



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

**DÉBORA MENEZES DA COSTA**

**Relação entre *Helicobacter pylori*, Metilação Gênica e Polimorfismos  
Genéticos do Hospedeiro no Câncer Gástrico**

**FORTALEZA**

**2016**

**DÉBORA MENEZES DA COSTA**

**Relação entre *Helicobacter pylori*, Metilação Gênica e Polimorfismos  
Genéticos do Hospedeiro no Câncer Gástrico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst.

**FORTALEZA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- C871r Costa, Débora Menezes da.  
Relação entre *helicobacter pylori*, metilação gênica e polimorfismos genéticos do hospedeiro no câncer gástrico. / Débora Menezes da Costa. – 2016.  
97 f.: il. color.  
Tese (doutorado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Doutorado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2016.  
Área de Concentração: Genética.  
Orientação: Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst.
1. Metilação. 2. *Helicobacter pylori*. 3. Neoplasias Gástricas. I. Título.

---

CDD 616.99433

**DÉBORA MENEZES DA COSTA**

**Relação entre *Helicobacter pylori*, Metilação Gênica e Polimorfismos  
Genéticos do Hospedeiro no Câncer Gástrico**

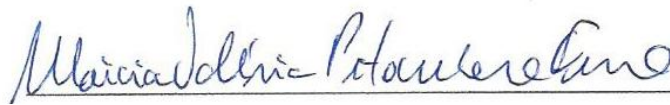
**Data da Defesa: 16/02/2016**

**BANCA EXAMINADORA**



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Márcia Valéria Pitombeira Ferreira

Universidade Federal do Ceará (UFC)



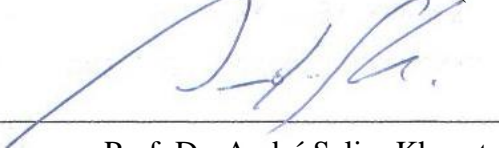
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Paulo Pordeus Gomes

Universidade Federal do Ceará (UFC)



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Leite Vieira Costa

Universidade Federal do Ceará (UFC)



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. André Salim Khayat

Universidade Federal do Pará (UFPA)

**À minha mãe, minha avó e minha  
família por todo apoio e incentivo, dedico.**

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, por me guiar no caminho certo e não me deixar cair nos inúmeros momentos de dúvida e angústia. Por Sua presença constante em minha vida;*

*A minha mãe Diana Tavares e a minha avó Ana Tavares, pela imensa dedicação à minha formação como pessoa, por todo amor e carinho;*

*À FUNACP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.*

*À Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst, pela incansável dedicação à orientação do meu trabalho de tese, bem como por todos os ensinamentos a mim passados ao longo dos quase 10 anos de orientação.*

*Aos professores participantes da banca examinadora Dra. Márcia Valéria Pitombeira Ferreira, Dr. João Paulo Pordeus Gomes, Dr. Marcelo Leite Vieira Costa e Dr. André Salim Khayat pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.*

*Aos pacientes incluídos nesse estudo e seus familiares;*

*A Profa. Márcia Valéria Pitombeira Ferreira, por todas as análises anátomo-patológicas e histológicas dos tumores;*

*Às parceiras de projeto Isabelle Joyce de Lima Silva Fernandes e Eliane dos Santos Pereira, por todas as diluições de DNA feitas com muita música e alegria, que resumem seu companheirismo;*

*Às doutorandas Ana Paula Santos do Carmo e Emanuele Silva de Oliveira, por sua amizade e exemplos de organização e dedicação à pesquisa;*

*A todos os amigos do Laboratório de Genética Molecular, Aline Kimberly, Paulo Ricardo, Maíra, Helder, Fabiane, Isaac e Morgana pela convivência sempre agradável e por contribuírem não só intelectualmente, mas por proporcionarem momentos tão necessários de descontração.*

*“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas.  
Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura  
para achar as que estão certas”.*

Carl Sagan

## RESUMO

O câncer gástrico constitui um sério problema de saúde pública. Diversos fatores de risco parecem estar envolvidos na contribuição para o seu desenvolvimento, tais como: genes de virulência de *H. pylori*, SNPs em genes-chave no hospedeiro e eventos epigenéticos. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar a relação entre a metilação de genes em casos de câncer gástrico, sua associação com genes de virulência de *H. pylori*, verificar a influência dos SNPs de *CDHI* e *MLHI* em seu status de metilação, bem como correlacionar a metilação do promotor de miR-34b/c e a expressão da proteína MET nesses mesmos casos. A metilação dos genes foi obtida através da realização da técnica MS-PCR e HRM (para miR-34b/c). Os genes de *H. pylori* foram detectados por PCR e os SNPs, por PCR-RFLP. Os genes de maior e menor frequência de metilação foram *MSH2* e *MLHI*, respectivamente. O corte de idade mostrou que pacientes com idade  $\geq 50$  anos tiveram *CDHI* mais frequentemente metilado que aqueles mais jovens. O gene *MLHI* foi significativamente menos metilado em tumores da cárdia. Quanto ao TNM, o gene *CDHI-M* foi associado à extensão tumoral avançada, inclusive quando subdividido por subtipo, já que mesma associação foi mostrada em tumores do subtipo intestinal. Já a combinação *CDKN2A-M/MLHI-U* foi associada à ausência de metástase à distância. Levando em consideração os genes de virulência de *H. pylori*, foi visto que pacientes infectados por cepas *vacAm1+* ou *cagG+* tiveram uma maior frequência de *CDKN2A-U*, *vacAs1+* foi associado com *COX-2-U* e *CDHI-U*, enquanto *hopQII*, com *MLHI-U*. Pacientes infectados por cepas *cagE+* e *virB11+* tiveram maior frequência de *MSH2-M*. Foi observado também que cepas menos virulentas apresentaram uma tendência à não-metilação para os genes *MLHI* e *CDHI*. As árvores de classificação, feitas de acordo com o subtipo histológico, mostraram que em tumores do subtipo difuso, cepas *cagE+* e *virB11+* (separados ou em concomitância) também estavam associadas a um caráter metilador em alguns dos genes analisados. Já cepas *virB11+cagA+* não levavam à metilação em dois genes. Nos tumores do subtipo intestinal, não foi observado um padrão, havendo uma variação nas combinações dos genes de *H. pylori* que levavam à metilação. Os SNPs de *CDHI* e não apresentaram relação com a metilação desses genes, enquanto o genótipo GA de *MLHI* apresentou uma tendência à não metilação do gene. Quanto à metilação do promotor de miR-34b/c, a distribuição dos casos por percentual mostrou que a maioria dos casos apresentou metilação acima de 50%. A maior frequência de casos entre os tumores do subtipo intestinal estava na faixa de metilação de 50-75%, e para os do subtipo difuso, a partir de 75%. Já a expressão de c-MET foi positiva em 86,36% dos casos, não sendo encontradas diferenças entre as diferentes localizações e subtipos. Não foi encontrada uma correlação entre o percentual de metilação de miR-34b/c e a expressão da proteína c-MET. Observando caso a caso, foi visto que na maioria dos casos cuja expressão de c-MET era negativa (H-score 0) possuía um elevado percentual de metilação de miR-34b/c. Assim, pode-se concluir que os status de metilação dos genes estudados parecem ser dependentes da localização tumoral e está relacionado também ao estadiamento TNM e ao subtipo tumoral. Além disso, cepas de *H. pylori* mais virulentas podem estar envolvidas nesse processo, aumentando a resposta inflamatória e levando à metilação desses genes. Já a proteína c-MET está superexpressa em casos de câncer gástrico e a região promotora de miR-34b/c, hipermetilada, indicando um possível envolvimento desses fatores na carcinogênese do estômago, embora não tenha sido encontrada uma relação direta entre as duas variáveis.

**Palavras-chave:** Metilação, *Helicobacter pylori*, Câncer Gástrico, Polimorfismos, microRNA, MET.



## ABSTRACT

Gastric cancer is a serious health problem. Several risk factors have been identified to contribute to its development, such as virulence genes of *H. pylori*, SNPs in host's key genes and epigenetic events. The aim of this study was to investigate the relationship between genes methylation in gastric cancer, its association with *H. pylori* virulence genes, and verify the influence of *CDHI* and *MLHI* SNPs in the methylation status and correlate methylation of the promoter of miR-34b/c expression of MET protein in those cases. The promoter genes methylation was assessed by MS-PCR and HRM (for miR-34b/c) techniques. *H.pylori* genes were detected by PCR and SNPs, by PCR-RFLP. *H.pylori* genes were detected by PCR and SNPs, by PCR-RFLP. The genes of higher and lower methylation frequency were *MSH2* and *MLHI*, respectively. Patients aged  $\geq 50$  had *CDHI* more frequently methylated than those younger. The *MLHI* gene was significantly less methylated in cardia tumors. As for the TNM, the *CDHI*-M gene was associated with advanced tumor extension, even when subdivided by subtype, since same association has been shown in tumors of intestinal subtype. Already the combination *CDKN2A*-M/*MLHI*-U was associated with absence of distant metastases. Taking into account the virulence genes of *H. pylori*, it was seen that patients infected *vacAm1+* or *cagG+* strains had a higher frequency of *CDKN2A*-U *vacAs1 +* was associated with *COX-2*-U and *CDHI*-U, while *hopQII* with *MLHI*-U. Patients infected with *cagE+* and *virB11+* strains had higher frequency of *MSH2*-M. It was also observed that less virulent strains tended to non-methylation for *CDHI* and *MLHI* genes. The classification trees made according to the histological subtype, showed that in tumors of diffuse subtype *cagE+* and *virB11 +* strains (separately or together) were also attached to a methylator character of some of the analyzed genes. Already strains *virB11+cagA+* did not lead to methylation in two genes. In intestinal subtype tumors was not observed a pattern having a variation in the combinations of *H. pylori* genes leading to the methylation. *CDHI* SNPs presented no relation to the methylation of this gene, while the GA genotype of *MLHI* SNP showed a tendency to not methylation of the gene. As regards the promoter methylation of miR-34b/c, the distribution percentage of the cases showed that the majority of cases presented methylation above 50%. The larger frequency among tumors of the intestinal subtype was in the methylation range of 50-75%, and to diffuse subtype from 75%. Already c-MET expression was positive in 86.36% of cases were not found differences among the different locations and subtypes. There was no correlation between the methylation percentage of miR-34b/c and c-MET expression. Observing each case, it was seen that in most cases whose c-MET expression was negative (H-score 0) had a high percentage of methylation of miR-34b/c. In conclusion, the methylation status of the studied genes appear to be dependent on the tumor location and is also related to the TNM staging and tumor subtype. In addition, more virulent *H. pylori* strains may be involved in this process by increasing inflammatory response leading to methylation of these genes. Already c-MET is overexpressed in cases of gastric cancer and the promoter region of miR-34b/c hipermethylated, indicating a possible involvement of these factors in carcinogenesis of the stomach, although it was not found a direct relationship between the two variables.

**Keywords:** Methylation, *Helicobacter pylori*, Gastric Cancer, Polymorphisms, microRNA, MET.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Taxa de incidência de câncer gástrico para cada 100 mil habitantes em homens e mulheres no Brasil e estado do Ceará, estimadas para o ano de 2014 .....	15
Figura 2 – Sítios anatômicos do estômago .....	16
Figura 3 – Classificação histopatológica de Lauren.....	17
Figura 4 – Representação esquemática da Cascata de Correa. Modelo sequencial de alterações da mucosa gástrica, a partir da mucosa normal até o câncer gástrico. ....	20
Figura 5 – Eletromicrografias de culturas de <i>Helicobacter pylori</i> .....	21
Figura 6 – Representação esquemática da Ilha de patogenicidade cag, que mostra as localizações de cagI e cagII. ....	23
Figura 7 – Representação esquemática do sistema de secreção tipo IV (SST4) de <i>Helicobacter pylori</i> .....	24
Figura 8 – Polimorfismo no gene <i>vacA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> .....	28
Figura 9 – Processo de metilação do DNA, levando à repressão da expressão gênica; e atuação das enzimas DNMTs. ....	31
Figura 10 – Família miR-34 atua como mediador na supressão tumoral através de p53.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definição do TNM patológico (à esquerda) e estadiamento por agrupamento de classificações histológicas (à direita) .....	18
Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores específicos para realização de MS-PCR e HRM .....	41
Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores específicos para a amplificação dos genes de <i>H. pylori</i> .....	45
Tabela 4 – Oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação de <i>CDH1</i> e <i>MLH1</i> e detecção dos respectivos polimorfismos. ....	46
Tabela 5 – Distribuição dos casos de câncer gástrico quanto a positividade de expressão de c-MET, de acordo com parâmetros clínico-patológicos.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

Cag-PAI – Ilha de Patogenicidade cag  
CagA – Citotoxina associada ao gene A  
CDKN2A – Inibidor 2A Quinase Dependente de Ciclina  
COX-2 – Ciclo-oxigenase-2  
DNMT – DNA metiltransferase  
FlaA – Flagelina A  
Hop – Porina da Membrana Externa de *Helicobacter*  
IL-8 – Interleucina 8  
LPS – Lipopolissacarídeos  
miRNA - MicroRNA  
mRNA – RNA mensageiro  
MLH1 – Homólogo 1 de MutL  
MMR – Reparo por mal-pareamento  
MSH2 – Homólogo 2 de MutS  
MSI – Instabilidade de Microssatélite  
NF-kB – Fator Nuclear kB  
OMP – Proteína de Membrana Externa  
pH – Potencial hidrogeniônico  
RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio  
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio  
SNP – Polimorfismo de Único Nucleotídeo  
SST4 – Sistema de Secreção do Tipo IV  
UTR – Região não traduzida (do DNA)  
VacA – Citotoxina vacuolizante A

