



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

MARKÊNIA KÉLIA SANTOS ALVES

GENÓTIPO DE *Helicobacter pylori* NA ETIOLOGIA DO
CÂNCER GÁSTRICO: CORRELAÇÃO COM
METILAÇÃO E EXPRESSÃO GÊNICA

Fortaleza/CE

2010

Cód. AC 118830
R14027564
16/06/2011

Markênia Kélia Santos Alves

**GENÓTIPO DE *Helicobacter pylori* NA ETIOLOGIA DO
CÂNCER GÁSTRICO: CORRELAÇÃO COM
METILAÇÃO E EXPRESSÃO GÊNICA**

**Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Microbiologia
Médica do Departamento de Patologia e
Medicina Legal da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Médica.**

Orientadora:

Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst

CARO USUÁRIO

QUANDO VOCÊ VEIO A ESTA BIBLIOTECA E ACHOU QUE EU SERIA
ÚTIL ÀS SUAS NECESSIDADES, TORNEI-ME "SEU COMPANHEIRO DE
APRENDIZAGEM".

QUANDO TIVER A TENTACÃO DE ME MUTILAR, LEMBRE-SE QUE
MUITOS OUTROS TAMBÉM PRECISAM DE MIM.

" SEU DIREITO TERMINA QUANDO COMEÇA O DO OUTRO".

BCS/UFC

Fortaleza/CE

2010

D
616.9943
A48g

A48g Alves, Markênia Kélia Santos

Genótipo de *Helicobacter pylori* na etiologia do câncer gástrico: correlação com metilação e expressão gênica / Markênia Kélia Santos Alves. – Fortaleza-CE, 2010.
219 f.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica

1. Neoplasias Gástricas 2. *Helicobacter pylori* 3. Metilação
I. Rabenhorst, Silvia Helena Barem (Orient.) II. Título.

CDD: 616.9943


Markênia Kélia Santos Alves

**Genótipo de *Helicobacter pylori* na etiologia do câncer gástrico:
correlação com metilação e expressão gênica**


Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Aprovada em **04 de março de 2010.**


BANCA EXAMINADORA




Prof. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini
Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP)



Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho
Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará (UFC)

*Aos meus pais, por sempre irem além,
dando-me lições de vida com coragem,
exemplos, incentivo, carinho e
dedicação. Suas histórias de vida são o
meu maior exemplo.*

AGRADECIMENTOS

Estas primeiras páginas, e últimas palavras que escrevo neste trabalho, são para agradecer a todas as pessoas que me aconselharam, motivaram, orientaram, reforçaram, cuidaram, ouviram, protegeram e colaboraram ao longo desta *época especial de minha vida*. Para além destas palavras escritas, espero encontrar a melhor forma e momento para dizer a todos o quanto estou agradecida e o quanto reconheço que, a todos, devo um pouco deste trabalho.

Inicialmente agradeço a **DEUS**, por sempre iluminar a minha vida, concedendo a fé, a esperança e por ser fonte de paz eterna.

Aos **pacientes** que participaram desta pesquisa, já que sem eles nenhuma dessas páginas estaria escrita.

À **Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst**, antes de tudo pela paciência, pelos ensinamentos e “dicas” de pesquisa, pelos esclarecimentos e sugestões oportunas e que espero ter sabido aproveitar. Suas sugestões nunca soaram arrogância de quem detém o título de Doutor, mas foram sempre úteis, sempre bem-vindas e acabaram por se constituir neste trabalho. Agradeço ainda o compromisso assumido, o empenho que colocou neste trabalho, os níveis de exigência dos desafios que me lançou e os suportes, formais e informais, que disponibilizou. Para agradecer a aliança, a confiança e a amizade, as palavras serão sempre poucas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, representado pelo **Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim**, pela dedicação na formação científica dos alunos deste programa.

À **Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini**, pela preciosa participação na banca examinadora, por todo acolhimento no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu e pela valiosa contribuição para a realização deste trabalho.

À **Dra Márcia Valéria Pitombeira Ferreira**, pela análise histopatológica e imuno-histoquímica dos tumores estudados e por fornecer um pouco do seu vasto conhecimento em patologia.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida e à Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho, pela estimada participação na banca examinadora.

Ao cirurgião Marcos Aurélio Pessoa Barros, pela contribuição na coleta dos espécimes clínicos.

Ao Laboratório PATHUS, representado pela patologista Luciana Gomes Rocha de Arruda, pela prontidão no fornecimento dos blocos e laudos histopatológicos.

À Dra Adriana Camargo Ferrasi, pela inestimável contribuição e ensinamentos para padronização da técnica de MS-PCR.

Ao doutorando Mário Henrique Girão Faria, pela contagiante paixão pelos assuntos da investigação científica, pela sensibilidade e suporte disponibilizado para o desenvolvimento deste trabalho e, acima de tudo, pela exigência. Gostaria de ratificar a sua competência, repleto conhecimento e orientação quanto à realização da técnica de imuno-histoquímica.

À doutoranda Valeska Portela Lima por todo o carinho, sobretudo nos momentos de maior aflição e sobrecarga. Também pela contribuição no arranjo gráfico deste trabalho e padronização de reações de PCR, pela competência e atitude profissional que tanto possui. Entre nós fica provado que as grandes amizades suportam grandes desafios.

À mestranda Isabelle Joyce Silva Fernandes, que muito intimamente partilhou uma palavra amiga, uma história, uma graça, a alegria de um bom riso num momento de descontração que tanto apreciamos, aproveito para dizer que *sempre pode contar comigo!*

Aos amigos do mestrado Anne Carolinne Bezerra Perdigão, Bruno Jaegger Laranjeira, Emerson Ramalho Ferreira, Francisca Jakelyne de Farias Marques e Rafael de Carvalho Mendes pelo companheirismo, incentivo e por suas palavras gentis e alegres, obrigada pelos sorrisos.

A todos os meus amigos do Laboratório de Genética Molecular (LABGEM), quero dizer o quanto valorizo a interdependência, o companheirismo, o respeito e os bons sentimentos que nos unem.

À técnica **Margareth Gonçalves Maia**, pela prontidão e apoio no preparo dos cortes histológicos.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal, em especial ao auxiliar de serviços gerais **Sebastião da Silva Lima**, pelo carinho, ajuda e incentivo nas manhãs de sábado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - **FUNCAP**, pelo apoio financeiro.

À **minha família** que merece poucas palavras, mas aquelas que são mais preciosas. Obrigada por vocês existirem. Obrigado por depositarem em mim a confiança em todas as horas. Sei que vocês se orgulham por eu ter superado mais uma etapa na minha vida. Mas este orgulho que sentem por mim, converto numa obrigação de cada dia ser mais digna desse sentimento. Pai, mãe e irmãos, um beijo em cada um de vocês.

Ao meu companheiro do sucesso e do fracasso, das alegrias e tristezas ... , **Eduardo José Fernandes Rodrigues**, obrigada por ter sempre me incentivado, apoiado e, o melhor de tudo, sempre me cobrado para que eu continuasse e concluísse mais esta etapa de nossas vidas, que construímos juntos. Posso dizer que uma *grande parcela* desta conquista eu devo a você. Obrigada pelos ensinamentos incontáveis, pela cumplicidade e reciprocidade nos bons e nos maus momentos, pela grande companhia que você me faz ao longo da vida.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, meus eternos agradecimentos.

*“Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode
nunca ser o bastante...”*

*Dê o melhor de você assim mesmo. E veja você que,
no final das contas, é entre você e Deus...*

Nunca foi entre você e eles!”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é um dos fatores etiológicos relevantes associados ao câncer gástrico, entretanto o mecanismo pelo qual essa bactéria atua ainda é pouco conhecido sendo sugerido o seu envolvimento na promoção da metilação do DNA. De fato, o silenciamento gênico, através da metilação de regiões promotoras, é altamente freqüente no câncer gástrico. Dessa maneira, o presente estudo objetivou avaliar a inativação dos genes *COX-2*, *CDKN2A* e *HMLH1* por metilação e sua relação com a infecção por *H. pylori*, associando com os achados clínicos e histopatológicos. Esse estudo observacional do tipo transversal foi realizado a partir de 82 adenocarcinomas gástricos. A detecção de *H. pylori* foi feita pela amplificação do gene *ureaseC*, utilizando a técnica de PCR, bem como a detecção dos genes *cagA*, *cagE*, *virB11*, *flaA* e os subtipos de *vacA*. O padrão de expressão e metilação dos genes *COX-2*, *HMLH1* e *CDKN2A* foram determinados por Imuno-Histoquímica e MS-PCR, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os testes do χ^2 e teste exato de Fisher sendo considerados significativos resultados com $p < 0,05$. O gene mais metilado foi *COX-2* (51,2%) seguido do *CDKN2A* (46,3%), sendo *HMLH1* o menos freqüente (32,9%). A positividade de *COX-2*, *HMLH1* e $p16^{\text{INK4A}}$ foi observada em 26%, 58,4% e 40,3% dos casos. Uma forte correlação negativa foi encontrada entre negatividade desses marcadores e presença de metilação nos promotores dos seus genes. Nos tumores localizados na cárdia, a negatividade de $p16^{\text{INK4A}}$ foi um achado significativo ($p=0,031$), assim como a metilação no promotor de *COX-2* nos tumores intestinais de estágios avançados ($p=0,037$). Por outro lado, nos tumores de localização não-cárdia, os tumores subtipo intestinal, apresentaram uma significativa ($p=0,006$) inativação de *HMLH1* por metilação enquanto que os tumores subtipo difuso, um achado significativo ($p=0,022$) foi a negatividade de *CDKN2A* por metilação. A infecção por *H. pylori* foi observada em 95,1% dos tumores. Considerando o genótipo bacteriano estudado, os genes *vacA* s1m1 (70,5%) e *flaA* (61,9%) foram os mais freqüentes. Foi observado que os tumores metilados para os genes *COX-2* e *HMLH1* foram associados com as cepas de *H. pylori* *vacA* s1 ($p=0,028$ e $0,047$, respectivamente) e os tumores não metilados foram associados com a presença do gene *flaA* ($p=0,017$). Não foi observada nenhuma correlação entre os genes de *H. pylori* e ausência de expressão dos marcadores estudados. Esses dados sugerem que a inativação dos genes *COX-2*, *HMLH1* e *CDKN2A* por metilação ocorre por vias distintas de acordo com o subtipo histológico e localização do tumor e depende do genótipo bacteriano.

Palavras-chave: Câncer gástrico; Metilação; *COX-2*; *HMLH1*; *CDKN2A*; Genótipos de *Helicobacter pylori*; Subtipo histológico; Localização do tumor.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a relevant etiological factor associated with gastric cancer, although the mechanism by which it acts is still not well known, it is suggested a role of this microorganism in the promotion of methylation of DNA. In fact, gene silencing by methylation of promoter regions is highly frequent in gastric cancer. Thus, the present study aimed to evaluate the inactivation of the genes *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1* by methylation and its relationship with infection by *H. pylori*, in a series of gastric adenocarcinomas, in association with clinical and histopathological findings. This observational transversal study analyzed a sample of 82 gastric adenocarcinomas. The detection of *H. pylori* was done by amplification of the *ureaseC* gene, using the PCR technique, as well as the detection of the *cagA*, *cagE*, *virB11*, *flaA* genes and the subtypes of the *vacA* gene. The pattern of expression and methylation of the *COX-2*, *HMLH1* and *CDKN2A* genes was determined by immunohistochemistry and MS-PCR techniques, respectively. Statistically significant differences were evaluated by the chi-square test (χ^2) or Fisher exact test and the results were considered statistically significant when the *p*-values were less than 0.05. The most methylated gene was *COX-2* (51.2%), followed by *CDKN2A* (46.3%) and *HMLH1* (32.9%). The positivity of *COX-2*, *HMLH1* and p16^{INK4A} was observed in 26%, 58.4% and 40.3% of the cases. A strong negative correlation was found between negativity of these markers and the presence of methylation in the promoters of their genes. In cardia tumors, negativity of p16^{INK4A} was a significant finding ($p=0.031$), as well as the methylation in the promoter of *COX-2* in intestinal tumors of advanced stages ($p=0.037$). On the other hand, in noncardia tumors, the intestinal subtype lesions demonstrated a significant ($p=0.006$) inactivation of *HMLH1* by methylation, while in the diffuse subtype tumors, a significant finding ($p=0.022$) was the negativity of *CDKN2A* by methylation. The infection by *H. pylori* was observed in 95.1% of the tumors. Considering the bacterial genotype, the genes *vacA* s1m1 (70.5%) and *flaA* (61.9%) were the most frequent. It was observed that the tumors with methylated *COX-2* and *HMLH1* genes were associated with the strains of *H. pylori vacA* s1 ($p=0.028$ and 0.047 , respectively) and the non-methylated tumors were associated with the presence of the gene *flaA* ($p=0.017$). No correlation was found between the genes of *H. pylori* and absence of expression of the studied markers. These data suggest that the inactivation of the genes *COX-2*, *HMLH1* and *CDKN2A* by methylation occur by distinct ways according to the histological subtype and tumor location and depends on the *H. pylori* genotype.

Keywords: Gastric cancer; Methylation; *COX-2*; *HMLH1*; *CDKN2A*; *Helicobacter pylori* genotypes; Histological subtype; Tumor location.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxas de incidência padronizadas por idade para o câncer gástrico. Os dados são mostrados por 100.000 habitantes/sexo	29
Figura 2	Representação esquemática simplificada das principais regiões anatômicas do estômago	31
Figura 3	Camadas da parede do estômago	32
Figura 4	Características histopatológicas dos adenocarcinomas subtipo intestinal (a) e subtipo difuso (b). As setas em amarelo representam (a) células tumorais formando glândulas e (b) células tumorais em anel de sinete	34
Figura 5	Representação esquemática da “CASCATA DE CORREA”	37
Figura 6	Representação esquemática da conversão da citosina em 5-metilcitosina catalisada pela DNA Metil-Transferase (DNMT). SAM – S-adenosilmetionina; SAH – S-adenosilhomocisteína; DNMT – DNA metiltransferase	39
Figura 7	Mecanismo de repressão transcricional mediado por metilação do DNA	40
Figura 8	A: Hipometilação global do genoma levando à ativação de oncogenes silenciados. B: Hipermetilação de ilhas CpG de genes supressores de tumor bloqueia a transcrição desses genes	42
Figura 9	Representação esquemática do <i>locus INK4a/ARF/INK4b</i>	43
Figura 10	Representação simplificada do ciclo celular, mostrando a atuação da p16 ^{INK4A} . M – Fase de mitose e citocinese; G1 – Fase de intervalo entre a fase M e a fase S; S – Fase de replicação do DNA; G2 – Fase de intervalo entre a fase S e M do ciclo celular	43
Figura 11	Representação esquemática do processo de reparo por erro de pareamento	45
Figura 12	Esquema da síntese das prostaglandinas catalisada pela enzima COX-2	46
Figura 13	Mecanismos pelos quais a enzima COX-2, via prostaglandinas, induzem o processo carcinogênico gástrico	47
Figura 14	W. Jaworski, 1886 [a] e Marshall e Warren [b]	50
Figura 15	Representação estrutural externa de <i>H. pylori</i>	52
Figura 16	Diagrama esquemático da camada externa da bactéria <i>H. pylori</i>	52
Figura 17	Representação da ilha de patogenicidade <i>cag</i> do genoma da cepa 26.695 de <i>H. pylori</i>	54
Figura 18	Modelo da maquinaria do sistema de secreção tipo IV de <i>H. pylori</i>	55
Figura 19	Esquema das sequências EPIYA A, B, C e D da proteína CagA nas cepas	

	ocidentais e asiáticas	56
Figura 20	Mecanismo de ação da proteína CagA	56
Figura 21	Imagem de células epiteliais gástricas com desarranjo do citoesqueleto e alongamento das células infectadas com cepas <i>cagA</i> (+) (seta vermelha)	57
Figura 22	a) Representação esquemática da região sinal e do meio do gene <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> e seus subtipos de alelos. b) Esquema da proteína VacA e processamento proteolítico para formação de proteína ativa	58
Figura 23	Vacuolização celular induzida por VacA	59
Figura 24	Mecanismo de ação de VacA em células epiteliais gástricas e linfócitos T	60
Figura 25	Representação da estrutura do flagelo, mostrando a composição protéica distinta na região do filamento, gancho e corpo basal	61
Figura 26	Gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata, mostrando a detecção de fragmento específico de 294pb (seta vermelha) a partir da reação de amplificação do gene <i>ureC</i>	82
Figura 27	Géis de poliacrilamida a 6% detectando fragmentos específicos de 297pb para gene <i>cagA</i> [a], 290pb e 192pb para os alelos m1 e m2 de <i>vacA</i> [b] e 259pb e 286pb para os alelos s1 e s2 de <i>vacA</i> , respectivamente [c]	82
Figura 28	Géis de agarose a 2% detectando fragmentos de 509 pb gerados a partir de amplificação do gene <i>cagE</i> [a], de 491pb para <i>virB11</i> [b], e 508pb para <i>flaA</i> [c]. O marcador de peso molecular utilizado nos géis de agarose a 2% foi 1kb para <i>cagE</i> , <i>virB11</i> (Invitrogen) e para <i>flaA</i> (Ludwig)	83
Figura 29	Imunomarcção das proteínas COX-2 (A, B), p16 ^{INK4A} (C, D) e HMLH1 (E, F) (400X). A, B– Imunomarcção em marrom no citoplasma de células tumorais gástricas para proteína COX-2. C, D– Marcação intensa e difusa em marrom no núcleo e citoplasma de células tumorais para proteína p16 ^{INK4A} . E, F- Marcação intensa e difusa em núcleo e citoplasma de células tumorais para proteína HMLH1. A, C, E) Adenocarcinoma gástrico subtipo difuso; B, D, F) Adenocarcinoma gástrico subtipo intestinal	84
Figura 30	Frequência de imunomarcção das proteínas COX-2, p16 ^{INK4A} e HMLH1 em 77 adenocarcinomas gástricos	85
Figura 31	Mediana do LI citoplasmático (LI C), nuclear (LI N) e do HS citoplasmático (HS C) para as proteínas COX-2, p16 ^{INK4A} e HMLH1	85
Figura 32	Géis de poliacrilamida a 6% detectando fragmentos específicos de 161pb e 171pb para o gene <i>COX-2</i> metilado e não metilado (a); 153pb e 124pb para <i>HMLH1</i> metilado e não metilado (b); 150pb e 151pb para <i>CDKN2A</i> (p16 ^{INK4A})	

	metilado e não-metilado, respectivamente (c)	86
Figura 33	Frequência de metilação em regiões promotoras dos genes <i>COX-2</i> , <i>CDKN2A</i> e <i>HMLH1</i> em 82 adenocarcinomas gástricos	87
Figura 34	Frequências dos casos positivos e negativos de COX-2 [A] e metilados e não metilados [B] de acordo com a faixa etária	88
Figura 35	Distribuição dos casos positivos e negativos de COX-2 e metilados e não-metilados de acordo com o tumor primário e comprometimento de linfonodos regionais. ^a <i>p</i> =0,069, * <i>p</i> = 0,026	89
Figura 36	Distribuição dos casos de COX-2 positivos e negativos [A] e metilados e não metilados [B] de acordo com o estadiamento tumoral	89
Figura 37	Frequência dos casos positivos e negativos de HMLH1 [A] e metilados e não-metilados [B] de acordo com a faixa etária	92
Figura 38	Frequência dos casos positivos e negativos de HMLH1 [A] e metilados e não-metilados [B] de acordo com tamanho do tumor primário e comprometimento de linfonodos regionais	92
Figura 39	Frequência dos casos positivos e negativos de HMLH1 [A] e metilados e não metilados [B] de acordo com o estadiamento tumoral	93
Figura 40	Frequência de detecção de HMLH1 [A] e metilação em regiões promotoras [B] de acordo com a localização do tumor.* <i>p</i> =0,044; * <i>p</i> =0,029	93
Figura 41	Frequência dos casos positivos e negativos de p16 ^{INK4A} [A] e metilados e não-metilados [B] de acordo com a faixa etária	97
Figura 42	Frequência de casos positivos e negativos de p16 ^{INK4A} [A] e metilados e não metilados [B] de acordo com o tamanho do tumor primário e comprometimento de linfonodos regionais	97
Figura 43	Frequências dos casos positivos e negativos de p16 ^{INK4A} [A] e metilados e não metilados [B] de acordo com o estadiamento tumoral	98
Figura 44	Distribuição dos casos de metilação em promotor de <i>CDKN2A</i> de acordo com genes combinados de <i>H. pylori</i>	101
Figura 45	Frequência dos grupos de genes metilados (0, 1, 2 e 3)	101
Figura 46	Distribuição da combinação dos dois genes metilados	102
Figura 47	Frequência do número de genes metilados (0, 1, 2, 3) de acordo com a faixa etária	102
Figura 48	Distribuição do número de genes metilados de acordo com o tamanho do tumor primário (T) e comprometimento de linfonodos (N). * <i>p</i> =0,017; ** <i>p</i> =0,005	103
Figura 49	Frequência de número de genes metilados de acordo com o estadiamento tumoral	103

Figura 50	Frequência do número de genes metilados de acordo com a localização do tumor	104
Figura 51	Distribuição do número de genes metilados segundo o subtipo histológico	104
Figura 52	Representação esquemática das possíveis vias tumorigênicas identificadas de acordo com a localização do tumor e subtipo histológico	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estimativa do número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo a localização primária do tumor (para o ano 2010, válida também para o ano 2011)	30
Tabela 2	Classificação histopatológica dos tumores gástricos, segundo OMS	33
Tabela 3	Estadiamento do adenocarcinoma gástrico	35
Tabela 4	Agrupamento do TNM para definição do estadiamento	35
Tabela 5	Seqüências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados e tamanho de fragmento gerado após término da PCR	73
Tabela 6	Condições das reações de PCR para os genes <i>ureC</i> , subtipos de <i>vacA</i> , <i>cagA</i> , <i>cagE</i> , <i>virB11</i> e <i>flaA</i> de <i>H. pylori</i>	74
Tabela 7	Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores e tamanho dos fragmentos gerados na PCR dos genes <i>CDKN2A</i> , <i>HMLH1</i> e <i>COX-2</i> metilados e não-metilados	76
Tabela 8	Condições da reação de PCR dos genes <i>CDKN2A</i> , <i>HMLH1</i> e <i>COX-2</i> metilados e não-metilados	76
Tabela 9	Sítios celulares de expressão das proteínas p16 ^{INK4A} , <i>HMLH1</i> e <i>COX-2</i> detectados na reação Imuno-Histoquímica	78
Tabela 10	Dados gerais da amostra estudada	81
Tabela 11	Frequência dos genes de patogenicidade de <i>H. pylori</i>	83
Tabela 12	Correlação entre expressão e <i>status</i> de rmetilação em regiões promotoras dos genes <i>COX-2</i> , <i>CDKN2A</i> e <i>HMLH1</i>	87
Tabela 13	Distribuição dos casos de imunomarcacão e metilação do gene <i>COX-2</i> de acordo com parâmetros clínicos e histopatológicos	90
Tabela 14	Relação entre expressão e metilação do promotor do gene <i>COX-2</i> e genes de patogenicidade de <i>H. pylori</i> estudados	91
Tabela 15	Relação entre expressão e metilação em regiões promotoras de <i>HMLH1</i> e parâmetros clínicos e histopatológicos	94
Tabela 16	Relação entre expressão e metilação no promotor de <i>HMLH1</i> de acordo com o subtipo histológico e localização do tumor	94
Tabela 17	Relação entre a inativação de <i>HMLH1</i> e subtipo histológico e localização do tumor	95
Tabela 18	Relação entre imunomarcacão e metilação no promotor de <i>HMLH1</i> e genes de <i>H. pylori</i>	96

Tabela 19	Relação entre imunomarcacão e metilaco de <i>CDKN2A</i> de acordo com parâmetros clinicopatológicos	98
Tabela 20	Relaco entre expressão e metilaco de <i>CDKN2A</i> de acordo com o subtipo histológico e localizaco do tumor	99
Tabela 21	Distribuição dos casos p16 ^{INK4A} negativos de acordo com subtipo histológico, <i>status</i> de metilaco e localizaco do tumor	99
Tabela 22	Distribuição dos casos de imunomarcacão e metilaco em promotor de <i>CDKN2A</i> de acordo com os genes de <i>H. pylori</i> estudados	100
Tabela 23	Distribuição das combinações dos dois genes metilados de acordo com parâmetros clínicos e patológicos	105
Tabela 24	Distribuição dos casos considerando o número de genes metilados (0, 1, 2 e 3) de acordo com os genes de <i>H. pylori</i> estudados	106
Tabela 25	Distribuição da combinação dos dois genes metilados de acordo com os genes de <i>H. pylori</i>	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

♂ - Sexo masculino

♀ - Sexo feminino

°C – Grau centígrado

χ^2 – Teste do Qui-Quadrado

a.C – Antes de Cristo

AICR – *American Institute for Cancer Research*

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

ARF – *Alternate open reading frame*

ATP – Adenosina trifosfato

babA – Gene da adesina de ligação ao antígeno do grupo sanguíneo de Lewis (*blood group antigen binding adhesion gene*).

Bax – *bcl-2 associated protein X*

Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2*

C-MYC – *cell-avian myelocytomatosis*

Ca⁺² – Íon cálcio

CA 19.9 – Antígeno carboidrato 19.9

CA 72.4 – Antígeno carboidrato 72.4

CA 50 – Antígeno carboidrato 50

cag – Gene associado a citotoxina

cag-PAI – Ilha de patogenicidade *cag*

cagA – Gene do antígeno A associado a citotoxina

cagE – Gene do antígeno E associado a citotoxina

cagL – Gene do antígeno L associado a citotoxina

CDH1 – Gene humano da E-caderina

CDK4 – Quinase dependente de ciclina 4 (*cyclin-dependent kinase 4*)

CDK6 – Quinase dependente de ciclina 6 (*cyclin-dependent kinase 6*)

CDKN2A – Gene do inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

CDKN2B – Gene do inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*)

CEA – Antígeno Carcinoembrionário

CH₃ – Grupamento Metil

Cl⁻ – Íon cloreto

CLO – Organismos como *Campylobacter* (*Campylobacter-Like Organism*)

CO₂ – Dióxido de carbono

COX-2 – Cicloxigenase tipo 2 (*Cyclooxygenase 2*)

CpG – Citosinas próximas a guaninas

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio

DAB – 3,3'- diaminobenzidina

DAPK 1– Proteína quinase 1 associada à morte celular (*Death-associated protein kinase 1*)

DEPC – Dietilpirocarbonato

DNA – Ácido desoxiribonucleico

DNMTs – DNA metiltransferases

dNTPs – Desoxiribonucleotídeos trifosfatos

EBV – Vírus Epstein-Barr

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico

EPIC – *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*

EPIYA – Região de repetição contendo os aminoácidos Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala

ERK – Quinase regulada por sinais extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase*)

EUA – Estados Unidos da América

EXO1 – Exonuclease 1

E2F – Fator de transcrição E2

F – Oligonucleotídeo anti-reverso (*Forward*)

FAK – Família de quinases de adesão focal (*focal adhesion kinase*)

Fase G1 – Fase de intervalo entre a fase M e a fase S do ciclo celular (*Gap 1*)

Fase G2 – Fase de intervalo entre a fase S e a M do ciclo celular (*Gap 2*)

Fase S – Fase de replicação do DNA

Fase M – Fase de mitose e citocinese

flaA – Gene associado a síntese da flagelina A

flaB – Gene associado a síntese da flagelina B

G+C – Guanina + Citosina

glmM – Fosfoglucosamina mutase (*phosphoglucosamine mutase*)

HCl – Ácido clorídrico

HDAC 1 – Proteínas desacetilases de histonas 1

HDAC 2 – Proteínas desacetilases de histonas 2

HIF - 1 α – Fator induzível por hipóxia 1 alfa

HMLH1 – Gene homólogo 1 de *mutL* humano (*human mutL homolog 1*)

HNPCC – Câncer de cólon não-polipóide hereditário

HpSA – Antígeno fecal de *Helicobacter pylori* (*Helicobacter pylori Stool Antigen*)

HUWC – Hospital Universitário Walter Cantídeo

IARC – Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer*)

ICD – O – Código morfológico da Classificação Internacional de Doenças para Oncologia.

iceA – Gene induzido pelo contato com epitélio A (*induced by contact with epithelium A*)

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

IL6 – Interleucina 6

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INK4A – Inibidores de Cdk4 (*inhibitors of Cdk4*)

LABGEM – Laboratório de Genética Molecular

LI – Índice de marcação

LI C – Índice de marcação citoplasmático

LI N – Índice de marcação nuclear

LSAB – Método de coloração da estreptoavidina biotina

Kb – Kilobase

KCl – Cloreto de potássio

kDa – Kilodalton

KIP – Família de proteínas inibidoras de quinases dependentes de ciclinas

M – Metilado

M - Molar

MALT – Linfoma do tecido linfóide associado à mucosa

MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*)

MBD – Proteínas com domínio de ligação ao grupamento metal (*Methyl-Binding Domain*)

MeCP2 – Proteínas 2 ligantes do grupamento metil de ilhas CpG (*Methyl CpG binding protein 2*)

MEK – Quinases MAPK/ERK (*MAPK/ERK Kinase*)

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MGMT – O6-Metilguanosina-DNA-Metiltransferase (*O6-metilguanosina-DNA metiltransferase*)

Mi-2 – Proteínas com atividade de remodelação de cromatina

Min – Minuto

MINT 1 – Gene metilado no tumor 1

MINT 2 – Gene metilado no tumor 2

µg - Micrograma

µL – Microlitro

µm - Micrômetro

µM – Micromolar

MKN28 – Linhagem de células humanas com mutação no gene *p53* no códon 251

MLH1 - Gene homólogo 1 de *mutL*

mM - Milimolar

MMPs – Metaloproteinases de matriz

MMR – Reparo por erro de pareamento (*DNA mismatch repair*)

MS-PCR – PCR específica para metilação

MSH2 – Gene homólogo 2 do gene *mutS* (*mutS homolog 2*)

MSH6 – Gene homólogo 6 do gene *mutS* (*mutS homolog 6*)

N₂ – Gás nitrogênio

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

nm – Nanômetro

NuRD – Família de proteínas com atividade de desacetilases

O₂ – Gás oxigênio

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – Pares de bases

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PGs – Prostaglandinas

PGE2 – Prostaglandinas E2

PGI2 – Prostaglandinas I2

pH - Potencial hidrogeniônico

PI-3k/Akt – Via de sinalização do fosfoinositol-3-quinase/quinases específicas de treonina/serina

PKA – Proteína quinase A

PKC – Proteína quinase C

PMS2 – Família de proteínas envolvidas no reparo por erro de pareamento codificadas pelo gene *PMS2 - postmeiotic segregation increased 2 gene*.

Pol δ – DNA polimerase δ

pRb – Proteína retinoblastoma

PTGS -2 – Prostaglandina endoperoxidase sintase 2 (*prostaglandin-endoperoxide synthase 2*)

PTP – Proteína tirosina fosfatase (*Protein tyrosine phosphatase*)

p53 – Proteína supressora tumoral com 53 kDa

R – Oligonucleotídeo reverso (*Reverse*)

R – Índice de correlação de Spearman

R.P.M – Rotações por minuto

RAF1 – Fator 1 associada a Ras (*Ras associated factor 1*)

RAS – *Rat sarcoma*

Região s – Região sinal do gene *vacA*

Região m – Região do meio do gene *vacA*

Região i – Região intermediária do gene *vacA*

RFC – Fator de Replicação C

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

RNA_r – Ácido ribonucleico ribossomal

RPA – Proteína de replicação A

RUNX3 – Fator de transcrição 3 relacionado ao Runt (*Runt-related transcription factor 3*)

SAH – S-adenosilhomocisteína

SAM – S-adenosilmetionina

Seg - segundo

SH2 – Proteína homóloga 2 de Src (*Src homology 2*)

SHP2 – *SH2 domain-containing tyrosine phosphatase*

Sin3a – Proteínas com atividade de remodelação de cromatina

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

Src – Família de proteínas de tirosina quinases oncogênicas

T - Temperatura

TGFα – Fator de crescimento tissular alfa

TGI – Trato Gastrointestinal

TNFα – Fator de necrose tumoral alfa

TNM – Estadiamento baseado no tumor primário, linfonodos regionais e metástase à distância.

U - Unidade

U – Não-metilado

UFC – Universidade Federal do Ceará

ureA – *ureaseA*

ureC – *ureaseC*

vacA – Gene da citotoxina vacuolizante A

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

vir – Gene de virulência

vit.C – Vitamina C

WCRF – *World Cancer Research Fund*

ÍNDICE

I	INTRODUÇÃO	28
I.1	Câncer gástrico	28
I.1.1	Epidemiologia	28
I.1.2	Anatomia e patologia	31
I.1.2.1	Anatomia do estômago	31
	a) Macroscópica	31
	b) Microscópica	32
I.1.2.2	Classificação histopatológica dos tumores gástricos	32
	a) Classificação da Organização mundial de Saúde (OMS)	32
	b) Classificação de Lauren	33
I.1.2.3	Estadiamento	34
	a) Clínico	34
	b) Patológico	34
I.1.3	Diagnóstico	36
I.1.3.1	Sinais e sintomas	36
I.1.3.2	Técnicas radiológicas	36
I.1.3.3	Endoscopia	36
I.1.3.4	Marcadores biológicos	37
I.1.4	Histogênese do adenocarcinoma gástrico	37
I.1.5	Etiologia	38
I.1.5.1	Fatores genéticos	38
I.1.5.2	Fatores epigenéticos	38
I.1.5.2.1	Metilação do DNA	39
	a) Processo de metilação do DNA	39
	b) Mecanismos de repressão transcricional	40
	c) Papel da metilação do DNA	41
I.1.5.2.2	Genes inativados pela hipermetilação em regiões promotoras	42
	a) <i>CDKN2A</i>	42
	b) <i>HMLH1</i>	44
	c) <i>COX-2</i>	45
I.1.5.3	Fatores ambientais	48
	a) Dieta	48

	b) Álcool e fumo	48
	c) Agentes infecciosos	48
1.2	<i>Helicobacter pylori</i>	49
1.2.1	Histórico	49
1.2.2	Epidemiologia	50
1.2.3	Características microbiológicas	51
1.2.3.1	Classificação taxonômica	51
1.2.3.2	Estrutura e nutrição	51
1.2.3.3	Genoma	53
1.2.3.4	Fatores de virulência e patogênese da infecção por <i>H. pylori</i>	53
1.2.3.4.1	Urease	53
1.2.3.4.2	Ilha de patogenicidade <i>cag</i>	54
	a) Genes do sistema de secreção tipo IV	54
	b) Gene <i>cagA</i> (Gene do antígeno A associado a citotoxina)	55
	c) Gene <i>cagE</i> (Gene do antígeno E associado a citotoxina)	57
1.2.3.4.3	Outros fatores de virulência	57
	a) Citotoxina Vacuolizante A (VacA)	57
	b) Flagelos	61
1.2.4	Diagnóstico da infecção por <i>H. pylori</i>	62
1.2.4.1	Testes invasivos	62
1.2.4.1.1	Endoscopia	62
	a) Histologia	62
	b) Cultura	62
	c) Teste rápido da urease	63
	d) Testes moleculares	63
1.2.4.2	Testes não-invasivos	63
1.2.4.2.1	Testes ativos	64
	a) Teste respiratório da uréia	64
	b) Teste para pesquisa de HpSA	64
1.2.4.2.2	Testes passivos	64
	a) Detecção de anticorpos específicos	64
1.2.5	Possíveis mecanismos carcinogênicos	64
2	PERGUNTA DE PARTIDA	66
3	HIPÓTESE	66
4	OBJETIVOS	67

4.1	Geral	67
4.2	Específicos	67
5	METODOLOGIA	68
5.1	Aspectos éticos	68
5.2	Desenho do estudo	68
5.3	População de investigação	68
5.4	Critérios de inclusão	68
5.5	Coleta dos dados clínicos e epidemiológicos	69
5.6	Procedimentos laboratoriais	69
5.6.1	Coleta, processamento e armazenamento da amostra	69
5.6.2	Extração do DNA de material congelado	69
5.6.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	70
5.6.3.1	Deteção de <i>H. pylori</i>	70
5.6.3.2	Genotipagem de <i>H. pylori</i>	71
5.6.4	Tratamento do DNA com bissulfito de sódio e MS-PCR	74
5.6.5	Método Imuno-Histoquímico para deteção de p16 ^{INK4A} , HMLH1 e COX-2	77
5.6.5.1	Análise Imuno-Histoquímica	78
5.7	Análise estatística	79
6	RESULTADOS	80
6.1	Caracterização da amostra	80
6.2	Deteção da infecção por <i>H. pylori</i> e genes de patogenicidade	82
6.3	Deteção por Imuno-Histoquímica dos marcadores COX-2, p16 ^{INK4A} e HMLH1	83
6.4	Deteção do <i>status</i> de metilação em regiões promotoras dos genes <i>COX-2</i> , <i>CDKN2A</i> e <i>HMLH1</i>	86
6.5	Correlação entre expressão e <i>status</i> de metilação em regiões promotoras dos genes <i>COX-2</i> , <i>CDKN2A</i> e <i>HMLH1</i>	87
6.6	Análise individual dos marcadores	88
6.6.1	<i>COX-2</i>	88
6.6.1.1	Relação entre imunomarcção e metilação em regiões promotoras do gene <i>COX-2</i> e parâmetros clinicopatológicos	88
6.6.1.2	Relação entre expressão e metilação em regiões promotoras de <i>COX-2</i> e genes de <i>H. pylori</i>	90
6.6.2	<i>HMLH1</i>	92
6.6.2.1	Relação entre imunomarcção e metilação em regiões promotoras do gene <i>HMLH1</i> e parâmetros clinicopatológicos	92

5.6.2.2	Relação entre expressão e metilação em regiões promotoras de <i>HMLH1</i> e genes de <i>H. pylori</i>	95
5.6.3	<i>CDKN2A</i>	96
5.6.3.1	Relação entre imunomarcacão e metilação no promotor do gene <i>CDKN2A</i> e parâmetros clinicopatológicos	96
5.6.3.2	Relação entre expressão e metilação no promotor de <i>CDKN2A</i> e genes de <i>H. pylori</i>	99
5.7	Análise combinada dos marcadores	101
7	DISCUSSÃO	108
7.1	Análise da caracterização da amostra	108
7.2	Análise da detecção de <i>H. pylori</i> e genes de patogenicidade	109
7.3	Análise individual da detecção da expressão e metilação no promotor dos genes <i>COX-2</i> , <i>HMLH1</i> e <i>CDKN2A</i>	111
7.3.1	<i>COX-2</i>	112
7.3.2	<i>HMLH1</i>	113
7.3.3	<i>CDKN2A</i>	114
7.4	Análise da correlação entre imunomarcacão e <i>status</i> de metilação no promotor dos genes <i>COX-2</i> , <i>HMLH1</i> e <i>CDKN2A</i>	115
7.5	Análise individual dos marcadores <i>COX-2</i> , <i>HMLH1</i> e $p16^{INK4A}$ de acordo com os parâmetros clinicopatológicos	116
7.5.1	<i>COX-2</i>	116
7.5.2	<i>HMLH1</i>	118
7.5.3	$p16^{INK4A}$	119
7.6	Análise individual dos marcadores <i>COX-2</i> , <i>HMLH1</i> e $p16^{INK4A}$ de acordo com a infecção por <i>H. pylori</i> e genes de patogenicidade	122
7.6.1	<i>COX-2</i>	122
7.6.2	<i>HMLH1</i>	123
7.6.3	$p16^{INK4A}$	124
7.7	Análise combinada dos marcadores <i>COX-2</i> , <i>HMLH1</i> e $p16^{INK4A}$	125
8	CONCLUSÕES	129
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
10	ANEXOS	151

1 – INTRODUÇÃO

1.1- Câncer Gástrico

1.1.1- EPIDEMIOLOGIA

As primeiras descrições de câncer gástrico datam de cerca de 1.500 a.C e foram encontradas em papiros médicos egípcios tais como o papiro de Ebers, um dos tratados médicos mais antigos e importantes escritos no Antigo Egito. Atualmente, apesar de uma diminuição acentuada na sua incidência em vários países, o câncer gástrico continua a ser uma doença muito comum em todo o mundo, sendo o quarto câncer mais freqüente, depois dos cânceres de pulmão, mama e cólon/reto (PARKIN et al., 2005). Essa neoplasia é mais freqüente no sexo masculino do que no feminino e aumenta progressivamente com a idade (HAMILTON; AALTONEN, 2000; CARL-MCGRATH et al., 2007; LOCHHEAD; EL-OMAR, 2008).

A incidência de câncer gástrico varia de acordo com a região analisada (Figura 1). Basicamente, existem regiões de alta, intermediária e baixa incidência. Países do nordeste da Ásia, como Japão, Coréia e China, são considerados de alta incidência, apresentando acima de 20 casos por 100.000 homens/ano. Já os países da América do Norte, sul da Ásia e Oceania, incluindo Austrália e Nova Zelândia, são de baixa incidência, com taxas abaixo de 10 casos por 100.000 homens/ano. Alguns países da América do Sul, entre eles o Brasil, são considerados de incidência intermediária (HAMILTON; AALTONEN, 2000; PARKIN et al., 2005; INCA, 2009).

O câncer gástrico é considerado a segunda causa de morte por câncer, depois do câncer de pulmão, afetando em torno de um milhão de pessoas por ano e com uma média de 700.000 mortes anualmente (PARKIN et al., 2005; KAMANGAR et al., 2006). Das 880.000 pessoas diagnosticadas com esse câncer no ano 2000, em torno de 650.000 (74%) morreram dessa doença (PARKIN, 2001).

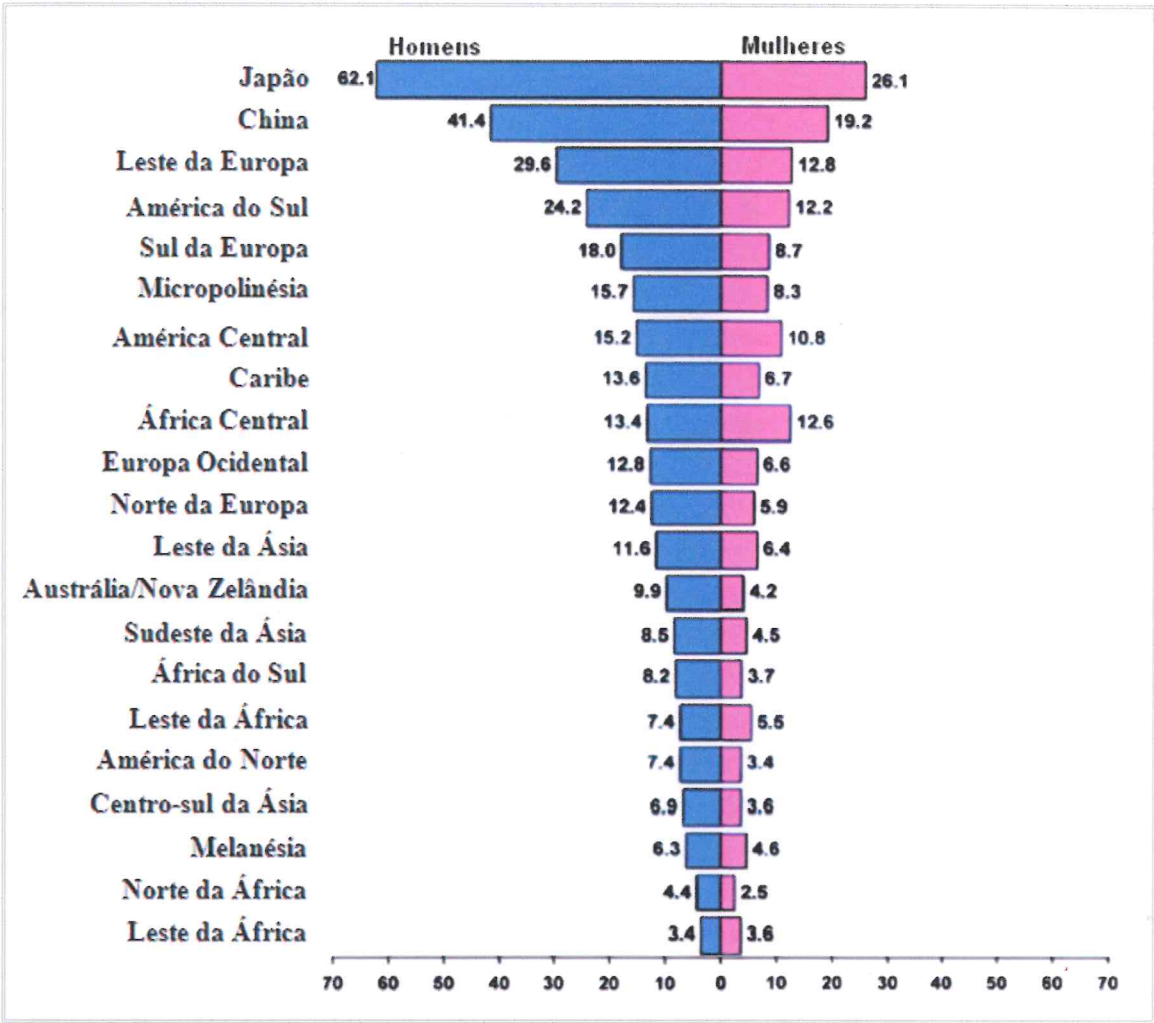


Figura 1- Taxas de incidência padronizadas por idade para o câncer gástrico. Os dados são mostrados por 100.000 habitantes/sexo. Fonte: Adaptado de Parkin et al., 2005.

No Brasil, o câncer gástrico é a quinta neoplasia mais incidente, depois do câncer de próstata, mama, cólon/reto e pulmão com estimativas para o ano de 2010, válidas para o ano de 2011, de 13.820 casos novos entre os homens e de 7.680 nas mulheres (Tabela 1) (INCA, 2009). Na região Nordeste, sem considerar os tumores de pele não melanoma, ele é o segundo mais freqüente entre os homens e quarto entre as mulheres. No estado do Ceará, essa neoplasia também é a segunda mais freqüente entre homens, atrás apenas do câncer de próstata e é a terceira entre as mulheres. Na capital Fortaleza, é observada a mesma tendência entre homens, porém é a quinta mais incidente entre as mulheres (INCA, 2009). A distribuição dos casos novos de câncer gástrico por sexo e região é mostrada na tabela 1.

Tabela 1— Estimativa do número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo a localização primária do tumor (para o ano 2010, válida também para o ano 2011).

	Brasil			Nordeste			Ceará			Fortaleza		
	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total
Próstata	52.350	-	52.350	11.570	-	11.570	2.240	-	2.240	540	-	540
Mama Feminina	-	49.240	49.240	-	8.270	8.270	-	1.660	1.660	-	690	690
Traqueia, brônquio, pulmão	17.800	9.830	27.630	2.380	1.570	3.950	490	370	860	130	150	280
Cólon/Reto	13.310	14.800	28.110	1.310	1.730	3.040	250	280	530	110	140	250
Estômago	13.820	7.680	21.500	2.620	1.660	4.280	730	440	1.170	190	110	300
Colo do útero	-	18.430	18.430	-	5.050	5.050	-	860	860	-	260	260
Cavidade oral	10.330	3.790	14.120	1.740	1.070	2.810	270	230	500	90	50	140
Esôfago	7.890	2.740	10.630	1.040	490	1.530	230	120	350	20	80	100
Leucemias	5.240	4.340	9.580	1.130	940	2.070	210	170	380	70	70	140
Pele-Melanoma	2.960	2.970	5.930	270	270	540	50	60	110	20	30	50
Outras localizações	59.130	78.770	137.900	3.870	10.910	14.780	470	2.260	2.730	830	1.540	2.370
Subtotal	182.830	192.590	375.420	25.930	31.960	57.890	4.940	6.450	11.390	2.000	3.120	5.120
Pele-não melanoma	53.410	60.440	113.850	14.600	16.860	31.460	3.340	3.420	6.760	710	490	1.200
Total	236.240	253.030	489.270	40.530	48.820	89.350	8.280	9.870	18.150	2.710	3.610	6.320

Fonte: Ministério da Saúde/Instituto Nacional do Câncer – INCA (2009).

Em estudo realizado por Lourenço e Hamada (2001), e de acordo com estimativas do INCA (2009), o câncer de estômago é uma das causas mais frequentes de morte por câncer no Brasil e ao comparar as taxas de mortalidade do Brasil, representado pelo estado de São Paulo, com a de outros países, como Argentina, EUA, Japão, Itália e Inglaterra, pode-se observar que São Paulo apresenta mortalidade por câncer de estômago menor que o Japão, contudo maior que os outros países analisados, e, portanto se constitui em uma área de risco de alta a intermediária para essa neoplasia.

1.1.2- ANATOMIA E PATOLOGIA

1.1.2.1- Anatomia do estômago

a) Macroscópica

O estômago é a primeira divisão da porção abdominal do trato alimentar, começando com a junção gastroesofágica e se estendendo até o piloro (Figura 2). A porção proximal do estômago é chamada de cárdia. As porções seguintes são fundo, corpo e antro, esta sendo considerada a porção distal. O piloro é um anel muscular que controla o fluxo do conteúdo alimentar do estômago para a primeira porção do duodeno. As curvaturas medianas e laterais do estômago são também denominadas de curvatura menor e maior, respectivamente (AJCC, 2002).

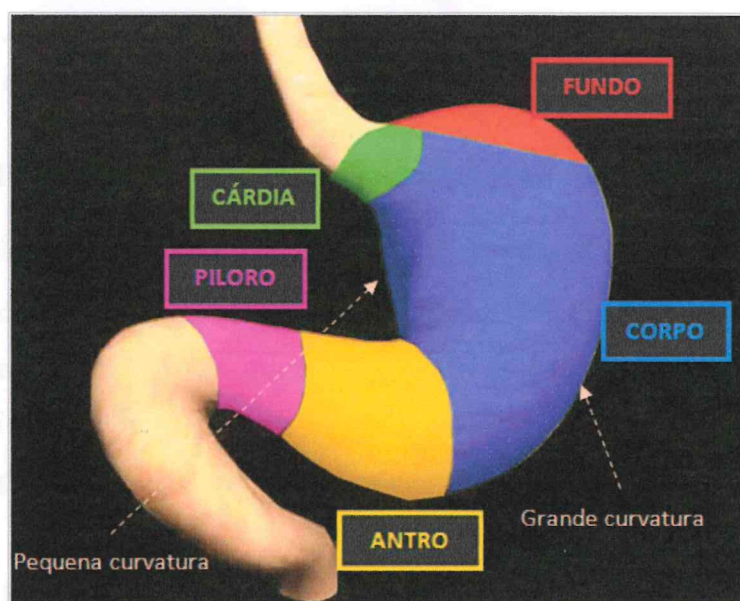


Figura 2 – Representação esquemática simplificada das principais regiões anatômicas do estômago. Fonte: <http://www.cancerquest.org/images/CancerByType/pics/stomachAnatomy.jpg>.

b) Microscópica

A parede do estômago, assim como o resto do trato gastrointestinal, possui quatro camadas. Da camada mais externa para a mais interna, a primeira corresponde à mucosa, composta do epitélio e lâmina própria, com a *muscularis mucosa* na base. Essa camada tem dois compartimentos, foveolar (superficial) e glandular profundo. As camadas seguintes da parede do estômago são submucosa, muscular própria e serosa (Figura 3) (LEWIN; APPELMAN, 1996).

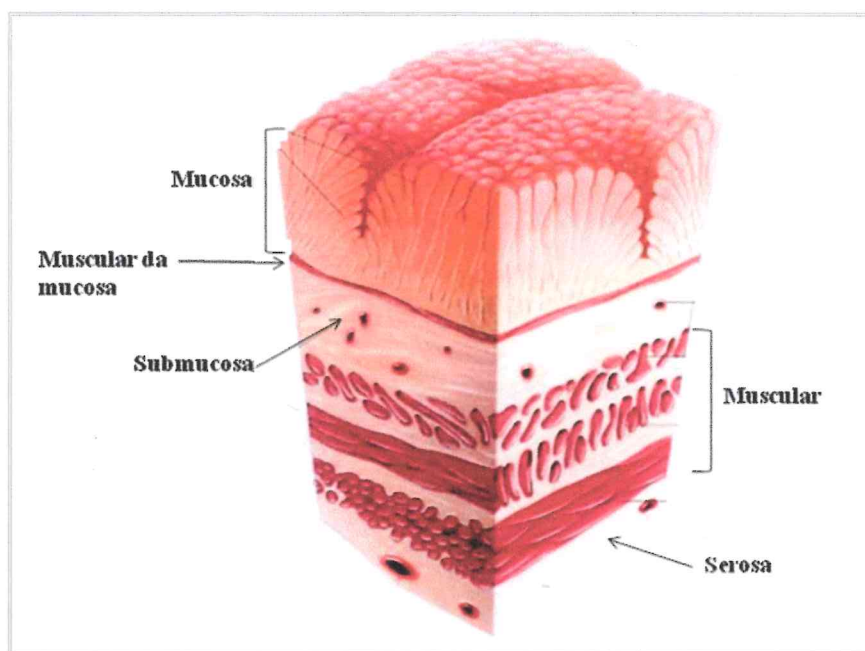


Figura 03 – Camadas da parede do estômago. Fonte: www.portalsaofrancisco.com.br/.../gastrite.php.

1.1.2.2- Classificação histopatológica dos tumores gástricos

a) Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)

De acordo com análise microscópica, e segundo Hamilton e Aaltonen (2000), os tumores gástricos podem ser de origem não-epitelial ou epitelial (Tabela 2). Os tumores epiteliais são divididos em adenomas (benignos), carcinóides e carcinomas, estes últimos, representados principalmente pelos adenocarcinomas, são a forma mais freqüente, correspondendo a mais de 95% dos cânceres gástricos. A classificação desses tumores está representada na tabela 2.

Tabela 2 – Classificação histopatológica dos tumores gástricos, segundo OMS.

TUMORES EPITELIAIS	ICD-O*	TUMORES NÃO-EPITELIAIS	ICD-O*
Adenoma – neoplasia intraepitelial	8140/0	Leiomioma	8890/0
Carcinoma		Schwannoma	9560/0
Adenocarcinoma	8140/3	Tumor de células granulares	9580/0
<i>Tipo intestinal</i>	8144/3	Tumor glômico	8711/0
<i>Tipo difuso</i>	8145/3	Leiomiossarcoma	8890/3
Adenocarcinoma papilífero	8260/3	Tumor estromal do TGI	8936/1
Adenocarcinoma tubular	8211/3	Benigno	8936/0
Adenocarcinoma mucinoso	8480/3	Potencial de malignidade incerto	8936/1
Carcinoma de células de anel de sinete	8490/3	Maligno	8936/3
Carcinoma adenoescamoso	8560/3	Sarcoma de Kaposi	9140/3
Carcinoma de células pequenas	8070/3	Outros	
Carcinoma indiferenciado	8041/3	Linfomas malignos	
Outros		Linfoma de células B de zona marginal do tipo MALT	9699/3
Carcinóide	8240/3	Linfoma de células do manto	9673/3
		Linfoma difuso de grandes células B	9680/3
		Outros	

* ICD-O – Código morfológico da Classificação Internacional de Doenças para Oncologia. 0 – tumores com comportamento benigno; 3 – tumores malignos; 1 – comportamento inespecífico, *borderline* ou incerto.

b) Classificação de Lauren

A classificação de Lauren é aplicada aos tumores gástricos do tipo carcinoma e é uma das mais utilizadas atualmente. Segundo Lauren (1965), esses tumores são classificados em dois tipos principais: intestinal e difuso. Os tumores que contêm aproximadamente quantidades equivalentes de componentes intestinal e difuso são chamados de carcinomas mistos.

Os tumores do subtipo intestinal (Figura 4a) são mais diferenciados, com uma tendência a formar estruturas tubulares do tipo glandular, semelhantes às presentes no adenocarcinoma primário do intestino. Esses tumores apresentam estruturas ductais bem definidas, cercadas por uma reação estromal desmoplástica contendo quantidades diferentes de infiltrados inflamatórios mistos. As células tumorais são grandes e os núcleos são polimórficos, anisocromáticos, têm um padrão de cromatina grosseira, e as figuras mitóticas são facilmente detectadas. Por outro lado, os tumores subtipo difuso (Figura 4b) exibem uma coesão celular baixa e são caracterizados pela presença de grupos pequenos e solitários de células tumorais sem formação de estruturas glandulares. Algumas vezes vacúolos

citoplasmáticos ricos em muco podem ser observados. Essas células contendo muco empurram o núcleo para periferia da célula e são denominadas de células em anel de sinete, como representado na figura 4b (LAUREN, 1965; CARL-MCGRATH et al., 2007).

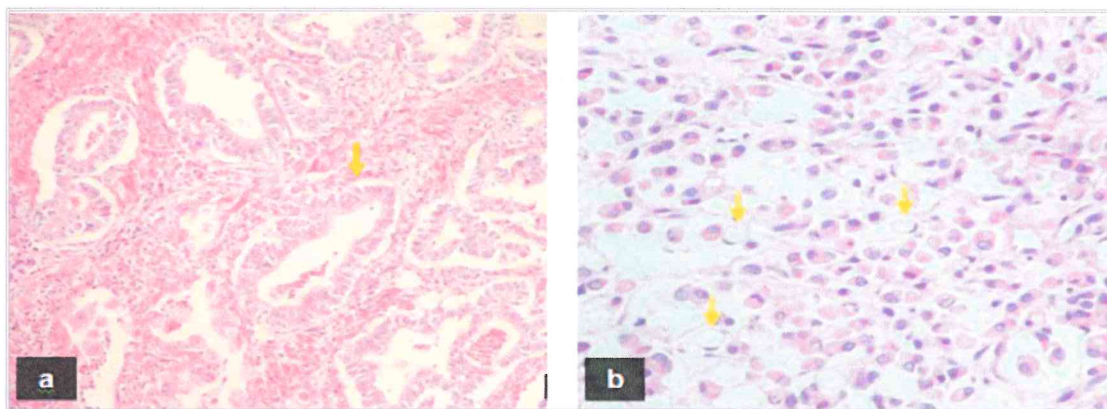


Figura 4 – Características histopatológicas dos adenocarcinomas gástricos subtipo intestinal (a) e subtipo difuso (b). As setas em amarelo representam (a) células tumorais formando estruturas glandulares e (b) células tumorais em anel de sinete.

1.1.2.3- Estadiamento

a) Clínico

Esse estadiamento é baseado nas evidências de extensão da doença adquiridas através de história clínica, exame físico e exames complementares antes que o tratamento definitivo seja instituído (AJCC, 2002). São avaliados tumor primário (T), linfonodos regionais (N) e metástases à distância (M).

b) Patológico

Estadiamento patológico depende tanto de dados clínicos como de achados patológicos obtidos do exame de espécime tumoral. Nesse estadiamento é avaliado o tumor primário (T), o comprometimento de linfonodos regionais (N) e a presença de metástase à distância (Tabela 3) (AJCC, 2002).

Após a avaliação desses parâmetros, esses são agrupados e definem um único estadiamento, que incluem IA, IB, II, IIIA, IIIB e IV, como representado na tabela 4. Essa classificação tem implicações terapêuticas e prognósticas.

Tabela 3 – Estadiamento do adenocarcinoma gástrico.

TNM	
T – Tumor primário	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ: Tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria
T1	Tumor invade a lâmina própria e submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria ou subserosa
T3	Tumor penetra a serosa (peritônio visceral) sem invasão de estruturas adjacentes
T4	Tumor invade estruturas adjacentes
N – Linfonodos regionais	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase para linfonodos regionais
N1	Metástase em 1-6 linfonodos regionais
N2	Metástase em 7-15 linfonodos regionais
N3	Metástase em acima de 15 linfonodos regionais
M – Metástase à distância	
MX	Metástase a distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância

Fonte: Adaptado do American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2002).

Tabela 4 – Agrupamento do TNM para definição do estadiamento.

Estádio	Estadiamento patológico		
	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2a/b	N0	M0
II	T1	N2	M0
	T2a/b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T2a/b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
IIIB	T3	N2	M0
IV	T4	N1-3	M0
	T1-3	N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Adaptado do American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2002).

1.1.3- DIAGNÓSTICO

1.1.3.1- Sinais e sintomas

A principal razão para o diagnóstico tardio de câncer gástrico é o fato de os pacientes apresentarem sinais e sintomas inespecíficos e vagos. Até o momento, nenhum sinal típico sugestivo de câncer gástrico precoce foi documentado. Em doença avançada, dor na região epigástrica, massa palpável no andar superior do abdome, anemia, perda de peso, sinais de obstrução (síndrome pilórica), sangramento, perfuração, ascite e sinais de acometimento secundário de outros órgãos podem surgir (CATALANO et al., 2009). Baseado na dificuldade de diagnóstico clínico, as técnicas endoscópicas e radiológicas se constituem atualmente nos principais indicadores para definição do diagnóstico dessa doença.

1.1.3.2- Técnicas radiológicas

A seriografia esofagogastroduodenal, utilizando técnicas de duplo contraste (bário e ar), é a mais utilizada entre as técnicas radiológicas para o diagnóstico de câncer gástrico e é utilizada atualmente de modo complementar aos estudos endoscópicos. Destaca-se na capacidade de avaliar o subtipo infiltrativo difuso em que a endoscopia tem sensibilidade reduzida. Contudo, devido à dificuldade em diferenciar um tumor benigno de uma úlcera maligna ou mesmo de um linfoma, essa técnica de forma isolada é insuficiente para o diagnóstico de câncer gástrico, pois, ao contrário da endoscopia, não possibilita a obtenção de amostra tecidual para análise histopatológica. A tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a ultrassonografia podem evidenciar sinais inespecíficos de acometimento neoplásico do estômago, frequentemente o espessamento parietal. No entanto, possuem destacado papel no estadiamento da doença, tanto na detecção de extensão locorregional como na pesquisa de metástases à distância (LOW et al., 1994; CATALANO et al., 2009).

1.1.3.3- Endoscopia

A endoscopia gastrointestinal alta é o procedimento de escolha para o diagnóstico de câncer gástrico sintomático (HALVORSEN et al., 1996). Embora mais invasiva e cara que a seriografia esofagogastroduodenal, a endoscopia é mais sensível e pode evitar procedimentos múltiplos, com custos adicionais. Adicionalmente, a endoscopia além de permitir a avaliação macroscópica da mucosa gástrica, possibilita a posterior confirmação histopatológica do tipo de lesão (DOOLEY et al., 1984; CATALANO et al., 2009).

1.1.3.4- Marcadores biológicos

Atualmente, existe uma busca constante por marcadores tanto tumorais como sorológicos que permitam a detecção e diagnóstico precoce de câncer gástrico. Os avanços nas pesquisas em patologia molecular têm esclarecido anormalidades genéticas e epigenéticas relacionadas ao desenvolvimento e progressão de câncer gástrico (BECKER et al., 2000; YASUI et al., 2001). Antígenos no tumor, no soro (CEA, CA19.9, CA72.4, CA50) ou no suco gástrico (CEA, CA19.9, sulfoglicoproteína) têm sido úteis no monitoramento e diagnóstico complementar dessa neoplasia (PECTASIDES et al., 1997; CATALANO et al., 2009).

1.1.4- HISTOGÊNESE DO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Adenocarcinomas gástricos não surgem *de novo* do epitélio normal, mas ocorrem através de mudanças sucessivas, que são bem caracterizadas para o carcinoma gástrico tipo intestinal, contudo as lesões que predisõem ao desenvolvimento do tipo difuso ainda são pouco entendidas (CORREA et al., 1975; CORREA, 1992).

Correa et al. (1975) descreveram um modelo, que foi denominado “CASCATA DE CORREA”, sobre o processo de carcinogênese gástrica. Segundo esse modelo, a carcinogênese gástrica é um processo de etapas múltiplas e multifatorial, que envolvem tanto fatores ambientais como relacionados ao hospedeiro. O resultado dessa cascata de eventos é um espectro progressivo de etapas histopatológicas, variando de um epitélio gástrico normal a um adenocarcinoma tipo intestinal, como representado na figura 5.

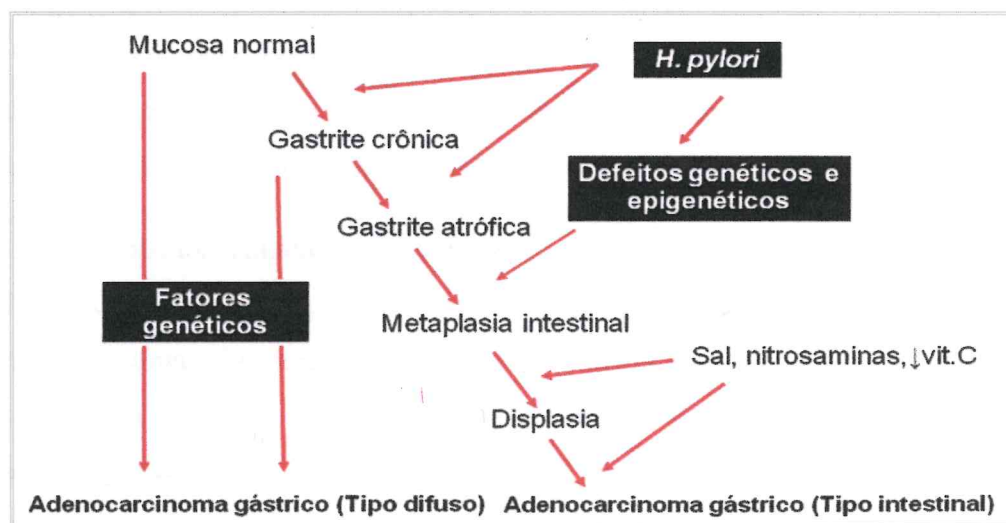


Figura 5 – Representação esquemática da “CASCATA DE CORREA”. Fonte: Adaptado de Correa, 1992.

Atualmente, diversos autores têm demonstrado que os adenocarcinomas gástricos subtipos intestinal e difuso são tumores distintos diferindo não apenas em características histopatológicas e clínicas, mas em suas vias tumorigênicas, com alterações genéticas e epigenéticas distintas (TAHARA, 2004; VAUHKONEN et al., 2006; PANANI, 2008).

1.1.5- ETIOLOGIA

O câncer gástrico é uma doença de etiologia multifatorial, cujos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais interagem e contribuem para a origem e progressão desse tumor (CORREA; SCHNEIDER, 2005).

1.1.5.1- Fatores genéticos

Alguns fatores de risco de natureza genética têm sido identificados e associados ao desenvolvimento de câncer gástrico. Entre eles, os principais são: tipo sanguíneo A, anemia perniciosa, história familiar, câncer gástrico difuso hereditário, câncer de cólon não polipóide hereditário e a síndrome de Li-Fraumeni (PARSONNET et al., 1991; RODER, 2002).

1.1.5.2- Fatores epigenéticos

O termo epigenética foi primeiro usado por Conrad Waddington em 1939 para descrever as interações causais entre genes e seus produtos, que modificam o fenótipo (WADDINGTON, 1939). Subseqüentemente, Arthur Riggs e colaboradores definiram epigenética como o estudo de mudanças herdáveis mitoticamente e/ou meioticamente em função do gene que não podem ser explicadas por mudanças na sequência do DNA (RUSSO et al., 1996). Atualmente, epigenética é definida como o estudo de mudanças herdáveis na expressão de um gene que ocorrem independentemente de mudanças na sequência primária do DNA (SHARMA; KELLY; JONES, 2009).

Os mecanismos epigenéticos podem ser divididos em quatro categorias principais (SHARMA; KELLY; JONES, 2009), que são: 1)- metilação do DNA; 2)- modificações covalentes de histonas; 3)- mecanismos não-covalentes, como a incorporação de variantes de histonas e remodelagem de cromatina; e 4)- RNAs não-codificantes, como os microRNAs. Entre essas modificações, a metilação do DNA é amplamente estudada e merece destaque devido ao seu papel importante no processo carcinogênico de vários tumores.

1.1.5.2.1- Metilação do DNA

a) Processo de metilação do DNA

A metilação do DNA consiste em uma modificação química na estrutura do DNA catalisada por uma família de enzimas denominadas de DNA metiltransferases (DNMTs). Nesta reação, um grupo metil ($-\text{CH}_3$) é covalentemente adicionado ao carbono 5 da citosina em dinucleotídeos CpG (citosinas próximas a guaninas), em regiões do DNA de 0,5 a 2 kb de comprimento, ricas em conteúdo CpG, conhecidas como ilhas CpG. Estas regiões são presentes principalmente em regiões promotoras de aproximadamente 40-50% de genes (LAIRD, 2003). O grupo metil utilizado nessa reação é transferido da S-adenosilmetionina (SAM) pela família de enzima DNA Metil-Transferase (DNMT) convertendo-a em S-adenosilhomocisteína (SAH) ao final da reação (WAJED et al., 2001) (Figura 6).

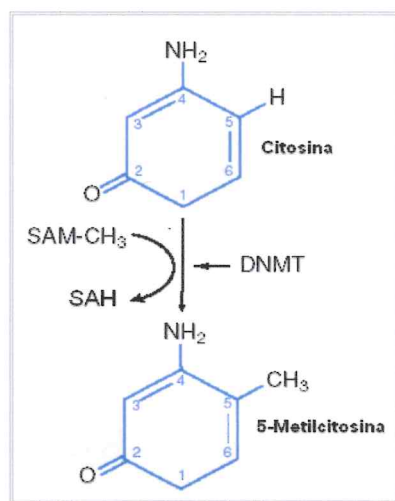


Figura 6- Representação esquemática da conversão da citosina em 5-metilcitosina catalisada pela DNA Metil-Transferase (DNMT). SAM – S-adenosilmetionina; SAH – S-adenosilhomocisteína; DNMT – DNA metiltransferase. Fonte – Adaptado de Strathdee; Brown, 2002.

Três membros da família das DNMTs foram descritos em células de mamíferos. O primeiro a ser identificado foi DNMT1, o qual exibe uma atividade maior no DNA hemimetilado do que no DNA não metilado, o que explica a sua função primária de manter o padrão de metilação do DNA depois da síntese do DNA *novo* durante a divisão celular. Diferentemente do DNMT1, os dois outros membros pertencentes a essa família, DNMT3a e DNMT3b, não têm preferência pelo DNA hemimetilado e tem função principalmente de metiltransferases de *novo* (OKANO et al., 1999; STRATHDEE; BROWN, 2002).

b) Mecanismos de repressão transcricional por metilação do DNA

A metilação do DNA em região promotora em ilhas CpG pode bloquear a transcrição de genes por interferir diretamente com a ligação de fatores de transcrição aos seus sítios alvos de ligação. Outro mecanismo proposto e atualmente mais aceito é que a metilação do DNA leva à ligação de uma família de proteínas denominadas de proteínas com domínio de ligação ao metil (MBD- *Methyl-Binding Domain*), permitindo a ligação especificamente ao DNA contendo sítios CpG metilados, como mostrado na figura 7. Essa família contém cinco membros dos quais três são conhecidos, MeCP2, MBD2 e MBD3, que possuem a capacidade de associar-se com complexos de proteínas grandes, tais como o complexo NuRD e Sin3a, (STRATHDEE; BROWN, 2002), contendo desacetilases de histonas (HDAC1 e HDAC2) e remodeladores de cromatina (Sin3a e mi-2), que resultam na produção de uma cromatina mais compacta, refratária à transcrição (TYLER; KADONAGA, 1999).

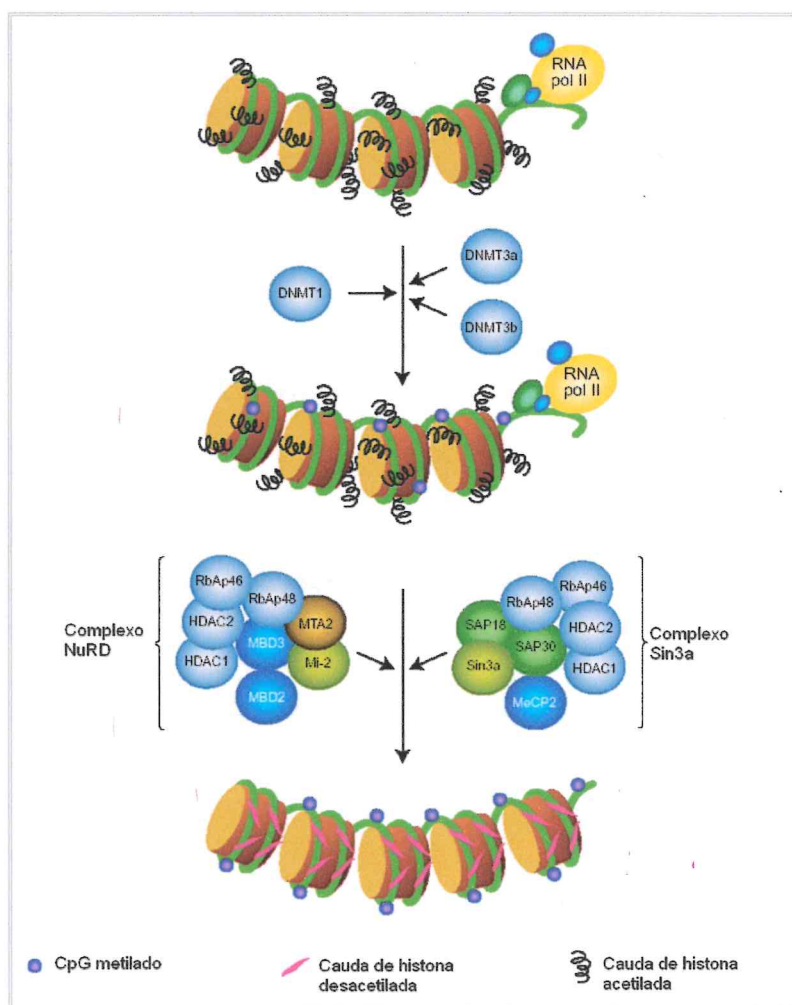


Figura 7 – Mecanismo de repressão transcricional mediado por metilação do DNA. Fonte: Adaptado de Strathdee; Brown, 2002.

c) Papel da metilação do DNA

Em células normais, a metilação do DNA tem um papel essencial no controle de processos celulares incluindo transcrição de genes, inativação do cromossomo X e *imprinting* genômico (ROBERTSON, 2005). Contudo, desregulação desse processo tem sido descrita na tumorigênese de várias neoplasias sendo apontadas duas mudanças no padrão de metilação do DNA em células tumorais: a diminuição global na metilação do DNA (hipometilação) e metilação aumentada em ilhas CpG de regiões promotoras de genes (hipermetilação) (WAJED et al., 2001), como mostrado na figura 8.

