity.	SP600125	ND	HB
RXRA	Retinoid X receptor, alpha	Nuclear hormone receptor. Involved in the retinoic acid response pathway.	Fenretinide	ND	HB
STMN1	Stathmin 1	Cytosolic phosphoprotein involved in the regulation of the microtubule filament system by destabilizing microtubules.	GDP366	ND	NH-B

^aThe protein descriptions and functions were obtained from the GeneCards website [<http://www.genecards.org>].

^bThe list of small inhibitors used in this work is not exhaustive and includes only those compounds with well-described mechanisms of binding, inhibition, and biological action.

^cIndicates whether the small compounds described have some biological effect in gastric cancer cells *in vitro* or *in vivo* (not determined; ND).

^dHub-bottleneck (HB); Non-hub-bottleneck (NH-B).

Figure legends

Figure 1. A physical protein-protein (PPPI) and physical chemo-protein (PCPI) interacting network of major proteins and chemotherapy compounds associated with gastric cancer. Both clustered proteins (composing different subnetworks) and unclustered proteins/small compounds are represented by nodes of different shapes and colors, as indicated in the inset.

Figure 2. An amplified view of proteins that compose subnetwork 1 from the PPPI-PCPI network, associated with chromosome segregation and ubiquitin-protein ligase regulation processes. Docetaxel is represented by a dark square node.

Figure 3. An amplified view of proteins that compose subnetwork 2 from the PPPI-PCPI network, associated with nucleobase, nucleoside, and nucleotide metabolic processes/DNA replication processes.

Figure 4. An amplified view of proteins that compose subnetwork 3 from the PPPI-PCPI network, associated with DNA replication/RNA transcription, apoptosis, and steroid metabolism processes.

Figure 5. An amplified view of proteins that compose subnetwork 4 from the PPPI-PCPI network, associated with apoptosis activation mechanism. Docetaxel is represented by the dark square node.

Figure 6. An amplified view of proteins that compose subnetwork 5 from the PPPI-PCPI network, associated with glutathione/alkene/leukotriene metabolism.

Figure 7. Centralities analysis (A to C) of proteins and small compounds associated with the PPPI-PCPI network. Dashed lines represent the threshold value calculated for each centrality. Proteins are represented by circular dots, while small compounds are indicated by

square dots. Only those proteins/small compounds with a high bottleneck score are indicated.

Legend: hub-bottleneck (HB); non hub-bottleneck (NH-B).

Figure 8. Smaller PPPI-PCPI subnetwork derived from calculated centralities analyses. The ten major hub-bottleneck and non-hub-bottleneck proteins/small compounds with the highest bottleneck values are indicated by big nodes. The color and shape of each node indicates the associated subnetwork (subnetworks 1 to 5 and unclustered proteins/small compounds; please refer to the main text of the manuscript for more details). Potential small compounds that target specific nodes are indicated by the insets and dashed arrows in the figure.

Figure 1.

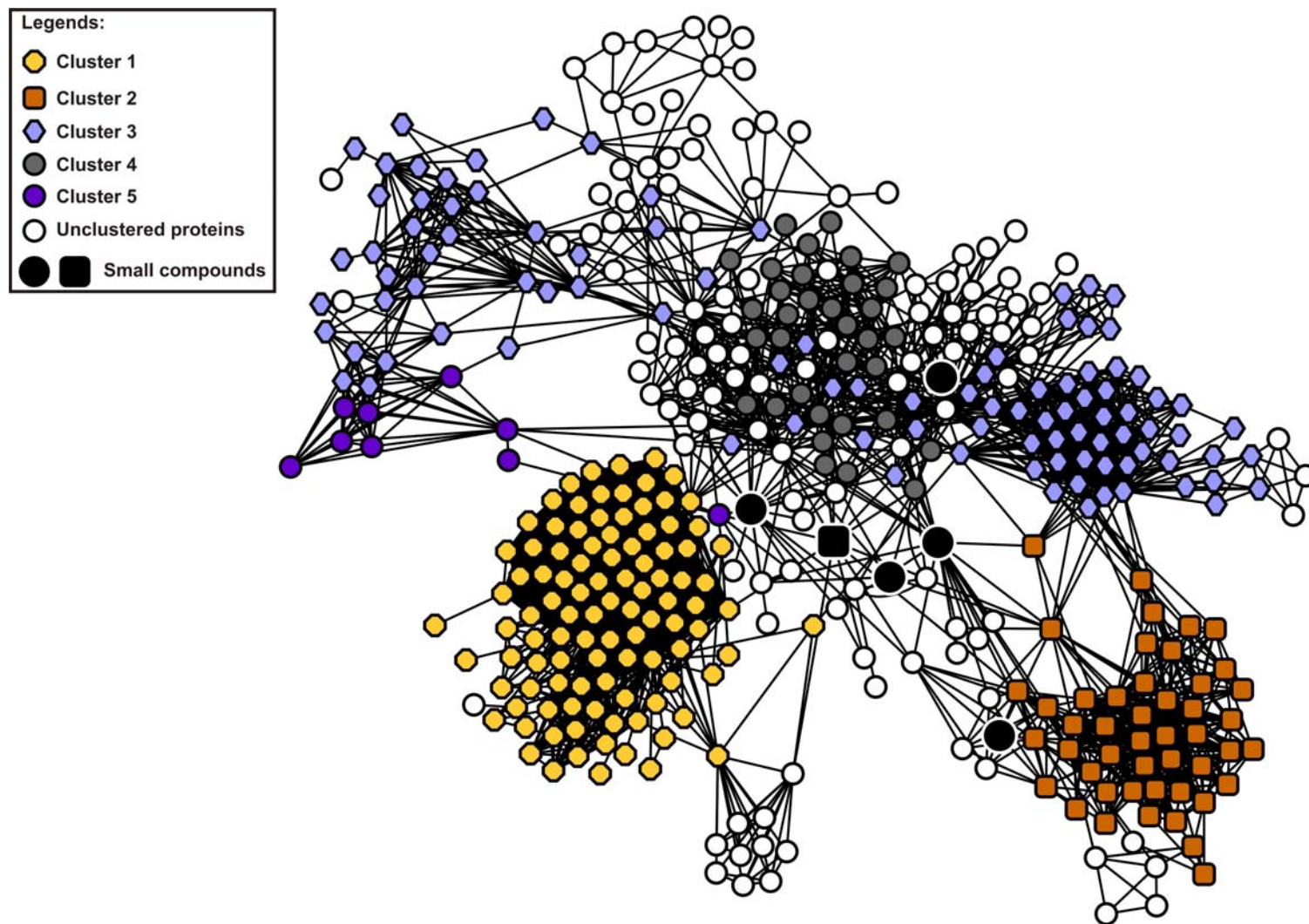


Figure 2.