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1 Câncer Gástrico .....	14
2.1.1 <i>Epidemiologia</i> .....	14
2.1.2 <i>Características Patológicas</i> .....	15
2.1.3 <i>Etiologia</i> .....	19
2.2 <i>Helicobacter pylori</i> .....	20
2.2.2 <i>Helicobacter pylori e o Câncer Gástrico</i> .....	22
2.2.3 <i>Fatores de Virulência</i> .....	22
2.3 Infecção por <i>Helicobacter pylori</i> , Inflamação Crônica e Hipermetilação de Promotores Gênicos no Câncer Gástrico.....	29
2.3.1 <i>O sucesso da colonização por H. pylori leva à infecção persistente e inflamação crônica da mucosa gástrica</i> .....	29
2.3.2 <i>Metilação do DNA</i> .....	30
2.3.3 <i>Helicobacter pylori promove a Metilação do DNA através da inflamação crônica</i> .....	31
2.4 Metilação do MicroRNA 34b/c e o Câncer Gástrico .....	33
2.4.1 <i>miRNA 34b/c e a regulação de MET</i> .....	34
2.5 Polimorfismos de <i>CDH1</i> e <i>MLH1</i> .....	35
<b>3. HIPÓTESES .....</b>	<b>37</b>
<b>4. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>37</b>
4.1 Objetivos Específicos.....	37
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
5.1 Casuística .....	38
5.2 Aspectos Éticos .....	38
5.3 Coleta de Dados e Avaliação Histopatológica .....	39
5.4 Extração do DNA de Espécimes Congelados .....	39
5.5 Tratamento do DNA com Bissulfito .....	40
5.6 PCR Específico para Metilação (convencional).....	40
5.7 HRM Específico para Metilação .....	40
5.8 Detecção de <i>H. pylori</i> e de seus Genes de Virulência.....	42
5.8.1 <i>Detecção do Gene cagA</i> .....	42
5.8.2 <i>Detecção do Gene cagE</i> .....	42
5.8.3 <i>Detecção do Gene virB11</i> .....	43
5.8.4 <i>Detecção do Gene cagG, cagM, cagT e oipA</i> .....	43
5.8.5 <i>Presença e Subtipos do Gene vacA de H. pylori</i> .....	43
5.8.6 <i>Detecção do gene hopQI e hopQII</i> .....	44
5.8.7 <i>Detecção do Gene flaA</i> .....	44
5.9 Detecção dos polimorfismos de <i>CDH1</i> e <i>MLH1</i> .....	44
5.10 Detecção da expressão de c-MET .....	46
5.11 Análises Estatísticas .....	47
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
6.1 Artigo I.....	48
6.2 Resultados .....	66
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>

<b>Anexo I - Protocolo de Coleta no Centro Cirúrgico .....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo II – Parecer do Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará.....</b>	<b>87</b>
<b>Anexo III – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Fortaleza .....</b>	<b>88</b>
<b>Anexo IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>89</b>
<b>Anexo V – Cadastro de Pacientes Submetidos à Coleta de Tecido de Peça Cirúrgica .....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE A – Artigos Publicados .....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE B – Tabelas Complementares .....</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICE C – Árvores de Classificação Complementares .....</b>	<b>95</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer gástrico constitui o quinto tipo de câncer mais frequente no mundo, sendo a terceira causa de morte por câncer. Os países em desenvolvimento contribuem com mais de 70% desses casos, tornando essa doença um grave problema de saúde pública. O câncer gástrico é uma doença multifatorial, cujo principal fator ambiental é a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (FERLAY et al., 2015).

Embora *H. pylori* infecte mais da metade da população mundial, apenas de 0,5 a 2% das pessoas infectadas desenvolvem câncer gástrico (OLUWASOLA, 2014). Fatores genéticos e epigenéticos têm sido atribuídos ao risco de desenvolvimento dessa doença. Dentre eles estão fatores de virulência de *H. pylori*, polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) em genes-chave do hospedeiro e eventos epigenéticos (FU et al., 2015; ZENG et al., 2015).

Vários genes de virulência de *H. pylori* têm sido reportados em associação ao desenvolvimento de doenças mais graves. Dentre esses genes estão aqueles da ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI), toxina vacuolizante (*vacA*), bem como genes de adesão e de motilidade, uma vez que todos contribuem para uma infecção persistente, levando a uma maior resposta inflamatória (WANG et al., 2013).

Dentre os SNPs associados ao câncer gástrico, dois presentes no gene *CDHI* e um no gene *MLHI* parecem estar associados ao aumento do risco para essa doença. Os alelos polimórficos de *CDHI* -160 C/A e -347 G/GA diminuem a eficiência transcricional quando comparado aos alelos de referência, levando a uma diminuição da expressão de E-caderina (SHIN et al., 2004; YAMADA et al., 2007). Já o SNP de *MLHI* -93 G/A diminui a expressão dessa enzima, levando a alterações na capacidade de reparo do DNA (MEI et al., 2010). Isso faz desses SNPs potenciais marcadores genéticos para a suscetibilidade de câncer gástrico.

Sabe-se que a metilação aberrante do DNA é uma importante alteração que ocorre no processo carcinogênico do estômago, e está associada diretamente à inflamação crônica causada pela infecção por *H. pylori* (NIWA et al., 2010; LIU et al., 2012). Vários genes aparecem silenciados por hipermetilação de seus promotores no câncer gástrico (MEISSNER, 2010). Dentre eles estão genes que codificam moléculas envolvidas na inflamação (*COX-2*), reguladores do ciclo celular (*CDKN2A*), moléculas de adesão intercelular (*CDHI*), enzimas de reparo (*MLHI* e *MSH2*), além de genes que codificam microRNAs (miR-34b/c) (SILVA et al., 2010; FERRASI et al., 2010; BEN AYED-GUERFALI et al., 2011; TSAI et al., 2011; QU et al., 2013).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Câncer Gástrico**

#### ***2.1.1 Epidemiologia***

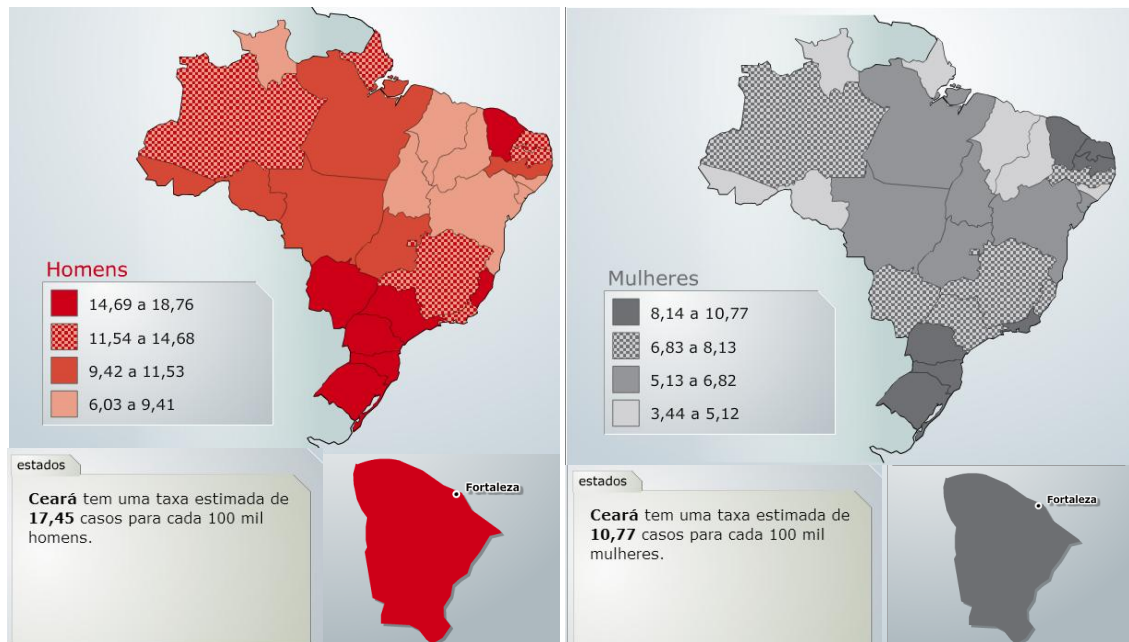
Estima-se que um milhão de novos casos de câncer gástrico tenham ocorrido no ano de 2012. Tais estatísticas colocam os tumores de estômago como o quinto tipo de câncer mais frequente no mundo, representando 6,8% de todos os diagnósticos de câncer. A frequência desse tipo de tumor é duas vezes maior em homens que em mulheres, sendo a terceira causa de morte por câncer em ambos os sexos (FERLAY et al., 2015).

As taxas de incidência de câncer gástrico variam de acordo com a região do mundo, sendo maiores em países do leste asiático, principalmente na China, bem como nos países das Américas Central e do Sul. Também no leste asiático se encontra a maior taxa de mortalidade, embora taxas elevadas também sejam observadas na Europa e nas Américas Central e do Sul. Estima-se que mais de 70% dos novos casos e mortes ocorrerão em países em desenvolvimento (FERLAY et al., 2015).

No Brasil, as taxas de incidência também variam regionalmente e, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a taxa de mortalidade é de cerca de 7,68/100.000 casos. O Ceará está entre os estados que possui uma das maiores taxas de incidência, sendo estimados 17,45/100.000 novos casos entre os homens e 10,77/100.000 casos entre as mulheres (Figura 1). Assim, no estado do Ceará, o câncer gástrico é o segundo mais frequente entre os homens (ficando abaixo apenas dos tumores de próstata) e o terceiro entre as mulheres (perdendo posição apenas para os tumores de mama e de colo do útero) (INCA, 2016).



Figura 1 – Taxa de incidência de câncer gástrico para cada 100 mil habitantes em homens e mulheres no Brasil e estado do Ceará, estimadas para o ano de 2016.

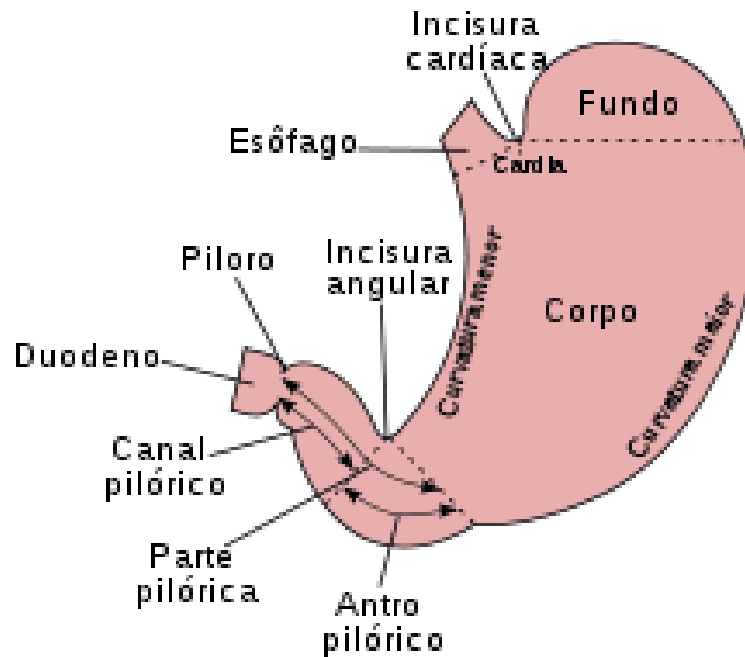


Fonte: INCA, 2016.

### 2.1.2 Características Patológicas

Os tumores gástricos são classificados, de acordo com a sua localização dentro do estômago, em proximais (cárdia, fundo e corpo) e distais (antro, piloro) (Figura 2). Existe uma grande dificuldade em estabelecer se um tumor localizado na região da cárdia possui sítio de origem no esôfago ou no estômago. Devido a essa impossibilidade de classificação, resolveu-se tratar os tumores localizados na cárdia e na região não-cárdia como duas entidades biológicas distintas, com etiologias, características clínicas e epidemiológicas diferentes. Além disso, o prognóstico dos tumores da cárdia é menos favorável quando comparado àqueles tumores localizados em outros sítios anatômicos (PIAZUELO e CORREA, 2013).

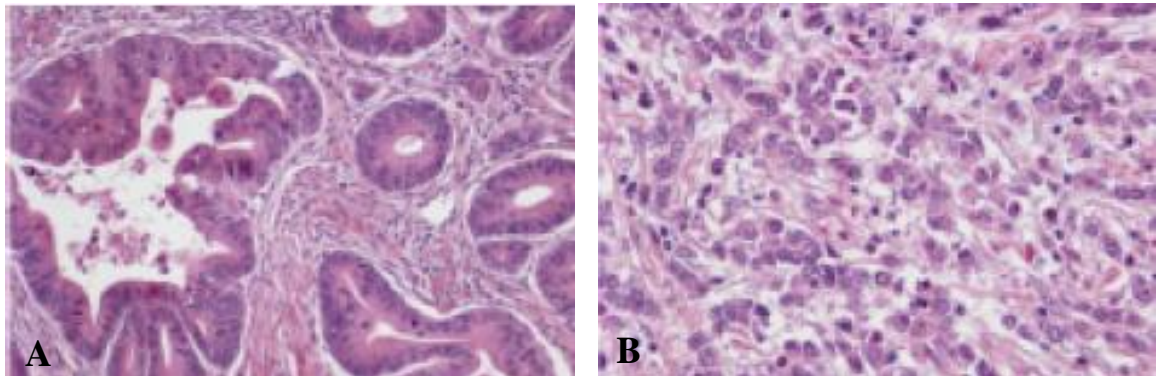
Figura 2 – Sítios anatômicos do estômago.