Apesar da hipometilação global em tumores humanos ter sido descrita anteriormente que a hipermetilação de ilhas CpG, o papel desse processo na carcinogênese ainda é pouco conhecido. Contudo, alguns mecanismos potenciais para desenvolvimento de tumores devido à hipometilação vêm sendo estudados, tais como a alterações na estabilidade cromossômica e ativação de transposons e oncogenes (STRATHDEE; BROWN, 2002).

A hipermetilação de ilhas CpG em regiões promotoras de genes de células de tumores humanos foi primeiro descrita em 1986 (BAYLIN et al., 1986) e desde então a inativação de muitos genes supressores de tumor, bem como a inativação de genes de reparo do DNA, resultando no aumento de dano genético e proliferação celular vêm sendo identificadas. Adicionalmente, o estômago é um dos órgãos que freqüentemente sofrem metilação do DNA de ilhas CpG no epitélio gástrico, provavelmente devido à fácil acessibilidade do tecido aos agentes exógenos (KIM et al., 2004).

A figura 8 sumariza o envolvimento de dois processos opostos de metilação do DNA, hipometilação e hipermetilação, que resultam na evolução de um tecido normal para um neoplásico.

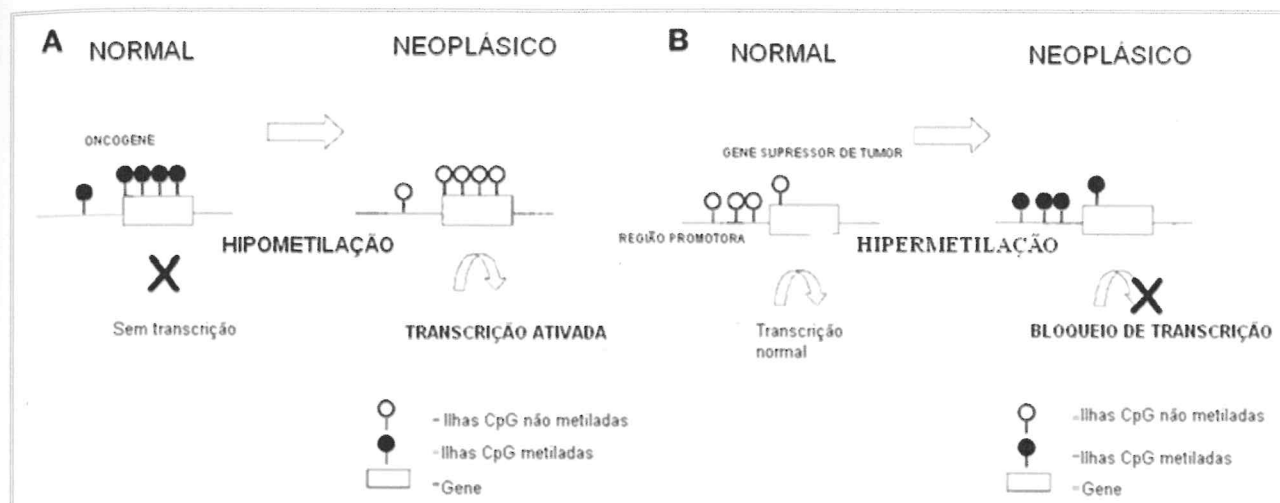


Figura 8 – A: Hipometilação global do genoma levando à ativação de oncogenes silenciados. B: Hipermetilação de ilhas CpG em regiões promotoras de genes supressores de tumor bloqueia a transcrição desses genes. Fonte: Adaptado de Wajed et al., 2001.

1.1.5.2.2 - Genes inativados pela hipermetilação em regiões promotoras em adenocarcinomas gástricos.

Muitos genes têm sido estudados quanto à presença de metilação em regiões promotoras em adenocarcinomas gástricos tais como *COX-2*, *CDH1*, *CDKN2A*, *RUNX3*, *DAPK*, *MGMT* e *HMLH1* (KIM et al., 2004; USHIJIMA et al., 2006; ZOU et al., 2009). A seguir serão abordados com maiores detalhes os genes *CDKN2A*, *HMLH1* e *COX-2*.

a) *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

O gene supressor tumoral *CDKN2A*, cujo produto é denominado $p16^{INK4A}$, é localizado no braço curto do cromossomo 9 humano e é o protótipo de uma família de inibidores de quinases dependentes de ciclina 4 do ciclo celular (*INK4 – inhibitors of Cdk4*). Ele se encontra no locus *INK4a/ARF/INK4b*, um fragmento pequeno de 35 kb do genoma humano, que contém mais dois genes, o *ARF*, também conhecido de $p19^{ARF}$ e $p14^{ARF}$, e o $p15^{INK4b}$, todos codificando proteínas supressoras tumorais (KIM; SHARPLESS et al., 2006). Na figura 9 é possível observar que o gene *CDKN2A* possui três exons, dos quais dois são compartilhados com *ARF*.

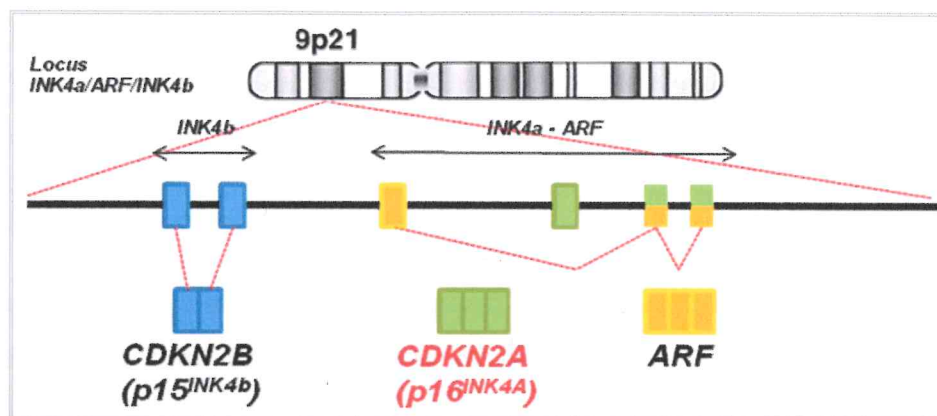


Figura 9 – Representação esquemática do locus *INK4a/ARF/INK4b*. Fonte: Adaptado de Kim; Sharpless et al., 2006.

A proteína $p16^{INK4A}$ atua na fase G1 (*Gap 1*) do ciclo celular, inibindo a progressão para a fase seguinte do ciclo, através da inibição seletiva da formação dos complexos ciclina D/quinase dependente de ciclina 4 ou 6 (CDK4 ou CDK6). Como consequência, a proteína retinoblastoma (pRb) não é fosforilada e retém os fatores de transcrição da família E2F, uma vez que a sua fosforilação promove a liberação desses fatores. As proteínas E2F ativam a transcrição de vários genes cujos produtos são essenciais para a progressão das células para a fase S (ALBERTS et al., 2004) (Figura 10).

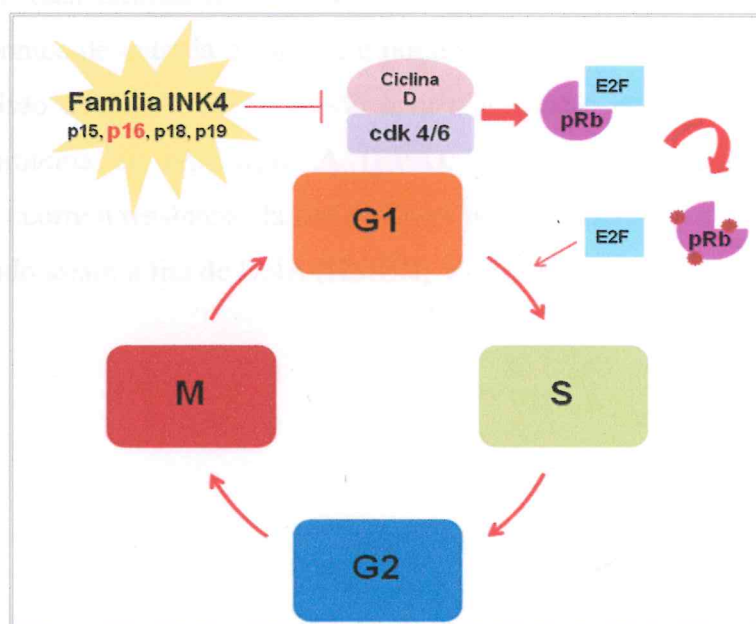


Figura 10 – Representação simplificada do ciclo celular, mostrando a atuação da $p16^{INK4A}$. M – Fase de mitose e citocinese; G1 – Fase de intervalo entre a fase M e a fase S; S – Fase de replicação do DNA; G2 – Fase de intervalo entre a fase S e a M do ciclo celular.

A inativação de $p16^{INK4A}$ tem sido documentada em vários tumores, tais como os colorretais, pulmonares e renais (GUZMAN et al., 2007; VIDAURRETA et al., 2008; GOTO

et al., 2009). Adicionalmente, em câncer gástrico, a hipermetilação de regiões promotoras do gene *CDKN2A* é considerada seu principal mecanismo de inativação (SHIM et al., 2000; ZHAO et al., 2003).

b) *HMLH1*(human *mutL* homolog 1)

O gene *HMLH1* é um homólogo humano do gene *mutL* da bactéria *Escherichia coli*, localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p21.3) e foi identificado como um *locus* freqüentemente mutado em câncer de cólon não-polipóide hereditário (HNPCC). Esse gene codifica uma proteína de mesmo nome que é uma das enzimas pertencentes ao sistema de reparo por erro de pareamento do DNA (*DNA mismatch repair* - MMR) (LI, 2008).

A figura 11 mostra de forma simplificada a atuação de HMLH1 no reparo pós-replicação do DNA. As proteínas MSH2 e MSH6, proteínas homólogas de MutS, reconhecem e se ligam ao erro de pareamento no DNA e recrutam outras proteínas, entre elas a HMLH1. As interações entre as proteínas e o DNA são moduladas pela energia fornecida pela quebra do ATP (representado em asteriscos vermelhos). Adicionalmente, o complexo formado também apresenta atividade de ATPase, que quebra o ATP, fornecendo energia para ativação do PCNA-RFC, estas últimas responsáveis pela quebra descontínua na fita de DNA. Esse processo gera pontos de entrada 5' na fita e possibilita a atuação da exonuclease EXO1, que promove a excisão do DNA. Esta excisão leva a formação de um intervalo de fita única coberto com proteína de replicação A (RPA), que se liga e protege a fita simples. Posteriormente, ocorre a ressíntese da fita de DNA pela polimerase δ e ligação catalisada pela ligase, restaurando assim a fita de DNA (HSIEH; YAMANE, 2008).

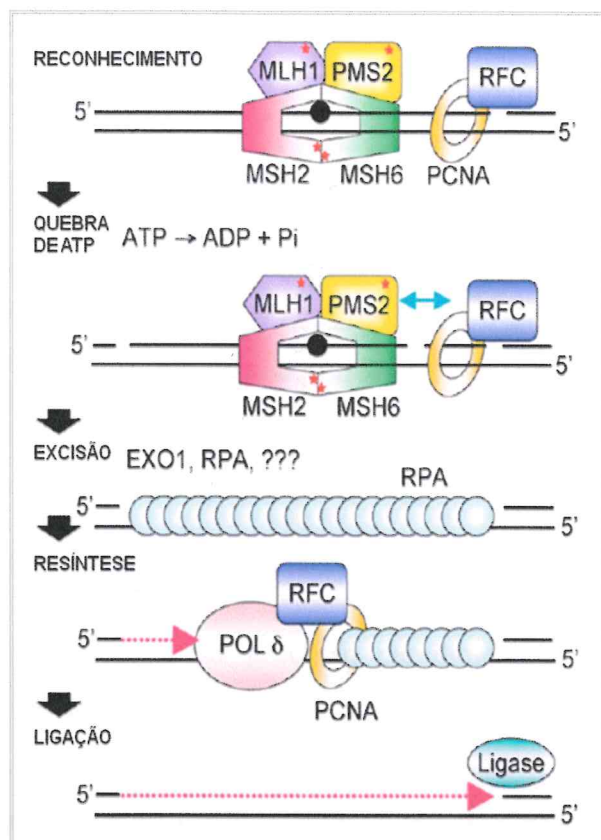


Figura 11 - Representação esquemática do processo de reparo por erro de pareamento. Fonte: Adaptado de Hsieh; Yamane, 2008.

Grady e Markowitz (2002) sugerem que, em câncer de cólon, o silenciamento epigenético de *HMLH1* via hipermetilação do seu promotor possui um forte efeito inibidor do sistema de reparo por erro de pareamento. Adicionalmente, evidências diretas que a hipermetilação do promotor de *HMLH1* diminui a expressão desse gene foi obtida por tratamento de células com 5-azacitidina, que reverteu a hipermetilação do promotor e restaurou a expressão do gene *HMLH1* e capacidade de MMR normal (VEIGL et al., 1998; HERMAN et al., 1998). Em câncer gástrico, a inativação de *HMLH1*, bem como dos genes *CDKN2A*, *CDH1* e *RUNX3* devido à hipermetilação de promotor é mais frequentemente observada do que sua inativação devido a mutações (USHIJIMA; SASAKO, 2004).

c) *COX-2* (cyclooxygenase 2)

O gene *COX-2*, oficialmente chamado de *PTGS-2* (prostaglandin-endoperoxide synthase 2), é localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q25.2-q25.3). Esse gene codifica uma enzima induzível de mesmo nome, regulada por eventos estimulatórios específicos e envolvida na síntese de prostaglandinas (PGs), as quais medeiam a sinalização celular (Figura

13). São derivadas principalmente do ácido araquidônico liberado da membrana celular por fosfolipases, como mostrado na figura 12 (KONTUREK et al., 2005).

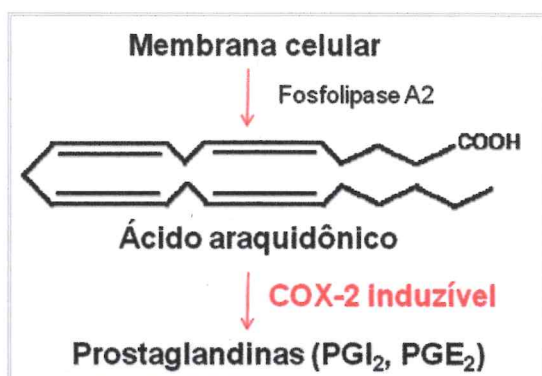


Figura 12 – Esquema da síntese das prostaglandinas catalisada pela enzima COX-2. Fonte: Adaptado de Konturek et al., 2005.

A COX-2 é relacionada ao processo carcinogênico gástrico, principalmente via prostaglandinas E2, atuando em mecanismos tumorigênicos tais como proliferação e migração celular, angiogênese, apoptose e invasibilidade (KONTUREK et al., 2005), como mostrado na figura 13. As prostaglandinas E2 (PGE2) se ligam aos seus receptores acoplados a proteína G e agem ativando vias de transdução de sinal, por promover a liberação de AMPc e Ca^{+2} (Figura 13). Estes por sua vez atuam: ativando a liberação de metaloproteinases de matriz (MMPs), que degradam a matriz extracelular e facilitam a invasão e migração celular; reduzindo a taxa de apoptose via inibição da via apoptótica mitocondrial, caracterizada por redução da liberação do citocromo c, diminuição da atividade das caspases 9 e 3 e um aumento da proteína anti-apoptótica Bcl-2; estimulando a angiogênese via o fator de transcrição HIF-1 α (Fator induzível por hipóxia 1 alfa), levando a ativação da transcrição do VEGF (Fator de crescimento do endotélio vascular); ativando a transcrição de genes envolvidos na proliferação e migração celular; e ativando a sinalização do EGFR, com conseqüente aumento da proliferação celular (KONTUREK et al., 2005; KONTUREK et al., 2006).

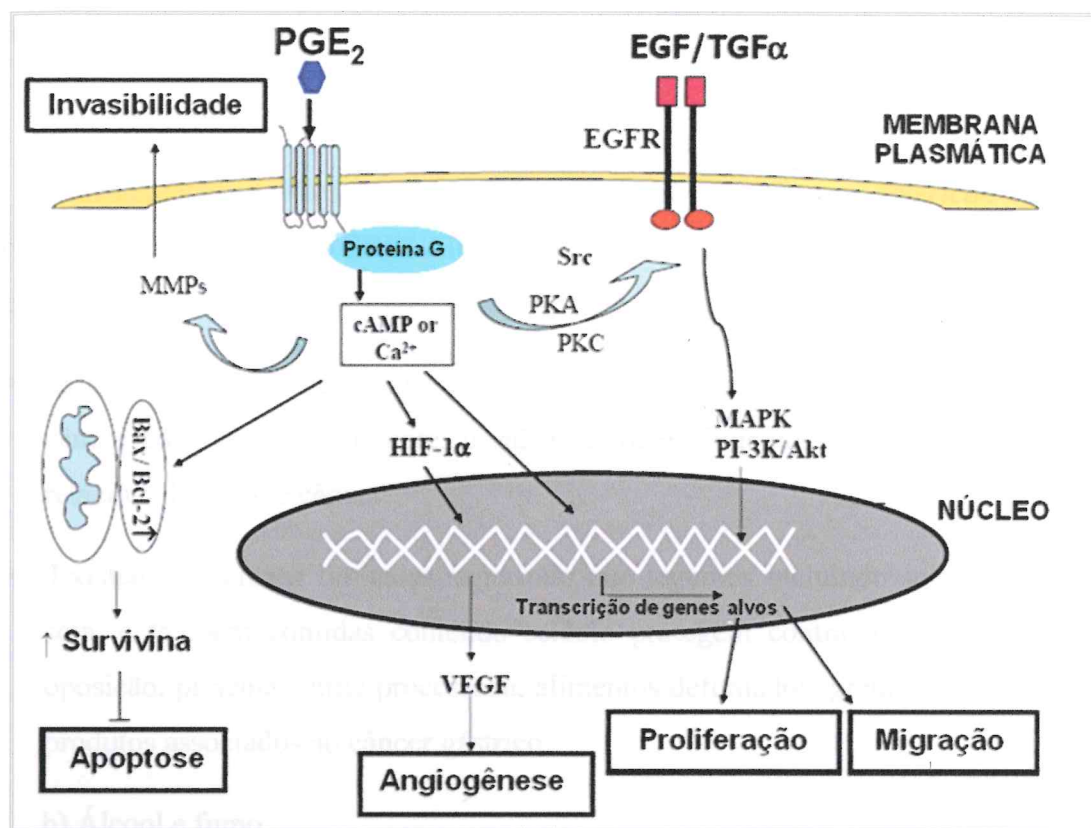


Figura 13 – Mecanismos pelos quais a enzima COX-2, via prostaglandinas, induzem o processo carcinogênico gástrico. Fonte: Adaptado de Konturek et al., 2005.

No câncer gástrico, a superexpressão de *COX-2* vem sendo relacionada à intensa resposta inflamatória e progressão tumoral (KONTUREK et al., 2005; YAMAC et al., 2008). Contudo, estudo conduzido por Huang et al. (2006) encontrou uma baixa expressão de *COX-2* em câncer gástrico associada a uma hipermetilação em promotor desse gene. Song et al. (2001) mostraram que linhagens de células de carcinoma gástrico sem expressão de *COX-2* apresentavam hipermetilação em regiões promotoras desse gene e que medicamentos inibidores de metilação restauravam a expressão de *COX-2*, sugerindo que a não expressão desse gene estava relacionada à metilação de seu promotor.

Apesar de alguns estudos apontarem a hipermetilação em regiões promotoras dos genes *CDKN2A*, *COX-2* e *HMLH1* como um importante mecanismo de silenciamento gênico em câncer gástrico e, portanto de perda de função desses genes na carcinogênese gástrica, ainda existem muitas lacunas a serem consideradas, tais como a importância desse processo em cada subtipo histológico, localização do tumor e adicionalmente são incertos os fatores que promovem esse processo.

1.1.5.3- Fatores ambientais

a) Dieta

Recentemente, o *World Cancer Research Fund* (WCRF) e a *American Institute for Cancer Research* (AICR) (WCRF; AICR, 2007) em revisão rebuscada da literatura de um painel de 722 publicações sobre dieta, atividade física e prevenção de câncer, concluiu que:

- Existem fortes evidências que vegetais sem amido, bem como frutas protegem contra câncer gástrico. Inversamente, o sal e também alimentos conservados com sal são relacionados a esse câncer;
- Existem evidências limitadas sugerindo que legumes incluindo soja ou produtos de soja, e também comidas contendo selênio protegem contra o câncer gástrico. Em oposição, pimenta, carne processada, alimentos defumados, grelhados e churrasco são produtos associados ao câncer gástrico.

b) Álcool e fumo

O consumo crônico de álcool e tabagismo intenso são fatores de risco importantes para o desenvolvimento de câncer gastrointestinal, entre eles o câncer gástrico. A carcinogênese associada ao álcool é principalmente relacionada ao acetaldeído, produto de degradação do álcool. Este composto liga-se ao DNA sendo, portanto mutagênico e carcinogênico. Adicionalmente, o álcool induz as enzimas citocromo P-450, levando a geração de espécies reativas do oxigênio, e ativação pró-carcinogênica aumentada (POSCHL; SEITZ, 2004).

O projeto da *European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition* (EPIC) encontrou uma relação direta entre presença de fumo e desenvolvimento de câncer gástrico. Em seu estudo, uma associação significativa entre o uso de cigarros e risco de câncer gástrico foi encontrado (GONZALEZ et al., 2003).

c) Agentes infecciosos

Infecções bacterianas e virais têm sido apontadas como importantes fatores ambientais na indução e progressão de câncer gástrico. Entre esses agentes infecciosos, o vírus Epstein-Barr (EBV) e a bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) merecem destaque, principalmente esta última, devido à sua associação com diversas doenças gástricas, principalmente o câncer

gástrico e seu merecido reconhecimento como agente carcinógeno do grupo I, pela IARC, em 1994 (IARC, 1994; NIEDOBITEK, 1999; CORREA, SCHNEIDER, 2005).

1.2- *Helicobacter pylori*

1.2.1- HISTÓRICO

Por volta de 1889, W. Jaworski (Figura 14a), professor de Medicina da Universidade Jagielloński da Cracóvia, Polônia, descreveu pela primeira vez organismos espiralados no sedimento de lavados gástricos obtidos de humanos (KONTUREK et al., 1996). Ele notificou entre outros bacilos, uma bactéria com uma aparência espiralada e denominou-a de *Vibrio rugula*, sugerindo pela primeira vez seu possível papel patogênico em doenças gástricas.

Na segunda metade do século XIX, Bizzozero (1892) reportou a presença de tais organismos no trato gastrointestinal de animais, mas esses achados foram considerados mera curiosidade microbiológica. Em 1900, Salomon mostrou que bactérias espiraladas infectando cães e gatos poderiam ser transmitidas aos ratos (KONTUREK, 2003).

Em 1906, Kreinitz, e posteriormente em 1940, outros estudos confirmaram a descoberta de Jaworski. Estes estudos documentaram a presença de espiroquetas em torno de 40% de estômagos humanos em exame *postmortem* e em espécimes cirúrgicos frescos (KONTUREK, 2003).

O principal obstáculo no reconhecimento do papel dessa bactéria na patologia gástrica humana foi inicialmente a falha persistente em cultivar a bactéria a partir de amostras de estômago. Em 1975, Steer encontrou bactérias espiraladas intimamente aderidas às células do epitélio superficial gástrico, mas cultivou somente *Pseudomonas aeruginosa*.

Em 1982, iniciava-se uma nova era na gastroenterologia básica e clínica marcada pela cultura bem sucedida de bactérias espiraladas por Warren e Marshall (Figura 14b) em um laboratório de microbiologia do Hospital Royal Perth durante um fim de semana de um feriado prolongado de Páscoa. A primeira cultura foi realizada a partir de biópsias gástricas de um paciente com úlcera duodenal e as bactérias isoladas foram inicialmente chamadas de um *Campylobacter-Like Organism* (CLO) achando que ele fosse uma espécie do gênero *Campylobacter*, mas tornou-se um gênero diferente agora denominado de *Helicobacter*,

espécie *Helicobacter pylori* (MARSHALL, 1984). Atualmente, são vastos os estudos envolvendo esse microrganismo, porém ainda são pouco entendidos seus mecanismos carcinogênicos gástricos.

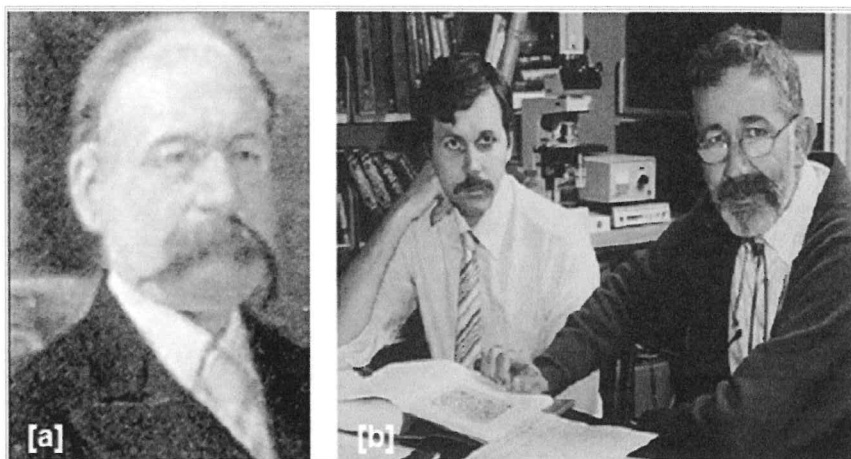


Figura 14 - W. Jaworski, 1886 [a] e Marshall e Warren [b]. Fonte: Adaptado de Konturek, 2003.

1.2.2- EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que a bactéria *H. pylori* está presente no estômago de, pelo menos, metade da população do mundo. A infecção freqüentemente permanece ao longo da vida e pode evoluir com manifestações clínicas e histológicas diversas, variando de indivíduos assintomáticos a indivíduos sintomáticos (MARSHALL, 2000).

A prevalência da infecção por *H. pylori* e o modo de transmissão variam entre grupos populacionais. Com relação à prevalência, entre adultos de meia idade, nos países em desenvolvimento, ela é em média de 80 a 90% e em países desenvolvidos é menor que 40%. Essa variação nas taxas de prevalência pode ser explicada pela grande variabilidade de métodos diagnósticos, espécimes clínicos utilizados e condições sócio-econômicas e educacionais da população (AHMED et al., 2006; AZEVEDO et al., 2009). A transmissão ocorre normalmente em pessoas com idade mais jovem e muitos estudos destacam a importância da transmissão intrafamiliar e da má condição socioeconômica na aquisição de *H. pylori*. Em países desenvolvidos a transmissão direta pessoa-pessoa parece predominar, enquanto em países em desenvolvimento a rota fecal-oral e a água contaminada têm maior impacto (GOODMAN; CORREA, 1995; KIVI; TINDBERG, 2006; MAGALHÃES QUEIROZ; LUZZA, 2006). O estômago é o principal habitat de *H. pylori*, com extensão para duodeno proximal ou esôfago distal (DUNN et al., 1997).

1.2.3- CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

1.2.3.1- Classificação taxonômica

A espécie *Helicobacter pylori* pertence à seguinte classificação taxonômica (KONEMAN et al., 2008):

- Domínio: Bacteria;
- Reino: Eubacteria;
- Filo: Proteobacteria;
- Classe: Epsilonproteobacteria;
- Ordem: *Campylobacterales*;
- Família: *Helicobacteraceae*;
- Gênero: *Helicobacter*.

1.2.3.2- Estrutura e nutrição

H. pylori é uma bactéria em forma de espiral, não esporulada, medindo de 2,5 a 5,0 μM de comprimento e 0,5 a 1,0 μM de largura. É lofotríquia, com quatro a seis flagelos unipolares embainhados, com bulbo terminal, como representado na figura 15 e 16 (DUNN et al., 1997).

Com relação à coloração de Gram, *H. pylori* é classificada como Gram negativa, e, portanto, apresenta como tal uma membrana externa e outra membrana citoplasmática, separadas por um espaço periplasmático de aproximadamente 30nm de espessura. Diferente de outras bactérias gram-negativas, a camada fina de peptidoglicano, com composição de muropeptídeo, é estruturalmente menos complexa (MOBLEY et al., 2001).

Adicionalmente, é observada uma membrana polar, localizada 20nm abaixo da membrana plasmática e próxima ao sítio de inserção do flagelo. Essa membrana contém um conjunto de moléculas de ATPase e provavelmente é localizada neste sítio para gerar energia para motilidade e síntese da parede celular. O citoplasma possui material nucleóide e ribossomos. Tanto no citoplasma como próximo ao pólo do flagelo, existem grânulos intracelulares, chamados de grânulos polifosfatos, que servem como fonte de energia, reserva

de fósforo e possivelmente prover energia requerida para motilidade das células. A figura 16 mostra uma representação esquemática simplificada dessa bactéria. Nessa figura, é interessante notar que aderidos à membrana e à parede celular estão os flagelos, que são compostos pelo corpo basal (Anel L, P, S e M e Bastão), gancho e filamento (MOBLEY et al., 2001).

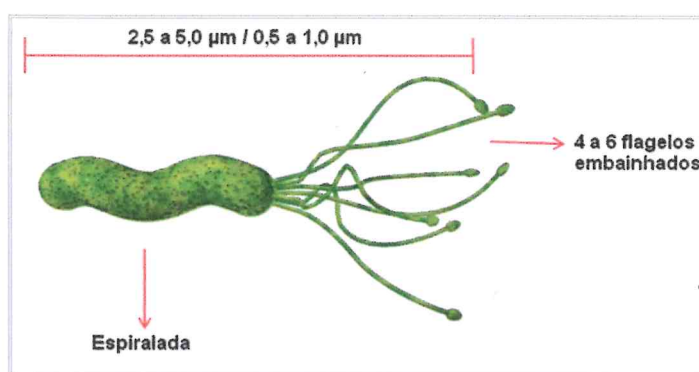


Figura 15 – Representação estrutural externa de *H. pylori*. Fonte: http://dooktor.pl/image_atta/art/Ax5oQR1Or26PS497b2yv6HrHt55002.jpg.

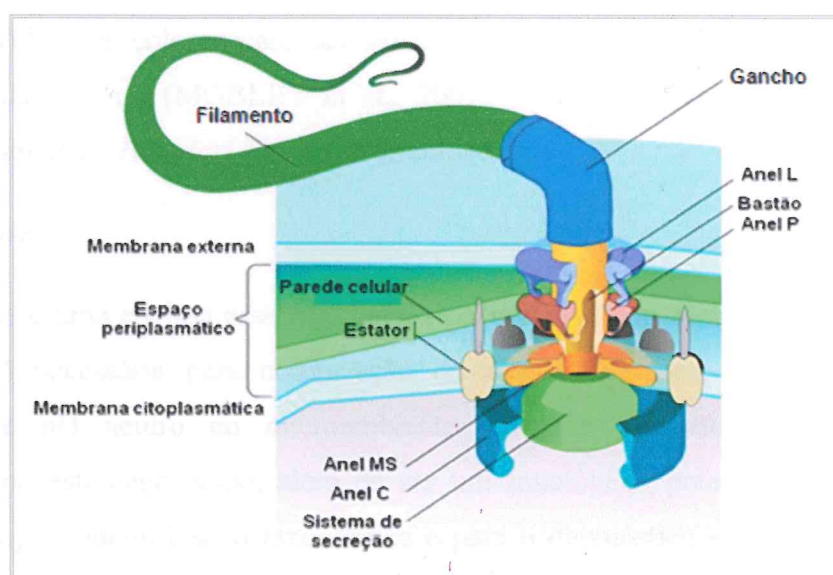


Figura 16 – Diagrama esquemático da camada externa da bactéria *H. pylori*. Fonte: Adaptado de gcat.davidson.edu.

Com base em suas necessidades nutricionais, *H. pylori* é uma bactéria fastidiosa, heterotrófica e microaerófila apresentando, portanto um crescimento ótimo sob baixa tensão de oxigênio (10% CO₂, 5% de O₂, 85% de N₂) e na presença de compostos orgânicos, além de fatores de crescimento (KONEMAN et al., 2008).

1.2.3.3- Genoma

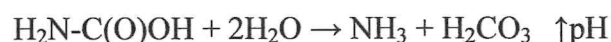
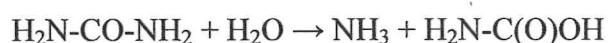
O genoma de *H. pylori* (cepa 26695) consiste de um cromossomo circular único com um tamanho de 1.667867 pares de base, apresentando 91% de região codificante e com um conteúdo médio de G+C de 39%. Cinco regiões no genoma apresentam uma diferença significativa na composição de G+C, sendo que duas dessas regiões são importantes por possuírem genes envolvidos no processamento do DNA (TOMB et al., 1997). Outra região de destaque no genoma é a ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI), um elemento insercional de aproximadamente 40 kb de DNA contendo em torno de 31 genes, e embora seja desconhecida sua origem é sugerido que ela foi adquirida de outras espécies bacterianas ou mesmo de outro gênero desde que o conteúdo G+C dessa região é diferente do restante do genoma de *H. pylori* (HACKER et al., 1997).

1.2.3.4- Fatores de virulência e patogênese da infecção por *H. pylori*

São diversos os fatores de virulência de *H. pylori* envolvidos na patogênese gástrica, contudo basicamente eles são divididos, de acordo com as funções que apresentam, em aqueles envolvidos na colonização, adesão do epitélio gástrico, no dano tecidual e na sobrevivência da bactéria (MOBLEY et al., 2001). A seguir serão descritos os principais fatores de virulência de *H. pylori* citados na literatura.

1.2.3.4.1- Urease

A urease é uma enzima essencial tanto para metabolismo como para virulência dessa bactéria. Ela é necessária para colonização da mucosa gástrica, já que ela permite a manutenção de pH neutro no microambiente ao redor da bactéria, necessário para sobrevivência no estômago ácido, além de ser um imunógeno potente. Adicionalmente, a urease é usada para identificação taxonômica e para o diagnóstico e seguimento depois do tratamento (EATON et al., 1991; MICHETTI et al., 1994; FERRERO et al., 1994). A enzima urease, também chamada de uréia amidohidrolase, é uma metaloenzima de alto peso molecular, em torno de 550 kDa, composta de três subunidades de 26,5 kDa (UreA), 61 kDa (UreB), e 13kDa (UreC) (LABIGNE et al., 1991). Ela catalisa a hidrólise da uréia em amônia e carbonato e este último espontaneamente se decompõe para formar outra molécula de amônia e ácido carbônico, como representado abaixo, que resulta em um aumento do pH:



1.2.3.4.2- Ilha de patogenicidade *cag* (*cag* pathogenicity island – *cag*-PAI)

A ilha *cag*-PAI está presente em 60-90% das cepas mundiais (COVACCI et al., 1999) e sua integridade é essencial para infecção bem sucedida de células epiteliais gástricas por *H. pylori* já que contêm genes envolvidos na patogênese gástrica. Estudos realizados por Blaser; Berg (2001) e Ali et al. (2005) mostraram que cepas de *H. pylori* portadoras de *cag*-PAI eram relacionadas à doenças gástricas tais como úlcera gástrica e carcinoma gástrico, sugerindo o papel dessas cepas na patogênese gástrica.

Os principais genes pertencentes a *cag*-PAI codificam proteínas envolvidas no dano tecidual gástrico e incluem genes de virulência (*vir*), distribuídos uniformemente por toda ilha (Figura 17), além dos genes *cagA* e *cagE* (também conhecido como *virB4*), localizados na porção direita da ilha e considerados como marcadores de integridade dessa ilha (BLASER et al., 1995; SOZZI et al., 2005).

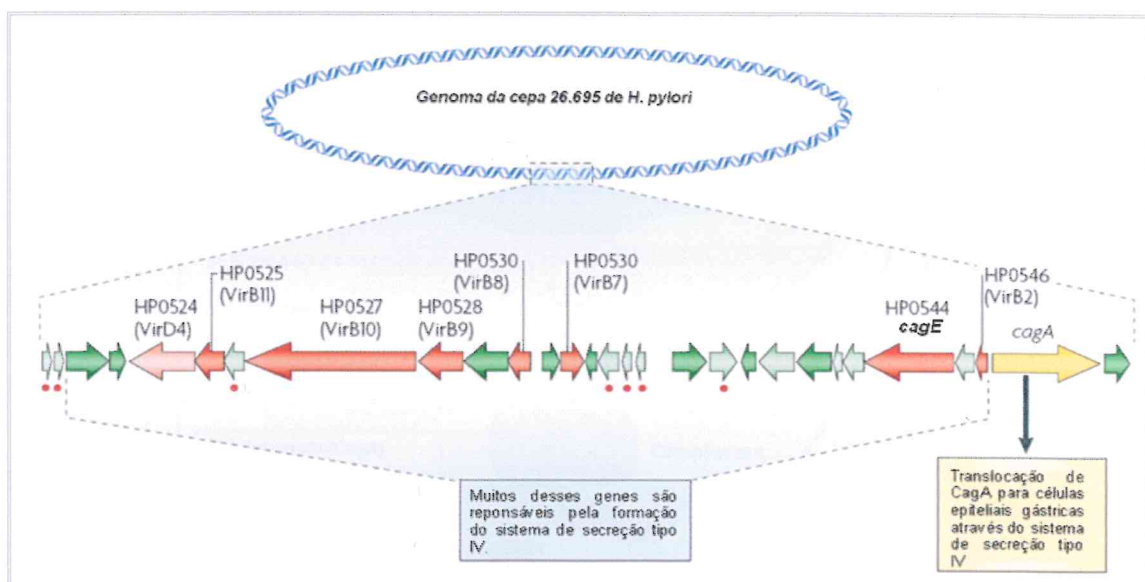


Figura 17 – Representação da ilha de patogenicidade *cag* do genoma da cepa 26.695 de *H. pylori*. Fonte: Adaptado de Suerbaum; Josenhans, 2007.

a) Genes do sistema de secreção tipo IV

A maioria de seus genes *vir*, da família *virB/D* codificam os componentes do sistema de secreção tipo IV, que consiste em uma seringa molecular, atuando na transferência de produtos bacterianos, incluindo CagA, dentro das células epiteliais gástricas (TOMB et al., 1997; WEN; MOSS, 2009). Entre esses genes, o *virB11* merece destaque devido ao seu papel importante na codificação de proteína de mesmo nome envolvida na biogênese do sistema de

secreção tipo IV e por essa proteína possuir atividade de ATPase (Figura 18), fornecendo energia para formação do *pilus* desse sistema de secreção (BACKERT; SELBACH, 2008). A figura 18 mostra as proteínas envolvidas na formação do sistema de secreção tipo IV de *H. pylori*. Por esta figura é possível observar que a proteína VirB11 forma um hexâmero (seta vermelha) aderido a membrana interna. A proteína CagL do *pilus* formado adere aos receptores de integrinas (α_5 e β_1) na membrana plasmática de células epiteliais gástricas e permite a injeção de fatores de virulência de *H. pylori*.

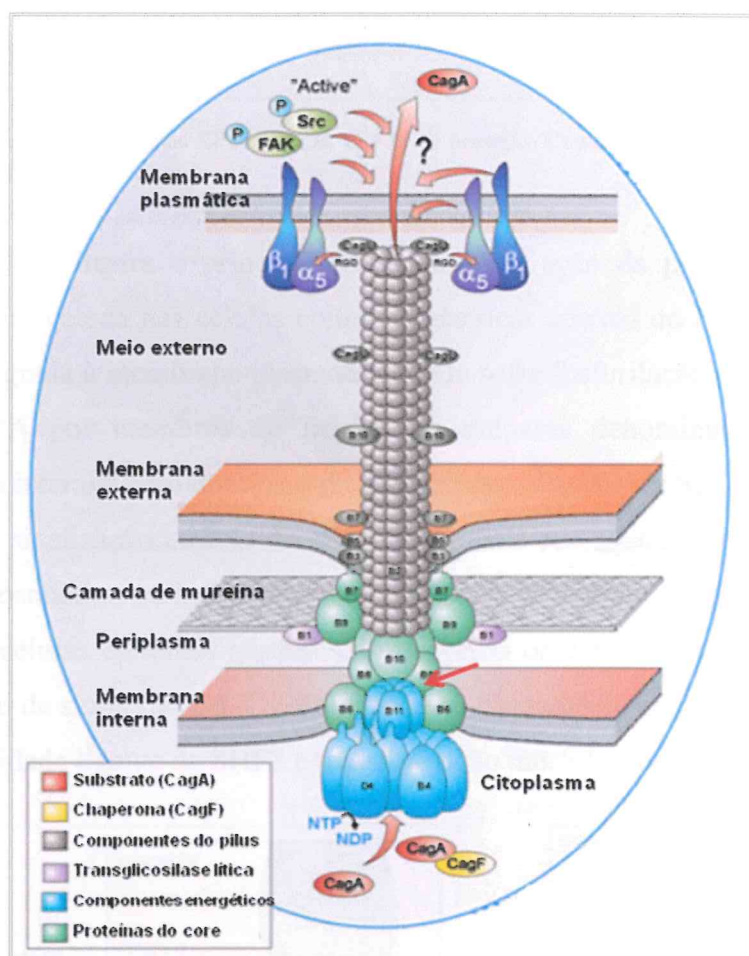


Figura 18 - Modelo da maquinaria do sistema de secreção tipo IV de *H. pylori*. Fonte – Adaptado de Backert; Selbach, 2008.

b) Gene *cagA* (Gene do antígeno A associado a citotoxina – *Cytotoxin-associated antigen A gene*)

Cepas portadoras do gene *cagA* têm sido associadas às lesões gástricas mais graves, incluindo câncer gástrico, sendo portanto um marcador de virulência *H. pylori* reconhecido na patogênese gástrica (HATAKEYAMA, 2004; WEN; MOSS, 2009). CagA é uma proteína de 120-145 KDa com uma região carboxiterminal variável, que apresenta motivos denominados

EPIYA. Existem quatro tipos de sequência EPIYA, -A, -B, -C e -D, que variam de acordo com a sequência de aminoácidos que apresentam e entre regiões geográficas, como representado na figura 19 (HATAKEYAMA, 2004).

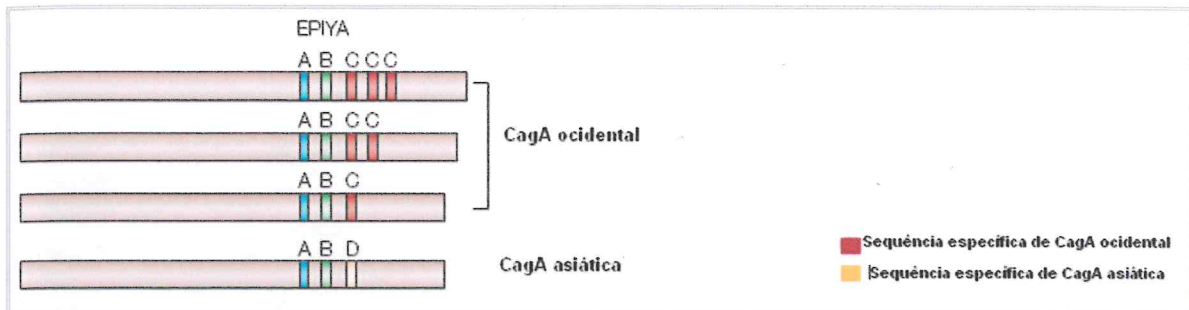


Figura 19 – Esquema das sequências EPIYA A, B, C e D da proteína CagA nas cepas ocidentais e asiáticas. Fonte: Adaptado de Hatakeyama, 2004.

A figura 20 ilustra o principal mecanismo de ação da proteína CagA. Quando a proteína CagA é injetada nas células epiteliais gástricas através do sistema de secreção tipo IV, ela fica integrada à membrana plasmática, onde sofre fosforilação em resíduos de tirosina de sítios EPIYA por membros da família de quinases denominadas de SRC. Ao ser fosforilada, esta interage com domínios da proteína homóloga 2 de SRC, a SH2, que uma vez ativada induz a sinalização através de quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), por mecanismos dependentes ou independentes de RAS. A desregulação sustentada dessa via leva a apoptose em células epiteliais gástricas. Entre cepas ocidentais de *H. pylori* produtoras de CagA, o número de sítios EPIYA-C correlaciona-se diretamente com os níveis de fosforilação de tirosina, atividade ligante de SHP2 e transformação morfológica (HIGASHI et al., 2002).

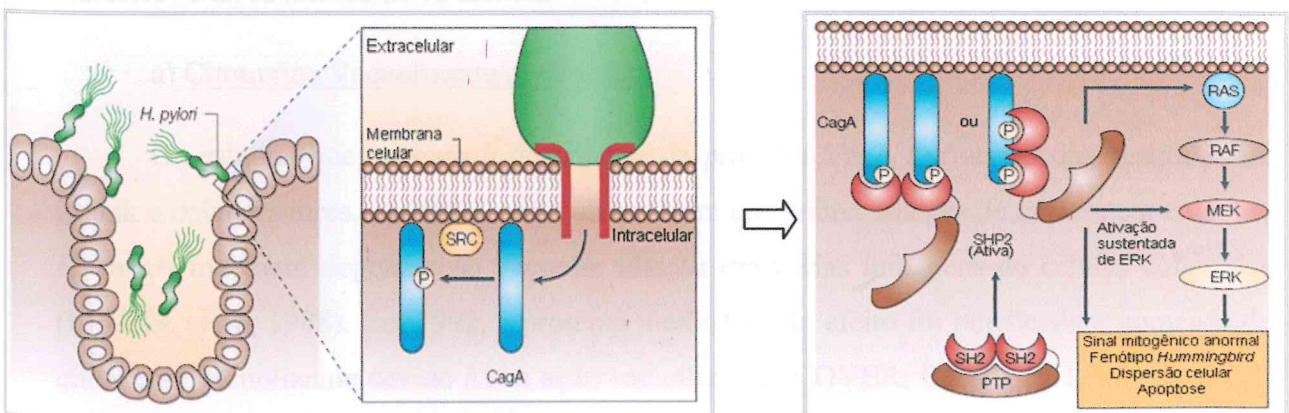


Figura 20 – Mecanismo de ação da proteína CagA. Fonte: Adaptado de Hatakeyama, 2004.

Adicionalmente, CagA também promove um fenômeno chamado de *hummingbird*, ou “beija-flor”, devido ao desarranjo do citoesqueleto, dispersão e alongamento das células infectadas (HIGASHI et al., 2004), como representado na figura 21.

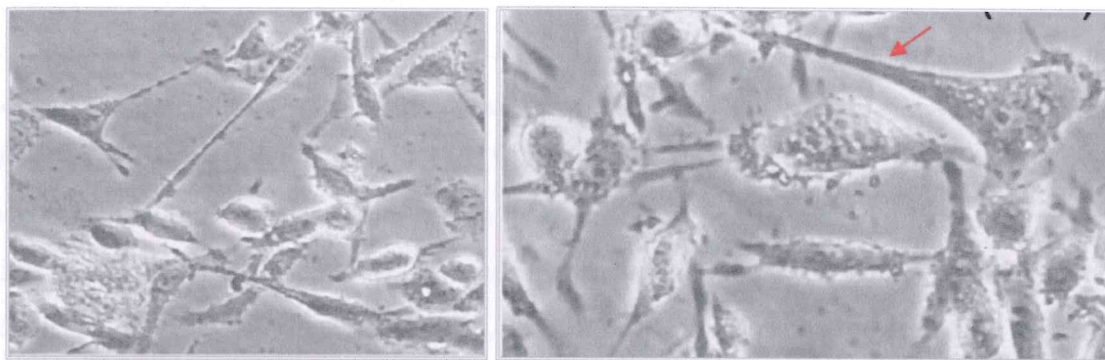


Figura 21 – Imagem de células epiteliais gástricas com desarranjo do citoesqueleto e alongamento das células infectadas com cepas *cagA* (+) (seta vermelha). Fonte: Kwok et al., 2007.

c) Gene *cagE* (Gene do antígeno E associado a citotoxina - *Cytotoxin-associated antigen E gene*)

A proteína CagE é outro fator de virulência de *H. pylori*, codificado pelo gene *cagE*, localizado na extremidade direita da *cag*-PAI, acima de *cagA*. Além de possuir uma função estrutural na formação do sistema de secreção tipo IV, ela atua também como uma citotoxina envolvida no aumento de expressão de interleucina 8 em células epiteliais gástricas (AUDIBERT et al., 2001). Mais recentemente, Sozzi et al. (2005) considerou-a como um melhor marcador de integridade de *cag*-PAI do que *cagA*.

1.2.3.4.3- Outros fatores de virulência

a) Citotoxina Vacuolizante A (VacA)

Os estudos que levaram à descoberta da proteína VacA derivaram das pesquisas de Leunk e colaboradores, em 1988, onde observaram que sobrenadantes de cultura em caldo de *H. pylori* induziam degeneração vacuolar intensa em várias linhagens de células cultivadas (LEUNK et al., 1988). Em 1992, a proteína mediadora do efeito foi purificada e nomeada de citotoxina vacuolizante devido à sua ação vacuolizante (COVER; BLASER, 1992). Contudo, foi apenas em 1994, com a determinação da sequência aminoterminal da proteína, que a clonagem e sequenciamento do gene da toxina foi possível, sendo designada *vacA* (COVER et al., 1994; SCHMITT; HAAS, 1994; TELFORD et al., 1994).

Todas as cepas de *H. pylori* contêm uma cópia do gene cromossomal *vacA*, contudo, existe um alto nível de diversidade entre os alelos de *vacA* entre as cepas. Essa diversidade alélica é particularmente notável próximo a região terminal 5' de *vacA* (região sinal - s) e na região do meio do gene (região m), que se combinam em mosaico via recombinação homóloga. Duas famílias principais de sequências da região s (s1 e s2) e da região m (m1 e m2) têm sido descritas, além de outros subtipos de alelos de *vacA*, como s1a, s1b, s1c, m1a, m1b, m2a e m2b (ATHERTON et al., 1995; VAN DOORN et al., 1998). A região sinal afeta a atividade vacuolizante da toxina, enquanto a região do meio determina a especificidade da ligação entre a toxina e a célula do hospedeiro, afetando, portanto a ligação às células epiteliais gástricas (LETLEY; ATHERTON, 2000; JI et al., 2000). A figura 22a mostra de forma esquemática a representação do gene *vacA* e sua variação alélica.

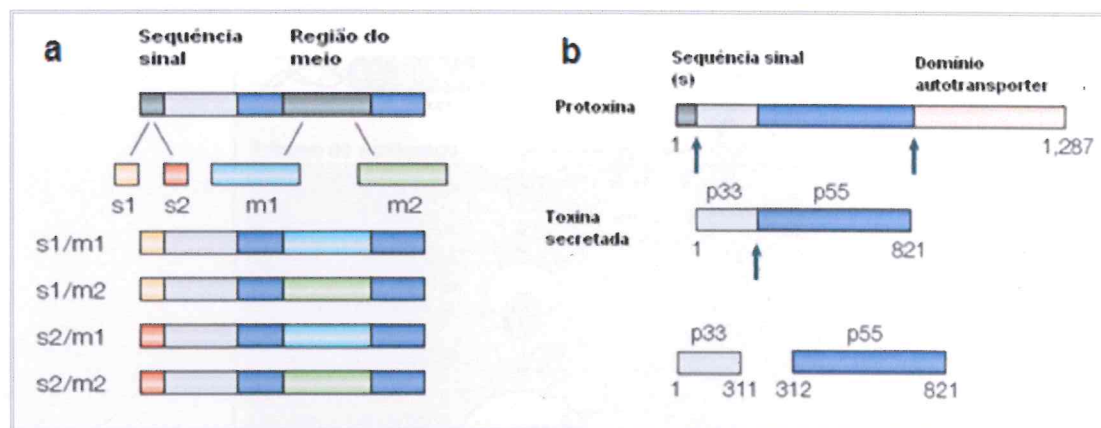


Figura 22 – a) Representação esquemática da região sinal e do meio do gene *vacA* de *H. pylori* e seus subtipos de alelos. b) Esquema da proteína VacA e processamento proteolítico para formação de proteína ativa. Fonte: Adaptado de Cover; Blanke, 2005.

Mais recente, Rhead et al. (2007) descreveram uma terceira região polimórfica no gene *vacA*, localizada entre a região sinal e do meio, denominada de região intermediária, que apresenta duas variações alélicas, i1 e i2, ambas comuns entre isolados clínicos de *H. pylori* e também associada à atividade vacuolizante da toxina.

O gene *vacA* codifica inicialmente uma prototoxina inativa de aproximadamente 140 kDa (Figura 22b). Posteriormente, uma sequência sinal aminoterminal e um fragmento carboxiterminal são clivados proteoliticamente, gerando uma toxina madura de aproximadamente 88 kDa, denominada VacA. As moléculas de toxina madura são secretadas no espaço extracelular via um mecanismo de autotransporte ou podem ser retidas na superfície da bactéria. A toxina madura sofre clivagem proteolítica em dois fragmentos, p33 e p55. O

primeiro fragmento é responsável pela atividade vacuolizante da toxina e o segundo pela ligação de VacA às células do hospedeiro (COVER et al., 1994; COVER; BLANKE, 2005).

Após a ligação de VacA à superfície das células epiteliais gástricas, essa toxina é internalizada e forma canais ânion-seletivos na membrana de compartimentos endocíticos (Figura 23). A permeabilidade do cloreto através desses canais resulta em um aumento da concentração de cloreto intraluminal e para compensar este aumento, a atividade ATPase vacuolar aumenta, resultando no aumento do influxo de prótons e redução de pH intraluminal. Posteriormente, bases fracas permeantes de membrana como a amônia se difunde para os compartimentos endocíticos e torna-se protonada nesse compartimento (MORBIATO et al., 2001). O edema osmótico desses compartimentos, pela entrada de H_2O , resulta em vacuolização celular, como representada na figura 23.

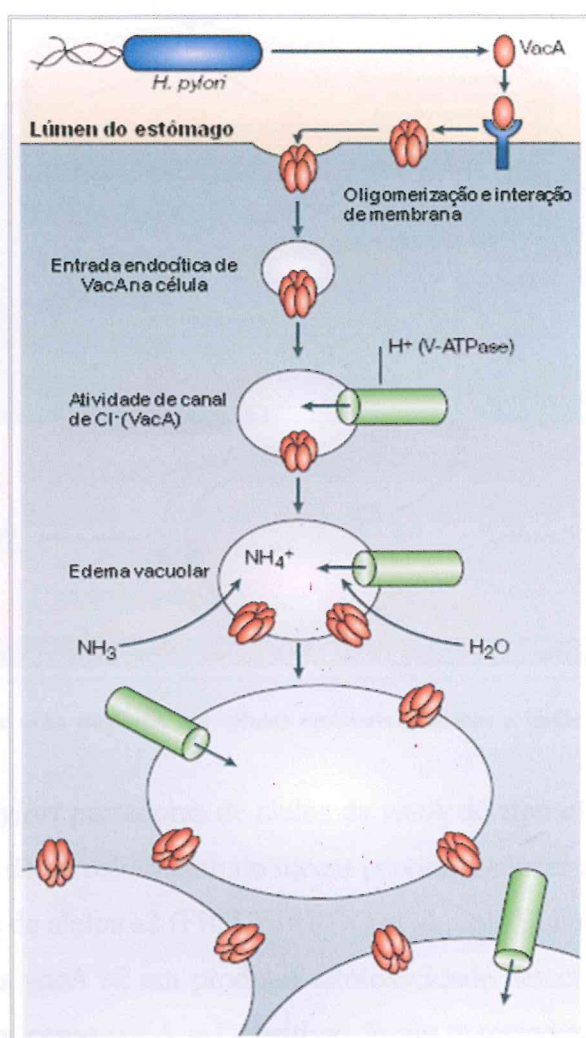


Figura 23 – Vacuolização celular induzida por VacA. Fonte: Adaptado de Cover; Blanke, 2005.

Em células epiteliais gástricas, além da ação de vacuolização celular, a toxina VacA atua também alterando a permeabilidade da membrana mitocondrial, levando ao aumento da liberação do citocromo c e portanto induzindo a apoptose (COVER et al., 2003). Adicionalmente, ela estimula a sinalização pró-inflamatória, através do estímulo da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 (SUPAJATURA et al., 2002). Também, a ativação por VacA da via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos e do fator de transcrição ativado 2 leva ao aumento de proliferação celular (NAKAYAMA et al., 2004). Em células T do sistema imune, VacA atua inibindo a ativação e proliferação desses linfócitos através da inibição da produção de IL-2, que é essencial para viabilidade e proliferação de células T. Como consequência, ocorre um comprometimento da resposta imune celular (GEBERT et al., 2003) (Figura 24).

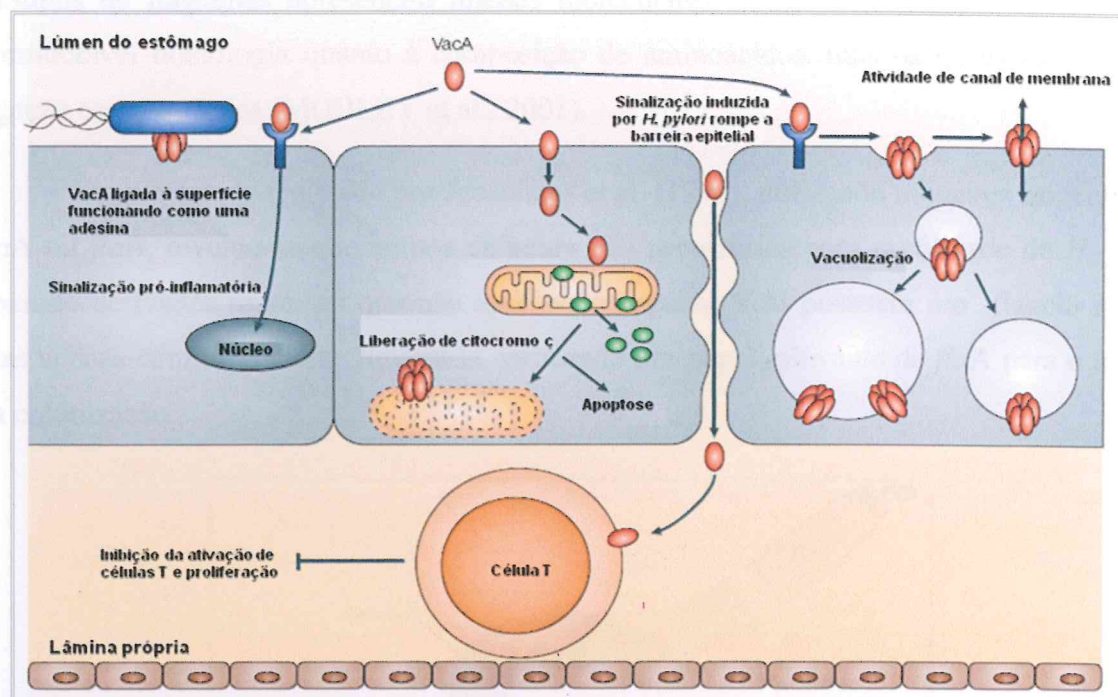


Figura 24 – Mecanismo de ação de VacA em células epiteliais gástricas e linfócitos T. Fonte: Adaptado de Cover; Blanke, 2005.

Cepas de *H. pylori* portadoras de alelos de *vacA* do tipo s1 foram associadas com um risco aumentado para desenvolvimento de úlcera péptica e câncer gástrico quando comparado com cepas portadoras de alelos s2 (FIGUEIREDO et al., 2002), o que pode ser explicado pela incapacidade de cepas *vacA* s2 em produzir citotoxicidade detectável *in vitro* (ATHERTON et al., 1995). Também, cepas *vacA* m1 positivas foram associadas com risco aumentado para desenvolvimento de câncer gástrico quando comparadas às cepas *vacA* tipo m2 (FIGUEIREDO et al., 2002).

b) Flagelos

A colonização bem sucedida da mucosa gástrica por *H. pylori* é dependente da presença do flagelo. O flagelo de *H. pylori* basicamente é composto de um corpo basal, que é embebido na parede celular e contém proteínas necessárias para rotação e quimiotaxia; um filamento que age como uma hélice quando é rotacionado à sua base; e um gancho que serve como uma junção entre o corpo basal e o filamento flagelar (MOBLEY et al., 2001) (Figura 25). Pelo menos 20 proteínas constituem os componentes estruturais do flagelo, contudo apenas componentes do filamento e do gancho tem sido caracterizados detalhadamente.

O filamento é um copolímero de subunidades de flagelinas FlaA e FlaB. FlaA é o subtipo predominante e FlaB o subtipo menor, localizado na base do flagelo. Ambos os subtipos de flagelinas apresentam massas moleculares similares (53kDa) e compartilham considerável homologia quanto à composição de aminoácidos, mas os genes não possuem ligação cromossômica (MOBLEY et al., 2001).

Em um estudo realizado por Josenhans et al. (1995), utilizando mutantes isogênicos de *flaA* ou *flaB*, revelou-se que ambos os genes são necessários para motilidade de *H. pylori*, contudo derivados mutantes que não apresentam apenas *flaB* possuem um flagelo normal, mas apenas com motilidade diminuída, indicando um papel relevante de *flaA* para o sucesso da colonização.

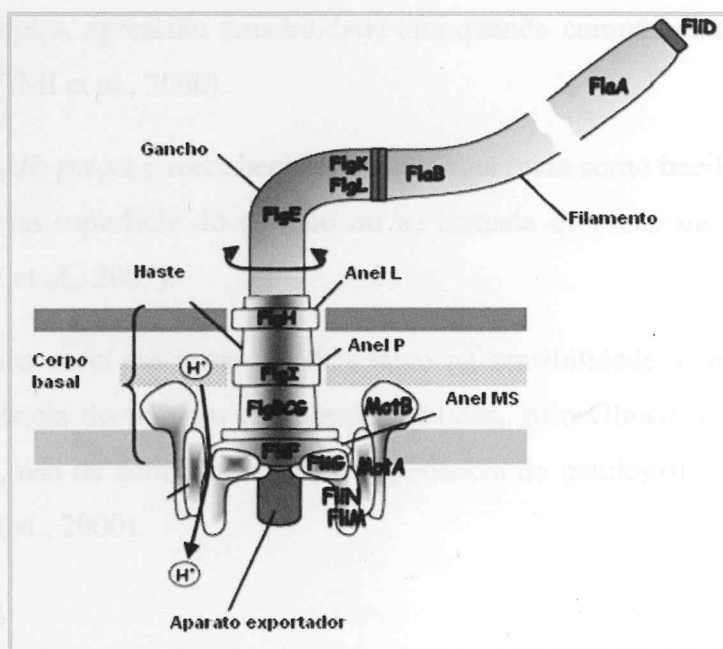


Figura 25 – Representação da estrutura do flagelo, mostrando a composição protéica distinta na região do filamento, gancho e corpo basal. Fonte: Adaptado de Mobley et al., 2001.

1.2.4- DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *H. pylori*

A infecção por *H. pylori* pode ser diagnosticada por métodos invasivos (endoscopia com biópsia para histologia, cultura, teste rápido da urease e PCR) e técnicas não invasivas (sorologia, teste respiratório de ^{13}C -uréia e teste de antígeno nas fezes). A escolha do método é baseada na prevalência da infecção na população; nos sintomas apresentados; na disponibilidade e nos custos dos testes (VAIRA; VAKIL, 2001; RICCI et al., 2007).

1.2.4.1- Testes invasivos

1.2.4.1.1- Endoscopia

A endoscopia gastrointestinal alta é o procedimento invasivo utilizado para avaliação macroscópica da mucosa gástrica e obtenção das biópsias de tecido gástrico para posterior identificação da infecção por *H. pylori*, utilizando os métodos abaixo descritos. Segundo Malfertheiner et al. (2007), esse procedimento é recomendado em pacientes com idade acima 55 anos, em pacientes que apresentam sintomas de alerta, tais como anemia, perda de peso, ou naqueles pacientes com novos sintomas dispépticos agudos.

a) Histologia

A histologia permite a detecção da bactéria no tecido bem como da presença de inflamação. A coloração de Giemsa é a coloração de escolha para detecção de *H. pylori* já que esta técnica é simples, apresenta sensibilidade alta quando comparada a outras colorações e baixo custo (ROTIMI et al., 2000).

No tecido, *H. pylori* é reconhecida pela sua aparência como bacilo curvo, curto ou em forma de espiral na superfície do epitélio ou na camada de muco ou na profundidade das glândulas (RICCI et al., 2007).

Essa técnica varia em torno 53-90% tanto na sensibilidade quanto na especificidade devido à dependência do número de biópsias obtidas, sítio clínico avaliado, densidade de bactéria presente, uso de antimicrobianos e experiência do patologista (EL-ZIMAITY et al., 1996; ROTIMI et al., 2000).

b) Cultura

O método padrão ouro para detecção da infecção por *H. pylori* é a cultura, devido à sua alta especificidade (100%) e por possibilitar a detecção da sensibilidade de *H. pylori* aos

antimicrobianos. Contudo, a sensibilidade desse método é baixa, devido a dificuldades no cultivo *in vitro* dessa bactéria, visto ser um microrganismo bastante frágil. Por esse motivo, a falha no cultivo decorre das seguintes impropriedades: número de biopsias, transporte dos espécimes clínicos, meios de cultura utilizados, tempo de processamento da amostra, uso prévio de antimicrobianos, inibidores da bomba de prótons, além de inexperiência do microbiologista (RICCI et al., 2007).

c) Teste rápido da urease

Esse teste é baseado na atividade da enzima urease produzida por *H. pylori* que degrada a uréia em amônia, e esta por sua vez aumenta o pH da solução do teste. A alteração do pH é detectada pelo indicador vermelho fenol que muda da cor amarela para vermelha. Em comparação a histologia e cultura, os testes rápidos da urease são mais ágeis, baratos e com sensibilidade semelhante (MONTEIRO et al., 2001; TSENG et al., 2005).

d) Testes moleculares

Entre os testes moleculares utilizados para detecção da infecção por *H. pylori*, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada. Para identificação dessa bactéria normalmente são utilizados os genes RNAr 16S, *ureA* e/ou *ureC* (DUNN et al., 1997). Além de possibilitar a detecção com alta especificidade e sensibilidade, PCR também possibilita a detecção de resistência de *H. pylori* a medicamentos e genotipagem dessas cepas (ZSIKLA et al., 2006).

Lage et al. (1995) em um estudo comparando a técnica de PCR com outras técnicas, como histologia, teste rápido da urease e cultura, para detecção da infecção por *H. pylori*, mostrou que a PCR, através da pesquisa do gene *ureC*, apresentou alta sensibilidade quando comparada aos outros métodos e especificidade equivalente à cultura, demonstrando a excelente utilidade desse método no diagnóstico de *H. pylori*.

1.2.4.2- Testes não-invasivos

Segundo Ricci et al. (2007), os testes não-invasivos para detecção de *H. pylori* podem ser divididos em ativos, quando detectam antígenos bacterianos, ou passivos, quando detectam anticorpos produzidos contra essa bactéria.

1.2.4.2.1- Testes ativos

a) Teste respiratório da uréia

Esse teste é baseado no princípio que a atividade da urease é presente no estômago de indivíduos infectados por *H. pylori*. Pacientes ingerem uréia marcada com carbono ^{13}C ou ^{14}C e a hidrólise da uréia ocorre na camada de muco e resulta na produção de CO_2 marcado. O CO_2 marcado difunde-se no epitélio dos vasos sanguíneos e é detectado na respiração dos pacientes. Ele apresenta alta sensibilidade e especificidade, e é utilizado para confirmação de erradicação de *H. pylori*; contudo, o teste respiratório da uréia pode não ser confiável na avaliação de pacientes que fizeram cirurgia gástrica ou naqueles que usaram inibidores de bomba de prótons ou ranitidina (RICCI et al., 2007).

b) Teste para pesquisa de HpSA (*Helicobacter pylori* Stool Antigen)

O teste para pesquisa de antígeno de *H. pylori* nas fezes é um tipo de imunoensaio enzimático que usa anticorpos anti-*H. pylori*. Em um estudo de Manes et al. (2001), a sensibilidade e especificidade desse método foram de 87,5% e 95,7%, respectivamente, após terapia de erradicação. Vaira et al. (2002) sugere que o teste respiratório da uréia e teste de pesquisa de HpSA são equivalentes para confirmação de erradicação de *H. pylori*.

1.2.4.2.2- Testes passivos

a) Deteção de anticorpos específicos

Os testes sorológicos são baseados na detecção de anticorpos do tipo IgG anti-*H. pylori* no soro dos pacientes. Esses testes apresentam as vantagens de serem de baixo custo e não necessitarem de equipamentos específicos para sua realização. Contudo, eles não distinguem entre uma infecção por *H. pylori* ativa e uma exposição prévia (STERNBERG et al., 1997; CIRAK et al., 2007).

1.2.5. POSSÍVEIS MECANISMOS CARCINOGENICOS

A relação entre presença de infecção por *H. pylori* e desenvolvimento e progressão de câncer gástrico já é bem estabelecida, contudo ainda é pouco entendido por quais mecanismos carcinogênicos essa bactéria atua. Adicionalmente, apesar de mais de 50% da população possuírem *H. pylori*, menos de 1% desenvolvem o adenocarcinoma gástrico (LADEIRA et al.,

2003), levantando a hipótese de que existem cepas de *H. pylori* mais patogênicas, além de fatores específicos dos hospedeiros que contribuem para o desenvolvimento desses tumores.

É proposto que *H. pylori* pode induzir o carcinoma gástrico por efeitos de dois tipos principais de eventos, que são o dano indireto de produtos da inflamação causando eventos mutacionais em células epiteliais gástricas e/ou efeitos diretos nas células epiteliais gástricas por *H. pylori* ou por liberação de produtos dessa bactéria em diferentes níveis. Neste último caso, esse efeito direto consiste em: efeitos tóxicos diretos em células epiteliais (GRISHAM et al., 2000); alteração no balanço proliferação-apoptose (KONTUREK et al., 1999); estresse oxidativo celular (LI et al., 2000); desregulação do sistema de reparo por erro de pareamento do DNA (MMR) (KIM et al., 2002; MIRZAEI et al., 2008); alterações na adesão celular (TERRES et al., 1998); e efeitos nas vias de transdução e expressão de genes, tais como de genes supressores tumorais, como *p53*, *p27^{KIP1}* e *p16^{INK4A}* (GAO et al., 2000; EGUCHI et al., 2003; LI et al., 2005; LIMA et al., 2008), além de genes que codificam enzimas pró-inflamatórias (COX-2) (KONTUREK et al., 2006).

Atualmente, a presença de *H. pylori* vem sendo associada à indução de hipermetilação em regiões promotoras de genes importantes para a progressão tumoral gástrica. Perri et al. (2007) mostraram que após a erradicação de *H. pylori*, o *status* de metilação dos genes *CDHI* e *CDKN2A* diminuíram significativamente e a metilação no gene *COX-2* desapareceu completamente. Chan et al. (2006) também observaram que a incidência de metilação em regiões promotoras de *CDHI* diminuiu depois da erradicação de *H. pylori*. Mais recentemente, Kitajima et al. (2008), em estudo *in vitro*, demonstraram a existência de uma relação entre presença de *H. pylori* e metilação do supressor de tumor *RUNX3*. Adicionalmente, Dong et al. (2009), *in vivo*, mostraram que a frequência de metilação do promotor de *CDKN2A* em lesões pré-cancerosas gástricas, foi maior em pacientes *H. pylori* positivos.

Neste contexto, é evidente a relevância de estudos que possibilitem a elucidação de mecanismos pelos quais *H. pylori* pode promover a carcinogênese gástrica. Frente à diversidade genética apresentada pela *H. pylori* torna-se importante verificar a relação existente entre seus genótipos específicos e os possíveis mecanismos carcinogênicos.

2- PERGUNTA DE PARTIDA

Cepas de *H. pylori* mais patogênicas estão associadas à inativação de genes importantes na carcinogênese gástrica, como *CDKN2A*, *HMLH1* e *COX-2*, via hipermetilação de seus promotores?

3- HIPÓTESE

A inativação dos genes estudados é dependente do genótipo *H. pylori*.

4- OBJETIVOS

4.1- GERAL

Avaliar a relação de cepas de *H. pylori* com a expressão e metilação em regiões promotoras dos genes *CDKN2A*, *HMLH1* e *COX-2*, em uma série de adenocarcinomas gástricos, associando com os achados clínicos e histopatológicos.