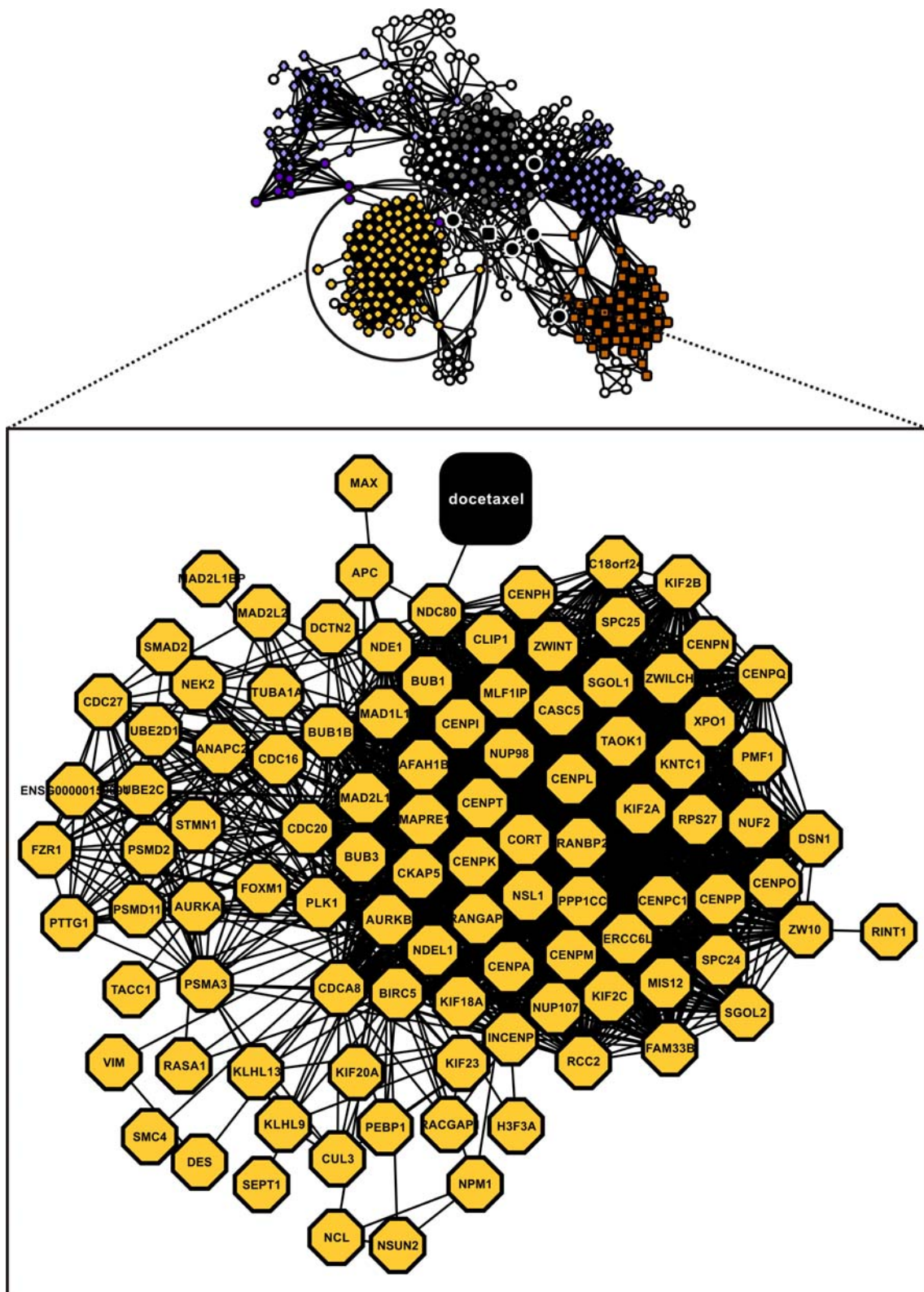


Figure 3

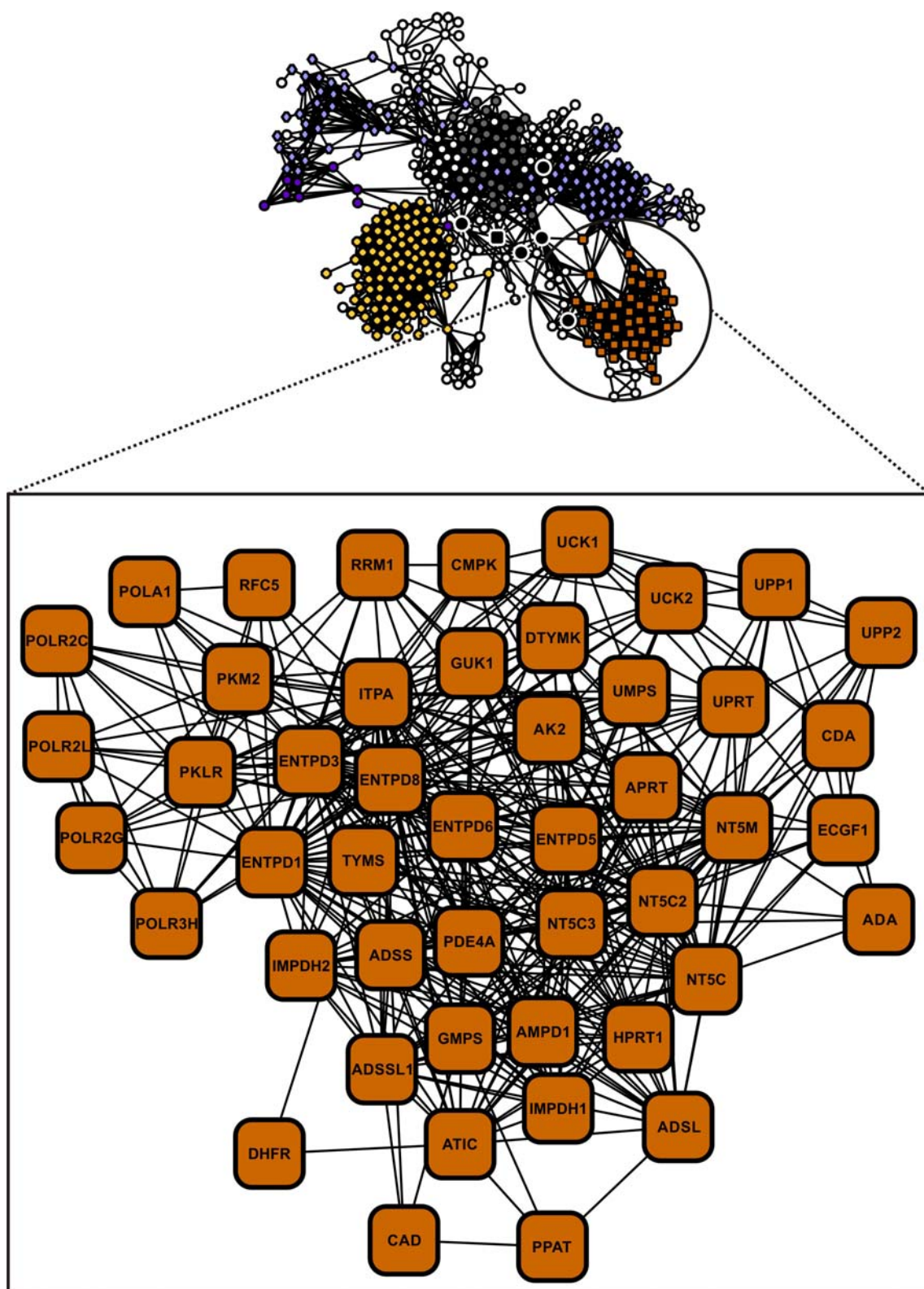


Figure 4.