Fonte: pt.wikipedia.org

A classificação histológica do câncer gástrico divide esses tumores em dois tipos principais: não-epiteliais e epiteliais. Dentre os tumores epiteliais, estão incluídos os adenocarcinomas, que representam 90-95% dos casos de tumor gástrico (CORREIA et al., 2009). Baseados em aspectos morfológicos, vários sistemas de classificação histológica têm sido propostos, no entanto, a classificação mais comumente utilizada nos países ocidentais é a classificação de Lauren, que divide o adenocarcinoma gástrico em dois tipos: intestinal e difuso (Figura 3). As diferenças morfológicas entre esses dois subtipos estão relacionadas a moléculas de adesão intercelular, as quais se encontram preservadas no subtipo intestinal e defeituosas no subtipo difuso (LAUREN, 1965).

Figura 3 – Classificação histopatológica de Lauren. Adenocarcinomas gástricos dos subtipos [A] Intestinal (x200) e [B] Difuso (x400), corados por HE.



Fonte: Piazuolo e Correa, 2013.

Os tumores do subtipo intestinal costumam ser mais frequentemente diagnosticados, embora sua incidência venha diminuindo nos países desenvolvidos. Em geral, esses tumores se apresentam moderadamente ou bem diferenciados, mostrando microscopicamente um padrão glandular semelhante à mucosa intestinal, com células coesas que formam estruturas tubulares, comumente acompanhados por formação papilar ou componentes sólidos (Figura 3a). Tais tumores são predominantemente encontrados em homens e em indivíduos mais velhos, são dependentes de fatores ambientais, dentre eles a infecção por *H. pylori*, e podem estar associados à presença de lesões pré-malignas, que representam passos intermediários no desenvolvimento da neoplasia (PIAZUELO e CORREA, 2013).

Já os tumores do subtipo difuso são pouco diferenciados, têm pior prognóstico que os do subtipo intestinal, parecendo ser mais agressivos. Microscopicamente, consistem em células pobremente coesivas, resultando em pequenos grupos ou mesmo em células tumorais solitárias, sem formação de estruturas glandulares, apresentando algumas vezes um vacúolo citoplasmático claro (Figura 3b). Esses tumores acometem com mais frequência pacientes jovens e do sexo feminino, podendo apresentar um caráter hereditário. Embora possa estar associado à infecção por *H. pylori*, é mais frequentemente associada com a perda de expressão de E-caderina, sem lesão pré-cancerosa bem definida. Geograficamente, os adenocarcinomas do subtipo difuso são mais comumente encontrados em áreas de baixa incidência, enquanto os do subtipo intestinal são predominantes em áreas de alta incidência (PIAZUELO e CORREA, 2013).

O estadiamento do tumor é outro parâmetro histopatológico a ser considerado. Existem dois sistemas de classificação principais usados para estabelecer o estadiamento do câncer gástrico: o “*Japanese Classification of Gastric Cancer*” (JCGC) e o Tumor-Nodo-Metástase (TNM) da “*American Joint Committee on Cancer*” (AJCC) (EDGE et al., 2010 apud NCCN Guidelines, 2015). Na classificação patológica TNM são avaliados parâmetros como a extensão do tumor primário (T), a presença de linfonodos comprometidos (N) e a presença de metástase à distância (M), como mostrado na Tabela 1 (NCCN Guidelines, 2015).

Baseado nesta classificação é estabelecido o estadiamento do tumor, que pode ser classificado em quatro estádios (I - IV). Os estádios I e II podem ser agrupados como precoces, enquanto III e IV são denominados avançados, os quais compreendem cerca de 65% de todos os tumores e apresentam um pior prognóstico (Tabela 1) (NCCN Guidelines, 2015).

Tabela 2 - Definição do TNM patológico (à esquerda) e estadiamento por agrupamento de classificações histológicas (à direita)

Tumor Primário (pT)		Estadiamento	Combinações TNM		
TX	Tumor primário não pode ser avaliado	<b>0</b>	Tis	N0	M0
T0	Sem evidência de tumor primário	<b>IA</b>	T1	N0	M0
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria	<b>IB</b>	T2	N0	M0
T1	Tumor invade a lâmina própria, mucosa muscular ou submucosa		T1	N1	M0
T1a	Tumor invade a lâmina própria ou mucosa muscular	<b>IIA</b>	T3	N0	M0
T1b	Tumor invade submucosa		T2	N1	M0
T2	Tumor invade a muscular própria		T1	N2	M0
T3	Tumor penetra o tecido conectivo subseroso sem invasão do peritônio visceral ou estruturas adjacentes	<b>IIB</b>	T4a	N0	M0
T4	Tumor invade a serosa (peritônio visceral) e estruturas adjacentes		T3	N1	M0
T4a	Tumor invade a serosa (peritônio visceral)		T2	N2	M0
T4b	Tumor invade estruturas adjacentes		T1	N3	M0
<b>Linfonodos Regionais (pN)</b>		<b>IIIA</b>	T4a	N1	M0
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados		T3	N2	M0
N0	Sem metástase para linfonodos regionais		T2	N3	M0
N1	Metástase em 1 a 2 linfonodos regionais	<b>IIIB</b>	T4b	N0	M0
N2	Metástase em 3 a 6 linfonodos regionais		T4b	N1	M0
N3	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais		T4a	N2	M0
N3a	Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais		T3	N3	M0
N3b	Metástase em 16 ou mais linfonodos regionais	<b>IIIC</b>	T4b	N2	M0
<b>Metástase à distância (pM)</b>			T4b	N3	M0
M0	Sem metástase à distância		T4a	N3	M0
M1	Com metástase à distância	<b>IV</b>	Qualquer	Qualquer	M1

Fonte: NCCN Guidelines, 2015.

### 2.1.3 Etiologia

O câncer gástrico é uma doença multifatorial, na qual vários fatores etiológicos estão possivelmente envolvidos em seu desenvolvimento. Estudos epidemiológicos sugerem que fatores ambientais, infecciosos e relacionados ao hospedeiro (fatores genéticos e epigenéticos) podem interagir, favorecendo o desenvolvimento desse câncer.

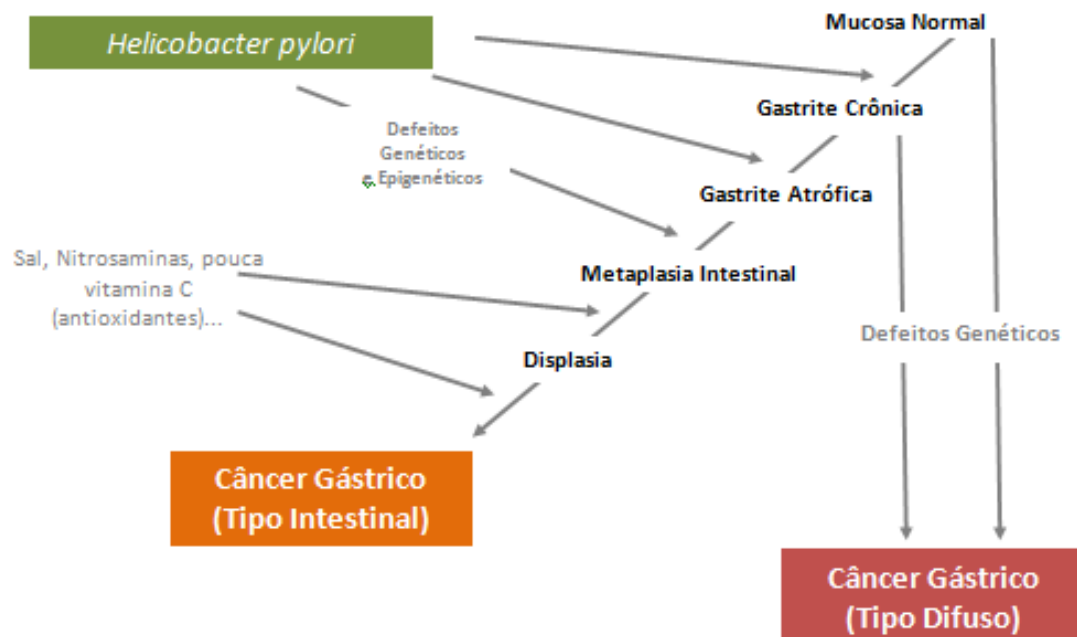
Dentre os fatores ambientais, pode-se destacar:

- ❖ Consumo elevado de sal, que através da destruição da camada mucosa gera inflamação, erosões e degeneração epitelial (PELETEIRO et al., 2011);
- ❖ Consumo excessivo de álcool, que gera uma resposta inflamatória crônica além dos efeitos tóxicos diretos do etanol. Tais fatores subsequentemente levam ao dano da mucosa gástrica, aumentando a absorção de nitrosaminas (BARTSCH e NAIR, 2005);
- ❖ Tabagismo, fator de risco já estabelecido para mais de 14 tipos de câncer (DOLL et al., 2005; LADEIRAS-LOPES et al., 2008);
- ❖ Infecção por *Helicobacter pylori*, um dos principais fatores ambientais causadores de câncer gástrico (WEN e MOSS, 2009).

*H. pylori* está envolvida na etiologia de doenças gástricas, tendo sua participação comprovada somente no ano de 1983, por Robin Warren e Barry Marshall. Os dois pesquisadores provaram pela primeira vez que uma bactéria era capaz de colonizar o epitélio gástrico, particularmente a mucosa gástrica e ganharam o Prêmio Nobel em 2005 por essa descoberta (WARREN e MARSHALL, 1983).

A infecção por essa bactéria foi inicialmente relacionada à carcinogênese de tumores do subtipo intestinal, como proposto por Correa (1992). Entretanto, mais recentemente, foi comprovado que a infecção por *H. pylori* leva a um aumento significativo do risco de desenvolvimento de ambos os subtipos, intestinal e difuso. Como nenhum outro passo além da gastrite crônica causada por *H. pylori* é necessário para o desenvolvimento dos tumores do subtipo difuso, parece haver mecanismos distintos que levam essa bactéria a induzir a carcinogênese para os dois subtipos. Para o subtipo intestinal, esse processo é inicialmente dirigido pela infecção por *H. pylori*, causando uma sequência de lesões precursoras caracterizadas por uma cascata de mudanças na mucosa gástrica que progridem a partir da mucosa normal. Já para o subtipo difuso, não há uma sequência de lesões precursoras (SMITH et al., 2006) (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática da Cascata de Correa. Modelo sequencial de alterações da mucosa gástrica, a partir da mucosa normal até o câncer gástrico.

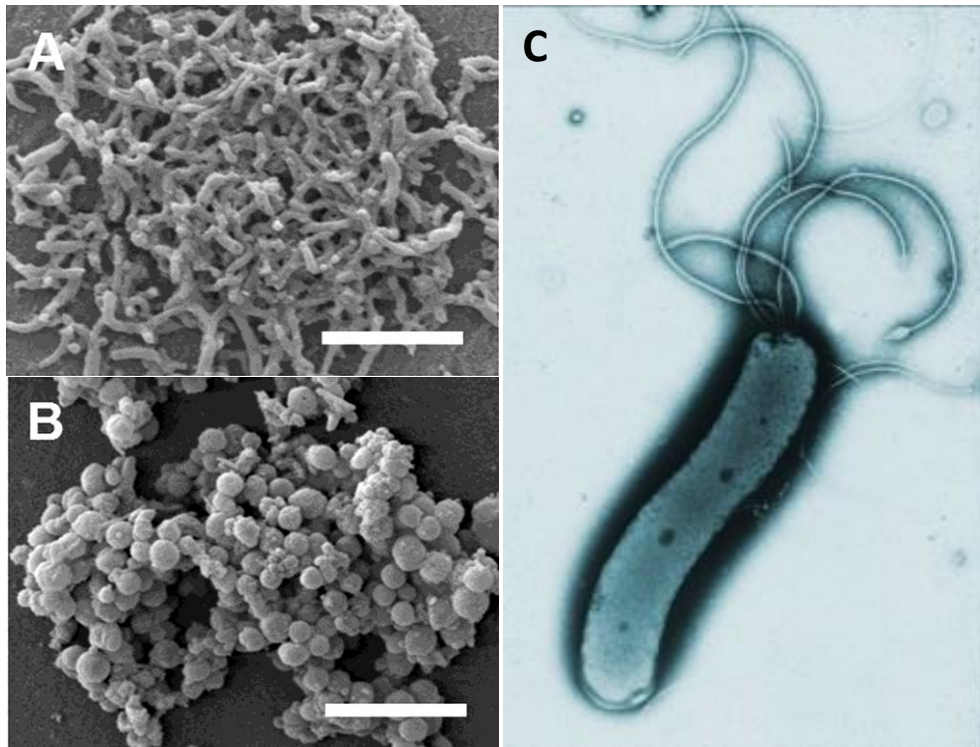


Fonte: Konturek, 2003.

## 2.2 *Helicobacter pylori*

É uma bactéria encontrada com maior frequência na forma espiralada ou encurvada, também podendo assumir a forma de cocos, gram-negativa, móvel, microaerófila, que possui de 4-6 flagelos unipolares embainhados e que apresenta de 0,5 a 0,9  $\mu\text{m}$  de largura e 2 a 4  $\mu\text{m}$  de comprimento (Figura 5). Essa espécie está classificada no Domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Epsilonproteobacteria, ordem Campylobacterales, família Helicobacteraceae e gênero *Helicobacter* (GOODWIN, et al., 1989; MONTECUCCO e RAPPUOLI, 2001; OWEN, 2001; NCBI).