4.2- ESPECÍFICOS

- Detectar a frequência de infecção por *H. pylori* e dos genes de patogenicidade, *cagA*, subtipos de *vacA*, *cagE*, *virB11* e *flaA*;
- Determinar a expressão e o padrão de metilação em regiões promotoras dos genes *CDKN2A*, *HMLH1* e *COX-2*, em amostras de adenocarcinomas gástricos, correlacionando o *status* da metilação com a expressão dos mesmos;
- Correlacionar todos os dados relativos à expressão e metilação em regiões promotoras dos genes *CDKN2A*, *HMLH1* e *COX-2* com os achados clínico-epidemiológicos e histopatológicos, com ênfase na relevância desses eventos na tumorigênese gástrica;
- Associar os genótipos de *H. pylori* com a expressão e o *status* da metilação em regiões promotoras dos genes *CDKN2A*, *HMLH-1* e *COX-2*;
- Verificar as associações de cepas de *H. pylori* com a expressão e o *status* da metilação em regiões promotoras dos genes *CDKN2A*, *HMLH1* e *COX-2*, considerando os achados clínico-epidemiológicos e histopatológicos e sua significância na tumorigênese gástrica.

5- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes com diagnóstico histopatológico

Gêneros gástricos obtidos através de:

- Assinatura do Termo de Consentimento

5 – METODOLOGIA

5.1- ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho faz parte de um projeto multidisciplinar denominado “Alterações moleculares no câncer gástrico: associação com fatores epidemiológicos”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC) em reunião no dia 30/11/2004, número do ofício: 712/04, sob protocolo 199/04 (Anexo I), dentro das normas que regulamentam as pesquisas em seres humanos segundo as Resoluções 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde/Brasil.

Os pacientes participantes da pesquisa foram inicialmente esclarecidos sobre de que se constituía a pesquisa, os objetivos do trabalho e informados de sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC). Após os devidos esclarecimentos, foi apresentado aos pacientes e respectivos responsáveis, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II) para preenchimento e assinatura.

5.2- DESENHO DO ESTUDO

Tratou-se de um estudo observacional, do tipo transversal, no qual foram coletados dados epidemiológicos, clínicos e material biológico (tecido tumoral gástrico), com o intuito de avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na carcinogênese gástrica relacionados com genótipo de *H. pylori*.

5.3- POPULAÇÃO DE INVESTIGAÇÃO

A população de investigação foi composta de 82 pacientes atendidos no Serviço de Cirurgia do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC) da Universidade Federal do Ceará (UFC), na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza-CE, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina em Botucatu/SP e no Hospital Amaral Carvalho, em Jaú/SP, com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico, e submetidos a gastrectomia parcial ou total.

5.4- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes com diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma gástrico feito a partir de biópsias gástricas obtidas através de endoscopia e ou gastrectomia parcial ou total;
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo paciente;

- Representatividade de células tumorais em amostra tumoral e bloco utilizado para estudo (>80% de células tumorais);
- Presença tanto de material tumoral fresco para extração de DNA como de blocos em parafina para análise histopatológica e imuno-histoquímica.

5.5- COLETA DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Os dados clínicos e epidemiológicos foram coletados a partir do prontuário do paciente, de informações fornecidas pelo médico e de entrevista direta com o paciente, de acordo com a ficha de Cadastro de Pacientes (Anexo III), elaborada previamente.

5.6- PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

5.6.1- COLETA, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

As amostras de tecido tumoral gástrico foram coletadas no centro cirúrgico dos hospitais previamente citados. Durante a gastrectomia, quando a peça foi retirada, um fragmento de tecido tumoral fresco de tamanho representativo foi obtido, em condições de assepsia, com auxílio de bisturi estéril.

As amostras tumorais frescas coletadas foram armazenadas imediatamente em freezer a menos 70°C até o momento da extração de DNA. Antes de cada extração, foram realizados cortes histológicos do material, ainda congelado, para avaliação da porcentagem de células tumorais no fragmento, estimada através da coloração por Hematoxilina/Eosina. A extração de DNA foi realizada apenas quando o fragmento se constituiu predominantemente de células tumorais, ou seja, possuía no mínimo 80% dessas células.

Os laudos e os blocos representativos (>80%) de tecido tumoral necessários para pesquisa foram fornecidos pelos laboratórios com os quais os hospitais citados são conveniados (Laboratório do Departamento de Patologia e Medicina Legal – UFC e o laboratório de patologia PATHUS).

5.6.2- EXTRAÇÃO DO DNA DE MATERIAL CONGELADO

O DNA de alto peso molecular foi obtido dos tecidos tumorais utilizando a técnica baseada no uso do detergente Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB - *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) para tecidos, já em uso rotineiro no Laboratório de Genética Molecular

(LABGEM), adaptado do protocolo descrito por Foster; Twell (1996). Seguem abaixo as etapas desse processo:

- Inicialmente, fragmentos de tecido tumoral de aproximadamente 0,5g foram macerados com auxílio de bastão de vidro estéril, em tubo Falcon de 15 mL;
- Ao macerado, foi adicionado o tampão de extração (2% CTAB, 1,4M de NaCl, 20mM de EDTA, 100mM de Tris-HCl pH 8,0, 0,2% de 2-Mercaptoetanol) na proporção de 6 mL para cada 0,5g de tecido tumoral. A mistura foi incubada sob agitação a 60°C, por 16 horas;
- Após as 16 horas de incubação, para purificação do DNA, foi adicionada uma mistura de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos;
- A fase superior foi transferida para um tubo Falcon estéril e o DNA foi precipitado com o uso de isopropanol PA. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em NaCl 1 M;
- O DNA foi, em seguida, precipitado com o etanol PA gelado, centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos;
- O sedimento, contendo DNA, foi lavado com etanol a 70% e colocado para secar a temperatura ambiente e ressuspensionado em água Milli-Q estéril com DEPC 0,1% e armazenado em freezer a -14°C.

A qualidade do DNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, sendo considerado satisfatório quando obtido um DNA de alto peso molecular. A quantidade do DNA foi determinada utilizando o aparelho espectrofotométrico NanoDrop™ 3300 com leituras em faixas de 260 e 280 nm.

5.6.3- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

5.6.3.1- Detecção de *H. pylori*

A presença de infecção por *H. pylori* foi detectada pela amplificação do gene bacteriano *glmM* (*ureaseC*), utilizando protocolo descrito por Lage et al. (1995) e oligonucleotídeos iniciadores mostrados na tabela 6.

A mistura de PCR foi preparada para um volume final de 25µL e foi composta de 2,5 µL de tampão 10x (Invitrogen; Tris-HCl 20mM, pH 8,4, KCl 50mM), 1% de Tween 20, 1U de Platinum *Taq* DNA Polimerase® da Invitrogen, 200µM da mistura de deoxiribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1µL de DNA. Depois de preparada a mistura, ela foi submetida, em termociclador Eppendorf, a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 7 minutos, como mostrado na tabela 7.

O produto amplificado de 294 pb foi visualizado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, utilizando um transluminador de luz ultravioleta e identificado através de comparação com marcador de peso molecular de 100 pares de base. Como controle positivo da reação, foi utilizada amostra de câncer gástrico ou gastrite sabidamente positiva para *H. pylori* pela histologia. O controle negativo consistiu de todos os reagentes com água no lugar do DNA.

Para confirmação da especificidade da reação, produtos de PCR do gene *ureC* foram clonados com o kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen, California, USA) e sequenciados usando o kit ABI PRISM BigDye Terminator v.3.0 Cycle Sequencing® (Applied Biosystems, California, USA) e o sequenciador de DNA ABI Prism 3100® (Applied Biosystems, California, USA).

5.6.3.2- Genotipagem de *H. pylori* (*vacA* subtipos s1, s2, m1, m2, *cagA*, *cagE*, *virB11* e *flaA*)

Todos os subtipos de *vacA* estudados foram amplificados de acordo com protocolo e oligonucleotídeos iniciadores descritos por Atherton et al. (1995) (Tabela 5). Para os subtipos s1 e s2, a mistura de PCR foi preparada para um volume final de 25µL e foi composta de tampão 1x (Invitrogen; Tris-HCl 20mM, pH 8,4, KCl 50mM), 1U de Platinum *Taq* DNA Polimerase® (Invitrogen), 1% de Tween 20, 200µM da mistura de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1µL de DNA. Os subtipos m1 e m2 foram detectados através de reações de PCR individuais. Tanto para m1 como m2, a mistura da PCR foi equivalente a utilizada na PCR dos subtipos s1 e s2, diferenciando apenas nas concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, 0,4µM para o subtipo m1 e 0,3µM para m2.

O gene *cagA* foi amplificado utilizando protocolo e oligonucleotídeos iniciadores descritos por Domingo et al., 1999 (Tabela 5). A mistura para PCR foi composta de tampão 1x (Invitrogen; Tris-HCl 20mM, pH 8,4, KCl 50mM), 1% de Tween 20, 1U de Platinum *Taq* DNA Polimerase® (Invitrogen), 200µM da mistura de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 µL de DNA, para um volume final de 25µL.

Os genes *cagE* e *virB11* foram amplificados em reações individuais, segundo protocolo de Sozzi et al., 2005 (Tabela 5). As misturas das reações foram preparadas para um volume final de 20µL usando MasterMix®, Promega (*Taq* DNA Polimerase, dNTPs e MgCl₂) de acordo com instruções do fabricante, adicionado de 0,8% de Tween 20, 0,3µM (*virB11*), 1µM (*cagE*) de cada oligonucleotídeo iniciador e 1µL de DNA.

Para amplificação do gene *flaA*, o protocolo de Göttke et al. (2000) e os oligonucleotídeos iniciadores descritos por ele foram utilizados (Tabela 5). A mistura de PCR foi preparada para um volume final de 20µL, usando Green MasterMix® (Promega; *Taq* DNA Polimerase, dNTPs e MgCl₂) de acordo com instruções do fabricante, com adição de 0,8% de Tween 20, 0,3µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1µL de DNA.

As misturas preparadas para amplificação dos referidos genes foram submetidas, em termociclador Eppendorf, a variações cíclicas de temperatura, consistindo de uma etapa de desnaturação inicial, seguida de ciclos de desnaturação, anelamento, extensão e uma última etapa de extensão final, variando de acordo com o gene a ser amplificado, como mostrado na tabela 6.

Para detecção dos produtos de amplificação da PCR dos genes *cagA*, *cagE*, *virB11* e *flaA*, uma eletroforese em gel de agarose a 2% foi realizada. Já para os subtipos de *vacA*, uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado com nitrato de prata, foi usada. A presença dos genes *vacA*, *cagA*, *cagE*, *virB11* e *flaA* genes foi considerada positiva quando fragmentos de tamanhos específicos (Tabela 5) foram detectados.

Tabela 5 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados e tamanho de fragmento gerado após término da PCR.

Gene	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores	Referência	Tamanho (pb)
ureC	F-5’AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT3’	Lage et al. (1995)	294
	R-5’AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC3’		
vacA	s1/s2 F-5’ATGGAAATACAACAAACACAC3’	Atherton et al. (1995)	259/286
	R-5’CTGCTTGAATGCGCCAAAC3’		
	m1 F-5’GGTCAAAATGCGGTCATGG3’	Atherton et al. (1995)	290
	R-5’CCATTGGTACCTGTAGAAAC3’		
	m2 F-5’GGAGCCCCAGGAAACATTG 3’	Atherton et al. (1995)	192
	R-5’CATAACTAGCGCCTTGCAC3’		
cagA	F-5’ATAATGCTAAATTAGACAACCTGAGCGA3’	Domingo et al. (1999)	297
	R-5’TTAGAATAATCAACAAACATAACGCCAT3’		
cagE	F-5’TTGAAAACCTCAAGGATAGGATAGAGC3’	Sozzi et al. (2005)	509
	R-5’GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC3’		
virB11	F-5’TTAAATCCTCTAAGGCATGCTAC3’	Sozzi et al. (2005)	491
	R-5’GATATAAGTCGTTTTACCGCTTC3’		
flaA	F-5’TTCTATCGGCTCTACCAC3’	Göttke et al. (2000)	508
	R-5’CTGACCGCCATTGACCAT3’		

F – Forward; R - Reverse

Tabela 6 – Condições das reações de PCR para os genes *ureC*, subtipos de *vacA*, *cagA*, *cagE*, *virB11* e *flaA* de *H. pylori*.

	Desnaturação inicial		Ciclo	Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão final	
	T°C	Tempo	Nº	T°C	Tempo	T°C	Tempo	T°C	Tempo	T°C	Tempo
<i>ureC</i>	95	5min	35	95	1min	57	1min	72	1min	72	5min
<i>vacAs1/s2</i>	95	5min	40	94	50seg	55	45seg	68	1min	68	7min
<i>vacAm1/m2</i>	95	5min	40	94	1min	55	1min	68	2min	68	7min
<i>cagA</i>	94	5min	40	94	1min	53	1min	72	2min	72	7min
<i>cagE</i>	95	5min	40	95	1min	56	1min	72	1min	72	7min
<i>virB11</i>	95	5min	35	95	1min	53	1min	72	2min	72	7min
<i>flaA</i>	95	5min	45	95	1min	49	1min	72	2min	72	7min

5.6.4- TRATAMENTO DO DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO E PCR ESPECÍFICA PARA METILAÇÃO (MS-PCR – *Methylation Specific PCR*)

A pesquisa de metilação em regiões promotoras dos genes *CDKN2A*, *HMLH1* e *COX-2* compreendeu duas etapas principais: tratamento do DNA com solução de bissulfito de sódio e a realização da MS-PCR.

A primeira etapa consistiu na modificação química do DNA, baseada na conversão de citosinas não metiladas em uracila, contudo as citosinas metiladas permaneceram inalteradas. Esse processo foi realizado segundo o protocolo descrito por Herman et al. (1996) e foi dividida em cinco fases, que são a desnaturação do DNA, tratamento com bissulfito de sódio, purificação, precipitação e ressuspensão do DNA, como descrito abaixo:

- Inicialmente, 2µg de DNA foi desnaturado através de tratamento com 2µL NaOH 3M e aquecimento da mistura a 50°C por 20 minutos;
- Para tratamento do DNA, 500µL da solução de bissulfito de sódio e hidroquinona foi adicionada a solução de DNA previamente desnaturada, seguido de incubação em banho-maria a 70°C por 3 horas;
- A purificação do DNA foi realizada utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System® (Promega), segundo instruções do fabricante;
- O DNA purificado foi precipitado utilizando etanol PA gelado seguido de incubação a -70°C por duas horas. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos;

- O sedimento obtido foi lavado com etanol a 70% e colocado para secar a temperatura ambiente;
- O DNA seco foi ressuspenso em água Milli-Q estéril e armazenado em freezer a -70°C.

A segunda etapa desse processo correspondeu à realização, após o tratamento do DNA, da MS-PCR. Como após o tratamento é desconhecido se o gene estudado é metilado ou não metilado, para cada amostra tratada, duas PCR foram realizadas, uma para pesquisa do gene metilado e outra para o não-metilado, utilizando oligonucleotídeos distintos.

Para o gene *CDKN2A*, o protocolo e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram descritos por Herman et al. (1996). A mistura da PCR para pesquisa do *CDKN2A* metilado ou não-metilado foi a mesma, com diferença apenas nos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, como descrito na tabela 8. Ela foi performada em um volume de reação final de 25µL, contendo 1x do tampão da *Taq* Platinum® (Invitrogen), 3,0 mM de MgCl₂, 0,4 mM da mistura de dNTPs, 0,64µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Platinum *Taq* DNA Polimerase® (Invitrogen), e 1µL de DNA tratado.

As reações para pesquisa do gene *HMLH1* metilado e não metilado foram realizadas segundo o protocolo e os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Kang et al. (1999) (Tabela 7). A mistura foi composta de 1x do tampão da *Taq* Platinum® (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM da mistura de dNTPs, 0,24 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Platinum *Taq* DNA Polimerase® (Invitrogen), e 1 µL de DNA tratado, para um volume final de 25µL.

A pesquisa do gene *COX-2* metilado e não-metilado foi realizada segundo Akhtar et al. (2001) (Tabela 7). Para um volume de 25 µL, a mistura da PCR foi composta de 1x do tampão da *Taq* Platinum® (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM da mistura de dNTPs, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Platinum *Taq* DNA Polimerase® (Invitrogen), e 1 µL de DNA tratado.

A tabela 8 descreve as condições das reações de PCR realizadas, considerando as variações de temperatura e tempo utilizadas para amplificação dos genes em estudo.

Como controle positivo, uma amostra de DNA metilado *in vitro* pela Sss-I metilase® (New England Biolabs) foi utilizada e água e/ou DNA dos leucócitos periféricos dos doadores saudáveis foram utilizados como controles-negativos.

Após a PCR, os produtos gerados (Tabela 7), foram detectados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante corado pelo nitrato de prata.

Tabela 7 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores e tamanho dos fragmentos gerados na PCR dos genes *CDKN2A*, *HMLH1* e *COX-2* metilados e não-metilados.

Gene	Oligonucleotídeo iniciador		Fragmento (pb)	Referência
	Forward	Reverse		
<i>CDKN2A</i>	M TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	150	Herman et al., 1996
	U TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAAACCACAACCATAA	151	
<i>MLH1</i>	M TATATCGTTCGTAGTATTCGTGT	TCCGACCCGAATAAACCCAA	153	Kang et al., 1999
	U TTTTGATGTAGATGTTTATTAGGGTTGT	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	124	
<i>COX-2</i>	M TTAGATACGGCGGCGGCGGC	TCTTTACCCGAACGTTCCG	161	Akhtar et al., 2001
	U ATAGATTAGATATGGTGGTGGTGGT	CACAATCTTTACCCAAACACTTCCA	171	

M – Metilado; U – Não-metilado; pb – pares de bases.

Tabela 8 – Condições da reação de PCR dos genes *CDKN2A*, *HMLH1* e *COX-2* metilados e não-metilados.

		Desnaturação inicial		Ciclo	Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão final	
		T°C	Tempo		T°C	Tempo	T°C	Tempo	T°C	Tempo	T°C	Tempo
<i>CDKN2A</i>	M	95	7min	35	95	1min	70	1min	72	2min	72	7min
<i>CDKN2A</i>	U	95	7min	35	95	1min	70	1min	72	2min	72	7min
<i>MLH1</i>	M	95	7min	35	95	1min30seg	66	1min	72	2min	72	7min
<i>MLH1</i>	U	95	7min	35	95	1min30seg	64	1min	72	2min	72	7min
<i>COX-2</i>	M	95	7min	38	95	1min30seg	59	50seg	72	2min	72	7min
<i>COX-2</i>	U	95	7min	35	95	1min30seg	65	1min	72	2min	72	7min

M – Metilado; U – Não-metilado.

A confirmação da especificidade da reação foi realizada através de clonagem dos produtos de MS-PCR de cada gene com uso do kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen) e posterior seqüenciamento usando o kit ABI PRISM BigDye Terminator v.3.0 Cycle Sequencing® (Applied Biosystems) e o seqüenciador de DNA ABI Prism 3100® (Applied Biosystems). Tanto os produtos da PCR metilados como não metilados foram seqüenciados.

5.6.5- MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE p16^{INK4A}, HMLH1 E COX-2.

A detecção da proteína p16^{INK4A} foi realizada utilizando o kit comercial CIntec Histology[®], segundo recomendações do fabricante. Para as proteínas HMLH1 e COX-2, foi utilizado o método Imuno-Histoquímico da estreptoavidina peroxidase, adaptado do protocolo de Hsu et al. (1981), de acordo com a descrição a seguir:

- As lâminas foram limpas em acetona e tratadas com silano a 4% e cortes histológicos a 5µm foram realizados, a partir de blocos previamente selecionados;
- As lâminas foram colocadas em estufa pré-aquecida a 70°C por 120 minutos, para retirada da parafina e posteriormente submetidas a passagens em gradientes de xilol para completa desparafinização e em gradientes de álcool-água para hidratação do tecido;
- Incubação das lâminas por 10 minutos com peróxido de hidrogênio a 3% para bloqueio da peroxidase endógena;
- Recuperação antigênica em forno de microondas utilizando tampão citrato 10mM pH=6,0 (± 99°C) por 15 minutos;
- Incubação com o anticorpo primário [diluição para HMLH1 (SC-581, Santa Cruz Biotechnology) 1:100 e COX-2 (SC-1746; Santa Cruz Biotechnology) 1:50] na geladeira (± 4°C) por 16 horas;
- Detecção pelo sistema LSAB+ (DakoCytomation), conforme instruções do fabricante;
- Revelação da reação através do sistema DAB+ (3,3'- diaminobenzidina) (DakoCytomation), segundo orientações do fabricante;
- Contra-coloração com hematoxilina de Carrazi a 40%;
- Desidratação em gradiente de água-álcool-xileno;
- Montagem com lamínula e bálsamo do Canadá.

Para cada reação realizada foram incluídos controles positivos, recomendados pelo fabricante e previamente testados.

5.6.5.1- Análise Imuno-Histoquímica

A marcação Imuno-Histoquímica foi definida como uma coloração marrom, em sítios específicos das células tumorais, dependendo do antígeno pesquisa (Tabela 9), em contraposição ao azul/violeta provido pela hematoxilina utilizada na contra-coloração.

Tabela 9 – Sítios celulares de expressão das proteínas p16^{INK4A}, HMLH1 e COX-2 detectados na reação Imuno-Histoquímica.

Proteína	Sítio celular de marcação
p16 ^{INK4A}	Núcleo e citoplasma
HMLH1	Núcleo e citoplasma
COX-2	Citoplasma

A quantificação de células tumorais marcadas foi realizada, segundo Landberg; Roos (1993), através da contagem manual, utilizando microscópio óptico com magnificação de 400X, de no mínimo 1.000 (mil) células tumorais gástricas, em diferentes campos representativos. A partir de então foi estimado o índice de marcação LI (*Labelling Index*), de acordo com a fórmula abaixo:

$$LI\ (\%) = [(n^{\circ}\text{ de células imuno-positivas}) / (n^{\circ}\text{ total de células contadas})] \times 100$$

A positividade foi considerada quando existiam no mínimo 5% de células tumorais marcadas ($LI \geq 5\%$). A intensidade de marcação também foi avaliada. Para isto, foram atribuídos os valores 0 (ausente), 1+ (fraca), 2+ (moderada) e 3+ (intensa) de acordo com a intensidade observada e esses valores foram multiplicados pelos valores percentuais (%) da fração de células que representam a respectiva categoria de intensidade, sendo calculado o H-Score, segundo previamente descrito por McCarty et al. (1985):

$$H = [(\% 0) \times 0] + [(\% 1+) \times 1] + [(\% 2+) \times 2] + [(\% 3+) \times 3]$$

Adicionalmente, foi avaliado o padrão de marcação no tecido tumoral. No padrão difuso, a marcação em células tumorais ocorreu uniformemente, distribuída em todo tecido. No padrão focal, a marcação foi restrita em alguma região, apresentando de um a cinco focos. Já o padrão multifocal, mais de cinco focos de marcação foram observados, distribuídos não-uniformemente.

5.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos, tanto clínico-epidemiológicos como histopatológicos, imuno-histoquímicos e moleculares, foram tabulados com auxílio do programa Microsoft Excel[®] 2000 (Microsoft, EUA) e foram demonstrados em tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS[®] versão 15.0 (Chicago, IL, USA). As diferenças significantes estatisticamente foram avaliadas pelos testes do Qui-Quadrado (χ^2) e Exato de Fisher. Correlações entre expressão, metilação dos genes estudados e genótipos de *H. pylori* foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando obtidos valores de *p* menores que 0,05.

6 – RESULTADOS

6.1- CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Dos 82 pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico que compuseram este estudo, 66 eram da região Nordeste e 16 da região Sudeste. Na primeira região, 42,4% dos pacientes eram procedentes da capital Fortaleza e os demais da região metropolitana e interior do estado. Os pacientes da região Sudeste eram do interior do estado de São Paulo, representado por Botucatu e Jaú.

A tabela 10 sumariza as principais características clínicas, epidemiológicas e histopatológicas dos pacientes e tumores estudados. Por esta tabela é possível observar que o sexo masculino (63,4%) predominou sobre o sexo feminino (36,6%), com uma razão masculino/feminino de 1,73. Com relação à idade dos pacientes, esta foi distribuída em faixas etárias de acordo com a padronização da IARC, já que melhor representou a amostra estudada e variou de 23-98 anos. Nenhum caso foi observado na faixa de 0-14 anos e houve um predomínio (56,1%) dos pacientes acima de 65 anos de idade.

Os adenocarcinomas gástricos estudados eram predominantemente (63,4%) pertencentes ao subtipo histológico intestinal, estavam localizados no antro em 61,0% dos casos, apresentavam diferenciação moderada (52,4%) e eram de estádios mais avançados (59/82; 71,95%), como representado na tabela 10.

Tabela 10 – Dados gerais da amostra estudada.

Variável	N(%)
<i>Sexo</i>	
Masculino	52 (63,4)
Feminino	30 (36,6)
<i>Faixa etária</i>	
0-14	0 (0)
15-44	5 (6,1)
45-54	14 (17,1)
55-64	17 (20,7)
≥65	46 (56,1)
<i>Subtipo histológico</i>	
Intestinal	52 (63,4)
Difuso	30 (36,6)
<i>Localização</i>	
Cárdia	18 (21,9)
Corpo	14 (17,1)
Antro	50 (61,0)
<i>Diferenciação</i>	
Bem	2 (2,4)
Moderado	43 (52,4)
Pouco	37 (45,2)
<i>TNM</i>	
<i>Tumor</i>	
1	2 (2,4)
2	15 (18,3)
3	51 (62,2)
4	14 (17,1)
<i>Linfonodos</i>	
0	17 (20,7)
1	31 (37,8)
2	24 (29,3)
3	8 (9,8)
X*	2 (2,4)
<i>Metástase</i>	
0	13 (15,8)
1	9 (11,0)
X*	60 (73,2)
<i>Estadiamento</i>	
IA	2 (2,5)
IB	6 (7,3)
II	15 (18,3)
IIIA	21 (25,6)
IIIB	16 (19,5)
IV	22 (26,8)
TOTAL	82 (100)

*X - Não foi possível avaliar.

6.2- DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR *H. pylori* E GENES DE PATOGENICIDADE

A infecção pela bactéria *H. pylori* foi observada em 95,1% (78/82) dos casos. Entre os genes bacterianos estudados, o mais freqüente foi *vacA* s1m1 (70,5%), seguido do *flaA* (61,9%) e *cagA* (60,3%) (Tabela 11). Em duas amostras, não foi possível amplificar o gene *vacA*. Para os genes *cagE*, *virB11* e *flaA*, não foi possível a análise em 15 amostras devido à insuficiência de amostra de DNA.

As figuras 26 a 27 [a-c] são exemplos de géis de poliacrilamida a 6% mostrando fragmentos específicos gerados a partir da reação de PCR para amplificação dos genes *ureC* (Figura 26), *cagA* (Figura 27a) e os subtipos de *vacA* (Figura 27b-c). A figura 28 [a-c] exemplifica a detecção dos genes *cagE* (Figura 28a), *virB11* (Figura 28b) e *flaA* (Figura 28c) em géis de agarose 2%.

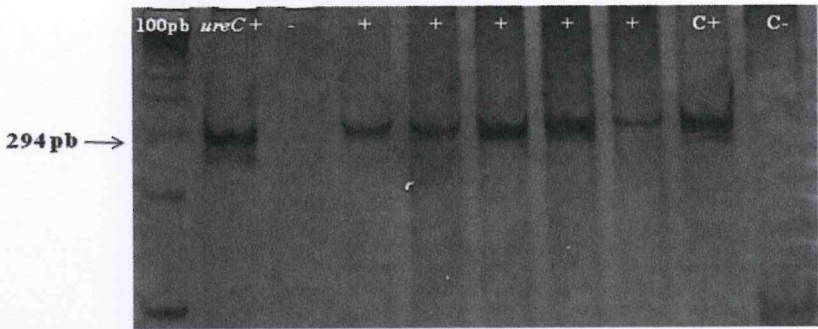


Figura 26 - Gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata, mostrando a detecção de fragmento específico de 294pb (seta) a partir da reação de amplificação do gene *ureC*.

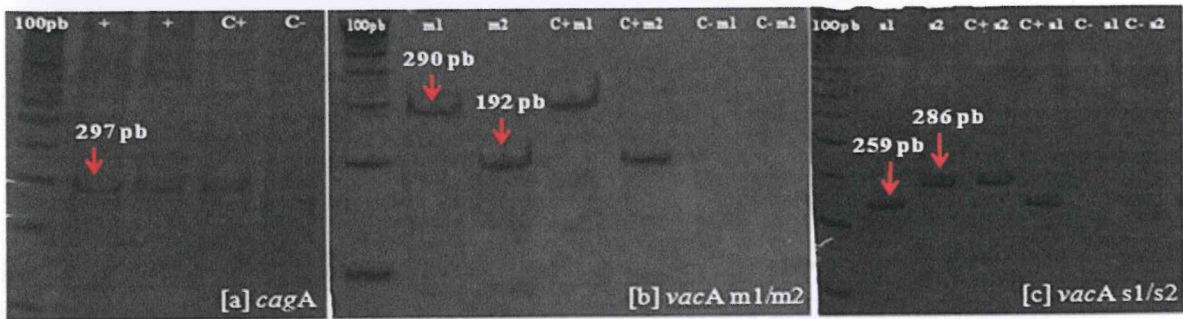


Figura 27 - Géis de poliacrilamida a 6% detectando fragmentos específicos de 297pb para gene *cagA* [a], 290pb e 192pb para os alelos m1 e m2 de *vacA* [b] e 259pb e 286pb para os alelos s1 e s2 de *vacA*, respectivamente [c].

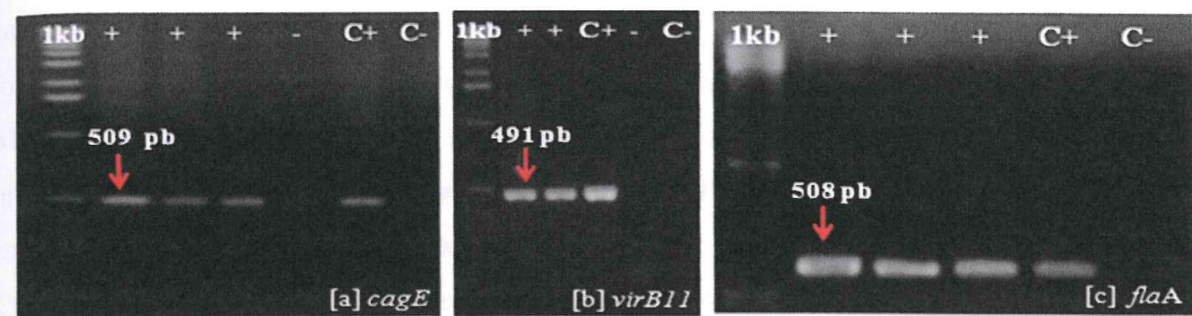


Figura 28 – Géis de agarose a 2% detectando fragmentos de 509 pb gerados a partir de amplificação do gene *cagE* [a], de 491pb para *virB11* [b], e 508pb para *flaA* [c]. O marcador de peso molecular utilizado nos géis de agarose a 2% foi 1kb para *cagE*, *virB11* (Invitrogen) e para *flaA* (Ludwig).

Tabela 11 - Frequência dos genes de patogenicidade de *H. pylori*.

Genes de <i>H. pylori</i>	N (%)
<i>vacA</i>	
s1m1	55 (70,5)
s1m2/s2m1	15 (19,2)
s2m2	6 (7,7)
S/A*	2 (2,6)
<i>cagA</i>	
Positivo	47 (60,3)
Negativo	31 (39,7)
<i>vacA</i> s1m1/ <i>cagA</i>	
Positivo	36 (46,1)
Negativo	40 (51,3)
S/A*	2 (2,6)
TOTAL	78 (100)
<i>flaA</i>	
Positivo	39 (61,9)
Negativo	24 (38,1)
<i>cagE</i>	
Positivo	29 (46,0)
Negativo	34 (54,0)
<i>virB11</i>	
Positivo	34 (54,0)
Negativo	29 (46,0)
Todos genes**	
Positivo	17 (27,0)
Negativo	46 (73,0)
TOTAL	63 (100)

*S/A – Sem amplificação. ***vacA* s1m1+*cagA*+*flaA*+*cagE*+*virB11*+

6.3- DETECÇÃO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS MARCADORES COX-2, p16^{INK4A} E HMLH1.

Exemplos de imunomarcacão para os marcadores estudados são mostrados na figura 29 [A-F]. A positividade de COX-2 foi detectada no citoplasma de células tumorais e em células inflamatórias, enquanto que HMLH1 e p16^{INK4A} foram encontrados tanto no núcleo

como no citoplasma de células tumorais. Eventuais células não neoplásicas imunomarcadas foram observadas, contudo não foram consideradas para as estimativas de LI e HS. A proteína p16^{INK4A} apresentou um padrão de marcação predominantemente difusa (67,7%) e em menor proporção focal (19,4%) e multifocal (12,9%). A HMLH1 mostrou uma distribuição difusa em 86,7% dos casos e igual proporção de marcação focal (6,7%) e multifocal (6,7%). A COX-2 apresentou 50% de marcação difusa e 45% e 5% de multifocal e focal, respectivamente.

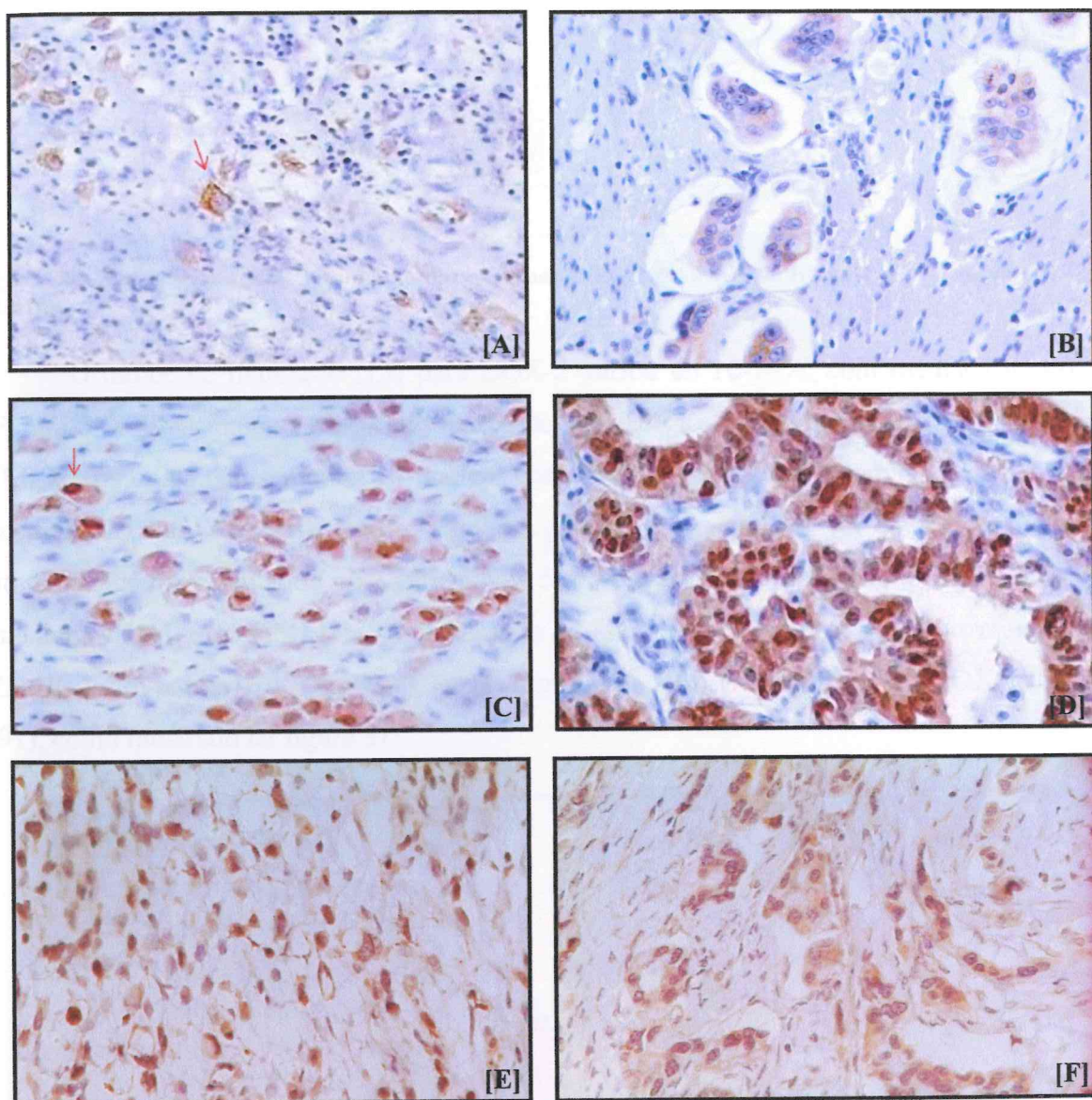


Figura 29 – Imunomarcção das proteínas COX-2 (A, B), p16^{INK4A} (C, D) e HMLH1 (E, F) (400X). A,B– Imunomarcção em marrom no citoplasma de células tumorais gástricas para proteína COX-2. C,D– Marcação intensa e difusa em marrom no núcleo e citoplasma de células tumorais para proteína p16^{INK4A}. E,F– Marcação intensa e difusa em núcleo e citoplasma de células tumorais para proteína HMLH1. A,C, E) Adenocarcinoma gástrico subtipo difuso; B, D, F) Adenocarcinoma gástrico subtipo intestinal.

A figura 30 mostra a frequência de positividade dos marcadores estudados. Observa-se que uma fração significativa dos tumores foi positiva para a enzima de reparo HMLH1 (45/77; 58,4%) e para o supressor tumoral p16^{INK4A} (31/77; 40,2%) enquanto que uma baixa frequência foi observada para enzima COX-2 (20/77; 26,0%).

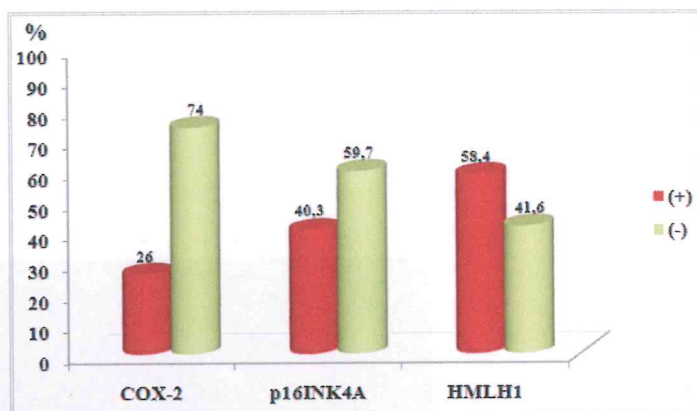


Figura 30 – Frequência de imunomarcação das proteínas COX-2, p16INK4A e HMLH1 em 77 adenocarcinomas gástricos.

O índice de marcação (LI) para COX-2 variou de 16-74%, com mediana de 40,5% (Figura 31). Uma maior variação de marcação foi observada para os marcadores p16^{INK4A} e HMLH1 os quais apresentaram LI nuclear com variação de 8-99% (mediana 55%) e 5-81% (mediana 25,5%), respectivamente. Também para estes marcadores foi observada marcação citoplasmática apresentando uma variação de 5,3-99% (mediana 68%) para p16^{INK4A} e 8-91% (mediana 61%) para HMLH1. Considerando o valor de HS citoplasmática, o maior valor observado foi para p16^{INK4A} (183; 5,5-294) seguido de HMLH1 (86; 8-262) e COX-2 (52; 19-191), como mostrado na figura 31.

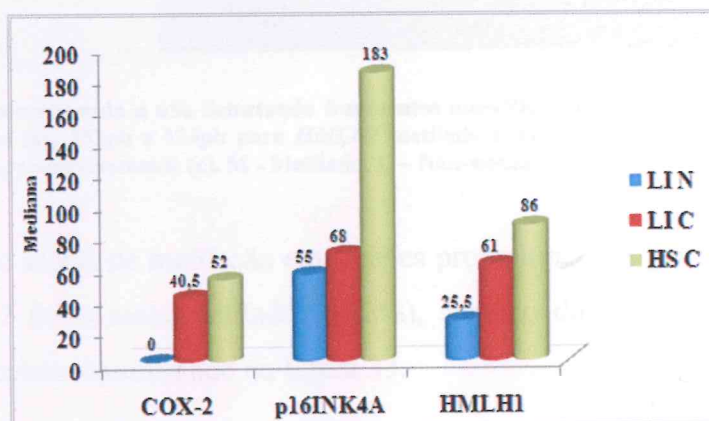


Figura 31 – Mediana do LI citoplasmático (LI C), nuclear (LI N) e do HS citoplasmático (HS C) para as proteínas COX-2, p16^{INK4A} e HMLH1.

6.4- DETECÇÃO DO STATUS DE METILAÇÃO EM REGIÕES PROMOTORAS DOS GENES *COX-2*, *CDKN2A* E *HMLH1*.

A figura 32 [a-c] mostra exemplos de géis de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata, onde foram detectados fragmentos específicos gerados a partir da amplificação dos genes *COX-2* (Figura 32a), *HMLH1* (Figura 32b) e *CDKN2A* (Figura 32c) metilados e não-metilados utilizando a técnica de MS-PCR.

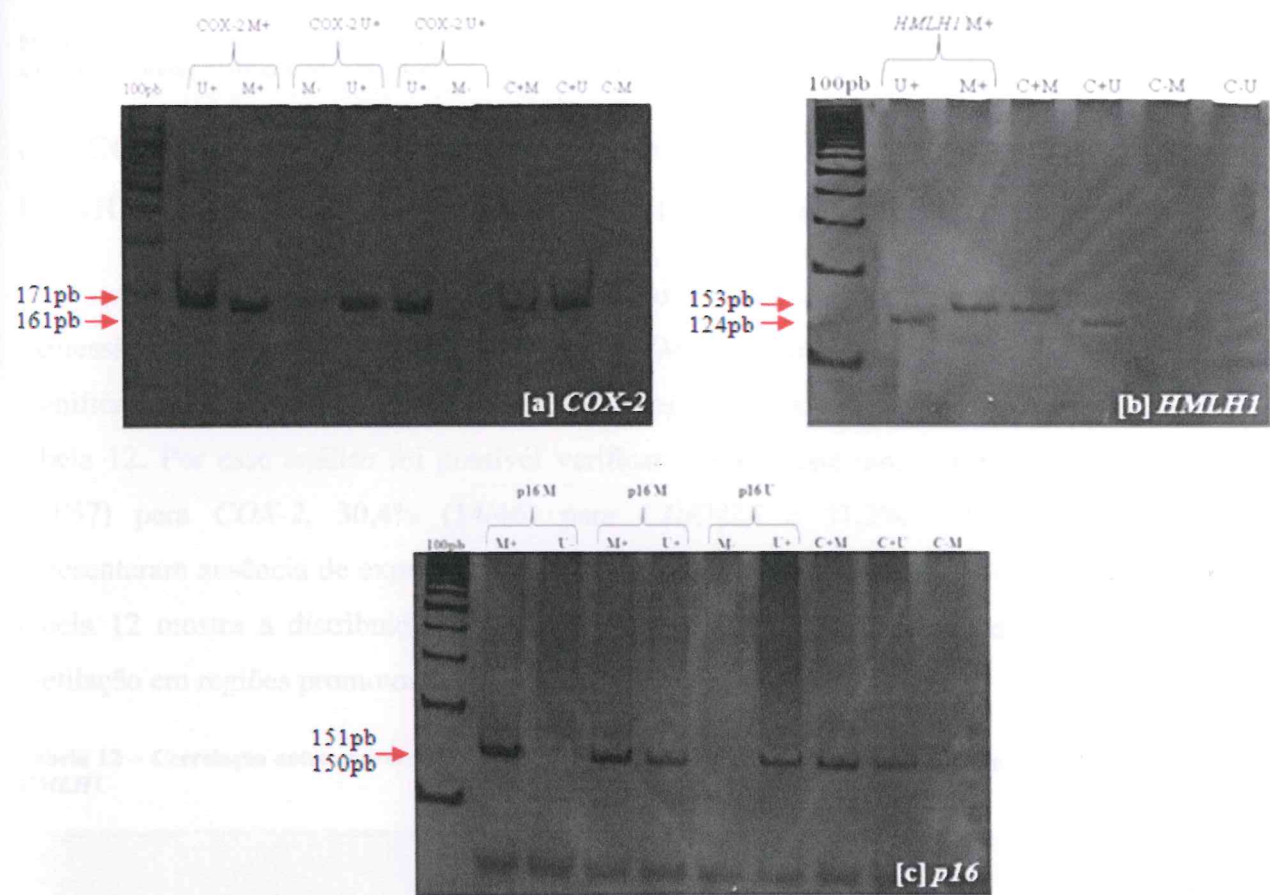


Figura 32 – Géis de poliacrilamida a 6% detectando fragmentos específicos de 161pb e 171pb para o gene *COX-2* metilado e não metilado (a); 153pb e 124pb para *HMLH1* metilado e não metilado (b); 150pb e 151pb para *p16* metilado e não-metilado, respectivamente (c). M - Metilado; U - Não-metilado.

A análise do *status* de metilação em regiões promotoras dos genes estudados mostrou que o gene *COX-2* foi o mais metilado (51,2%), seguido dos genes *CDKN2A* (46,3%) e *HMLH1* (32,9%), como representado na figura 33.

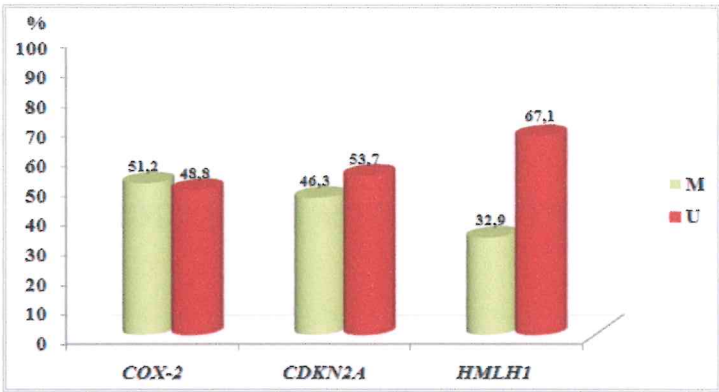


Figura 33 – Frequência de metilação em regiões promotoras dos genes *COX-2*, *CDKN2A* e *HMLH1* em 82 adenocarcinomas gástricos. M – Metilado; U – Não-metilado.

6.5- CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO E STATUS DE METILAÇÃO EM REGIÕES PROMOTORAS DOS GENES *COX-2*, *CDKN2A* E *HMLH1*

A análise de correlação feita entre *status* de metilação em regiões promotoras e a expressão dos genes *COX-2*, *CDKN2A* e *HMLH1* mostrou uma correlação negativa significativa entre esses parâmetros para todos os três genes estudados, como mostrado na tabela 12. Por esse análise foi possível verificar também que uma fração de casos, 33,3% (19/57) para *COX-2*, 30,4% (14/46) para *CDKN2A* e 31,2% (10/32) para *HMLH1* apresentaram ausência de expressão na ausência de metilação em suas regiões promotoras. A tabela 12 mostra a distribuição dos casos de acordo com a expressão dessas proteínas e metilação em regiões promotoras dos seus genes.

Tabela 12 – Correlação entre expressão e *status* de metilação em regiões promotoras dos genes *COX-2*, *CDKN2A* e *HMLH1*.

		IMUNOMARCAÇÃO		N	p-valor	R
		+	-			
COX-2	M	2 (5%)	38 (95%)	40	<0,001	-0,497
	U	18 (49%)	19 (51%)	37		
Total		20	57	77		
CDKN2A	M	4 (11%)	32 (89%)	36	<0,001	-0,557
	U	27 (66%)	14 (34%)	41		
Total		31	46	77		
HMLH1	M	4 (15,4%)	22 (84,6%)	26	<0,001	-0,624
	U	41(80,4%)	10 (19,6%)	51		
Total		45	32	77		

M – Metilado; U – Não-metilado.

Dos quatro casos *H. pylori* negativos todos foram p16^{INK4A} e COX-2 negativos e três foram HMLH1 positivos. Com relação ao *status* de metilação, três e quatro foram *CDKN2A* e *COX-2* metilados, respectivamente e todos foram *HMLH1* não-metilados.

6.6- ANÁLISE INDIVIDUAL DOS MARCADORES

6.6.1- COX-2

6.6.1.1- Relação entre imunomarcacão e metilação em regiões promotoras do gene *COX-2* e parâmetros clinicopatológicos

A distribuição dos casos positivos e negativos de COX-2 e *status* de metilação desse gene de acordo com as faixas etárias é mostrada na figura 34[A-B]. Apesar da baixa positividade de COX-2, os casos positivos foram distribuídos em todas as faixas etárias, não havendo diferenças de expressão de COX-2 ($p>0,05$) entre elas, com aproximadamente 50% dos casos positivos em cada faixa. Com relação ao *status* de metilação de *COX-2* (Figura 34B) nenhuma diferença também foi observada entre os casos metilados e não-metilados de acordo com a faixa etária. Adicionalmente, cortes considerando a idade dos pacientes foram realizados (50, 60 e 65 anos), contudo, em nenhum desses cortes foram observadas diferenças na expressão ou metilação do promotor de *COX-2*.

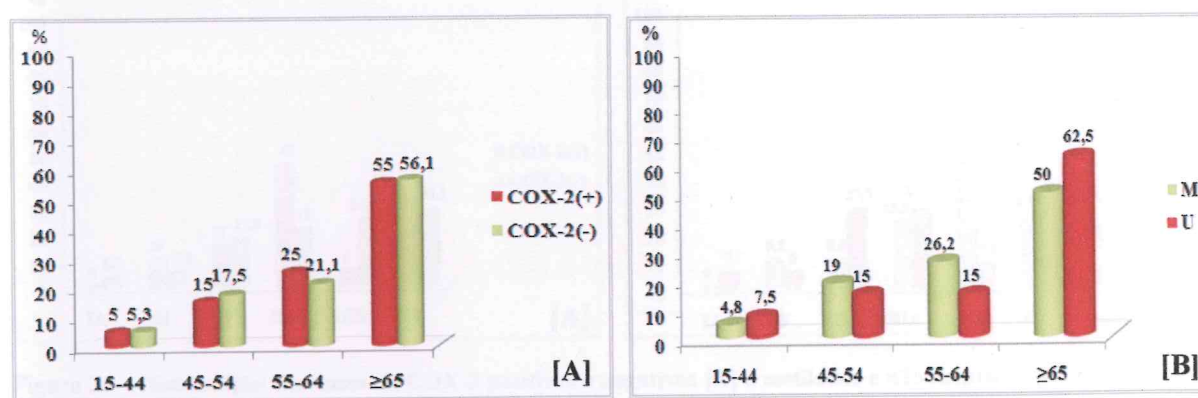


Figura 34 – Frequências dos casos positivos e negativos de COX-2 [A] e metilados e não metilados [B] de acordo com a faixa etária. M – Metilado; U – Não-metilado.

De acordo com o tamanho do tumor primário é possível observar pela figura 35A que diferente dos tumores T1-T3, nos tumores T4, a positividade de COX-2 foi mais frequente, apesar de não ser estatisticamente significante ($p=0,069$). Quando se observa a distribuição dos casos considerando o *status* de metilação desse gene (Figura 35B) é notado que uma frequência estaticamente significativa ($p= 0,026$) de casos metilados de *COX-2* foi detectada nos tumores T3. Ao avaliar o comprometimento de linfonodos regionais, é possível verificar

que (Figura 35A e B) os tumores N0 e N1 apresentaram maior frequência de casos COX-2 positivos e também maior frequência de casos não-metilados para esse gene, contudo, os tumores N2 e N3 foram predominantemente negativos para a expressão de COX-2 e apresentaram similar frequência de casos metilados.

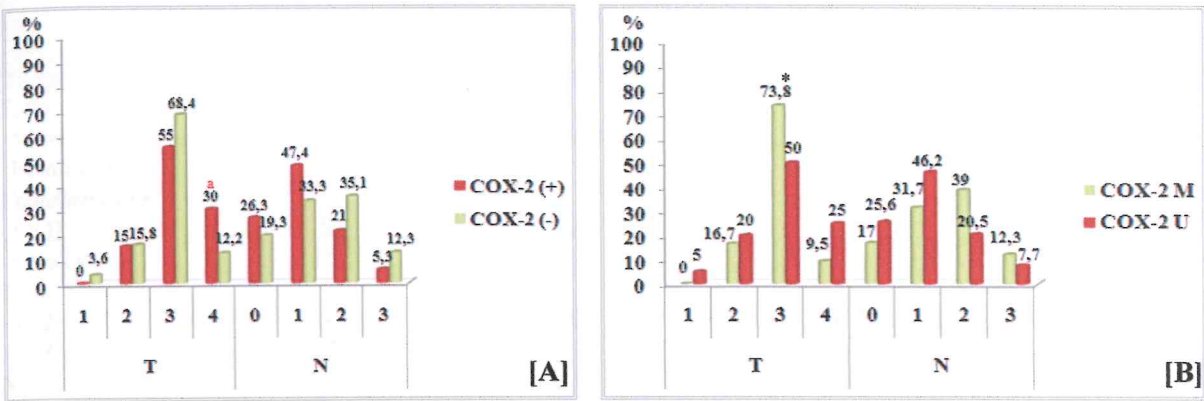


Figura 35 – Distribuição dos casos positivos e negativos de COX-2 e metilados e não-metilados de acordo com o tumor primário e comprometimento de linfonodos regionais. * $p=0,069$, * $p=0,026$. M – Metilado; U – Não-metilado.

Considerando a distribuição dos casos de COX-2 de acordo com o estadiamento tumoral é possível observar pela figura 36 [A-B] que existe um aumento gradativo da negatividade de COX-2 e de casos metilados de acordo com o grau de disseminação do tumor, apesar de não ser estatisticamente significativo.

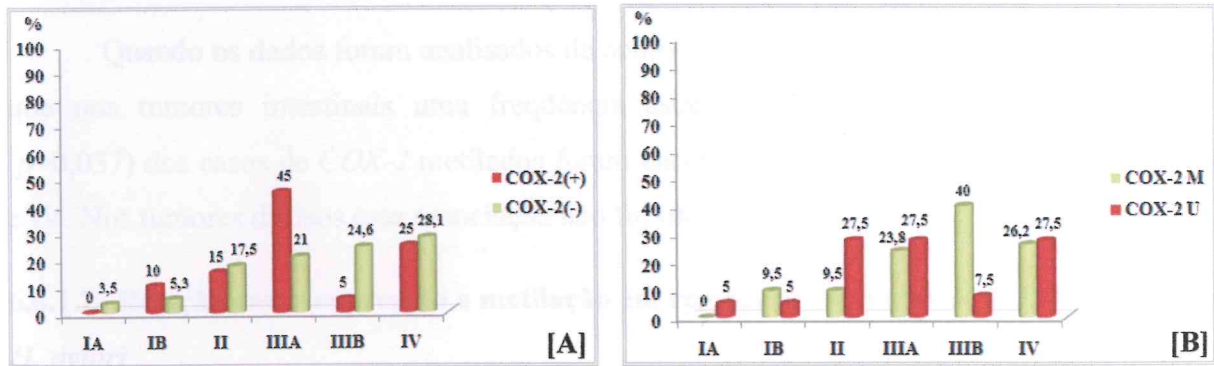


Figura 36 – Distribuição dos casos de COX-2 positivos e negativos [A] e metilados e não metilados [B] de acordo com o estadiamento tumoral. M – Metilado; U – Não-metilado.

A tabela 13 mostra a distribuição dos casos de acordo com o sexo, subtipo histológico e localização do tumor, e os parâmetros clinicopatológicos agrupados. Nenhuma relação foi observada entre a expressão de COX-2 e sexo, subtipo histológico e localização do tumor. Também não se observou nenhuma diferença na expressão de COX-2 quando os estadiamentos foram agrupados em estádios iniciais e avançados e os tumores divididos em duas categorias de acordo com a extensão local do tumor e comprometimento linfonodal.

Assim como a expressão, a metilação em regiões promotoras do gene *COX-2* também não foi associada com os parâmetros citados (Tabela 13).

Tabela 13 – Distribuição dos casos de imunomarcacão e metilação do gene *COX-2* de acordo com parâmetros clínicos e histopatológicos.

	<i>COX-2</i>							
	(+)	Imunomarcacão (-)	<i>p</i> -valor	Total	M	Metilação U	<i>p</i> -valor	Total
<i>Sexo</i>								
Masculino	12	37	0,694	49	26	26	0,771	52
Feminino	8	20		28	16	14		30
<i>Estadiamento</i>								
I e II	5	15	0,908	20	8	15	0,063	23
III e IV	15	42		57	34	25		59
<i>T</i>								
1+2	3	11	1,000	14	7	10	0,352	17
3+4	17	46		63	35	30		65
<i>N</i>								
0	5	11	0,589	16	7	10	0,352	17
1-3	15	46		61	34	29		63
X	-	-	-		1	1	-	2
<i>Subtipo histológico</i>								
Intestinal	13	37	0,994	50	24	28	0,227	52
Difuso	7	20		27	18	12		30
<i>Localização</i>								
Cárdia	4	13	1,000	17	9	9	0,907	18
Não-cárdia	16	44		60	33	31		64
TOTAL	20	57	-	77	42	40	-	82

X – Não foi possível avaliar. M – Metilado; U – Não-metilado.

Quando os dados foram analisados de acordo com o subtipo histológico foi observado que nos tumores intestinais uma frequência estatisticamente significativa (83%; 20/24) ($p=0,037$) dos casos de *COX-2* metilados foram encontrados nos tumores de estadiamento III e IV. Nos tumores difusos essa associação não foi observada.

6.6.1.2- Relação entre expressão e metilação em regiões promotoras de *COX-2* e genes de *H. pylori*

A tabela 14 mostra a distribuição dos casos de expressão e metilação em promotor de *COX-2* de acordo com os genes de *H. pylori* estudados. Nenhuma diferença entre imunomarcacão de *COX-2* e os genes de *H. pylori* estudados, isolados ou combinados, foi observada. Com relação ao *status* de metilação de *COX-2*, as cepas de *H. pylori* portadoras de *vacA* s1 foram significativamente ($p=0,028$) associadas com tumores metilados (Tabela 14), apesar de o alelo *vacA*s1m1 não ter sido relacionado com metilação de *COX-2*.

Tabela 14 – Relação entre expressão e metilação do promotor do gene *COX-2* e genes de patogenicidade de *H. pylori* estudados.

	COX-2							
	Imunomarcacão		p-valor	Total	Metilacão		p-valor	Total
	(+)	(-)			M	U		
cagA								
+	11	31	0,788	42	21	26	0,380	47
-	9	22		31	17	14		31
vacA								
s1m1	13	40	0,542	53	30	25	0,200	55
s1m2/s2m1	4	10	0,864	14	7	8	0,773	15
s2m2	2	2	0,289	4	1	5	0,200	6
S/A	1	1	-	2	0	2	-	2
s1								
+	16	49	0,332	65	37	31	0,028	68
-	3	3		6	1	7		8
S/A	1	1	-	2	0	2	-	2
m1								
+	14	41	0,645	55	30	27	0,427	57
-	5	11		16	8	11		19
S/A	1	1	-	2	0	2	-	2
Total	20	53	-	73	38	40	-	78
cagE								
+	8	20	0,905	28	15	14	0,402	29
-	9	21		30	14	20		34
virB11								
+	12	20	0,128	32	15	19	0,741	34
-	5	21		26	14	15		29
flaA								
+	11	27	0,933	38	15	24	0,124	39
-	6	14		20	14	10		24
Todos genes*								
+	5	11	0,841	16	6	11	0,299	17
-	12	30		42	23	23		46
Total	17	41	-	58	29	34	-	63

M- Metilado; U – Não-metilado; S/A- Sem amplificaco; *vacAs1m1+cagA+cagE+virB11+flaA.

Adicionalmente, ao avaliar a associao dos casos com concomitância entre presença de metilaco e ausência de expressão de *COX-2* com os genes de *H. pylori* foi observado que todos esses casos eram significativamente associados ($p=0,026$) s cepas de *H. pylori* portadoras do alelo vacAs1 (34/34).

6.6.2- HMLH1

6.6.2.1- Relação entre imunomarcacão e metilação em regiões promotoras do gene *HMLH1* e parâmetros clinicopatológicos

A distribuição dos casos de expressão e metilação no promotor de *HMLH1* de acordo com a faixa etária (Figura 37 A e B) foi similar ao observado para os casos de COX-2. Houve um aumento da negatividade de HMLH1 e dos casos metilados com a progressão da idade dos pacientes, o que reflete a distribuição da amostra estudada.

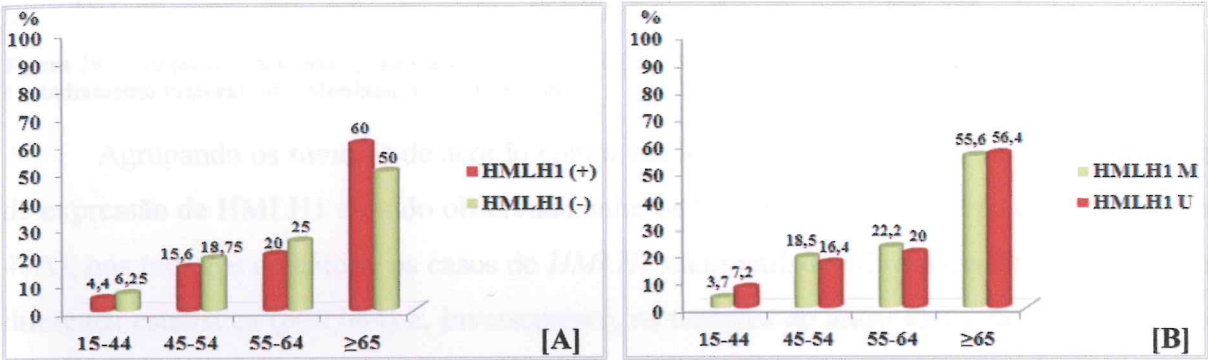


Figura 37 – Frequência dos casos de positivos e negativos de HMLH1 [A] e metilados e não-metilados [B] de acordo com a faixa etária. M – Metilado; U – Não-metilado.

Não houve diferença quanto à frequência de expressão da enzima HMLH1 de acordo com a extensão local do tumor primário ou presença de comprometimento de linfonodos regionais. O mesmo ocorreu quando os dados do *status* de metilação em região promotora de *HMLH1* foram distribuídos considerando esses dois parâmetros (Figura 38 A e B).

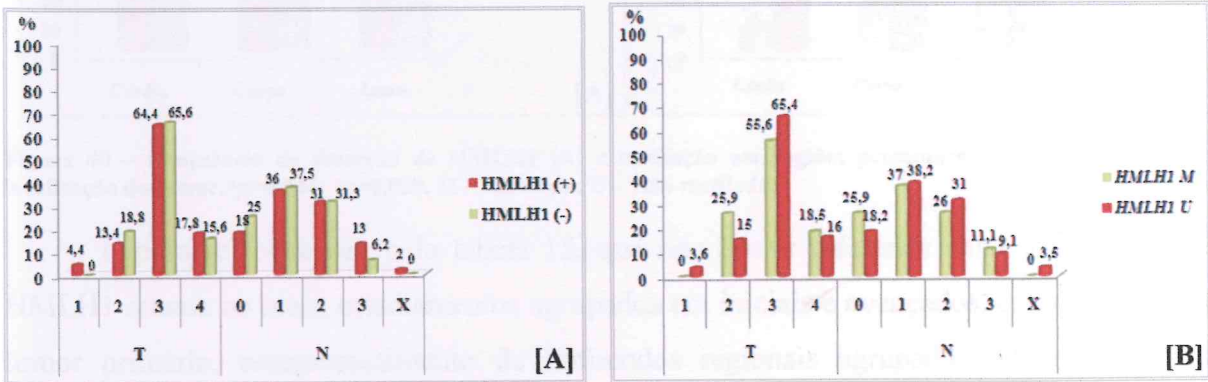


Figura 38 – Frequência dos casos positivos e negativos de HMLH1 [A] e metilados e não-metilados [B] de acordo com tamanho do tumor primário e comprometimento de linfonodos regionais. M – Metilado; U – Não-metilado.

Quando os dados de expressão e metilação em região promotora de *HMLH1* foram distribuídos de acordo com o estadiamento (Figura 39 A e B) observou-se que os casos de HMLH1 negativos e metilados foram mais frequentes nos estádios iniciais (IB-II) do tumor

quando comparado com os casos positivos e não-metilados e constantes nos estádios mais avançados (IIIA-IV).

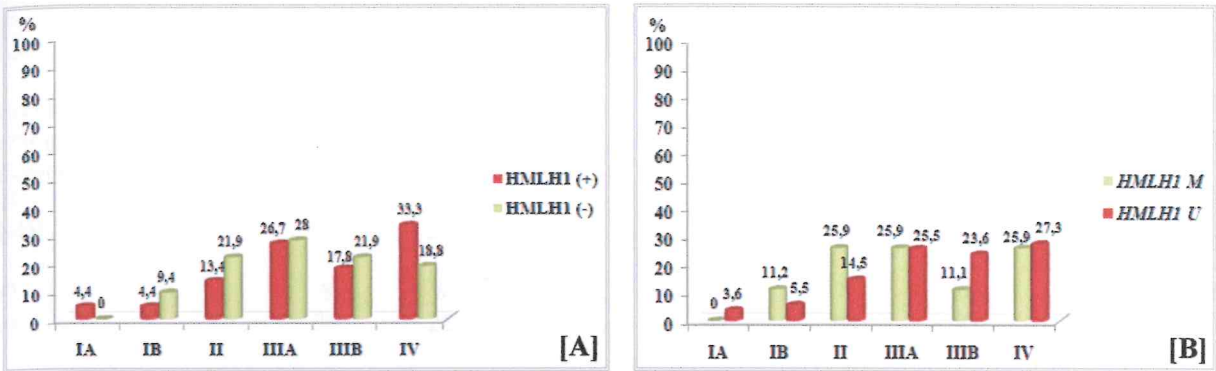


Figura 39 – Frequência dos casos positivos e negativos de HMLH1 [A] e metilados e não metilados [B] de acordo com o estadiamento tumoral. M – Metilado; U – Não-metilado.

Agrupando os tumores de acordo com a sua localização, apesar de nenhuma diferença de expressão de HMLH1 ter sido observada entre os três sítios (cárdia, corpo e antro) (Figura 40A), nos tumores da cárdia, os casos de *HMLH1* não-metilados foram mais frequentes, com diferença estatística ($p=0,044$) e, inversamente, os tumores do antro foram significativamente (77,8%; $p=0,029$) metilados, como mostrado na figura 40B.

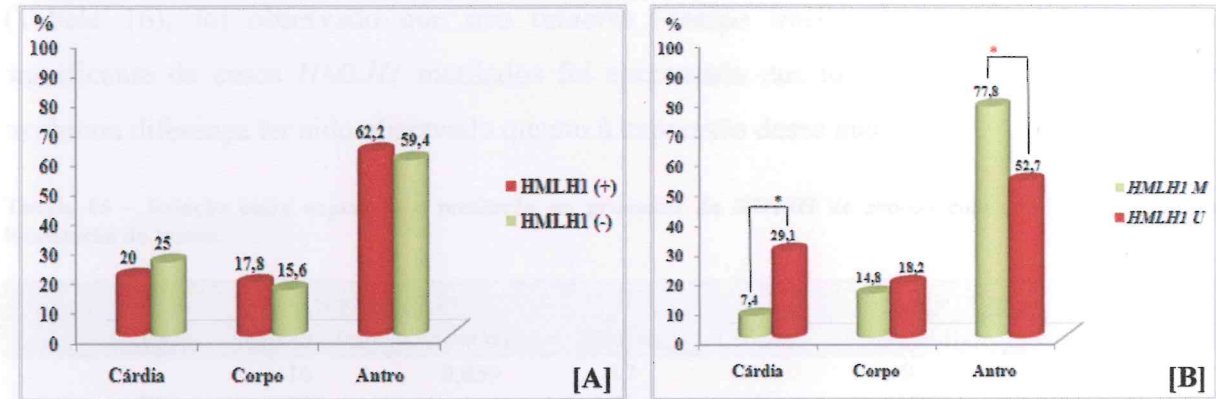


Figura 40 – Frequência de detecção de HMLH1 [A] e metilação em regiões promotoras [B] de acordo com a localização do tumor. * $p=0,044$; * $p=0,029$. M – Metilado; U – Não-metilado.

É possível observar, pela tabela 15, que não houve diferença entre a expressão de HMLH1 quanto ao sexo, estadiamentos agrupados em iniciais e avançados, extensão local do tumor primário, comprometimento de linfonodos regionais agrupados, além de subtipo histológico. O mesmo foi observado quando o *status* de metilação em região promotora do gene *HMLH1* foi avaliado de acordo com os parâmetros acima. Contudo, entre os casos *HMLH1* metilados, *HMLH1* metilado foi mais frequente (92,6%; 25/27; $p=0,044$) entre os tumores não-cárdia (Corpo e antro) quando comparado aos tumores da região da cárdia.

Tabela 15 – Relação entre expressão e metilação em regiões promotoras de *HMLH1* e parâmetros clínicos e histopatológicos.

	<i>HMLH1</i>							
	Imunomarcacão				Metilação			
	(+)	(-)	<i>p</i> -valor	Total	M	U	<i>p</i> -valor	Total
<i>sexo</i>								
Masculino	29	20	0,861	49	16	36	0,584	52
Feminino	16	12		28	11	19		30
<i>stadiamento</i>								
I+II	10	10	0,373	20	10	13	0,204	23
III+IV	35	22		57	17	42		59
1+2	8	6	0,913	14	7	10	0,416	17
3+4	37	26		63	20	45		65
0	8	8	0,441	16	7	10	0,416	17
1-3	37	24		61	20	45		65
<i>subtipo histológico</i>								
Intestinal	29	21	0,915	50	17	35	0,953	52
Difuso	16	11		27	10	20		30
<i>localização do tumor</i>								
Cárdia	9	8	0,602	17	2	16	0,044	18
Não-cárdia	36	24		60	25	39		64
OTAL	45	32	-	77	27	55	-	82

M - Metilado; U - Não-metilado.

Ao analisar os tumores de acordo com o subtipo histológico e localização do tumor (Tabela 16), foi observado que nos tumores subtipo intestinal, uma frequência maior significativa de casos *HMLH1* metilados foi encontrada nos tumores não-cárdia, apesar de nenhuma diferença ter sido observado quanto à expressão desse marcador.

Tabela 16 – Relação entre expressão e metilação no promotor de *HMLH1* de acordo com subtipo histológico e localização do tumor.

	INTESTINAL				DIFUSO			
	Cárdia	Não-cárdia	<i>p</i> -valor	TOTAL	Cárdia	Não-cárdia	<i>p</i> -valor	TOTAL
I	1	16	0,039	17	1	9	0,640	10
	12	23		35	4	16		20
OTAL	13	39	-	52	5	25	-	30
ositivo	7	22	0,724	29	2	14	1,000	16
egativo	6	15		21	2	9		11
OTAL	13	37	-	50	4	23	-	27

M – Metilado; U – Não-metilado.

Quando apenas os casos *HMLH1* negativos foram considerados de acordo com o subtipo histológico e localização do tumor (Tabela 17), foi observado que nos tumores intestinais, não cárdia, a via de inativação do gene *HMLH1* foi predominantemente por metilação. O mesmo não foi observado nos tumores subtipo difuso.

Tabela 17 - Relação entre inativação de HMLH1 e subtipo histológico e localização do tumor.

	INTESTINAL				DIFUSO			
	M	U	p-valor	HMLH1 negativo		M	U	p-valor
				TOTAL	M			TOTAL
Cárdia	1	5	0,006	6	1	1	0,491	2
Não-cárdia	13	2		15	7	2		9
TOTAL	14	7	-	21	8	3	-	11

M – Metilado; U – Não-metilado

6.6.2.2- Relação entre expressão e metilação em regiões promotoras de *HMLH1* e genes de *H. pylori*.

Ao avaliar a distribuição dos casos de acordo com os genes de *H. pylori*, foi observado uma associação significativa ($p=0,047$), assim como encontrado para o gene *COX-2*, entre presença do alelo s1 de *vacA* e tumores *HMLH1* metilados. Também, é interessante notar que todos os seis casos *vacAs2m2* foram encontrados nos tumores não-metilados (Tabela 18), contudo sem significância estatística ($p=0,087$).

Tabela 18 – Relação entre imunomarcação e metilação do promotor de *HMLH1* e genes de *H. pylori*.

	HMLH1							
	Imunomarcação				Metilação			
	(+)	(-)	p-valor	Total	M	U	p-valor	Total
<i>cagA</i>								
+	24	18	0,937	42	15	32	0,537	47
-	18	13		31	12	19		31
<i>vacA</i>								
s1m1	32	21	0,785	53	20	35	0,616	55
s1m2/s2m1	8	6	0,864	14	5	10	0,908	15
s2m2	2	2	1,000	4	0	6	0,087	6
S/A	0	2	-	2	2	0	-	2
 s1								
+	38	27	1,000	65	25	43	0,047	68
-	4	2		6	0	8		8
S/A	0	2	-	2	2	0	-	2
 m1								
+	34	21	0,397	55	20	37	0,481	57
-	8	8		16	5	14		19
S/A	0	2	-	2	2	0		2
Total	42	31	-	73	27	51	-	78
<i>cagE</i>								
+	16	12	0,825	28	12	17	0,129	29
-	18	12		30	8	26		34
<i>virB11</i>								
+	17	15	0,346	32	14	20	0,082	34
-	17	9		26	6	23		29
<i>flaA</i>								
+	24	14	0,334	38	15	24	0,144	39
-	10	10		20	5	19		24
Todos genes*								
+	9	7	0,821	16	8	9	0,112	17
-	25	17		42	12	34		46
Total	34	24	-	58	20	43	-	63

M- Metilado; U – Não-metilado; S/A- Sem amplificação; **vacA*s1m1+*cagA*+*cagE*+*virB11*+*flaA*.