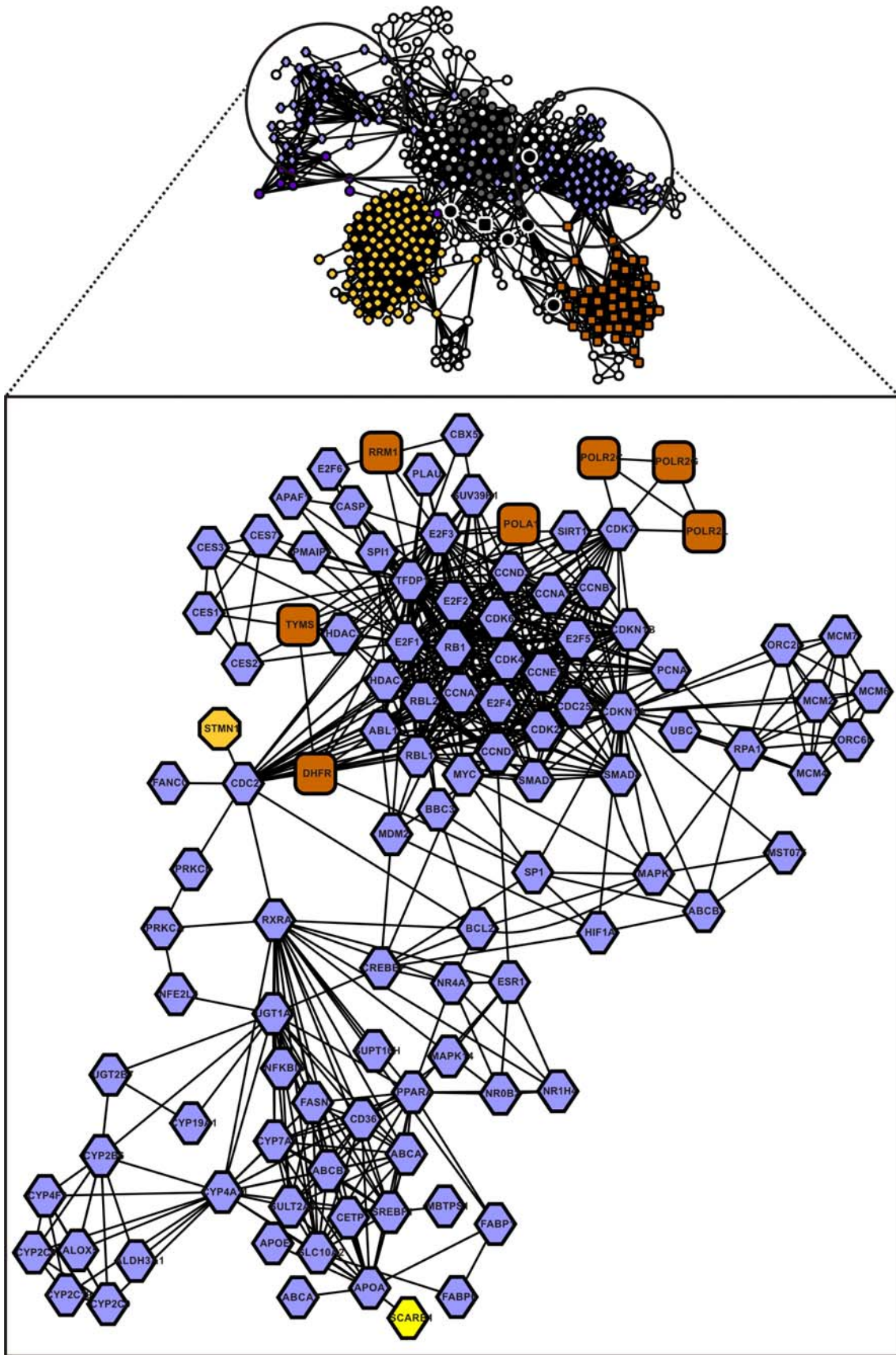


Figure 5.

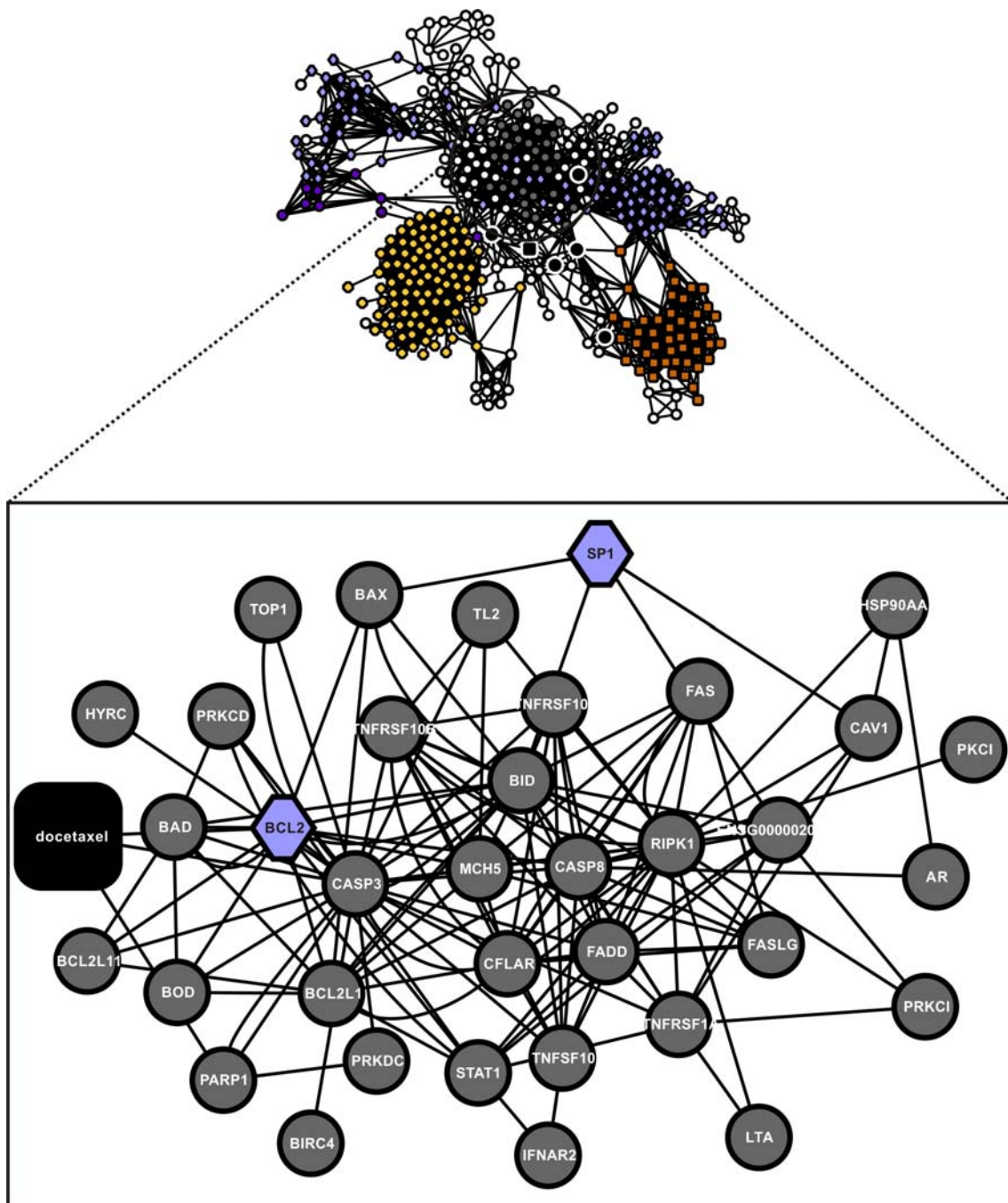


Figure 6.