Figura 5 – Eletromicrografias de culturas de *Helicobacter pylori*, mostrando suas formas espiralada [A] e cocóide [B], sendo detalhada em [C], na qual é possível se observar sua forma e flagelos unipolares.



Fontes: Azevedo et al., 2007; <https://www.abdn.ac.uk/ims/profiles/g.l.hold>

*H. pylori* coloniza áreas do estômago e duodeno, sobrevivendo muito bem neste ambiente ácido devido à sua capacidade de secretar urease. Um dos testes diagnósticos mais utilizados na detecção de *H. pylori* é o teste rápido da urease, no qual um fragmento da mucosa gástrica é colocado em frasco contendo uréia e vermelho fenol como indicador de pH. Essa enzima converte a uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, em amônia e bicarbonato promovendo a alcalinização local e resultando no aumento do pH periplasmático e do microambiente próximo. A elevação do pH previne o acúmulo tóxico de ureia dentro da bactéria e protege esse patógeno dos efeitos danosos do pH ácido do estômago (WARREN e MARSHALL, 1983; TOMBOLA et al., 2001; YAMAOKA, 2008).

Evidências suportam que a relação entre *H. pylori* e os humanos date de pelo menos 60.000 anos. A diversidade genética da bactéria evoluiu paralelamente à da espécie humana, mostrando que ambos têm evoluído intimamente desde então. Além disso, a distribuição da diversidade genética de *H. pylori* está em consonância com a colonização dos primeiros humanos e sua migração a partir do leste africano. Assim, tem-se hipotetizado que a colonização por essa bactéria pode ter proporcionado benefícios àqueles que a possuíam,

funcionando como uma pressão seletiva durante um longo período de tempo (BLASER e ATHERTON, 2004; LINZ et al., 2007).

*H. pylori* possui uma distribuição cosmopolita, sendo encontrada em habitantes de todos os continentes (GO, 2002). Admite-se que a infecção ocorra durante a infância e embora as vias de transmissão não sejam completamente entendidas, são aceitas as seguintes: (1) via fecal-oral, característica de países em desenvolvimento, na qual a água poderia ser o veículo; e (2) via gastro-oral e oral-oral, prevalente em países desenvolvidos (SHANKS e EL-OMAR, 2009; KHALIFA et al., 2010). A prevalência da infecção por *H. pylori* varia de acordo com a idade (quanto maior a idade maior a prevalência), o nível socioeconômico (maior em países em desenvolvimento) e a etnia (LOGAN e WALKER, 2001).

### **2.2.2 Helicobacter pylori e o Câncer Gástrico**

Em 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou *H. pylori* como um carcinógeno de classe I (definitivo), baseando-se em evidências epidemiológicas sobre seu papel na patogênese dos adenocarcinomas gástricos (IARC, 1994). Embora cerca de 50% da população mundial esteja infectada por essa bactéria, estima-se que somente 1-2% dessas pessoas irão desenvolver câncer gástrico (WEN e MOSS, 2009). Essa discordância entre as taxas de infecção e desenvolvimento da doença é devida a diferenças entre as cepas envolvidas nas infecções (presença de fatores de virulência), bem como entre os hospedeiros humanos (fatores genéticos e ambientais) (GLADE, 1999; HUANG et al., 2003; SCHNEIDER et al., 2008; LIMA et al., 2011).

### **2.2.3 Fatores de Virulência**

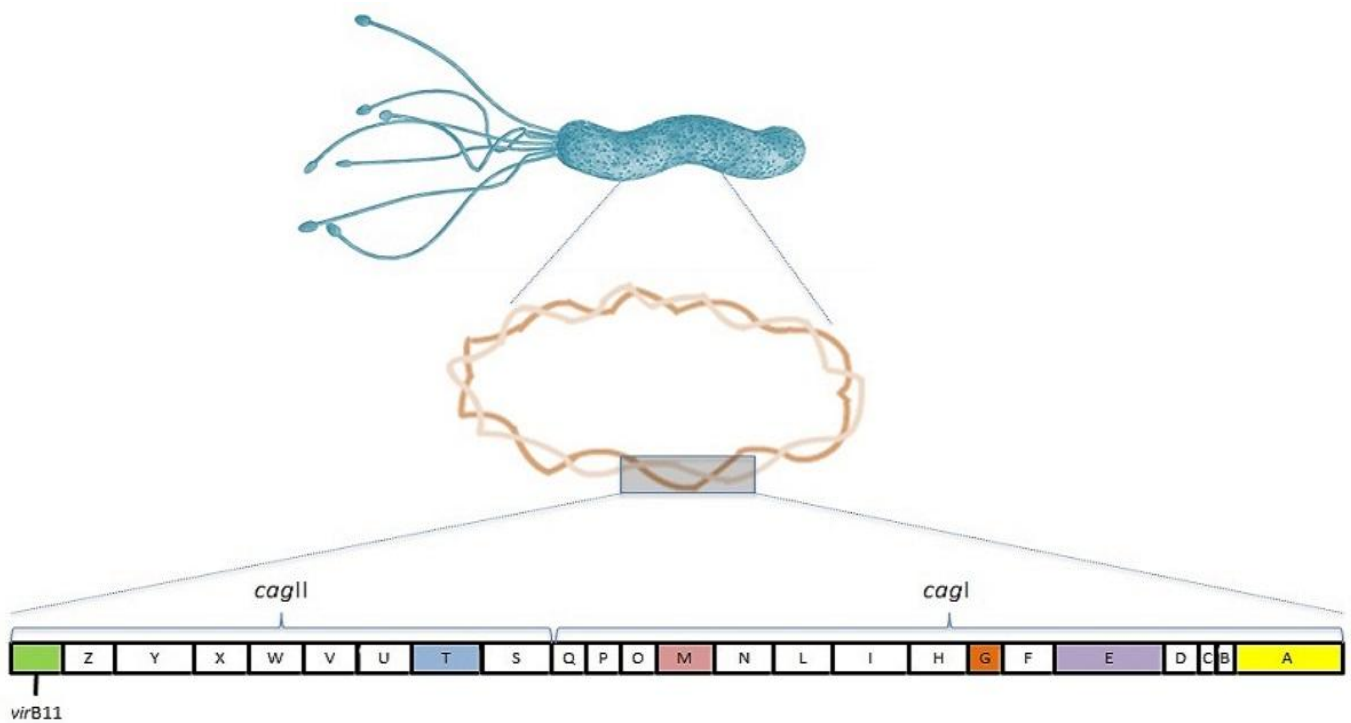
Alguns fatores de virulência de *H. pylori* são frequentemente associados a doenças gástricas mais graves. Estudos mostram que a presença da ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI), bem como da variação alélica do gene *vacA*, estão relacionadas ao desenvolvimento de câncer gástrico (AVILÉS-JIMÉNEZ et al., 2012; WANG et al., 2013; MATOS et al., 2013).



### 2.2.3.1 Ilha de Patogenicidade *cag* (*cag*-PAI)

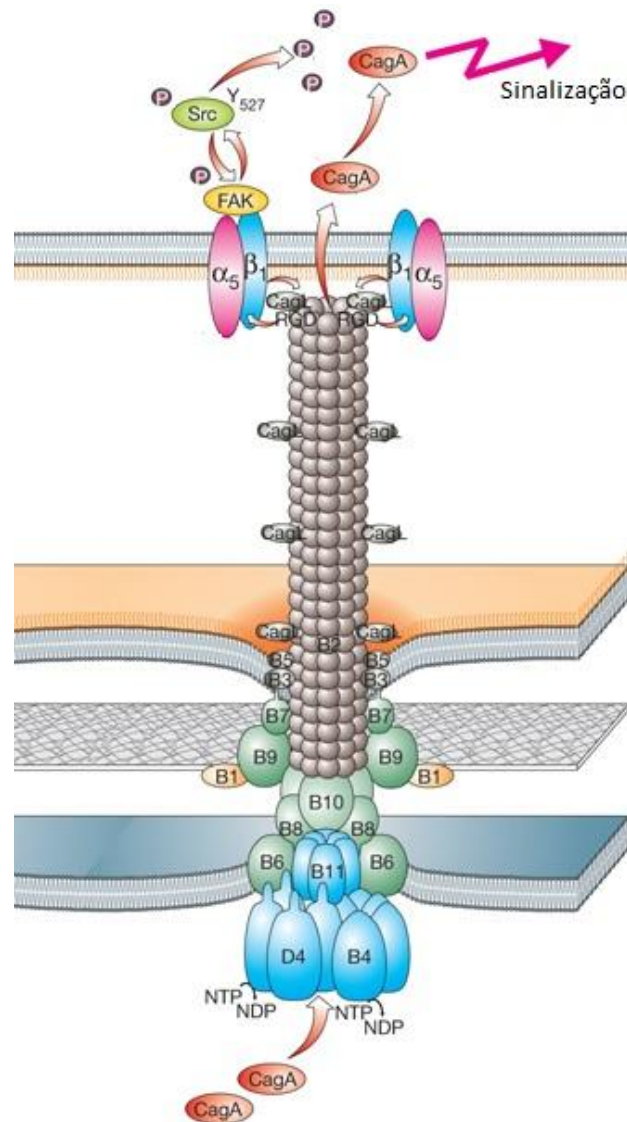
*cag*-PAI constitui uma zona de plasticidade no genoma de *H. pylori*, com segmento de DNA de 40 kb, composta por aproximadamente 31 genes, sendo dividida em duas regiões *cagI* (lado direito) e *cagII* (lado esquerdo) (Figura 6). A maioria desses genes codificam componentes do sistema de secreção tipo IV (SST4) (Figura 7), utilizado pela bactéria para a translocação de produtos bacterianos diretamente para o citoplasma da célula hospedeira, incluindo a proteína CagA (TANAKA et al., 2003) Estudos mostram que, em comparação a cepas com *cag*-PAI parcialmente deletada, as cepas que possuem essa região intacta aumentam em 10 vezes o risco de câncer gástrico em seus hospedeiros (PACCHIANI et al., 2013).

Figura 6 – Representação esquemática da Ilha de patogenicidade *cag*, que mostra as localizações de *cagI* e *cagII*. Em destaque se encontram os genes estudados (direita para esquerda): *cagA*, *cagE*, *cagG*, *cagM*, *cagT* e *virB11*.



Fonte: da Costa et al., 2015.

Figura 7 – Representação esquemática do sistema de secreção tipo IV (SST4) de *Helicobacter pylori*. O SST4 é um complexo formado por várias proteínas, atravessando as membranas interna e externa de *H. pylori*. A proteína VirD4 e os componentes estruturais (VirB1–11) são tipicamente requeridos para a secreção e são posicionados de acordo com as funções propostas para cada um deles. Esse sistema é capaz de secretar substratos, como por exemplo CagA e peptidoglicana.



Fonte: Kwok et al., 2007

A filogenia de *H. pylori* mostra que a maioria dos genes de *cag*-PAI é semelhante aos genes *housekeeping*, indicando que essa ilha de patogenicidade provavelmente foi adquirida apenas uma vez pela bactéria. A presença de *cag*-PAI varia da presença quase universal nas cepas hpEastAsia e hpAfrica1, intermediária na hpEurope até a completa ausência na hpAfrica2. Quando comparada a outras bactérias do mesmo gênero, a ausência de *cag*-PAI parece ser um caráter ancestral. Assim, essa ilha de patogenicidade teria sido

adquirida através de uma transferência gênica horizontal a partir de uma fonte desconhecida, em um momento posterior ao estabelecimento de *H. pylori* no hospedeiro humano (OLBERMANN et al., 2010).

Estudos sobre a integridade de *cag*-PAI mostram que a maioria das cepas mundiais não possui essa ilha íntegra. A conservação de *cag*-PAI é maior naquelas cepas isoladas do Japão e menor nas provindas da Europa e da África (KAUSER et al., 2004). A infecção com uma cepa que contém um grupo mais completo de genes de *cag*-PAI está associada ao desenvolvimento de úlcera, mostrando assim a importância de tais genes no desfecho das doenças gástricas (TALARICO et al., 2009).

❖ Gene *cagA* – localizado na porção direita da ilha, é reconhecido como marcador de *cag*-PAI, que codifica uma proteína (CagA) de 121-145 kDa injetada no citoplasma das células epiteliais gástricas quando ocorre sucesso da infecção por *H. pylori*. Essa proteína atua como um antígeno altamente imunogênico, que interage com proteínas das células hospedeiras, induzindo mudanças morfológicas nessa célula (fenótipo *hummingbird*). A proteína CagA, além de mudanças na estrutura celular, também é responsável pela desregulação da polaridade, da proliferação celular e do processo mitótico, agindo como uma engrenagem na desregulação de múltiplas vias de sinalização celular (MURATA-KAMIYA, 2011). Estudos em roedores mostraram que os animais infectados com cepas de *H. pylori* do tipo selvagem (que possuía *cagA* sem alterações) desenvolveram câncer gástrico, diferentemente daqueles infectados por cepas com *cagA* mutante (FRANCO et al., 2005; 2008). Nos países ocidentais, tem sido reportado que indivíduos infectados com cepas de *H. pylori* que possuem o gene *cagA* têm um maior risco de desenvolver úlcera péptica e câncer gástrico, que aquelas infectadas com cepas *cagA* negativas (VAN DOORN et al., 1998; YAMAOKA et al., 2002). Já nos países do leste asiático, a maioria das cepas de *H. pylori* possui o gene *cagA*, não havendo uma associação clara com alguma doença (SHIOTA et al., 2013).