6.6.3- *CDKN2A* (p16^{INK4A})

6.6.3.1- Relação entre imunomarcação e metilação no promotor do gene *CDKN2A* e parâmetros clinicopatológicos.

A distribuição dos casos de imunomarcação de p16^{INK4A} de acordo com a faixa etária mostrou que a negatividade de p16^{INK4A} foi predominante em todas as faixas etárias, com exceção da faixa de pacientes maiores de 65 anos de idade, que apresentou maior frequência de casos positivos (Figura 41A). Os casos metilados de *CDKN2A* foram ligeiramente mais frequentes nas faixas etárias 15-44 e 45-54 anos e nas demais faixas uma frequência similar de casos metilados e não-metilados foi observada (Figura 41B).

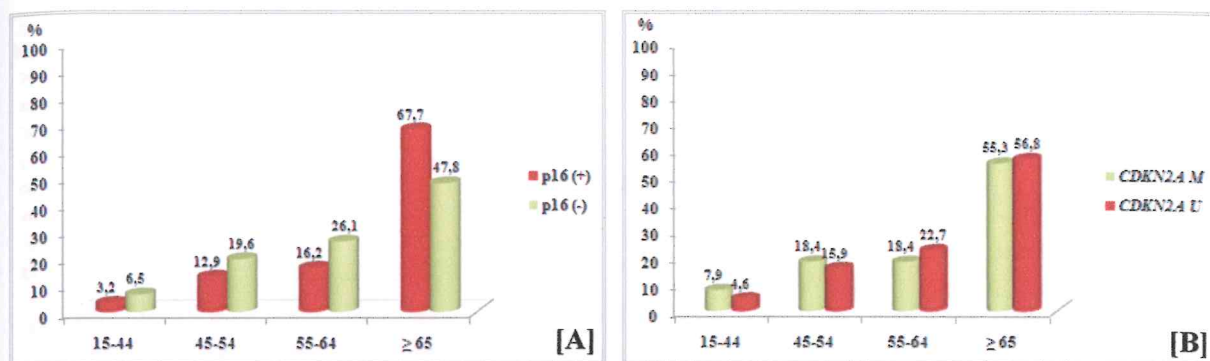


Figura 41 – Frequência dos casos positivos e negativos de p16^{INK4A} [A] e metilados e não-metilados [B] de acordo com a faixa etária. M – Metilado; U – Não-metilado.

A análise de expressão de p16^{INK4A} de acordo com a infiltração local na parede gástrica mostrou que (Figura 42A) a negatividade de p16^{INK4A} foi ligeiramente mais freqüente nos tumores T2 e T3. Nos tumores T1 apenas a positividade foi observada, contudo somente dois casos pertencem ao tamanho T1. Nos casos com ausência de comprometimento de linfonodos regionais (N0) e nos tumores N3 a positividade de p16^{INK4A} foi predominante, enquanto que em tumores N1 e N2 a negatividade foi mais freqüente, contudo sem diferença estatística. Essa mesma distribuição não foi observada quando se analisou o *status* de metilação de *CDKN2A* de acordo com esses parâmetros, como mostrado na figura 42B.

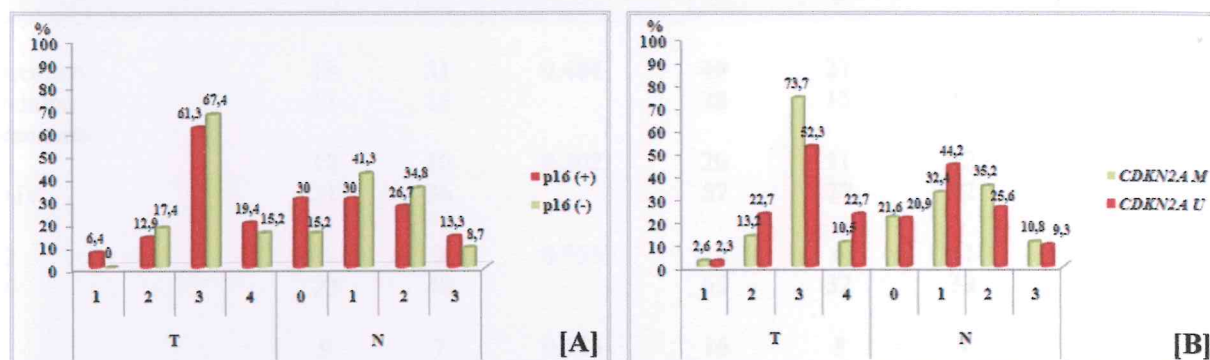


Figura 42 – Frequência de casos positivos e negativos de p16^{INK4A} [A] e metilados e não-metilados [B] de acordo com o tamanho do tumor primário e comprometimento de linfonodos regionais. M – Metilado; U – Não-metilado.

Quando os dados de p16^{INK4A} foram distribuídos de acordo com o estadiamento tumoral, observou-se que as freqüências de casos positivos e negativos de p16^{INK4A} (Figura 43A) e metilados e não-metilados de *CDKN2A* (Figura 43B) foram semelhantes nos estádios iniciais mas os padrões variaram de acordo com o aumento da malignidade.

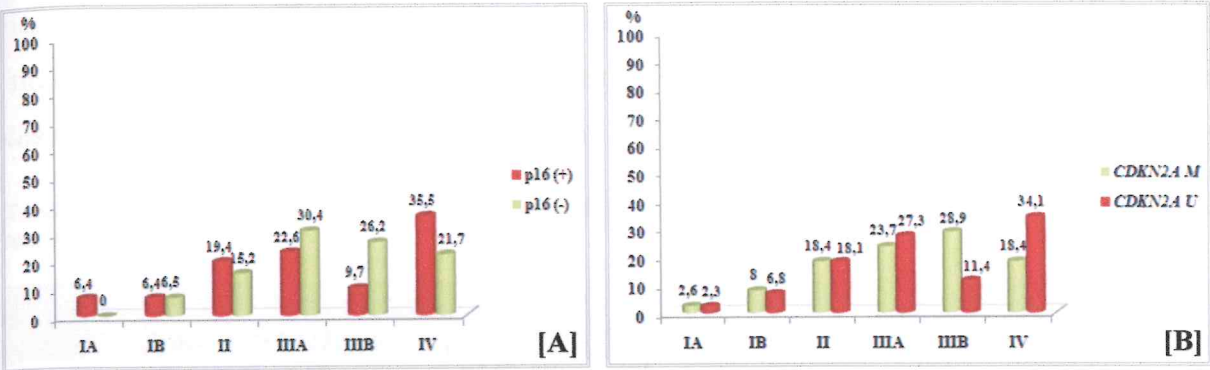


Figura 43 – Frequências dos casos positivos e negativos de p16^{INK4A} [A] e metilados e não metilados [B] de acordo com o estadiamento tumoral. M – Metilado; U – Não-metilado.

A tabela 19 mostra a distribuição dos casos de p16^{INK4A} de acordo com os parâmetros clinicopatológicos agrupados. Por essa tabela é possível observar que existe uma frequência significativamente maior (82%; $p=0,031$) de casos p16^{INK4A} negativos nos tumores da cárdia quando comparado aos tumores não-cárdia, apesar da existência de frequências similares de metilação de p16^{INK4A} em ambos os sítios dos tumores.

Tabela 19 - Relação entre imunomarcação e metilação de CDKN2A de acordo com parâmetros clinicopatológicos.

	CDKN2A (p16 ^{INK4A})				Metilação			
	Imunomarcação		p-valor	Total	Metilação		p-valor	Total
	(+)	(-)			M	U		
Sexo								
Masculino	18	31	0,404	49	23	29	0,614	52
Feminino	13	15		28	15	15		30
Estadiamento								
I+II	10	10	0,302	20	11	12	0,866	23
III+IV	21	36		57	27	32		59
1+2	5	9	0,955	14	6	11	0,305	17
3+4	23	40		63	32	33		65
0	9	7	0,143	16	8	9	0,940	17
1-3	22	39		61	29	34		63
X	-	-	-	-	1	1	-	2
Subtipo histológico								
Intestinal	19	31	0,582	50	25	27	0,678	52
Difuso	12	15		27	13	17		30
Localização do tumor								
Cárdia	3	14	0,031	17	9	9	0,725	18
Não-cárdia	28	32		60	29	35		64
TOTAL	31	46	-	77	38	44	-	82

X – Não foi possível avaliar; M - Metilado; U - Não-metilado.

Apesar de nenhuma diferença ter sido observada (Tabela 19) entre os tumores subtipo intestinal e difuso com relação à frequência de casos p16^{INK4A} negativos e o status de metilação em promotor de CDKN2A, quando os casos foram analisados concomitantemente de acordo com o subtipo histológico e localização do tumor foi observado que a associação de

negatividade de p16^{INK4A} com os tumores da cárdia é característica dos tumores subtipo intestinal, uma vez que nestes tumores houve uma forte tendência (85%; 11/13; $p=0,051$) dos casos p16^{INK4A} negativos serem localizados na cárdia (Tabela 20).

Tabela 20 – Relação entre expressão e metilação de *CDKN2A* de acordo com o subtipo histológico e localização do tumor.

	INTESTINAL				DIFUSO			
	Cárdia	Não-cárdia	p-valor	TOTAL	Cárdia	Não-cárdia	p-valor	TOTAL
M	8	17	0,262	25	1	12	0,355	13
U	5	22		27	4	13		17
TOTAL	13	39	-	52	5	25	-	30
Positivo	2	17	0,051	19	1	11	0,605	12
Negativo	11	20		31	3	12		15
TOTAL	13	37	-	50	4	23	-	27

M- Metilado; U- Não-metilado.

A tabela 21 sumariza a distribuição dos casos p16^{INK4A} negativos nos tumores subtipo intestinal e difuso, considerando a localização do tumor e *status* de metilação no promotor de *CDKN2A*. Esta tabela mostra que nos tumores subtipo difuso, a metilação no promotor de *CDKN2A* foi uma alteração epigenética relevante ($p=0,022$) para inativação de p16^{INK4A} nos tumores de localização não-cárdia, embora nenhuma diferença significativa tenha sido observada nos casos p16^{INK4A} negativos de acordo com a localização (Tabela 20). Por outro lado, nos tumores intestinais, nenhuma diferença foi encontrada com relação ao padrão de metilação no promotor de *CDKN2A*.

Tabela 21 - Distribuição dos casos p16^{INK4A} negativos de acordo com subtipo histológico, *status* de metilação e localização do tumor.

	INTESTINAL				DIFUSO			
	p16 ^{INK4A} (-)							
	M	U	p-valor	TOTAL	M	U	p-valor	TOTAL
Cárdia	8	3	0,873	11	0	3	0,022	3
Não-cárdia	14	6		20	10	2		12
TOTAL	22	9	-	31	10	5	-	15

M – Metilado; U – Não-metilado.

6.6.3.2- Relação entre expressão e metilação no promotor de *CDKN2A* e genes de *H. pylori*.

A distribuição dos casos considerando a expressão de p16^{INK4A} e *status* de metilação no promotor de *CDKN2A*, de acordo com genes de *H. pylori* estudados, é mostrada na tabela 22. Nenhuma relação foi observada entre genes de *H. pylori*, isolados ou em associação, com a negatividade de p16^{INK4A}. Por outro lado, considerando o *status* de metilação no promotor de *CDKN2A*, foi observada uma frequência significativa ($p=0,017$) de tumores não-metilados

associados às cepas de *H. pylori* *flaA*(+). Adicionalmente, cepas de *H. pylori* *cagA*(+) ou *vacAs1m1*(+) mas sem *flaA* foram associadas com tumores metilados ($p=0,022$ e $p=0,003$, respectivamente) (Figura 44).

Tabela 22 – Distribuição dos casos de imunomarcacão e metilação em promotor de *CDKN2A* de acordo com os genes de *H. pylori* estudados.

	p16 ^{INK4A}			p-valor	CDKN2A			
	(+)	(-)	Total		M	U	Total	p-valor
<i>cagA</i>								
+	18	24	42	0,937	19	28	47	0,331
-	13	18	31		16	15	31	
<i>vacA</i>								
s1m1	22	31	53	0,828	26	29	55	0,472
s1m2/s2m1	5	9	14	0,580	6	9	15	0,680
s2m2	3	1	4	0,304	2	4	6	0,686
S/A	1	1	2	-	1	1	2	-
<i>sl</i>								
+	25	40	65	0,076	32	36	68	0,285
-	5	1	6		2	6	8	
S/A	1	1	2	-	1	1	2	-
<i>m1</i>								
+	24	31	55	0,662	26	31	57	0,790
-	6	10	16		8	11	19	
S/A	1	1	2	-	1	1	2	-
Total	31	42	73	-	35	43	78	-
<i>cagE</i>								
+	12	16	28	0,771	10	19	29	0,312
-	14	16	30		16	18	34	
<i>virB11</i>								
+	14	18	32	0,855	14	20	34	0,987
-	12	14	26		12	17	29	
<i>flaA</i>								
+	19	21	40	0,393	12	28	40	0,017
-	7	11	18		14	9	23	
Todos genes*								
+	8	9	17	0,826	4	13	17	0,082
-	18	23	41		22	24	46	
Total	26	32	58	-	26	37	63	-

M- Metilado; U – Não-metilado; S/A- Sem amplificação; **vacAs1m1+cagA+cagE+virB11+flaA*.

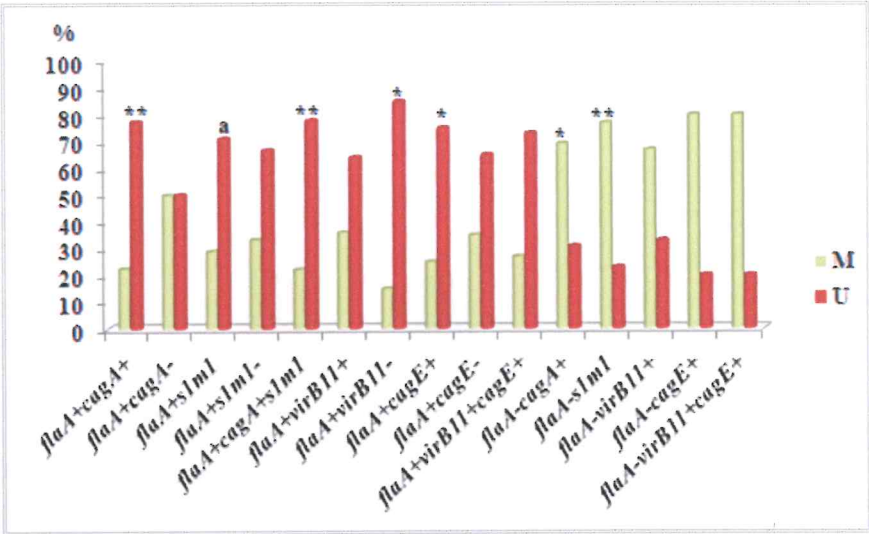


Figura 44 – Distribuição dos casos de metilação em promotor de *CDKN2A* de acordo com genes combinados de *H. pylori*. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; ^a $p=0,052$. M- metilado; U- Não-metilado.

O estudo da expressão e *status* de metilação no promotor de *CDKN2A* associado com genótipo de *H. pylori*, de acordo com parâmetros clinicopatológicos, gerou uma publicação, que se encontra em anexo (Anexo IV).

6.7- ANÁLISE COMBINADA DOS MARCADORES

Para verificar a densidade de metilação em ilhas CpG em amostras de adenocarcinomas gástricos quanto aos genes estudados, os casos foram agrupados de acordo com o número de genes metilados (Grupo 0, 1, 2, e 3). A figura 45 mostra a freqüência dos grupos estudados. É possível observar que o grupo com dois genes metilados foi mais freqüente, sendo a combinação *COX-2/CDKN2A* a predominante (Figura 46) e o grupo com todos os três genes metilados foi menos freqüente.

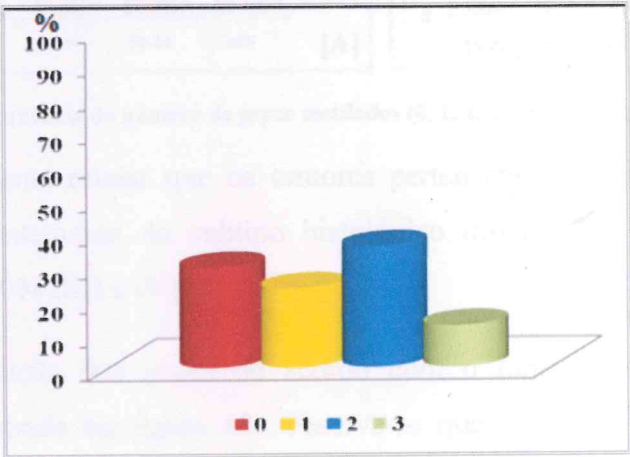


Figura 45 – Freqüência dos grupos de genes metilados (0, 1, 2 e 3).

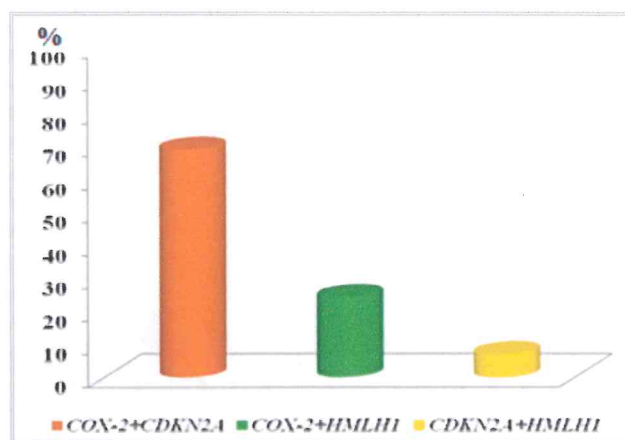


Figura 46 – Distribuição da combinação dos dois genes metilados.

Como a metilação é um fenômeno epigenético que tem relação com a idade, os casos foram distribuídos de acordo com a faixa etária. Observa-se pela figura 47 [A e B] que nos indivíduos mais jovens existe uma frequência relevante de dois genes metilados, como também a ausência de metilação no promotor dos genes estudados. Nas outras faixas etárias todos os grupos estão representados. Quando foi analisada a combinação dos dois genes estudados de acordo com a faixa etária verificou-se que o gene *CDKN2A* foi o mais frequentemente metilado na faixa etária entre 15-44 anos, associado com a *COX-2* (preferencialmente) ou com *HMLH1*.

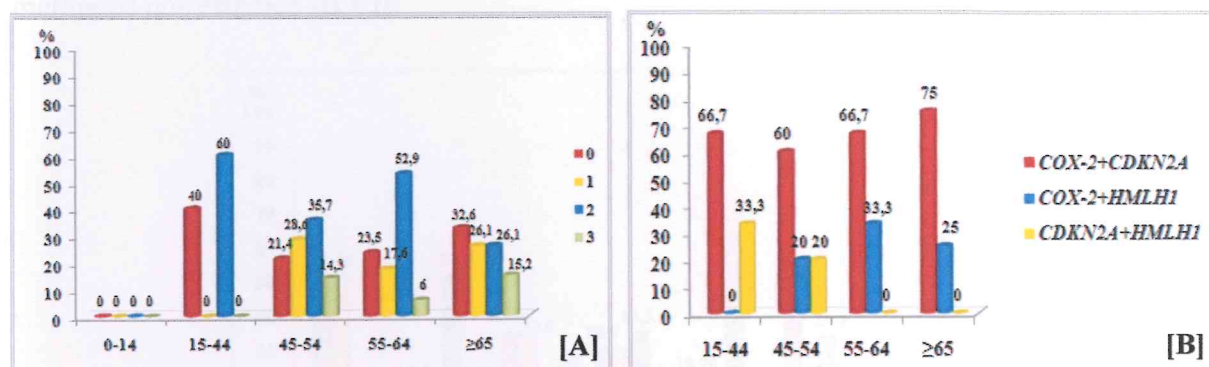


Figura 47 – Frequência do número de genes metilados (0, 1, 2, 3) de acordo com a faixa etária.

É interessante relatar que os tumores pertencentes à faixa etária entre 15-44 anos foram predominantemente do subtipo histológico difuso (4/5; 80%) e de estágios mais avançados (4/5; 80% IIIB e IV).

A distribuição dos genes de acordo com o tumor primário e comprometimento linfonodal é mostrada na figura 48. Observa-se que o estágio T2 do tumor primário foi associado significativamente ($p=0,017$) com a presença de apenas um gene metilado, enquanto que o estágio T3 foi relacionado com dois genes metilados ($p=0,005$).

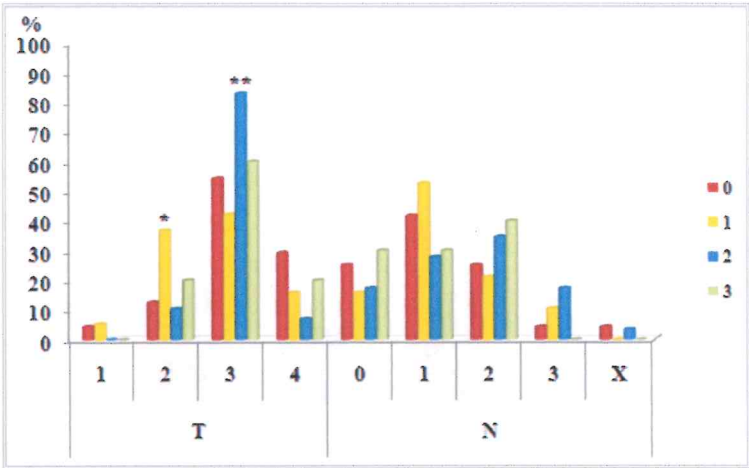


Figura 48 – Distribuição do número de genes metilados de acordo com o tamanho do tumor primário (T) e comprometimento de linfonodos (N). * $p=0,017$; ** $p=0,005$.

A análise dos casos de acordo com o estadiamento tumoral permitiu verificar que (Figura 49), exceto o estadiamento IA, que possui apenas dois casos, em cada estágio existe uma representatividade de todos os grupos de metilação de genes estudados (0, 1, 2, 3). Em todos os estádios a frequência de dois genes metilados foi mais freqüente, com exceção do estadiamento II. É interessante notar que a presença de três genes metilados é mais freqüente nos estádios iniciais e diminui nos estádios mais avançados (IIIA–IV). Vale lembrar que, dos três genes estudados, o gene *HMLH1* foi o que apresentou maior frequência de casos metilados nos estádios IB a II.

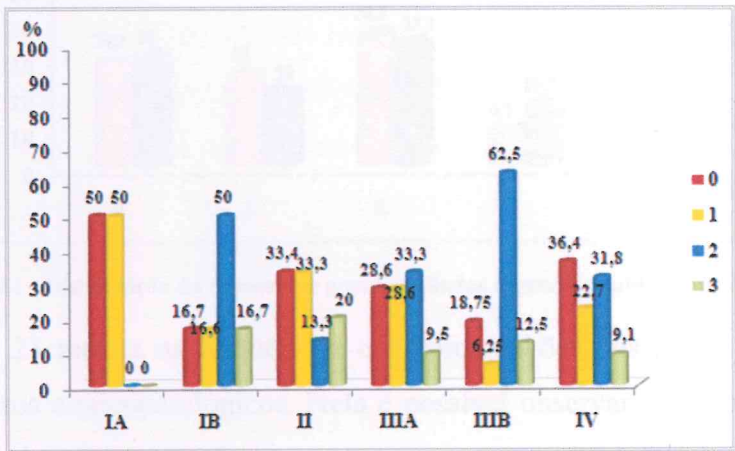


Figura 49 – Freqüência de número de genes metilados de acordo com o estadiamento tumoral.

Com relação à localização do tumor, a presença de três genes metilados foi mais freqüente no antro, porém ausente na cárdia (Figura 50). Pelas análises específicas de cada gene, verificou-se que apesar do gene *HMLH1* apresentar a menor frequência de metilação, ele foi significativamente mais metilado nos tumores do antro, sendo também significativamente menos freqüente na cárdia (Figura 40B).

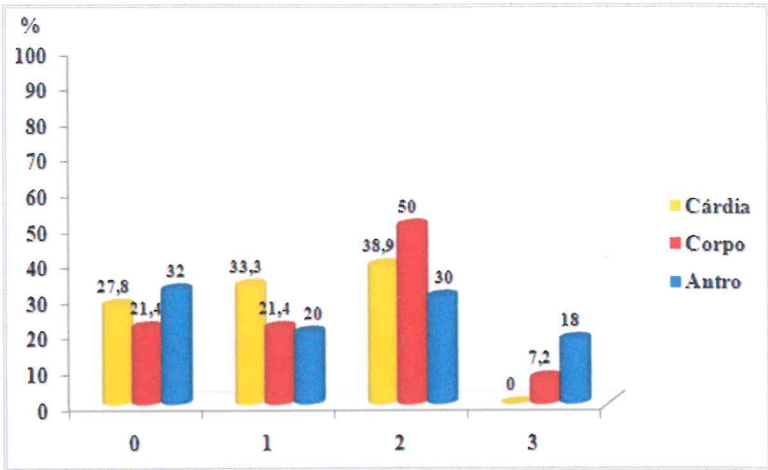


Figura 50 – Frequência do número de genes metilados de acordo com a localização do tumor.

De acordo com o subtipo histológico, é possível observar pela figura 51 que a presença de três genes metilados foi discretamente mais freqüente nos tumores difusos. Por outro lado, a ausência de genes metilados, a presença de apenas um ou dois genes metilados apresentaram freqüências similares entre os tumores intestinais e difusos.

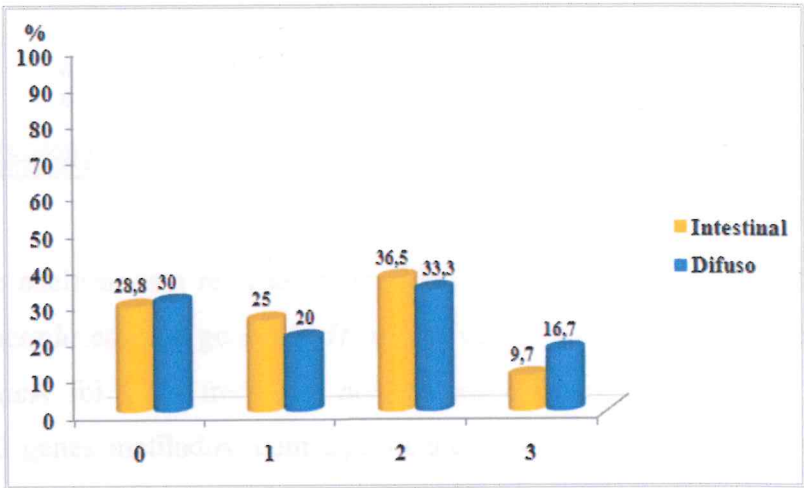


Figura 51 - Distribuição do número de genes metilados segundo o subtipo histológico.

A tabela 23 mostra as freqüências das combinações dos genes metilados de acordo com os parâmetros clinicopatológicos. Nela é possível observar que a combinação *COX-2* e *CDKN2A* metilados foi mais freqüente em pessoas mais velhas e em tumores T3. É importante lembrar que, como observado anteriormente, o gene *COX-2* metilado foi mais freqüente nos tumores T3 e, portanto o achado na tabela reflete com qual gene *COX-2* metilado está associado. Adicionalmente, a presença *CDKN2A/HMLH1* metilados foram mais freqüentes ($p=0,002$) no estadiamento II, contudo apenas dois casos pertencem a esse grupo. Quando agrupamos os estadiamentos em iniciais e avançados foi observado que os genes *CDKN2A/HMLH1* metilados foram relacionados aos estádios iniciais (I+II) ($p=0,025$).

Tabela 23 – Distribuição das combinações dos dois genes metilados de acordo com parâmetros clínicos e patológicos.

	<i>COX-2/</i> <i>CDKN2A</i>	<i>p</i> -valor	<i>COX-2/</i> <i>HMLH1</i>	<i>p</i> -valor	<i>CDKN2A/</i> <i>HMLH1</i>	<i>p</i> -valor	TOTAL
≤60	7	0,226	4	0,667	2	0,192	13
>60	13		3		0		16
T							
1	0	-	0	-	0	-	0
2	2	1,000	1	1,000	0	1,000	3
3	17	0,633	5	0,569	2	1,000	24
4	1	0,532	1	0,431	0	1,000	2
N							
0	2	0,287	2	0,569	1	0,320	5
1	5	0,675	2	1,000	1	0,483	8
2	8	0,431	2	1,000	0	0,532	10
3	4	1,000	1	1,000	0	1,000	5
X	1	-	0	-	0	-	1
Estadiamento							
IA	0	-	0	-	0	-	0
IB	2	1,000	1	1,000	0	1,000	3
II	0	0,089	0	1,000	2	0,002	2
IIIA	5	1,000	2	1,000	0	1,000	7
IIIB	9	0,107	1	0,367	0	0,532	10
IV	4	0,642	3	0,311	0	1,000	7
Lauren							
Intestinal	13	1,000	4	0,665	2	0,532	19
Difuso	7		3		0		10
Sítio							
Cárdia	6	0,382	1	0,646	0	1,000	7
Corpo	6	0,382	1	0,646	0	1,000	7
Antro	8	0,109	5	0,390	2	0,483	15
TOTAL	20	-	7	-	2	-	29

Quando analisamos a relação da densidade de metilação em promotor dos três genes estudados de acordo com os genes de *H. pylori* verificou-se que (Tabela 24) a presença do alelo s1 de *vacA* foi mais freqüente nos grupos de genes metilados 1, 2 e 3, quando comparado a 0 genes metilados, com significância estatística ($p=0,010$). Adicionalmente, a presença do gene *flaA* foi relacionada com um gene metilado ($p=0,018$) e com a ausência de dois metilados ($p=0,033$). A falta de associação com três genes pode ser explicada pela baixa freqüência de três genes metilados concomitantemente. Os dois genes metilados relacionados com ausência de *flaA* consiste na combinação *COX-2* e *CDKN2A* metilados ($p= 0,041$), como mostrado na tabela 25.

Tabela 24 – Distribuição dos casos considerando o número de genes metilados (0, 1, 2 e 3) de acordo com os genes de *H. pylori* estudados.

	0	p-valor	1	p-valor	2	p-valor	3	p-valor
<i>cagA</i>								
+	15	0,787	14	0,104	13	0,191	5	0,478
-	9		4		13		5	
<i>vacA</i>								
s1m1	14	0,063	14	0,369	19	0,620	8	0,717
s1m2/s2m1	6	0,434	2	0,498	5	1,000	2	1,000
s2m2	4	0,075	1	1,000	1	0,657	0	1,000
S/A	0	-	1	-	1	-	0	-
s1								
+	18	0,010*	16	0,675	24	0,259	10	0,244
-	6		1		1		0	
S/A	0	-	1	-	1	-	0	-
m1								
+	16	0,254	14	0,537	19	0,888	8	1,000
-	8		3		6		2	
S/A	0	-	1	-	1	-	0	-
Total	24	-	18	-	26	-	10	-
<i>cagE</i>								
+	9	0,721	8	0,721	7	0,336	5	0,233
-	12		8		12		2	
<i>virB11</i>								
+	10	0,475	10	0,428	9	0,490	5	0,437
-	11		6		10		2	
<i>flaA</i>								
+	13	1,000	14	0,018	8	0,033	4	1,000
-	8		2		11		3	
Todos genes**								
+	6	0,841	6	0,273	3	0,230	2	1,000
-	15		10		16		5	
Total	21	-	16	-	19	-	7	-

S/A - Sem amplificação; *0 genes metilados vs 1+2+3 genes metilados (18/6 vs 50/2);
***vacA*s1m1+*cagA*+*cagE*+*virB11*+*flaA*.

Tabela 25 – Distribuição da combinação dos dois genes metilados de acordo com os genes de *H. pylori*.

	COX-2+CDKN2A	p-valor	COX-2+HMLH1	p-valor	CDKN2A+HMLH1	p-valor
<i>cagA</i>						
+	10	0,411	3	1,000	0	0,480
-	7		4		2	
<i>vacA</i>						
s1m1	14	0,344	5	1,000	0	0,240
s1m2/s2m1	2	0,283	2	0,597	1	0,200
s2m2	1	1,000	0	1,000	0	1,000
S/A	0	-	0	-	1	-
<i>sl</i>						
+	16	1,000	7	1,000	1	1,000
-	1		0		0	
S/A	0	-	0	-	1	-
<i>m1</i>						
+	14	0,344	5	1,000	0	0,240
-	3		2		1	
S/A	0	-	0	-	1	-
Total	17	-	7	-	2	-
<i>cagE</i>						
+	4	0,617	3	0,305	0	1,000
-	9		2		1	
<i>virB11</i>						
+	5	0,350	3	0,628	1	0,474
-	8		2		0	
<i>flaA</i>						
+	3	0,041	4	0,111	1	0,421
-	10		1		0	
Todos genes*						
+	1	0,222	2	0,155	0	1,000
-	12		3		1	
Total	13	-	5	-	1	-

S/A – Sem amplificação. **vacAs1m1+cagA+cagE+virB11+flaA*.

7 – DISCUSSÃO

No estado do Ceará, o câncer gástrico é uma das neoplasias mais frequentes. As estimativas do INCA para o ano de 2010 apontam uma incidência de 21 mil casos novos para essa neoplasia no Brasil, e destes 1.170 e 300 ocorrerão apenas no estado do Ceará e na capital Fortaleza, respectivamente. Essa neoplasia é uma doença complexa e de etiologia multifatorial, cujo fator etiológico ambiental mais importante é a bactéria *H. pylori*. Entretanto, apesar de inúmeros estudos apontarem a importância dessa bactéria na etiologia do câncer gástrico, os mecanismos pelos quais ela contribui para o desenvolvimento dessa neoplasia são ainda pouco conhecidos. No câncer gástrico uma das alterações mais frequentes é a hipermetilação em promotor de genes supressores tumorais e de reparo (SHIM et al., 2000; ESTELLER et al., 2002; KIM et al., 2003; ZHANG et al., 2008; KSIAA et al., 2009), contudo são poucos os estudos que associam a metilação no promotor desses genes com a presença de infecção por *H. pylori*. Por essa razão, o presente estudo abordou as alterações na expressão e padrão de metilação nos promotores dos genes *CDKN2A*, *HMLH1* e *COX-2* em amostras de pacientes com adenocarcinomas gástricos em associação com a presença de cepas de *H. pylori*. O estudo da expressão e metilação no promotor do gene *COX-2* foi incluído, por este ser um potente indutor da resposta inflamatória, à qual é atribuída papel importante na carcinogênese gástrica. Os dados obtidos foram analisados considerando a amostra total, mas também foram analisados de acordo com aspectos histopatológicos tendo em vista a natureza distinta dos adenocarcinomas subtipos intestinal e difuso (TAHARA, 2004), bem como as regiões anatômicas em que esses tumores foram encontrados (DRIESSEN et al., 2003; DRIESSEN et al., 2004; KIM et al., 2005).

7.1- ANÁLISE DA CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No presente estudo, a maioria dos pacientes foi procedente da região metropolitana e do interior do estado do Ceará. Considerando a inclusão aleatória dos casos, esses dados refletem a procedência de atendimento no Hospital Universitário Walter Cantídeo e na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza e mostram a importância e representatividade desses dois serviços como hospitais de referência do Estado. Uma menor parcela dos pacientes procedentes da região sudeste do país foram do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina em Botucatu/SP e do Hospital Amaral Carvalho, em Jaú/SP, também considerados hospitais de referência na região.

Ao avaliar a amostra estudada de acordo com o sexo dos pacientes, foi observado um predomínio de acometimento de câncer gástrico no sexo masculino sobre o feminino, com uma razão masculino/feminino de 1,73. A maior frequência de câncer gástrico nos pacientes do sexo masculino é concordante com a literatura mundial, inclusive no Brasil, onde na maioria dos estados é encontrada uma frequência maior de homens acometidos com essa neoplasia (CÉSAR et al., 2002; PARKIN et al., 2005; INCA, 2009). A alta frequência de pacientes com idade avançada também é concordante com estudos que mostram o acometimento de câncer gástrico em pacientes de idade mais avançada, com um aumento gradativo com a idade (CÉSAR et al., 2002; CARL-MCGRATH et al., 2007).

A análise histopatológica dos adenocarcinomas gástricos estudados mostrou uma frequência maior de tumores do subtipo intestinal de Lauren e localizados na região do antro. O predomínio de adenocarcinomas gástricos subtipo intestinal é uma constante em vários estudos, principalmente em regiões geográficas de alto risco para essa neoplasia. Adicionalmente, estudos apontam o antro como a localização mais frequente desses tumores, apesar de atualmente existir um aumento no número de tumores proximais (RODER et al., 2002; FIGUEIREDO et al., 2002; LOPES et al., 2004; SHANG; PEÑA, 2005; CARL-MCGRATH et al., 2007; LOCHHEAD; EL-OMAR, 2008).

A alta frequência de adenocarcinomas gástricos diagnosticados em estadiamentos mais avançados é relatada na literatura (ALBERTS et al., 2003; CORREA, 2004; CUNNINGHAM et al., 2005). A presença de uma maior frequência de tumores mais avançados (IIIA, IIIB e IV) em nossa amostra, principalmente III (IIIA e IIIB) e menor frequência de tumores nos estágios IV, provavelmente reflete o diagnóstico tardio desses tumores. É interessante relatar que muitos pacientes encaminhados para cirurgia não foram submetidos a esse procedimento devido ao estágio bastante avançado dessa neoplasia, com comprometimento de diversas estruturas anatômicas. Isso certamente levou a uma subestimativa das frequências dos graus avançados, denotando o déficit para o rastreamento e o diagnóstico do câncer gástrico no sistema público de saúde do Estado.

7.2- ANÁLISE DA DETECÇÃO DE *H. pylori* E GENES DE PATOGENICIDADE

Como era esperado, pelo fato da amostra ser procedente de pacientes de um país subdesenvolvido, além de ser de uma região do país com uma grande parcela da população

em condições sócio-econômicas baixas, no presente estudo uma alta frequência de infecção por *H. pylori* foi observada. Esses dados são consistentes com outros estudos realizados no Brasil, como os de Thomazini et al. (2006) e Ferrasi et al. (2010), ambos realizados no sudeste do Brasil, utilizando também a técnica de PCR para detecção de *H. pylori* em amostras de câncer gástrico. Essa alta frequência de infecção por *H. pylori* não é justificada pela alta sensibilidade da técnica de PCR, já que Queiroz et al. (1999), também no Brasil, detectaram *H. pylori*, através de sorologia, cultura e histologia, em 95,3% dos casos de adenocarcinoma gástrico. De forma semelhante, Nomura et al. (1991), no Hawaii, utilizando sorologia, encontraram *H. pylori* em alta frequência (94%) em câncer gástrico.

Outro fator importante que deve ser levado em consideração na carcinogênese gástrica associada à infecção por *H. pylori* é a grande variabilidade genética dessa bactéria. Vários são os estudos que indicam a natureza patogênica de certos tipos de cepas de *H. pylori* (PEEK; BLASER, 2002; SOZZI et al., 2005; ATHERTON, 2006; KAMALI-SARVESTANI et al., 2006), levantando a hipótese que a virulência da bactéria é relacionada a presença de determinados fatores relacionados à patogenicidade. Neste estudo, a combinação alélica s1m1 de *vacA* e os genes *cagA* e *flaA* foram mais frequentes. Como consequência, a associação de *cagA* e *vacA* s1m1 foi também elevada. A alta frequência de cepas portadores dos genes *cagA* e *vacA* s1m1 de *H. pylori* em câncer gástrico ou em lesões mais agressivas é descrita na literatura (SUGIMOTO et al., 2009; WEN; MOSS, 2009; JANG et al., 2010). Em câncer gástrico, Lin et al. (2004) detectaram o gene *cagA* em 76% dos casos e Chomvarin et al. (2008), estudando pacientes da Tailândia, com diversas doenças gastrointestinais, encontraram uma frequência de 100% de *H. pylori* *cagA*(+) em câncer gástrico, 96,8% em doenças gastrointestinais não ulcerosas e 100% em úlceras gástricas e duodenais. Kamali-Sarvestani et al. (2006), no Irã, detectaram uma frequência significativa do genótipo *vacA* s1m1 associado com pacientes com câncer gástrico quando comparados com aqueles com gastrite ou úlcera péptica. Em estudo de Douraghi et al. (2009), as cepas de *H. pylori* *cagA* positivas e portadoras dos alelos de *vacA* s1 e *vacA* i1 foram associadas com risco de câncer gástrico. Esses achados são consistentes com o aspecto patogênico desses genes corroborando com os diversos estudos que apontam esses genes como importantes fatores de virulência.

Por outro lado, a análise do gene *flaA* associado a lesões gástricas foi realizada em apenas um estudo de Wu et al. (2005), que detectaram *flaA* em 89,2% de amostras de câncer gástrico e úlcera péptica. A maioria dos estudos abordando esse gene é restrita à determinação

da função desse gene. No presente estudo, a detecção de uma frequência significativa de cepas portadoras do gene *flaA* se mostra relevante, desde que ele é responsável pela codificação de proteína envolvida na formação do flagelo, que vem sendo associado não somente com a colonização bem sucedida, mas também com os processos de infecção e persistência na mucosa gástrica (EATON et al., 1996; OTTEMANN; LOWENTHAL, 2002). Adicionalmente à função de motilidade, a qual é bem caracterizada, o flagelo tem sido associado com outras funções, como a de atuar como um aparato exportador de fatores de virulência (YOUNG et al., 1999), na sensibilidade da viscosidade do meio (MCCARTER; SILVERMAN, 1990) e como uma importante proteína imunogênica (YAN et al., 2003).

Os outros dois genes de *H. pylori* analisados neste estudo foram *cagE* e *virB11*. Ainda existem poucos estudos abordando esses dois genes em câncer gástrico. O gene *cagE* tem sido sugerido como um melhor marcador para integridade da ilha *cag*-PAI que *cagA* (SOZZI et al., 2005; MODENA et al., 2007). Ali et al. (2005), na Índia, detectaram *cagE* em 100% dos adenocarcinomas gástricos. Erzin et al. (2006) e Chomvarin et al. (2008), também encontraram esse gene em alta frequência (81,8% e 93,8%, respectivamente) em tumores gástricos de pacientes da Turquia e Tailândia. Por outro lado, o gene *virB11*, localizado na porção esquerda da ilha de patogenicidade *cag*, é bastante relevante pois além de apresentar função essencial na formação do sistema de secreção tipo IV, pode ser utilizado como marcador do lado esquerdo da ilha *cag*-PAI. Tomasini et al. (2003) e Sozzi et al. (2005), estudando pacientes dispépticos italianos, encontraram o gene *virB11* em 90% e 94,7% dos casos, respectivamente. Adicionalmente, a importância desses dois genes na patogenicidade das cepas de *H. pylori* foi verificada no estudo de Lima et al. (2010) realizado no Laboratório de Genética Molecular (LABGEM) onde foram observadas frequências elevadas tanto do gene *cagE* como do *virB11* em amostras de adenocarcinomas gástricos, justificando a introdução desses genes no presente estudo.

7.3- ANÁLISE INDIVIDUAL DA DETECÇÃO DA EXPRESSÃO E METILAÇÃO NO PROMOTOR DOS GENES *COX-2*, *HMLH1* E *CDKN2A*

O padrão de imunomarcagem predominantemente nuclear/citoplasmática das proteínas p16^{INK4A} e HMLH1 observado neste estudo é semelhante ao encontrado por outros estudos (KISHIMOTO et al., 2008; LI et al., 2008; FALCHETTI et al., 2008). De acordo com Liang et al. (2002), marcação citoplasmática indica a acumulação dessa proteína no citoplasma, devido à sua fosforilação mediada pela proteína quinase B, oncogenicamente ativada,

bloqueando o reconhecimento de seus sítios por fatores de importação nuclear. Contudo, o acordo entre imunomarcacão nuclear e citoplasmática encontrado neste estudo sugere que a presença de marcação dessas proteínas no citoplasma reflete sua expressão nuclear.

7.3.1 - COX-2

A COX-2 tem sido considerada uma enzima chave na indução e progressão do câncer gástrico já que a sua expressão aumentada é relacionada à carcinogênese gástrica através da promoção de proliferação, migração celular, angiogênese e inibição de apoptose (KONTUREK et al., 2006). Por essa razão, estratégias terapêuticas tendo como alvo a COX-2 foram desenvolvidas para prevenção desse tipo de neoplasia (FITZGERALD et al., 2003). A frequência da expressão do gene *COX-2* é descrita de forma variável na literatura (20,4%–74%) (LEUNG et al., 2001; KAWABE et al., 2002; JOO et al., 2006; HUANG et al., 2006; KOLEV et al., 2007; YAMAC et al., 2008). No presente estudo, apenas uma pequena fração (26%) das amostras de câncer gástrico apresentou imunomarcacão de COX-2. Apesar da maioria dos estudos relatarem uma frequência de imunomarcacão para COX-2 superior à apresentada neste estudo, outros estudos mostram frequência de expressão um pouco superior (36,7%) (KOLEV et al., 2007) ou mesmo inferior (20,4%) (HUANG et al., 2006). A grande variabilidade nas frequências de expressão do gene *COX-2* pode ser explicada pela diversidade de metodologia utilizada, já que há diversos anticorpos usados, com variações na sensibilidade e especificidade dos mesmos, somados aos critérios utilizados na avaliação da imunomarcacão.

Assim como neste estudo, Huang et al. (2006), em estudo conduzido em Dalian, na China, no qual avaliou a expressão do gene *COX-2* e o padrão de seus fatores regulatórios, observou uma frequência similar de expressão de *COX-2* (20,4%) em câncer gástrico, sendo essa frequência um pouco superior à expressão em metaplasia intestinal (18,2%) e em gastrite crônica (10%). É interessante salientar que neste estudo os autores realizaram o método Imuno-Histoquímico utilizando o anticorpo policlonal do mesmo fabricante do estudo aqui apresentado e validaram os seus resultados utilizando a técnica de Western blotting.

Outra explicação compatível com a complexidade dessa neoplasia seria o envolvimento de forma variável da COX-2 na patogênese gástrica. Assim, apesar da existência de uma via dependente da expressão de COX-2 em câncer gástrico, essa via nem sempre seria a predominante. Dentro deste contexto, a baixa expressão do gene *COX-2* encontrada neste estudo e em outros pode ser parcialmente explicada pela falta de ativadores

transcricionais para *COX-2*, como verificado por Huang et al. (2006). Entretanto, esses autores verificaram neste mesmo estudo que mesmo na presença de ativadores transcricionais havia a ausência de expressão de *COX-2*, justificado pela presença de silenciamento transcricional devido à hipermetilação em promotor do gene *COX-2*.

De fato, no presente estudo uma alta frequência (51,2%) de metilação no promotor do gene *COX-2* foi detectada com uma correlação negativa significativa entre a presença de metilação e expressão, confirmando o envolvimento desse evento na inativação do gene *COX-2*. A ausência de expressão de *COX-2* por metilação em região promotora já foi observada por outros autores. Hur et al. (2003) em estudo realizado na Coreia encontraram uma associação entre diminuição da expressão de *COX-2* e metilação aumentada de suas ilhas CpG. Em pacientes de Hong Kong, o silenciamento transcricional do gene *COX-2* devido à hipermetilação do promotor foi encontrado em 43,1% das amostras de câncer gástrico (YU et al., 2003). Adicionalmente, o silenciamento gênico via metilação pode ser comprovado pelos estudos onde a expressão do gene *COX-2* foi restaurada pelo tratamento, *in vitro*, com agentes demetilantes (SONG et al., 2001; KIKUCHI et al., 2002). Embora a hipermetilação do promotor de *COX-2* tenha sido reportada em câncer gástrico com frequência de 13,3% a 63,5% (YU et al., 2003; HUR et al., 2003; DE MAAT et al., 2007; FERRASI et al., 2010), a frequência de metilação em promotor encontrada neste estudo foi ligeiramente elevada, mas concordante com os estudos de Huang et al. (2006) e Ferrasi et al. (2010). No estudo de Huang et al. (2006), ao analisarem as taxas de expressão da enzima DNMT1, uma DNA metiltransferase envolvida no processo de metilação, observaram que, em 69,0% dos casos, essa enzima estava relacionada à negatividade de *COX-2*, adicionando dados que associam a negatividade de *COX-2* com a hipermetilação do promotor devido à superexpressão de DNMT1 e justificando a ausência de expressão nos casos onde os ativadores de transcrição para o gene *COX-2* estavam presentes.

7.3.2 – *HMLH1*

A inativação de genes do reparo por erro de pareamento do DNA, mais comumente o gene *HMLH1*, é uma via alternativa descrita no desenvolvimento e progressão de vários cânceres (CHIARAVALLI et al., 2001; PLEVOVÁ et al., 2005; HAYASHI et al., 2006; CHOUAYEKH et al., 2009). A instabilidade genética gerada pela inativação desses genes é caracterizada por mutações somáticas no DNA tumoral observadas através da instabilidade de regiões de repetições de 4 a 6 pares de bases denominadas de regiões de microssatélite.

Embora a instabilidade de microssatélite tenha sido descrita primeiramente e predominantemente em carcinomas colorretais, ela também é um achado freqüente e importante em outros tumores malignos, entre eles o adenocarcinoma gástrico (TOYOTA et al., 1999; JUNG et al., 2001; YAO et al., 2004; MIZOSHITA et al., 2005). Kang et al. (1999) detectaram que 100% dos carcinomas gástricos com alta instabilidade de microssatélite não apresentavam expressão de *HMLH1* e 95% destes mostravam hipermetilação em promotor desse gene. De forma semelhante, em estudo conduzido por Jung et al. (2001), todos os tumores gástricos com alta instabilidade de microssatélite não apresentavam expressão de *HMLH1*. Estudo conduzido por Kim et al. (2003), estudando o padrão de metilação dos genes *HMLH1*, *CDKN2A* e *CDHI*, mostraram que a hipermetilação em promotor de *HMLH1* correlacionou-se com perda de expressão desse gene, resultando em instabilidade de microssatélite em câncer gástrico. Outros estudos realizados com intuito de avaliar mecanismos de inativação do gene *HMLH1* indicam que a hipermetilação é um mecanismo relevante de silenciamento desse gene (BEVILACQUA; SIMPSON, 2000; ENDOH et al., 2000; FLEISHER et al., 2001; KANG et al., 2002). Neste estudo, a perda da expressão do gene *HMLH1* foi observada em 41,6% dos casos e a metilação no promotor em 32,9%. De forma semelhante, Leung et al. (1999) detectaram uma freqüência de metilação em promotor de *HMLH1* de 31%, entretanto os autores observaram uma freqüência menor (28,6%) de perda da expressão. Fleisher et al. (1999) também observaram uma freqüência (32%) de metilação no promotor de *HMLH1* semelhante à do presente estudo. A forte correlação negativa observada entre perda de expressão de *HMLH1* e presença de metilação corrobora com os estudos que apontam a metilação da região promotora de *HMLH1* como um importante mecanismo de inativação gênica (LEUNG et al., 1999; FLEISHER et al., 1999; KANG et al., 2002).

7.3.3 – *CDKN2A*

A importância da perda do supressor tumoral $p16^{\text{INK4A}}$ no processo carcinogênico tem sido apontado em muitos cânceres (HENGST et al., 1994; ZHOU et al., 2000; VIDAURRETA et al., 2008; GOTO et al., 2009). Em câncer gástrico, perda de expressão de $p16^{\text{INK4A}}$ é comum e a hipermetilação de regiões promotoras desse gene é considerado como seu principal mecanismo de inativação (SHIM et al., 2000; DING et al., 2003; ZHAO et al., 2003). Neste estudo, a freqüência de positividade de $p16^{\text{INK4A}}$ (40,3%) e *status* de metilação no promotor de *CDKN2A* (46,3%) são concordantes com outros estudos (HE et al., 2005; NAPIERALSKI et al., 2007; ABBASZADEGAN et al., 2008). Shim et al. (2000) e Ding et

al. (2003) reportaram frequências de metilação em promotor de *CDKN2A* em 42% e 45% dos casos de câncer gástrico. Adicionalmente, no presente estudo, uma forte correlação negativa entre negatividade de p16^{INK4A} e metilação no promotor de *CDKN2A* foi encontrada. Esse achado é concordante com estudos prévios (SHIM et al., 2000; ZHAO et al., 2007; ABBASZADEGAN et al., 2008). Shim et al. (2000) em estudo realizado na Coreia, analisando a expressão por imuno-histoquímica e o padrão de metilação do gene *CDKN2A*, por MS-PCR, em oitenta e oito amostras de carcinomas gástricos, encontraram que 86,4% dos casos p16^{INK4A} negativos apresentavam metilação em promotor desse gene. Zhao et al. (2007) e Abbaszadegan et al. (2008) detectaram uma forte correlação negativa entre presença de metilação em promotor de *CDKN2A* e ausência de expressão, confirmando o envolvimento da hipermetilação no promotor de *CDKN2A* na inativação do supressor tumoral p16^{INK4A} em câncer gástrico.

7.4 – ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO E STATUS DE METILAÇÃO NO PROMOTOR DOS GENES *COX-2*, *HMLH1* E *CDKN2A*

No presente estudo, uma alta concordância (38/40; 95%) entre presença de metilação e ausência de expressão foi observada para os três genes estudados, *COX-2*, *HMLH1* e *CDKN2A*. Contudo, apesar da indicação que a hipermetilação em promotor desses genes é o principal mecanismo implicado na inativação deles, ele não é o único, desde que 33,3%, 31,2% e 30,4% dos casos de *COX-2*, *HMLH1* e p16^{INK4A} negativos, respectivamente, não foram metilados. Outros estudos também encontraram resultados semelhantes (SHIM et al., 2000; KIM et al., 2003; YU et al., 2003; ABBASZADEGAN et al., 2008). A concordância com outros estudos e a representativa frequência encontrada neste estudo e nos outros citados indica que esses dados não são decorrentes de falhas metodológicas, mas provavelmente são conseqüentes tanto da ausência de ativadores transcricionais, previamente observada no estudo de Huang et al. (2006) para o gene *COX-2*, como de mecanismos alternativos de inativação desses genes como mutações, deleções ou microRNAs.

Adicionalmente, uma pequena fração dos casos metilados em promotor de *COX-2* (2/40), *HMLH1* (4/26) e *CDKN2A* (4/36) foi positiva. Esta situação pode ser justificada por três possibilidades. A primeira possibilidade consiste na alta sensibilidade do método MS-PCR, que é capaz de detectar DNA metilado em um nível de 0,1% (HERMAN et al., 1996). Então, se células tumorais tiverem ambos DNA metilado e não-metilado, e a proporção de DNA metilado for tão baixa quanto 0,1% do DNA total, esta amostra seria classificada como

tendo um padrão de metilação positivo, mas ela mostraria imunoreatividade positiva em 99,9% de células tumorais não-metiladas. A segunda explicação seria uma metilação parcial dos genes cuja metilação incompleta pode reduzir o nível de repressão transcricional, resultando na perda parcial da expressão desses genes. Já a terceira possibilidade consiste na hemimetilação dos genes, cujo alelo não-metilado seria responsável pela imunoreatividade. Independente das possibilidades expostas observa-se a importância da análise conjunta dos resultados de MS-PCR e Imuno-Histoquímica

7.5– ANÁLISE INDIVIDUAL DOS MARCADORES COX-2, HMLH1 E p16^{INK4A} DE ACORDO COM OS PARÂMETROS CLINICOPATOLÓGICOS

7.5.1- COX-2

Na maioria dos estudos, correlações entre expressão do gene *COX-2* e características clinicopatológicas bem-conhecidas do câncer gástrico foram investigadas, porém com resultados divergentes.

Estudo conduzido por Koley et al. (2007) mostrou uma associação significativa entre sexo masculino e positividade de *COX-2*. Neste mesmo estudo a expressão do gene *COX-2* foi relacionada com a idade avançada dos pacientes. No presente estudo essas associações não foram encontradas, mesmo considerando vários cortes de idade, o que está de acordo com outros trabalhos conduzidos por Shi et al. (2003), Joo et al. (2006) e Yamac et al. (2008).

Analizando as características do tumor de acordo com a expressão do gene *COX-2*, autores de alguns estudos verificaram que a positividade de *COX-2* foi correlacionada com a presença de metástase para linfonodos regionais (MURATA et al., 1999; GAO et al., 2000; UEFUJI et al., 2001; HAN et al., 2003) e estadiamento mais avançado (GAO et al., 2000; UEFUJI et al., 2001; HAN et al., 2003; XUE et al., 2003). No presente estudo, nenhuma relação significativa entre expressão e metástase para linfonodos regionais e estadiamento foi observada, concordando com os estudos de Lim et al. (2000), Son et al. (2001) e Kawabe et al. (2002). Adicionalmente, em estudos prévios, a positividade de *COX-2* foi associada significativamente com profundidade de invasão tumoral (UEFUJI et al., 2001; HAN et al., 2003; JOO et al., 2006). Apesar de não significativo, na amostra estudada uma tendência de positividade de *COX-2* foi associada com os tumores T4. Esse achado está de acordo com estudo de Han et al. (2003), e os trabalhos acima mencionados, que detectaram uma frequência predominante de expressão de *COX-2* nos tumores T3/T4.

Quando a expressão de *COX-2* foi analisada de acordo com os subtipos histológicos, intestinal e difuso, alguns autores encontraram uma associação significativa da expressão de *COX-2* com os tumores do subtipo intestinal de adenocarcinoma gástrico (SAUKKONEN et al., 2001; HAN et al., 2003). Entretanto, essa observação não é um consenso na literatura, onde alguns estudos, incluindo o aqui apresentado, não observaram essa relação (GAO et al., 2000; UEFUJI et al., 2001; YU et al., 2004; YAMAC et al., 2008).

Com relação ao *status* de metilação do gene *COX-2*, ainda são escassos os estudos que fazem a análise considerando esse aspecto e parâmetros clinicopatológicos, com apenas dois estudos, até o momento da redação dessa dissertação, abordando esse assunto (DE MAAT et al., 2007; FERRASI et al., 2010). No presente trabalho nenhuma relação foi observada entre presença de metilação no promotor de *COX-2* e sexo, idade, subtipo histológico e localização do tumor, concordando com estudo de De Maat et al. (2007), realizado na Alemanha e Ferrasi et al. (2010), no sudeste do Brasil. Contudo, diferente do presente estudo, que observou uma associação entre metilação no promotor de *COX-2* e os tumores T3, De Maat et al. (2007) encontraram uma correlação significativa entre tumores *COX-2* metilados e baixo TNM e ausência de comprometimento de linfonodos. A discordância entre os estudos pode ser devido ao fato de que no estudo de De Maat et al. (2007), as amostras eram provenientes de pacientes em tratamento ou previamente tratados com os medicamentos fluorouracil, doxorrubicina e metotrexato, os quais potencialmente poderiam modificar o perfil de expressão do gene *COX-2*.

Os dados de expressão e metilação em promotor de *COX-2* foram analisados de acordo com cada subtipo histológico separadamente, baseado em estudos que demonstram que mudanças genéticas e epigenéticas em adenocarcinomas gástricos diferem, dependendo do subtipo histológico (TAHARA et al., 1994; TAHARA, 2004). Nos tumores subtipo difuso, nenhuma diferença significativa, quanto à expressão ou metilação em promotor de *COX-2* de acordo com os parâmetros clinicopatológicos foi observada. Entretanto, nos tumores subtipo intestinal houve um predomínio significativo de casos *COX-2* metilados nos estádios mais avançados. Essas diferenças observadas corroboram a existência de vias distintas entre os tumores subtipos intestinais e difusos, onde a inflamação, característica da indução inicial desse tipo de neoplasia, nos tumores subtipo intestinal geraria um ambiente propício para a ativação de enzimas envolvidas no processo de metilação que, com a progressão do tumor, pode ter levado à inativação de genes susceptíveis à metilação, incluindo o gene *COX-2*. Até o

momento, ainda não há na literatura estudos que analisam os subtipos histológicos separadamente de acordo com esses parâmetros, assim, este é o primeiro trabalho realizado considerando esses aspectos. Por outro lado, quando os tumores foram analisados considerando a sua localização anatômica, não foi observada nenhuma associação entre expressão ou metilação do promotor de *COX-2* e a localização tumoral.

7.5.2- HMLH1

Apesar de alguns estudos prévios encontrarem uma frequência significativa de negatividade de HMLH1 e metilação da região promotora desse gene em pessoas de idade avançada (NAKAJIMA et al., 2001; WAKI et al., 2002; HONDA et al., 2005; KIM et al., 2010), no presente estudo, nenhuma associação entre expressão de *HMLH1* e metilação em promotor desse gene com a idade foi observada, como também com o sexo. A falta de associação da presença de metilação com a idade também foi observada em outros estudos (MOTOSHITA et al., 2005; PERRI et al., 2007; FERRASI et al., 2010), indicando que outros fatores associados à idade devem estar influenciando o padrão de metilação desse gene, nas diferentes populações estudadas.

Estudos anteriores foram realizados avaliando a expressão e metilação em promotor de *HMLH1* de acordo com as características do tumor. Nakajima et al. (2001) e Honda et al. (2005) mostraram que a negatividade de HMLH1 é mais freqüente significativamente em tumores maiores. Em contraste, Geddert et al. (2004) encontraram uma frequência significativa de hipermetilação em promotor de *HMLH1* em tumores T1/T2 e N0. Entretanto, neste estudo nenhuma associação significativa entre expressão e metilação em promotor de *HMLH1* e extensão do tumor e comprometimento de linfonodos regionais foi observada, concordando com estudo de Ferrasi et al. (2010). Por outro lado, foi observado que, apesar de não significativa, tanto a negatividade de HMLH1 como a presença de metilação no promotor foram ligeiramente mais elevadas nos estádios iniciais quando comparado com os casos HMLH1 positivos e não-metilados, indo de encontro aos achados de Kitajima et al. (2003) que observaram uma frequência relevante de perda de expressão de *HMLH1* nos estádios iniciais do tumor, sugerindo um papel importante desse processo na iniciação do tumor. A perda de expressão de *HMLH1* na fase inicial do tumor possibilitaria a fixação de mutações importantes no DNA ocorridas devido à exposição da mucosa gástrica a agentes mutagênicos, resultando na progressão tumoral.

Considerando os tumores de acordo com o subtipo histológico, frequências similares de expressão e metilação em promotor de *HMLH1* foram encontradas entre os tumores subtipo intestinal e difuso, corroborando com estudos de Geddert et al. (2004) e Ferrasi et al. (2010). Contudo, de acordo com a localização do tumor, apesar de nenhuma diferença de expressão do gene *HMLH1* ter sido encontrada, é notado que os tumores *HMLH1* metilados foram predominantemente localizados no antro, concordando com estudo realizado por Nakajima et al. (2001) que encontrou uma frequência maior de tumores metilados localizados no terço inferior do estômago. Kim et al. (2003) observaram que adenocarcinomas gástricos com alta instabilidade de microssatélite, associados com 89% de metilação em promotor de *HMLH1*, eram significativamente localizados na porção distal do estômago. Assim, esses dados em conjunto indicam que a susceptibilidade à metilação depende da localização do tumor.

Quando os tumores foram avaliados de acordo com o subtipo histológico e localização concomitantemente, diferenças foram observadas. Nos tumores intestinais, a inativação do gene *HMLH1* foi predominantemente significativa por metilação nos tumores com localização não-cárdia. Contudo, nos tumores subtipo difuso, apesar de haver um número representativo de casos metilados nos tumores com localização não-cárdia, nenhuma diferença significativa foi observada. Estudos conduzidos por Falchetti et al. (2008) e Seo et al. (2009) mostraram que os tumores com alta instabilidade de microssatélite eram significativamente distais, do subtipo intestinal e predominantemente *HMLH1* negativos, contudo, o padrão de metilação em promotor do gene *HMLH1* não foi avaliado nesse estudo. Dessa maneira, parece que a maior frequência dos tumores *HMLH1* metilados encontrados no antro são característicos dos tumores subtipo intestinal, e provavelmente devem determinar uma via tumorigênica específica.

7.5.3- p16^{INK4A}

A relação de metilação do promotor de *CDKN2A* e pessoas mais velhas é encontrada em alguns estudos (WAKI et al., 2002; FERRASI et al., 2010), entretanto no presente estudo, como no de Mino et al. (2006) e Kishimoto et al. (2008) essa associação não foi observada. Em estudos anteriores, a positividade de p16^{INK4A} foi associada com a ausência de comprometimento dos linfonodos regionais (HE et al., 2005; HONDA et al., 2005) e a metilação desse gene foi significativamente mais baixa em tumores bem-diferenciados (ABBASZADEGAN et al., 2008), mas nenhuma correlação foi encontrada entre esses

parâmetros clinicopatológicos e expressão e metilação no promotor de *CDKN2A* no presente estudo.

Quando os dados foram analisados considerando os subtipos de adenocarcinomas separadamente, nenhuma diferença na expressão de p16^{INK4A} e metilação no promotor de *CDKN2A* foi observada entre os tumores intestinais e difusos. É interessante notar que, com relação à localização do tumor, houve uma diferença na expressão de p16^{INK4A}, mas não no padrão de metilação em promotor de *CDKN2A*, já que os tumores da cárdia tiveram um número significativo de casos p16^{INK4A} negativos. A localização dos tumores gástricos parece ser um aspecto relevante para tumorigênese desses tumores. Driessen et al. (2003) e (2004) reportaram que as características dos adenocarcinomas gástricos da cárdia, incluindo dados clínicos e padrões de expressão de citoqueratina, foram intimamente ligadas ao adenocarcinoma proximal que ao adenocarcinoma gástrico distal, sugerindo a natureza distinta daqueles tumores na determinação de vias tumorigênicas. A frequência mais alta de negatividade de p16^{INK4A} nos tumores da cárdia foi também observado por Kim et al. (2005), em estudo comparando a expressão de várias proteínas entre pacientes com adenocarcinomas da cárdia e não-cárdia, tais como p53, E-caderina, MGMT e p16^{INK4A}. Contudo, os autores não avaliaram esta expressão considerando os subtipos histológicos.

Para elucidar melhor as diferenças na expressão de p16^{INK4A} entre os tumores da cárdia e não-cárdia, os dados foram analisados considerando os subtipos histológicos e localização do tumor concomitantemente. O número maior de casos p16^{INK4A} negativos localizados na cárdia foi característico dos tumores subtipo intestinal, embora essas lesões não difiram com relação ao *status* de metilação de *CDKN2A* de acordo com a localização. Como neste estudo, Abbaszadegan et al. (2008) também não encontrou relação entre metilação no promotor de *CDKN2A* e localização do tumor ou entre metilação de *CDKN2A* e subtipo histológico.

Conseqüentemente, baseado na ausência de expressão de p16^{INK4A}, na metilação no promotor de *CDKN2A* e na localização do tumor, foi possível identificar vias distintas nos tumores subtipos intestinal e difuso. Embora o número de casos dos tumores não-metilados seja pequeno para ambos os subtipos histológicos, nos tumores difusos não-cárdia a metilação no promotor de *CDKN2A* foi a única via pela qual a inativação de p16^{INK4A} ocorreu. Por outro lado, nos tumores intestinais este processo ocorreu por duas rotas diferentes independente da

localização do tumor. Este estudo é o primeiro trabalho na literatura que reporta a inativação de $p16^{\text{INK4A}}$ por metilação de acordo com subtipo histológico e localização do tumor.

A figura 52 sumariza as possíveis vias tumorigênicas identificadas neste estudo de acordo com a localização do tumor e subtipo histológico. Nos tumores localizados na cárdia, a inativação de $p16^{\text{INK4A}}$ foi um achado predominante nos tumores subtipo intestinal, assim como a metilação no promotor de *COX-2* em estágios avançados. Como a combinação *COX-2/CDKN2A* de genes metilados foi mais freqüente, isso indica que os eventos anteriormente citados são relevantes na progressão destes tumores. Por outro lado, nos tumores de localização não-cárdia, dois eventos importantes são observados de acordo com o subtipo histológico, um envolvido com os tumores subtipo intestinal, que consiste na inativação de *HMLH1* por metilação, e outro com os tumores subtipo difuso, onde a inativação de *CDKN2A* por metilação é um achado significativo. Nos tumores localizados na não-cárdia, a metilação no promotor de *HMLH1* é um achado importante, independente do subtipo histológico e parece ser um evento relevante na iniciação destes tumores.

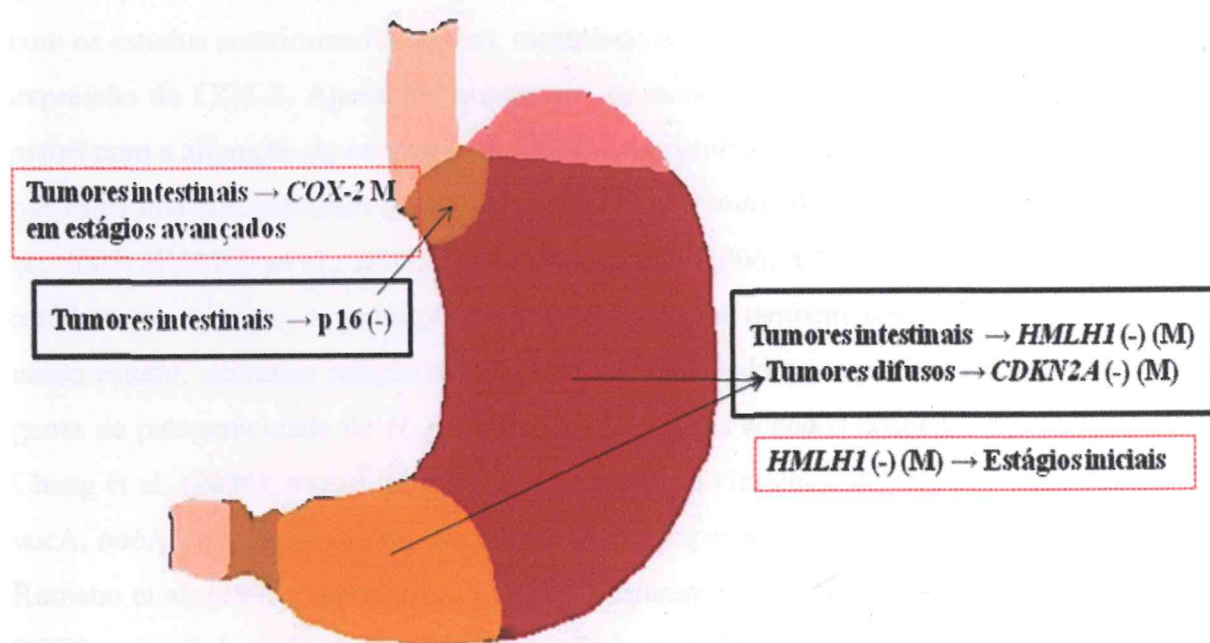


Figura 52 – Representação esquemática das possíveis vias tumorigênicas identificadas de acordo com a localização do tumor e subtipo histológico.

7.6– ANÁLISE INDIVIDUAL DOS MARCADORES COX-2, HMLH1 E p16^{INK4A} DE ACORDO COM A INFECÇÃO POR *H. pylori* E GENES DE PATOGENICIDADE

7.6.1 – COX-2

Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* têm encontrado uma associação significativa entre presença de infecção por *H. pylori* e aumento da expressão do gene *COX-2* (SHEU et al., 2003; CAPUTO et al., 2003; CHANG et al., 2004; YU et al., 2004; KONTUREK et al., 2006). Adicionalmente, foi observada uma redução na expressão do gene *COX-2* após a erradicação de *H. pylori* (MCCARTHY et al., 1999; KIMURA et al., 2000). Contudo, Kawabe et al. (2002) não encontrou correlação entre expressão de *COX-2* e infecção por *H. pylori* em câncer gástrico, assim como também Yamac et al. (2008) em estudo conduzido na Turquia em pacientes com adenocarcinoma gástrico e Huang et al. (2006) em Dalian na China. Neste estudo, a maioria dos tumores (95,1%) foram *H. pylori* positivos, com apenas quatro casos negativos. Apesar da impossibilidade de análise considerando a ausência de *H. pylori*, devido ao número insuficiente de casos *H. pylori* negativos, é interessante salientar que os quatro casos *H. pylori* negativos foram *COX-2* negativos e metilados, concordando com os estudos anteriormente citados, mostrando o envolvimento de *H. pylori* na alteração da expressão de *COX-2*. Apesar de numerosos os estudos que avaliam o envolvimento de *H. pylori* com a alteração da expressão de *COX-2*, os resultados são controversos, provavelmente por estes não considerarem o genótipo bacteriano e *status* de metilação de *COX-2* (GUO et al., 2003; HUANG et al., 2006; KONTUREK et al., 2006; YAMAC et al., 2008). Os poucos estudos que avaliam o genótipo bacteriano mostram também resultados divergentes. Em nosso estudo, nenhuma relação significativa foi observada entre positividade de *COX-2* e os genes de patogenicidade de *H. pylori* estudados. Esses achados concordam com o estudo de Chang et al. (2004), o qual mostrou que os genes de virulência de *H. pylori*, incluindo *iceA*, *vacA*, *babA* e *cagA* não foram associados com a superexpressão de *COX-2*. Adicionalmente, Romano et al. (1998), em estudo *in vitro*, mostraram que o aumento do RNAm de *COX-2* e PGE2 em células gástricas MKN28 mediada por *H. pylori* independe da presença das proteínas VacA e CagA. Entretanto, Bartchewsky et al. (2009) detectaram níveis altos de *COX-2* na mucosa gástrica de pacientes infectados com gastrite crônica e foram associados com a infecção por cepas *H. pylori* *cagA* e *vacA* s1m1 positivas. Guo et al. (2003) reportaram

que os níveis da proteína COX-2 em câncer gástrico infectados por cepas de *H. pylori cagA* (+) foram maiores que naqueles espécimes sem infecção por essas cepas.