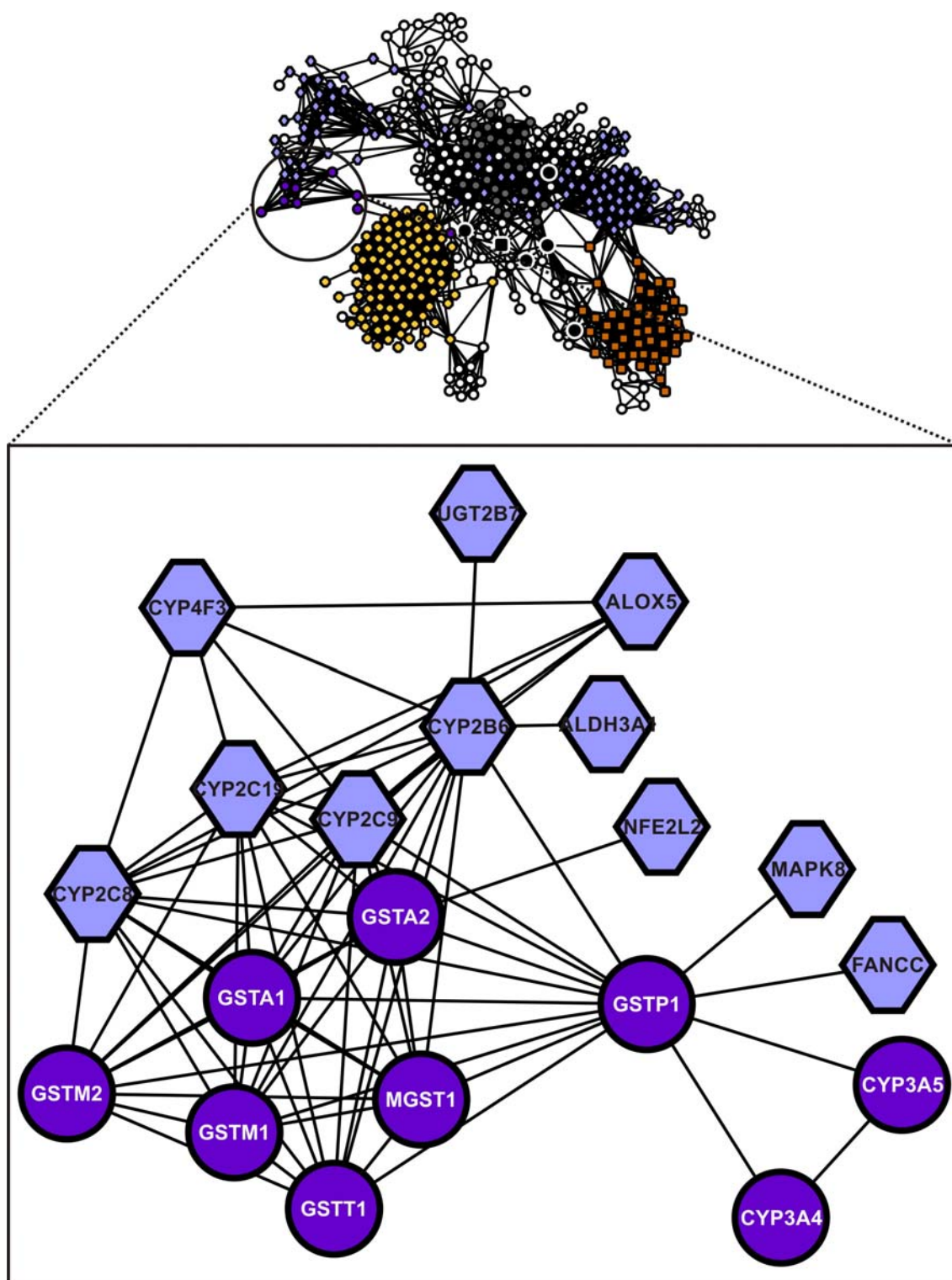
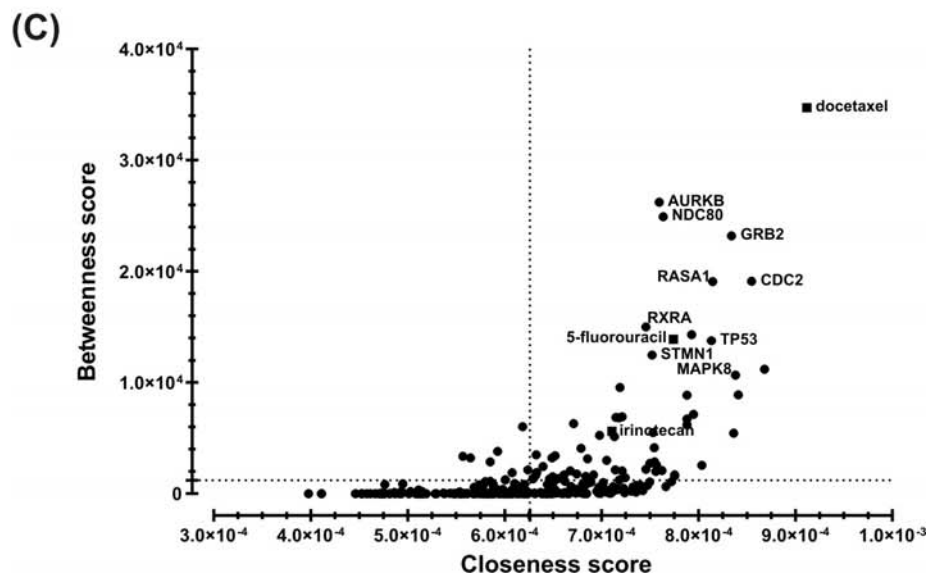
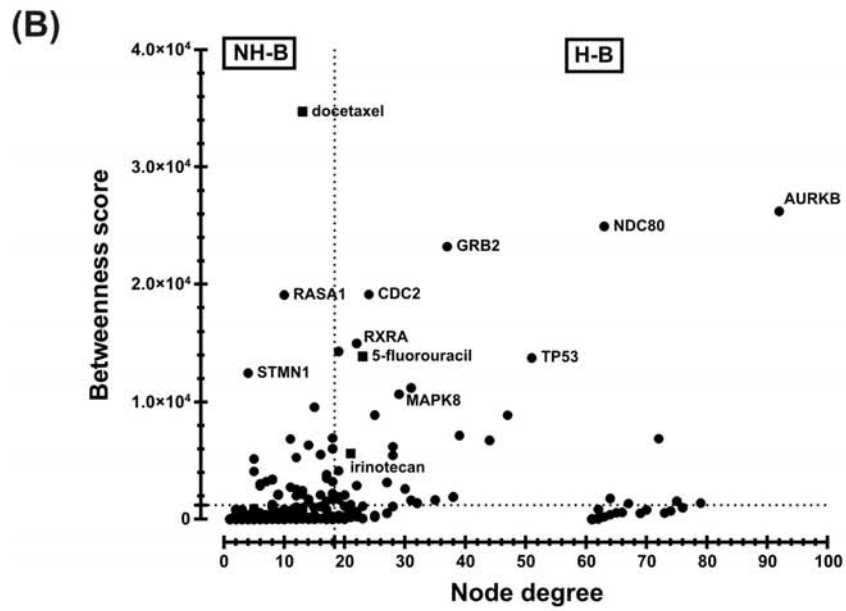
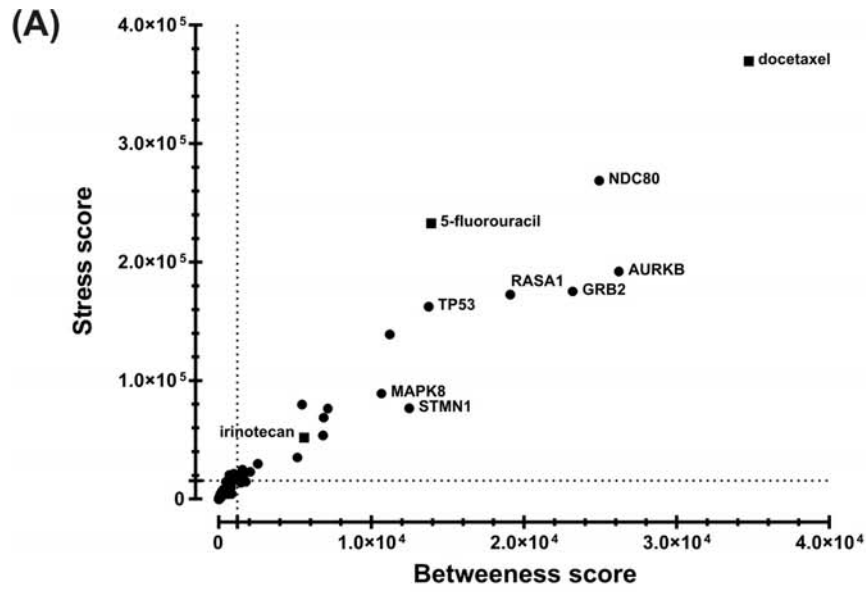


Figure 7.



DISCUSSÃO

O câncer gástrico, na prática clínica diária, é uma doença de difícil tratamento quando não descoberta inicialmente, apresentando uma refratariedade importante para as drogas quimioterápicas usadas atualmente, estando estas em associação ou isoladas. Além disso, quando em progressão desta patologia, o estado geral do paciente pode se deteriorar rapidamente, perdendo muitas vezes as condições clínicas necessárias para receber o tratamento (MURAD et al. 1993; PYRHONEN et al. 1995; GLIMELIUS et al. 1997).