❖ Gene *cagE* (*virB4*) – também localizado na porção direita de *cag*-PAI, é considerado um melhor marcador de integridade da ilha de patogenicidade que os outros genes *cag* (IKENOUE et al., 2001; SOZZI et al., 2005). Este gene codifica uma proteína transmembrana constituinte do SST4, localizada na membrana interna da bactéria, com função de ATPase, que fornece energia para a montagem do sistema e/ou transporte de

substâncias (KUTTER et al., 2008). Além disso, essa proteína é responsável pela indução da secreção de interleucina 8 (IL-8) pelas células epiteliais gástricas (TUMMURU et al., 1995).

❖ Gene *cagG* – localizado na porção direita da ilha, tem sido relatado como sendo um marcador da região de *cagI*. Esse gene codifica uma proteína de 16 kDa e, diferente de alguns outros presentes em *cag*-PAI, não é um homólogo *vir*, embora tenha fraca homologia com a proteína “*switch*” do motor flagelar (CENSINI et al., 1996; TOMB et al., 1997; HSU et al., 2002). CagG parece ter sua função relacionada com a aderência das cepas a células epiteliais gástricas, além de desempenhar um papel importante na indução da citocina pró-inflamatória IL-8 (FISCHER et al., 2001; MIZUSHIMA et al., 2002; SAITO et al., 2005). Estudos mostram que *cagG* tem sido frequentemente encontrado em diversas doenças gastrointestinais, embora sem relação a uma doença específica (HSU et al., 2002; XU et al., 2003).

❖ Gene *cagM* – também tem sido relatado como sendo um marcador da região de *cagI* (HSU et al., 2002). Alguns estudos revelaram que a proteína codificada por este gene forma uma estrutura de superfície, que atua como o agente indutor do fator nuclear kB (NF-kB), mediando a secreção de IL-8 (FISCHER et al., 2001; SMOLKA et al., 2012). Também está envolvida na repressão da transcrição de H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, inibindo significativamente a secreção de ácido gástrico pelas células. Dessa forma, a expressão de CagM parece representar uma primeira linha de defesa de *H. pylori* contra o ácido gástrico (SAHA et al., 2010; LING et al., 2013). Estudos revelaram que esse gene está associado ao desenvolvimento de gastrite, úlceras pépticas e câncer gástrico (PACHECO et al., 2008; WANG et al., 2013; LAI et al., 2013).

❖ Gene *cagT* (*virB7*) – localizado na porção esquerda de *cag*-PAI, tem sido relatado como sendo um marcador da região de *cagII* (MATTAR et al., 2007). CagT está localizada em ambas as membranas interna e externa, estando relacionada à indução da secreção de IL-8 (na membrana externa) e à facilitação da translocação de CagA para as células hospedeiras, atuando como uma proteína semelhante a chaperona (na membrana interna) (FISCHER et al., 2001; TANAKA et al., 2003; DING et al., 2012). Estudos relatam uma associação entre o gene *cagT* e o desenvolvimento de úlcera péptica (KAUSER et al., 2005; PACHECO et al., 2008; LAI et al., 2013).

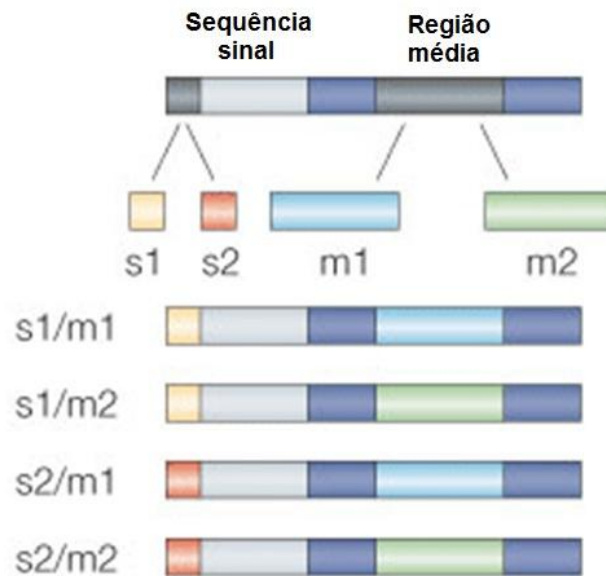
❖ Gene *virB11* – localizado na porção esquerda de *cag*-PAI, este gene codifica uma proteína essencial para a translocação de CagA (FISCHER et al., 2001). Ele também faz parte do SST4 e possui uma estrutura anelar composta de seis unidades monoméricas, exibindo função de ATPase (FRONZES et al., 2009). Embora poucos estudos associem a presença de cepas *virB11* positivas ao desenvolvimento de câncer gástrico, dois desses estudos conseguem demonstrar tal envolvimento na carcinogênese gástrica (LIMA et al., 2010; LIMA et al., 2011).

#### 2.2.3.2 Citotoxina Vacuolizante A (*vacA*)

O gene *vacA* está presente em todas as cepas de *H. pylori* e compreende duas partes variáveis, *s* (localizada no final da cadeia 5' do DNA) e *m* (localizada na região média). Essas duas regiões possuem alelos variáveis: *s* (*s1* ou *s2*) e *m* (*m1* ou *m2*), e a combinação em mosaico desses alelos determina a toxicidade da proteína produzida (Figura 8). Cepas portadoras do genótipo *s1m1* produzem uma proteína que é tóxica para uma maior variedade de tipos celulares, que aquelas *s1m2*. Já as cepas *s2m1* são raras e o produto de cepas *s2m2* virtualmente não possui toxicidade (PAGLIACCIA et al., 1998; LETLEY et al., 2003).

A proteína VacA é secretada no espaço extracelular e é internalizada por endocitose pela célula do hospedeiro. Esta citotoxina induz várias atividades celulares, incluindo a formação de poros nas membranas citoplasmática e mitocondrial, bem como o efluxo de citocromo c, que aumenta a permeabilidade celular, levando à apoptose. Essa proteína também interfere na fagocitose, na apresentação de antígenos, além de inibir especificamente a ativação e a proliferação de células T (SUNDRUD et al., 2004; BASSO et al., 2010).

Figura 8 – Polimorfismo no gene *vacA* de *Helicobacter pylori*. O gene *vacA* possui variações nas regiões sinal (*s1* e *s2*) e média (*m1* e *m2*), normalmente originando dessas combinações três tipos de toxinas: *s1m1*, *s1m2* e *s2m2* (o tipo *s2m1* é raro).



Fonte: Cover; Blanke, 2005 (adaptado)

### 2.2.3.3 Genes de Proteínas de Membrana Externa (*Outer Membrane Proteins* – OMPs)

A adesão de *H. pylori* na mucosa gástrica desempenha um papel importante na colonização inicial e persistência da infecção, assim como na intensidade da resposta inflamatória resultante da infecção (OHNO et al., 2009). Aproximadamente 4% do genoma de *H. pylori* codifica um repertório diverso de OMPs que foram agrupadas em cinco famílias principais (ALM et al., 2000).

❖ Gene *hopQ* – faz parte da maior família de OMPs, a “*Helicobacter outer membrane protein*” (Hop). Esse gene codifica uma proteína de membrana externa que auxilia a adesão das cepas de *H. pylori* nas células epiteliais gástricas, podendo assim desempenhar um importante papel no início da colonização e na persistência da bactéria no estômago (CAO et al., 2005; LOH et al., 2008). O gene *hopQ* está presente em duas formas: tipos I e II, sendo cepas *hopQI* associadas a maiores índices de infiltração de células inflamatórias e atrofia que aquelas com *hopQII* (CAO e COVER, 2002; OHNO et al., 2009).

❖ Gene *oipA* – codifica uma proteína de adesão de aproximadamente 34 kDa (YAMAOKA et al., 2000). O estado funcional de *oipA*, regulado por “*slipped strand mispairing*”, é determinado pelo número de repetições dos dinucleotídeos CT na região 5’ do gene (SAUNDERS et al., 1998). *oipA* em seu estado funcional está associado a doenças gástricas mais graves, como úlcera duodenal e câncer gástrico, além de estar relacionado a uma alta densidade bacteriana, infiltração neutrofílica e altos níveis de IL-8 na mucosa gástrica (KUDO et al., 2004). OipA pode induzir a inflamação através da fosforilação de várias vias de sinalização que usualmente interagem com vias relacionadas a *cag-PAI* (LU et al., 2005; TABASSAM et al., 2008). A inativação de *oipA* resulta em uma diminuição do nível de  $\beta$ -catenina nuclear in vitro e uma menor incidência de câncer em modelos animais, ressaltando a importância desta OMP na virulência de *H. pylori* (FRANCO et al., 2008).

#### 2.2.3.4 Gene de Motilidade *flaA*

A motilidade de *H. pylori*, essencial para o sucesso da colonização gástrica, é conferida por um feixe unipolar composto por 3-5 flagelos. Estes, por sua vez, são constituídos por três elementos estruturais: corpo basal, gancho e filamento, funcionando como um propulsor quando rodado na sua base (GEIS et al., 1989; WROBLEWSKI et al., 2010). O filamento do flagelo de *H. pylori* é composto por duas flagelinas: a maior, FlaA e a menor, FlaB (BLAIR et al., 2003). A mutação de *flaA* resulta na truncagem flagelar e diminuição da motilidade in vitro, estando entre as proteínas essenciais para a infecção persistente em modelos animais (JOSEPHANS et al., 1995; EATON et al., 1996).

### **2.3 Infecção por *Helicobacter pylori*, Inflamação Crônica e Hipermetilação de Promotores Gênicos no Câncer Gástrico**

#### ***2.3.1 O sucesso da colonização por H. pylori leva à infecção persistente e inflamação crônica da mucosa gástrica***

Para que ocorra a colonização da mucosa gástrica, é necessário que *H. pylori* atravesse a camada de muco que protege o epitélio gástrico. Assim, lipases e proteases são sintetizadas para a degradação dessa camada, facilitando esta etapa de colonização. Além disto, *H. pylori* se move facilmente devido à sua morfologia em espiral e aos seus flagelos,

atravessando a camada de muco e estabelecendo íntimo contato com as células epiteliais de revestimento (LADEIRA et al., 2003). Os fatores de aderência contribuem para a sua fixação ao epitélio gástrico, por meio da adesão a moléculas expressas na superfície dessas células, como os antígenos de grupos sanguíneos Lewis b (BOREN et al. 1993; HILL e RODE, 1998). Após essa adesão, a célula epitelial passa a ter contato com uma série de fatores de virulência da bactéria, como o SST4, CagA, VacA, dentre outros produtos bacterianos (O'KEEFFE e MORAN, 2008).

A resposta imune do hospedeiro se inicia através do reconhecimento de peptidoglicano, lipopolissacarídeo (LPS) e flagelina de *H. pylori*, levando à ativação de NF- $\kappa$ B, que por sua vez leva à transcrição de vários genes, incluindo citocinas inflamatórias como a IL-8 (ADEREM et al., 2000; VIALA et al., 2004). As patologias induzidas por *H. pylori* são dependentes das respostas mediadas por células e citocinas do perfil de resposta Th1, uma vez que essa resposta, quando fora de controle, promove uma inflamação crônica e o desenvolvimento de doenças mais graves. Entretanto, a resposta Th1 é a única que confere uma real proteção contra essa infecção (SOMMER et al., 2001; HELLMIG et al., 2003; STOICOV et al., 2004; O'KEEFFE e MORAN, 2008).

A inflamação crônica é acompanhada por um afluxo de neutrófilos e macrófagos, o que gera a liberação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) capazes de causar danos ao DNA. Esse processo é conhecidamente um fator responsável por promover vários tipos de câncer, estando relacionado a aproximadamente 15-20% de todas as doenças malignas humanas. Estudos têm demonstrado que tanto a inflamação por um período prolongado, quanto a presença de uma grande quantidade de ROS são capazes de induzir a metilação aberrante do DNA (NA e WOO, 2014).

### **2.3.2 Metilação do DNA**

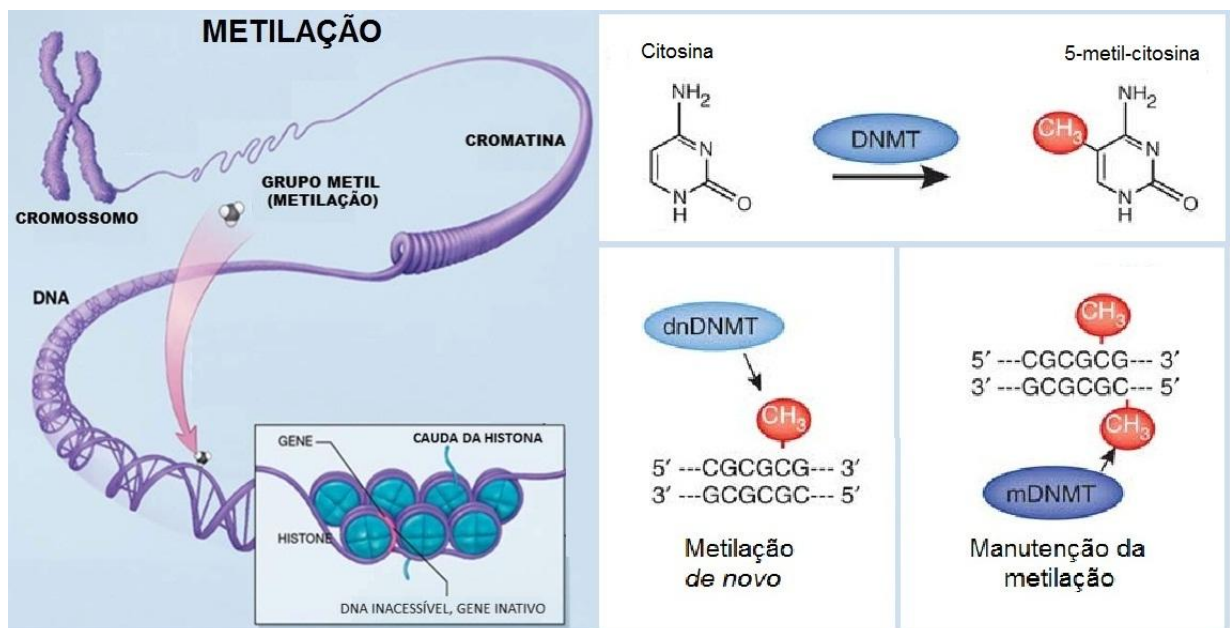
A metilação do DNA é a modificação epigenética mais estudada e consiste em um processo químico reversível que ocorre em regiões do genoma ricas em citosina e guanina, denominadas de ilhas CpG. Essa reação é catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMTs), que adicionam um grupo metil ao carbono de quinta posição do resíduo de citosina presente em um dinucleotídeo CpG. Atualmente, existem três DNMTs estabelecidas: DNMT1, DNMT3a e DNMT3B. DNMT1 está envolvida na manutenção da metilação através da metilação de cadeias recém-sintetizadas de DNA durante a replicação, enquanto DNMT3a e



DNMT3B estão principalmente envolvidas em metilação *de novo* (Figura 9) (JONES e LAIRD, 1999).