Por outro lado, quando foi avaliado o envolvimento de *H. pylori* na indução de metilação em promotor de *COX-2*, foi observado que cepas *vacA* s1 positivas foram significativamente relacionadas com tumores *COX-2* metilados. Aktar et al. (2001), em estudo *in vitro*, mostraram que células gástricas expostas por duas semanas *H. pylori* não apresentavam alteração no *status* de metilação de *COX-2*, contudo os autores não avaliaram o genótipo dessas cepas. Da mesma forma que a expressão de *COX-2*, são raros os estudos que avaliam o *status* de metilação desse gene de acordo com o genótipo bacteriano, o que pode gerar resultados divergentes. Estudo de Ferrasi et al. (2010) não encontrou associação significativa entre metilação do promotor de *COX-2* e presença de infecção por cepas *H. pylori cagA* (+), entretanto os autores não avaliaram o envolvimento do gene *vacA* de *H. pylori* neste processo.

7.6.2 – HMLH1

A relação entre presença de *H. pylori* e alteração na expressão de *HMLH1* vem sendo apontada em alguns estudos *in vitro*, *in vivo* e de erradicação dessa bactéria. *In vitro*, Kim et al. (2002) mostraram que a cocultura de linhagens de células epiteliais gástricas com cepas de *H. pylori* resultavam em níveis diminuídos de proteínas do sistema MMR, entre elas a *HMLH1* e sugeriu que a deficiência de MMR causada por *H. pylori* pode levar a uma alta instabilidade de microssatélite no epitélio gástrico e isto pode resultar em um mecanismo importante de acumulação de mutações na mucosa gástrica durante os estágios mais iniciais da tumorigênese gástrica. Também, no mesmo estudo, a presença de ambas as cepas de *H. pylori cagA*(+) e *cagA*(-) causaram uma redução nos níveis das proteínas de MMR do DNA, sugerindo que esse processo ocorre independente de *cagA*. *In vivo*, Park et al. (2005), examinando a expressão de *HMLH1* e *HMSH2* em amostras de pacientes com gastrite e úlcera péptica *H. pylori* positivas, observaram que a positividade de *HMLH1* aumentou significativamente depois da erradicação de *H. pylori*. No presente estudo, como já anteriormente mencionado, não foi possível comparar a influência da infecção por *H. pylori* na expressão de *HMLH1*, mas vale salientar que dos quatro casos *H. pylori* negativos três eram *HMLH1* positivo. Quando a expressão de *HMLH1* foi analisada com foco no genótipo de *H. pylori*, não se observou nenhuma associação entre eles, indicando que da mesma forma que Kim et al. (2002), em estudo anteriormente citado avaliando a influência de *cagA* na

expressão de *HMLH1*, os outros genes de patogenicidade de *H. pylori* estudados no estudo aqui apresentado também não devem influenciar esse processo.

Com relação ao *status* de metilação em promotor de *HMLH1*, até o momento são poucos os estudos que abordam o envolvimento de *H. pylori* na inativação de *HMLH1* via metilação. Neste estudo, as cepas de *H. pylori vacA s1* foram relacionadas significativamente com os tumores *HMLH1* metilados. Estudo conduzido por Ferrasi et al. (2010) não encontrou uma relação significativa entre cepas *H. pylori cagA* (+) e presença de metilação em promotor de *HMLH1*, contudo os autores não avaliaram esse processo considerando o alelo *s1* de *vacA*. Perri et al. (2007) observaram que depois da erradicação de *H. pylori* de pacientes com metaplasia intestinal, a frequência de metilação em promotor de *HMLH1* não sofreu mudança significativa, apesar dos genes *CDKN2A*, *CDH1* e *COX-2* terem apresentado diminuição significativa no *status* de metilação.

7.6.3 – p16^{INK4A}

Embora a inativação de p16^{INK4A} seja aceita como parte da tumorigênese do câncer gástrico, o mecanismo que leva a este processo é desconhecido. Tem sido sugerido que *H. pylori* tem um papel importante neste processo (DONG et al., 2009; TAHARA et al., 2009). No presente estudo, foi observado que a inativação de p16^{INK4A}, associada à infecção por *H. pylori*, via metilação ou não-metilação, depende do genótipo bacteriano. Uma frequência alta significativa do gene *flaA* associada aos tumores não-metilados foi observada. Contudo, cepas com genótipo *cagA* ou *vacA s1m1* sem *flaA* foram relacionadas com a metilação do promotor de *CDKN2A*. Apesar da ausência de estudos relacionando genótipo bacteriano com inativação de p16^{INK4A} e metilação do promotor, alguns estudos têm correlacionado infecção por *H. pylori* com metilação de *CDKN2A*, mas com resultados controversos (ABBASZADEGAN et al., 2008; KSIAA et al., 2009; DONG et al., 2009; TAHARA et al., 2009). Da mesma forma que para os genes *COX-2* e *HMLH1*, isto pode ser explicado pela variação no genótipo das cepas de *H. pylori* estudadas. Infelizmente, não é possível justificar a presença de *flaA* como um ponto de corte para o *status* de metilação de *CDKN2A*. O gene *flaA* codifica a principal proteína da flagelina do filamento do flagelo, responsável pela motilidade de *H. pylori* no muco gástrico e pela colonização bem sucedida da mucosa gástrica (SUERBAUM, 1995). Estudos futuros são necessários para explicar o envolvimento desse gene com o processo de metilação no promotor de *CDKN2A* utilizando um número maior de casos.

expressão de *HMLH1*, os outros genes de patogenicidade de *H. pylori* estudados no estudo aqui apresentado também não devem influenciar esse processo.

Com relação ao *status* de metilação em promotor de *HMLH1*, até o momento são poucos os estudos que abordam o envolvimento de *H. pylori* na inativação de *HMLH1* via metilação. Neste estudo, as cepas de *H. pylori vacA s1* foram relacionadas significativamente com os tumores *HMLH1* metilados. Estudo conduzido por Ferrasi et al. (2010) não encontrou uma relação significativa entre cepas *H. pylori cagA* (+) e presença de metilação em promotor de *HMLH1*, contudo os autores não avaliaram esse processo considerando o alelo *s1* de *vacA*. Perri et al. (2007) observaram que depois da erradicação de *H. pylori* de pacientes com metaplasia intestinal, a frequência de metilação em promotor de *HMLH1* não sofreu mudança significativa, apesar dos genes *CDKN2A*, *CDH1* e *COX-2* terem apresentado diminuição significativa no *status* de metilação.

7.6.3 – p16^{INK4A}

Embora a inativação de p16^{INK4A} seja aceita como parte da tumorigênese do câncer gástrico, o mecanismo que leva a este processo é desconhecido. Tem sido sugerido que *H. pylori* tem um papel importante neste processo (DONG et al., 2009; TAHARA et al., 2009). No presente estudo, foi observado que a inativação de p16^{INK4A}, associada à infecção por *H. pylori*, via metilação ou não-metilação, depende do genótipo bacteriano. Uma frequência alta significativa do gene *flaA* associada aos tumores não-metilados foi observada. Contudo, cepas com genótipo *cagA* ou *vacA s1m1* sem *flaA* foram relacionadas com a metilação do promotor de *CDKN2A*. Apesar da ausência de estudos relacionando genótipo bacteriano com inativação de p16^{INK4A} e metilação do promotor, alguns estudos têm correlacionado infecção por *H. pylori* com metilação de *CDKN2A*, mas com resultados controversos (ABBASZADEGAN et al., 2008; KSIAA et al., 2009; DONG et al., 2009; TAHARA et al., 2009). Da mesma forma que para os genes *COX-2* e *HMLH1*, isto pode ser explicado pela variação no genótipo das cepas de *H. pylori* estudadas. Infelizmente, não é possível justificar a presença de *flaA* como um ponto de corte para o *status* de metilação de *CDKN2A*. O gene *flaA* codifica a principal proteína da flagelina do filamento do flagelo, responsável pela motilidade de *H. pylori* no muco gástrico e pela colonização bem sucedida da mucosa gástrica (SUERBAUM, 1995). Estudos futuros são necessários para explicar o envolvimento desse gene com o processo de metilação no promotor de *CDKN2A* utilizando um número maior de casos.

7.7- ANÁLISE COMBINADA DOS MARCADORES COX-2, HMLH1 E p16^{INK4A}

Baseado no fato de que a metilação em ilhas CpG em promotores de genes raramente ocorre em um único gene, mas em um conjunto deles (TOYOTA et al., 1999; KANG et al., 2003; USHIJIMA et al., 2006), e que o câncer gástrico é um dos tumores com maior frequência de metilação em promotores de genes (KANG et al., 2001; WAKI et al., 2002), o presente trabalho avaliou a densidade de metilação considerando os três genes estudados baseado no número de genes metilados, sendo agrupados de acordo com esse critério. Neste estudo, a presença do grupo com dois genes metilados foi mais frequente, sendo a combinação *COX-2/CDKN2A* a predominante e a combinação *CDKN2A/HMLH1* a menos frequente. É importante salientar que os genes estudados possuem funções diversas, porém todos relevantes na tumorigênese gástrica. O gene *COX-2* é associado à inflamação, por codificar enzima de mesmo nome envolvida neste processo, e, a inflamação é apontada como um evento na iniciação e progressão do câncer gástrico. Por outro lado, o gene *HMLH1*, responsável pelo reparo por erro de pareamento, foi escolhido para estudo aqui neste trabalho devido ao fato de que o tecido gástrico está em constante renovação celular e exposto a agentes exógenos, necessitando, portanto de uma enzima de reparo com função plena e ideal. Já o gene supressor tumoral *CDKN2A* é um dos genes mais metilados em câncer gástrico, sendo relevante seu estudo nestes tumores. Como os genes *CDKN2A* e *HMLH1*, são provavelmente comprometidos com vias tumorigênicas exclusivas, isso justificaria a baixa combinação dos três genes metilados.

Dentro deste contexto, inicialmente, foram avaliados os grupos de genes metilados de acordo com a idade, já que tem sido sugerido, como anteriormente mencionado, que o processo de metilação é relacionado com a idade. O fato de o câncer gástrico normalmente ocorrer em pessoas mais idosas e ter uma frequência maior de ilhas CpG metiladas, sugere a ligação da idade e câncer via aumento na metilação de ilhas CpG. No presente estudo, similarmente aos estudos de Oue et al. (2006) e Zhang et al. (2008) os quais estudaram vários genes, incluindo os genes *CDKN2A* e *HMLH1* aqui analisados, nenhuma associação significativa foi observada entre o número genes metilados e a idade dos pacientes. Contudo, é interessante apontar que nos pacientes mais jovens, apesar de não significativa, a inativação do gene *CDKN2A* foi relevante quando comparada com os outros genes estudados, embora alguns estudos não encontrem nenhuma associação (KSIAA et al., 2009) ou relacionem a metilação desse gene com pessoas mais velhas (FERRASI et al., 2010). Naqueles indivíduos

mais jovens, quando foi verificada a associação de *CDKN2A* com os outros genes estudados, a combinação predominante foi com *COX-2*. Adicionalmente, esses tumores foram predominantemente do subtipo difuso e de estágios mais avançados, sugerindo que nestes tumores gástricos de pessoas mais jovens, a inativação do gene *CDKN2A*, por metilação, é uma importante via de desenvolvimento e progressão tumoral nos pacientes estudados.

Os grupos de genes metilados foram também avaliados levando em consideração as características histopatológicas dos tumores. A ausência ou a presença de apenas um gene metilado nos tumores T1, a significativa presença de um gene metilado nos tumores T2 e a frequência significativa de dois genes metilados (*COX-2* e *CDKN2A*) nos tumores T3, sugere que o aumento de genes metilados está relacionado com o aumento de extensão do tumor provavelmente pela presença de pelo menos um gene com papel importante no controle de proliferação celular, como o supressor tumoral *CDKN2A*. É razoável supor que as células sem essa proteína supressora de tumor podem ter um descontrole na proliferação celular e/ou ter mais chance de aberrações genéticas adicionais.

Contudo, considerando o estadiamento tumoral, a presença de todos os três genes metilados foi mais freqüente nos estádios iniciais e diminui nos estádios mais avançados. Esse dado na realidade não pode ser interpretado como uma diminuição do grau de metilação com a progressão do tumor, mas como uma consequência dos genes estudados, cujo gene *HMLH1* foi mais metilado nos estádios iniciais. O fato de esse gene ter sido o com a menor freqüência de metilação e estar nos tumores de estádios iniciais sugere o envolvimento dele na iniciação da tumorigênese gástrica, uma vez que a inativação, via metilação, de uma enzima de reparo leva a um acúmulo de erros por pareamento no DNA e mutações e conseqüentemente a uma instabilidade genética. Adicionalmente, a combinação *CDKN2A/HMLH1* metilada foi mais freqüente no estágio II, mostrando que nos estádios iniciais, tanto o gene *HMLH1* como o *CDKN2A* têm papéis relevantes na iniciação do tumor, entretanto, o número de casos observados foi pequeno, indicando a necessidade de outros estudos com um maior número de casos que abordem esse aspecto.

Neste estudo nenhuma diferença no número de genes metilados de acordo com o subtipo histológico foi observada. Estudos conduzidos por Oue et al. (2006) e Zhang et al. (2008), avaliando o *status* de metilação de múltiplos genes, entre eles *CDKN2A*, *HMLH1*, *MINT1*, *MINT2*, *CDH1*, *MGMT*, também não observaram diferenças entre os tumores subtipo intestinal e difuso.

Considerando a localização do tumor, é interessante notar que a presença de todos os três genes metilados foi mais freqüente nos tumores do antro. Esse achado provavelmente reflete a associação do gene *HMLHI* metilado com os tumores deste sítio, como anteriormente discutido. Assim é possível que a inativação de *HMLHI* no antro por metilação seja uma via relevante nestes tumores, diferente dos tumores da cárdia, onde houve um predomínio significativo de tumores *HMLHI* não-metilados, resultando na ausência dos três genes metilados. Esses achados somam dados para a influência do sítio anatômica determinando vias tumorigênicas distintas.

Alguns estudos sugerem o envolvimento de *H. pylori* na indução da metilação. Esses estudos foram realizados tanto avaliando esse processo em genes isolados, como em tumores com alto fenótipo metilador de ilhas CpG de diversos genes envolvidos na carcinogênese gástrica. Tahara et al. (2009) encontraram uma forte associação entre o número aumentado de ilhas CpG metiladas e infecção por *H. pylori*. Maekita et al. (2006) estimaram quantitativamente os níveis de metilação de oito ilhas CpG na mucosa gástrica e observaram que o nível de metilação de todas as oitos regiões de ilhas CpG analisadas foram significativamente maiores na mucosa infectada com *H. pylori* que na não infectada por esta bactéria. Leung et al. (2006) observaram uma diminuição na densidade de metilação em promotor de *E-caderina* depois da erradicação de *H. pylori*. Entretanto, nestes estudos não foram avaliados o genótipo bacteriano. No presente estudo, o padrão de metilação foi analisado considerando as cepas de *H. pylori*, sendo observado que as cepas de *H. pylori vacA s1* foram relacionadas com a presença de algum gene metilado. Tendo em vista que recentes estudos apontam o papel da inflamação na indução da metilação através da ativação das DNA metiltransferases, enzimas responsáveis pelas reações de metilação (HMADCHA et al., 1999; OBST et al., 2000), é possível que a toxina vacuolizante de *H. pylori* mais ativa (*vacA s1*) exacerbe a resposta inflamatória via ativação da liberação de radicais livres, potencializando o envolvimento da inflamação no processo de metilação. Essa hipótese pode ser corroborada pelo estudo *in vitro* realizado por Katayama et al. (2009), que identificaram a associação da *H. pylori* com o processo de metilação, tendo como gene alvo o *RUNX3*. Esses autores demonstraram que a presença de *H. pylori* induziu a produção de óxido nítrico em macrófagos, e o óxido nítrico foi associado com a metilação de *RUNX3* em células gástricas. Adicionalmente, alguns estudos têm sugerido que *H. pylori* pode induzir proliferação celular, e a própria proliferação tem sido sugerida como um fator que promove a metilação do DNA (VELICESCU et al., 2002; SUZUKI et al., 2007).

Outro dado significativo no presente estudo consiste no fato de que as cepas de *H. pylori* com ausência do gene *flaA* foram mais frequentes em tumores com dois genes metilados, entre eles o gene *CDKN2A*. De forma complementar, a presença de cepas de *H. pylori flaA* (+) foram mais frequentes em tumores com um gene metilado, colocando a presença do gene *flaA* de *H. pylori* como um ponto de corte na indução ou não de metilação do gene *CDKN2A*. É plausível supor que cepas com ausência de flagelo permaneçam na região antral do estômago, uma vez que elas não possuem flagelo para mover-se e fixar-se em regiões superiores do estômago. Como nesta região existe uma maior predisposição à metilação do gene *CDKN2A*, então as cepas *flaA* positivas estariam indiretamente associadas a metilação.

8 – CONCLUSÕES

- *H. pylori* foi um fator etiológico freqüente na amostra estudada e a variação da freqüência dos genes de patogenicidade sugere que as cepas genotipicamente diversas possuem relevância diferencial na tumorigênese gástrica;
- A via de inativação dos genes *COX-2*, *CDKN2A* e *HMLH1* foi predominante por metilação em seus promotores, mas não foi a única via, desde que não foram detectados os produtos protéicos independente da metilação;
- A expressão e metilação em promotor dos genes *COX-2*, *HMLH1* e *CDKN2A* independem de idade e sexo dos pacientes, porém em pessoas mais jovens, a metilação no promotor de *CDKN2A* parece ser importante;
- A baixa expressão do gene *COX-2*, decorrente da metilação de seu promotor, indicou que em somente uma pequena parcela dos tumores gástricos, a presença da enzima *COX-2* pode ser associada à tumorigênese gástrica;
- O padrão de metilação no promotor de *COX-2* foi associado à progressão dos tumores subtipo intestinal de localização da cárdia;
- A freqüência da inativação do gene *HMLH1* mostrou-se semelhante aos de estudos de outras regiões do mundo, principalmente nos tumores de estadios iniciais;
- A metilação foi o principal mecanismo de inativação do gene *HMLH1* nos tumores de localização não-cárdia e subtipo intestinal;
- A ausência de expressão do gene supressor tumoral *CDKN2A* foi um evento freqüente, independente da infiltração local do tumor primário e estadiamento;
- Nos tumores subtipo difuso, a inativação de p16^{INK4A} por metilação no promotor de *CDKN2A* ocorreu exclusivamente nos tumores não-cárdia. Por outro lado, nos tumores subtipo intestinal, a inativação de p16^{INK4A} por metilação ocorreu em ambos os tumores cárdia e não-cárdia;
- O aumento no número de genes metilados foi associado com o aumento de invasão local do tumor primário da parede gástrica;

- A metilação do promotor dos genes *COX-2*, *HMLH1* e *CDKN2A* dependeu do genótipo de *H. pylori*;
- Nos genes *COX-2* e *HMLH1*, a metilação foi relacionada às cepas de *H. pylori* *vacAs1* e provavelmente consequência da indução da resposta inflamatória à toxina VacA;
- O padrão de metilação no promotor do gene *CDKN2A* é influenciado, direta ou indiretamente, pelo gene *flaA* de *H. pylori*.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEGAN MR, MOAVEN O, SIMA HR, GHAFARZADEGAN K, A'RABI A, FORGHANI MN, RAZIEE HR, MASHHADINEJAD A, JAFARZADEH M, ESMAILI-SHANDIZ E, DADKHAH E. *p16* promoter hypermethylation: a useful serum marker for early detection of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2008;14:2055-60.

AHMED KS, KHAN AA, AHMED I, TIWARI SK, HABEEB MA, ALI SM, AHI JD, ABID Z, ALVI A, HUSSAIN MA, AHMED N, HABIBULLAH CM. Prevalence study to elucidate the transmission pathways of *Helicobacter pylori* at oral and gastroduodenal sites of a South Indian population. **Singapore Med J** 2006; 47:291-296.

AJCC – American Joint Committee on Cancer. Cancer Staging Handbook. From the AJCC Cancer Staging Manual. 6 ed. Springer, 2002.

AKHTAR M, CHENG Y, MAGNO RM, ASHKTORAB H, SMOOT DT, MELTZER SJ, WILSON KT. Promoter methylation regulates *Helicobacter pylori*-stimulated cyclooxygenase-2 expression in gastric epithelial cells. **Cancer Res** 2001; 61(6):2399-403.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Biologia Molecular da Célula. Artmed Editora. Porto Alegre, 2004.

ALBERTS SR, CERVANTES A, VAN DE VELDE CJ. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. **Ann Oncol** 2003; 14:31-36.

ALI M, KHAN AA, TIWARI SK, AHMED N, RAO LV, HABIBULLAH CM. Association between *cag*-pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer, gastric carcinoma, and non-ulcer dyspepsia subjects with histological changes. **World J Gastroenterol** 2005; 11(43):6815-22.

ATHERTON JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. **Annu Rev Pathol** 2006;1:63-96.

ATHERTON JC, CAO P, PEEK RM, TUMMURU MK, BLASER MJ, COVER TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J Biol Chem** 1995; 270:17771-7.

AUDIBERT C, BURUCOA C, JANVIER B, FAUCHÈRE JL. Implication of the structure of the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion. **Infect Immun** 2001; 69(3):1625-9.

AZEVEDO NF, HUNTINGTON J, GOODMAN KJ. The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications. **Helicobacter** 2009; 14 Suppl 1:1-7.

BACKERT S, SELBACH M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. **Cell Microbiol** 2008; 10(8):1573-81.

BARTCHEWSKY W JR, MARTINI MR, MASIERO M, SQUASSONI AC, ALVAREZ MC, LADEIRA MS, SALVATORE D, TREVISAN M, PEDRAZZOLI J JR, RIBEIRO ML. Effect of *Helicobacter pylori* infection on IL-8, IL-1beta and COX-2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. **Scand J Gastroenterol** 2009; 44(2):153-61.

- BAYLIN SB, HÖPPENER JW, DE BUSTROS A, STEENBERGH PH, LIPS CJ, NELKIN BD. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. **Cancer Res** 1986; 46(6):2917-22.
- BECKER KF, KELLER G, HOEFLE H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. **Surg Oncol** 2000; 9:5-11.
- BEVILACQUA RA, SIMPSON AJ. Methylation of the *hMLH1* promoter but no *hMLH1* mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. **Int J Cancer** 2000; 87(2):200-3.
- BIZZOZERO G. Sulle ghiandole tubulari del tube gastroenterico e sui rapporti dell'ero coll epithelo de rivestimento della mucosa. **Atti d R Accad delle Sci di Torino** 1892; 28:233-251.
- BLASER MJ, BERG DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. **J Clin Invest** 2001; 107:767-773.
- BLASER MJ, PEREZ-PEREZ GI, KLEANTHOUS H, COVER TL, PEEK RM, CHYOU PH, STEMMERMANN GN, NOMURA A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Res** 1995; 55(10):2111-5.
- BORRMANN R. Geschwulste des magens and duodenums. In: Henke F, Lubarsch O, editors. Handbuch der speziellen pathologischen anatomie and histologie. Berlin: Springer-Verlag 1926. p.865.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Cancer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil**, Rio de Janeiro: INCA, 2009. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 15 dez. 2009.
- BRODER AC. The grading of carcinoma. **Minn Med** 1925; 8:726-30.
- CAPUTO R, TUCCILLO C, MANZO BA, ZARRILLI R, TORTORA G, BLANCO CDEL V, RICCI V, CIARDIELLO F, ROMANO M. *Helicobacter pylori* VacA toxin up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN 28 gastric cells through an epidermal growth factor receptor-, cyclooxygenase-2-dependent mechanism. **Clin Cancer Res** 2003; 9(6):2015-21.
- CARL-MCGRATH S, EBERT M, RÖCKEN C. Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis. **Cancer Therapy** 2007; 5:877-894.
- CATALANO V, LABIANCA R, BERETTA GD, GATTA G, DE BRAUD F, CUTSEM EV. Gastric cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 2009; 71:127-164.
- CÉSAR ACG, SILVA AE, TAJARA EH. Fatores Genéticos e Ambientais Envolvidos na Carcinogênese Gástrica. **Arq Gastroenterol** 2002; 39(4):253-259.
- CHAN AO, PENG JZ, LAM SK, LAI KC, YUEN MF, CHEUNG HK, KWONG YL, RASHID A, CHAN CK, WONG BC. Eradication of *Helicobacter pylori* infection reverses *E-cadherin* promoter hypermethylation. **Gut** 2006; 55(4):463-8.
- CHANG YJ, WU MS, LIN JT, SHEU BS, MUTA T, INOUE H, CHEN CC. Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori*

involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor- κ B activation. **Mol Pharmacol** 2004; 66:1465-1477.

CHIARAVALLI AM, FURLAN D, FACCO C, TIBILETTI MG, DIONIGI A, CASATI B, ALBARELLO L, RIVA C, CAPELLA C. Immunohistochemical pattern of hMSH2/hMLH1 in familial and sporadic colorectal, gastric, endometrial and ovarian carcinomas with instability in microsatellite sequences. **Virchows Arch** 2001; 438(1):39-48.

CHOMVARIN C, NAMWAT W, CHAICUMPAR K, MAIRIANG P, SANGCHAN A, SRIPA B, TOR-UDOM S, VILAICHONE RK. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients. **Int J Infect Dis** 2008; 12(1):30-6.

CHOUAYEKH SK, TRIFA F, KHABIR A, BOUJELBANE N, BOUDAWARA TS, DAOUD J, FRIKHA M, GARGOURI A, GARGOURI R. Clinical significance of epigenetic inactivation of *hMLH1* and *BRCA1* in Tunisian patients with invasive breast carcinoma. **J Biomed Biotechnol** 2009; 2009:369129.

CIRAK MY, AKYÖN Y, MÉGRAUD F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. **Helicobacter** 2007; 12 Suppl 1:4-9.

CORREA P. Is gastric cancer preventable? **Gut** 2004; 53:1217-1219.

CORREA P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process—First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Res** 1992; 52:6735-40.

CORREA P, HAENSZELW, CUELLO C, TANNENBAUM S, ARCHER M. A model for gastric cancer epidemiology. **Lancet** 1975; 2:58-60.

CORREA P, SCHNEIDER BG. Etiology of gastric cancer: what is new? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14(8):1865-8.

COVACCI A, TELFORD JL, DEL GIUDICE G, PARSONNET J, RAPPUOLI R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science** 1999; 284:1328-1333.

COVER TL, BLANKE SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. **Nat Rev Microbiol** 2005; 3(4):320-32.

COVER TL, BLASER MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem** 1992; 267(15):10570-5.

COVER TL, KRISHNA US, ISRAEL DA, PEEK RM JR. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. **Cancer Res** 2003; 63(5):951-7.

COVER TL, TUMMURU MK, CAO P, THOMPSON SA, BLASER MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. **J Biol Chem** 1994; 269(14):10566-73.

CUNNINGHAM SC, KAMANGAR F, KIM MP, HAMMOUD S, HAQUE R, MAITRA A, MONTGOMERY E, HEITMILLER RE, CHOTI MA, LILLEMÖE KD, CAMERON JL, YEO CJ, SCHULICK RD. Survival after gastric adenocarcinoma resection: eighteen-year experience at a single institution. **J Gastrointest Surg** 2005; 9:718-725.

DE MAAT MF, VAN DE VELDE CJ, UMETANI N, DE HEER P, PUTTER H, VAN HOESEL AQ, MEIJER GA, VAN GRIEKEN NC, KUPPEN PJ, BILCHIK AJ, TOLLENAAR RA, HOON DS. Epigenetic silencing of *cyclooxygenase-2* affects clinical outcome in gastric cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25(31):4887-94.

DING Y, LE XP, ZHANG QX, DU P. Methylation and mutation analysis of *p16* gene in gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2003; 9(3):423-6.

DOMINGO D, ALARCON T, PIETRO N, SANCHEZ I, LOPEZ-BREA M. *cagA* and *vacA* status of Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. **J Clin Microbiol** 1999; 37:2113-4.

DONG CX, DENG DJ, PAN KF, ZHANG L, ZHANG Y, ZHOU J, YOU WC. Promoter methylation of *p16* associated with *Helicobacter pylori* infection in precancerous gastric lesions: a population-based study. **Int J Cancer** 2009; 124(2):434-9.

DOOLEY CP, LARSON AW, STACE NH, RENNER IG, VALENZUELA JE, ELIASOPH J, COLLETTI PM, HALLS JM, WEINER JM. Double-contrast barium meal and upper gastrointestinal endoscopy. A comparative study. **Ann Intern Med** 1984; 101:538-45.

DOURAGHI M, TALEBKHAN Y, ZERAATI H, EBRAHIMZADEH F, NAHVIJOO A, MORAKABATI A, GHAFARPOUR M, ESMAILI M, BABABEIK M, OGHALAIE A, RAKHSHANI N, HOSSEINI ME, MOHAGHEGHI MA, MOHAMMADI M. Multiple gene status in *Helicobacter pylori* strains and risk of gastric cancer development. **Digestion** 2009; 80(3):200-7.

DRIESSEN A, NAFTEUX P, LERUT T, VAN RAEMDONCK D, DE LEYN P, FILEZ L, PENNINCKX F, GEBOES K, ECTORS N. Identical cytokeratin expression pattern CK7+/CK20- in esophageal and cardiac cancer: etiopathological and clinical implications. **Mod Pathol** 2004; 17:49-55.

DRIESSEN A, VAN RAEMDONCK D, DE LEYN P, FILEZ L, PEETERS M, WINNEPENNINCKX V, PENNINCKX F, LERUT T, ECTORS N. Are carcinomas of the cardia oesophageal or gastric adenocarcinomas? **Eur J Cancer** 2003; 39:2487-94.

DUNN BE, COHEN H, BLASER MJ. *Helicobacter pylori*. **Clin Microbiol Rev** 1997; 10(4):720-41.

EATON KA, BROOKS CL, MORGAN DR, KRAKOWKA S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. **Infect Immun** 1991; 59(7):2470-5.

EATON KA, SUERBAUM S, JOSENHANS C, KRAKOWKA S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. **Infect Immun** 1996; 64(7):2445-8.

EGUCHI H, HERSCHENHOUS N, KUZUSHITA N, MOSS SF. *Helicobacter pylori* increases proteasome-mediated degradation of p27(kip1) in gastric epithelial cells. **Cancer Res** 2003; 63: 4739-4746.

EL-ZIMAITY HM, GRAHAM DY, AL-ASSI MT, MALATY H, KARTTUNEN TJ, GRAHAM DP, HUBERMAN RM, GENTA RM. Interobserver variation in the histopathological assessment of *Helicobacter pylori* gastritis. **Hum Pathol** 1996; 27(1):35-41.

- ENDOH Y, TAMURA G, AJIOKA Y, WATANABE H, MOTOYAMA T. Frequent hypermethylation of the *hMLH1* gene promoter in differentiated-type tumors of the stomach with the gastric foveolar phenotype. **Am J Pathol** 2000; 157(3):717-22.
- ERZIN Y, KOKSAL V, ALTUN S, DOBRUCALI A, ASLAN M, ERDAMAR S, DIRICAN A, KOCAZEYBEK B. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *babA2* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. **Helicobacter** 2006; 11(6):574-80.
- ESTELLER M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene** 2002; 21:5427- 40.
- FALCHETTI M, SAIEVA C, LUPI R, MASALA G, RIZZOLO P, ZANNA I, CECCARELLI K, SERA F, MARIANI-COSTANTINI R, NESI G, PALLI D, OTTINI L. Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival. **Hum Pathol** 2008; 39(6):925-32.
- FERRASI AC, PINHEIRO NA, RABENHORST SH, CABALLERO OL, RODRIGUES MA, DE CARVALHO F, LEITE CV, FERREIRA MV, BARROS MA, PARDINI MI. *Helicobacter pylori* and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. **World J Gastroenterol** 2010; 16(3):312-9.
- FERRERO RL, THIBERGE JM, HUERRE M, LABIGNE A. Recombinant antigens prepared from the urease subunits of *Helicobacter* spp.: evidence of protection in a mouse model of gastric infection. **Infect Immun** 1994; 62(11):4981-9.
- FIGUEIREDO C, MACHADO JC, PHAROAH P, SERUCA R, SOUSA S, CARVALHO R, CAPELINHA AF, QUINT W, CALDAS C, VAN DOORN LJ, CARNEIRO F, SOBRINHO-SIMÕES M. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 2002; 94(22):1680-7.
- FITZGERALD GA. COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nat Rev Drug Discov** 2003; 2:879 - 90.
- FLEISHER AS, ESTELLER M, TAMURA G, RASHID A, STINE OC, YIN J, ZOU TT, ABRAHAM JM, KONG D, NISHIZUKA S, JAMES SP, WILSON KT, HERMAN JG, MELTZER SJ. Hypermethylation of the *hMLH1* gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. **Oncogene** 2001; 20(3):329-35.
- FLEISHER AS, ESTELLER M, WANG S, TAMURA G, SUZUKI H, YIN J, ZOU TT, ABRAHAM JM, KONG D, SMOLINSKI KN, SHI YQ, RHYU MG, POWELL SM, JAMES SP, WILSON KT, HERMAN JG, MELTZER SJ. Hypermethylation of the *hMLH1* gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. **Cancer Res** 1999; 59(5):1090-5.
- FOSTER GD, TWELL DJ. Plant Gene Isolation: Principles and Pratics. Sons Ltd., England 1996, p.426.
- GAO HJ, YU LZ, BAI JF, PENG YS, SUN G, ZHAO HL, MIU K, L XZ, ZHANG XY, ZHAO ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: *H. pylori* infection, histological types and staging. **World J Gastroenterol** 2000; 6(6):848-854.

GEBERT B, FISCHER W, WEISS E, HOFFMANN R, HAAS R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. **Science** 2003; 301(5636):1099-102.

GEDDERT H, KIEL S, ISKENDER E, FLORL AR, KRIEG T, VOSSEN S, GABBERT HE, SARBIA M. Correlation of *hMLH1* and *HPP1* hypermethylation in gastric, but not in esophageal and cardiac adenocarcinoma. **Int J Cancer** 2004; 110(2):208-11.

GONZÁLEZ CA, PERA G, AGUDO A, PALLI D, KROGH V, VINEIS P, TUMINO R, PANICO S, BERGLUND G, SIMÁN H, NYRÉN O, AGREN A, MARTINEZ C, DORRONSORO M, BARRICARTE A, TORMO MJ, QUIROS JR, ALLEN N, BINGHAM S, DAY N, MILLER A, NAGEL G, BOEING H, OVERVAD K, TJONNELAND A, BUENO-DE-MESQUITA HB, BOSHUIZEN HC, PEETERS P, NUMANS M, CLAVEL-CHAPELON F, HELEN I, AGAPITOS E, LUND E, FAHEY M, SARACCI R, KAAKS R, RIBOLI E. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). **Int J Cancer** 2003; 107(4):629-34.

GOODMAN KJ, CORREA P. The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. **Int J Epidemiol** 1995; 24(5):875-87.

GOTO T, MIZUKAMI H, SHIRAHATA A, SAKATA M, SAITO M, ISHIBASHI K, KIGAWA G, NEMOTO H, SANADA Y, HIBI K. Aberrant methylation of the *p16* gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. **Anticancer Res** 2009; 29(1):275-7.

GÖTTKE MU, FALLONE CA, BARKUN AN, VOGT K, LOO V, TRAUTMANN M, TONG JZ, NGUYEN TN, FAINSILBER T, HAHN HH, KÖRBER J, LOWE A, BEECH RN. Genetic variability determinants of *Helicobacter pylori*: influence of clinical background and geographic origin of isolates. **J Infect Dis** 2000; 181:1674-81.

GRADY WM, MARKOWITZ SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 2002; 3:101-28.

GRISHAM MB, JOURD'HEUIL D, WINK DA. Review article: chronic inflammation and reactive oxygen and nitrogen metabolism--implications in DNA damage and mutagenesis. **Aliment Pharmacol Ther** 2000; 14 Suppl 1:3-9.

GUO XL, WANG LE, DU SY, FAN CL, LI L, WANG P, YUAN Y. Association of cyclooxygenase-2 expression with Hp-cagA infection in gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2003; 9(2):246-9.

GUZMAN LM, KORIYAMA C, AKIBA S, EIZURU Y, CASTILLO D, CORVALAN A, AGUAYO FR. High frequency of *p16* promoter methylation in non-small cell lung carcinomas from Chile. **Biol Res** 2007; 40(3):365-72.

HACKER J, BLUM-OEHLER G, MÜHLDORFER I, TSCHÄPE H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Mol Microbiol** 1997; 23(6):1089-97.

HALVORSEN JR RA, YEE J, MCCORMICK VD. Diagnosis and staging of gastric cancer. **Semin Oncol** 1996; 23:325-35.

HAMILTON S R, AALTONEN L. A. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC Press Lyon, 2000, p. 38-52.

HAN SL, TANG HJ, HUA YW, JI SQ, LIN DX. Expression of COX-2 in stomach cancers and its relation to their biological features. **Dig Surg** 2003; 20(2):107-14.

HATAKEYAMA M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. **Nat Rev Cancer** 2004; 4(9):688-94.

HAYASHI T, ARAI M, UENO M, KINOSHITA H, TADA Y, KOIZUMI K, MIKI Y, YAMAGUCHI T, KATO Y, UTSUNOMIYA J, MUTO T, SUGIHARA K. Frequency of immunohistochemical loss of mismatch repair protein in double primary cancers of the colorectum and stomach in Japan. **Dis Colon Rectum** 2006; 49(10 Suppl):S23-9.

HE XS, RONG YH, SU Q, LUO Q, HE DM, LI YL, CHEN Y. Expression of *p16* gene and Rb protein in gastric carcinoma and their clinicopathological significance. **World J Gastroenterol** 2005; 11:2218-23.

HENGST L, DULIC V, SLINGERLAND JM, LEES E, REED SI. A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91(12):5291-5.

HERMAN JG, GRAFF JR, MYÖHÄNEN S, NELKIN BD, BAYLIN SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:9821-6.

HERMAN JG, UMAR A, POLYAK K, GRAFF JR, AHUJA N, ISSA JP, MARKOWITZ S, WILLSON JK, HAMILTON SR, KINZLER KW, KANE MF, KOLODNER RD, VOGELSTEIN B, KUNKEL TA, BAYLIN SB. Incidence and functional consequences of *hMLH1* promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95(12):6870-5.

HIGASHI H, NAKAYA A, TSUTSUMI R, YOKOYAMA K, FUJII Y, ISHIKAWA S, HIGUCHI M, TAKAHASHI A, KURASHIMA Y, TEISHIKATA Y, TANAKA S, AZUMA T, HATAKEYAMA M. *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. **J Biol Chem** 2004; 279(17):17205-16.

HIGASHI H, TSUTSUMI R, MUTO S, SUGIYAMA T, AZUMA T, ASAKA M, HATAKEYAMA M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. **Science** 2002; 295(5555):683-6.

HMADCHA A, BEDOYA FJ, SOBRINO F, PINTADO E. Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1beta via nitric oxide production. **J Exp Med** 1999; 190:1595-604.

HONDA T, TAMURA G, ENDOH Y, NISHIZUKA S, KAWATA S, MOTOYAMA T. Expression of tumor suppressor and tumor-related proteins in differentiated carcinoma, undifferentiated carcinoma with tubular component and pure undifferentiated carcinoma of the stomach. **Jpn J Clin Oncol** 2005; 35(10):580-6.

HSIEH P, YAMANE K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. **Mech Ageing Dev** 2008; 129(7-8):391-407.

- HSU SM, RAINE L, FANGER H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem** 1981; 29:577-580.
- HUANG L, ZHANG KL, LI H, CHEN XY, KONG QY, SUN Y, GAO X, GUAN HW, LIU J. Infrequent COX-2 expression due to promoter hypermethylation in gastric cancers in Dalian, China. **Hum Pathol** 2006; 37(12):1557-67.
- HUR K, SONG SH, LEE HS, HO KIM W, BANG YJ, YANG HK. Aberrant methylation of the specific CpG island portion regulates cyclooxygenase-2 gene expression in human gastric carcinomas. **Biochem Biophys Res Commun** 2003; 310:844- 51.
- IARC – International Agency of Research on Cancer. Global Cancer, 2002.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. No 61. IARC, Lyon, 1994.
- JANG S, JONES KR, OLSEN CH, JOO YM, YOO YJ, CHUNG IS, CHA JH, MERRELL DS. Epidemiological link between gastric disease and polymorphisms in VacA and CagA. **J Clin Microbiol** 2010; 48(2):559-67.
- JI X, FERNANDEZ T, BURRONI D, PAGLIACCIA C, ATHERTON JC, REYRAT JM, RAPPUOLI R, TELFORD JL. Cell specificity of *Helicobacter pylori* cytotoxin is determined by a short region in the polymorphic midregion. **Infect Immun** 2000; 68(6):3754-7.
- JOO YE, CHUNG IJ, PARK YK, KOH YS, LEE JH, PARK CH, LEE WS, KIM HS, CHOI SK, REW JS, PARK CS, KIM SJ. Expression of cyclooxygenase-2, p53 and Ki-67 in gastric cancer. **J Korean Med Sci** 2006; 21(5):871-6.
- JOSEPHANS C, LABIGNE A, SUERBAUM S. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. **J Bacteriol** 1995; 177(11):3010-20.
- JUNG HY, JUNG KC, SHIM YH, RO JY, KANG GH. Methylation of the *hMLH1* promoter in multiple gastric carcinomas with microsatellite instability. **Pathol Int** 2001; 51(6):445-51.
- KAMALI-SARVESTANI E, BAZARGANI A, MASOUDIAN M, LANKARANI K, TAGHAVI AR, SABERIFIROOZI M. Association of *H. pylori* cagA and vacA genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. **World J Gastroenterol** 2006; 12(32):5205-10.
- KAMANGAR F, DORES GM, ANDERSON WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **J Clin Oncol** 2006; 24(14):2137-50.
- KANG GH, LEE HJ, HWANG KS, LEE S, KIM JH, KIM JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. **Am J Pathol** 2003; 163:1551-1556.
- KANG GH, SHIM YH, JUNG HY, KIM WH, RO JY, RHYU MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. **Cancer Res** 2001; 61(7):2847-51.

KANG GH, SHIM YH, RO JY. Correlation of methylation of the *HMLH1* promoter with lack of expression of HMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. **Lab Invest** 1999; 79(7):903-9.

KANG YH, BAE SI, KIM WH. Comprehensive analysis of promoter methylation and altered expression of hMLH1 in gastric cancer cell lines with microsatellite instability. **J Cancer Res Clin Oncol** 2002; 128(3):119-24.

KATAYAMA Y, TAKAHASHI M, KUWAYAMA H. *Helicobacter pylori* causes *runx3* gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated by nitric oxide produced by macrophages. **Biochem Biophys Res Commun** 2009; 388(3):496-500.

KAWABE A, SHIMADA Y, UCHIDA S, MAEDA M, YAMASAKI S, KATO M, HASHIMOTO Y, OHSHIO G, MATSUMOTO M, IMAMURA M. Expression of cyclooxygenase-2 in primary and remnant gastric carcinoma: comparing it with p53 accumulation, *Helicobacter pylori* infection, and vascular endothelial growth factor expression. **J Surg Oncol** 2002; 80(2):79-88.

KIKUCHI T, ITOH F, TOYOTA M, SUZUKI H, YAMAMOTO H, FUJITA M, HOSOKAWA M, IMAI K. Aberrant methylation and histone deacetylation of cyclooxygenase 2 in gastric cancer. **Int J Cancer** 2002; 97:272-7.

KIM H, KIM YH, KIM SE, KIM NG, NOH SH, KIM H. Concerted promoter hypermethylation of *hMLH1*, *p16INK4A*, and *E-cadherin* in gastric carcinomas with microsatellite instability. **J Pathol** 2003; 200(1):23-31.

KIM HG, LEE S, KIM DY, RYU SY, JOO JK, KIM JC, LEE KH, LEE JH. Aberrant methylation of DNA mismatch repair genes in elderly patients with sporadic gastric carcinoma: A comparison with younger patients. **J Surg Oncol** 2010; 101(1):28-35.

KIM JJ, TAO H, CARLONI E, LEUNG WK, GRAHAM DY, SEPULVEDA AR. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. **Gastroenterology** 2002; 123(2):542-53.

KIM MA, LEE HS, YANG HK, KIM WH. Clinicopathologic and protein expression differences between cardia carcinoma and noncardia carcinoma of the stomach. **Cancer** 2005;103:1439-46.

KIM TY, JONG HS, JUNG Y, KIM TY, KANG GH, BANG YJ. DNA hypermethylation in gastric cancer. **Aliment Pharmacol Ther** 2004; 20 Suppl 1:131-42.

KIM WY, SHARPLESS NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. **Cell** 2006; 127(2):265-75.

KIMURA A, TSUJI S, TSUJII M, SAWAOKA H, IJIMA H, KAWAI N, YASUMARU M, KAKIUCHI Y, OKUDA Y, ALI Z, NISHIMURA Y, SASAKI Y, KAWANO S, HORI M. Expression of cyclooxygenase-2 and nitrotyrosine in human gastric mucosa before and after *Helicobacter pylori* eradication. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 2000; 63(5):315-22.

KISHIMOTO I, MITOMI H, OHKURA Y, KANAZAWA H, FUKUI N, WATANABE M. Abnormal expression of p16(INK4a), cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 and retinoblastoma protein in gastric carcinomas. **J Surg Oncol** 2008; 98(1):60-6.

- KITAJIMA Y, MIYAZAKI K, MATSUKURA S, TANAKA M, SEKIGUCHI M. Loss of expression of DNA repair enzymes MGMT, hMLH1, and hMSH2 during tumor progression in gastric cancer. **Gastric Cancer** 2003; 6(2):86-95.
- KITAJIMA Y, OHTAKA K, MITSUNO M, TANAKA M, SATO S, NAKAFUSA Y, MIYAZAKI K. *Helicobacter pylori* infection is an independent risk factor for *Runx3* methylation in gastric cancer **Oncol Rep** 2008; 19(1):197-202.
- KIVI M, TINDBERG Y. *Helicobacter pylori* occurrence and transmission: a family affair? **Scand J Infect Dis** 2006; 38(6-7):407-17.
- KOLEV Y, UETAKE H, IIDA S, ISHIKAWA T, KAWANO T, SUGIHARA K. Prognostic significance of VEGF expression in correlation with COX-2, microvessel density, and clinicopathological characteristics in human gastric carcinoma. **Ann Surg Oncol** 2007; 14(10):2738-47.
- KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC, JR WINN WC. Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido. Guanabara Koogan. 6ed., 2008.
- KONTUREK JW. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. **J Physiol Pharmacol** 2003; 54 Suppl 3:23-41.
- KONTUREK PC, KANIA J, BURNAT G, HAHN EG, KONTUREK SJ. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. **J Physiol Pharmacol** 2005; 56 Suppl 5:57-73.
- KONTUREK PC, KONTUREK JW, KONTUREK SJ. Gastric secretion and the pathogenesis of peptic ulcer in *Helicobacter pylori* infection: Historical Background - Polish link to discovery of spiral bacteria in the stomach. **J Physiol Pharmacol** 1996; 47:5-19.
- KONTUREK PC, KONTUREK SJ, BRZOZOWSKI T. Gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. **J Physiol Pharmacol** 2006; 57 Suppl 3:51-65.
- KONTUREK PC, PIERZCHALSKI P, KONTUREK SJ, MEIXNER H, FALLER G, KIRCHNER T, HAHN EG. *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric mucosa through an upregulation of Bax expression in humans. **Scand J Gastroenterol** 1999; 34(4):375-83.
- KSIAA F, ZIADI S, AMARA K, KORBI S, TRIMECHE M. Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma. **Clin Chim Acta** 2009; 404(2):128-33.
- KWOK T, ZABLER D, URMAN S, ROHDE M, HARTIG R, WESSLER S, MISSELWITZ R, BERGER J, SEWALD N, KÖNIG W, BACKERT S. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. **Nature** 2007; 449(7164):862-6.
- LABIGNE A, CUSSAC V, COURCOUX P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. **J Bacteriol** 1991; 173(6):1920-31.
- LADEIRA MSP, SALVADORI DMF, RODRIGUES MAM. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 2003; 39:335-342.
- LAGE AP, GODFROID E, FAUCONNIER A, BURETTE A, BUTZLER JP, BOLLEN A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive

techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. **J Clin Microbiol** 1995; 33:2752-6.

LAIRD PW. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer** 2003; 3(4):253-66.

LANDBERG G, ROOS G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. **Cell Prolif** 1993; 26:427-437.

LAUREN P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffused and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1965; 64:31-49.

LETLEY DP, ATHERTON JC. Natural diversity in the N terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity. **J Bacteriol** 2000; 182(11):3278-80.

LEUNG SY, YUEN ST, CHUNG LP, CHU KM, CHAN AS, HO JC. *hMLH1* promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. **Cancer Res** 1999; 59(1):159-64.

LEUNG WK, MAN EP, YU J, GO MY, TO KF, YAMAOKA Y, CHENG VY, NG EK, SUNG JJ. Effects of *Helicobacter pylori* eradication on methylation status of *E-cadherin* gene in noncancerous stomach. **Clin Cancer Res** 2006; 12(10):3216-21.

LEUNG WK, TO KF, NG YP, LEE TL, LAU JY, CHAN FK, NG EK, CHUNG SC, SUNG JJ. Association between cyclo-oxygenase-2 overexpression and missense p53 mutations in gastric cancer. **Br J Cancer** 2001; 84(3):335-9.

LEUNK RD, JOHNSON PT, DAVID BC, KRAFT WG, MORGAN DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. **J Med Microbiol** 1988; 26(2):93-9.

LEWIN KJ, APPELMAN HD. Atlas of Tumor Pathology: Tumors of the Esophagus and Stomach. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D.C. 1996.

LI CQ, PIGNATELLI B, OHSHIMA H. Coexpression of interleukin-8 and inducible nitric oxide synthase in gastric mucosa infected with *cagA*+ *Helicobacter pylori*. **Dig Dis Sci** 2000; 45(1):55-62.

LI GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Res** 2008; 18(1):85-98.

LI JH, SHI XZ, LV S, LIU M, XU GW. Effect of *Helicobacter pylori* infection on p53 expression of gastric mucosa and adenocarcinoma with microsatellite instability. **World J Gastroenterol** 2005; 11(28):4363-6.

LI M, LIU L, WANG Z, WANG L, LIU Z, XU G, LU S. Overexpression of hMSH2 and hMLH1 protein in certain gastric cancers and their surrounding mucosae. **Oncol Rep** 2008; 19(2):401-6.

LIANG J, ZUBOVITZ J, PETROCELLI T, KOTCHETKOV R, CONNOR MK, HAN K, LEE JH, CIARALLO S, CATZAVELOS C, BENISTON R, FRANSSEN E, SLINGERLAND JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. **Nat Med** 2002; 8:1153-1160.

LIM HY, JOO HJ, CHOI JH, YI JW, YANG MS, CHO DY, KIM HS, NAM DK, LEE KB, KIM HC. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. **Clin Cancer Res** 2000; 6(2):519-25.

LIMA VP, DE LIMA MA, ANDRÉ AR, FERREIRA MV, BARROS MA, RABENHORST SH. *H pylori* (CagA) and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas: correlation with p53 mutation and c-Myc, Bcl-2 and Bax expression. **World J Gastroenterol** 2008; 14(6):884-91.

LIMA VP, LIMA MA, FERREIRA MV, BARROS MA, RABENHORST SH. The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. **Int J Infect Dis** 2010; 14(7):e613-7.

LIN HJ, PERNG CL, LO WC, WU CW, TSENG GY, LI AF, SUN IC, OU YH. *Helicobacter pylori* *cagA*, *iceA* and *vacA* genotypes in patients with gastric cancer in Taiwan. **World J Gastroenterol** 2004; 10(17):2493-7.

LOCHHEAD P, EL-OMAR EM. Gastric cancer. **Br Med Bull** 2008; 85:87-100.

LOPES LF, BACCHI MM, ELGUI-DE-OLIVEIRA D, ZANATI SG, ALVARENGA M, BACCHI CE. Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma in São Paulo State, Brazil. **Braz J Med Biol Res** 2004; 37:1707-1712.

LOURENÇO LG, HAMADA GS. Gastric cancer in Brazil. **Gastric Cancer** 2001; 4:103-105.

LOW VH, LEVINE MS, RUBESIN SE, LAUFER I, HERLINGER H. Diagnosis of gastric carcinoma: sensitivity of double-contrast barium studies. **AJR Am J Roentgenol** 1994; 162:329-34.

MAEKITA T, NAKAZAWA K, MIHARA M, NAKAJIMA T, YANAOKA K, IGUCHI M, ARII K, KANEDA A, TSUKAMOTO T, TATEMATSU M, TAMURA G, SAITO D, SUGIMURA T, ICHINOSE M, USHIJIMA T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. **Clin Cancer Res** 2006; 12(3 Pt 1):989-95.

MAGALHÃES QUEIROZ DM, LUZZA F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter** 2006; 11:1-5.

MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O'MORAIN C, BAZZOLI F, EL-OMAR E, GRAHAM D, HUNT R, ROKKAS T, VAKIL N, KUIPERS EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. **Gut** 2007; 56(6):772-81.

MANES G, BALZANO A, IAQUINTO G, RICCI C, PICCIRILLO MM, GIARDULLO N, TODISCO A, LIONIELLO M, VAIRA D. Accuracy of stool antigen test in posteradication assessment of *Helicobacter pylori* infection. **Dig Dis Sci** 2001; 46(11):2440-4.

MARSHALL BJ. *Helicobacter pylori* in the year 2000. *Helicobacter pylori* Foundation, p.1-9, 2000.

MARSHALL BJ, ROYCE H, ANNEAR DI. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. **Microbiol Lett** 1984; 25:83-88.

MCCARTHY CJ, CROFFORD LJ, GREENSON J, SCHEIMAN JM. Cyclooxygenase-2 expression in gastric antral mucosa before and after eradication of *Helicobacter pylori* infection. **Am J Gastroenterol** 1999; 94(5):1218-23.

MCCARTY KS JR, MILLER LS, COX EB, KONRATH J, MCCARTY KS SR. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. **Arch Pathol Lab Med** 1985; 109:716-21.

MCCARTER L, SILVERMAN M. Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. **Mol Microbiol** 1990; 4(7):1057-62.

MICHETTI P, CORTHÉSY-THEULAZ I, DAVIN C, HAAS R, VANEY AC, HEITZ M, BILLE J, KRAEHENBUHL JP, SARAGA E, BLUM AL. Immunization of BALB/c mice against *Helicobacter felis* infection with *Helicobacter pylori* urease. **Gastroenterology** 1994; 107(4):1002-11.

MINO A, ONODA N, YASHIRO M, AYA M, FUJIWARA I, KUBO N, SAWADA T, OHIRA M, KATO Y, HIRAKAWA K. Frequent *p16* CpG island hypermethylation in primary remnant gastric cancer suggesting an independent carcinogenic pathway. **Oncol Rep** 2006; 15(3):615-20.

MIRZAEI V, MOLAEI M, SHALMANI HM, ZALI MR. *Helicobacter pylori* infection and expression of DNA mismatch repair proteins. **World J Gastroenterol** 2008; 14(43):6717-21.

MIZOSHITA T, TSUKAMOTO T, CAO X, OTSUKA T, ITO S, TAKAHASHI E, NAKAMURA S, NAKAMURA T, YAMAMURA Y, TATEMATSU M. Microsatellite instability is linked to loss of *hMLH1* expression in advanced gastric cancers: lack of a relationship with the histological type and phenotype. **Gastric Cancer** 2005; 8(3):164-72.

MOBLEY HLT, MENDZ GL, HAZELL SL. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM Press, Washington, 2001.

MÓDENA JL, ACRANI GO, MICAS AF, CASTRO M, SILVEIRA WD, MÓDENA JL, OLIVEIRA RB, BROCCHI M. Correlation between *Helicobacter pylori* infection, gastric diseases and life habits among patients treated at a university hospital in Southeast Brazil. **Braz J Infect Dis** 2007; 11:89-95.

MONTEIRO L, DE MASCAREL A, SARRASQUETA AM, BERGEY B, BARBERIS C, TALBY P, ROUX D, SHOULER L, GOLDFAIN D, LAMOULIATTE H, MÉGRAUD F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. **Am J Gastroenterol** 2001; 96(2):353-8.

MORBIATO L, TOMBOLA F, CAMPELLO S, DEL GIUDICE G, RAPPUOLI R, ZORATTI M, PAPINI E. Vacuolation induced by VacA toxin of *Helicobacter pylori* requires the intracellular accumulation of membrane permeant bases, Cl(-) and water. **FEBS Lett** 2001; 508(3):479-83.

MOTOSHITA J, OUE N, NAKAYAMA H, KURAOKA K, AUNG PP, TANIYAMA K, MATSUSAKI K, YASUI W. DNA methylation profiles of differentiated-type gastric carcinomas with distinct mucin phenotypes. **Cancer Sci** 2005; 96(8):474-9.

- MURATA H, KAWANO S, TSUJI S, TSUJI M, SAWAOKA H, KIMURA Y, SHIOZAKI H, HORI M. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. **Am J Gastroenterol** 1999; 94(2):451-5.
- NAKAJIMA T, AKIYAMA Y, SHIRAISHI J, ARAI T, YANAGISAWA Y, ARA M, FUKUDA Y, SAWABE M, SAITOH K, KAMIYAMA R, HIROKAWA K, YUASA Y. Age-related hypermethylation of the *hMLH1* promoter in gastric cancers. **Int J Cancer** 2001; 94(2):208-11.
- NAKAYAMA M, KIMURA M, WADA A, YAHIRO K, OGUSHI K, NIIDOME T, FUJIKAWA A, SHIRASAKA D, AOYAMA N, KURAZONO H, NODA M, MOSS J, HIRAYAMA T. *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. **J Biol Chem** 2004; 279(8):7024-8.
- NAPIERALSKI R, Ott K, Kremer M, Becker K, Boulesteix AL, Lordick F, Siewert JR, Höfler H, Keller G. Methylation of tumor-related genes in neoadjuvant-treated gastric cancer: relation to therapy response and clinicopathologic and molecular features. **Clin Cancer Res** 2007; 13:5095-102.
- NIEDOBITEK G. The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? **Virchows Arch** 1999; 435:79-86.
- NOMURA A, STEMMERMANN GN, CHYOU PH, KATO I, PEREZ-PEREZ GI, BLASER MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. **N Engl J Med** 1991; 325(16):1132-6.
- OBST B, WAGNER S, SEWING KF, BEIL W. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. **Carcinogenesis** 2000; 21(6):1111-5.
- OKANO M, BELL DW, HABER DA, LI E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell** 1999; 99(3):247-57.
- OTTEMANN KM, LOWENTHAL AC. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. **Infect Immun** 2002; 70(4):1984-90.
- QUE N, MITANI Y, MOTOSHITA J, MATSUMURA S, YOSHIDA K, KUNIYASU H, NAKAYAMA H, YASUI W. Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. **Cancer** 2006; 106(6):1250-9.
- PANANI AD. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. **Cancer Lett** 2008; 266(2):99-115.
- PARK DI, PARK SH, KIM SH, KIM JW, CHO YK, KIM HJ, SOHN CI, JEON WK, KIM BI, CHO EY, KIM EJ, CHAE SW, SOHN JH, SUNG IK, SEPULVEDA AR, KIM JJ. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the expression of DNA mismatch repair protein. **Helicobacter** 2005; 10(3):179-84.
- PARKIN DM. Global cancer statistics in the year 2000. **Lancet Oncol** 2001; 2(9):533-43.
- PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J, PISANI P. Global Cancer Statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin**, v.55, p. 74-108, 2005.

- PARSONNET J, VANDERSTEEN D, GOATES J, SIBLEY RK, PRITIKIN J, CHANG Y. *Helicobacter pylori* infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. **J Natl Cancer Inst**, v. 83, p. 640-643, 1991.
- PECTASIDES D, MYLONAKIS A, KOSTOPOULOU M, PAPADOPOULOU M, TRIANTAFILLIS D, VARTHALITIS J, DIMITRIADES M, ATHANASSIOU A. CEA, CA 19-9, and CA-50 in monitoring gastric carcinoma. **Am J Clin Oncol** 1997; 20(4):348-53.
- PEEK RM JR, BLASER MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:28-37.
- PERRI F, COTUGNO R, PIEPOLI A, MERLA A, QUITADAMO M, GENTILE A, PILOTTO A, ANNESE V, ANDRIULLI A. Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of *H. pylori* infected patients and effect of eradication. **Am J Gastroenterol** 2007; 102(7):1361-71.
- PLEVOVÁ P, SEDLÁKOVÁ E, ZAPLETALOVÁ J, KREPELOVÁ A, SKÝPALOVÁ P, KOLÁR Z. Expression of the hMLH1 and hMSH2 proteins in normal tissues: relationship to cancer predisposition in hereditary non-polyposis colon cancer. **Virchows Arch** 2005; 446(2):112-9.
- PÖSCHL G, SEITZ HK. Alcohol and cancer. **Alcohol Alcohol**. 2004; 39(3):155-65.
- QUEIROZ DM, MENDES EN, ROCHA GA, OLIVEIRA AM, OLIVEIRA CA, CABRAL MM, NOGUEIRA AM, SOUZA AF. Serological and direct diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastric carcinoma: a case-control study. **J Med Microbiol** 1999; 48(5):501-6.
- RHEAD JL, LETLEY DP, MOHAMMADI M, HUSSEIN N, MOHAGHEGHI MA, ESHAGH HOSSEINI M, ATHERTON JC. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. **Gastroenterology** 2007; 133(3):926-36.
- RICCI C, HOLTON J, VAIRA D. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: invasive and non-invasive tests. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2007; 21(2):299-313.
- ROBERTSON KD. DNA methylation and human disease. **Nat Rev Genet** 2005; 6(8):597-610.
- RODER DM. The epidemiology of gastric cancer. **Gastric Cancer** 2002; 5:5-11.
- ROMANO M, RICCI V, MEMOLI A, TUCCILLO C, DI POPOLO A, SOMMI P, ACQUAVIVA AM, DEL VECCHIO BLANCO C, BRUNI CB, ZARRILLI R. *Helicobacter pylori* up-regulates cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 synthesis in MKN 28 gastric mucosal cells in vitro. **J Biol Chem** 1998; 273(44):28560-3.
- ROTIMI O, CAIRNS A, GRAY S, MOAYYEDI P, DIXON MF. Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. **J Clin Pathol** 2000; 53(10):756-9.
- RUSSO VEA, MARTIENSSEN RA, RIGGS AD. Epigenetic mechanisms of gene regulation. Woodbury: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.
- SAUKKONEN K, NIEMINEN O, VAN REES B, VILKKI S, HÄRKÖNEN M, JUHOLA M, MECKLIN JP, SIPPONEN P, RISTIMÄKI A. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia

- of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma. **Clin Cancer Res** 2001; 7(7):1923-31.
- SCHMITT W, HAAS R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. **Mol Microbiol** 1994; 12(2):307-19.
- SEO HM, CHANG YS, JOO SH, KIM YW, PARK YK, HONG SW, LEE SH. Clinicopathologic characteristics and outcomes of gastric cancers with the MSI-H phenotype. **J Surg Oncol** 2009; 99(3):143-7.
- SHANG J, PENA AS. Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2005; 11:4131-4139.
- SHARMA S, KELLY TK, JONES PA. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis** 2009; 13.
- SHEU BS, YANG HB, SHEU SM, HUANG AH, WU JJ. Higher gastric cyclooxygenase-2 expression and precancerous change in *Helicobacter pylori*-infected relatives of gastric cancer patients. **Clin Cancer Res** 2003; 9(14):5245-51
- SHI H, XU JM, HU NZ, XIE HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. **World J Gastroenterol** 2003; 9(7):1421-6.
- SHIM YH, KANG GH, RO JY. Correlation of *p16* hypermethylation with *p16* protein loss in sporadic gastric carcinomas. **Lab Invest** 2000; 80(5):689-95.
- SON HJ, KIM YH, PARK DI, KIM JJ, RHEE PL, PAIK SW, CHOI KW, SONG SY, RHEE JC. Interaction between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. **J Clin Gastroenterol** 2001; 33(5):383-8.
- SONG SH, JONG HS, CHOI HH, INOUE H, TANABE T, KIM NK, BANG YJ. Transcriptional silencing of *Cyclooxygenase-2* by hyper-methylation of the 5' CpG island in human gastric carcinoma cells. **Cancer Res** 2001; 61(11):4628-35.
- SOZZI M, TOMASINI ML, VINDIGNI C, ZANUSSI S, TEDESCHI R, BASAGLIA G, FIGURA N, DE PAOLI P. Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. **J Lab Clin Med** 2005; 146:262-70.
- STEER HW. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relation to bacteria. **J Clin Pathol** 1975; 28:639-646.
- STERNBERG A, COSCAS D, WAGNER Y, AUSLANDER L, KAUFSTEIN M, FIREMAN Z. Comparison of various *Helicobacter pylori* detection methods: serology, histology and bacteriology. **Isr J Med Sci** 1997; 33(3):160-3.
- STRATHDEE G, BROWN R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. **Expert Rev Mol Med** 2002; 4(4):1-17.
- SUERBAUM S. The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. **Trends Microbiol** 1995; 3:168-70.

- SUERBAUM S, JOSENHANS C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. **Nat Rev Microbiol** 2007; 5(6):441-52.
- SUGIMOTO M, YAMAOKA Y. The association of *vacA* genotype and *Helicobacter pylori*-related disease in Latin American and African populations. **Clin Microbiol Infect** 2009; 15(9):835-42.
- SUPAJATURA V, USHIO H, WADA A, YAHIRO K, OKUMURA K, OGAWA H, HIRAYAMA T, RA C. Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. **J Immunol** 2002; 168(6):2603-7.
- SUZUKI H, HIBI T, MARSHALL BJ. *Helicobacter pylori*: present status and future prospects in Japan. **J Gastroenterol** 2007; 42:1-15.
- TAHARA E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. Genetic pathways of two types of gastric cancer. **IARC Sci Publ** 2004; 157:327-49.
- TAHARA E, KUNIYASU H, YASUI W, YOKOZAKI H. Gene alterations in intestinal metaplasia and gastric cancer. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 1994; 6:S97-102.
- TAHARA T, ARISAWA T, SHIBATA T, NAKAMURA M, YOSHIOKA D, OKUBO M, MARUYAMA N, KAMANO T, KAMIYA Y, FUJITA H, NAKAGAWA Y, NAGASAKA M, IWATA M, TAKAHAMA K, WATANABE M, YAMASHITA H, HIRATA I. Increased number of methylated CpG islands correlates with *Helicobacter pylori* infection, histological and serological severity of chronic gastritis. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2009; 21:613-9.
- TELFORD JL, GHIARA P, DELL'ORCO M, COMANDUCCI M, BURRONI D, BUGNOLI M, TECCE MF, CENSINI S, COVACCI A, XIANG Z, PAPINI E, MONTECUCCO C, PARENTE L, RAPPUOLI R. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. **J Exp Med** 1994; 179(5):1653-58.
- TERRÉS AM, PAJARES JM, O'TOOLE D, AHERN S, KELLEHER D. *H pylori* infection is associated with downregulation of E-cadherin, a molecule involved in epithelial cell adhesion and proliferation control. **J Clin Pathol** 1998; 51(5):410-2.
- THOMAZINI CM, PINHEIRO NA, PARDINI MI, NARESSE LE, RODRIGUES MAM. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: distribution of *cagA* and *vacA* genotypes in patients with gastric carcinoma. **J Bras Patol Med Lab** 2006; 42:25-30.
- TOMASINI ML, ZANUSSI S, SOZZI M, TEDESCHI R, BASAGLIA G, DE PAOLI P. Heterogeneity of *cag* genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. **J Clin Microbiol** 2003; 41:976-980.
- TOMB JF, WHITE O, KERLAVAGE AR, CLAYTON RA, SUTTON GG, FLEISCHMANN RD, KETCHUM KA, KLENK HP, GILL S, DOUGHERTY BA, NELSON K, QUACKENBUSH J, ZHOU L, KIRKNESS EF, PETERSON S, LOFTUS B, RICHARDSON D, DODSON R, KHALAK HG, GLODEK A, MCKENNEY K, FITZGERALD LM, LEE N, ADAMS MD, HICKEY EK, BERG DE, GOCAYNE JD, UTTERBACK TR, PETERSON JD, KELLEY JM, COTTON MD, WEIDMAN JM, FUJII C, BOWMAN C, WATTHEY L, WALLIN E, HAYES WS, BORODOVSKY M, KARP PD, SMITH HO, FRASER CM, VENTER JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature** 1997; 388(6642):539-47.

- TOYOTA M, AHUJA N, OHE-TOYOTA M, HERMAN JG, BAYLIN SB, ISSA JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96(15):8681-6.
- TSENG CA, WANG WM, WU DC. Comparison of the clinical feasibility of three rapid urease tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Dig Dis Sci** 2005; 50(3):449-52.
- TYLER JK, KADONAGA JT. The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. **Cell** 1999; 99(5):443-6.
- UEFUJI K, ICHIKURA T, MOCHIZUKI H. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric adenomas and adenocarcinomas. **J Surg Oncol** 2001; 76(1):26-30.
- USHIJIMA T, NAKAJIMA T, MAEKITA T. DNA methylation as a marker for the past and future. **J Gastroenterol** 2006; 41(5):401-7.
- USHIJIMA T, SASAKO M. Focus on gastric cancer. **Cancer Cell** 2004; 5(2):121-5.
- VAIRA D, VAKIL N. Blood, urine, stool, breath, money, and *Helicobacter pylori*. **Gut** 2001; 48(3):287-9.
- VAIRA D, VAKIL N, MENEGATTI M, VAN'T HOFF B, RICCI C, GATTA L, GASBARRINI G, QUINA M, PAJARES GARCIA JM, VAN DER ENDE A, VAN DER HULST R, ANTI M, DUARTE C, GISBERT JP, MIGLIOLI M, TYTGAT G. The stool antigen test for detection of *Helicobacter pylori* after eradication therapy. **Ann Intern Med** 2002; 136(4):280-7.
- VAN DOORN LJ, FIGUEIREDO C, SANNA R, PENA S, MIDOLO P, NG EK, ATHERTON JC, BLASER MJ, QUINT WG. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. **J Clin Microbiol** 1998; 36(9):2597-603.
- VAUHKONEN M, VAUHKONEN H, SIPPONEN P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2006; 20(4):651-74.
- VEIGL ML, KASTURI L, OLECHNOWICZ J, MA AH, LUTTERBAUGH JD, PERIYASAMY S, LI GM, DRUMMOND J, MODRICH PL, SEDWICK WD, MARKOWITZ SD. Biallelic inactivation of *hMLH1* by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95(15):8698-702.
- VELICESCU M, WEISENBERGER DJ, GONZALES FA, TSAI YC, NGUYEN CT, JONES PA. Cell division is required for de novo methylation of CpG islands in bladder cancer cells. **Cancer Res** 2002; 62:2378-84.
- VIDAURRETA M, MAESTRO ML, SANZ-CASLA MT, MAESTRO C, RAFAEL S, VEGANZONES S, MORENO J, BLANCO J, SILMI A, ARROYO M. Inactivation of *p16* by CpG hypermethylation in renal cell carcinoma. **Urol Oncol** 2008; 26(3):239-45.
- WADDINGTON CH. Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of drosophila. **Proc Natl Acad Sci USA** 1939; 25:299-307.
- WAJED SA, LAIRD PW, DEMEESTER TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. **Ann Surg** 2001; 234(1):10-20.

WAKI T, TAMURA G, TSUCHIYA T, SATO K, NISHIZUKA S, MOTOYAMA T. Promoter methylation status of *E-cadherin*, *hMLH1*, and *p16* genes in nonneoplastic gastric epithelia. **Am J Pathol** 2002; 161(2):399-403.

WEN S, MOSS SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer Lett** 2009; 282(1):1-8.

WORLD CANCER RESEARCH FUND / AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR, 2007.

WU CC, CHOU PY, HU CT, LIU ZC, LIN CY, TSENG YH, LIN NT. Clinical Relevance of the *vacA*, *iceA*, *cagA*, and *flaA* genes of *Helicobacter pylori* strains isolated in Eastern Taiwan. **J Clin Microbiol** 2005; 43(6):2913-5.

YAMAC D, AYYILDIZ T, COŞKUN U, AKYÜREK N, DURSUN A, SECKIN S, KOYBASIOĞLU F. Cyclooxygenase-2 expression and its association with angiogenesis, *Helicobacter pylori*, and clinicopathologic characteristics of gastric carcinoma. **Pathol Res Pract** 2008; 204(8):527-36.

YAN J, LIANG SH, MAO YF, LI LW, LI SP. Construction of expression systems for *flaA* and *flaB* genes of *Helicobacter pylori* and determination of immunoreactivity and antigenicity of recombinant proteins. **World J Gastroenterol** 2003; 9(10):2240-2250

YAO Y, TAO H, KIM JJ, BURKHEAD B, CARLONI E, GASBARRINI A, SEPULVEDA AR. Alterations of DNA mismatch repair proteins and microsatellite instability levels in gastric cancer cell lines. **Lab Invest** 2004; 84(7):915-22.

YASUI W, OUE N, KUNİYASU H, ITO R, TAHARA E, YOKOZAKI H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. **Gastric Cancer** 2001; 4:113-21.

YOUNG GM, SCHMIEL DH, MILLER VL. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1999; 96(11):6456-61.

YU LZ, GAO HJ, BAI JF, SUN G, ZHAO HL, SUN L, MIU K, ZHAO ZQ. Expression of COX-2 proteins in gastric mucosal lesions. **World J Gastroenterol** 2004; 10(2):292-4.