O conhecimento mais detalhado do mecanismo de ação de uma droga quimioterápica necessita de uma visão ampla do funcionamento sistêmico de uma célula, ou seja, implícito neste conhecimento estaria o reconhecimento da complexidade de cada doença que se origina no contexto celular do indivíduo acometido. Tal entendimento vem de encontro aos dados fisiológicos, bioquímicos e parâmetros ômicos gerais. Assim, a integração destes dados foi o foco deste trabalho, utilizando, para tanto, ferramentas computacionais que ainda estão pouco difundidas dentro da pesquisa biomédica.

Entre as drogas mais estudadas e empregadas no câncer gástrico estão o docetaxel, o 5-FU, a cisplatina e a oxaliplatina, assim como a capecitabina e o irinotecan. Cada um destes compostos possui mecanismos de ação definidos e relativamente bem caracterizados no contexto farmacodinâmico. De forma geral, as drogas são, muitas vezes, empregadas em combinação, compondo os chamados esquemas quimioterápicos (por exemplo, DCF e XELOX; Cap. 1), onde se busca a combinação de diferentes mecanismos de ação, aumentando, dessa forma, o efeito dos tratamentos nas doenças neoplásicas malignas (HU, 2009).

Levando-se em conta tal fato, a questão principal deste trabalho foi integrar todo o conhecimento já estabelecido por meio da prospecção de dados experimentais e ensaios

clínicos, envolvendo drogas rotineiramente em uso clínico para o tratamento de câncer gástrico e a interação com proteínas que poderiam estar relacionadas à patologia ou ainda que pudessem demonstrar novas interações possíveis de intervenção quimioterápica. Nesse sentido, a farmacologia de sistemas tem integrado os dados experimentais e computacionais no desenvolvimento do conhecimento da ação de drogas, integrando as várias escalas de complexidade, variando desde níveis de organização celular até molecular. Esse conhecimento ainda tem sido pouco utilizado, mas já se têm exemplos de uso na leucemia mieloide crônica, em doenças cardiovasculares, doenças de pele - como acne, patologias infectocontagiosas, asma, esquizofrenia (ALBERT 2002; DITCHFIELD 2003; HIROTA 2005).

Assim, a prospecção de novos alvos observados na rede de interação entre proteínas e droga possibilitaria o emprego de drogas que poderiam comprometer todo o sistema de manutenção da célula e melhorar a resposta contra o câncer gástrico.

Por outro lado, farmacologia de sistemas permite também aumentar o conhecimento dos possíveis efeitos colaterais das moléculas estudadas, utilizando ferramentas apropriadas para tal. Entretanto, este trabalho não se deteve em correlacionar os dados encontrados com os possíveis efeitos colaterais já definidos na literatura, uma vez que os efeitos adversos podem ser relevantes e muitas vezes impeditivos no seu emprego clínico (DEEKS 2007; SCOTT 2007). Um exemplo disso foi observado para o esquema DCF, onde os pacientes apresentaram maiores índices de mielossupressão e complicações infecciosas (KAESTNER 2009; STOLZ 2009; BASTIANS 2009).

Dessa forma, para o tratamento do câncer, utilizando regimes quimioterápicos, busca-se a melhor combinação entre o número mínimo de compostos a serem combinados com a melhor resposta mensurável e com menor toxicidade.

Cabe salientar que todas as drogas acima mencionadas para o tratamento de câncer gástrico também são utilizadas de forma isolada ou em combinação no combate de várias outras neoplasias malignas, como neoplasia de cólon e mama (HAGE-SLEIMAN et al. 2010; WATANABE et al. 2010). Para outros tipos de neoplasias, observou-se alguns avanços importantes na área de tratamento quimioterápico, com reconhecimento de novos alvos terapêuticos nos últimos anos, tais como o HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*), o EGFR (*epidermal growth-factor receptor*) e o fator k-Ras (homólogo viral do oncogene do sarcoma de rato). Estes fatores se tornaram fontes de inúmeros estudos para o desenvolvimento de drogas, como por exemplo, o trastuzumab, bevacizumab e cetuximab, respectivamente. (MILO 2002; NEWMAN 2005).

Um exemplo de câncer bem estudado e que encontra inúmeras dificuldades em seu tratamento é a leucemia mieloide crônica, onde são usadas drogas inibidoras de tirosina cinases, como o Dasatinib (são atualmente usadas na clínica para o tratamento deste tumor (GIRVAN 2002; NEWMAN 2002). Empregando-se a ferramenta de farmacologia de sistema, observa-se que essa droga interage com outros inibidores de tirosina cinase, como sorafenibe e sunitinibe. Estes inibidores atuam não apenas nas tirosinas cinases, mas também em bombas de efluxo de drogas, e em transportadores de múltiplas compostos, inibindo a atividade dessas proteínas. Interessantemente, o dasatinib também apresenta uma interligação com agentes anti-inflamatórios, como celecoxib, além de atuar em alvos semelhantes às drogas usadas no tratamento do acne. Essa interligação demonstra tão complexa é a relação de pequenos compostos-sistemas bioquímicos, o qual é possível observar não somente o alvo para qual um determinado composto foi desenhado, mas também o uso potencial destes compostos para o tratamento de outras patologias quando empregado em combinação com outras drogas.

Dessa maneira, e levando-se em conta a complexidade dos sistemas tumorais, onde o câncer gástrico está incluído, há a necessidade cada vez maior de se ampliar o leque de opções

quimioterápicas sobre outros alvos terapêuticos, utilizando-se drogas já bem estabelecidas, como o caso do 5-FU, ou desenvolvendo-se novos compostos que possam atuar de forma restrita a um alvo ou que tenha atividade em múltiplos alvos. A integração de tais conhecimentos poderá fornecer inúmeras possibilidades de associações e utilizações de compostos já utilizados na clínica com mecanismos de ação relativamente bem descritos, bem como o desenvolvimento de novas drogas.

CONCLUSÕES

Este estudo define alguns tópicos que não se esgotam na sua discussão. Entre eles estão:

- 1- A biologia de sistemas e as suas ferramentas podem representar um incremento significativo no desenvolvimento de novas drogas e regimes de quimioterápicos, capazes de melhorar os resultados no combate ao câncer gástrico. De forma paralela, essa ferramenta também sinaliza com a possibilidade do desenvolvimento de compostos que, isoladamente, podem atuar em um gargalo específico, que represente um alvo importante no câncer gástrico ou até mesmo em outros tumores. Isso pode ser uma realidade em doenças altamente refratárias às drogas em uso e às suas combinações onde, uma vez que se tornem refratárias, a mortalidade elevada é uma constante.
- 2- O desenvolvimento de novas drogas ou até mesmo novas associações que, baseados nas ferramentas da biologia de sistemas, poderiam minimizar os efeitos adversos desses tratamentos.
- 3- A perspectiva da pesquisa translacional, a fim de identificar novos alvos, prever eventos colaterais adversos e aumentar a segurança e a eficácia das drogas existentes pode encontrar nesta metodologia a forma de consolidar tratamentos que, algumas vezes, são testados de forma empírica e que geralmente não se tem certeza se determinadas drogas serão efetivas para todos os indivíduos com doenças complexas, como o câncer, doenças metabólicas, diabetes melitus do tipo 2, desordens psiquiátricas, entre outras.

- 4- O futuro da farmacologia irá requerer mais do que uma simples (meta) análise dos bancos de dados existentes. Ela deverá ter a sua aplicação antecipada em estudos que envolvem mecanismo de drogas, valendo-se de conhecimentos bioquímicos, e fisiológicos, utilizando dados específicos sobre a expressão de proteínas nos tecidos.

REFERÊNCIAS

AHMAD, S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. **Chem Biodivers**. n. 7, p.543-66, 2010.

ALBERT, R.; BARABASI, A.L. Statistical mechanics of complex network. **Rev Mod Phys**. n.74, p.47-97, 2002.

ANAND, S.; PENRHYN-LOWE, S.; VENKITARAMAN, A.R. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. **Cancer Cell**. n.3. p.51-62, 2003.

BADER, G.D.; HOGUE, C.W. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. **BMC Bioinformatics**. n. 4, p.2, 2003.