As ilhas CpG ficam localizadas quase sempre na região promotora do gene e a sua metilação, embora não altere a informação genética, dificulta a leitura da sequência de DNA, resultando na repressão da transcrição por inativação gênica. Em geral, o aumento da metilação na região promotora de um gene leva à reduzida expressão do gene em questão, enquanto a metilação na região transcrita tem um efeito variável na expressão do gene. Dessa forma, a metilação das ilhas CpG constitui uma das principais vias epigenéticas envolvidas na regulação da transcrição gênica (ROBERTSON, 2005).

Figura 9 – Processo de metilação do DNA, levando à repressão da expressão gênica; e atuação das enzimas DNMTs.



Fontes: bio.davidson.edu; DAY e SWEATT, 2010.

### 2.3.3 *Helicobacter pylori* promove a Metilação do DNA através da inflamação crônica

Embora se saiba que a inflamação causada pela infecção por *H. pylori* pode estimular a metilação, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda não foram completamente estabelecidos. Alguns estudos apontam nas seguintes direções: (1) a interleucina-6, uma das citocinas produzidas na mucosa infectada por *H. pylori*, regula o

promotor DNMT1, aumentando a expressão dessa enzima; (2) *H. pylori*, além de estar diretamente envolvida na indução da inflamação crônica, também é responsável por aumentar a expressão de DNA metiltransferases (DNMTs). Esta superexpressão de DNMTs é capaz de provocar metilação de novo; (3) Produtos de danos, incluindo 5-clorocitosina e 5-bromocitosina, formados in vivo por moléculas reativas mediadas pela inflamação, podem mimetizar 5-metilcitosina e induzir a metilação de novo em ilhas CpG não metiladas anteriormente (YANG et al., 2012).

#### **2.3.4 Hipermetilação de Promotores Gênicos no Câncer Gástrico**

Alguns estudos demonstraram um aumento na metilação de ilhas CpG de vários genes na mucosa de pacientes infectados por *H. pylori* (MAEKITA et al., 2006; CHO et al., 2007). Dentre esses estão os genes *COX-2*, *CDKN2A*, *CDH1*, *MLH1* e *MSH2*.

O gene *COX-2* codifica uma proteína que catalisa a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas, estando envolvido tanto na proliferação celular, quanto no processo inflamatório da mucosa gástrica (PAI et al., 2002; KONTUREK et al., 2005). O aumento da expressão de *COX-2* tem sido relatado durante a carcinogênese gástrica, embora alguns estudos tenham mostrado a hipermetilação desse gene (SONG et al., 2001; HUANG et al., 2006; SILVA et al., 2010).

O gene *CDKN2A*, localizado no cromossomo 9p21, codifica duas proteínas reguladoras do ciclo celular ( $p16^{\text{INK4A}}$  e  $p14^{\text{ARF}}$ ) envolvidas na inibição da progressão desse ciclo, sendo por isso considerado um supressor tumoral. Esse gene é um dos que se encontra mais metilado no câncer gástrico (SILVA et al., 2010; BEN AYED-GUERFALI et al., 2011).

*CDH1* também é um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 16q22.1 que codifica a proteína E-caderina. Essa proteína possui um importante papel na manutenção da diferenciação, polaridade e arquitetura normal da célula (JIANG et al., 2015). A metilação do promotor desse gene leva a uma redução na expressão de E-caderina e, conseqüentemente, a uma disfunção da adesão célula-célula, o que facilita a proliferação, a invasão neoplásica e a metástase (PERL et al., 1998; QU et al., 2013).

Já *MLH1* (homólogo 1 de MutL) e *MSH2* (homólogo 2 de MutS) codificam enzimas participantes do sistema de reparo do DNA “*mismatch repair*” (MMR) cuja função é manter a fidelidade do genoma durante a proliferação celular (GOLOGAN e SEPULVEDA, 2005). A eficiência desse sistema de reparo requer o correto funcionamento dos heterodímeros homólogos de MutL e de MutS, compostos por MLH1–PMS2/MLH1–MLH3 e

MSH2–MSH6/MSH2–MSH3, respectivamente. Uma consequência da deficiência de MMR é a inserção ou deleção de nucleotídeos nas sequências dos microssatélites, causando instabilidade microssatélite (MSI), alteração comumente descrita nos tumores gástricos (VELHO et al., 2014; YAMAMOTO et al., 2015). Assim, a metilação dos promotores gênicos de *MLH1* e *MSH2* representa uma das principais causas de instabilidade microssatélite (MSI), estando associada diretamente à carcinogênese gástrica (GU et al., 2009; FERRASI et al., 2010).

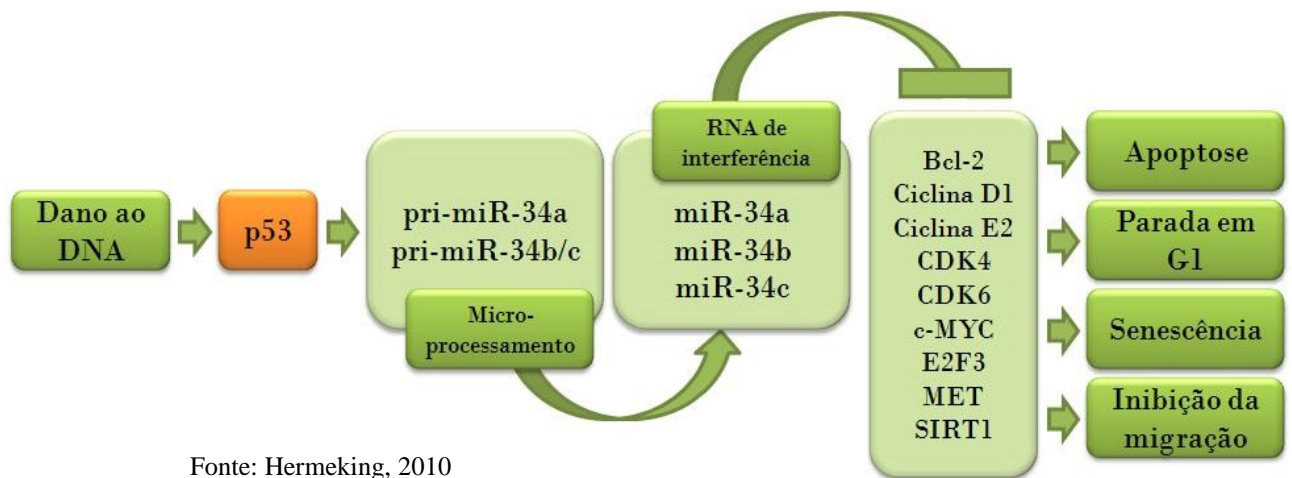
#### **2.4 Metilação do MicroRNA 34b/c e o Câncer Gástrico**

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes (18-25 nucleotídeos de comprimento) que regulam da expressão gênica pós-transcricionalmente através da ligação a sequências na região 3' não-traduzida (UTR) de RNA mensageiros (mRNA). Essa interação resulta na clivagem ou inibição de síntese protéica do mRNA, levando a uma expressão protéica reduzida do gene-alvo (KIM, 2005). Os miRNAs possuem um papel crítico em funções biológicas tais como proliferação celular, apoptose, desenvolvimento neuronal e tumorigênese, podendo funcionar como supressores de tumor ou oncogenes, dependendo do gene alvo (MEOLA et al., 2009; IORIO e CROCE, 2009). miRNAs supressores de tumor geralmente atuam na repressão de genes que promovem o crescimento celular, sendo encontrados regulados negativamente nos tumores (SHARMA et al., 2010).

A desregulação dos miRNAs pode ser causada por vários mecanismos, incluindo deleções, ampliações, mutações no DNA genômico, bem como metilação aberrante de seu promotor. A metilação de miRNAs parece desempenhar um papel importante em seu silenciamento, uma vez que vários miRNAs se apresentaram silenciados por hipermetilação de suas regiões promotoras em vários tipos de câncer, incluindo miR-34b/c (KOZAKI et al., 2008; TAHARA et al., 2013; XIE et al., 2014).

Em mamíferos, a família de miR-34 compreende três miRNAs processados que são codificados por dois genes diferentes: o miR-34a é codificado por um transcrito próprio, enquanto miR-34b e miR-34c possuem um transcrito primário em comum (HERMEKING, 2010). Relatos apontam que membros da família de miR-34 são alvos diretos de p53, e sua regulação positiva induz apoptose e parada do ciclo celular. Semelhante a outros genes-alvo de p53, os miR-34 podem ser importantes alvos para outras vias de sinalização envolvidos no desenvolvimento normal (Figura 10) (HE et al., 2007; TARASOV et al., 2007).

Figura 10 – Família *miR-34* atua como mediador na supressão tumoral através de p53, que ativa o processamento dos *miR-34* primários.



Fonte: Hermeking, 2010

Análises de micro-arranjos revelaram centenas de possíveis genes-alvo de *miR-34*, regulados negativamente por esses miRNAs. A alta similaridade entre os três membros da família *miR-34* sugere que eles possuem os mesmos alvos. Confirmando isso, análises de expressão depois da transfecção em separado de *miR-34a*, *miR-34b* e *miR-34c* mostrou que os mRNAs afetados são quase idênticos. Entretanto, parece haver diferença quanto à afinidade pelos alvos de cada um dos miRNAs (HE et al., 2007). Alguns exemplos são *c-MYC*, *MET* e *BLC-2* (Figura 10).

Estudos com câncer gástrico mostraram que a expressão de *miR-34b/c* em tecidos tumorais é menor que em tecidos não-tumorais adjacentes ao tumor e que a expressão desse miRNA está associada com o status de metilação da sua ilha CpG, sendo regulado negativamente por hipermetilação de seu promotor nos casos de câncer gástrico (SUZUKI et al., 2010; TSAI et al., 2011).

#### 2.4.1 *miRNA 34b/c e a regulação de MET*

Sabe-se que *miR-34b/c* regula negativamente a expressão de *MET*. Esta proteína, por sua vez, é um receptor transmembrana com domínio tirosina-quinase presente na superfície celular, cujo ligante é o fator de crescimento de hepatócitos (HGF). Uma vez ativada, essa via regula a proliferação celular, a apoptose e a migração. A atividade de *MET* é normalmente detectada em estágios bem definidos da embriogênese e organogênese. A ativação da via HGF/*MET* leva a ativação simultânea de múltiplos sinais de vias de

transdução, promovendo a infiltração de células cancerígenas (BOCCACCIO e COMOGLIO, 2006). Tem sido reportado que MET se encontra superexpresso em vários tumores primários humanos, incluindo câncer gástrico, renal, hepático, dentre outros (NOGUCHI et al., 2015). Esse aumento da expressão de MET parece ser regulado, em parte, pela ausência de miR-34b/c, que pode ser regulado através metilação de seu promotor (MIGLIORE et al., 2008).

## 2.5 Polimorfismos de *CDH1* e *MLH1*

Vários polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) no gene *CDH1* estão associados ao câncer gástrico, sendo o *CDH1* -160 C/A (rs16260) aquele mais amplamente estudado. Nesse SNP, o alelo polimórfico -160A diminui a eficiência transcricional em 68% quando comparado ao alelo -160C. A presença do alelo polimórfico diminui a expressão de E-caderina, levando ao aumento da susceptibilidade para câncer gástrico em algumas populações. Assim, esse alelo variante tem sido considerado um potencial marcador genético para a suscetibilidade de câncer (LI et al., 2000; YAMADA et al., 2007).

No câncer gástrico esporádico, entretanto, a influência do SNP -160 C/A não tem se mostrado consistente, pois os resultados encontrados variam de ausência de risco, risco e proteção para o mesmo alelo (WU et al., 2002; KURAOKA et al., 2003; MEDINA-FRANCO et al., 2007). Tal inconsistência está relacionada à etnia das populações estudadas, uma vez que o alelo -160A parece aumentar o risco para câncer gástrico em caucasianos e o reduzir nos asiáticos (GAO et al., 2008; DENG et al., 2014).