YU J, LEUNG WK, LEE TL, TSE PC, TO KF, SUNG JJ. Promoter hypermethylation of *cyclooxygenase-2* in gastric carcinoma. **Int J Oncol** 2003; 22:1025- 31.

XUE YW, ZHANG QF, ZHU ZB, WANG Q, FU SB. Expression of cyclooxygenase-2 and clinicopathologic features in human gastric adenocarcinoma. **World J Gastroenterol** 2003; 9(2):250-3.

ZHANG KL, SUN Y, LI Y, LIU M, QU B, CUI SH, KONG QY, CHEN XY, LI H, LIU J. Increased frequency of CpG island methylator phenotype and *CDH1* methylation in a gastric cancer high-risk region of china. **Transl Oncol** 2008; 1(1):28-35.

ZHAO GH, LI TC, SHI LH, XIA YB, LU LM, HUANG WB, SUN HL, ZHANG YS. Relationship between inactivation of *p16* gene and gastric carcinoma. **World J Gastroenterol** 2003; 9(5):905-9.

ZHAO YF, ZHANG YG, TIAN XX, JUAN DU, ZHENG J. Aberrant methylation of multiple genes in gastric carcinomas. **Int J Surg Pathol** 2007; 15:242-51.

ZHOU J, YANG D, ZHANG L, WANG J, YAO Q, SU Z, FAN Y. Study on the relationship of alteration and expression of *p16* gene to pancreatic carcinoma. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi** 2000; 17(6):399-403.

ZOU XP, ZHANG B, ZHANG XQ, CHEN M, CAO J, LIU WJ. Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions. **Hum Pathol** 2009; 40(11):1534-42.

ZSIKLA V, HAILEMARIAM S, BAUMANN M, MUND MT, SCHAUB N, MEIER R, CATHOMAS G. Increased rate of *Helicobacter pylori* infection detected by PCR in biopsies with chronic gastritis. **Am J Surg Pathol** 2006; 30(2):242-8.

10- ANEXOS

Anexo I



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 712/04

Fortaleza, 30 de novembro de 2004

Protocolo nº 199/04

Pesquisador responsável: Silvia Helena Barem Rabenhorst

Deptº./Serviço: Departamento de Patologia e Medicina Legal/UFC

Título do Projeto: "Alterações moleculares no câncer gástrico: associação com fatores epidemiológicos"

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 25 de novembro de 2004.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente,

Mirian Parente Monteiro.

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/HUWCUFC

Anexo II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituição: DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL – UFC

LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR – LABGEM

Endereço: RUA Coronel Nunes de Melo, 1127, Porangabuçu

Investigadora: Responsável: Silvia Helena Barem Rabenhorst

Título: ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CÂNCER GÁSTRICO: ASSOCIAÇÃO COM FATORES EPIDEMIOLÓGICOS

Eu, _____ por este meio, fui informado (a), em detalhes sobre o estudo intitulado: ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CÂNCER GÁSTRICO: ASSOCIAÇÃO COM FATORES EPIDEMIOLÓGICOS. O estudo está sendo realizado pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. O estudo em questão pretende associar fatores genéticos e ambientais, que podem levar ao desenvolvimento do carcinoma gástrico, de modo a identificar os fatores de risco, tais como a presença de uma bactéria denominada *H. pylori* e de um vírus denominado EBV. Esses serão detectados através da presença do material genético destes agentes infectantes no tumor. Serão também observadas as alterações genéticas das células tumorais. Estas alterações serão vistas pela expressão de proteínas, ou pela análise do DNA/RNA do tumor.

Cerca de 100 pacientes serão incluídos no presente estudo. Portanto, concordando em participar serei um dos pacientes participantes deste estudo que envolve diversas instituições, permitindo coleta de material necessário para o estudo. Não haverá mudança ou perdas em relação à análise pelo patologista do meu material. Paralelamente, serão anotadas algumas questões referentes à minha pessoa, no que diz respeito a dados pessoais como a data de nascimento e relativo a hábitos de vida e a minha doença. Estas informações serão retiradas do meu prontuário ou na ausência delas, serão perguntadas pessoalmente a mim.

Minha participação não terá benefício direto imediato, em princípio, mas que poderá estar contribuindo para que se entendam melhor os fatores de risco e alterações que propiciem o aparecimento do câncer gástrico. A identificação dos fatores de risco para câncer gástrico servirá para direcionar medidas preventivas. Por outro lado as alterações dos materiais genéticos encontradas nas células tumorais poderão ser usadas como fatores que auxiliarão no diagnóstico, prognóstico e também como alvos das novas terapias que estão sendo agora desenvolvidas.

Todos os dados da minha participação neste estudo serão documentados e mantidos confidencialmente, sendo disponíveis apenas para as autoridades de saúde e profissionais envolvidos neste estudo, os quais, quando necessário, terão acesso ao meu prontuário.

Como minha participação é voluntária, posso abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isso resulte em qualquer penalidade ou perda de meus direitos onde recebo atendimento médico. Se tiver qualquer dúvida ou perguntas relativas a esse estudo ou aos meus direitos no que diz respeito a minha participação, posso contactar a Dra. Silvia Helena Rabenhorst no telefone 3288 8206 ou 9994 5689.

Assinatura do paciente: _____

Endereço do paciente: _____

Telefone: _____ Data: ____/____/____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do investigador: _____

Anexo III**Cadastro de Pacientes Submetidos à Coleta de Tecido de Peça Cirúrgica**

Código: CG _____ Data: ____/____/____

Nº Prontuário: _____ Data de admissão no serviço hospitalar: ____/____/____

Depto Responsável: _____ Hospital: _____

Nome: _____ Sexo F ☐ M ☐

Endereço: _____

Contato: _____ Naturalidade: _____ Procedência: _____

Idade: _____ Nasc: ____/____/____ Cor: _____ ABO: _____

Grau de instrução: _____ Profissão: _____

História familiar:☐ Avô ☐ Avó ☐ Mãe ☐ Pai ☐ Irmão(ã) ☐ Tio(a) ☐ Filho(a)

Outros _____

Hábitos: ☐ Sal ☐ Frutas ☐ Verduras ☐ Churrasco ☐ Carne seca ☐ geladeira☐ Tabagista Tipo _____ Frequência _____ Fum. passivo ☐☐ Álcool Tipo _____ Frequência _____**Dados relativos à neoplasia.**

Data do primeiro diagnóstico: ____/____/____ Exame: _____

H. pylori ☐

Sítio anatômico: _____ Est. Clínico: T _____ N _____ M _____

Aspecto morfológico: _____ Bormann: _____

Exame anatomopatológico Nº: _____**Tratamento:** ☐ Radioterapia ☐ Quimioterapia ☐ Hormonioterapia ☐ Imunoterapia

Protocolo _____

Cirurgia: realizada em ____/____/____ Cirurgião _____**Responsável pela Coleta** _____Tempo de ressecção da coleta: ☐ <1h ☐ 1h ☐ 2h ☐ 3h ☐ < ou =4h ☐ Outras _____**Observações** _____Nº de amostra Tumoral congelada ☐ Nº de amostra Normal ☐

Local Armazenamento: _____



Anexo IV

Artigo publicado *APMIS Journal* intitulado: ***CDKN2A* promoter methylation is related to the tumor location and histological subtype and associated with *Helicobacter pylori* *flaA*(+) strains in gastric adenocarcinomas.**

***CDKN2A* promoter methylation is related to the tumor location and histological subtype and associated with *Helicobacter pylori* *flaA*(+) strains in gastric adenocarcinomas**

MARKÊNIA KÉLIA SANTOS ALVES,¹ VALESKA PORTELA LIMA,¹ ADRIANA CAMARGO FERRASI,² MARIA APARECIDA RODRIGUES,² MARIA INÊS DE MOURA CAMPOS PARDINI² and SILVIA HELENA BAREM RABENHORST¹

¹Microbiology Section, Department of Pathology and Forensic Medicine, Federal University of Ceará, Porangabussu Campus, Ceará; and ²Molecular Biology Laboratory, Botucatu Hemocenter, School of Medicine, Paulista State University, Botucatu Campus, São Paulo, Brazil

Alves MKS, Lima VP, Ferrasi AC, Rodrigues MA, de Moura Campos Pardini MI, Rabenhorst SHB. *CDKN2A* promoter methylation is related to the tumor location and histological subtype and associated with *Helicobacter pylori* *flaA*(+) strains in gastric adenocarcinomas. APMIS 2010; 118: 297–307.

Promoter hypermethylation of *CDKN2A* (p16^{INK4A} protein) is the main mechanism of gene inactivation. However, its association with *Helicobacter pylori* infection is a controversial issue. Therefore, we examined a series of gastric adenocarcinomas to assess the association between p16^{INK4A} inactivation and *H. pylori* genotype (*vacA*, *cagA*, *cagE*, *virB11* and *flaA*) according to the location and histological subtype of the tumors. p16^{INK4A} expression and *CDKN2A* promoter methylation were found in 77 gastric adenocarcinoma samples by immunohistochemistry and methylation-specific PCR, respectively. *Helicobacter pylori* infection and genotype were determined by PCR. A strong negative correlation between immunostaining and *CDKN2A* promoter region methylation was found. In diffuse subtype tumors, the inactivation of p16^{INK4A} by promoter methylation was unique in noncardia tumors ($p = 0.022$). In addition, *H. pylori*-bearing *flaA* was associated with non-methylation tumors ($p = 0.008$) and *H. pylori* strain bearing *cagA* or *vacA*s1m1 genes but without *flaA* was associated with methylated tumors ($p = 0.022$ and 0.003 , respectively). Inactivation of p16^{INK4A} in intestinal and diffuse subtypes showed distinct carcinogenic pathways, depending on the tumor location. Moreover, the process of methylation of the *CDKN2A* promoter seems to depend on the *H. pylori* genotype. The present data suggest that there is a differential influence and relevance of *H. pylori* genotype in gastric cancer development.

Key words: p16^{INK4A}; gastric cancer; histological subtypes; tumor location; methylation; *Helicobacter pylori* genotypes.

Markênia Kélia Santos Alves, Rua Osvaldo Cruz, 3485, Dionísio Torres, Fortaleza, Ceará 60125-151, Brazil. e-mail: markenialves@yahoo.com.br; markenia_alves@hotmail.com

Gastric cancer (GC) is an important worldwide health problem because of its high frequency, poor prognosis, advanced stage at

the time of diagnosis and limited treatment options (1, 2).

There is much evidence that the carcinogenesis process involves abnormalities of cell cycle regulators (3, 4). In GC, besides p53, p16^{INK4A} (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A-*CDKN2A*)

Received 22 November 2009. Accepted 14 January 2010

is often inactivated (3, 5–9). The p16^{INK4A} protein is a cell cycle regulator involved in the inhibition of G1 (Gap1) phase progression, and although the common mechanism of its inactivation is through the hypermethylation of its promoter, few studies have evaluated this process in GC considering the distinct histological subtypes, tumor location (10, 11) and possible causes leading to this.

Helicobacter pylori is a major environmental factor associated with the development of GC (12). Its high genetic variability has been related to its virulence and consequently to disease outcome (13–15). Two well-established virulence factors are the presence of the cytotoxin-associated antigen A (*cagA*) gene, located within the right portion of the *cag* pathogenicity island (*cag*-PAI), and vacuolating cytotoxin A (*vacA*), mostly the *vacAslml* allele (16, 17). *cag*-PAI also has *cagE* and *virB11* genes, located in the right and left regions of the island, respectively. These genes are thought to play a role in constructing the type IV secretion system and inducing proinflammatory, pro-proliferative epithelial cell signaling (13, 18, 19). Another important *H. pylori* virulence factor is the presence of flagella, codified by several genes, such as *flaA* and *flaB*, which are responsible for successful colonization of its unusual habitat. The *flaA* gene is the main factor responsible for codification of the flagellar filament protein, flagellin (20).

Although the exact mechanism of *H. pylori*-associated gastric carcinogenesis remains unknown, *H. pylori* infection has been reported as an important factor causing promoter hypermethylation of tumor suppressor genes, such as the *E-cadherin* and *CDKN2A* genes (21, 22). However, this is a controversial issue (23–25). Moreover, studies associating *H. pylori* infection with *CDKN2A* methylation status have not accounted for p16^{INK4A} expression, which precludes a more comprehensive assessment of the involvement of this bacterium in the inactivation of p16^{INK4A}. Moreover, these studies are restricted to cases of gastritis and precancerous lesions (22, 23). So far, there are no studies relating *H. pylori* genotypes to p16^{INK4A} inactivation in GC.

In this context, the present investigation aimed to evaluate the relationship between the *H. pylori* genotype and p16^{INK4A} inactivation.

As intestinal and diffuse tumors are different entities and there is evidence of different pathways according to the tumor location (cardia and noncardia tumors), the data were also analyzed considering the tumor histological subtype and location.

MATERIALS AND METHODS

Clinical specimens

The present study was approved by the Hospital Ethics Committee of Ceará Federal University and all subjects signed the informed consent form before inclusion. Samples from 77 patients with gastric adenocarcinoma who had undergone gastrectomy were collected from two hospitals in Ceará state, Brazil: Walter Cantídeo Hospital (associated with Ceará Federal University) and Santa Casa de Misericórdia Hospital, both located in Fortaleza, the state capital. The histological classification was carried out by the team's pathologists according to the Lauren classification. The clinical and histopathological features are shown in Table 2.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from frozen tumor tissue using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) technique, adapted from the method of Foster and Twell (26). The DNA extraction was performed only in fragments that showed more than 80% of tumor cells, and the quality was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. The amount of DNA was determined using a NanoDrop™ 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA).

Sodium bisulfite treatment and methylation-specific PCR (MS-PCR)

The DNA of tumor tissue extracted was modified by sodium bisulfite to determine the methylation status of the *CDKN2A* gene by MS-PCR, as described previously by Herman *et al.* (27). The primers targeted to the promoter *CDKN2A* region were 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3' (sense) and 5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3' (antisense) for the methylated *CDKN2A* (150 bp), and 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3' (sense) and 5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3' (antisense) for the unmethylated *CDKN2A* (151 bp). PCR was performed in 25 µl reaction volume, containing 1× Platinum *Taq* buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTPs, 0.4 µM of each

Table 1. PCR primer sets used for genotyping *Helicobacter pylori*

Gene	Primer sequence	Reference number	Annealing (°C)	Size (bp) of the PCR product
<i>ureC</i>	F 5'-AAGCTTTTtaggggTgTTAGGGGTTT-3' R 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3'	28	55	294
<i>vacA</i>				
s1/s2	F 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3' R 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	29	55	259/286
m1	F 5'-GGTCAAAATGCGGTCATGG-3' R 5'-CCATTGGTACCTGTAGAAAC-3'		55	290
m2	F 5'-GGAGCCCCAGGAAACATTG-3' R 5'-CATAACTAGCGCCTTGCAC-3'		52	192
<i>cagA</i>	F 5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3' R 5'-TTAGAATAATCAACAAACATAACGCCAT-3'	30	56	297
<i>cagE</i>	F 5'-TTGAAAACCTTCAAGGATAGGATAGAGC-3' R 5'-GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC3'	14	50	509
<i>virB11</i>	F 5'-TTAAATCCTCTAAGGCATGCTAC-3' R 5'-GATATAAGTCGTTTTACCGCTTC-3'	14	49	491
<i>flaA</i>	F 5'-TTCTATCGGCTCTACCAC-3' R 5'-CTGACCGCCATTGACCAT-3'	31	55	508

F, follow; R, reverse.

primer set, 1 U of Platinum *Taq* DNA Polymerase® (Invitrogen, Foster, CA, USA) and 1 µl of treated DNA. DNA methylated *in vitro* by Sss-I Methylase® (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) was used as a positive control, and water and DNA from peripheral lymphocytes of healthy donors were used as negative controls. The PCR products were separated in 6% non-denaturing polyacrylamide gel and subsequently submitted to silver staining.

Bisulfite sequencing analysis

For confirmation of the reaction specificity, MS-PCR products from *CDKN2A* gene analyzed were cloned using a TOPO TA Cloning Kit® (Invitrogen) and sequenced using an ABI PRISM BigDye Terminator v.3.0 Cycle Sequencing Kit® (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) and ABI Prism 3100 DNA Sequencer® (Applied Biosystems). Both the methylated and unmethylated PCR products were sequenced.

Detection of *H. pylori* and the presence of *vacA*, *cagA*, *cagE*, *virB11* and *flaA* genes

Helicobacter pylori infection was detected by amplification of the *ureC* gene using primers for PCR, as described by Lage et al. (28). For the *H. pylori*-positive samples, the presence of the *vacA* alleles, *cagA*, *cagE*, *virB11* and *flaA* genes, was identified using the primer sets from the published literature (Table 1).

PCR mixtures, for amplification of *cagE* and *virB11* genes, were prepared in a volume of 20 µl using MasterMix® (*Taq* DNA Polymerase, dNTPs and MgCl₂) according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA), with addition of 0.8% Tween 20, 0.3 µM of each primer (*virB11* and *cagE*) and 1 µl of the DNA sample.

The *ureC*, *cagA*, *vacA* s1/s2, *vacA* m1 genes were amplified in a 25 µl volume containing the following: 2.5 µl of 10× PCR buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France); 1% Tween 20; 1.5 mM of MgCl₂ (Invitrogen); 200 µM (each) of dNTPs (Invitrogen); 1 U of Platinum *Taq* polymerase® (Invitrogen); 0.4 µM of each of the primers for *ureC*, *cagA*, *vacA* s1/s2 and *vacA* m1; 0.3 µM of primer for *vacA* m2; and 1 µl of *H. pylori* DNA. The PCR mixtures, for amplification of the *flaA* gene, were prepared in a 20 µl volume using Green MasterMix® (*Taq* DNA Polymerase, dNTPs and MgCl₂) according to the manufacturer's instructions (Promega), with addition of 0.8% Tween 20, 0.3 µM of each primer and 1 µl of the DNA sample.

The PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. The size of the amplification product was used to confirm the identity of the PCR product. The sample was considered *H. pylori* positive when an *ureC* fragment of 294 bp was amplified. For confirmation of the reaction specificity, PCR products from the *ureC* gene were cloned using a TOPO TA Cloning Kit® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced using an ABI PRISM BigDye Terminator v.3.0 Cycle

Table 2. Relationship between p16^{INK4A} expression, *CDKN2A* methylation status and clinicopathological features in 77 gastric adenocarcinomas

Variable	n (%)	p16 ^{INK4A} detection			<i>CDKN2A</i>		
		(+) (%)	(-) (%)	p-value	M (%)	U (%)	p-value
Gender							
Male	49 (63.6)	18 (36.7)	31 (63.3)	0.404	22 (44.9)	27 (55.1)	0.666
Female	28 (36.4)	13 (46.4)	15 (53.6)		14 (50.0)	14 (50.0)	
Age							
< 50	13 (16.9)	4 (30.8)	9 (69.2)	0.574	7 (53.8)	6 (46.2)	0.574
> 50	64 (83.1)	27 (42.2)	37 (57.8)		29 (45.3)	35 (55.7)	
Pathological type							
Intestinal	50 (64.9)	19 (38.0)	31 (62.0)	0.582	25 (50.0)	25 (50.0)	0.437
Diffuse	27 (35.1)	12 (44.4)	15 (55.6)		11 (40.7)	16 (59.3)	
Anatomical site							
Cardia	17 (22.1)	3 (17.6)	14 (82.4)	0.031	8 (47.0)	9 (53.0)	0.977
Noncardia	60 (77.9)	28 (46.7)	32 (53.3)		28 (46.7)	32 (53.3)	
Histological stage							
I + II	20 (26.0)	10 (50.0)	10 (50.0)	0.302	10 (50.0)	10 (50.0)	0.735
III + IV	57 (74.0)	21 (36.8)	36 (63.2)		26 (45.6)	31 (54.4)	
Tumor status							
1	2 (2.6)	2 (100)	0 (0)	0.159	1 (50.0)	1 (50.0)	1.000
2-4	75 (97.4)	29 (38.7)	46 (61.3)		35 (46.7)	40 (53.3)	
Lymph node status							
0	16 (20.8)	9 (56.2)	7 (43.8)	0.143	7 (43.7)	9 (56.3)	0.787
1-4	61 (79.2)	22 (36.1)	39 (63.9)		29 (47.5)	32 (52.5)	
Total	77 (100)	31 (40.3)	46 (59.7)		36 (46.8)	41 (53.2)	

Sequencing Kit[®] (Applied Biosystems) and an ABI Prism 3100 DNA Sequencer[®] (Applied Biosystems). The *vacA*, *cagA*, *cagE*, *virB11* and *flaA* genes were considered positive when a specific fragment was detected (Table 1). DNase-free water was used as a negative control. DNA preservation has also been confirmed by amplification of different genes using other approaches, which are underway in our laboratory. Random samples were reanalyzed to confirm the results.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed using a CINtec p16^{INK4A} Cytology Kit[®] (K5340; Dako, Glostrup, Denmark), according to the manufacturer's instructions. A confirmed case of p16-positive human breast carcinoma was used as a positive control.

Immunostaining analyses

The immunohistochemical evaluation was performed by two experienced analysts independently, using direct light microscopy. Any conflicting results were jointly considered for a consensual determination.

The protein expression was quantified through manual counting of at least 1000 tumor cells in 10 different fields at a magnification of 400x. The labeling index (LI) expresses the percentage of nuclear or cytoplasmic positive cells in each tumor sample (32). Only cases with LI equal to or greater than 5% were considered positive. Also, the pattern of staining (focal, multifocal and diffuse) was observed and H-scored. The H-score takes into account the intensity of the cytoplasmic p16^{INK4A} stain, expressed in values ranging from 0 to 3 (0 = no stain, 1 = weak, 2 = moderate and 3 = strong), following the methods described by McCarty *et al.* (33).

Statistical analyses

The statistical analyses were carried out using the SPSS version 15.0 program (Chicago, IL, USA). Statistically significant differences were evaluated by the chi-square test or Fisher exact test. Correlations between immunostaining and *CDKN2A* promoter region methylation were analyzed by Spearman's rank correlation coefficient. The results were considered statistically significant when the p-values were less than 0.05.

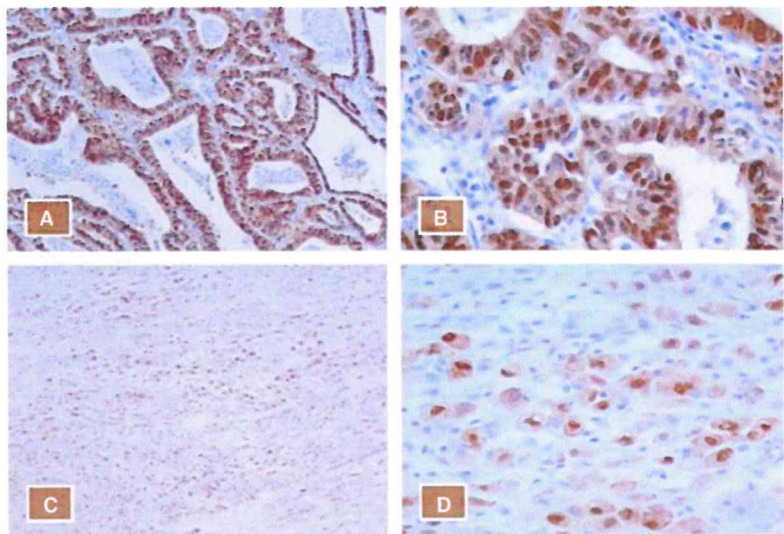


Fig. 1. Immunohistochemical staining for p16^{INK4A} protein (A, C: 100×; B, D: 400×) in formalin-fixed paraffin-embedded gastric adenocarcinomas. The p16^{INK4A} immunostaining is seen as brown counterstained with Harry's hematoxylin. (A, B) Intestinal subtype gastric cancer and (C, D) diffuse subtype gastric cancer: diffuse and intense cytoplasm and nuclear staining.

RESULTS

The p16^{INK4A} expression was observed in 40.3% (31/77) of the tumors. Positive gastric tumor cells showed both nuclear and cytoplasmic staining, mostly concomitantly (86.7%; 26/31), varying in intensity related to the cytoplasmic staining. Examples of immunostaining for p16^{INK4A} are illustrated in Fig. 1. The median nuclear/cytoplasmic labeling score was 71.8% and the cytoplasmic H-score (HS) ranged from 12 to 294 (median = 213). The medians attributed to LI and H scores for the intestinal tumors (76.5%; 220, respectively) were higher than those observed in diffuse tumors (44.5%; 158). No statistical differences were found between the clinicopathological parameters analyzed, including gender, age,

histological stage, tumor invasion and lymph node status ($p > 0.05$) (Table 2).

Relationship between inactivation of p16^{INK4A}, CDKN2A methylation status, histological type and tumor location

p16^{INK4A} was negative in 59.7% (46/77) of the tumors and methylation of *CDKN2A* promoter was detected in 46.8% (36/77) (Table 2). Among the methylated tumors, 88.9% (32/36) of them were p16^{INK4A} negative, showing strong negative correlation between immunostaining and *CDKN2A* promoter region methylation ($p = 0.000$; $r = -0.557$). No difference was observed between the intestinal and diffuse subtypes regarding the frequency of p16^{INK4A}-negative cases and the

Table 3. Relationship between inactivation of p16^{INK4A} and histological subtypes according to tumor location (n = 46)

Variable	n (%)	Intestinal p16(-)			Diffuse p16(-)		
		Methylation	Non-methylation	p-value	Methylation	Non-methylation	p-value
Cardia	14 (30.4)	8	3	0.873	0	3	0.022
Noncardia	32 (69.6)	14	6		10	2	
Total	46 (100)	22	9		10	5	

CDKN2A promoter methylation status. However, negative p16^{INK4A} cases were significantly more frequent in the cardia tumors than in the noncardia tumors ($p = 0.031$), despite the similar frequency of *CDKN2A* promoter methylation at both tumor sites (Table 2). Based on the histological subtype, it seems that this association was characteristic of the intestinal tumors because in these tumors, there was a strong tendency (85%; 11/13) for p16^{INK4A}-negative cases to be located in the cardia. However, this was not statistically significant ($p = 0.051$). Table 3 summarizes the distribution of p16^{INK4A} negativity in the intestinal and diffuse tumors considering the *CDKN2A* promoter methylation status and the tumor location. This table shows that no difference was found related to the *CDKN2A* promoter methylation status in the intestinal tumors. On the other hand, in diffuse tumors, *CDKN2A* promoter methylation was a relevant epigenetic alteration ($p = 0.022$) for the p16^{INK4A} inactivation in noncardia tumors, although no significant difference was found in the

p16^{INK4A}-negative cases according to the region (Table 2).

Relationship between detection of p16^{INK4A}, *CDKN2A* methylation status, *H. pylori* infection and *vacA*, *cagA*, *cagE*, *virB11* and *flaA* genes

Infection by *H. pylori* was detected in 94.8% (73/77) of the cases. In 15 cases, it was not possible to amplify the genes *cagE*, *virB11* and *flaA*. The most frequent *H. pylori* genes were *vacA* s1m1 and *flaA* (Table 4). Among the genotypes of *H. pylori* observed, the most frequent was the *H. pylori* strain carrying all the genes studied (*flaA* + *cagA* + *vacA*s1m1 + *cagE* + *virB11* +).

The distribution of the cases considering the p16^{INK4A} expression and *CDKN2A* methylation status according to the *H. pylori* genes is shown in Table 4. No relationship was found between *H. pylori* genes alone or in association with p16^{INK4A} negativity. On the other hand, considering the promoter methylation status, a significantly ($p = 0.009$) higher frequency of *flaA* was

Table 4. Distribution of the p16^{INK4A} detection and *CDKN2A* methylation according to the *Helicobacter pylori* genes

Variable	n (%)	p16 ^{INK4A}		p-value	CDKN2A		
		(+) (%)	(-) (%)		M (%)	U (%)	p-value
<i>cagA</i>							
Positive	42 (57)	18 (42.9)	24 (57.1)	0.937	17 (40.5)	25 (59.5)	0.345
Negative	31 (43)	13 (41.9)	18 (58.1)		16 (51.6)	15 (48.4)	
<i>vacA</i> s1m1							
Positive	53 (73)	22 (41.5)	31 (58.5)	0.788	25 (47.2)	28 (52.8)	0.583
Negative	20 (27)	9 (45.0)	11 (55.0)		8 (40.0)	12 (60.0)	
Total	73 (100)	31 (42.5)	42 (57.5)	—	33 (45.2)	40 (54.8)	—
<i>cagE</i>							
Positive	28 (48.3)	12 (42.9)	16 (57.1)	0.771	10 (35.7)	18 (64.3)	0.397
Negative	30 (51.7)	14 (46.7)	16 (53.3)		14 (46.7)	16 (53.3)	
<i>virB11</i>							
Positive	32 (55.2)	14 (43.8)	18 (56.2)	0.855	14 (43.7)	18 (56.3)	0.684
Negative	26 (44.8)	12 (46.2)	14 (53.8)		10 (38.5)	16 (61.5)	
<i>flaA</i>							
Positive	40 (69.0)	19 (47.5)	21 (52.5)	0.393	12 (30.0)	28 (70.0)	0.009
Negative	18 (31.0)	7 (38.9)	11 (61.1)		12 (66.7)	6 (33.3)	
All genes							
Positive	17 (29.3)	8 (47)	9 (53)	0.826	4 (23.5)	13 (76.5)	0.076
Negative	41 (70.7)	18 (43.9)	23 (56.1)		20 (48.8)	21 (51.2)	
Total	58 (100)	26 (44.8)	32 (55.2)	—	24 (41.4)	34 (58.6)	—

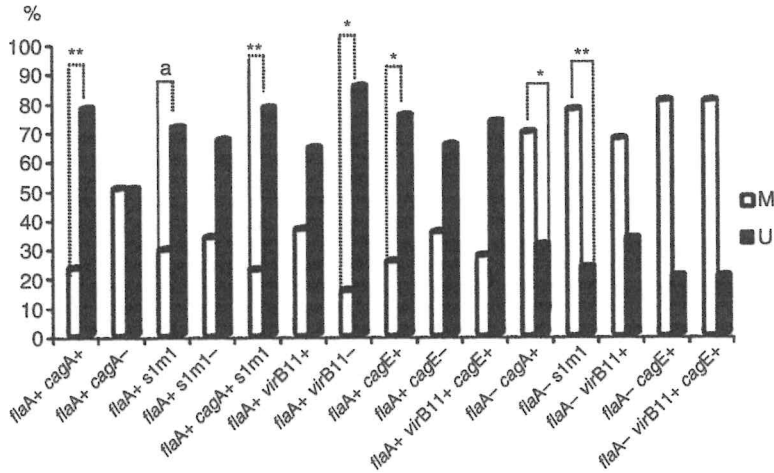


Fig. 2. Distribution of the *CDKN2A* methylation status according to the *Helicobacter pylori* genes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ^a $p = 0.052$. M, methylated; U, unmethylated.

found to be associated with non-methylated tumors. Also, there was a tendency between non-methylated tumors with the presence of *H. pylori* carrying all studied genes; however, this was not statistically significant ($p = 0.076$). In addition, *H. pylori* strains bearing *cagA* or *vacAs1m1* genes but without *flaA* were associated with methylated tumors ($p = 0.022$ and 0.003 , respectively) (Fig. 2).

According to the histological subtypes and tumor location, no association was found between the negativity of $p16^{\text{INK4A}}$ and *H. pylori* strains. However, in intestinal tumors, the presence of the *flaA* gene, isolated or in combination with all other *H. pylori* genes studied, was related to a tendency of non-methylation of *CDKN2A*, but was not statistically significant ($p = 0.071$ and 0.071 respectively).

According to the location, in noncardia tumors, non-methylated *CDKN2A* was significantly more frequent in association with strains of *H. pylori* carrying all genes studied ($p = 0.035$) or *flaA* alone ($p = 0.036$). This fact seems characteristic of noncardia intestinal tumors, because *H. pylori* strains carrying all the genes studied were associated with non-methylation tumors in this histological subtype, though without a statistical difference ($p = 0.076$).

To investigate the involvement of the *H. pylori* strain in the $p16^{\text{INK4A}}$ inactivation process, we analyzed the $p16^{\text{INK4A}}$ -negative cases considering the inactivation pathway

(methylation or non-methylation) and the presence of bacterial genes. From these analyses, we found a significant association between the inactivation of $p16^{\text{INK4A}}$ by a non-methylation pathway and the *flaA* gene ($p = 0.029$). Analysis of the inactivation of $p16^{\text{INK4A}}$, according to histological subtype and location, considering *H. pylori* strains, was not possible because of the small number of cases.

DISCUSSION

The importance of loss of the tumor suppressor $p16^{\text{INK4A}}$ in the carcinogenic process has been pointed out in many cancers (34–36). In GC, loss of expression of $p16^{\text{INK4A}}$ is common and hypermethylation of promoter regions of this gene is considered to be its main inactivation mechanism (7–9). In this study, the $p16^{\text{INK4A}}$ positivity (40.3%) and *CDKN2A* methylation promoter status (46.3%) are in accordance with other reports (24, 37, 38). Moreover, the predominantly nuclear/cytoplasmic staining pattern observed was the same as that most often described in the literature. According to Liang et al. (39), cytoplasmic staining indicates the accumulation of this protein in the cytoplasm, caused by its phosphorylation mediated by protein kinase B, oncogenetically activated, blocking the recognition of its sites by nuclear importation factors. However, the agreement between nuclear and cytoplasmic staining found

in this study suggests that the presence of p16^{INK4A} protein in the cytoplasm reflects its nuclear expression.

In previous studies, p16^{INK4A} positivity was associated with the absence of lymph node invasion (38, 40) and *CDKN2A* promoter methylation was related to older patients and significantly lower in well-differentiated tumors (24), but no correlation was found between these clinicopathological parameters and p16^{INK4A} expression and *CDKN2A* promoter methylation in the present study. Kishimoto *et al.* (41) and Mino *et al.* (42) did not find this association as well.

The strong correlation found in this study between p16^{INK4A} negativity and promoter methylation is in agreement with the other studies (9, 24, 43). However, despite the indication that *CDKN2A* hypermethylation is the main mechanism implicated in p16^{INK4A} inactivation, it is not the only one, because 30.4% of the p16^{INK4A}-negative cases were not methylated. Other studies also have shown the same results (9, 24). The frequency found in this and the other studies cited was not so low and cannot be justified by methodology standardization error. Instead, it can be explained by alternative mechanisms of p16^{INK4A} inactivation, such as mutations and deletions. In GC, the frequency of p16 inactivation by homozygous deletions reported in the literature ranges from 0% to 9% and by mutation from 0% to 2% (9, 44, 45).

In light of studies demonstrating that genetic and epigenetic changes in gastric carcinoma differ, depending on the GC histological type (46, 47), we analyzed the data considering the adenocarcinoma subtypes separately. However, no differences in p16^{INK4A} expression and *CDKN2A* promoter methylation were observed between intestinal and diffuse tumors. Interestingly, regarding tumor location, there was a difference in the p16^{INK4A} expression, but not in the *CDKN2A* promoter methylation status, as the cardia tumors had a significant number of p16^{INK4A}-negative cases. The location of the tumors seems to be a relevant aspect for the tumorigenic pathway. Driessen *et al.* (48, 49) reported that the characteristics of cardia carcinoma, including clinical data and cytokeratin expression patterns, were closer to esophageal adenocarcinoma than to distal gastric

adenocarcinoma, suggesting the distinct nature of those tumors in the determination of tumorigenic pathways. The higher frequency of p16^{INK4A} negativity in cardia tumors was also observed by Kim *et al.* (11), in a study comparing the various protein expression profiles between patients with cardia and noncardia carcinomas, such as p53, E-cadherin, MGMT and p16^{INK4A}. However, the authors did not evaluate this expression considering the histological subtypes.

Thus, in light of the differences in p16^{INK4A} expression between cardia and noncardia tumors, we analyzed the data considering histological subtypes and tumor location concomitantly. The higher number of p16^{INK4A}-negative cases located in the cardia was characteristic of intestinal tumors, although these lesions did not differ regarding the *CDKN2A* methylation status according to the location. As in this study, Abbaszadegan *et al.* (24) also found no relationship between *CDKN2A* promoter methylation and tumor location or between *CDKN2A* promoter methylation and histological subtypes.

Therefore, based on p16^{INK4A} negativity, *CDKN2A* promoter methylation and tumor location, it was possible to identify distinct pathways in intestinal and diffuse tumors. Although the number of cases of non-methylated tumors was small for both histological subtypes, in noncardia diffuse tumors, the methylation of *CDKN2A* promoter was the only way by which the p16^{INK4A} inactivation occurred. On the other hand, in intestinal tumors, this process occurred by two different routes independently of tumor location. This study is the first report in the literature regarding p16^{INK4A} inactivation by promoter methylation according to histological subtypes and tumor location.

Although the p16^{INK4A} inactivation is accepted as part of GC tumorigenesis, the mechanism that triggers this process remains unknown. It is suggested that *H. pylori* has an important role in this process (22, 23). In the present study, we observed that the influence of *H. pylori* infection in p16^{INK4A} inactivation by methylation or non-methylation pathways depends on the genotype of the bacterium. A significantly higher frequency of *flaA* gene in non-methylated tumors and a strong tendency between these tumors and the presence of

H. pylori carrying all the studied genes was observed. In addition, inactivation of p16^{INK4A} by a non-methylation pathway was associated with the *flaA* gene. However, strains with *cagA* or *vacA* s1m1 without *flaA* genotype were related to *CDKN2A* promoter methylation. It is possible that the *H. pylori* strain carrying these genes acts by releasing reactive oxygen species, which can make DNA unstable, and nitric oxide, which can activate DNA methyltransferases (50, 51). In addition, increasing evidence has shown that *H. pylori* can induce cell proliferation, and cell proliferation itself has been suggested as a promoting factor for DNA methylation (52, 53). In spite of the lack of studies relating bacterium genotype to p16^{INK4A} inactivation and promoter methylation, some studies have correlated *H. pylori* infection with p16^{INK4A} methylation, but with controversial results. This can be explained by the variation in the genotypes of the *H. pylori* strains studied. Nevertheless, we cannot justify the presence of the *flaA* as a cut-off point for the *CDKN2A* promoter methylation status. The *flaA* gene codifies the main flagellin protein of the flagella filament, responsible for the motility of *H. pylori* in the gastric mucus and for the successful colonization in the gastric mucosa (20). Therefore, future studies are needed to explain the involvement of this gene associated with p16^{INK4A} promoter methylation status with a larger number of cases.

In conclusion, inactivation of p16^{INK4A} in histological subtypes of GC occurs by different routes depending on the location of the tumor. In diffuse subtype tumors, inactivation of p16^{INK4A} by methylation of the *CDKN2A* promoter occurs exclusively in noncardia tumors. On the other hand, in intestinal tumors, although promoter methylation is an important route for inactivation of p16^{INK4A}, it occurs both in cardia and noncardia tumors. In addition, this process of methylation of the *CDKN2A* promoter depends on the *H. pylori* genotype.

REFERENCES

- Jemal ADV, Siegel RMPH, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal CMPH, et al. Cancer statistic, 2006. CA Cancer J Clin 2006;56:106–30.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Globocan 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase no. 5, version 2.0. Lyon: IARC Press, 2004.
- Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. World J Gastroenterol 2006;12:192–8.
- Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. Biochim Biophys Acta 2002;1602:73–87.
- Lima VP, de Lima MA, André AR, Ferreira MV, Barros MA, Rabenhorst SH. *H. pylori* (CagA) and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas: correlation with p53 mutation and c-Myc, Bcl-2 and Bax expression. World J Gastroenterol 2008;14:884–91.
- Lima EM, Leal MF, Burbano RR, Khayat AS, Assumpção PP, Bello MJ, et al. Methylation status of ANAPC1, CDKN2A and TP53 promoter genes in individuals with gastric cancer. Braz J Med Biol Res 2008;41:539–43.
- Ding Y, Le XP, Zhang QX, Du P. Methylation and mutation analysis of p16 gene in gastric cancer. World J Gastroenterol 2003;9:423–6.
- Zhao GH, Li TC, Shi LH, Xia YB, Lu LM, Huang WB, et al. Relationship between inactivation of p16 gene and gastric carcinoma. World J Gastroenterol 2003;9:905–9.
- Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. Lab Invest 2000;80:689–95.
- Ksiaz F, Ziadi S, Amara K, Korbi S, Trimeche M. Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma. Clin Chim Acta 2009;404:128–33.
- Kim MA, Lee HS, Yang HK, Kim WH. Clinicopathologic and protein expression differences between cardia carcinoma and noncardia carcinoma of the stomach. Cancer 2005;103:1439–46.
- Peek RM Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nat Rev Cancer 2002;2:28–37.
- Atherton JC. The pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastro-duodenal diseases. Annu Rev Pathol 2006;1:63–96.
- Sozzi M, Tomasini ML, Vindigni C, Zanussi S, Tedeschi R, Basaglia G, et al. Heterogeneity of cag genotypes and clinical outcome of Helicobacter pylori infection. J Lab Clin Med 2005;146:262–70.
- Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. Helicobacter pylori virulence and genetic geography. Science 1999;284:1328–33.
- Lu H, Wu JY, Kudo T, Ohno T, Graham DY, Yamaoka Y. Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected

- with *Helicobacter pylori*. *Mol Biol Cell* 2005; 16:4954–66.
17. Wang HT, Li ZH, Yuan JP, Zhao W, Shi XD, Tong SQ, et al. Effect of *Helicobacter pylori* VacA on gene expression of gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2005;11:109–13.
 18. Krause S, Pansegrau W, Lurz R, Cruz F, Lanka E. Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J Bacteriol* 2000;182: 2761–70.
 19. Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, Kanai F, Kato N, et al. Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* 1999;44:336–41.
 20. Suerbaum S. The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. *Trends Microbiol* 1995;3:168–70.
 21. Chan AO, Huang C, Hui WM, Cho CH, Yuen MF, Lam SK, et al. Stability of E-cadherin methylation status in gastric mucosa associated with histology changes. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24:831–6.
 22. Dong CX, Deng DJ, Pan KF, Zhang L, Zhang Y, Zhou J, et al. Promoter methylation of p16 associated with *Helicobacter pylori* infection in precancerous gastric lesions: a population-based study. *Int J Cancer* 2009;124:434–9.
 23. Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Nakamura M, Yoshioka D, Okubo M, et al. Increased number of methylated CpG islands correlates with *Helicobacter pylori* infection, histological and serological severity of chronic gastritis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:613–9.
 24. Abbaszadegan MR, Moaven O, Sima HR, Ghafarzadegan K, A'rabi A, Forghani MN, et al. p16 promoter hypermethylation: a useful serum marker for early detection of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008;14:2055–60.
 25. Chan AO, Lam SK, Wong BC, Wong WM, Yuen MF, Yeung YH, et al. Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. *Gut* 2003;52:502–6.
 26. Foster G, Twell D. *Plant Gene Isolation: Principles and Practice*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1996. p. 426.
 27. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821–6.
 28. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33:2752–6.
 29. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270:17771–7.
 30. Domingo D, Alarcon T, Pietro N, Sanchez I, Lopez-Brea M. *cagA* and *vacA* status of Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999;37:2113–4.
 31. Göttke MU, Fallone CA, Barkun AN, Vogt K, Loo V, Trautmann M, et al. Genetic variability determinants of *Helicobacter pylori*: influence of clinical background and geographic origin of isolates. *J Infect Dis* 2000;181:1674–81.
 32. Landberg G, Roos G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. *Cell Prolif* 1993;26:427–37.
 33. McCarty KS Jr, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal anti-receptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109:716–21.
 34. Zhou J, Yang D, Zhang L, Wang J, Yao Q, Su Z, et al. Study on the relationship of alteration and expression of p16 gene to pancreatic carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2000; 17:399–403.
 35. Goto T, Mizukami H, Shirahata A, Sakata M, Saito M, Ishibashi K, et al. Aberrant methylation of the p16 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2009;29:275–7.
 36. Vidaurreta M, Maestro ML, Sanz-Casla MT, Maestro C, Rafael S, Veganzones S, et al. Inactivation of p16 by CpG hypermethylation in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2008;26:239–45.
 37. Napieralski R, Ott K, Kremer M, Becker K, Boulesteix AL, Lordick F, et al. Methylation of tumor-related genes in neoadjuvant-treated gastric cancer: relation to therapy response and clinicopathologic and molecular features. *Clin Cancer Res* 2007;13:5095–102.
 38. He XS, Rong YH, Su Q, Luo Q, He DM, Li YL, et al. Expression of p16 gene and Rb protein in gastric carcinoma and their clinicopathological significance. *World J Gastroenterol* 2005;11: 2218–23.
 39. Liang J, Zubovitz J, Petrocchi T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002; 8:1153–60.
 40. Honda T, Tamura G, Endoh Y, Nishizuka S, Kawata S, Motoyama T. Expression of tumor

- suppressor and tumor-related proteins in differentiated carcinoma, undifferentiated carcinoma with tubular component and pure undifferentiated carcinoma of the stomach. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35:580–6.
41. Kishimoto I, Mitomi H, Ohkura Y, Kanazawa H, Fukui N, Watanabe M. Abnormal expression of p16(INK4a), cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 and retinoblastoma protein in gastric carcinomas. *J Surg Oncol* 2008;98:60–6.
42. Mino A, Onoda N, Yashiro M, Aya M, Fujiwara I, Kubo N, et al. Frequent p16 CpG island hypermethylation in primary remnant gastric cancer suggesting an independent carcinogenic pathway. *Oncol Rep* 2006;15:615–20.
43. Zhao YF, Zhang YG, Tian XX, Juan Du, Zheng J. Aberrant methylation of multiple genes in gastric carcinomas. *Int J Surg Pathol* 2007;15:242–51.
44. Wu Q, Possati L, Montesi M, Gualandi F, Rimessi P, Morelli C, et al. Growth arrest and suppression of tumorigenicity of bladder-carcinoma cell lines induced by the p16/CDKN2 (p16INK4A, MTS1) gene and other loci on human chromosome 9. *Int J Cancer* 1996;65:840–6.
45. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, et al. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999;59:5438–42.
46. Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 2004;157:327–49.
47. Tahara E, Kuniyasu H, Yasui W, Yokozaki H. Gene alterations in intestinal metaplasia and gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994;6: S97–102.
48. Driessen A, Naftaux P, Lerut T, Van Raemdonck D, De Leyn P, Filez L, et al. Identical cytokeratin expression pattern CK7+/CK20– in esophageal and cardiac cancer: etiopathological and clinical implications. *Mod Pathol* 2004;17:49–55.
49. Driessen A, Van Raemdonck D, De Leyn P, Filez L, Peeters M, Winnepeninckx V, et al. Are carcinomas of the cardia oesophageal or gastric adenocarcinomas? *Eur J Cancer* 2003;39:2487–94.
50. Obst B, Wagner S, Sewing KF, Beil W. Helicobacter pylori causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis* 2000;21:1111–5.
51. Hmadcha A, Bedoya FJ, Sobrino F, Pintado E. Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1beta via nitric oxide production. *J Exp Med* 1999;190:1595–604.
52. Suzuki H, Hibi T, Marshall BJ. Helicobacter pylori: present status and future prospects in Japan. *J Gastroenterol* 2007;42:1–15.
53. Velicescu M, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Tsai YC, Nguyen CT, Jones PA. Cell division is required for de novo methylation of CpG islands in bladder cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:2378–84.

ANEXO V

Artigo publicado no *Scandinavian Journal of Gastroenterology* intitulado: **p27^{KIP1} expression in gastric cancer: Differential pathways in the histological subtypes associated with *Helicobacter pylori* infection.**

ORIGINAL ARTICLE

p27^{KIP1} expression in gastric cancer: Differential pathways in the histological subtypes associated with *Helicobacter pylori* infection

MARCKÊNIA KÉLIA SANTOS ALVES, VALESKA PORTELA LIMA, ÂNGELA ROSA ANDRÉ, MÂRCIA VALÉRIA PITOMBEIRA FERREIRA, MARCOS AURÉLIO PESSOA BARROS & SILVIA HELENA BAREM RABENHORST

Department of Pathology and Forensic Medicine, Section of Microbiology, Federal University in Ceará, Fortaleza, Brazil

Abstract

Objective. Decreases in p27^{KIP1} and C-MYC expression have been associated with *Helicobacter pylori* infection. Furthermore, C-MYC seems to be a transcriptional repressor of p27^{KIP1}. Therefore, in a series of gastric adenocarcinomas we studied the association of p27^{KIP1} expression with *H. pylori* genotype (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) and the involvement of C-MYC in this process. **Material and methods.** Expression of p27^{KIP1} and C-MYC was determined by immunohistochemistry in 84 gastric adenocarcinoma samples and *H. pylori* infection and genotype were determined by polymerase chain reaction. **Results.** Most p27^{KIP1}-negative cases (94.0%) were *H. pylori*-positive and 44.8% were C-MYC-positive. In the diffuse gastric cancer subtype, p27-negative-C-MYC-positive was the most frequent combination (cluster II), and was associated with the more pathogenic *H. pylori* strains. Although an association with p27^{KIP1} and *H. pylori* strain was found in the intestinal gastric cancer subtype, negativity for p27^{KIP1} and C-MYC markers was the most frequent cluster, followed by cluster II, and both were present, independent of the *H. pylori* genotype. **Conclusions.** Reduced expression of p27^{KIP1} was closely linked to *H. pylori* infection, and was dependent on the more pathogenic strains. Moreover, intestinal and diffuse subtypes showed distinct carcinogenic pathways influenced by *H. pylori* strains. These data add insight to the differential influence and relevance of *H. pylori* genotype in gastric cancer development.

Key Words: C-MYC, gastric cancer, *Helicobacter pylori* genotypes, histological subtypes, p27^{KIP1}

Introduction

Gastric cancer is one of the most frequent malignancies worldwide and one of the leading causes of cancer mortality in Brazil [1,2]. Adenocarcinoma, the most common type, has been classified by Lauren [3], according to its clinical and histological features, into two main types, diffuse and intestinal, with distinct carcinogenetic pathways. Intestinal gastric adenocarcinoma, which is well differentiated, is the most frequent type and has a more favorable prognosis. Its etiology depends on environmental factors. Diffuse-type adenocarcinoma is poorly differentiated, has a poor prognosis, and its relationship with environmental factors is controversial [4–6].

Helicobacter pylori infection is the major environmental factor that contributes to the development of human gastric cancer [7,8]. The ability of *H. pylori* to promote gastric carcinogenesis is related to the host's genetic susceptibility and to specific bacterial virulence factors [9,10]. *H. pylori* is highly prevalent in human populations and has remarkable genetic diversity [11,12]. This diversity has been found to affect the bacterial virulence and consequently the disease outcome [13–15]. Two well-established virulence factors of *H. pylori* are vacuolating cytotoxin A (VacA) and the cytotoxin-associated gene A (CagA) [16,17]. The VacA protein has potential to influence gastric epithelial cell cycling and epithelial cell-signal transduction. The *vacA* gene is present in all strains and

Correspondence: Markênia Kélia Santos Alves, MS, 3485, Osvaldo Cruz Street, Dionísio Torres, Fortaleza 60125151, Ceará State, Brazil.
E-mail: markenialves@yahoo.com.br

(Received 27 September 2009; accepted 29 November 2009)

ISSN 0036-5521 print/ISSN 1502-7708 online © 2010 Informa UK Ltd.
DOI: 10.3109/00365520903521566

comprises two variable regions: the signal sequence (*s1* and *s2*) and the middle region (*m1* and *m2*), which combine mosaicism. Strains bearing *s1* and *m1* alleles have long been noted as being more virulent than *m2* strains [5,18,19]. The *cagA* gene is considered a marker for the presence of the *cag* pathogenicity island (*cag*-PAI). It is located within the right portion of the *cag*-PAI and induces intense inflammatory responses and alterations of the gastric epithelium [20,21]. *cag*-PAI also includes the *cagE* and *virB11* genes, located in the right and left regions of *cag*-PAI, respectively. The *virB11* gene encodes the homonymous protein, which has a key role due to its structural position in the formation of the type IV secretion system, through which CagA is injected into host cells, and because it exhibits adenosine triphosphatase activity [16,22,23]. *cagE* is also considered to play a role in constructing the type IV secretion system and some authors consider it to be a marker of the integrity of *cag*-PAI, like the *cagA* gene [15,24,25].

Despite the association of *H. pylori* infection with the development and progression of gastric cancer, the precise molecular mechanisms responsible for the promotion of gastric cancer by *H. pylori* remain poorly understood. One of the proposed mechanisms is modulation of gastric epithelial cell-cycle kinetics by alterations of cell-cycle regulators, like p27^{KIP1}, p53, and p21^{WAF1/CIP1} [26–29]. Although some studies have already described an association between *H. pylori* and p53 mutation [30–32], knowledge of the relationship between *H. pylori* and p27^{KIP1} expression is still limited. p27^{KIP1} is a member of the Cip/Kip family of cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKI). It binds to a wide variety of cyclin/CDK complexes, including CDK2 and -4, inhibiting kinase activity and blocking the G1/S transition necessary for cell-cycle progression [33–36]. In addition, p27^{KIP1} has been implicated in the regulation of apoptosis and cell differentiation, and in the response to inflammatory stimuli [37,38]. The p27^{KIP1} protein level is mainly regulated through degradation by ubiquitin-dependent proteolysis [38,39]. However, some studies have demonstrated a decreased expression of p27^{KIP1} due to transcriptional repression by C-MYC, a helix–loop–helix zipper transcriptional factor [40,41]. The presence of the C-MYC protein has also been shown to block the nuclear transport of p27^{KIP1} from the cytoplasm, mediated by increase in synthesis of cyclins D1 and D2 [40,42].

In gastric cancer, decreased p27^{KIP1} protein expression is an indicator of poor prognosis, and is associated with more aggressive characteristics and tumor proliferation [28,35,43]. The association between *H. pylori* and reduced p27^{KIP1} expression has been

indicated by some *in vitro* studies and others involving eradication of this microorganism [39,44,45]. However, only a few papers have analyzed *in vivo* the association between *H. pylori* infection and the expression of the p27^{KIP1} protein and they were restricted to gastritis and intestinal metaplasia [27,44]. Moreover, there are no *in vivo* studies which relate *H. pylori* genotypes with p27^{KIP1} and C-MYC expression in gastric cancer. Thus we examined, in a series of gastric adenocarcinomas, the relationship between the *H. pylori* genotype and p27^{KIP1} protein expression and also the involvement of C-MYC in this process. Since the intestinal and diffuse tumors are different entities, the data were also analyzed considering these histological subtypes.

Material and methods

Clinical specimens

The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Complex of the Federal University of Ceará and all subjects signed an informed consent form before inclusion. Samples from 84 patients with gastric adenocarcinoma who had undergone gastrectomy were collected from two hospitals in Ceará State, Brazil: Walter Cantídeo Hospital at the Federal University of Ceará and Santa Casa de Misericórdia Hospital, both located in Fortaleza, the state capital. The histological classification was made according to the Lauren classification [3] by the team's pathologists.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from frozen tumor tissue using the cetyltrimethyl ammonium bromide technique, adapted from the method of Foster and Twell [46]. DNA extraction was done only in fragments that showed >80% tumor cells, and the quality was assessed by 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. Also, the amount of DNA was determined using a NanoDropTM 3300 fluorospectrometer.

Detection of *H. pylori* and the presence of *vacA*, *cagA*, *cagE*, and *virB11* genes

The *H. pylori* infection was detected by amplification of the *ureC* gene using primers for polymerase chain reaction (PCR), as described by Lage et al. [47]. For the *H. pylori*-positive samples, the presence of the

genes *vacA*, and the *cagA*, *cagE*, and *virB11* genes were identified using primer sets shown in the published literature. These are shown in Table I. PCR mixtures, for amplification of *cagE* and *virB11* genes, were prepared in a volume of 20 µl using MasterMix® Taq DNA Polymerase, dNTPs and MgCl₂ according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI), with addition of 0.8% Tween 20, 3 µM (*virB11*) or 1 µM (*cagE*) of each primer and 1 µl of the DNA sample.

The *cagA*, *vacA s1/s2*, and *vacA m1* genes were amplified in a 25-µl volume containing 2.5 µl of 10× PCR buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 1% Tween 20, 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 200 µM each of dNTPs (Invitrogen), 1 U of Platinum Taq polymerase (Invitrogen), 0.4 µM (*ureC*, *cagA*, *vacA s1/s2*, and *vacA m1*) or 0.3 µM (*vacA m2*) for each primer and 1 µl of *H. pylori* DNA.

The PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. The size of the amplification product was used to confirm the identity of the PCR product. The sample was considered *H. pylori*-positive when an *ureC* fragment of 294 bp was amplified. For confirmation of the specificity of reaction, PCR products from *ureC* gene were cloned with a TOPO TA Cloning® kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced using the ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.0 cycle-sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and ABI PRISM® 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems). *vacA*, *cagA*, *cagE*, and *virB11* genes were considered positive when a specific

fragment was detected (Table I). DNase-free water was used as a negative control. DNA preservation was also confirmed by amplification of different genes by other approaches under study in the laboratory. Random samples were re-analyzed for confirmation of the results.

Immunohistochemistry

Immunostaining was performed according to a previously described protocol of Hsu et al. [49]. For antigen retrieval, deparaffinized sections were pretreated by heating in a microwave oven in 10 mM citrate buffer, pH 6.0, for 20 min. After cooling, sections were then immersed in 3% hydrogen peroxide for 10 min to block endogenous peroxidase activity. Sections were then incubated in a moist chamber overnight at 4°C with primary antibody. The primary antibodies used were p27^{KIP1} (clone SX53G8; dilution 1:50; DakoCytomation; Glostrup, Zealand, Denmark) and C-MYC (clone 9E11; dilution 1:100; Novocastra; Newcastle upon Tyne, UK). After rinsing with phosphate-buffered saline (PBS), the slides were incubated with secondary antibody followed by streptavidin-biotin-peroxidase complex (LSAB+ system; DakoCytomation), both for 30 min at room temperature with a PBS wash between each step. The reaction was revealed with diaminobenzidine-H₂O₂ (DAB+ system; DakoCytomation), counterstained with Harry's hematoxylin and mounted. A confirmed case of nuclear C-MYC-positive and

Table I. PCR primer sets used for genotyping *H. pylori*.

Gene	Primer sequence	Reference	Annealing temperature (°C)	Size (bp) of PCR product
<i>ureC</i>	F: -5'AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT3'; R: -5'AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC3'	47	55	294
<i>vacA s1/s2</i>	F: -5'ATGGAAATACAACAAACACAC3'; R: -5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	48	55	259/286
<i>m1</i>	F: -5'GGTCAAAATGCGGTCATGG3'; R: -5'CCATTGGTACCTGTAGAAAC3'		55	290
<i>m2</i>	F: -5'GGAGCCCCAGGAAACATTG3'; R: -5'CATAACTAGCGCCTTGCAC3'		52	192
<i>cagA</i>		48		
	F: -5'ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA3'; R: -5'TTAGAATAATCAACAAACATAACGCCAT3'		56	297
<i>cagE</i>	F: -5'TTGAAACTTCAAGGATAGGATAGAGC3'; R: -5'GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC3'	15	50	509
<i>virB11</i>	F: -5'TTAAATCCTCTAAGGCATGCTAC3'; R: -5'GATATAAGTCGTTTTACCGCTTC3'	15	49	491

F = forward; R = reverse.

p27-positive human breast carcinoma was used as a positive control. Controls of primary antibody specificity included omission or substitution of primary antiserum by normal bovine serum.

Immunostaining analyses

The immunohistochemical evaluation was performed by two experienced analysts independently using direct light microscopy. Any conflicting results were jointly considered to give a consensual determination. Protein expression was quantified by manual counting of at least 1000 tumor cells in 10 different fields at magnification of $\times 400$. The labeling index (LI) was expressed as the percentage of tumor-positive cells for nuclear or cytoplasmic staining in each sample [50]. Only cases with scores $\geq 5\%$ were considered positive. Also, the pattern of staining (focal, multifocal, or diffuse) was observed. In the diffuse pattern, the staining of tumor cells occurs uniformly, distributed throughout the whole sample. In the focal staining pattern, staining is restricted to the same region and there can be one to five staining foci. Finally, in the multifocal pattern, more than five foci are observed, distributed non-uniformly.

Statistical analyses

The analyses were carried out using the statistical software SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Statistically significant differences were evaluated by the chi-square test or Fisher's exact test. Correlations between p27^{KIP1} expression and the *H. pylori* genotype group were analyzed by Spearman's rank correlation coefficient. The results were considered statistically significant when *P*-values were < 0.05 .

Results

Of the 84 analyzed cases, 59 were males and 25 were females. The median age was 64.5 years (range 23–90 years). The classification of the gastric tumors was as follows: 2.4% (2/84) were stage IA, 10.7% (9/84) were IB, 23.8% (20/84) were II, 19.0% (16/84) were IIIA, 10.7% (9/84) were IIIB, and 33.3% (28/84) were IV.

Detection of p27^{KIP1}, *H. pylori* infection, and *vacA*, *cagA*, *cagE*, and *virB11* genes

Of the analyzed cases, p27^{KIP1} expression was detected in only 20.2% (17/84) and *H. pylori* infection

was present in 95.2% (80/84). All p27^{KIP1}-positive cases were *H. pylori*-positive, with a diffuse stain pattern observed in 76.5% of the cases (13/17), focal in 17.6% (3/17) and multifocal in 5.9% (1/17). The LI ranged from 5.6% to 41%. Three cases with exclusive cytoplasmic p27^{KIP1} staining and two cases with concomitant nuclear and cytoplasmic p27^{KIP1} staining were also *H. pylori*-positive. On the other hand, among the 79.8% (67/84) of p27^{KIP1}-negative cases, 94.0% (63/67) were *H. pylori*-positive. All *H. pylori*-negative cases were also p27^{KIP1}-negative.

The *H. pylori vacA s1m1* combination was the most frequently observed (72.5%; 58/80), with *s1m2*, *s2m1*, and *s2m2* being detected in 15.0% (12/80), 5.0% (4/80) and 7.5% (6/80) of the cases, respectively. The *H. pylori cag*-PAI genes studied had similar frequencies: 65.0% (52/80) for *cagA*, 53.8% for *cagE* (43/80), and 61.2% (49/80) for the *virB11* gene.

Relationship between *H. pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, and *virB11* genes and p27^{KIP1} detection

To investigate the relationship between *H. pylori cagA*, *cagE*, *virB11*, and *vacA* genes and p27^{KIP1} expression in the pathogenesis of gastric cancer, the cases were divided into groups according to the presence of the studied *H. pylori* genes. The division criteria utilized were *cag*-PAI integrity and presence of the *vacA* alleles, as described in Table II. This Table also shows that the highest frequency of lack of p27^{KIP1} expression (76.7%; 23/30) occurred in cases with *H. pylori* subgroup A1 strain (*vacA s1m1*, *cagA*, *cagE*, and *virB11*), followed by subgroup A2 strains (*vacA s1m1* and *virB11*- as left-side marker of *cag*-PAI and *cagE* or *cagA*- as right-side marker of *cag*-PAI). Statistical analysis was carried out only in the A group due to insufficient numbers of cases in the B and C groups. Although the A1 subgroup had the highest number of p27^{KIP1}-negative cases, a representative number of p27^{KIP1}-positive cases were observed in this subgroup. In subgroup A2, only p27^{KIP1}-negative cases were found. However, this was not statistically significant (*P* = 0.064). It is interesting to note that in group B (*vacA s1m2* or *s2m1*) and group C (*vacA s2m2*) the majority of p27^{KIP1}-negative cases were in strains with only one or no *cag*-PAI gene.

Association of p27^{KIP1} negativity with the A1 subgroup was observed only when the 63 p27^{KIP1}-negative cases were analyzed. From this analysis, there was a statistical difference between the A1 subgroup and the A2 and A3 subgroups (*P* = 0.006 and *P* = 0.022, respectively). Also, Spearman's rank correlation showed a negative correlation between

Table II. Comparison between the results of p27 nuclear expression in *H. pylori* genotype groups in the 80 cases of gastric adenocarcinoma analyzed.

Genotype group	N	p27(+) (n = 12)	p27(-) (n = 46)	P
Group A: <i>vacA</i> s1m1				
1 - <i>ureC</i> (+), <i>cagA</i> (+), <i>cagE</i> (+) and <i>virB11</i> (+)	30	7	23	0.724 ^a
2 - <i>ureC</i> (+), <i>cagA</i> (+) and <i>virB11</i> (+) or <i>cagE</i> (+) and <i>virB11</i> (+)	11	0	11	0.064 ^b
3 - <i>ureC</i> (+), <i>cagA</i> (+) or <i>cagE</i> (+) or <i>virB11</i> (+) or <i>cagA</i> (+) and <i>cagE</i> (+)	11	3	8	0.427 ^c
4 - <i>ureC</i> (+)	6	2	4	0.376 ^d
		n = 3	n = 13	
Group B: <i>vacA</i> s1m2 or <i>vacA</i> s2m1				
1 - <i>ureC</i> (+), <i>cagA</i> (+), <i>cagE</i> (+) and <i>virB11</i> (+)	2	0	2	-
2 - <i>ureC</i> (+), <i>cagA</i> (+) and <i>virB11</i> (+) or <i>cagE</i> (+) and <i>virB11</i> (+)	1	0	1	-
3 - <i>ureC</i> (+), <i>cagA</i> (+) or <i>cagE</i> (+) or <i>virB11</i> (+) or <i>cagA</i> (+) and <i>cagE</i> (+)	7	1	6	-
4 - <i>ureC</i> (+)	6	2	4	-
		n = 2	n = 4	
Group C: <i>vacA</i> s2m2				
1 - <i>ureC</i> (+), <i>cagA</i> (+), <i>cagE</i> (+) and <i>virB11</i> (+)	0	0	0	-
2 - <i>ureC</i> (+), <i>cagA</i> (+) and <i>virB11</i> (+) or <i>cagE</i> (+) and <i>virB11</i> (+)	1	0	1	-
3 - <i>ureC</i> (+); <i>cagA</i> (+) or <i>cagE</i> (+) or <i>virB11</i> (+) or <i>cagA</i> (+) and <i>cagE</i> (+)	2	1	1	-
4 - <i>ureC</i> (+)	3	1	2	-
Total	80	17	63	

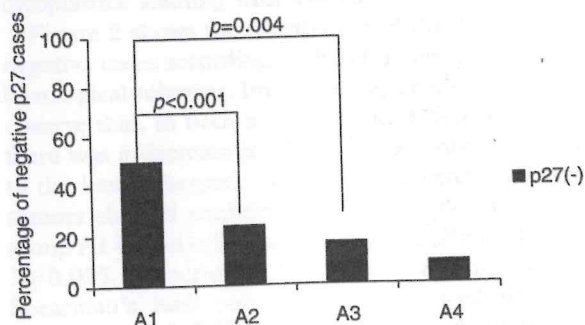
A1 versus other groups.

A2 versus other groups.

A3 versus other groups.

A4 versus other groups.

p27^{KIP1}-negative cases of the A1 subgroup with the A2 ($r_s = -0.349$; $P = 0.005$) and A3 subgroups ($r_s = -0.289$; $P = 0.022$). Additionally, as the A group was the most representative, the 46 p27^{KIP1}-negative cases belonging to this group were analyzed separately (Figure 1) and there was also a statistical difference between the A1 and A2 ($P < 0.001$) and between the A1 and A3 ($P = 0.004$) subgroups. Spearman's rank correlation showed a negative correlation between p27^{KIP1}-negative cases of the A1 subgroup with the A2 ($r_s = -0.561$; $P < 0.001$) and A3 subgroups ($r_s = -0.459$; $P = 0.001$).

Figure 1. Comparison of 46 p27^{KIP1}-negative cases among *H. pylori* genotype groups A1, A2, A3, and A4.

Relationship between *H. pylori* genotype group and p27^{KIP1} detection and histological type

No statistical difference between intestinal and diffuse histological subtypes related to p27^{KIP1} expression was observed. However, when the cases were distributed according to the *H. pylori* genotype groups, a statistical difference between these histological subtypes in the A1 subgroup was found ($P = 0.038$) (Table III). In the A group, a tendency towards reduction of p27^{KIP1} negativity could be observed with loss of studied *cag*-PAI genes in both histological types (Table III). This tendency was not observed in cases from the B group. Most of the p27^{KIP1}-positive cases (13/17) were found in the intestinal subtype, but without a statistical difference ($P = 0.39$).

Among the intestinal subtype (Table III), the majority of the p27^{KIP1}-positive cases were observed in the A1 subgroup (53.8%; 7/13), besides a high number of p27^{KIP1}-negative cases in this subgroup. Six of these p27^{KIP1}-positive cases showed a predominant high LI and diffuse staining pattern. Two cases had exclusive cytoplasmic p27 staining and two cases had concomitant nuclear and cytoplasmic p27 staining, all belonging to the A group. On the other hand, in the diffuse subtype tumors, despite the small number of cases, the p27^{KIP1}-positive cases were present

Table III. Comparison of p27 nuclear positivity among the *H. pylori* genotype groups according to the histological subtypes.

Genotype group	Intestinal (I)		P	Diffuse (D)		P	I×D P
	p27(+)	p27(-)		p27(+)	p27(-)		
Group A							
	7	13	0.188 ^a	0	10 ^c	0.107 ^a	0.038*
	0	8	0.076 ^b	0	3 ^c	0.618 ^b	—
	1	7	0.375 ^c	2	1	0.045 ^c	0.152
	1	3	1.000 ^d	1	1	0.134 ^d	1.000
Subtotal	9	31	—	3	15	—	—
Group B							
	0	1	—	0	1	—	—
	0	0	—	0	1	—	—
	0	5	—	1	1	—	—
	2	2	—	0	2	—	—
Subtotal	2	8	—	1	5	—	—
Group C							
1	0	0	—	0	0	—	—
2	0	0	—	0	1	—	—
3	1	0	—	0	1	—	—
4	1	0	—	0	2	—	—
Subtotal	2	0	—	0	4	—	—
Total; n (%)	13 (25)	39 (75)	—	4 (14.3)	24 (85.7)	—	—

A1 versus other groups.
A2 versus other groups.
A3 versus other groups.
A4 versus other groups.
A1+A2 versus other groups (*P* = 0.067).
Histological subtype (intestinal, diffuse) versus p27^{KIP1} detection.

in the less pathogenic A subgroups, with statistical significance (*P* = 0.045) for the A3 subgroup. Although all cases from the subgroups A1 and A2 were p27-negative (13/28), considering both subgroups there was no statistical significance when they were compared to the other groups (*P* = 0.067). Only one case in this group had focal cytoplasmic staining with low LI.

Figure 2 shows the distribution of the 46 p27^{KIP1}-negative cases according to the *H. pylori* A group and histological subtypes. From this Figure it is possible to observe that, in both intestinal and diffuse subtypes, there was a decrease in p27^{KIP1} negativity according to the less pathogenic group. The intestinal subtype tumors showed statistical significance between subgroup A1 versus subgroups A2 and A3 (*P* = 0.010 and *P* = 0.025, respectively). Also, in the intestinal tumors, Spearman's rank correlation test showed that the presence of p27^{KIP1}-negative cases in the A1 subgroup was inversely correlated with the A2 (*r*_s = -0.501; *P* = 0.004) and A3 subgroups (*r*_s = -0.459;

P = 0.009). In the diffuse subtype tumors, a statistical significance was only observed between subgroup A1 versus subgroup A2 (*P* = 0.022) and Spearman's rank correlation test showed that the presence of p27^{KIP1}-negative cases in the A1 subgroup was inversely correlated with the A2 subgroup (*r*_s = -0.707; *P* = 0.003).