BAKER, D.J.; DAWLATY, M.M.; GALARDY, P. et al. Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex. **Cell Mol Life Sci**. n.64, p.589-600, 2007.

BAKER, S.J.; REDDY, E.P. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. **Oncogene**. n. 17, p.3261-70, 1998.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J R Stat Soc B**. n. 57, p.289-300, 1995.

BENNETT, B.L.; SASAKI DT; MURRAY, B.W. et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**. n. 98, p.13681-6, 2001.

BERGER, S.I.; IYENGAR, R. Network analyses in systems pharmacology. **Bioinformatics**. n. 25, p.2466-72, 2009.

BORGATTI, S.P. Centrality and network flow. **Soc Networks**. n. 27, p.55-71, 2005.

BREWER, M.; RANGER-MOORE, J.; SATTERFIELD, W. et al. Combination of 4-HPR and oral contraceptive in monkey model of chemoprevention of ovarian cancer. **Front Biosci**. n.12, p. 2260-8, 2007.

CARSON, D.A.; KAYE; J.; WASSON, D.B. The potential importance of soluble deoxynucleotidase activity in mediating deoxyadenosine toxicity in human lymphoblasts. **J Immunol**. n. 126, p.348-52, 1981.

CATALANO, V.; LABIANCA, R.; BERETTA, G.D. et al. Gastric cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**. n. 71, p.127-64, 2009.

CHANEY, S.G.; CAMPBELL, S.L.; BASSETT, E. et al. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. **Crit Rev Oncol Hematol**. n. 53. p.3-11, 2005.

CHAO, W.T.; TSAI, S.H.; LIN, Y.C. et al. Cellular localization and interaction of ABCA1 and caveolin-1 in aortic endothelial cells after HDL incubation. **Biochem Biophys Res Commun**. n. 332, p.743-9, 2005.

CHEN, G.; BHOJANI, M.S.; HEAFORD, A.C. et al. Phosphorylated FADD induces NF-kappaB, perturbs cell cycle, and is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. **Proc Natl Acad Sci U S A.** n. 102, p.12507-12, 2005.

CHEN, Y.; RILEY, D.J.; ZHENG, L. et al. Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. **J Biol Chem.** n.277, p.49408-16, 2002.

CHEN, Y.C.; POHL, G.; WANG, T.L. et al. Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer. **Cancer Res.** n. 65, p.331-7, 2005.

CIFERRI, C.; MUSACCHIO, A.; PETROVIC, A. The Ndc80 complex: hub of kinetochore activity. **FEBS Lett.** n. 581, p.2862-9 2007.

COLES, B.F.; CHEN, G.; KADLUBAR, F.F. et al. Inter-individual variation and organ-specific patterns of glutathione S-transferase alpha, mu, and pi expression in gastrointestinal tract mucosa of normal individuals. **Arch Biochem Biophys.** n. 403, p.270-6, 2002.

CUMMING, R.C.; LIGHTFOOT, J.; BEARD, K. et al. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. **Nat Med.** n.7, p.814-20, 2001.

CVITKOVIC, E. Ongoing and unsaid on oxaliplatin: the hope. **Br J Cancer.** n. 4, p.8-11, 1998.

DAI, Y.; DENT, P.; GRANT, S. Induction of apoptosis in human leukemia cells by the CDK1 inhibitor CGP74514A. **Cell Cycle**. n. 1, p.143-52, 2002.

DANENBERG, P.V. Thymidylate synthetase-a target enzyme in cancer chemotherapy. **Biochim Biophys Acta**. n. 473, p.73-92,1977.

DEEKS, E.D.; SCOTT, L.J. Docetaxel: in gastric cancer. **Drugs**. n. 67, p.1893-901, 2007.

DHARMAWARDANA, P.G.; PERUZZI, B.; GIUBELLINO, A. et al. Molecular targeting of growth factor receptor-bound 2 (Grb2) as an anti-cancer strategy. **Anticancer Drugs**. n. 17, p.13-20, 2006.

DITCHFIELD, C.; JOHNSON, V.L.; TIGHE, A. et al. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. **J Cell Biol**. n.161, p.267-80, 2003.

DU, J.; CAI, X.; YAO, J. et al. The mitotic checkpoint kinase NEK2A regulates kinetochore microtubule attachment stability. **Oncogene**. n.27, p.4107-14, 2008.

ELLIOTT, D.A.; KIM, W.S.; JANS, D.A. et al. Macrophage apolipoprotein-E knockdown modulates caspase-3 activation without altering sensitivity to apoptosis. **Biochim Biophys Acta**. n. 1780, p.145-53, 2008.

ESTRADA, E.; HATANO, N. A vibrational approach to node centrality and vulnerability in complex networks. **Phys. A** 389:3648-3660, 2010.

ESTRADA, E. Virtual identification of essential proteins within the protein interaction network of yeast. **Proteomics**. n. 6, p.35-40, 2006.

FARATIAN, et al. Cancer systems biology. **Methods Mol Biol**. n.662, p.245-63, 2010.

FREEMAN, L.C. Going the Wrong Way on a One-Way Street: Centrality in Physics and Biology. **Journal of Social Structure**. v. 9, n. 15, p.1, 2008.

FRIEDENSON, B. BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian. **MedGenMed**. n.7, p.60, 2005.

FURUKAWA, H.; IWANAGA, T.; KOYAMA, H. et al. Effect of sex hormones on carcinogenesis in the stomachs of rats. **Cancer Res**. n. 42, p.5181-2, 1982.

GALMARINI, C.M.; GRAHAM, K.; THOMAS, X. et al. Expression of high Km 5'-nucleotidase in leukemic blasts is an independent prognostic factor in adults with acute myeloid leukemia. **Blood**. n.98, p.1922-26, 2001.

GALMARINI, C.M.; MACKEY, JR.; DUMONTET, C. et al. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. **Leukemia**. n. 15, p.875-90, 2001.

GAY, B.; SUAREZ, S.; CARAVATTI, G. et al. Selective GRB2 SH2 inhibitors as anti-Ras therapy. **Int J Cancer**. n. 83, p.235-41, 1999.

GHOSHAL, K.; JACOB, S.T. An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. **Biochem Pharmacol.** n. 53, p.1569-75,1997.

GIRVAN, M.; NEWMAN, M.E. Community structure in social and biological networks. **Proc Natl Acad Sci U S A.** n. 99, p.7821-6, 2002.

GLIMELIUS, B.; EKSTROM, K.; HOFFMAN, K. et al. Randomized comparison between chemotherapy plus best supportive care with best supportive care in advanced gastric cancer. **Ann Oncol.** n. 8, p.163-8, 1997.

GLINSKY, G.V.; BEREZOVSKA, O.; GLINSKII, A.B. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. **J Clin Invest.** n.115, p.1503-21, 2005.

GRABSCH, H.; TAKENO, S.; PARSONS, W.J. et al. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer--association with tumour cell proliferation. **J Pathol.** n. 200, p.16-22, 2003.

GRAY, T.; MORREY, E.L.; GANGADHARAN, B. et al. Enforced expression of cytosolic 5'-nucleotidase I confers resistance to nucleoside analogues in vitro but systemic chemotherapy toxicity precludes *in vivo* selection. **Cancer Chemother Pharmacol.** n. 58, p.117-28, 2006.

GUNDERSON, L.L.; SOSIN, H. Adenocarcinoma of the stomach: areas of failure in a reoperation series (second or symptomatic look) clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** n.8, p.1-11, 1982.

HAGE-SLEIMAN, R.; HERVEAU, S.; MATERA, E.L. et al. Tubulin binding cofactor C (TBCC) suppresses tumor growth and enhances chemosensitivity in human breast cancer cells. **BMC Cancer.** n.10, p.135, 2010.

HARRINGTON, E.A.; BEBBINGTON, D.; MOORE, J. et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth *in vivo*. **Nat Med.** n.10, p.262-7, 2004.

HAUF, S.; COLE, R.W. LATERRA, S. et al. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. **J Cell Biol.** n. 161, p.281-94, 2003.