Dentre os vários SNPs encontrados no gene *CDH1*, o -347 G/GA (rs5030625) também pode ser destacado. Neste SNP, ocorre a troca de G por GA na posição -347 da região promotora deste gene, estando relacionado a uma diminuição da regulação transcricional (SHIN et al., 2004). Esse polimorfismo também parece estar relacionado ao aumento do risco para o desenvolvimento de câncer gástrico, embora os resultados ainda sejam conflitantes, de acordo com a variação da população estudada (DENG et al., 2014).

Já dentre os polimorfismos de *MLH1*, o localizado na região promotora -93 G/A (rs1800734) tem sido associado a uma diminuição da expressão dessa enzima, através da diminuição da afinidade de ligação de proteínas nucleares, levando a alterações na capacidade de reparo do DNA (MEI et al., 2010). Assim, esse polimorfismo foi relacionado ao risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer, dentre eles o câncer gástrico, em diversas populações. Entretanto, os resultados desses estudos permanecem contraditórios.

Alguns estudos analisam a relação entre a presença dos polimorfismos de -160 C/A de *CDH1* e -93 G/A de *MLH1* ao aumento da metilação dos respectivos genes (LIU et al., 2005; BORGES et al., 2010; MIYAKURA et al., 2014).

### 3. HIPÓTESES

Existe uma relação entre a virulência de cepas de *H. pylori* e os diferentes padrões de metilação dos genes *COX-2*, *CDKN2A*, *CDHI*, *MLH1* e *MSH2* de acordo com o subtipo histológico e localização dos tumores gástricos.

Os polimorfismos localizados nas regiões promotoras de *MLH1* e de *CDHI* influenciam a metilação desses genes.

A expressão de c-MET está relacionada diretamente com o percentual de metilação de miR-34b/c em casos de câncer gástrico, variando de acordo com o subtipo histológico e localização desses tumores.

### 4. OBJETIVO GERAL

Relacionar o status de metilação dos promotores gênicos com o perfil genotípico de cepas de *Helicobacter pylori* quanto aos genes de virulência (*cagA*, *cagE*, *cagM*, *cagG*, *cagT*, *virB11*, *vacA*, *hopQ*, *oipA*, *flaA*), e com polimorfismos dos genes *CDHI* e *MLH1* com parâmetros clínicos e histopatológicos (localização, subtipo histológico e estadiamento TNM) de casos de câncer gástrico, bem como analisar a relação entre a metilação de miR-34b/c à expressão da proteína MET.

#### 4.1 Objetivos Específicos

- ❖ Relacionar o status de metilação dos promotores dos genes *COX-2*, *CDKN2A*, *CDHI*, *MLH1*, *MSH2* a parâmetros histopatológicos de casos de câncer gástrico e ao genótipo de cepas de *H. pylori*, quanto aos genes *cagA*, *cagE*, *cagM*, *cagG*, *cagT*, *virB11*, *vacA*, *hopQ*, *oipA*, *flaA*;
- ❖ Verificar a influência dos polimorfismos -160 C/A e -347 G/GA do gene *CDHI* e -93 G/A do gene *MLH1* na metilação de seus respectivos promotores gênicos e em parâmetros histopatológicos de casos de câncer gástrico, quando associados aos genótipos das cepas de *H. pylori*;
- ❖ Correlacionar a metilação de miR-34b/c à expressão da proteína MET e ambos à parâmetros histopatológicos em casos de câncer gástrico.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Casuística**

Um total de 125 amostras de tumor gástrico foram obtidas a partir de pacientes submetidos a gastrectomias totais ou parciais nos hospitais de Fortaleza: Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (SCMF), Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC) e Hospital Geral de Fortaleza (HGF).

Os espécimes tumorais frescos foram coletados nos centros cirúrgicos dos respectivos hospitais, imediatamente após a gastrectomia, obedecendo às condições ideais de assepsia, de acordo com o protocolo de coleta (Anexo I). As amostras foram retiradas sem comprometimento da investigação histopatológica da rotina hospitalar e, em seguida, foram transportadas rapidamente em compartimento contendo gelo para o Laboratório de Genética Molecular – LABGEM do Departamento de Patologia e Medicina Legal – DPML. Essas amostras foram mantidas em freezer a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o momento da extração do DNA. De cada amostra congelada foram feitos cortes histológicos, com uma espessura de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , corados com Hematoxilina-Eosina e avaliados quanto ao percentual de células tumorais pelo patologista do grupo de pesquisa. Apenas as amostras que continham um percentual maior ou igual a 80% de células tumorais foram dirigidas para a extração do DNA genômico.

### **5.2 Aspectos Éticos**

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob o número de protocolo 326/11 e Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Fortaleza, sob o número 071002/10 (Anexos II e III), observando as normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde de acordo com as resoluções 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05. Foram incluídos neste estudo apenas aqueles indivíduos submetidos à ressecção cirúrgica, que após serem informados sobre a pesquisa, concordaram em participar dela, assinando espontaneamente o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo IV).



### 5.3 Coleta de Dados e Avaliação Histopatológica

Os dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos no momento da entrevista com o paciente e por meio da consulta de prontuários, respectivamente, sendo registrados em fichas de coleta estruturadas (Anexo V).

Os dados histopatológicos, tais como subtipos tumorais e estadiamento, foram extraídos dos laudos patológicos, presentes nos respectivos prontuários.

### 5.4 Extração do DNA de Espécimes Congelados

As amostras tumorais com pelo mais de 80% de células tumorais foram submetidas à extração do DNA genômico de alto peso molecular, utilizando-se o método de extração com CTAB descrito por Foster e Twell (1996). De acordo com este método, fragmentos de aproximadamente 0,5 g foram macerados com auxílio de bastão de vidro esterilizado, em tubo tipo Falcon de 15 mL e, em seguida, adicionou-se o tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA; 100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,2% de 2-Mercaptoetanol), obedecendo-se proporção de 6 mL de tampão de extração para cada 0,5 g de tecido tumoral. Após esta etapa as amostras foram incubadas em banho-maria a 60°C por 16 horas, submetendo os tubos a algumas inversões.

Após a incubação, adicionou-se volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), para purificação, seguido de centrifugação a 2000 rpm por 15 min. Em seguida, a fase superior foi transferida para tubo tipo Falcon estéril de 15 mL e o DNA foi precipitado com 2/3 do volume de isopropanol à 100% e centrifugado a 2000 rpm por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado com NaCl 1 M, para liberação do complexo DNA-CTAB. Em seguida, adicionou-se 2,5 vezes de etanol 100% gelado e centrifugado a 2000 rpm por 5 min. O DNA então foi lavado com etanol 70% e colocado para secar à 37°C. Depois de seco, o DNA foi ressuscitado em 400 µL de água milli-Q estéril com DEPC 0,1% e armazenado em freezer à -14°C.

Para avaliar a qualidade do DNA, cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo e observado sob transluminador de luz ultravioleta. Paralelamente, foi realizada a quantificação do DNA usando um espectrofotômetro NanoDrop<sup>TM</sup> 3300 (Wilmington, DE, USA).

## 5.5 Tratamento do DNA com Bissulfito

O DNA extraído do tecido tumoral foi modificado em uma reação com bissulfito de sódio, com objetivo de se determinar o status de metilação dos genes *COX-2*, *CDKN2A*, *CDH1*, *MLH1* e *MSH2* por PCR metilação específico (MS-PCR) como descrito previamente por Ferrasi et al. (2010).

## 5.6 PCR Específico para Metilação (convencional)

Os iniciadores específicos para as regiões promotoras dos genes estudados estão descritos na tabela 2. As reações de PCR foram feitas com um volume final de 25 µL, contendo 1X do tampão Platinum Taq, 3 mM MgCl<sub>2</sub> (*CDKN2A*, *CDH1*, *MSH2*) ou 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (*MLH1* e *COX-2*), 0,4 mM de cada dNTP, 0,4 mM (*COX-2*, *CDH1*), 0,64 µM (*CDKN2A*), 0,24 mM (*MLH1*) or 1.0 µM (*MSH2*) de cada par de iniciadores, 1 U de Platinum Taq DNA Polimerase<sup>®</sup> (Invitrogen, Foster, CA, USA), e 50 ng de DNA tratado. Água e DNA de linfócitos periféricos de doadores saudáveis foram usados como controles negativos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante, subsequentemente corados por nitrato de prata.

## 5.7 HRM Específico para Metilação

Os iniciadores específicos para a região promotora do miR-34b/c estão descritos na tabela 2. O percentual de metilação desse miRNA foi obtido através da técnica de HRM. A reação de PCR foi feita com o kit EpiTect<sup>®</sup> HRM PCR (Qiagen) com um volume final de 25 µL, contendo 1X EpiTect HRM Master Mix, 0,75 µM de cada iniciador e 10 ng de DNA tratado. A rampa de HRM variou de 75-95°C. Água foi utilizada como controle negativo, enquanto EpiTect<sup>®</sup> PCR DNA Control (Qiagen) foi utilizado para fazer os gradientes de percentual de metilação (0%, 25%, 50%, 75% e 100%).

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores específicos para realização de MS-PCR e HRM

Gene	Oligonucleotídeos Iniciadores		Anelamento (°C)	Produto de PCR (pb)	Referências
	Forward	Reverse			
<i>COX-2</i>	M: TTAGATACGGCGGCGGCGGC	TCTTTACCCGAACGCTTCCG	59	161	Akhtar et al., 2001
	U: ATAGATTAGATATGGTGGTGGTGGT	CACAATCTTTACCCAAACACTTCCA	65	171	
<i>CDKN2A</i>	M: TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACC GCGACCGTAA	70	150	Herman et al., 1996
	U: TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA	70	151	
<i>CDH1</i>	M: TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT	TAACTAAAAATTCACCTACCGAC	57	115	De Schutter et al., 2009
	U: TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTG	CACAACCAATCAACAACACA	53	97	
<i>MLH1</i>	M: TATATCGTTCGTAGTATTCGTGT	TCCGACCCGAATAAACCCAA	66	153	Kang et al., 1999
	U: TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTGT	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	64	124	
<i>MSH2</i>	M: TCGTGGTCGGACGTCGTTT	CAACGTCTCCTTCGACTACACCG	60	157	Fang et al., 2006
	U: GGTTGTTGTGGTTGGATGTTGTTT	CAACTACAACATCTCCTTCAACTACACCA	60	157	
<i>miR-34b/c</i>	M: GGTTGGGAATTGAAGTTTG	CCCAAAAATACCAAACCT	55	-	Vinci et al., 2013

## 5.8 Detecção de *H. pylori* e de seus Genes de Virulência

A detecção da presença de *H. pylori* e de seus respectivos genes foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A tabela 3 mostra as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos de cada reação. Em todas as reações, foram usados como controle negativo um mix de PCR sem amostra de DNA. A presença de *H. pylori* nas amostras estudadas foi detectada pela presença da região interna, específica para *H. pylori*, do gene que codifica a proteína urease (*ureC*) (BICKLEY et al., 1993). A mistura para PCR foi composta por tampão 1X (Tris-HCl 20 mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®; 0,4 mM deoxinucleotídeos trifosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 25 µL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata. Como controles positivos foram utilizados DNAs extraídos de amostras sabidamente positivas para infecção por *H. pylori*.

### 5.8.1 Detecção do Gene *cagA*

O gene *cagA* de *H. pylori* foi amplificado em uma mistura para PCR composta por tampão 1X Go Taq® Flexi DNA Polimerase (Promega); 0,24 mM deoxinucleotídeos trifosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,48 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 12,5 µL. Os produtos gerados foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata.

### 5.8.2 Detecção do Gene *cagE*

O gene *cagE* de *H. pylori* foi amplificado em uma mistura para PCR composta por Master Mix® 1X (Promega), 0,1% Tween 20, 0,48 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 20 µL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

### 5.8.3 Detecção do Gene *virB11*

O gene *virB11* de *H. pylori* foi amplificado em uma mistura contendo 10 µl de Go Taq Master Mix<sup>®</sup> (Promega), 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,3 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 20 µL. Os produtos que foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

### 5.8.4 Detecção do Gene *cagG*, *cagM*, *cagT* e *oipA*

Os genes *cagG*, *cagT*, *cagM* e *oipA* foram amplificados em uma mistura para PCR composta por Top Taq<sup>®</sup> Master Mix 1X (Qiagen), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 20 µL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

### 5.8.5 Presença e Subtipos do Gene *vacA* de *H. pylori*

#### 5.8.5.1 *vacA* s1 e s2

Os subtipos s1 e s2 foram amplificados em uma mesma reação. A mistura para PCR foi composta por tampão 1X (Tris-HCl 20 mM [pH 8,4], KCl 50 mM); 0,1% Tween 20; 1,25 U de Go Taq<sup>®</sup> Flexi DNA Polimerase (Promega); 0,24 mM deoxinucleotídeos trifosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,48 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 12,5 µL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata.

#### 5.8.5.2 *vacA* m1 e m2

Os subtipos m1 e m2 foram amplificados individualmente. Para amplificação do subtipo *m1* a mistura para PCR foi composta por tampão 1X (Tris-HCl 20 mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 0,1% de Tween 20, 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen<sup>®</sup>; 0,2 mM deoxinucleotídeos trifosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 25 µL.

Para a amplificação do subtipo *m2*, foi feita a mistura para PCR contendo tampão 1X (Tris-HCl 20 mM [pH 8,4], KCl 50 mM); 0,1% de Tween 20; 1,25 U de Go Taq<sup>®</sup> Flexi

DNA Polimerase (Promega); 0,25 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,32 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 12,5 μL. Os produtos gerados em ambas as reações foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata.