Relationship between p27^{KIP1} and C-MYC expression and association with *H. pylori* genotype group

To verify the involvement of C-MYC with p27^{KIP1} negativity, both markers were analyzed together. C-MYC positivity was detected in 40.5% (34/84) of the cases, and 85.3% (29/34) of these were p27-negative. Considering the p27^{KIP1}-negative cases, 44.8% (30/67) were C-MYC-positive, 14 of which were intestinal and 16 diffuse subtype. Among the p27^{KIP1} cytoplasmic staining cases, only one was C-MYC-positive and it belonged to the diffuse

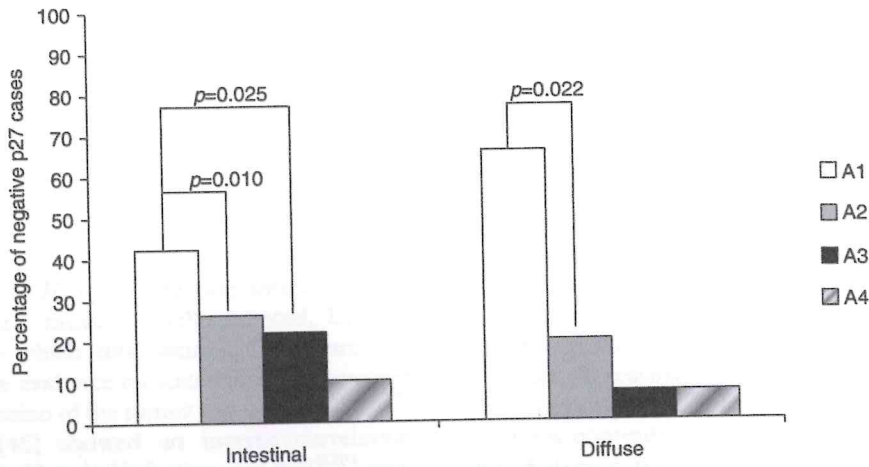


Figure 2. Comparison of 46 p27-negative cases among *H. pylori* genotype groups A1, A2, A3, and A4 according to histological type.

ubtype. In histological subtypes, no statistical difference was observed between p27^{KIP1} and C-MYC expression. There was no statistical difference between C-MYC expression and *H. pylori* genotype group. However, when this association was examined considering the histological subtypes, there was a significant difference in C-MYC expression between the intestinal and diffuse tumors in the *H. pylori* subgroup A1 ($P = 0.039$), with a predominance of C-MYC negativity in the intestinal subtype. For the combined C-MYC and p27^{KIP1} analysis, considering the *H. pylori* genotype groups, the data were divided into four clusters (I–IV), according to the expression of these genes. This analysis showed that these clusters had different frequencies according to the histological subtype (Figure 3). In diffuse

tumors, the most frequent cluster was the p27-negative-C-MYC-positive (cluster II). It was predominant in *H. pylori* strains A1 and A2, with a significantly higher frequency ($P = 0.002$) when compared to p27-negative-C-MYC-negative (IV). On the other hand, in the intestinal tumors, the cluster II had similar frequency among all subgroups, and there was a statistically significant difference between intestinal and diffuse tumors, related to the presence of this cluster, in the *H. pylori* A1 subgroup ($P = 0.018$). Additionally, in diffuse tumors, positivity for both markers (I) was more frequent in the A3 and A4 subgroups, especially in relation to the A3 subgroup ($P = 0.055$). The opposite was observed in the intestinal tumors, where positivity for both markers was restricted to the A1 *H. pylori* genotype. Negativity for both markers (IV) was not so frequent in the diffuse

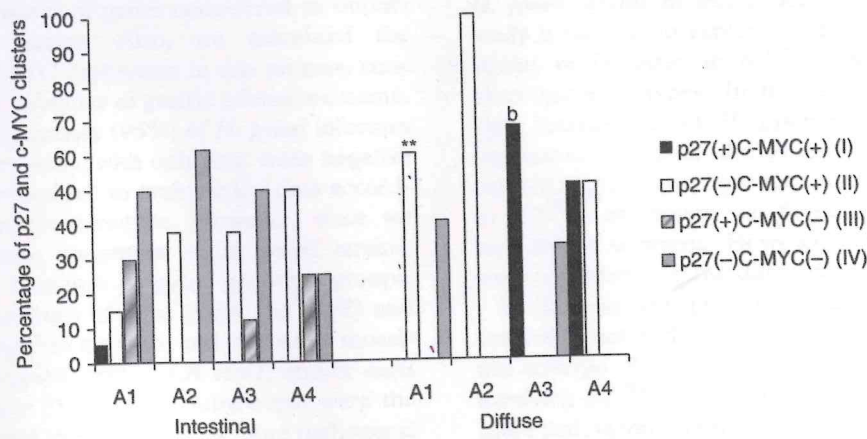


Figure 3. Percentage of clusters I ($n = 4$), II ($n = 21$), III ($n = 8$), and IV ($n = 25$) according to the *H. pylori* genotype subgroup and histological classification in 40 intestinal tumors and 18 diffuse tumors of group A ($n = 58$). ** $P = 0.002$ (cluster II versus cluster IV), $P = 0.018$ (histological subtype versus cluster II). ^b $P = 0.055$.

tumors. Conversely, it was the most frequent cluster of the intestinal tumors, followed by cluster II, which was present regardless of the *H. pylori* genotype. In addition, the p27-positive-C-MYC-negative cases (II) were only observed in the intestinal tumors.

Discussion

The association of *H. pylori* infection with the development of gastric cancer is well accepted, but the mechanisms by which this bacterium acts are still unknown. Some evidence indicates that it is involved in altered expression of the tumor suppressor p27^{KIP1}. Hirin et al. [45] showed an inverse correlation between chronic *H. pylori* infection and p27^{KIP1} protein expression in gastric epithelial cell culture. Another study conducted by Kuzushita et al. [51] suggested that *H. pylori* infection may contribute to the development of the gastric cancer p27^{KIP1} pathway since *H. pylori*-infected rats with p27^{KIP1} deficiency are more likely to develop gastric cancer. *In vivo*, Yu et al. [44] observed reversion of p27^{KIP1} protein expression after eradication of *H. pylori* in patients with intestinal metaplasia. Additionally, studies indicate the pathogenic nature of certain types of *H. pylori* strains [9,15,18], raising the hypothesis that the pathogenicity of bacteria is related to the presence of more virulent strains. In spite of the relevance of the absence of p27^{KIP1} in gastric cancer pathogenesis associated with the presence of *H. pylori* infection, few *in vivo* studies to date have tried to elucidate the influence of this bacterium in p27^{KIP1} expression. Therefore, in the present study, alterations in the expression of p27^{KIP1} in samples from gastric adenocarcinoma patients were analyzed in association with the presence of particular *H. pylori* strains, taking into account the presence of genes considered as important virulence factors. Also, we examined the influence of C-MYC expression in this process, considering distinct subtypes of gastric adenocarcinoma.

Since a high frequency (95%) of *H. pylori* infection was found in the study, with only four cases negative for *H. pylori*, we decided to evaluate the data according to the bacterial genotype. However, since we identified different genotypes of *H. pylori* strains, we divided the data into *H. pylori* genotype groups, based on the presence of right (*cagA* and *cagE*) and left (*virB11*) *cag*-PAI markers and the *vacA* mosaicism. Strains bearing *cagA*, *vacA s1m1*, and/or *cagE* and *virB11* genes (A1 and A2 subgroups) were the most frequent and were considered more pathogenic since these genes were already related in the other studies to more aggressive lesions and to the integrity of the pathogenicity island (*cagA*, *cagE*, and *virB11*),

another important virulence factor of *H. pylori* strains [7,14,15,52–54]. In the general analysis, the majority of the p27^{KIP1}-negative cases were found in the more pathogenic *H. pylori* groups (A1 and A2), but without a statistical difference. In fact, when we carried out the analysis considering only the p27^{KIP1}-negative cases, there was a statistical difference between the frequencies in the A1 subgroup and the A2 and A3 subgroups. Also, there was a negative correlation between p27^{KIP1}-negative cases in the A1 versus the A2 and A3 subgroups. These data indicate that strains considered more pathogenic could be responsible for decreasing p27^{KIP1} protein, leading to development/promotion of gastric carcinoma. These findings contradict the study by Eguchi et al. [39], which demonstrated, *in vitro*, that *H. pylori* virulence-associated genes, including the *cagA*, *cagE*, and *vacA* genes, may play a minor role in decreasing the level of p27^{KIP1} protein in gastric epithelial cells.

A relevant aspect of this study is that the data were analyzed considering the adenocarcinoma subtypes. Currently, based on the molecular changes involved, intestinal and diffuse subtypes are considered distinct tumors, having different tumorigenic pathways [6]. Most studies, especially those that consider the influence of *H. pylori*, do not make this distinction, instead considering gastric adenocarcinoma as a single disease. This may explain some conflicting data [39,45]. Wiksten et al. [55] and Sgambato et al. [56] carried out studies involving p27^{KIP1} expression in both histological subtypes, but without considering *H. pylori* infection and, like in the present study, they did not observe a correlation between p27^{KIP1} expression and intestinal and diffuse tumors. On the other hand, Saragoni et al. [57] showed a correlation between decreased p27^{KIP1} expression and diffuse mixed histotype, but they did not evaluate the influence of *H. pylori* strains in that process. Thus, the present study is the first to explore the influence of different strains of *H. pylori* in p27^{KIP1} expression in both histological subtypes. In this analysis, there was a clear interference of *H. pylori* strain with p27^{KIP1} expression, since in the general analysis, without considering *H. pylori* groups, no difference relating to p27^{KIP1} expression was found between intestinal and diffuse subtypes. However, when these groups were considered, some differences were observed.

In fact, in the present study, *H. pylori* strains seemed to act in distinct ways, according to histological subtype. Both subtypes had a common pathway involving p27^{KIP1} inactivation in association with the more pathogenic strain (A1). p27^{KIP1} positivity in this group was only observed in the intestinal subtype, indicating the existence of two pathways in this histological subtype, one where blockade of p27^{KIP1} is

not involved, while in the other it is an important step. On the other hand, in the diffuse tumors, p27 negativity was statistically related to more pathogenic strains (A1 and A2 subgroups) and, conversely, despite the small number of cases in this group, p27^{KIP1} positivity was related to the less pathogenic strains, indicating that, in these tumors, blockade of the p27^{KIP1} pathway, related to more pathogenic strains, was unique and important.

The reduction in p27^{KIP1} expression in gastric cancer, associated with *H. pylori* infection, can be explained by the transcriptional and post-translational mechanisms. In an acute exposure model, *H. pylori* increased the degradation of p27^{KIP1} protein via a proteasome-dependent pathway [39]. On the other hand, in a long-term co-culture model during which *H. pylori* selects for apoptosis-resistant gastric epithelial cells, the expression of p27^{KIP1} mRNA, detected by Northern blotting, was reduced by about 30% [45]. Similar results were obtained by cDNA microarray analysis [58]. Additionally, there are indications that *H. pylori* increases C-MYC expression in patients with gastric cancer [59] and since there is evidence that C-MYC decreases transcription and the nuclear transport of p27^{KIP1} from the cytoplasm [40,42], or sequestration of p27^{KIP1} in cyclin D/cdk4 complexes [60], the increase in C-MYC expression is suggested to be another way of p27^{KIP1} inactivation by *H. pylori* [27].

In our study, a correlation between p27^{KIP1} and C-MYC was not found, although most (85.3%) C-MYC positive cases were p27^{KIP1}-negative. However, most of the diffuse tumors were C-MYC-positive-p27-negative and statistically associated with the more pathogenic *H. pylori* strains (A1 and A2). Additionally, positivity for both markers was observed in less pathogenic strains, indicating that in this histological subtype the mechanism by which

H. pylori causes the decrease in p27^{KIP1} is C-MYC activation, as suggested by Kim et al. [27], related to the most pathogenic strains. C-MYC is a transcriptional factor of the helix-loop-helix/leucine zipper family of proteins, involved in several cellular processes, such as proliferation and apoptosis [61]. In those tumors, it is plausible to suggest that cellular proliferation and tumoral progression occur through transcription blockade of p27^{KIP1} by C-MYC. Interestingly, in these tumors, only one of the cases with p27^{KIP1} cytoplasmic labeling was C-MYC-positive, contradicting studies of Yang et al. [40] and Perez-Roger et al. [42].

In the intestinal subtype, in spite of a decrease in p27^{KIP1} expression associated with the presence of C-MYC, the predominant finding was negativity for both markers, and neither of them was associated with a specific *H. pylori* group, which justifies the contradictory data from Eguchi et al. [39]. Therefore, the influence of more pathogenic *H. pylori* strains on the decrease in p27^{KIP1} expression, which has been statistically confirmed, could be caused by protein degradation in these tumors, as demonstrated by Eguchi et al. [39], instead of by C-MYC blocking p27^{KIP1} expression, as suggested by Kim et al. [27]. Furthermore, it seems that sequestration in the cytoplasm, related to the most pathogenic *H. pylori* strains, might be another alternative way to inactivate p27^{KIP1}-associated inhibitory activity, since all cytoplasmic p27^{KIP1} cases were found to be associated with strains of the A group in those tumors. The cytoplasmic positivity for p27^{KIP1} protein corresponds to the accumulation of this protein in the cytoplasm, caused by its oncogenetically activated protein-kinase B-mediated phosphorylation, which blocks the recognition of its sites by nuclear importation factors [62]. However, this study included a fairly small number of cases with p27^{KIP1} cytoplasmic

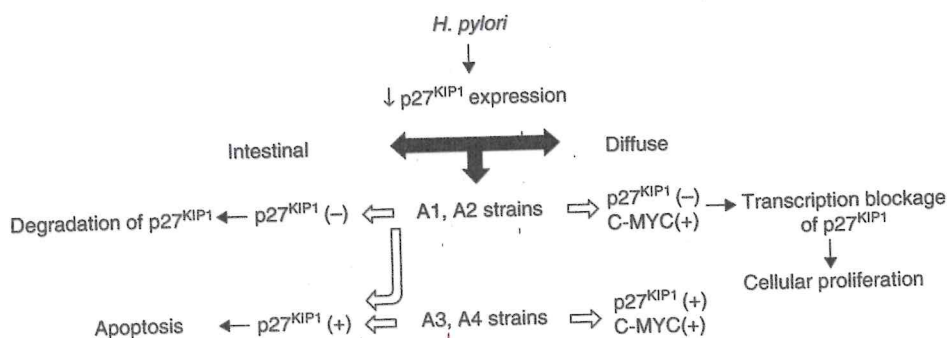


Figure 4. Schematic presentation of the different pathways for the two histological subtypes of gastric adenocarcinoma. For intestinal tumors, a decrease in p27^{KIP1} expression occurs independent of C-MYC and is associated with the most pathogenic strains of *H. pylori*, probably by degradation of that protein. These strains are also related in some cases to p27^{KIP1} positivity, leading to tumor cell apoptosis. In diffuse tumors, C-MYC blocks transcription of p27^{KIP1}, which occurs dependent on the most pathogenic strains, causing disordered cell proliferation and tumor progression.

expression, and this may have had an impact on our conclusions.

Additionally, it was observed, exclusively in intestinal tumors, that there is an association of p27^{KIP1} positivity with the absence of C-MYC. Wu et al. [63] showed that inhibition of C-MYC leads to induction of increased p27^{KIP1} levels. The upregulated p27^{KIP1} level is caused by an increase in protein stability caused by the reduction of Skp2, a key molecule related to p27^{KIP1} ubiquitination and degradation, and *de novo* protein synthesis [64]. The overexpression of p27^{KIP1} protein in mammalian cells induces G1 arrest of the cell cycle, leading to inhibition of proliferation and induction of apoptosis [65]. Lee et al. [43] demonstrated that positive expression of p27^{KIP1} correlated significantly with a favorable prognosis in gastric cancer.

Figure 4 summarizes the distinct pathways for intestinal and diffuse tumors.

In conclusion, our data indicate that reduced expression of p27^{KIP1} is closely linked to *H. pylori* infection-associated gastric cancer and is dependent on the most pathogenic strains. Besides this, it seems that the two gastric adenocarcinoma histological subtypes have distinct carcinogenic pathways, with different influence of *H. pylori* strains. Eradication of *H. pylori* reverses the decreased expression of p27^{KIP1} in gastric cancer and may possibly halt the gastric carcinogenesis cascade. Further understanding of regulators of the cell cycle, such as p27^{KIP1}, and the role of *H. pylori* in gastric cancer pathogenesis may provide not only valuable prognostic information but perhaps also a new dimension regarding its treatment.

Declaration of interest: There are no conflicts of interest.

References

[1] BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2008.

[2] Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection. J Physiol Pharmacol 2006;57:51–65.

[3] Laurén P. Two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. Acta Pathol Microbiol Scand 1965;64:31–49.

[4] Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. World J Gastroenterol 2006;12:2979–90.

[5] Correa P, Schneider BG. Etiology of gastric cancer: what is new? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14:1865–8.

[6] Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. IARC Sci Publ 2004;157:327–49.

[7] Peek RM Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nat Rev Cancer 2002;2:28–37.

[8] IARC. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7–14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994;61:1–241.

[9] Blaser MJ, Atherton JC. Helicobacter pylori persistence: biology and disease. J Clin Invest 2004;113:321–33.

[10] Figueiredo C, Machado JC, Pharoah PM, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, et al. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. J Natl Cancer Inst 2002;94:1680–7.

[11] Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N Engl J Med 2002;347:1175–86.

[12] Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. Helicobacter pylori virulence and genetic geography. Science 1999;284:1328–33.

[13] Jafari F, Shokrzadeh L, Dabiri H, Baghaei K, Yamaoka Y, Zojaji H, et al. vacA genotypes of Helicobacter pylori in relation to cagA status and clinical outcomes in Iranian populations. Jpn J Infect Dis 2008;61:290–3.

[14] Atherton JC. The pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastro-duodenal diseases. Annu Rev Pathol 2006;1:63–96.

[15] Sozzi M, Tomasini ML, Vindigni C, Zanussi S, Tedeschi R, Basaglia G, et al. Heterogeneity of cag genotypes and clinical outcome of Helicobacter pylori infection. J Lab Clin Med 2005;146:262–70.

[16] Lu H, Yamaoka Y, Graham DY. Helicobacter pylori virulence factors: facts and fantasies. Curr Opin Gastroenterol 2005;21:653–9.

[17] Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M, López-Vidal Y. Helicobacter pylori: focus on CagA and VacA major virulence factors. Salud Publica Mex 2004;46:538–48.

[18] Wen S, Moss SF. Helicobacter pylori virulence factors in gastric carcinogenesis. Cancer Lett 2009;282:1–8.

[19] Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem 1995;270:17771–7.

[20] Wang HT, Li ZH, Yuan JP, Zhao W, Shi XD, Tong SQ, et al. Effect of Helicobacter pylori VacA on gene expression of gastric cancer cells. World J Gastroenterol 2005;11:109–13.

[21] Zambon CF, Navaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M. Helicobacter pylori babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. J Clin Pathol 2003;56:287–91.

[22] Backert S, Müller EC, Jungblut PR, Meyer TF. Tyrosine phosphorylation patterns and size modification of the Helicobacter pylori CagA protein after translocation into gastric epithelial cells. Proteomics 2001;1:608–17.

[23] Krause S, Pansegrau W, Lurz R, de la Cruz F, Lanka E. Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the cag pathogenicity island of Helicobacter pylori encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. J Bacteriol 2000;182:2761–70.

[24] Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, Kanai F, Kato N, et al. Structure of cag pathogenicity island in Japanese Helicobacter pylori isolates. Gut 1999;44:336–41.

[25] Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, et al. Analyses of the cag

- pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1998;28:37–53.
- [6] Gamboa-Dominguez A, Seidl S, Reyes-Gutierrez E, Hermannstädter C, Quintanilla-Martinez L, Busch R, et al. Prognostic significance of p21WAF1/CIP1, p27Kip1, p53 and E-cadherin expression in gastric cancer. *J Clin Pathol* 2007;60:756–61.
- [7] Kim SS, Meitner P, Konkin TA, Cho YS, Resnick MB, Moss SF. Altered expression of Skp2, c-Myc and p27 proteins but not mRNA after *H. pylori* eradication in chronic gastritis. *Mod Pathol* 2006;19:49–58.
- [8] Al-Moundhri MS, Nirmala V, Al-Hadabi I, Al-Mawaly K, Burney I, Al-Nabhani M, et al. The prognostic significance of p53, p27 kip1, p21 waf1, HER-2/neu, and Ki67 proteins expression in gastric cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study of 121 Arab patients. *J Surg Oncol* 2005;91:243–52.
- [9] Shirin H, Hibshoosh H, Kawabata Y, Weinstein IB, Moss SF. p16Ink4a is overexpressed in *H. pylori*-associated gastritis and is correlated with increased epithelial apoptosis. *Helicobacter* 2003;8:66–71.
- [10] Ozturk Y, Ozer E, Lebe B, Bekem O, Buyukgebiz B. Immunohistochemical evaluation of p53 expression and proliferative activity in children with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:467–70.
- [11] Shibata A, Parsonnet J, Longacre TA, Garcia MI, Puligandla B, Davis RE, et al. CagA status of *Helicobacter pylori* infection and p53 gene mutations in gastric adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2002;23:419–24.
- [12] Oda T, Murakami K, Nishizono A, Kodama M, Nasu M, Fujioka T. Long-term *Helicobacter pylori* infection in Japanese monkeys induces atrophic gastritis and accumulation of mutations in the p53 tumor suppressor gene. *Helicobacter* 2002;7:143–51.
- [13] Alkarain A, Slingerland J. Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:13–21.
- [14] Blain SW, Scher HI, Cordon-Cardo C, Koff A. p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2003;3:111–15.
- [15] Chetty R. p27 protein and cancers of the gastrointestinal tract and liver: an overview. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:23–7.
- [16] Hengst L, Dulic V, Slingerland JM, Lees E, Reed SI. A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5291–5.
- [17] McAllister SS, Becker-Hapak M, Pintucci G, Pagano M, Dowdy SF. Novel p27(kip1) C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions. *Mol Cell Biol* 2003;23:216–28.
- [18] Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ. p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res* 2001;264:148–68.
- [19] Eguchi H, Herschenhou N, Kuzushita N, Moss SF. *Helicobacter pylori* increases proteasome-mediated degradation of p27(kip1) in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 2003;63:4739–46.
- [20] Yang W, Shen J, Wu M, Arsura M, FitzGerald M, Suldan Z, et al. Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* 2001;20:1688–702.
- [21] Berns K, Martins C, Dannenberg JH, Berns A, Riele H, Bernards R. p27kip1-independent cell cycle regulation by MYC. *Oncogene* 2000;19:4822–7.
- [22] Perez-Roger I, Kim SH, Griffiths B, Sewing A, Land H. Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *EMBO J* 1999;18:5310–20.
- [23] Lee KH, Lee HE, Cho SJ, Cho YJ, Lee HS, Kim JH, et al. Immunohistochemical analysis of cell cycle-related molecules in gastric carcinoma: prognostic significance, correlation with clinicopathological parameters, proliferation and apoptosis. *Pathobiology* 2008;75:364–72.
- [24] Yu J, Leung WK, Ng EK, To KF, Ebert MP, Go MY, et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on expression of cyclin D2 and p27 in gastric intestinal metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1505–11.
- [25] Shirin H, Sordillo EM, Kolevska TK, Hibshoosh H, Kawabata Y, Oh SH, et al. Chronic *Helicobacter pylori* infection induces an apoptosis-resistant phenotype associated with decreased expression of p27(kip1). *Infect Immun* 2000;68:5321–8.
- [26] Foster G, Twell D. Plant gene isolation principles and practice. Chichester, UK: Wiley; 1996. p. 426.
- [27] Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33:2752–6.
- [28] Domingo D, Alarcon T, Pietro N, Sanchez I, Lopez-Brea M. cagA and vacA status of Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999;37:2113–4.
- [29] Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981;29:1349–53.
- [30] Landberg G, Roos G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. *Cell Prolif* 1993;26:427–37.
- [31] Kuzushita N, Rogers AB, Monti NA, Whary MT, Park MJ, Aswad BI, et al. p27KIP1 deficiency confers susceptibility to gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Gastroenterology* 2005;129:1544–56.
- [32] Kamali-Sarvestani E, Bazargani A, Masoudian M, Lankarani K, Taghavi AR, Saberifirooz M. Association of *H. pylori* cagA and vacA genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2006;12:5205–10.
- [33] Lin HJ, Perng CL, Lo WC, Wu CW, Tseng GY, Li AF, et al. *Helicobacter pylori* cagA, iceA and vacA genotypes in patients with gastric cancer in Taiwan. *World J Gastroenterol* 2004;10:2493–7.
- [34] Björkholm B, Falk P, Engstrand L, Nyrén O. *Helicobacter pylori*: resurrection of the cancer link. *J Intern Med* 2003;253:102–19.
- [35] Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Kokkola A, Boguslawski K, Haglund C. The prognostic value of p27 in gastric cancer. *Oncology* 2002;63:180–4.
- [36] Sgambato A, Migaldi M, Leocata P, Ventura L, Criscuolo M, Di Giacomo C, et al. Loss of p27Kip1 expression is a strong independent prognostic factor of reduced survival in N0 gastric carcinomas. *Cancer* 2000;89:2247–57.
- [37] Saragoni L, Morgagni P, De Manzoni G, Tomezzoli A, Roviello F, Marrelli D, et al. Expression of p27 and proliferative (MIB-1), mitotic (MI) and apoptotic indices in early-phase (EGF) gastric carcinoma. Results of a study by the Italian Gastric Cancer Research Group (IRGGC). *Pathologica* 2003;95:22–30.
- [38] Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. *Helicobacter pylori*

- infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784–9.
- [1] Zhang GX, Gu YH, Zhao ZQ, Xu SF, Zhang HJ, Wang HD, et al. Coordinate increase of telomerase activity and c-Myc expression in *Helicobacter pylori*-associated gastric diseases. *World J Gastroenterol* 2004;10:1759–62.
- [2] Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hyde J, Ansorge W, et al. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J* 1999;18:5321–33.
- [3] Lutz W, Leon J, Eilers M. Contributions of Myc to tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2002;1602:61–71.
- [4] Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002;8:1153–60.
- [63] Wu M, Bellas RE, Shen J, Yang W, Sonenshein GE. Increased p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor gene expression following anti-IgM treatment promotes apoptosis of WEHI 231 B cells. *J Immunol* 1999;163: 6530–5.
- [64] Kim JH, Kim HP, Jung CH, Hong MH, Hong MC, Bae HS, et al. Inhibition of cell cycle progression via p27KIP1 upregulation and apoptosis induction by an ethanol extract of *Rhus verniciflua* Stokes in AGS gastric cancer cells. *Int J Mol Med* 2006;18:201–8.
- [65] Davison EA, Lee CS, Naylor MJ, Oakes SR, Sutherland RL, Hennighausen L, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (Kip1) regulates both DNA synthesis and apoptosis in mammary epithelium but is not required for its functional development during pregnancy. *Mol Endocrinol* 2003;17: 2436–47.

ANEXO VI

Artigo publicado no *Virchows Archiv Journal* intitulado: ***MTHFR C677T polymorphism and differential methylation status in gastric cancer: An association with *Helicobacter pylori* infection.***

***MTHFR* C677T polymorphism and differential methylation status in gastric cancer: an association with *Helicobacter pylori* infection**

uardo Henrique Cunha Neves Filho ·
 rkenia Kelia Santos Alves · Valeska Portela Lima ·
 ria Helena Barem Rabenhorst

eived: 25 June 2010 / Revised: 1 October 2010 / Accepted: 5 October 2010
 Springer-Verlag 2010

Abstract *MTHFR* C677T and *Helicobacter pylori* infection are believed to play critical roles in the DNA methylation process, an epigenetic feature frequently found in gastric cancer. The aim of this study was to verify the associations between the *MTHFR* C677T polymorphism and the methylation status of three gastric cancer-related genes. The influence of *H. pylori* strains was also assessed. DNA extracted from 71 gastric tumor samples was available for *MTHFR* C677T genotyping by PCR-RFLP, promoter methylation identification by MS-PCR and *H. pylori* detection and posterior subtyping (*cagA* and *vacA* genes) by PCR. In the distal tumors, a positive correlation was found between the methylation of *CDKN2A* and the allele T carriers ($r=0.357$; $p=0.009$). Considering the eldest patients (age ≥ 60 years old), this correlation was even stronger ($r=0.417$; $p=0.014$). *H. pylori* infection by highly pathogenic strains (*cagA*+/*vacA*s1m1) was also found related to promoter methylation of *CDKN2A* and the allele T carriers in distal tumors ($r=0.484$; $p=0.026$). No significant correlation was verified between *MTHFR* C677T genotype and promoter methylation status when

we analyzed the general sample. DNA methylation in *CDKN2A* associated to the *MTHFR* 677T carrier is suggested to be a distal tumor characteristic, especially in those 60 years old or older, and it seems to depend on the infection by *H. pylori* *cagA*/*vacA*s1m1 strains.

Keywords *MTHFR* C677T · DNA methylation · *Helicobacter pylori* · Gastric cancer

Introduction

Gastric adenocarcinoma is one of the most frequent malignancies worldwide and it is globally the second leading cause of cancer-related deaths [1]. Brazil is one of the countries with a higher incidence, mainly in the Southeast and Northeast regions [2]. Gastric cancer has multifactorial etiology, being caused by environmental, genetic and epigenetic factors, which may interact to the tumor promotion and progression [3]. Epidemiological studies have shown an association between disturbances of folate metabolism and increased risk of gastric cancer, including low intake of folate, low levels of folate in blood or genetic factors affecting folate metabolism, such as polymorphisms in folate-metabolizing genes [4–6].

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) acts centrally in folate metabolism, catalyzing the 5-methylenetetrahydrofolate synthesis reaction, the predominant circulatory form of folate and carbon donor for the remethylation of homocysteine to methionine. This pathway leads to the production of S-adenosylmethionine, the universal donor of methyl radical in human, which is required for DNA methylation [7]. Thus, polymorphisms that reduce the MTHFR activity could influence the status of DNA

H. C. Neves Filho · M. K. S. Alves · V. P. Lima ·
 H. B. Rabenhorst
 Department of Pathology and Forensic Medicine—Genetic
 Section, Universidade Federal do Ceará,
 Rua Alexandre Baraúna, 949, Porangabussu,
 CEP 60183-630 Fortaleza, Brazil

H. C. Neves Filho (✉)
 Departamento de Patologia e Medicina Legal,
 Universidade Federal do Ceará—Faculdade de Medicina,
 Rua Alexandre Baraúna, 949, Porangabussu,
 CEP 60183-630 Fortaleza, CE, Brazil
 e-mail: edu0689@yahoo.com.br

hylation and would explain individual susceptibility to gastric cancer [8]. A C/T nucleotide change at 677 position in the *MTHFR* gene (*MTHFR* C677T), resulting in an isoleucine-to-valine substitution in the MTHFR protein, was found to produce a thermolabile variant of the MTHFR and significantly reduces the enzyme activity [9]. Furthermore, a recent meta-analysis carried out by Boccia et al. reported a significant positive correlation between gastric cancer and *MTHFR* 677TT genotype [10].

DNA methylation is an important epigenetic feature of DNA that plays critical roles in gene regulation and cellular differentiation mechanisms. Methylation of promoter, especially in the CpG islands, culminates in gene silencing. Gastric cancer is one of the human tumors with higher number of silenced genes by methylation of CpG islands [11]. Currently, the available data about the role of *MTHFR* C677T polymorphism in relation to the aberrant DNA methylation in gastric cancer is inconsistent and incomplete. It has been suggested that this polymorphism plays a dual role on the methylation status of promoter regions depending on the target gene [8, 12].

Another important etiological factor in gastric cancer is *Helicobacter pylori* infection. Bacterial virulence factors characteristics present in some bacteria which enable them to cause disease. These are, mainly, vacuolating cytotoxin production associated to certain types of *vacA* (vacuolating cytotoxin gene A) alleles and *cagA* (cytotoxin associated gene product A) [13]. *H. pylori* strains expressing *cagA* and more active forms of *vacA*, such as the s1m1 genotype, are more likely to cause disease [14].

Despite of some advances, the molecular mechanisms associated with *H. pylori* in gastric carcinogenesis remains poorly understood. One of the promoting effects has been attributed to the induction of inflammation and aberrant methylation. It has been reported that frequencies or levels of CpG islands methylation of certain genes correlate with *H. pylori* infection, histological or serological severity of gastritis, and gastric cancer occurrence [12]. The observation that *H. pylori*-induced methylation is reversed after *H. pylori* eradication therapy supports this hypothesis [14]. Thus, the aim of this study was to verify the associations between the *MTHFR* C677T polymorphism genotype and the DNA methylation of three candidate genes (*COX-2*, *CDKN2A*, and *HMLHI*), largely associated with gastric carcinogenesis, and the influence of *H. pylori* strains in this process.

Materials and methods

Clinical specimens

The present study was approved by the Hospital Ethics Committee in the Federal University of Ceará and all

subjects signed the informed consent form before inclusion. Samples from 71 patients with gastric adenocarcinoma who had undergone gastrectomy were collected from Walter Cantídio University Hospital and Santa Casa de Misericórdia Hospital, both located in Fortaleza, the Ceará state capital. The histological classification was done according to Lauren's classification by our team of pathologists.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from frozen tumor tissue using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) technique, adapted from Foster and Twell [15]. The DNA extraction was done only in fragments that showed more than 80% of tumor cells. The DNA quality was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and the amount was determined using the NanoDrop™ 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA).

Sodium bisulfite treatment and methylation-specific PCR (MS-PCR)

Extracted DNA of tumor tissue was modified by sodium bisulfite to determine the methylation status of the *CDKN2A*, *HMLHI*, and *COX-2* genes by MS-PCR, as previously described by Ferrasi et al. [16]. The primers targeted to the studied promoter gene regions are described in Table 1. PCR was performed in 25 µL reaction volume, containing 1× Platinum *Taq* buffer, 3.0 mM MgCl₂ (*CDKN2A*) or 1.5 mM MgCl₂ (*HMLHI* and *COX-2*), 0.4 mM of each dNTPs, 0.64 µM (*CDKN2A*), 0.24 mM (*HMLHI*) or 0.4 mM (*COX-2*) of each primer set, 1U of Platinum *Taq* DNA Polymerase® (Invitrogen, Foster, CA, USA), and 1 µL of treated DNA. DNA methylated *in vitro* by Sss-I methylase® (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) was used as a positive control. Water and DNA from peripheral lymphocytes of healthy donors were used as negative controls. The PCR products were separated in 6% non-denaturing polyacrylamide gel and subsequently submitted to silver staining (Fig. 1).

For confirmation of the reaction specificity, MS-PCR products from *CDKN2A*, *HMLHI*, and *COX-2* genes analyzed were cloned with a TOPO TA Cloning Kit® (Invitrogen, California, USA) and both the methylated and unmethylated PCR products were sequenced using an ABI PRISM® BigDye Terminator v.3.0 Cycle Sequencing Kit® (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) and ABI Prism 3100 DNA Sequencer® (Applied Biosystems).

Determination of MTHFR C677T genotypes

MTHFR C677T genetic polymorphism was detected by PCR-RFLP as previously described by Frosst et al. [17].

le 1 PCR primer sets used for MS-PCR

Gene	Primer sequences (5' - 3')		Annealing (°C)	Size of PCR product (bp)	Ref.
	Forward	Reverse			
KN2A	M TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACC GCGACCGTAA	70	150	[32]
	U TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA	70	151	
LH1	M TATATCGTTCGTAGTATTCGTGT	TCCGACCCGAATAAACCCAA	66	153	[33]
	U TTTTGATGTAGATGTTTTATTAG	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	64	124	
X-2	M TTAGATACGGCGGGCGGGCGGC	TCTTTACCCGAACGCTTCCG	59	161	[34]
	U ATAGATTAGATATGGTGGTGGTGGT	CACAATCTTTACCCAAACACTTCCA	65	171	

nethylated; U unmethylated

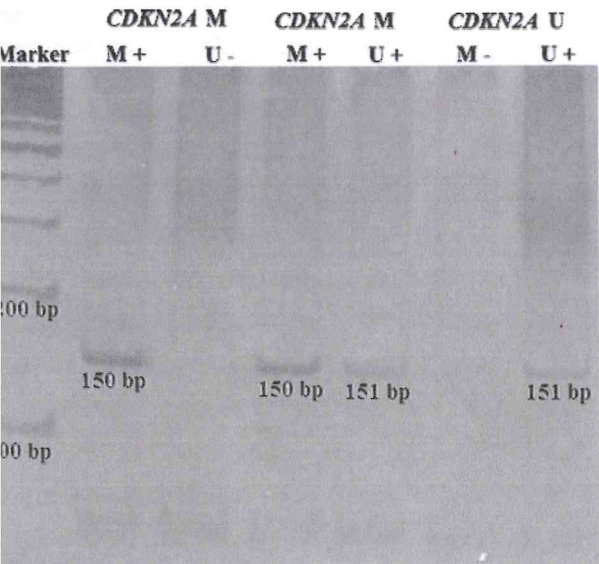
e PCR products of 198 bp were digested with restriction
lonuclease *Hinf*I, producing a 175 and a 23 bp fragments
the polymorphism was present. The digestive products
re resolved by electrophoresis in 6% polyacrylamide gel
h silver staining. Random samples were reanalyzed for
oratory procedures control (Fig. 2).

tection of *H. pylori* and *vacA* alleles and the presence
cagA gene

pylori infection was detected by PCR of the *ureC* gene.
e primers for the *H. pylori* studied genes and their
nealing temperature are described in Table 2. For
nfirmation of the reaction specificity, PCR products from
eC gene were cloned with TOPO TA Cloning Kit®
ivitrogen, California, USA) and sequenced using the ABI
ISM® BigDye Terminator v.3.0 Cycle Sequencing Kit®

(Applied Biosystems, Foster, CA, USA) and ABI Prism
3100 DNA Sequencer® (Applied Biosystems).

The *ureC*, *cagA*, *vacA* s1/s2, *vacA* m1/m2 genes were
amplified in a 25-μL volume containing 2.5 μL of 10×
PCR buffer® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France); 1%
Tween 20, 1.5 mM of MgCl₂ (Invitrogen), 200 μM (each)
of dNTPs (Invitrogen), 1U of Platinum *Taq* polymerase®
(Invitrogen); 0.4 μM (*ureC*, *cagA*, *vacA* s1/s2, *vacA* m1),
0.3 μM (*vacA* m2) for each primer and 1 μL of DNA.
DNase-free water was used as negative control. The PCR
products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis
with ethidium bromide staining (Fig. 3). *vacA* and *cagA*
genes were considered positive when a specific fragment
was detected (Table 2). Random samples were reanalyzed
to confirm the results. DNA preservation has been
confirmed by amplification of different genes in other
approaches under study in our laboratory.

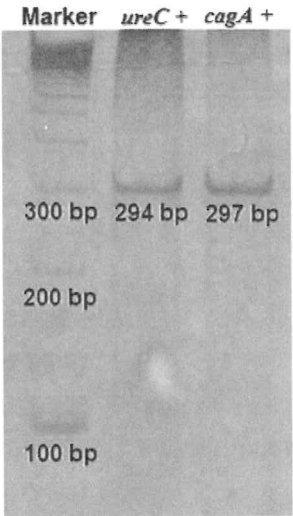


g. 1 Representative electrophoresis of the *CDKN2A* MS-PCR in
% polyacrylamide gel with silver staining



Fig. 2 Representative electrophoresis of the *MTHFR* C677T poly-
morphism in 6% polyacrylamide gel with silver staining

3 Representative electrophoresis of the *ureC* and *cagA* amplification in 6% acrylamide gel with silver staining



Frequency of promoter methylation of three CpG islands and MTHFR genotypes

All 71 tumor samples were available for MS-PCR analysis and for *MTHFR* genotyping. CpG island methylation was found in 30 of the tumors samples (42.2%) for *CDKN2A*, 38 (53.5%) for *COX-2* and 22 (30.9%) for *HMLH1*. The *MTHFR* C677T genotype shows similar frequency for the homozygous CC (34/71; 47.8%) and heterozygous CT (31/71; 43.6%) carriers. Homozygous carries for *MTHFR* 677TT was found in only 8.6% of the patients.

Association between MTHFR C677T, promoter methylation and clinicopathological parameters

The association of each *MTHFR* C677T genotype to the promoter CpG islands methylation status is shown in Table 3. No significant correlation was found between the promoter methylation for all the studied genes, age (cutoff of 60 years old), histological subtypes (intestinal and diffuse), and *MTHFR* genotype (Table 3).

When the tumors were analyzed according to its localization, in the distal tumors a positive correlation was found between the promoter methylation of *CDKN2A* and the allele T carriers (CT and TT genotypes; $r=0.357$, $p=0.009$) (Table 4). Considering the patients age with 60 years old or older, this correlation was even higher ($r=0.417$, $p=0.014$).

Influence of *H. pylori* genotype in the methylation process

H. pylori infection was present in 68 of the patients (95.8%). Among them, 31 (45.5%) were *cagA*+/*vacA*s1m1. As most of the patients were *H. pylori* positive, we verify if there was an association between the *H. pylori* strains and the *MTHFR* genotype in gene methylation, considering clinicopathological parameters. From these analysis, we

Statistical analyses

These were carried out using the statistical program SPSS® version 15.0 (Chicago, IL, USA). Statistically significant differences were evaluated by the chi-square test (χ^2). Correlations were analyzed by Spearman's rank correlation coefficient. The results were considered statistically significant when p values were less than 0.05.

Results

Study population

Among the 71 cases analyzed, 45 (63.4%) were males and (36.6%) females. The average age was 64.2, ranging from 23 to 92 years old. The most frequent site was the gastric non cardia [52/71 (73.2%) \times 19/71 (26.8%)]. Intestinal and diffuse subtypes presented 43 (60.5%) and 28 (39.5%) frequencies, respectively.

Table 2 PCR primer sets used for genotyping *H. pylori*

Gene	Primer sequence	Annealing (°C)	Size (bp) of PCR product	Reference number
<i>CagA</i>	F—5' AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT 3' R—5' AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC 3'	55	294	[35]
<i>VacA</i>	F—5' ATGGAAATACAACAAACACAC 3' R—5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	55	259/286	[36]
	F—5' GGTCAAAATGCGGTCATGG 3' R—5' CCATTGGTACCTGTAGAAAC 3'	55	290	
	F—5' GGAGCCCCAGGAAACATTG 3' R—5' CATACTAGCGCCTTGAC 3'	52	192	
<i>UreA</i>	F—5' ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA 3' R—5' TTAGAATAATCAACAAACATAACGCCAT 3'	56	297	[37]

F forward; R reverse

Table 3 Association between the MTHFR C677T genotype, the clinicopathological parameters, and the promoter methylation status of the three studied genes

Variables	MTHFR genotype			Allele T carriers
	CC	CT	TT	
Age	22	18	5	23
Gender	12	13	1	14
Education	13	7	2	9
Duration	21	24	4	28
Tumor's histotype				
Tubular	13	13	2	15
Glandular	21	18	4	22
Tumor's anatomical site				
Proximal	9	8	2	10
Distal	25	23	4	27
CDKN2A				
Methylated	23	15	3	18
Unmethylated	11	16	3	19
COX-2				
Methylated	17	13	3	16
Unmethylated	17	18	3	21
HMLH1				
Methylated	24	21	4	25
Unmethylated	10	10	2	12

found a high association between the promoter methylation of *CDKN2A* and the *MTHFR* 677T carrier ($r=0.484$, $p=0.026$) in the distal tumors infected by *H. pylori cagA+/vacAs1ml1*.

Association between number of methylated CpG islands and MTHFR genotype

To investigate whether the *MTHFR* genotype might be associated with methylation of multiple CpG sites we grouped all the 71 subjects according to the numbers of methylated genes: none, 1, 2, and 3. No promoter methylated gene was present in 20 (28.2%) of the cases while the presence of 1, 2, and 3 was observed in 19 (26.8%), 25 (35.2%), and 7 (9.8%) of the cases, respectively. The mean number of methylated CpG sites according to the *MTHFR* genotype was 1.12 for CC, 1.42 for CT, 1.33 for TT and 1.40 for T carrier. No significant association was found between *MTHFR* genotype and number of methylated CpG sites and no statistical difference was verified between the number mean of methylated CpG sites over the different *MTHFR* genotypes.

Discussion

The relationship between the hypermethylation of tumor suppressor genes or DNA repair genes with the gastric carcinogenesis process has been pointed in many studies; however, the factors involved in the induction of this process are still unknown [18, 19]. Some studies indicate that DNA methylation depends on environmental factors such as *H. pylori* infection and may also vary according to the presence of polymorphisms involved in this process as those of enzymes involved in the folate cycle [8, 12, 13]. However, there are only few studies focusing these aspects and they present controversial results. So that, in the present study, the association between the methylation status of *CDKN2A*, *HMLH1*, and *COX-2*, the *MTHFR* C677T polymorphism and the influence of high pathogenic *H. pylori* strains in gastric cancer were analyzed.

The first analysis focused the association between the presence of promoter methylation and the *MTHFR* C677T polymorphism. Some studies demonstrated that genetic and epigenetic changes in gastric carcinoma differ depending on the tumor localization and on its histological subtype [20, 21]. Based on that, the data were analyzed according to these aspects. Although no difference was observed regarding to histological subtype, differences were identified according to the tumor anatomic site. In the distal tumors, an unexpected positive correlation was found between the CpG island methylation of *CDKN2A* and the allele T carriers. In fact, this correlation was even higher when we considered the 60 years old or older patients. Tahara et al. [12] also observed a similar correlation between the hypermethylation of *CDKN2A* and the *MTHFR* 677TT genotype, but these authors did not associate it to the tumor anatomic site. Both ours and Tahara et al.'s studies disagree with Weng et al. [22],

Table 4 Association between MTHFR polymorphism and methylation status of three promoter CpG islands on the distal tumors

Variables	MTHFR genotype			Allele T carriers
	CC	CT	TT	
<i>CDKN2A</i>				
Unmethylated	6	14	2	16
Methylated	9	9	2	11*
<i>COX-2</i>				
Unmethylated	13	14	2	16
Methylated	12	9	2	11
<i>HMLH1</i>				
Unmethylated	10	9	1	10
Methylated	15	14	3	17

* $p=0.009$

ich found a promoter hypermethylation of *CDKN2A* in patients with the *MTHFR* 677CC genotype. Various studies have been associating the *MTHFR* C677T polymorphism to gastric cancer risk in a specific anatomic localization. Wang et al. [23], evaluating the association of *MTHFR* C677T and thymidylate synthase promoter polymorphisms with genetic susceptibility found a gastric cardia adenocarcinoma risk related to the *MTHFR* 677TT and 2R2R genotypes. Likewise, Miao et al. [5] observed that subjects with the *MTHFR* 677TT variant genotype had twofold increased risk of gastric cardia adenocarcinoma. These studies suggested that the common functionally polymorphism *MTHFR* C677T plays a substantial influence on the gastric cardia adenocarcinoma carcinogenesis. However, both studies did not evaluate the methylation pattern of specific genes associated to this polymorphism. Related to methylation status associated with tumor region there are some controversy. Vo et al. [24] found no distinct methylation status for *CDKN2A* regarded to the tumor localization, while recent studies carried out in Turkey [25] and Germany [6] correlate methylation of promoter *CDKN2A* to cardiac tumors, but the *MTHFR* C677T polymorphism influence is not assessed. We suggest that in distal tumors, the silencing of tumor suppressor genes by their promoter CpG islands and methylation, especially when influenced by *MTHFR* polymorphism, might be an important carcinogenic pathway. It has been well established over the literature that, in general, the methylation status of promoter CpG islands tends to increase with age [27]. From that standpoint, we found that the correlation between methylation of *CDKN2A* and *MTHFR* 677T carrier subjects in distal tumors is higher in an older generation (60 years old or older). It seems that the *MTHFR* polymorphism may have a greater influence on the methylation status as time goes by. Additionally, in the present study, *MTHFR* C677T polymorphism does not act homogeneously over all the studied genes. *MTHFR* 677TT genotype seems to be related to the hypermethylation of *CDKN2A*; on the other hand, it does not show an involvement regarding to *HMLH1* and *COX-2* methylation status. Some studies have been reporting this dual behavior of *MTHFR* C677T polymorphism regarding to methylation and unmethylation of promoter regions depending on the target gene [8, 12]. Our data suggests that this differential methylation status influenced by *MTHFR* C677T genotype depends on the tissue, specifically on the tumor localization. Probably the induction of the methylation process of some genes, like *HMLH1* and *COX-2*, is independent on the *MTHFR* C677T polymorphism.

Although the hypermethylation of promoter regions in genes involved on gastric carcinogenesis has been well accepted and some studies associate it with *MTHFR* C677T polymorphism, the influence of *H. pylori* in this process is still not understood. In the present study, the infection by a

highly pathogenic *H. pylori* strain (*cagA*+ and *vacA* s1m1 genotype) was associated to the methylation of *CDKN2A* in the distal stomach in patients with *MTHFR* 677TT genotype.

Recently, there have been reports showing that *H. pylori* infection is the most predisposing factor for gene methylation in the stomach [28–30]. It is well known that *H. pylori* induces chronic inflammation, resulting in down-regulation of the some genes that maintain gastric mucosal homeostasis [14]. Also, the inflammation induced by *H. pylori* infection seems to promote methylation of certain genes [31], which could justify an increased risk of tumor formation, mainly associated with the risk of noncardia gastric cancer.

In conclusion, the DNA methylation in promoter regions of *CDKN2A* associated to the *MTHFR* 677T carrier is suggested to be a distal tumor characteristic, especially in those 60 years old or older, and depends on the infection by *H. pylori* *cagA/vacA*s1m1 strains. More studies with large sample size involving the folate enzymes polymorphisms, DNA methylation and *H. pylori* infection are needed to extend our understanding of gastric carcinogenesis.

Conflict of interest statement We attest the inexistence of conflicts of interest, corporate involvement, or patent holdings.

References

1. Lao-Sirieix P, Caldas C, Fitzgerald RC (2010) Genetic predisposition to gastro-oesophageal cancer. *Curr Opin Genet Dev* 20 (3):210–217
2. Ministério da Saúde do Brasil. Instituto Nacional de Câncer (2009) Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. INCA, Rio de Janeiro
3. Cotran RS et al (2000) Robbins—patologia estrutural e funcional. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
4. Choi SW, Mason JB (2000) Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 130:129–132
5. Miao X, Xing D, Tan W, Qi J, Lu W, Lin D (2002) Susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma and genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase in an at-risk Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 11(11):1454–1458
6. Götze T, Röcken C, Röhl FW et al (2007) Gene polymorphisms of folate metabolizing enzymes and the risk of gastric cancer. *Cancer Lett* 251(2):228–236
7. Shen H, Xu Y, Zheng Y et al (2001) Polymorphisms of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control study. *Int J Cancer* 5:332–336
8. Wang J, Sasco AJ, Fu C et al (2008) Aberrant DNA methylation of P16, MGMT, and hMLH1 genes in combination with *MTHFR* C677T genetic polymorphism in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 17(1):118–125
9. Graziano F, Kawakami K, Ruzzo A et al (2006) Methylenetetrahydrofolate reductase 677C/T gene polymorphism, gastric cancer susceptibility and genomic DNA hypomethylation in an at-risk Italian population. *Int J Cancer* 118(3):628–632

Boccia S, Hung R, Ricciardi G et al (2008) Meta- and pooled analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer risk: a huge-GSEC review. *Am J Epidemiol* 167(5):505–516

Perri F, Cotugno R, Piepoli A et al (2007) Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of *H. pylori* infected patients and effect of eradication. *Am J Gastroenterol* 102 (7):1361–1371

Tahara T, Shibata T, Nakamura M et al (2009) MTHFR 677T carrier influences the methylation status of *H. pylori*-infected gastric mucosa in older subjects. *Dig Dis Sci* 54(11):2391–2398

Atherton JC (1998) *H. pylori* virulence factors. *Br Med Bull* 54 (1):105–120

Atherton JC (2006) The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol* 1:63–96

Foster GD, Twell DJ (1996) Plant gene isolation: principles and practice. Wiley, England

Ferrasi AC, Pinheiro NA, Rabenhorst SH et al (2010) *Helicobacter pylori* and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 16(3):312–319

Frosst P, Blom HJ, Milos R et al (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111–113

Kim H, Kim YH, Kim SE, Kim NG, Noh SH, Kim H (2003) Concerted promoter hypermethylation of hMLH1, p16INK4A, and E-cadherin in gastric carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 200(1):23–31

Shim YH, Kang GH, Ro JY (2000) Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab Invest* 80(5):689–695

Driessen A, Nafteux P, Lerut T et al (2004) Identical cytokeratin expression pattern CK7+/CK20– in esophageal and cardiac cancer: etiopathological and clinical implications. *Mod Pathol* 17 (1):49–55

Tahara E (2004) Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 157:327–349

Weng YR, Sun DF, Fang JY, Gu WQ, Zhu HY (2006) Folate levels in mucosal tissue but not methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms are associated with gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 12(47):7591–7597

Wang LD, Guo RF, Fan ZM et al (2005) Association of methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase promoter polymorphisms with genetic susceptibility to esophageal and cardiac cancer in a Chinese high-risk population. *Dis Esophagus* 18(3):177–184

Vo QN, Geradts J, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG (2002) CDKN2A promoter methylation in gastric adenocarcinomas: clinical variables. *Hum Pathol* 33(12):1200–1204

25. Ksiai F, Ziadi S, Amara K, Korbi S, Trimeche M (2009) Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma. *Clin Chim Acta* 404(2):128–133

26. Sarbia M, Geddert H, Klump B, Kiel S, Iskender E, Gabbert HE (2004) Hypermethylation of tumor suppressor genes (p16INK4A, p14ARF and APC) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 111(2):224–228

27. van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B (2002) Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* 51(6):797–802

28. Nardone G, Compare D, De Colibus P, de Nucci G, Rocco A (2007) *Helicobacter pylori* and epigenetic mechanisms underlying gastric carcinogenesis. *Dig Dis* 25(3):225–229

29. Kitajima Y, Ohtaka K, Mitsuno M et al (2008) *Helicobacter pylori* infection is an independent risk factor for Runx3 methylation in gastric cancer. *Oncol Rep* 19(1):197–202

30. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M et al (2006) High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res* 12(3 Pt 1):989–995

31. Katayama Y, Takahashi M, Kuwayama H (2009) *Helicobacter pylori* causes runx3 gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated by nitric oxide produced by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 388(3):496–500

32. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 93:9821–9826

33. Kang GH, Shim YH, Ro JY (1999) Correlation of methylation of the *HMLH1* promoter with lack of expression of HMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. *Lab Invest* 79 (7):903–909

34. Akhtar M, Cheng Y, Magno RM et al (2001) Promoter methylation regulates *Helicobacter pylori*-stimulated cyclooxygenase-2 expression in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 61(6):2399–2403

35. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A et al (1995) Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 33:2752–2756

36. Atherton JC, Cao P, Peek RMJR, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 270:17771–17777

37. Domingo D, Alarcon T, Pietro N, Sanchez I, Lopez-Brea M (1999) cagA and vacA status of Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 37:2113–2114

ANEXO VII

Artigo submetido ao *International Journal of Cancer* intitulado: ***COX-2, HMLH1 and CDKN2A gene promoter inactivation by methylation in gastric cancer: Relationship with histologic subtype, tumor location and *Helicobacter pylori* genotypes.***

Title: *COX-2*, *HMLH1* and *CDKN2A* gene promoter inactivation by methylation in gastric cancer: Relationship with histologic subtype, tumor location and *Helicobacter pylori* genotypes.

The authors names: Markênia Kélia Santos Alves (MS)*¹, Valeska Portela Lima (MS)¹, Adriana Camargo Ferrasi (PhD)², Márcia Valéria Pitombeira Ferreira (MD)¹, Maria Inês de Moura Campos Pardini (PhD)², Silvia Helena Barem Rabenhorst (PhD)¹.

¹Genetic section, Department of Pathology and Forensic Medicine. Federal University of Ceará, Brazil. Rua Alexandre Baraúna, 949. Rodolfo Teófilo. Porangabussu Campus, Fortaleza, Ceará, Brazil – 60183-630. ²Molecular Biology Laboratory, Botucatu Blood Transfusion Center, Medical School – University of Sao Paulo State – UNESP – 18618-000 - Botucatu, SP, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55-85-33668306; +55-85-99240929; fax: +55-85-32673840. 3485, João Florêncio de Queiroz Street, Capim Macio. City: Natal, Rio Grande do Norte State, Brazil. Postal code: 58082-320. E-mail address: markenialves@yahoo.com.br; markenia_alves@hotmail.com.

Keywords: Gastric cancer; histological subtypes; tumor location; methylation; *COX-2*; *CDKN2A*; *HMLH1*; *Helicobacter pylori* genotypes.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a relevant etiological factor associated with gastric carcinoma (GC), although the mechanism by which it acts is still not well known. It is suggested a role of this microorganism in the promotion of DNA methylation, a highly frequent alteration found in GC. Thus, the present study aimed to evaluate the inactivation of the genes *COX-2*, *HMLH1* and *CDKN2A* by methylation and its relationship with infection by *H. pylori*, in a series of GC, in association with clinical and histopathological findings. This study analyzed a sample of 76 *H. pylori* infection-positive gastric adenocarcinomas. The detection of *H. pylori* was done by amplification of the *ureaseC* gene, using the PCR technique, as well as the *H. pylori* genotypes. The expression and methylation status of the *COX-2*, *HMLH1* and *CDKN2A* genes was determined by immunohistochemistry and MS-PCR techniques, respectively. Statistically significant differences were evaluated by the chi-square test (χ^2) or Fisher exact test and the results were considered statistically significant when the *p*-values were < 0.05 . The most methylated gene was *COX-2* (50.0%), followed by *CDKN2A* (44.7%) and *HMLH1* (32.9%). The immunopositivity of *COX-2*, p16^{INK4A} and *HMLH1* was observed in 26.8%, 42.3% and 59.2% of the cases. A strong negative correlation was found between expression of these markers and the presence of methylation in the promoters of their genes. In cardia tumors, negativity of p16^{INK4A} was a significant finding ($p=0.044$) independently of the methylation status. On the other hand, in noncardia tumors, the intestinal and diffuse subtype tumors had a different pattern of gene expression alteration. In intestinal subtype, a significant finding was the *HMLH1* inactivation by methylation ($p=0.010$), while in the diffuse subtype, was the *CDKN2A* inactivation by methylation ($p=0.021$). Considering the bacterial genotype, the allele combination *vacA* s1m1 (72.4%) and *flaA* (61.9%) and *cagA* (61.8%) genes were the most frequent. Tumors with methylated *COX-2* and *HMLH1* genes were associated with the strains of *H. pylori* *vacA* s1 ($p=0.025$ and 0.047 , respectively) and the non-methylated tumors were associated with the presence of the gene *flaA* ($p=0.008$). These data suggest that the inactivation of the genes *COX-2*, *HMLH1* and *CDKN2A* by methylation occur by distinct pathways according to the histological subtype and tumor location and depends on the *H. pylori* genotype.

Keywords: Gastric cancer; histological subtypes; tumor location; methylation; *COX-2*; *CDKN2A*; *HMLH1*; *Helicobacter pylori* genotypes.

INTRODUCTION

Gastric carcinoma (GC) is one of the most frequent malignancies in the world and a leading cause of cancer death, representing therefore a major public health problem worldwide (KAMANGAR et al., 2006; PARKIN et al., 2005). This cancer is a multifactorial disease whose genetic, epigenetic and environment factors interact and contribute to the origin and progression of these tumors (CORREA, SCHNEIDER, 2005). DNA methylation in normally unmethylated gene promoters is the most epigenetic change in GC, probably due to the easy accessibility to exogenous agents (KIM et al., 2004), and it has been shown to be an important mechanism in the transcriptional inactivation of certain tumor suppressor genes (KIM et al., 2004; ESTELLER, 2002).

CDKN2A, located on the short arm of human chromosome 9, is one the most methylated tumor suppressor gene in GC. Its product, p16^{INK4A}, acts during G1 phase of the cell cycle by inhibiting the progression to the next cell cycle phase through the selective inhibition of the formation of complexes cyclin D/cyclin-dependent kinase 4 or 6 (ZHAO et al., 2003). The *HMLH1* gene is a human homologue gene *mutL* of the bacterium *Escherichia coli*, located in chromosome 3p21.3. This gene codes a protein with the same name that belongs to the system DNA mismatch repair (MMR) (LI, 2008). Inactivation of the *CDKN2A* and *HMLH1* genes has been documented in several tumors such as colorectal, lung and kidney, including GC (GOTO et al., 2009; VIDAURRETA et al., 2008; GUZMAN et al., 2007; ZHAO et al., 2003; GRADY; MARKOWITZ, 2002; SHIM et al., 2000; VEIGL et al., 1998; HERMAN et al., 1998). The restoration of expression of these genes by demethylating agents (KIKUCHI et al., 2002; SONG et al., 2001) indicates that these alterations may potentially be therapeutic target.

Additionally, *COX-2* overexpression has been related to the intense inflammatory response and GC development (KONTUREK et al., 2005), but same studies had showed a low expression of the *COX-2* gene in GC associated with gene promoter hypermethylation (HUANG et al., 2006; SONG et al., 2001). This gene, officially called *PTGS-2* (prostaglandin-endoperoxide synthase 2) is located in chromosome 1q25.2-q25.3 and encodes an enzyme by the same name involved in the synthesis of prostaglandins (PGs), which mediate cell signaling and are involved in inflammation process (KONTUREK et al., 2005). Although there are studies that indicate hypermethylation in promoter regions of genes *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1* as an important mechanism of gene silencing and, therefore, loss of their function in gastric carcinogenesis, there are still many gaps to be considered such as its importance in each histological subtype, tumor location and the factors that promote this process.

Studies *in vitro*, *in vivo* and eradication have associated the presence of the bacterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) to induce hypermethylation in promoter regions of genes important for GC progression, such as *COX-2*, *CDH1*, *HMLH1*, *CDKN2A* and *RUNX3* (KATAYAMA et al., 2009; DONG et al., 2009; KITAJIMA et al., 2008; PERRI et al., 2007; CHAN et al., 2006; LEUNG et al., 2006), however, with controversial results (FERRASI et al., 2010; ABBASZADEGAN et al., 2008; AKTAR et al., 2001). *H. pylori* has a high genetic variability, which has been related to virulence and clinical outcome of gastric diseases

(ATHERTON, 2006; SOZZI et al., 2005; PEEK; BLASER, 2002). Two well-established virulence factors are the presence of the cytotoxin-associated antigen A (*cagA*) gene, located within the right portion of the *cag* pathogenicity island (*cag*-PAI), and vacuolating cytotoxin A (*vacA*), mostly the *vacAs1m1* allelic combination (WANG et al., 2005). The *cag*-PAI island also has *cagE* and *virB11* genes, located in the right and left regions of the island, respectively. These genes are described to play a role in constructing the type IV secretion system and inducing proinflammatory, pro-proliferative epithelial cell signaling (ATHERTON, 2006; KRAUSE et al., 2000) and showed an high frequency in GC (LIMA et al., 2010). Another important *H. pylori* virulence factor is the presence of flagella, codified by several genes, such as *flaA* and *flaB*, which has been associated with the successful colonization and with the process of infection and persistence in the gastric mucosa (OTTEMANN; LOWENTHAL, 2002; EATON et al., 1996). In addition to the well characterized motility role, the flagella has been associated with other functions such as acting as an export apparatus of virulence factors (YOUNG et al., 1999), the sensitivity of the medium viscosity (McCARTER; SILVERMAN, 1990) and as an important immunogenic protein (YAN et al., 2003). The *flaA* gene is the main factor responsible for codification of the flagella filament flagellin (SUERBAUM, 1995). So far, few studies have assessed the involvement of the genotypes of *H. pylori* in the context of inducing methylation of genes involved in gastric carcinogenesis.

In this context, it is clear the relevance of studies for the elucidation of the mechanisms by which *H. pylori* may promote gastric carcinogenesis. Facing the genetic diversity presented by *H. pylori*, it is important to assess the relationship between specific genotypes and their possible carcinogenic mechanisms. Additionally, the intestinal and diffuse subtypes tumors needs to be considered individually, since they are distinct tumors differ not only in clinical and histopathologic features, but in their tumorigenic pathways, with distinct genetic and epigenetic alterations (VAUHKONEN et al., 2006; TAHARA, 2004).

MATERIALS AND METHODS

Clinical specimens

The present study was approved by the Hospital Ethics Committee in the Federal University of Ceará, Brazil, and all subjects signed the informed consent form before inclusion. Samples from 76 patients with gastric adenocarcinoma who had undergone gastrectomy were collected from Walter Cantídio University Hospital and Santa Casa de Misericórdia Hospital, both located in Fortaleza, the Ceará state capital. The histological classification was done according to Lauren's classification.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from frozen tumor tissue using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) technique, adapted from Foster and Twell (1996). The DNA extraction was done only in fragments that showed more than 80% of tumor cells. The DNA quality was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and the amount was determined using the NanoDrop™ 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA).

Sodium Bisulfite Treatment and Methylation-Specific PCR (MS-PCR)

Extracted DNA of tumor tissue was modified by sodium bisulfite to determine the methylation status of the *CDKN2A*, *HMLH1* and *COX-2* genes by MS-PCR, as previously described by Ferrasi et al. (2010). The primers targeted to the studied promoter gene regions and the annealing temperatures are described in Table 1. PCR was performed in 25 µL reaction volume, containing 1x Platinum Taq buffer, 3.0 mM MgCl₂ (*CDKN2A*) or 1.5mM MgCl₂ (*HMLH1* and *COX-2*), 0.4 mM of each dNTPs, 0.64 µM (*CDKN2A*), 0.24 mM (*HMLH1*) or 0.4 mM (*COX-2*) of each primer set, 1U of Platinum Taq DNA Polymerase® (Invitrogen, Foster, CA, USA), and 50 ng of treated DNA.

Table 1 - PCR primer sets used for MS-PCR.

Primer		Reference	Annealing (°C)	Size (bp) of PCR product
Forward	Reverse			
M: TTAGATACGGCGGCGGCGGC	TCTTTACCCGAACGCTTCCG	AKHTAR et al., 2001	59	161
U: ATAGATTAGATATGGTGGTGGT	CACAATCTTTACCCAAACACTTCCA		65	171
M: TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	HERMAN et al., 1996	70	150
U: TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA		70	151
M: TATATCGTTCGTAGTATTCGTGT	TCCGACCCGAATAAACCCAA	KANG et al., 1999	66	153
U: TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT	ACCACCTCATÇATAACTACCCACA		64	124

M – Methylated; U – Unmethylated.

DNA methylated *in vitro* by Sss-I methylase® (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) was used as a positive control. Water and DNA from peripheral lymphocytes of healthy

donors were used as negative controls. The PCR products were resolved in 6% non-denaturing polyacrylamide gel and subsequently submitted to silver staining.

For confirmation of the reaction specificity, MS-PCR products from *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1* genes analyzed were cloned with a TOPO TA Cloning Kit[®] (Invitrogen, California, USA) and both the methylated and unmethylated PCR products were sequenced using an ABI PRISM[®] BigDye Terminator v.3.0 Cycle Sequencing Kit[®] (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) and ABI Prism 3100 DNA Sequencer[®] (Applied Biosystems).

Detection of H. pylori infection and vacA alleles and the presence of cagA, cagE, virB11 and flaA genes

H. pylori infection was detected by amplification of the *ureC* gene using primers for PCR, as described by Lage et al. (1995). For the *H. pylori*-positive samples, the presence of the *vacA* alleles, *cagA*, *cagE*, *virB11* and *flaA* genes were identified using the primer sets showed in Table 2. PCR mixtures, for amplification of *cagE*, *virB11* and *flaA* genes, were prepared in a volume of 20 µL using Green MasterMix[®] (Taq DNA Polymerase, dNTPs and MgCl₂) according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, USA), with addition of 0.8% Tween 20, 0.3 µM (*virB11*), 0.3 µM (*cagE*) and 0.3 µM (*flaA*) of each primer and 50ng of the DNA sample.

The *ureC*, *cagA*, *vacA* s1/s2, *vacA* m1 genes were amplified in a 25 µL volume containing 2.5 µL of 10X PCR buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 1% Tween 20, 1.5 mM of MgCl₂ (Invitrogen), 200 µM (each) of dNTPs (Invitrogen), 1U of Platinum Taq polymerase[®] (Invitrogen), 0.4 µM (*ureC*, *cagA*, *vacA* s1/s2, *vacA* m1), 0.3 µM (*vacA* m2) for each primer and 50ng of DNA sample.

The PCR products were resolved by 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. The sample was considered *H. pylori* positive when an *ureC* fragment of 294bp was amplified. For confirmation of the reaction specificity, PCR products from the *ureC* gene were cloned in TOPO TA Cloning Kit[®] (Invitrogen, California, USA) and sequenced using an ABI PRISM BigDye Terminator v.3.0 Cycle Sequencing Kit[®] (Applied Biosystems, California, USA) and an ABI Prism 3100 DNA Sequencer[®] (Applied Biosystems, California, USA). The *vacA*, *cagA*, *cagE*, *virB11* and *flaA* genes were considered positive when a specific fragment was detected (Table 2). DNase-free water was used as a negative control. DNA preservation has also been confirmed by amplification of different genes in other approaches under study in our laboratory. Random samples were reanalyzed to confirm the results.

Table 2 - PCR primer sets used for genotyping *H. pylori*.

Primer sequence	Reference number	Annealing (°C)	Size (bp) of PCR product
<i>F</i> - 5'AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT3' <i>R</i> - 5' AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC3'	LAGE et al., 1995	55	294
<i>s1/s2 F</i> -5'ATGGAAATACAACAAACACAC3' <i>R</i> - 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	DOMINGO et al., 1999	55	259/286
<i>m1 F</i> -5'GGTCAAAATGCGGTCATGG3' <i>R</i> -5'CCATTGGTACCTGTAGAAAC3'	DOMINGO et al., 1999	55	290
<i>m2 F</i> -5'GGAGCCCCAGGAAACATTG3' <i>R</i> -5'CATAACTAGCGCCTTGCAC3'	DOMINGO et al., 1999	52	192
<i>F</i> -5'ATAATGCTAAATTAGACAACCTGAGCGA 3' <i>R</i> -5'TTAGAATAATCAACAAACATAACGCCAT 3'	DOMINGO et al., 1999	56	297
<i>F</i> -5'TTGAAAACCTTCAAGGATAGGATAGAGC3' <i>R</i> -5'GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC3'	SOZZI et al., 2005	50	509
<i>F</i> -5'TTAAATCCTCTAAGGCATGCTAC3' <i>R</i> -5'GATATAAGTCGTTTTACCGCTTC3'	SOZZI et al., 2005	49	491
<i>F</i> - 5'TTCTATCGGCTCTACCAC3' <i>R</i> - 5'CTGACCGCCATTGACCAT3'	GOTTKE et al., 2000	55	508

F- Forward; R- Reverse.

Immunohistochemistry

The detection of p16^{INK4A} protein was performed using a commercial kit CINTEC Histology® (K5340, Dako, Glostrup, Denmark), according to manufacturer's recommendations. For the protein HMLH1 and COX-2 was used streptavidin peroxidase method, adapted from the protocol of Hsu et al. (1981). Briefly, for antigen retrieval, deparaffinized sections were pretreated by heating in a microwave oven in citrate buffer 10mM pH 6.0 for 20 minutes. Endogenous peroxidase was blocked by H₂O₂ 3%, for 10 minutes. Sections were incubated in a humid chamber overnight at 4°C with the following primary antibodies: COX-2 (SC-1746; dilution 1:50; Santa Cruz Biotechnology®, California, USA) and HMLH1 (SC-581; dilution

1:100; Santa Cruz Biotechnology[®], California, USA). The reaction was detected with the LSAB+ system (DakoCytomation[®], USA), according to the manufacturer's recommendation. Confirmed cases of p16-positive human breast carcinoma, COX-2-positive colon from patients with Crohn disease and HMLH1-positive tonsil were used as a positive control

Immunostaining analyses

The immunohistochemical evaluation was performed by two experienced analysts independently, using direct light microscopy. Any conflicting results were jointly considered for a consensual determination. The protein expression was quantified through manual counting of at least 1000 tumor cells in 10 different fields at a magnification of 400x. The labeling index (LI) expresses the percentage of nuclear or cytoplasmic positive cells in each tumor sample (LANDBERG; ROOS, 1993). Only cases with LI equal to or greater than 5% were considered positive.

Statistical analyses

The statistical analyses were carried out using the SPSS version 15.0 program (Chicago, IL, USA). Statistically significant differences were evaluated by the chi-square test (χ^2) or Fisher exact test. Correlations between immunostaining and *COX-2*, *HMLH1* and *CDKN2A* promoter region methylation were analyzed by Spearman's rank correlation coefficient. The results were considered statistically significant when the *p*-values were less than 0.05.

RESULTS

Study Population

A total of 76 *H. pylori* infection-positive patients participated in this study. The characteristics of the patients and tumors are shown in Table 3.

Table 3. Characteristics of 76 subjects.

Median age (year)	65.5
Sex (male/female)	47/29
Lauren classification (Intestinal/Diffuse)	48/28
Tumor location (Cardia/Noncardia)	17/59
pTNM stage ^a (I+II/III+IV)	22/54

^apTNM stage: pathologic Tumor-Lymph Node-Metastasis stage.

Frequency and correlation between methylation in promoter regions and expression of genes *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1*.

The presence of *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1* promoter methylation was observed in 50.0% (38/76), 44.7% (34/76) and 32.9% (25/76) of the cases, respectively. In five cases not were possible to detect the immunohistochemical expression due to large amount of necrosis in the tumor material analyzed. Absence of immunodetection of the studied proteins in the tumors was observed in 73.2% (52/71) for *COX-2*, 57.7% (41/71) for p16^{INK4A} and 40.8% (29/71) for *HMLH1*. The frequencies of methylation associated with immunohistochemical expression of each gene are shown in Table 4. A highly significant negative correlation between immunopositivity and *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1* promoter region methylation was found. However, a fraction of cases, 34.6% (18/52) for *COX-2*, 31.7% (13/41) for *CDKN2A* and 31.0% (9/29) for *HMLH1* demonstrated absence of expression without gene promoter methylation.

Table 4. Correlation between expression and methylation status in promoter regions of genes *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1*.

		IMMUNODETECTION		N	p-value	R
		(+)	(-)			
<i>COX-2</i>	M	2	34	36	< 0.001	-0.486
	U	17	18	35		
	Total	19	52	71		
<i>CDKN2A</i>	M	4	28	32	< 0.001	-0.546
	U	26	13	39		
	Total	30	41	71		
<i>HMLH1</i>	M	3	20	23	< 0.001	-0.634
	U	39	9	48		
	Total	42	29	71		

M: Methylated; U: Unmethylated; (+): Immunopositive (LI>5%); (-): Immunonegative (LI<5%).

Relationship between promoter methylation and expression of the COX-2, CDKN2A, HMLH1 genes and Lauren histological type and tumor location.

No significant association was observed between sex, age and tumor staging with promoter methylation and expression of genes *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1*. Likewise, no difference was observed between the intestinal and diffuse subtype tumors regarding to the frequency of the promoter methylation of these genes and the immunodetection of the *COX-2*, p16^{INK4A} and *HMLH1* proteins (Table 5). However, when the cases were analyzed according to the tumor location, the cardia tumors demonstrated a significant frequency of p16^{INK4A} negative cases ($p=0.044$), even though, no significant difference was found regarding to the *CDKN2A* promoter methylation. On the other hand, the noncardia tumors were predominantly *HMLH1* methylated ($p=0.042$) when compared to cardia tumors (Table 5).

Table 5 – Distribution of COX-2, CDKN2A and HMLH1 methylation status and expression according to histological subtype and tumor location.