HIROTA, T.; LIPP, J.J.; TOH, B.H. et al. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. **Nature.** n. 438, p.1176-80, 2005.

HOLM, P.J.; BHAKAT, P.; JEGERSCHÖLD, C. et al. Structural basis for detoxification and oxidative stress protection in membranes. **J Mol Biol.** n. 360, p.934-45, 2006.

HOLME, P.; HUSS, M.; JEONG, H. Subnetwork hierarchies of biochemical pathways. **Bioinformatics.** n.19, p.532-8, 2003.

HU, Y. BRCA1, hormone, and tissue-specific tumor suppression. **Int J Biol Sci.** n.5, p.20-7, 2009.

ICHIKAWA, W. Prediction of clinical outcome of fluoropyrimidine-based chemotherapy for gastric cancer patients, in terms of the 5-fluorouracil metabolic pathway. **Gastric Cancer.** n.9, p.145-55, 2006.

JANUNGER, K.G.; HAFSTRÖM, L.; NYGREN, P. et al. The swedish council on technology assessment in Health Care. A systematic overview of chemotherapy effects in gastric cancer. **Acta Oncol.** n. 40, p.309-26, 2001.

KAESTNER, P.; STOLZ, A.; BASTIANS, H. Determinants for the efficiency of anticancer drugs targeting either Aurora-A or Aurora-B kinases in human colon carcinoma cells. **Mol Cancer Ther.** n.8, p.2046-56, 2009.

KAWASAKI, H.; CARRERA, C.J.; PIRO, L.D. et al. Relationship of deoxycytidine kinase and cytoplasmic 5'-nucleotidase to the chemotherapeutic efficacy of 2-chlorodeoxyadenosine. **Blood.** n. 81, p.597-601, 1993.

KEEN, N.; TAYLOR, S.S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. **Nat Rev Cancer.** n.4, p.927-36, 2004.

_____; _____. Mitotic drivers-inhibitors of the Aurora B Kinase. **Cancer Metastasis Rev.** n. 28, p.185-95, 2009.

KIM, S.T.; KANG, W.K.; KANG, J.H. et al. Salvage chemotherapy with irinotecan, 5-fluorouracil and leucovorin for taxane- and cisplatin-refractory, metastatic gastric cancer. **Br J Cancer**. n. 92, p.1850-4, 2005.

KITANO, H. A robustness-based approach to systems-oriented drug design. **Nat Rev Drug Discov**. n. 6, p.:202-10, 2007.

KUO, M.F.; WANG, H.S.; KUO, Q.T. et al. High expression of stathmin protein predicts a fulminant course in medulloblastoma. **J Neurosurg Pediatr**. n. 4, p.74-80, 2009.

LAGE, H. Molecular analysis of therapy resistance in gastric cancer. **Dig Dis**. n. 21, p.326-38, 2003.

LANDEN, C.N. JR.; LIN, Y.G.; IMMANENI, A. ET AL. Overexpression of the centrosomal protein Aurora-A kinase is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. **Clin Cancer Res**. n.13, p.4098-104, 2007.

LAPPALAINEN, I.; THUSBERG, J. SHEN, B. et al. Genome wide analysis of pathogenic SH2 domain mutations. **Proteins**. n.72, p.779-92, 2008.

LARSSON, D.E.; HASSAN, S.; LARSSON, R. et al. Combination analyses of anti-cancer drugs on human neuroendocrine tumor cell lines. **Cancer Chemother Pharmacol**. n. 65, p. 5-12, 2009.

LE, X.F.; LAMMAYOT, A.; GOLD, D. et al. Genes affecting the cell cycle, growth, maintenance, and drug sensitivity are preferentially regulated by anti-HER2 antibody through phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling. **J Biol Chem.** n. 280, p.2092-104, 2005.

LEE, S.M.; LEE, J.Y.; CHOI, J.E. et al. Epigenetic inactivation of retinoid X receptor genes in non-small cell lung cancer and the relationship with clinicopathologic features. **Cancer Genet Cytogenet.** n. 197, p.39-45, 2010.

LI, Q.; YU, Y.Y.; ZHU, Z.G. et al. Effect of NFkappaB constitutive activation on proliferation and apoptosis of gastric cancer cell lines. **Eur Surg Res.** n. 37, p.105-10, 2005.

LIN, C.Y.; CHIN, C.H.; WU, H.H. et al. Hubba: hub objects analyzer-a framework of interactome hubs identification for network biology. **Nucleic Acids Res.** n. 36, p.W438-W43, 2008.

LINDON, C.; PINES, J. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. **J Cell Biol.** n. 164, p.233-41, 2004.

LISCOVITCH, M.; LAVIE, Y. Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways? **Trends Biochem Sci.** n. 25, p.530-34, 2000.

LONGLEY, D.B.; HARKIN, D.P.; JOHNSTON, P.G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat Rev Cancer.** n. 3, p.330-8, 2003.

MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in biological networks. **Bioinformatics**. n.21, p.3448-49, 2005.

MALONE, W.; PERLOFF, M.; CROWELL, J. et al. Fenretinide: a prototype cancer prevention drug. **Expert Opin Investig Drugs**. n. 12, p.1829-42, 2003.

MARUO, Y.; IWAI, M.; MORI, A. et al. Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and drug metabolism. **Curr Drug Metab**. n. 6, p.91-9, 2005.

MCDERMOTT, U.; LONGLEY, D.B.; GALLIGAN, L. et al. Effect of p53 status and STAT1 on chemotherapy-induced, Fas-mediated apoptosis in colorectal cancer. **Cancer Res**. n. 65, p.8951-60, 2005.

MEYERHARDT, J.A.; FUCHS, C.S. Chemotherapy options for gastric cancer. **Semin Radiat Oncol**. n. 12, p.176-6, 2002.

MILO, R.; SHEN-ORR, S.; ITZKOVITZ, S. et al. Network motifs: simple building blocks of complex networks. **Science**. n.298, p.824-7, 2002.

MORENO, J.J. New aspects of the role of hydroxyeicosatetraenoic acids in cell growth and cancer development. **Biochem Pharmacol**. n. 77, p.1-10, 2009.

MORROW, C.S.; COWAN, K.H. Glutathione S-transferases and drug resistance. **Cancer Cells**. n. 2, p.15-22, 1990.

NEWMAN, M.E.J. A measure of betweenness centrality based on random walks. **Soc Networks**. n. 27, p.39-54, 2005.

NISHIYAMA, M.; WADA, S. Docetaxel: its role in current and future treatments for advanced gastric cancer. **Gastric Cancer**. n. 12, p.132-41, 2009.

NOGUCHI, T.; WIRTZ, H.C.; MICHAELIS, S. et al. Chromosomal imbalances in gastric cancer. Correlation with histologic subtypes and tumor progression. **Am J Clin Pathol**. n.115, p.828-34, 2001.

NYLANDER-KOSKI, O.; KIVILUOTO, T.; PUOLAKKAINEN, P. et al. The effect of nitric oxide, growth factors, and estrogen on gastric cell migration. **J Surg Res**. n.143, p.230-7, 2007.

PALLI, D.; CIPRIANI, F.; DECARLI, A. et al. Reproductive history and gastric cancer among postmenopausal women. **Int J Cancer**. n.56, p.812-5, 1994.

PARK, D.J.; LENZ, H.J. Determinants of chemosensitivity in gastric cancer. **Curr Opin Pharmacol**. n. 6, p.337-44, 2006.

PARKIN, D.M.; PISANI, P.; PERLAY, J. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**. n. 55, p.74-108, 2002.

PAUMI, C.M.; LEDFORD, B.G.; SMITHERMAN, P.K. et al. Role of multidrug resistance protein 1 (MRP1) and glutathione S-transferase A1-1 in alkylating agent resistance. **J Biol Chem**. n. 276, p.7952-6, 2001.

PERRY, MICHAEL C.; WILLIAMS, Lippincott.; WILKINS. **The Chemotherapy Source Book**. 4. ed., 2008.

PINEDO, H.M.; PETERS, G.F. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. **J Clin Oncol**. n.6, p.1653-64, 1988.

POOL-ZOBEL, B.L.; SELVARAJU, V.; SAUER, J. et al. Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. **Carcinogenesis**. n. 26, p.1064-76, 2005.

POZZO, C.; BARONE, C. Is there an optimal chemotherapy regimen for the treatment of advanced gastric cancer that will provide a platform for the introduction of new biological agents? **Oncologist**. n. 13, p.794-806, 2008.

PUJOL, A.; MOSCA, R.; FARRÉS, J. et al. Unveiling the role of network and systems biology in drug discovery. **Trends Pharmacol Sci**. n. 31, p.115-23, 2010.

QUEK, R.; LIM, W.T. FOO, K.F. et al. Capecitabine and oxaliplatin (XELOX) is safe and effective in patients with advanced gastric cancer. **Acta Oncol**. n. 46, p.1032-4, 2007.

RAMOS-GOMEZ, M.; KWAK, M.K.; DOLAN, P.M. et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. n. 98, p.3410-5, 2001.

RASHEED, Z.A.; RUBIN, E.H. Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs. **Oncogene**. n. 22, p.7296-304, 2003.

RIVALS, I.; PERSONNAZ, L.; TAING, L. et al. (2007) Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test? **Bioinformatics**. n. 23, p.401-7.

RODER, D.M. The epidemiology of gastric cancer. **Gastric Cancer**. n.5, p. 5-1, 2000.

ROSATI, G.; FERRARA, D.; MANZIONE, L. New perspectives in the treatment of advanced or metastatic gastric cancer. **World J Gastroenterol**. n. 15, p. 2689-9262, 2009.

SAU, A.; PELLIZZARI T.F.; VALENTINO, F. et al. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. **Arch Biochem Biophys**. n.500, p.116-22, 2010.

SCARDONI, G.; PETTERLINI, M.; LAUDANNA, C. Analyzing biological network parameters with CentiScaPe. **Bioinformatics**. n. 25, p.2857-59, 2009.

SCHARLAU, D.; BOROWICKI, A.; HABERMA, N.N.N. et al. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. **Mutat Res**. n. 682, p.39-53, 2009.

SCULLY, R.; LIVINGSTON, D.M. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. **Nature**. n. 408, p.429-32, 2000.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Res**. n. 13, p. 2498-2504, 2003.

SHI, X.; WANG, D.; DING, K. et al. GDP366, a novel small molecule dual inhibitor of survivin and Op18, induces cell growth inhibition, cellular senescence and mitotic catastrophe in human cancer cells. **Cancer Biol Ther**. n. 9, p.640-50, 2010.

SHIBATA, W.; MAED, S.; HIKIBA, Y. et al. c-Jun NH2-terminal kinase 1 is a critical regulator for the development of gastric cancer in mice. **Cancer Res**. n. 68, p.5031-9, 2008.

SHIM, H.J.; YUN, J.Y.; HWANG, J.E. et al. BRCA1 and XRCC1 polymorphisms associated with survival in advanced gastric cancer treated with taxane and cisplatin. **Cancer Sci**. n.101, p.1247-54, 2010.

SLÁDEK, N.E.; KOLLANDER, R.; SREERAMA, L. et al. Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens. **Cancer Chemother Pharmacol**. n. 49, p.309-21, 2002.

SMITHERMAN, P.K.; TOWNSEND, A.J.; KUTE, T.E. et al. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) in alkylating agent setoxification: MRP2 potentiates glutathione S-transferase A1-1-mediated resistance to chlorambucil cytotoxicity. **J Pharmacol Exp Ther.** n.308, p.260-7, 2004.

SUGAI, T.; TSUKAHARA, M.; ENDOH, M. et al. Analysis of cell cycle-related proteins in gastric intramucosal differentiated-type cancers based on mucin phenotypes: a novel hypothesis of early gastric carcinogenesis based on mucin phenotype. **BMC Gastroenterol.** n.10, p.55, 2010.

TANAKA, T.U. Bi-orienting chromosomes on the mitotic spindle. **Curr Opin Cell Biol.** n.14, p.365-71, 2002.

TAYLOR, S.; PETERS, J.M. Polo and Aurora kinases: lessons derived from chemical biology. **Curr Opin Cell Biol.** n. 20, p.77-84, 2008.

THOMADAKI, H.; SCORILAS, A. Breast cancer cells response to the antineoplastic agents cisplatin, carboplatin, and doxorubicin at the mRNA expression levels of distinct apoptosis-related genes, including the new member, BCL2L12. **Ann N Y Acad Sci.** n. 1095, p.35-44, 2007.

TIEN, J.F.; UMBREIT, N.T.; GESTAUT, D.R. et al. Cooperation of the Dam1 and Ndc80 kinetochore complexes enhances microtubule coupling and is regulated by aurora B. **J Cell Biol.** n. 189, p.713-23, 2010.

TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**. n. 22, p.7369-75, 2003.

VADER, G.; MAIA, A.F.; LENS, S.M. The chromosomal passenger complex and the spindle assembly checkpoint: kinetochore-microtubule error correction and beyond. **Cell Division**. n.3, p.10, 2008.

VAN LEUKEN, R.; CLIJSTERS, L.; VAN ZON, W. et al. Polo-like kinase-1 controls Aurora A destruction by activating APC/C-Cdh1. **PLoS One**. n. 4, p.e5282, 2009.

VAN'T VEER, L.J.; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M.J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**. n. 415, p.530-6, 2002.

WATANABE, T.; KAMISAKI, Y.; TIMMERMAN, H. Convergence and divergence, a concept for explaining drug actions. **J Pharmacol Sci**. n.96, p.95-100, 2004.

WILS, J. Treatment of gastric cancer. **Curr Opin Oncol**. n. 10, p.357-61, 1998.

WIST, A.D.; BERGER, S.I.; IYENGAR, R. Systems pharmacology and genome medicine: a future perspective. **Genome Med**. n. 1, p.11, 2009.

WU, G.; QIU, X-L.; ZHOU, L. et al. Small molecule targeting the Hec1/Nek2 mitotic pathway suppresses tumor cell growth in culture and in animal. **Cancer Res**. n. 68, p.8393-99, 2008.

WUTCHY, S.; STADLER, P.F. Centers of complex networks. **J Theor Biol.** n. 223, p.45-53
2003

XIAO, C.; YANG, B.F.; ASADI, N. et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in glioma cells. **J Biol Chem.** n. 277, p.25020-5, 2002.

YANG, H.; HE, L.; KRUK, P. et al. Aurora-A induces cell survival and chemoresistance by activation of Akt through a p53-dependent manner in ovarian cancer cells. **Int J Cancer.** n.119, p.2304-12, 2006.

YE, Y.N.; LIU, E.S.; SHIN, V.Y. et al. Contributory role of 5-lipoxygenase and its association with angiogenesis in the promotion of inflammation-associated colonic tumorigenesis by cigarette smoking. **Toxicology.** n. 203, p.179-88, 2004.

YOKOYAMA, Y.; KURAMITSU, Y.; TAKASHIMA, M. et al. Protein level of apolipoprotein E increased in human hepatocellular carcinoma. **Int J Oncol.** n. 28, p.625-31, 2006.

YOO, J.; PARK, S.S.; LEE, Y.J. Pretreatment of docetaxel enhances TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells. **J Cell Biochem.** n. 104, p.1636-46, 2008.

YOO, N.J.; LEE, S.H.; JEONG, E.G. et al. Expression of nuclear and cytoplasmic phosphorylated FADD in gastric cancers. **Pathol Res Pract.** n. 203, p.73-8, 2007.

YU, G.Z.; CHEN, Y.; WANG, J.J. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. **J Cancer Res Clin Oncol.** n.135, p.1331-9, 2009.

YU, H.; KIM, P.M.; SPRECHER, E. et al. The importance of bottlenecks in protein networks: correlation with gene essentiality and expression dynamics. **PLoS Comput Biol.** n. 3, p.e59, 2007.