		Intestinal	Diffuse	p-value	Cardia	Noncardia	p-value	Total
COX-2	M	22	16	0.342	8	30	0.783	38
	U	26	12		9	29		38
	+	12	7	0.862	4	15	1.000	19
	-	34	18		12	40		52
CDKN2A (p16^{INK4A})	M	22	12	0.801	9	25	0.440	34
	U	26	16		8	34		42
	+	18	12	0.470	3	27	0.044*	30
	-	28	13		13	28		41
HMLH1	M	15	10	0.689	2	23	0.042*	25
	U	33	18		15	36		51
	+	27	15	0.915	9	33	0.788	42
	-	19	10		7	22		29

M: Methylated; U: Unmethylated; (+): Immunopositive (LI>5%); (-): Immunonegative (LI<5%). * Significant results.

Considering both, the Lauren histological classification and the tumor location, in the intestinal subtype tumors, all tumors, excepting one, with *HMLH1* gene promoter methylated (93.33%; 14/15; $p=0.040$) were localized in the noncardia region (Figure 1A), while in the cardia's tumors the negativity of p16^{INK4A} was significantly more frequent ($p=0.049$) (Figure 1B).

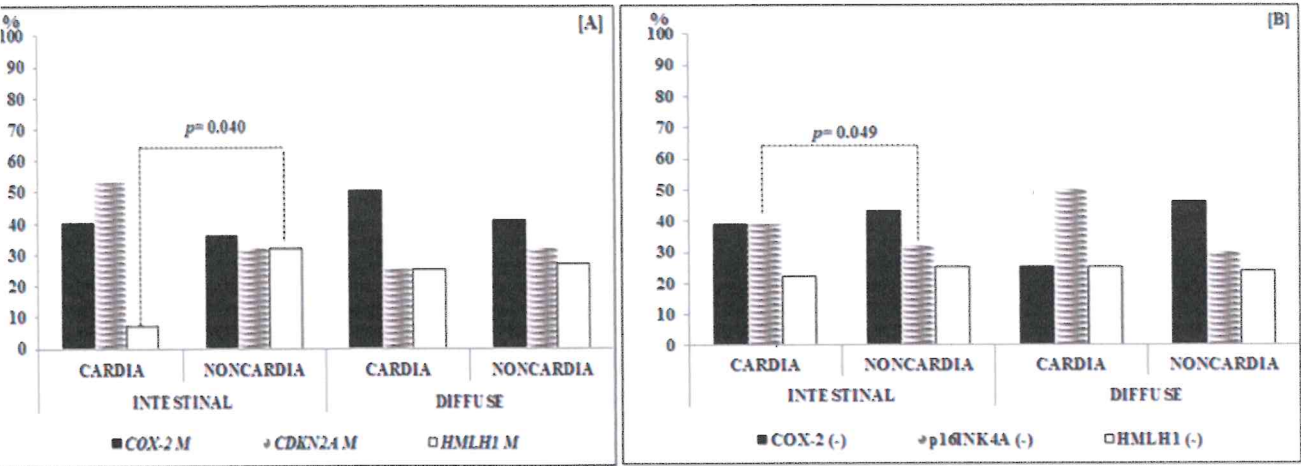


Figure 1 – [A] Frequency of promoter region methylation and [B] expression of the COX-2, CDKN2A and HMLH1 genes according to histological subtype and tumor location. M- Methylated; U- Unmethylated.

To observe the relationship among methylation status and the absence of expression of the studied genes considering the histological subtypes and the tumor location, we analyzed only the immunonegative cases (Table 6). From these analysis it was possible to observe that in the intestinal tumors, the negativity of *HMLH1* by promoter methylation of this gene was predominant in noncardia tumors ($p=0.010$). On the other hand, in diffuse subtype tumors, all $p16^{INK4A}$ negative cases and methylated were in the group of noncardia tumors ($p=0.021$).

Table 6 – Distribution of the COX-2, p16 and HMLH1 negative cases according to histological subtype and location tumor and methylation status.

		INTESTINAL				DIFFUSE			
		Cardia	Noncardia	p-value	Total	Cardia	Noncardia	p-value	Total
COX-2(-)	M	6	14	0.726	20	1	13	1.000	14
	U	5	9		14	0	4		4
al		11	23		34	1	17		18
(-)	M	8	11	1.000	19	0	9	0.021*	9
	U	3	6		9	2	2		4
al		11	17		28	2	11		13
HMLH1 (-)	M	1	11	0.010*	12	1	7	1.000	8
	U	5	2		7	0	2		2
al		6	13		19	1	9		10

M: Methylated; U: Unmethylated; (-): Immunonegative; *Significant results.

Relationship between methylation status, expression of the COX-2, CDKN2A, HMLH1 genes and *H. pylori* *vacA* subtypes, *cagA*, *cagE*, *virB11* and *flaA* genes.

Among the studied *H. pylori* genes, *vacA* *slm1* was the most frequent one (72.4%; 55/76), followed by *flaA* (61.9%; 39/63) and *cagA* (61.8%; 47/76), which had similar frequencies. In 13 cases was not possible to amplify the genes *cagE*, *virB11* and *flaA* due of insufficient amount of DNA. The table 7 summarizes the distribution of *H. pylori* genes according to the promoter methylation status and expression of the COX-2, CDKN2A and HMLH1 genes. From this table it is possible to observe that most, except one, of the tumors

with *COX-2* gene promoter methylated and all cases with *HMLH1* gene promoter methylated were significantly associated with *H. pylori vacAs1* allele. Additionally, a significant number of non methylated *CDKN2A* cases were related with the *H. pylori flaA* gene (82.4%; 29/37; $p=0.008$).

Table 7 - Distribution of the cases expression and status methylation of the genes *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1* according to *H. pylori* genotypes.

	<i>vacA s1</i>			<i>vacA m1</i>			<i>cagA</i>			<i>cagE</i>			<i>virB11</i>			<i>flaA</i>		
	+	-	p-value	+	-	p-value	+	-	p-value	+	-	p-value	+	-	p-value	+	-	p-value
M	37	1	0.025*	30	8	0.427	21	17	0.238	15	14	0.402	15	14	0.741	15	14	0.124
U	31	7		27	11		26	12		14	20		19	15		24	10	
Total	68	8	-	57	19	-	47	29	-	29	34	-	34	29	-	39	24	-
+	16	3	0.179	14	5	0.645	11	8	0.896	8	9	0.905	12	5	0.128	11	6	0.933
-	49	3		41	11		31	21		20	21		20	21		27	14	
Total	65	6	-	55	16	-	42	29	-	28	30	-	32	26	-	38	20	-
M	32	2	0.285	26	8	0.790	19	15	0.336	10	16	0.312	14	12	0.987	12	14	0.008*
U	36	6		31	11		28	14		19	18		20	17		29	8	
Total	68	8	-	57	19	-	47	29	-	29	34	-	34	29	-	41	22	-
+	25	5	0.076	24	6	0.662	18	12	0.901	12	14	0.771	14	12	0.855	19	7	0.542
-	40	1		31	10		24	17		16	16		18	14		21	11	
Total	65	6	-	55	16	-	42	29	-	28	30	-	32	26	-	40	18	-
M	25	0	0.047*	20	5	0.481	15	10	0.817	12	8	0.129	14	6	0.082	15	5	0.144
U	43	8		37	14		32	19		17	26		20	23		24	19	
Total	68	8	-	57	19	-	47	29	-	29	34	-	34	29	-	39	24	-
+	38	4	1.000	34	8	0.397	24	18	0.678	16	18	0.825	17	17	0.346	24	10	0.334
-	27	2		21	8		18	11		12	12		15	9		14	10	
Total	65	6	-	55	16	-	42	29	-	28	30	-	32	26	-	38	20	-

M- Methylated; U- Unmethylated; (+): Immunopositive (LI>5%); (-): Immunonegative (LI<5%); *Significant results.

DISCUSSION

In this study, the data from methylation and immunoexpression of the genes *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1* were analyzed for GC histological subtypes, tumor region and the *H. pylori* genotypes. To date, to our knowledge, there are no studies considering all these aspects together. The analysis of *COX-2* gene was included, since its protein, a potent inducer of inflammatory response, has been assigned an important role in gastric carcinogenesis associated with methylation process (OBST et al., 2000; HMADCHA et al., 1999).

The literature shows variables frequencies of the immunoexpression of the genes *COX-2* (20.4% - 74%), *HMLH1* (28.6% - 81%) and *CDKN2A* (46.8% - 65%) (LING et al., 2010; KISHIMOTO et al., 2008; YAMAC et al., 2008, KOLEV et al., 2007; MATTIOLI et al., 2007; JOO et al., 2006; HUANG et al., 2006, KAWABE et al., 2002; CHIARAVALLI et al., 2001; LEUNG et al. 2001; TSUJIE et al., 2000; LEUNG et al., 1999; FLEISHER et al., 1999). In this study, only a small fraction (26.8%) of GC samples showed immunohistochemical expression of *COX-2*, while high frequencies were observed for the p16^{INK4A} protein (42.3%) and *HMLH1* (59.2%). Similarly to this study, Huang et al. (2006) observed a low frequency of *COX-2* expression (20.4%) in GC, which was validated by Western blotting.

In the present study a relevant frequency (50.0%, 32.9% and 44.7%, respectively) of methylation in the promoters of the *COX-2*, *HMLH1* and *CDKN2A* genes was detected with a significant negative correlation between the presence of methylation and immunoexpression, confirming the involvement of this event in the inactivation of these genes, as observed by other authors (FERRASI et al., 2010; ABBASZADEGAN et al., 2008; DE MAAT et al., 2007; ZHAO et al., 2007; KANG et al., 2002; KIM et al., 2003; YU et al., 2003; FLEISHER et al. 2001; BEVILACQUA; SIMPSON, 2000, ENDOH et al., 2000; SHIM et al., 2000; LEUNG et al. 1999; FLEISHER et al., 1999). Additionally, gene silencing via methylation could be proven by studies in which expression of *COX-2* gene was restored by treatment *in vitro* with demethylating agents (KIKUCHI et al., 2002; SONG et al., 2001).

However, despite the data pointing the promoter hypermethylation as the main mechanism implicated in the inactivation of the studied genes, 33.3%, 31.2% and 30.4% of the cases which demonstrated negative immunoexpression of *COX-2*, p16^{INK4A} and *HMLH1*, respectively, were not methylated. Other studies also found similar results (ABBASZADEGAN et al., 2008; KIM et al., 2003; YU et al., 2003; SHIM et al., 2000). The agreement and the representative frequency found in this and others studies indicate that these data are not due to methodological flaws and may be partially explained by the lack of transcriptional activators, as observed by Huang et al. (2006) for *COX-2* gene. In fact, in the study conducted by Huang et al. (2006), *COX-2* inactivation was observed both by methylation and by absence of activators of transcription for the *COX-2* gene. In the first process, in 69.0% of the cases, the expression of the enzyme DNMT1, a DNA methyltransferase involved in the methylation process, was related to the negativity of *COX-2*. In addition, alternative mechanisms of inactivation of these genes such as mutations, deletions or microRNAs can contribute for their deregulated expression.

Based on studies which demonstrate that genetic and epigenetic changes in gastric adenocarcinomas differ depending on the histological subtype (TAHARA, 2004; VAUHKONEN et al., 2006), the data were analyzed according to each histological subtype separately. In this study, similar frequency of expression and methylation in the promoters of the genes *COX-2*, *HMLH1* and *CDKN2A* were found between intestinal and diffuse subtype tumors, corroborating studies by Ferrasi et al. (2010), Yamac et al. (2008), Yu et al. (2004) and Geddert et al. (2004). However, it is interesting to note that, although no difference was found related to immunodetection, tumors located in the noncardia region were predominantly *HMLH1* methylated. This data is according to a study by Nakajima et al. (2001), which found a higher frequency of *HMLH1* methylated tumors located in the lower third of the stomach. Also, Kim et al. (2003) found that gastric carcinomas with high microsatellite instability, associated with promoter methylation in *HMLH1*, were significantly localized in the distal stomach. On the other hand, in cardia region we find a significative frequency of the p16^{INK4A} negative cases, however, this negativity was not related with the promoter methylation of this gene. Thus, these data together indicate that susceptibility to methylation depends on the location of the tumor.

When tumors were evaluated according to histological subtype and location simultaneously, differences were observed. In intestinal tumors, inactivation of the *HMLH1* gene by methylation was mostly significant for tumors located in noncardia region. In diffuse subtype tumors, although there were a representative number of *HMLH1* methylated cases in tumors with noncardia location, no significant difference was observed. Studies conducted by Seo et al. (2009) and Falchetti et al. (2008) showed that most of the tumors with high microsatellite instability were located distally, belonged to the intestinal subtype and had negative expression of *HMLH1*. However, the authors did not evaluate the pattern of methylation of the promoter of *HMLH1*. Thus, it appears that the higher frequency of methylated *HMLH1* tumors found in the noncardia region is characteristic of intestinal tumors, and probably should determine a specific tumorigenic pathway. The greater number of cases with negative expression of p16^{INK4A} located in cardia was typical of the tumors of the intestinal subtype, although, the methylation status of *CDKN2A* was not. As in this study, Abbaszadegan et al. (2008) also did not find relation between the methylation of the promoter of *CDKN2A* and the location of the tumor nor histological subtype. The higher frequency of negativity of p16^{INK4A} in tumors of the cardia was also observed by Kim et al. (2005), in a study comparing the expression of several proteins in patients with cardia and noncardia adenocarcinoma, however, the authors did not evaluate this expression considering the histological subtypes. So that, the data from ours analysis agree with Driessen et al. (2004) and (2003) studies, in which they reported that the characteristics of the cardia adenocarcinomas, including clinical data and expression patterns of cytokeratin, were more closely linked to proximal than to distal adenocarcinomas, suggesting the different nature of those tumors in determining tumorigenic pathways.

Therefore, based on the absence of expression, methylation in promoter regions of genes *CDKN2A* and *HMLH1* and the location of the tumor, it was possible to identify distinct tumorigenic pathways in intestinal and diffuse histologic subtypes. The figure 2 summarizes

the possible tumorigenic pathways identified in this study according to tumor location and histological subtype. In tumors located in the cardia, the inactivation of $p16^{\text{INK4A}}$ was a predominant finding in tumors of the intestinal subtype. On the other hand, in noncardia tumors, two major events were observed according to histological subtype, in diffuse tumors the inactivation of *CDKN2A* by methylation was a significant finding, while in intestinal subtype the pathway consists in *HMLH1* inactivation by promoter methylation. Although no significant, the methylation of this gene was also frequent in the diffuse tumors, indicating that the *HMLH1* methylation is an important finding, regardless of histological subtype.

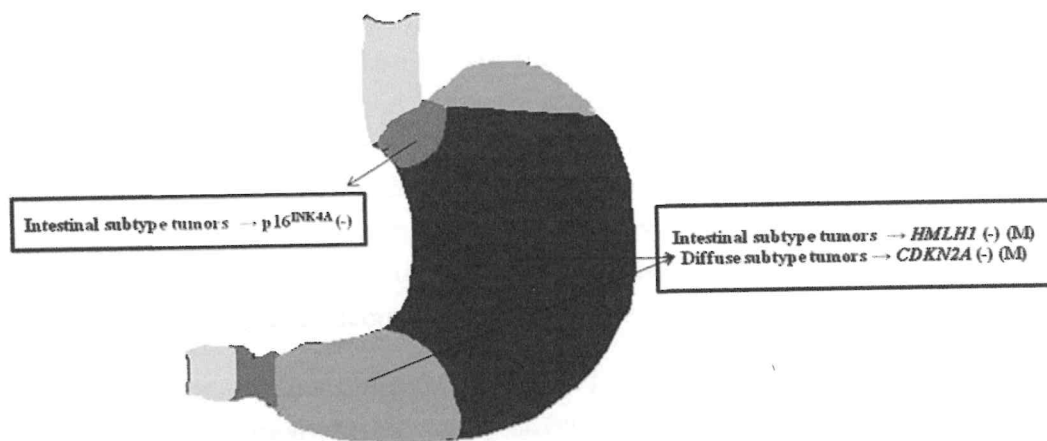


Figure 2 – Schematic representation of tumorigenic pathways identified in this study according to histologic subtype, tumor location and immunoexpression and methylation in promoter regions of the genes *COX-2*, *HMLH1* e *CDKN2A*. (-): Negative immunostaining; (M) – Methylated tumors.

Another important factor in gastric carcinogenesis is its association with *H. pylori* infection and the great genetic variability of this bacterium (ATHERTON, 2006; SOZZI et al., 2005; PEEK; BLASER, 2002). The relationship between the alteration expression of the *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1* genes and *H. pylori* infection is controversial (FERRASI et al., 2010; KSIAA et al., 2009; KONTUREK et al., 2005; PARK et al., 2005; CHANG et al., 2004). Additionally, there are few studies that consider the *H. pylori* genotypes (YAMAC et al., 2008; GUO et al., 2003). In our study, no significant relationship was observed between positive immunoexpression of the genes *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1* and the *H. pylori* pathogenicity genes studied, corroborating to studies of Chang et al. (2004), Kim et al. (2002) and Romano et al. (1998).

Recent studies suggest the involvement of *H. pylori* in the inactivation of genes implicated in gastric tumorigenesis via methylation in the promoter regions of these genes (FERRASI et al., 2010; KATAYAMA et al., 2009; ABBASZADEGAN et al., 2008; AKTAR et al., 2001). These studies evaluate this process considering both, each gene independently and grouped according to the number of methylated genes as in tumors with high methylator phenotype of CpG islands of several genes involved in gastric carcinogenesis. Tahara et al. (2009) found a strong association between increased number of methylated CpG islands and infection by *H. pylori*. Maekita et al. (2006) quantitatively estimated the levels of methylation

of eight CpG islands in gastric mucosa and observed that the level of methylation of all eight regions of CpG islands analyzed were significantly higher in the mucosa infected by *H. pylori* than in noninfected one. Leung et al. (2006) observed a decrease in the density of methylation in the promoter of *E-cadherin* after eradication of *H. pylori*.

In this study, when *H. pylori* genotypes was considered according to the methylation status in the promoter of genes *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1*, it was observed that strains carrying *vacA* s1 allele were significantly associated with tumors with methylated *COX-2* and *HMLH1* genes. Aktar et al. (2001), in an *in vitro* study, showed that gastric cells exposed for two weeks to *H. pylori* showed no change in methylation status of *COX-2*, but the authors did not evaluate the genotype of these strains. As this study, the study by Ferrasi et al. (2010) demonstrated no significant association between methylation of the promoter of *COX-2* and *HMLH1* and infection by *cagA* (+) *H. pylori* strains, but the authors did not evaluate the involvement of the *vacA* gene of *H. pylori* in this process. Perri et al. (2007) observed that after eradication of *H. pylori* in patients with intestinal metaplasia, the frequency of methylation of the promoter of *HMLH1* suffered no significant change, although the genes *CDKN2A*, *CDH1* and *COX-2* had shown significant decrease in methylation status.

Given that recent studies indicate the role of inflammation in inducing methylation through activation of DNA methyltransferases, enzymes which are responsible for methylation reactions (OBST et al., 2000; HMADCHA et al., 1999), it is possible that the more active vacuolizing toxin of *H. pylori* (*vacA* s1) would exacerbate the inflammatory response via activation of free radicals, strengthening the involvement of inflammation in the process of methylation. This hypothesis can be corroborated by *in vitro* study performed by Katayama et al. (2009), which identified the association of *H. pylori* with the methylation process, having as target the *RUNX3* gene, one of the most methylated gene in gastric cancer. These authors showed that the presence of *H. pylori* induced nitric oxide production in macrophages, and nitric oxide was associated with methylation of *RUNX3* in gastric cells. Additionally, some studies have suggested that *H. pylori* can induce cell proliferation, and the proliferation itself has been suggested as a factor that promotes the methylation of DNA (SUZUKI et al., 2007; VELICESCU et al., 2002). Therefore, these data presented in this study join the evidences that *H. pylori* contribute (directly or indirectly) to methylation process and this is dependent on the bacterial genotype. The absence of these analyses could explain the controversial results.

Another significant data in this study consists in the fact that the strains of *H. pylori* carrying the *flaA* gene were significantly associated to tumors with methylated *CDKN2A*. Despite the few studies correlating *H. pylori* genotype with inactivation of p16^{INK4A} by methylation of the promoter, some studies have correlated infection by *H. pylori* with methylation of *CDKN2A*, but with controversial results (KSIA et al. 2009; DONG et al. 2009; TAHARA et al. 2009; ABBASZADEGAN et al., 2008). It is plausible to assume that strains with absence of flagellum would remain in the antral region of stomach, since they have no flagellum to move and settle in the upper regions of the stomach. As this area has a greater predisposition to methylation of the *CDKN2A* gene, then the *flaA* positive strains would be indirectly associated with methylation. However, further studies are necessary to explain the

involvement of this gene associated with *CDKN2A* promoter methylation in a larger number of cases.

In conclusion, the route of inactivation of genes *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1* was predominant by methylation in their promoters and depended on the histological subtype and tumor location. Additionally, the methylation of the promoter of the genes *COX-2*, *CDKN2A* and *HMLH1* seems depended on the genotype of *H. pylori*, however this association is independent of the histopathological parameters.

REFERENCES

1. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **J Clin Oncol** 2006; 24:2137-50.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin**, v.55, p. 74-108, 2005.
3. Correa P, Schneider BG. Etiology of gastric cancer: what is new? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14:1865-8.
4. Kim TY, Jong HS, Jung Y, Kim TY, Kang GH, Bang YJ. DNA hypermethylation in gastric cancer. **Aliment Pharmacol Ther** 2004; 20:131-42.
5. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene** 2002; 21:5427-40.
6. Zhao GH, Li TC, Shi LH, Xia YB, Lu LM, Huang WB, Sun HL, Zhang YS. Relationship between inactivation of *p16* gene and gastric carcinoma. **World J Gastroenterol** 2003; 9:905-9.
7. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Res** 2008; 18:85-98.
8. Goto T, Mizukami H, Shirahata A, Sakata M, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y, Hibi K. Aberrant methylation of the *p16* gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. **Anticancer Res** 2009; 29:275-7.
9. Vidaurreta M, Maestro ML, Sanz-Casla MT, Maestro C, Rafael S, Veganzones S, Moreno J, Blanco J, Silmi A, Arroyo M. Inactivation of *p16* by CpG hypermethylation in renal cell carcinoma. **Urol Oncol** 2008; 26:239-45.
10. Guzman LM, Koriyama C, Akiba S, Eizuru Y, Castillo D, Corvalan A, Aguayo FR. High frequency of *p16* promoter methylation in non-small cell lung carcinomas from Chile. **Biol Res** 2007; 40:365-72.
11. Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 2002; 3:101-28.

12. Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of *p16* hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. **Lab Invest** 2000; 80:689-95.
13. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of *hMLH1* by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:8698-702.
14. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of *hMLH1* promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:6870-5.
15. Kikuchi T, Itoh F, Toyota M, Suzuki H, Yamamoto H, Fujita M, Hosokawa M, Imai K. Aberrant methylation and histone deacetylation of *cyclooxygenase 2* in gastric cancer. **Int J Cancer** 2002; 97:272-7.
16. Song SH, Jong HS, Choi HH, Inoue H, Tanabe T, Kim NK, Bang YJ. Transcriptional silencing of *Cyclooxygenase-2* by hyper-methylation of the 5' CpG island in human gastric carcinoma cells. **Cancer Res** 2001; 61:4628-35.
17. Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG, Konturek SJ. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. **J Physiol Pharmacol** 2005; 56:57-73.
18. Huang L, Zhang KL, Li H, Chen XY, Kong QY, Sun Y, Gao X, Guan HW, Liu J. Infrequent *COX-2* expression due to promoter hypermethylation in gastric cancers in Dalian, China. **Hum Pathol** 2006; 37:1557-67.
19. Katayama Y, Takahashi M, Kuwayama H. *Helicobacter pylori* causes *runx3* gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated by nitric oxide produced by macrophages. **Biochem Biophys Res Commun** 2009; 388:496-500.
20. Dong CX, Deng DJ, Pan KF, Zhang L, Zhang Y, Zhou J, You WC. Promoter methylation of *p16* associated with *Helicobacter pylori* infection in precancerous gastric lesions: a population-based study. **Int J Cancer** 2009; 124:434-9.
21. Kitajima Y, Ohtaka K, Mitsuno M, Tanaka M, Sato S, Nakafusa Y, Miyazaki K. *Helicobacter pylori* infection is an independent risk factor for *Runx3* methylation in gastric cancer. **Oncol Rep** 2008; 19:197-202.
22. Perri F, Cotugno R, Piepoli A, Merla A, Quitadamo M, Gentile A, Pilotto A, Annese V, Andriulli A. Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of *H. pylori* infected patients and effect of eradication. **Am J Gastroenterol** 2007; 102:1361-71.
23. Chan AO, Peng JZ, Lam SK, Lai KC, Yuen MF, Cheung HK, Kwong YL, Rashid A, Chan CK, Wong BC. Eradication of *Helicobacter pylori* infection reverses *E-cadherin* promoter hypermethylation. **Gut** 2006; 55:463-8.

24. Leung WK, Man EP, Yu J, Go MY, To KF, Yamaoka Y, Cheng VY, Ng EK, Sung JJ. Effects of *Helicobacter pylori* eradication on methylation status of *E-cadherin* gene in noncancerous stomach. **Clin Cancer Res** 2006; 12:3216-21.
25. Ferrasi AC, Pinheiro NA, Rabenhorst SH, Caballero OL, Rodrigues MA, de Carvalho F, Leite CV, Ferreira MV, Barros MA, Pardini MI. *Helicobacter pylori* and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. **World J Gastroenterol** 2010; 16:312-9.
26. Abbaszadegan MR, Moaven O, Sima HR, Ghafarzadegan K, A'RABI A, Forghani MN, Raziiee HR, Mashhadinejad A, Jafarzadeh M, Esmaili-Shandiz E, Dadkhah E. *p16* promoter hypermethylation: a useful serum marker for early detection of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2008; 14:2055-60.
27. Akhtar M, Cheng Y, Magno RM, Ashktorab H, Smoot DT, Meltzer SJ, Wilson KT. Promoter methylation regulates *Helicobacter pylori*-stimulated *cyclooxygenase-2* expression in gastric epithelial cells. **Cancer Res** 2001; 61:2399-403.
28. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. **Annu Rev Pathol** 2006; 1:63-96.
29. Sozzi M, Tomasini ML, Vindigni C, Zanussi S, Tedeschi R, Basaglia G, Figura N, De Paoli P. Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. **J Lab Clin Med** 2005; 146:262-70.
30. Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:28-37.
31. Wang HT, Li ZH, Yuan JP, Zhao W, Shi XD, Tong SQ, et al. Effect of *Helicobacter pylori* VacA on gene expression of gastric cancer cells. **World J Gastroenterol** 2005; 11:109-13.
32. Krause S, Pansegrau W, Lurz R, Cruz F, Lanka E. Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. **J Bacteriol** 2000; 182:2761-70.
33. Lima VP, de Lima MA, Ferreira MV, Barros MA, Rabenhorst SH. The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. **Int J Infect Dis** 2010; 14(7):e613-7.
34. Ottemann KM, Lowenthal AC. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. **Infect Immun** 2002; 70(4):1984-90.
35. Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. **Infect Immun** 1996; 64(7):2445-8.
36. Young GM, Schmiel DH, Miller VL. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96(11):6456-61.

37. McCarter L, Silverman M. Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. **Mol Microbiol** 1990; 4(7):1057-62.
38. Yan J, Liang SH, Mao YF, Li LW, Li SP. Construction of expression systems for *flaA* and *flaB* genes of *Helicobacter pylori* and determination of immunoreactivity and antigenicity of recombinant proteins. **World J Gastroenterol** 2003; 9(10):2240-2250.
39. Suerbaum S. The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. **Trends Microbiol** 1995; 3:168-70.
40. Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2006; 20(4):651-74.
41. Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. Genetic pathways of two types of gastric cancer. **IARC Sci Publ** 2004; 157:327-49.
42. Foster GD, Twell DJ. Plant Gene Isolation: Principles and Pratics. Sons Ltd., England 1996, p.426.
43. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:9821-6.
44. Kang GH, Shim YH, Ro JY. Correlation of methylation of the *HMLH1* promoter with lack of expression of HMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. **Lab Invest** 1999; 79(7):903-9.
45. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. **J Clin Microbiol** 1995; 33:2752-6.
46. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J Biol Chem** 1995; 270:17771-7.
47. Domingo D, Alarcon T, Pietro N, Sanchez I, Lopez-Brea M. *cagA* and *vacA* status of Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. **J Clin Microbiol** 1999; 37:2113-4.
48. Gottke MU, Fallone CA, Barkun AN, Vogt K, Loo V, Trautmann M, et al. Genetic variability determinants of *Helicobacter pylori*: influence of clinical background and geographic origin of isolates. **J Infect Dis** 2000; 181:1674-81.
49. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem** 1981; 29:577-580.
50. Landberg G, Roos G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. **Cell Prolif** 1993; 26:427-37.

51. Obst B, Wagner S, Sewing KF, Beil W. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. **Carcinogenesis** 2000; 21(6):1111-5.
52. Hmadcha A, Bedoya FJ, Sobrino F, Pintado E. Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1beta via nitric oxide production. **J Exp Med** 1999; 190:1595-604.
53. Ling ZQ, Tanaka A, Li P, Nakayama T, Fujiyama Y, Hattori T, Sugihara H. Microsatellite instability with promoter methylation and silencing of *hMLH1* can regionally occur during progression of gastric carcinoma. **Cancer Lett** 2010; 297(2):244-51.
54. Kishimoto I, Mitomi H, Ohkura Y, Kanazawa H, Fukui N, Watanabe M. Abnormal expression of p16(INK4a), cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 and retinoblastoma protein in gastric carcinomas. **J Surg Oncol** 2008; 98(1):60-6.
55. Yamac D, Ayyildiz T, Coskun U, Akyürek N, Dursun A, Seckin S, Koybasioglu F. Cyclooxygenase-2 expression and its association with angiogenesis, *Helicobacter pylori*, and clinicopathologic characteristics of gastric carcinoma. **Pathol Res Pract** 2008; 204(8):527-36.
56. Kolev Y, Uetake H, Iida S, Ishikawa T, Kawano T, Sugihara K. Prognostic significance of VEGF expression in correlation with COX-2, microvessel density, and clinicopathological characteristics in human gastric carcinoma. **Ann Surg Oncol** 2007; 14(10):2738-47.
57. Mattioli E, Vogiatzi P, Sun A, Abbadessa G, Angeloni G, D'Ugo D, Trani D, Gaughan JP, Vecchio FM, Cevenini G, Persiani R, Giordano A, Claudio PP. Immunohistochemical analysis of pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16(INK4A), p27(KIP1), p21(WAF1), Ki-67 expression patterns in gastric cancer. **J Cell Physiol** 2007; 210(1):183-91.
58. Joo YE, Chung IJ, Park YK, Koh YS, Lee JH, Park CH, Lee WS, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Expression of cyclooxygenase-2, p53 and Ki-67 in gastric cancer. **J Korean Med Sci** 2006; 21(5):871-6.
59. Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, Maeda M, Yamasaki S, Kato M, Hashimoto Y, Ohshio G, Matsumoto M, Imamura M. Expression of cyclooxygenase-2 in primary and remnant gastric carcinoma: comparing it with p53 accumulation, *Helicobacter pylori* infection, and vascular endothelial growth factor expression. **J Surg Oncol** 2002; 80(2):79-88.
60. Chiaravalli AM, Furlan D, Facco C, Tibiletti MG, Dionigi A, Casati B, Albarello L, Riva C, Capella C. Immunohistochemical pattern of hMSH2/hMLH1 in familial and sporadic colorectal, gastric, endometrial and ovarian carcinomas with instability in microsatellite sequences. **Virchows Arch** 2001; 438(1):39-48. :
61. Leung WK, To KF, Ng YP, Lee TL, Lau JY, Chan FK, Ng EK, Chung SC, Sung JJ. Association between cyclo-oxygenase-2 overexpression and missense p53 mutations in gastric cancer. **Br J Cancer** 2001; 84(3):335-9.
62. Tsujie M, Yamamoto H, Tomita N, Sugita Y, Ohue M, Sakita I, Tamaki Y, Sekimoto M, Doki Y, Inoue M, Matsuura N, Monden T, Shiozaki H, Monden M. Expression of tumor suppressor gene p16(INK4) products in primary gastric cancer. **Oncology** 2000; 58(2):126-36.

63. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. *hMLH1* promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. **Cancer Res** 1999; 59(1):159-64.
64. Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the *hMLH1* gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. **Cancer Res** 1999; 59(5):1090-5.
65. De Maat MF, Van De Velde CJ, Umetani N, De Heer P, Putter H, Van Hoesel AQ, Meijer GA, Van Grieken NC, Kuppen PJ, Bilchik AJ, Tollenaar RA, Hoon DS. Epigenetic silencing of *cyclooxygenase-2* affects clinical outcome in gastric cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25(31):4887-94.
66. Zhao YF, Zhang YG, Tian XX, Juan DU, Zheng J. Aberrant methylation of multiple genes in gastric carcinomas. **Int J Surg Pathol** 2007; 15:242-51.
67. Kang YH, Bae SI, Kim WH. Comprehensive analysis of promoter methylation and altered expression of *hMLH1* in gastric cancer cell lines with microsatellite instability. **J Cancer Res Clin Oncol** 2002; 128(3):119-24.
68. Kim H, Kim YH, Kim SE, Kim NG, Noh SH, Kim H. Concerted promoter hypermethylation of *hMLH1*, *p16INK4A*, and *E-cadherin* in gastric carcinomas with microsatellite instability. **J Pathol** 2003; 200(1):23-31.
69. Yu J, Leung WK, Lee TL, Tse PC, To KF, Sung JJ. Promoter hypermethylation of *cyclooxygenase-2* in gastric carcinoma. **Int J Oncol** 2003; 22:1025-31.
70. Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Nishizuka S, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the *hMLH1* gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. **Oncogene** 2001; 20(3):329-35.
71. Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the *hMLH1* promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. **Int J Cancer** 2000; 87(2):200-3.
72. Endoh Y, Tamura G, Ajioka Y, Watanabe H, Motoyama T. Frequent hypermethylation of the *hMLH1* gene promoter in differentiated-type tumors of the stomach with the gastric foveolar phenotype. **Am J Pathol** 2000; 157(3):717-22.
73. Yu LZ, Gao HJ, Bai JF, Sun G, Zhao HL, Sun L, Miu K, Zhao ZQ. Expression of COX-2 proteins in gastric mucosal lesions. **World J Gastroenterol** 2004; 10(2):292-4.
74. Geddert H, Kiel S, Iskender E, Florl AR, Krieg T, Vossen S, Gabbert HE, Sarbia M. Correlation of *hMLH1* and *HPPI* hypermethylation in gastric, but not in esophageal and cardiac adenocarcinoma. **Int J Cancer** 2004; 110(2):208-11.

75. Nakajima T, Akiyama Y, Shiraishi J, Arai T, Yanagisawa Y, Ara M, Fukuda Y, Sawabe M, Saitoh K, Kamiyama R, Hirokawa K, Yuasa Y. Age-related hypermethylation of the *hMLH1* promoter in gastric cancers. **Int J Cancer** 2001; 94(2):208-11.
76. Seo HM, Chang YS, Joo SH, Kim YW, Park YK, Hong SW, Lee SH. Clinicopathologic characteristics and outcomes of gastric cancers with the MSI-H phenotype. **J Surg Oncol** 2009; 99(3):143-7.
77. Falchetti M, Saieva C, Lupi R, Masala G, Rizzolo P, Zanna I, Ceccarelli K, Sera F, Mariani-Costantini R, Nesi G, Palli D, Ottini L. Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival. **Hum Pathol** 2008; 39(6):925-32.
78. Kim MA, Lee HS, Yang HK, Kim WH. Clinicopathologic and protein expression differences between cardia carcinoma and noncardia carcinoma of the stomach. **Cancer** 2005; 103:1439-46.
79. Driessen A, Naftoux P, Lerut T, Van Raemdonck D, De Leyn P, Filez L, Penninckx F, Geboes K, Ectors N. Identical cytokeratin expression pattern CK7+/CK20- in esophageal and cardiac cancer: etiopathological and clinical implications. **Mod Pathol** 2004; 17:49-55.
80. Driessen A, Van Raemdonck D, De Leyn P, Filez L, Peeters M, Winnepeninckx V, Penninckx F, Lerut T, Ectors N. Are carcinomas of the cardia oesophageal or gastric adenocarcinomas? **Eur J Cancer** 2003; 39:2487-94.
81. Ksiaa F, Ziadi S, Amara K, Korbi S, Trimeche M. Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma. **Clin Chim Acta** 2009; 404(2):128-33.
82. Park DI, Park SH, Kim SH, Kim JW, Cho YK, Kim HJ, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Cho EY, Kim EJ, Chae SW, Sohn JH, Sung IK, Sepulveda AR, Kim JJ. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the expression of DNA mismatch repair protein. **Helicobacter**. 2005; 10(3):179-84.
83. Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Sheu BS, Muta T, Inoue H, Chen CC. Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor- κ B activation. **Mol Pharmacol** 2004; 66:1465-1477.
84. Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Association of cyclooxygenase-2 expression with *Hp-cagA* infection in gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2003; 9(2):246-9.
85. Kim JJ, Tao H, Carloni E, Leung WK, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. **Gastroenterology** 2002; 123(2):542-53.
86. Romano M, Ricci V, Memoli A, Tuccillo C, Di Popolo A, Sommi P, Acquaviva AM, Del Vecchio Blanco C, Bruni CB, Zarrilli R. *Helicobacter pylori* up-regulates cyclooxygenase-2

mRNA expression and prostaglandin E2 synthesis in MKN 28 gastric mucosal cells *in vitro*. **J Biol Chem** 1998; 273(44):28560-3.

87. Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Nakamura M, Yoshioka D, Okubo M, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Takahama K, Watanabe M, Yamashita H, Hirata I. Increased number of methylated CpG islands correlates with *Helicobacter pylori* infection, histological and serological severity of chronic gastritis. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2009; 21:613-9.

88. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Arai K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M, Ushijima T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. **Clin Cancer Res** 2006; 12(3 Pt 1):989-95.

89. Suzuki H, Hibi T, Marshall BJ. *Helicobacter pylori*: present status and future prospects in Japan. **J Gastroenterol** 2007; 42:1-15.

90. Velicescu M, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Tsai YC, Nguyen CT, Jones PA. Cell division is required for de novo methylation of CpG islands in bladder cancer cells. **Cancer Res** 2002; 62:2378-84.

EXO VIII

ResumoID: 851-1

Congresso Brasileiro de Microbiologia

II-COMUNICAÇÃO

Tema: Genética e Biologia Molecular (Divisão N) - PAINEL: 017

Tema-AREA: N01 - Expressão gênica

Inativação de p16 em adenocarcinomas gástricos associado à infecção por cepas de *H. pylori* mais patogênicasAutores: Alves^{1,1,1}; Ferrasi^{2,2}; Ferreira¹; Pardini²; Rabenhorst¹

Instituição: 1. UFC; Universidade Federal do Ceará; Rua Mosenhor Furtado, SN. Bairro Rodolfo Teófilo. Departamento de Patologia Leg

2. UNESP; Universidade Estadual Paulista; Hemocentro. Dist. Rubião

Título:

inativação gênica, através da metilação de regiões promotoras, é altamente frequente no câncer gástrico, sendo observado que aquele poderia ser induzido pela *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). O presente estudo objetivou avaliar a inativação de *CDKN2A* (proteína p16) por metilação e a relação desta com a infecção pela *H. pylori*. Esse estudo observacional do tipo transversal foi realizado a partir de 77 adenocarcinomas gástricos, coletados durante gastrectomia total ou parcial, em dois hospitais de Fortaleza, Ceará. A detecção de *H. pylori* foi feita pela amplificação do gene da *seC*, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Amostras *H. pylori* positivas foram genotipadas pelo gene *vacA*, *cagA*, *cagE*, *virB11* e *flaA*. O padrão de metilação do gene *CDKN2A* foi determinado por modificação com bissulfato de sódio e posterior realização da PCR Específica para Metilação e a detecção da proteína p16 por Imunoquímica, utilizando o kit CINtec® Histology. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os testes do χ^2 e teste de Fisher sendo considerados significativos resultados com $p < 0,05$. A metilação de *CDKN2A* foi detectada em 47% (28/77) dos casos e a expressão de p16 em 36% (28/77). Dos casos p16 negativos, 67% apresentaram *CDKN2A* metilados, sendo observada uma correlação negativa entre eles ($p = 0,000$ e $r = -0,546$). A infecção por *H. pylori* foi observada em 95% (77) dos tumores. Considerando o genótipo bacteriano estudado, os genes *vacA* s1m1 (72,6%; 53/73) e *flaA* (67,2%; 52/77) foram os mais frequentes, e os genes *cagA* (57,5%; 42/73), *virB11* (55,2%; 32/58), *cagE* (48,3%; 28/58), apresentaram frequências similares. Não foi observada nenhuma correlação entre os genes de *H. pylori* estudados e a atividade de p16, porém os tumores não metilados foram associados com a presença de genótipo mais patogênico de *H. pylori* (*flaA*+*cagA*+*vacA*s1m1+*cagE*+*virB11*+) ou com a presença do gene *flaA* isolado ($p = 0,052$ e $p = 0,008$, respectivamente). Adicionalmente, considerando a inativação do p16 por outra via que não a metilação, observou-se que a expressão de p16 foi positivamente correlacionada ($p = 0,021$; $r = 0,401$) com cepas *flaA* (+) e uma tendência foi detectada com as cepas mais patogênicas ($p = 0,063$). Assim conclui-se que a inativação de p16 ocorre predominantemente por metilação e depende da *H. pylori*, entretanto, existe uma associação da inativação do p16 pela *H. pylori*, mas por outra via, sendo correlacionada a cepas *flaA* (+) e mais patogênicas. Palavras-chaves: *H. pylori*, Câncer gástrico, Metilação, p16.



XIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICOBACTÉRIAS
III SIMPÓSIO DE COLEÇÕES DE CULTURAS
II SIMPÓSIO DE ESCHERICHIA COLI "LUIZ RACHID TRABULSI"

Certificado

Certificamos que o trabalho "INATIVAÇÃO DE P16 EM ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS ASSOCIADO À INFECÇÃO POR CEPAS DE *H. PYLORI* MAIS PATOGÊNICAS" com a autoria de: ALVES, FERRASI, FERREIRA, PARDINI, RABENHORST foi apresentado na forma de pôster durante o "25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA" em 11 de Novembro de 2009, em Porto de Galinhas-PE.

Porto de Galinhas, 12 de novembro de 2009.

Marina Baquerizo Martinez
Presidente da SBM

Carlos Pelleschi Taborda
1º Secretário da SBM

ANEXO IX

Congresso Brasileiro de Microbiologia

ResumoID: 851-2

II-COMUNICAÇÃO

Tema A: Genética e Biologia Molecular (Divisão N) - PAINEL: 025

-AREA: N01 - Expressão gênica

Relação entre expressão de COX-2 e mutação de p53 em câncer gástrico associado com infecção por *H. pylori* cagA(+)

Autores: Alves, M.K.S.; Lima, V.P.; Silva-Fernandes, I.J.L.; Diniz, R.V.; Ferreira, M.V.P.; Barros, M.A.P.; Rabenhorst, S.H.B.

Instituição: 1. UFC; Departamento de Patologia e Medicina Legal; Rua Mosenhor Furtado SN. Rodolfo Teófilo.

Resumo:

A ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) vem sendo associada ao processo tumorigênico em alguns tipos de câncer, contudo o mecanismo pelo qual ela promove o desenvolvimento desses tumores ainda não é conhecido. É sugerida uma inativação funcional de p53 por COX-2. O objetivo deste estudo foi determinar a relação entre expressão de COX-2 e mutação de p53 em adenocarcinomas gástricos avaliando a influência da infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) cagA positivo, considerado carcinógeno tipo 1, neste processo. Esse estudo observacional do tipo transversal foi realizado a partir de 33 adenocarcinomas gástricos, coletados durante gastrectomia total ou parcial, em dois hospitais de Fortaleza, Ceará. A expressão de COX-2 e mutação de p53 foram determinados por Imuno-Histoquímica e Polimorfismo de Conformação de Simples (SSCP), respectivamente, e a infecção por *H. pylori* foi detectada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) através da amplificação do gene *ureaseC* com posterior genotipagem para o gene *cagA*. A análise estatística foi realizada utilizando o teste do χ^2 , de Fisher, e a correlação de Spearman, sendo considerada significativa quando obtida $p < 0,05$. Dos 33 tumores analisados, a expressão de COX-2 foi detectada 36,4% (12/33) dos casos, a mutação de p53 em 73% (23/33) e a infecção por *H. pylori* cagA positivo em 57,6% (19/33). Dos casos COX-2 positivo, 83,3% (10/12) foram p53 mutado, porém não foi encontrada correlação entre eles ($p = 0,210$; $r = 0,224$). Casos *H. pylori* cagA positivo foram encontrados frequentemente nos tumores com ausência de expressão de COX-2 (84%; 13/19) e p53 mutado (74%; 14/19). Os tumores que apresentaram a combinação COX-2 negativo e p53 mutado foram 69,2% (9/13) *H. pylori* cagA positivo e dos casos COX-2 positivo e p53 mutado, 50% (5/10) foram cagA positivo, contudo sem significância estatística. Esses dados sugerem que a inativação funcional de p53 por COX-2 parece não ser uma via tumorigênica nos tumores gástricos e que não há influência da infecção por *H. pylori* cagA.

Palavras-chaves: Câncer gástrico, COX-2, *Helicobacter pylori*, p53



XIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICOBACTÉRIAS
III SIMPÓSIO DE COLEÇÕES DE CULTURAS
II SIMPÓSIO DE ESCHERICHIA COLI "LUIZ RACHID TRABULSI"

Certificado

Certificamos que o trabalho "RELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DE COX-2 E MUTAÇÃO DE P53 EM CÂNCER GÁSTRICO ASSOCIADO COM INFECÇÃO POR H. PYLORI CAGA(+)" com a autoria de: ALVES, M.K.S., LIMA, V.P., SILVA-FERNANDES, I.J.L., DINIZ, R.V., FERREIRA, M.V.P., BARROS, M.A.P., RABENHORST, S.H.B. foi apresentado na forma de pôster durante o "25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA" em 11 de Novembro de 2009, em Porto de Galinhas-PE.

Porto de Galinhas, 12 de novembro de 2009.

Marina Baquerizo Martinez
Presidente da SBM

Carlos Pelleschi Taborda
1º Secretário da SBM

ANEXO X

Adaltech Soluções para Evento - www.adaltech.com.br

http://sec.adevento.com.br/sbm/inscricao/mostra_resumo.asp?trald=1

25º Congresso Brasileiro de Microbiologia

ResumoID: 720-1

MINI-COMUNICAÇÃO

ÁREA: Genética e Biologia Molecular (Divisão N) - PAINEL: 014

SUB-ÁREA: N02 - Gene e estrutura do genoma

FREQUENCIA DOS GENES DE *cag*-PAI EM PACIENTES COM CANCER GASTRICO DO ESTADO DO CEARA

Autores LIMA, V.P.; ALVES, M.K.S.; DINIZ, R.V.; BARROS, M.A.P.; RABENHORST, S.H.B.

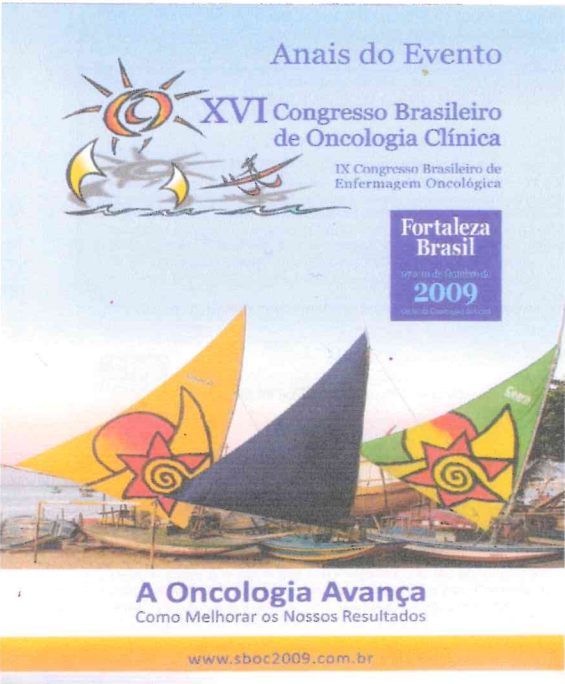
Instituição 1. UFC; DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL; RUA ALEXANDRE BARAUNA, 949 PORANGABUSSU FORTALEZA-CE CEP:60183-630

Resumo:

O câncer gástrico é uma doença multifatorial, na qual a infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) tem um papel relevante. Entretanto, apenas 3% dos indivíduos infectados por *H. pylori* desenvolvem câncer gástrico e as diferenças quanto à evolução clínica da infecção estaria associado à presença de cepas genotipicamente distintas. Dentre os fatores de virulência de *H. pylori* destaca-se a ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI), sendo seu principal representante o gene *cagA*. Além desse, outros genes de *cag*-PAI são potencialmente relevantes, como os genes *cagE* (localizado no lado direito de *cag*-PAI) e *virB11* (localizado no lado esquerdo). Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar a presença desses genes (individualmente e combinados) em pacientes com câncer gástrico. Amostras de 101 pacientes com câncer gástrico submetidos à gastrectomia foram incluídas neste estudo. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para a detecção de *H. pylori*, utilizando o gene da ureaseC (*ureC*), e dos genes de *cag*-PAI: *cagA*, *cagE* e *virB11*. *H. pylori* foi detectada em 93% (94/101) dos casos analisados. As frequências dos genes *cagA*, *cagE* e *virB11* foram, respectivamente: 64,9% (61/94), 53,2% (50/94) e 60,6% (57/94). Verificou-se uma alta correlação positiva entre *cagA* e *virB11* ($r=0,728$; $p<0,001$). Adicionalmente, correlações positivas foram observadas entre *cagA* e *cagE* ($r=0,248$; $p=0,016$) e entre *cagA* e *virB11* ($r=0,229$; $p=0,027$). Quatro grupos foram gerados considerando a integridade de *cag*-PAI: grupo 1, todos os genes estudados; grupo 2 [*cagA*(+) e *virB11*(+) ou *cagE*(+) e *virB11*(+)] ; grupo 3, apenas um dos genes presentes ou os dois genes localizados no lado direito da ilha e grupo 4, todos os genes de *cag*-PAI negativos. O grupo mais frequente foi o grupo 1 representando 38,4% (36/94), seguido do grupo 3, 25,6% (24/94), representado, principalmente pelos genes localizados no lado direito (*cagA* e/ou *cagE*) de *cag*-PAI (83,4%; 20/24). Frequência semelhante, 18% (17/94) foi observada nos grupos 2 e 4. A alta frequência de cepas portadoras do gene *cagE* e *virB11*, em associação com *cagA* ou de forma isolada indicam sua relevância para o desenvolvimento de câncer gástrico associado à infecção por *H. pylori*.

Palavras-chaves: CÂNCER GÁSTRICO, *cag*-PAI, GENÓTIPOS, *Helicobacter pylori*

ANEXO XI



48 • SBOC - Tumores do Trato Gastrointestinal

A119

[167] AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE CDKN2A EM ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS ASSOCIADOS A INFECÇÃO POR *HELICOBACTER PYLORI* CAG(A+).
ALVES, M.K.S.; LIMA, V.P.; COSTA, D.M.; FERRAS, A.C.; FERREIRA, M.V.P.; PARDINI, M.I.M.C.; RABENHORST, S.H.B.
1,2,3,5,7. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, FORTALEZA, CE, BRASIL; 4,6. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU, SP, BRASIL

A associação da infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) com o desenvolvimento de câncer gástrico já é bem estabelecida, embora os mecanismos carcinogênicos ainda não sejam conhecidos. Estudos apontam que esta bactéria pode promover a hipermetilação de genes supressores de tumor com consequente silenciamento desses genes. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação de cepas de *H. pylori* cag(A+) com o padrão de metilação e expressão do gene *CDKN2A* (proteína p16), em uma série de adenocarcinomas gástricos. Esse estudo observacional do tipo transversal foi realizado a partir de 82 adenocarcinomas gástricos, coletados durante gastrectomia total ou parcial, em dois hospitais de Fortaleza, Ceará. A detecção de *H. pylori* foi feita pela amplificação do gene

da ureaseC, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e as amostras *H. pylori* positivas foram genotipadas para o gene cagA. O padrão de metilação do gene *CDKN2A* foi determinado por modificação com bissulfato de sódio e posterior realização da PCR Específica para Metilação. A imunohistoquímica para pesquisa da proteína p16 no tecido tumoral foi realizada utilizando o kit CInice® Histology e a positividade foi considerada quando obtido um índice de marcação > ou igual a 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os testes do χ^2 e teste exato de Fisher e os resultados foram considerados significativos quando obtido $p < 0,05$. Dos 82 tumores analisados, 52 eram subtipo histológico intestinal e 30 eram difusos. *H. pylori* foi detectada em 95% (78/82) dos casos e destes 60% (47/78) eram cagA positivos. *CDKN2A* metilado e a presença da proteína p16 foram observados em 46% (38/82) e 42% dos tumores, respectivamente, sendo encontrada uma correlação negativa entre eles ($p = 0,000$, $r = -0,557$). Não foi observada associação entre metilação de *CDKN2A* e a presença de cepas *H. pylori* cagA positivas na análise geral ($p = 0,331$) ou por tipo histológico ($p = 0,732$), não sendo também detectada associação entre expressão de p16 e presença de *H. pylori* cagA. Esses dados mostram que a alta inativação do gene *CDKN2A*, por metilação, é independente da presença de cepas de *H. pylori* cag(A+).

A120

[111] CARCINOMA VERRUCOSO ANAL: RELATO DE CASO EM PACIENTE INFECTADO POR HIV
VISSOTTO, E.F.; FARIA, L.D.B.B.; BERNARDES, J.M.G.; SILVA, V.R.; VASCONCELOS, M.C.S.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO, UBERLÂNDIA, MG, BRASIL

Introdução: O carcinoma verrucoso anal (condiloma acuminado gigante ou tumor de Buschke Lowenstein) é uma variante rara do carcinoma de células escamosas da região anal, e apresenta estreita relação com o papiloma vírus humano (HPV). Apresenta-se como uma massa exofítica de grandes proporções, de caráter agressivo, porém com baixo risco de desenvolver metástases. A excisão radical é o tratamento mais utilizado, e pode ser associado a radioterapia e quimioterapia. A incidência de câncer anal vem aumentando nos últimos anos, e pode estar relacionado com o aumento da incidência de pacientes infectados pelo HIV. **Objetivos:** Relatar um caso de condiloma acuminado gigante, e fazer uma revisão da literatura sobre a associação do câncer anal em geral e do tumor de Buschke Lowenstein com a infecção pelo HIV. **Relato de caso:**

Paciente do sexo masculino, 33 anos, portador da síndrome da imunodeficiência adquirida (Sida) há 7 anos, em terapia antirretroviral regular. Apresentava lesões verrucosas no ânus e fistulas perianais há quatro anos. Foi feito diagnóstico de carcinoma verrucoso anal e estadiamento clínico com ressonância magnética. Optou-se pela realização de quimioterapia (3 ciclos durante dois meses com mitomicina C e 5-fluorouracil) e radioterapia neoadjuvante em região pélvica e linfonodos inguinais. O paciente recusou a proposta de amputação anorectal à Miles, e foi realizada apenas a ressecção cirúrgica das lesões. No momento está em acompanhamento ambulatorial, com boa evolução clínica, sem evidências de recidiva. **Discussão:** Estudos demonstram que a incidência de câncer anal aumentou consideravelmente com o surgimento da Aids. Mesmo com a introdução de terapias antirretrovirais, as taxas de incidência, ao contrário do esperado, aumentaram. Sugere-se que o aumento da sobrevida aumentou o tempo para o risco de desenvolvimento de câncer anal. Não encontramos trabalhos relacionando o aumento da incidência do tumor de Buschke Lowenstein com infecção por HIV. No entanto, pareceu significativa dos casos relatados da doença são de homossexuais infectados pelo vírus. No Brasil, há escassez de dados epidemiológicos sobre câncer anal.

A121

[124] POLIMORFISMO DA MTHFR (C677T) E PADRÃO DE METILAÇÃO EM CÂNCER GÁSTRICO: ASSOCIAÇÃO COM A INFECÇÃO POR *HELICOBACTER PYLORI*
NEVES FILHO, E.H.C.; ALVES, M.K.S.; LIMA, V.P.; SILVA-FERNANDES, I.L.L.; RABENHORST, S.H.B.
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, FORTALEZA, CE, BRASIL

O presente estudo visou analisar a associação entre o polimorfismo da MTHFR (C677T) e a metilação dos genes *COX-1*, *CDKN2A* e *hMLH1* a partir de amostras de tumores gástricos e verificar a influência de *Helicobacter pylori* nesse processo. A população de investigação constituiu-se de um número de 58 pacientes diagnosticados com câncer gástrico submetidos a gastrectomia total ou parcial provenientes do Serviço de Cirurgia do Hospital das Clínicas/LFC e da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza - CE. O polimorfismo da MTHFR C677T foi detectado pela técnica de PCR-RFLP, a presença de metilação por meio da técnica de MS-PCR (modificação com bissulfato de sódio com posterior amplificação por PCR) e a infecção por *H. pylori* foi detectada por PCR do gene da ureaseC. Nas amostras *H. pylori* positivas foi verificada a presença do gene cagA e dos alelos do *vacA*. As análises

estatísticas foram realizadas utilizando o teste do χ^2 e o teste exato de Fisher (SPSS® versão 15.0), sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$. O genótipo selvagem (CC) foi detectado em 46,5% (27/58) das amostras, enquanto os polimorfismos heterozigotos e homozigotos compreenderam 48,2% (28/58) e 5,3% (3/58), respectivamente. A ausência de metilação foi observada em 27,6% (16/58) dos casos, a presença de metilação em apenas um gene em 25,8% (15/58), em dois genes em 34,5% (20/58) e em três genes em 12,1% (7/58) das amostras. A infecção por *H. pylori* foi detectada em 94,8% (55/58) dos casos, nos quais a positividade do gene cagA foi verificada em 69,0% (38/55) e a presença de *vacA* s1m1 observada em 69,0% (38/55). Não foi observada nenhuma associação significativa entre genótipo e presença de metilação na amostra geral ou por localização de acometimento do tumor (cárdia e não cárdia). Entretanto, ao analisar os tumores *H. pylori* cagA(+)/*vacA* s1m1 localizados na cárdia, verificou-se uma correlação significativa entre o genótipo TT e a presença de metilação de um gene ($p = 0,035$; $r = 0,677$), enquanto nos tumores *H. pylori* cagA(+)/*vacA* s1m1 não cárdia observou-se a presença de metilação de dois ou mais genes associada com genótipo CT ($p = 0,033$, $r = 0,489$). Assim, existe uma relação entre os genótipos da MTHFR e presença de metilação associados à infecção por *H. pylori* cagA(+)/*vacA* s1m1, a qual se mostra dependente da localização do tumor.

A122

[130] PADRÃO DE METILAÇÃO DIFERENCIAL DOS GENES *COX2*, *CDKN2A* E *hMLH1* EM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO PROXIMAL E DISTAL
ALVES, M.K.S.; NEVES FILHO, E.H.C.; FERRAS, A.C.; FERREIRA, M.V.P.; PARDINI, M.I.M.C.; RABENHORST, S.H.B.
1,2,4,6. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, FORTALEZA, CE, BRASIL; 3,5. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU, SP, BRASIL

Os tumores gástricos proximais e distais são morfologicamente indistinguíveis, porém as diferenças epidemiológicas observadas são intimamente ligadas às vias carcinogênicas distintas, embora essas vias ainda sejam pobremente entendidas e avaliadas. Uma via proposta é o silenciamento de genes de reparo e supressores de tumores, por hipermetilação de suas regiões promotoras. O presente estudo objetivou determinar e comparar o padrão de metilação dos genes *COX2*, *CDKN2A* e *hMLH1* em uma série de adenocarcinomas gástricos humanos distais (antro e corpo) e proximais (cárdia). Esse estudo observacional do tipo transversal foi realizado a partir de 82 adenocarcinomas gástricos, coletados durante gastrectomia total

ou parcial, em dois hospitais de Fortaleza, Ceará. O padrão de metilação dos genes *COX2*, *CDKN2A* e *hMLH1* foi determinado por modificação com bissulfato de sódio e posterior realização da Reação em Cadeia da Polimerase Específica para Metilação. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os testes do χ^2 e teste exato de Fisher e os resultados foram considerados significativos quando obtido $p < 0,05$. Dos 82 tumores analisados, 18 e 64 eram proximais e distais, respectivamente. O gene *COX2* foi o mais metilado (44/82; 54%), seguido do *CDKN2A* (38/82; 46%) e *hMLH1* (27/82; 33%), porém sem diferença estatística. A ausência de metilação nos genes estudados foi observada em 29% (24/82) dos casos. Entre os casos que apresentaram dois dos genes metilados, a associação entre *COX2* e *CDKN2A* foi a mais frequente (71%; 22/31), seguida da combinação de *COX2* e *hMLH1* (22,6%; 7/31) e *hMLH1* e *CDKN2A* (6,4%; 2/31). *COX2* e *CDKN2A* apresentaram frequências de metilação similares entre os tumores proximais e distais, porém *hMLH1* foi predominantemente metilado nos tumores distais (25/27) ($p = 0,026$). Esses resultados indicam que nos tumores gástricos distais, o reparo ineficiente, devido à inativação por metilação do *hMLH1*, pode ser um importante via para desenvolvimento e progressão desses tumores.

SBOC - Tumores do Trato Gastrointestinal • 55

A147

[637] STATUS DE METILAÇÃO DO GENE COX2 EM CÂNCER GÁSTRICO: RELAÇÃO COM IDADE E ESTADIAMENTO TUMORAL. DINIZ, R.V.; ALVES, M.K.S.; LIMA, V.P.; FERRAS, A.C.; PARDINI, M.L.M.C.; RABENHORST, S.H.B.
1,2,3,4. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, FORTALEZA, CE, BRASIL; 4,5. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU, SP, BRASIL.

A metilação de DNA, levando ao silenciamento de genes, é associada com o desenvolvimento e progressão tumoral gástrica e é alterada com a idade, contudo esse processo ainda não é entendido. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre metilação do gene COX2 (citocromo oxidase tipo 2) e o estadiamento tumoral, de acordo com a idade dos pacientes. Esse estudo observacional do tipo transversal foi realizado a partir de 82 adenocarcinomas gástricos, coletados durante gastrectomia total ou parcial, em dois hospitais de Fortaleza,

Ceará. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os testes do χ^2 e o teste exato de Fisher cujos resultados foram considerados significativos quando obtido $p < 0,05$. O padrão de metilação do gene COX2 foi determinado por modificação com bissulfato de sódio e posterior realização da PCR Específica para Metilação. Dos 82 casos analisados, 82,9% (68/82) eram pacientes maiores de 50 anos, 71,9% (59/82) eram tumores de estadiamento mais avançado (III e IV) e 52,4% (43/82) apresentaram COX2 metilado. Dos tumores de estadiamento I e II, 61% (14/23) eram não metilados, por outro lado, os tumores de estadiamentos III e IV foram mais frequentemente metilados (58%; 34/59), porém sem diferença estatística ($p = 0,132$). Dos pacientes com idade menor ou igual a 50 anos, 55,6% (5/9) apresentaram COX2 metilado nos estadiamentos III e IV, contudo frequência similar (58%) foi encontrada nos pacientes maiores de 50 anos. Portanto, conclui-se que a presença de metilação no gene COX2 não está relacionada com a progressão tumoral nesses tumores estudados e independe da idade dos pacientes.

A148

[222] PERFIL DE SEGURANÇA DO BEVACIZUMABE ASSOCIADO À QUIMIOTERAPIA DE PRIMEIRA LINHA EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL METASTÁTICO E PRIMÁRIO NÃO OPERADO. OLIVEIRA, T.B.; DE MELLO, C.A.L.; DE PAIVA JR, T.F.; E SILVA, M.J.B.; SANCHES, S.M.; CRUZ, M.R.S.; NICOLAU, U.R.; DETTINO, A.L.A.; FANELLI, M.F.
HOSPITAL A.C. CAMARGO, SÃO PAULO, SP, BRASIL.

Introdução: O papel da ressecção paliativa do tumor primário em pacientes com câncer colorretal metastático (CCRM) é incerto. O objetivo do estudo é avaliar o índice de complicações relacionados ao tumor primário não ressecado e determinar a segurança do uso de bevacizumabe nesta situação. **Materiais e métodos:** Análise retrospectiva de 12 pacientes tratados com quimioterapia (QT) associada a bevacizumabe em primeira linha, sem ressecção do tumor primário, entre janeiro de 2007 e agosto de 2008. Todos os pacientes apresentavam pouco ou nenhum sintoma relacionados ao tumor primário. **Resultados:** A idade média dos pacientes foi de 54,6 anos (entre 28-75), 5 homens e 7 mulheres, todos com ECOG=0. A localização do tumor primário era o reto em 8 pacientes (66,6%), cólon sigmoide em 3 (25%) e o cólon transverso em 1 (8,3%). Oito pacientes (66,6%) apresentavam sangramento retal

ao diagnóstico (leve a moderado). O intervalo médio entre o diagnóstico e o início da QT foi 40,8 dias (entre 6-125). O número total de ciclos de bevacizumabe foi 151 (média: 12,5 ciclos; entre 4-37). A QT de primeira linha era FOLFOX-6 em 66% e FOLFIRI em 33% dos pacientes. Apenas 3 pacientes (25%) apresentaram sangramento digestivo baixo, todos grau I, sem necessidade de interrupção do bevacizumabe. Nenhum apresentou perfuração ou obstrução intestinal. Dois pacientes (16,6%) apresentaram epistaxe grau I e I (8,3%) hipertensão grau I. Não foram observadas outras complicações num seguimento médio de 9,3 meses. **Conclusões:** Recentemente o anticorpo monoclonal bevacizumabe tem sido usado no tratamento de primeira linha de CCRM mostrando benefício de sobrevida, porém com um maior risco de sangramento e raramente perfuração intestinal. Esses efeitos colaterais causam preocupação em pacientes com tumor primário não operado. Nossos dados mostram que a quimioterapia associada a bevacizumabe em primeira linha é segura para pacientes com CCRM e primário não ressecado. Não foram observadas complicações maiores relacionadas ao tumor primário. Embora nossos dados venham de um número limitado de pacientes, não há estudos prospectivos controlados abordando este tema na literatura. Portanto, em casos selecionados, uma abordagem conservadora de CCRM assintomático ou pouco sintomático em relação ao tumor primário pode ser considerada, mesmo se é previsto o uso de terapia antiangiogênica.

A149

[623] EFICÁCIA E SEGURANÇA DO USO DE BEVACIZUMABE EM PACIENTES ACIMA DE 70 ANOS COM CARCINOMA COLORRETAL METASTÁTICO DE PAIVA JR, T.F.; ALENCAR JUNIOR, A.M.; OLIVEIRA, T.B.; BENEVIDES, C.F.L.; CEZÁRIO, L.L.A.; CHINEN, L.T.D.; CRUZ, M.R.S.; LIMA, V.C.C.; NICOLAU, U.R.; FANELLI, M.F.; DE MELLO, C.A.L.
HOSPITAL A.C. CAMARGO, SÃO PAULO, SP, BRASIL.

Objetivo: Avaliar a eficácia e a segurança do uso de bevacizumabe (Bev) associado à quimioterapia (QT) em pacientes portadores de carcinoma colorretal (CCR) metastático com mais de 70 anos. **Método:** Foram avaliados retrospectivamente 17 pacientes com CCR maiores de 70 anos tratados com Bev concomitante a QT baseada em 5-Fluorouracil (5-FU) e/ou Oxaliplatina ou Irinotecano entre abril de 2007 a novembro de 2008 no Hospital A.C. Camargo. Foram avaliadas variáveis clínicas e demográficas, complicações da terapia, taxas de resposta e sobrevida global (SG) e tempo para progressão (TPP). Para o cálculo da SG, foi empregado o método de Kaplan-Meier. **Resultados:** A população estudada teve idade mediana de 72 anos (70 a 78) e foi constituída em 70% por mulheres. Doze

pacientes apresentavam comorbidades, dentre os quais 23,5% tinham hipertensão arterial sistêmica (HAS) e 11,8% trombose venosa profunda (TVP). Três pacientes tinham tumor primário não operado. O Bev foi administrado na primeira linha de tratamento para 64,7% dos pacientes e na segunda linha para 29,4%. O esquema de QT administrada concomitante ao Bev foi FOLFOX-6 em 70% dos pacientes, FOLFIRI em 52,9% dos pacientes, enquanto que 17,6% apresentaram doença estável e 23,5% progressão de doença. Em um seguimento mediano de 23 meses, a sobrevida global (SG) mediana foi de 27,6 meses e o TPP foi de 6 meses. Ocorreram complicações relacionadas ao uso de Bev em 5 pacientes (sangramento em 2, hipertensão em 1 e proteinúria em 2), mas somente 1 paciente teve o Bev interrompido. **Conclusão:** A terapia antiangiogênica com bevacizumabe combinada a quimioterapia para tratamento do CCR mostrou ser segura em pacientes acima de 70 anos. Os eventos adversos mais frequentemente observados foram sangramento e proteinúria, em geral não necessitando da interrupção da terapia. A sobrevida observada para este grupo foi superior à descrita na literatura para pacientes com CCR metastático em tratamento com Bev.

A150

[188] SÍNDROME DE VEIA CAVA SUPERIOR COM CIRCULAÇÃO COLATERAL EM ESCLAVINA - MANIFESTAÇÃO ATÍPICA DE RECÍDIVA DE ADENOCARCINOMA DE CÔLON. TAKAHASHI, T.K.; TESTA, L.; SARAGIOTTO, D.F.; CASTRO-JR, G.; HOFF, P.M.
INSTITUTO DO CÂNCER DO ESTADO DE SÃO PAULO (ICESP) - FACULDADE DE MEDICINA DA USP, SÃO PAULO, SP, BRASIL.

Introdução: Neoplasias são a principal causa de síndrome de veia cava superior (SVCS) (Wilson et al., 2007), sendo câncer de pulmão não-pequenas células (50%), câncer de pulmão pequenas células (22%), linfomas (12%) e metástases (9%, em geral câncer de mama), as principais etiologias. Nosso objetivo é descrever o caso de um paciente portador de SVCS decorrente de metástase de câncer de cólon. **Relato de caso:** Homem, 61 anos, é admitido

com quadro de dor torácica e emagrecimento, sendo que há dois anos e meio fora submetido a hemicolectomia direita com ileo-transverso anastomose por adenocarcinoma de cólon pT3pN2. O mesmo havia sido submetido a quimioterapia adjuvante (5-FU/LV, Mayo Clinic). Clínicamente, era evidente a circulação colateral torácica em esclavina, quadro bastante típico de SVCS, comprovado por imagem. Durante a investigação, concluiu-se que tal dor torácica era causada por adenomegalias mediastinais de aspecto metastático, sendo que a biópsia revelou tratar-se de adenocarcinoma com imunossucesso de CDX-2, CK20 e CK7, sendo TTF-1 negativo, compatível com adenocarcinoma metastático com provável sítio primário em cólon. Paciente foi tratado com 5 aplicações de radioterapia de 400 cGy, evoluindo com melhora do quadro. **Conclusão:** Apesar de infrequente, adenocarcinoma de cólon pode se apresentar como causa de SVCS, por compressão direta por adenomegalias mediastinais, como neste paciente.

A151

[265] CARCINOMA DE CÔLON X ACTINOMICOSE DE CÔLON - RELATO DE CASO. MONTEIRO, T.N.L.; RODAS, P.M.M.; ROCHA, A.C.; FERRÓ, S.K.S.
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, MACEIO, AL, BRASIL.

O estudo analisa um caso de actinomicose de cólon, o qual se assemelhava com carcinoma de cólon, exaltando a importância do diagnóstico diferencial. O paciente, 41 anos, atendido na Unidade de Emergência Dr. Amândio Lages, Maceió - AL, encontrava-se com quadro clínico de abdome agudo inflamatório, história de perda ponderal, mal-estar geral e massa palpável e endurecida em flanco direito e ruídos hidroaéreos diminuídos. Foi então submetido a procedimento cirúrgico com suspeita diagnóstica pré-operatória de carcinoma de cólon. O ato cirúrgico foi iniciado, com incisão para-mediana direita, encontrando-se uma

tumoração com aspecto neoplásico apendicular envolvendo ceco e retroperitônio adjacente até o músculo psoas maior direito. Foi realizada hemicolectomia direita com anastomose ileo transversa seguida de omentectomia. A evolução do paciente foi satisfatória, recebendo alta hospitalar no 8º dia de pós-operatório. O exame histopatológico diagnosticou actinomicose abdominal (de cólon) com apendicite aguda purulenta e linfadenite aguda. Diante do exposto, conclui-se que se deve atentar para os diagnósticos diferenciais de processos tumorais, pois os mesmos, muitas vezes, são de difícil confirmação diagnóstica, devido as semelhanças clínicas, como perda ponderal, evolução insidiosa, dor abdominal, alteração do hábito intestinal, massa abdominal palpável, perfurações intestinais com sinais de peritonite. A anamnese cuidadosa é fundamental, incluindo história familiar. Deve-se suspeitar de carcinoma de cólon em todo paciente que desenvolva dor abdominal, modificação dos hábitos intestinais, emagrecimento, anemia e massas palpáveis.