#### **5.8.6 Detecção do gene *hopQI* e *hopQII***

As variações alélicas do gene *hopQ* (*hopQI* e *hopQII*) foram amplificadas individualmente. A mistura para PCR foi composta por Top Taq<sup>®</sup> Master Mix 1X (Qiagen), 0,6 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 20 μL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

#### **5.8.7 Detecção do Gene *flaA***

A mistura para PCR usada para a amplificação de *flaA* foi composta por 1X Green Master Mix<sup>®</sup> (Promega), com adição de 0,8% de Tween 20, 0,3 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

#### **5.9 Detecção dos polimorfismos de *CDH1* e *MLH1***

Os polimorfismos de *CDH1* -160 C/A, -347 G/GA e *MLH1* -93 G/A foram detectados por PCR-RFLP. A reação de PCR foi realizada em um volume total de 20 μL, contendo aproximadamente 50 ng de DNA genômico, 0,5 μM de cada primer e 1X Top Taq<sup>®</sup> Master Mix (Qiagen). A sequência dos iniciadores e as condições da reação estão mostradas na tabela 4. O mesmo produto de PCR obtido foi submetido a duas digestões enzimáticas distintas com *HincII* (para o SNP -160C/A), *BanII* (para o SNP -347 G/GA) e *PvuII* (*MLH1* -93 G/A). Os produtos das digestões também estão descritos na tabela 4.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores específicos para a amplificação dos genes de *H. pylori*

Gene	Oligonucleotídeos Iniciadores	Anelamento (°C)	Produto de PCR (pb)	Referências
<i>ureC</i>	F – 5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' R – 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3'	55	294	Lage et al., 1995
<i>vacAs1/s2</i>	F – 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3' R – 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	55	259/286	Lima et al, 2011
<b>m1</b>	F – 5'GGTCAAAATGCGGTCATGG3' R – 5'-CCATTGGTACCTGTAGAAAC-3'	55	290	Lima et al, 2011
<b>m2</b>	F – 5'-GGAGCCCCAGGAAACATTG-3' R – 5'-CATAACTAGCGCCTTGCAC-3'	52	192	Lima et al, 2011
<i>cagA</i>	F – 5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3' R – 5'-TTAGAATAATCAACAAACATAACGCCAT-3'	56	297	Lima et al, 2011
<i>cagE</i>	F – 5'-TTGAAAACCTCAAGGATAGGATAGAGC-3' R – 5'-GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC-3'	56	509	Lima et al, 2011
<i>virB11</i>	F – 5'-TTAAATCCTCTAAGGCATGCTAC-3' R – 5'-GATATAAGTCGTTTTACCGCTTC-3'	49	491	Lima et al, 2011
<i>cagG</i>	F – 5'-GCCATGTTAACACCCCCTAG-3' R – 5'-TTAATGCGCTAGAATAGTGC-3'	52	497	Hsu et al., 2002
<i>cagM</i>	F-5'-ACAAATACAAAAAAGAAAAAGAGGC-3' R-5'-ATTTTTCAACAAGTTAGAAAAAGCC-3'	52	587	Hsu et al., 2002
<i>cagT</i>	F-5'- TCTAAAAAGATTACGCTCATAGGCG -3' R-5'- CTTTGGCTTGTCATGTTCAAGTTGCC-3'	52	490	Hsu et al., 2002
<i>hopQI</i>	F-5'- ACGAACGCGCAAAAACCTTTA -3' R-5'- TTGCCATTCTCATCGGTGTA-3'	55	187	Sicinschi et al., 2012
<i>hopQII</i>	F-5'- ACAGCCACTCCAATCCAGAA -3' R-5'- AACCCACCGTGGATTTTAG-3'	55	160	Sicinschi et al., 2012
<i>flaA</i>	F-5'-TTCTATCGGCTCTACCAC-3' R-5'-CTGACCGCCATTGACCAT-3'	55	508	Göttke et al., 2000
<i>oipA</i>	F-5'-CAAGCGCTTAACAGATAGGC-3' R-5'-GCTTCACGAGAAAACGCCTT-3'	55	894	Yamaoka et al., 2000

Tabela 4 – Oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação de CDH1 e MLH1 e detecção dos respectivos polimorfismos.

<b>CDH1</b>	<b>Primers (5'→3')</b>	<b>Anelamento (°C)</b>	<b>Produto de PCR (bp)</b>
<b>F</b>	GCCCCGACTTGTCTCTCTAC	61	446
<b>R</b>	GGCCACAGCCAATCAGCA		
<b>MLH1</b>			
<b>F</b>	AGTAGCCGCTTCAGGGA	50	259
<b>R</b>	CTCGTCCAGCCGCCGAATAA		
<b>Produtos de Restrição Enzimática</b>			
<b>CDH1 -160C/A</b>	C/C	C/A	A/A
	446 pb	446, 368 e 78 pb	368 e 78 pb
<b>CDH1 -347G/GA</b>	G/G	G/GA	GA/GA
	263, 115 e 68 pb	331, 263, 115 e 68 pb	331 e 115 pb
<b>MLH1 -93 G/A</b>	G/G	G/A	A/A
	134 e 125 pb	259, 134 e 125 pb	259 pb

### 5.10 Detecção da expressão de c-MET

A expressão da proteína c-MET foi detectada através da técnica de imunohistoquímica. As lâminas passaram pelas etapas de desparafinização e hidratação. Depois disso, foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato 10mM, pH 6,0, por 3 minutos e 40 segundos na Pascal. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10V, por 10 minutos. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C com o anticorpo primário Met (D1C2) XP<sup>®</sup> Rabbit mAb (diluição 1:300; Cell Signaling Technology). A reação foi detectada com o kit comercial MACH 4 Universal - sistema de detecção HRP-polímero (Biocare Medical), de acordo com as recomendações do fabricante. Casos de carcinoma renal foram utilizados como controle positivo.

A avaliação da imunohistoquímica foi realizada utilizando microscopia de luz direta. A expressão da proteína foi quantificada por contagem manual de no mínimo 300 células tumorais em 5 campos diferentes em um aumento de 400x. Como ainda não existe um sistema validado para a marcação de c-MET, utilizaram-se dois critérios para avaliação. O primeiro deles considerou como positivos aqueles casos com 50% ou mais de células positivas (marcação citoplasmática ou membranar), independente da intensidade de marcação; e/ou marcação de moderada ou forte intensidade, com mais de 10% de células positivas. O segundo critério adotado foi o H-score, no qual o nível individual de intensidade de marcação (0 a 3+) foi multiplicado pelo percentual de células positivas (0-100%) e todos os valores foram somados para obter o H-score final, que variou de 0 a 300 (XU et al., 2015).



### 5.11 Análises Estatísticas

Além da análise descritiva dos dados, utilizou-se o programa SPSS<sup>®</sup> versão 15.0 (Chicago, IL, USA) para a realização das demais análises estatísticas. Utilizou-se a correlação de Spearman para a análise de correlação entre as variáveis estudadas. A significância das diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou teste exato de Fisher. Foi feita a análise de árvore de decisão para relacionar os fatores de virulência de *H. pylori* e o status de metilação dos genes estudados. Este método usa particionamento binário recursivo em que as observações são repetidamente bifurcadas em "nós", com base nos parâmetros considerados para prever os resultados que, no presente estudo foi o status metilado ou não-metilado. O software WEKA foi usado para avaliar todas as variáveis possíveis e selecionou a melhor variável sobre a qual se dividir. O algoritmo J48 disponível ao WEKA foi usado para os experimentos. Nesta análise, foram considerados seis parâmetros variáveis (*cagA*, *cagE*, *virB11*, *cagG*, *cagT*, *cagM*) para a seleção no processo de construção da árvore. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de *p* era menor que 0,05.

## 6. RESULTADOS

A análise dos resultados possibilitou a elaboração de um artigo científico, que visa testar as duas primeiras hipóteses apresentadas. Tabelas com dados clínicos e resultados omitidos no artigo estão apresentadas no Apêndice B.

### 6.1 Artigo I

**Concomitance of Genes Methylation in Gastric Cancer: its importance in histopathological features and association with *Helicobacter pylori* virulence genes**

*Authors:* Débora Menezes da Costa<sup>1</sup>, Msc; Eliane dos Santos Pereira<sup>1</sup>, Msc; Maria Inês de Moura Campos-Pardini<sup>2</sup>, PhD; Silvia Helena Barem Rabenhorst<sup>1</sup>, PhD.

*Affiliations:*

<sup>1</sup> Department of Pathology and Forensic Medicine, Federal University of Ceará, Brazil.

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, State University Júlio de Mesquita Filho – UNESP, São Paulo, Brazil

## ABSTRACT

Gastric cancer is a serious health problem. Several risk factors have been identified to contribute to its development, such as virulence genes of *H. pylori*, SNPs in host's key genes and epigenetic events. The aim of this study was to investigate the relationship between genes methylation in gastric cancer, its association with *H. pylori* virulence genes, and verify the influence of *CDHI* and *MLHI* SNPs in the methylation status. The promoter genes methylation was assessed by MS-PCR. *H. pylori* genes were detected by PCR and SNPs, by PCR-RFLP. The genes of higher and lower methylation frequency were *MSH2* and *MLHI*, respectively. Patients aged  $\geq 50$  had *CDHI* more frequently methylated than those younger. The *MLHI* gene was significantly less methylated in cardia tumors. As for the TNM, the *CDHI*-M gene was associated with advanced tumor extension, even when subdivided by subtype, since same association has been shown in tumors of intestinal subtype. Already the combination *CDKN2A*-M/*MLHI*-U was associated with absence of distant metastases. Taking into account the virulence genes of *H. pylori*, it was seen that patients infected *vacAm1*+ or *cagG*+ strains had a higher frequency of *CDKN2A*-U *vacAs1* + was associated with *COX-2*-U and *CDHI*-U, while *hopQII* with *MLHI*-U. Patients infected with *cagE*+ and *virB11*+ strains had higher frequency of *MSH2*-M. It was also observed that less virulent strains tended to non-methylation for *CDHI* and *MLHI* genes. The classification trees made according to the histological subtype, showed that in tumors of diffuse subtype *cagE*+ and *virB11* + strains (separately or together) were also attached to a methylator character of some of the analyzed genes. Already strains *virB11*+*cagA*+ did not lead to methylation in two genes. In intestinal subtype tumors was not observed a pattern having a variation in the combinations of *H. pylori* genes leading to the methylation. In conclusion, the methylation status of the studied genes appear to be dependent on the tumor location and is also related to the TNM staging and tumor subtype. In addition, more virulent *H. pylori* strains may be involved in this process by increasing inflammatory response leading to methylation of these genes.

**Keywords:** Methylation, *Helicobacter pylori*, Gastric cancer, Repair enzymes, E-cadherin

## INTRODUCTION

Gastric cancer is the fifth most common cancer and the third cause of death worldwide. Developing countries contribute with more than 70% of the cases, making this disease a serious health problem (1). Gastric cancer is a multifactorial disease that has as its major environmental factor the infection by *Helicobacter pylori*. Even though *H. pylori* is classified as a group I carcinogenic agent (WHO/IARC) and infects more than half the world's population, only 0.5–2% of the infected people develop gastric cancer (2).

Several genetic risk factors have been identified to contribute to gastric cancer development, such as virulence genes of *H. pylori* (genes of *cag*-PAI island, motility and adhesion), single nucleotide polymorphisms (SNPs) in host's key genes and epigenetic events. However, the carcinogenic process triggered by *H. pylori* is still not well understood (3-5).

Aberrant DNA methylation is a relevant change in the carcinogenic process of the stomach and it is associated with chronic inflammation as a consequence of an infection caused by *H. pylori* (6). DNA methylation is the major epigenetic process involved in the transcriptional repression of specific genes, leading to the gene silencing. Thus, it is widely accepted that the hypermethylation of promoters of tumor suppressor genes participates in tumorigenesis (7).

Several genes are common targets of promoter CpG islands methylation in cancer (8). *COX-2* (inflammation), *CDKN2A* (cell cycle regulation), *CDHI* (intercellular adhesion), *MLH1* and *MSH2* (mismatch repair pathway) are genes that are reported to be methylated in gastric cancer.

The *COX-2* gene, located on the 1q25.2-q25.3 chromosome, encodes an enzyme which catalyses the conversion of arachidonic acid to prostaglandins, which mediate cell signaling and are involved in the inflammation process (9). An increased expression of *COX-2* has been related to gastric carcinogenesis, but some studies have shown a promoter hypermethylation of this gene (10-12).

The *CDKN2A* gene, located on the 9p21 chromosome, encodes for the p16<sup>INK4A</sup> protein and its alternate reading frame p14<sup>ARF</sup>. Both are involved in the cell cycle negative regulation via pRb and p53, respectively, inhibiting progression to the next cell cycle phase. This gene is one of the most methylated tumor suppressor genes present in gastric cancer (12,13).

The *CDHI* gene is a tumor suppressor gene located on the 16q22.1 chromosome that codifies E-cadherin. This protein has an important role in the maintenance of differentiation,

cellular polarity and cellular normal architecture (14). The promoter methylation of this gene leads to a reduced expression of E-cadherin, and consequently, to a dysfunction of cell-cell adhesion, which facilitates proliferation, neoplastic invasion and metastasis (15). This gene has two polymorphisms at positions -160 C/A (rs16260) and -347 G/GA (rs5030625) that are known to reduce its transcriptional activity (16,17). A relationship between the polymorphic allele and the hypermethylation pattern of the promoter region of *CDHI* was observed in one study with gastric cancer patients with the *CDHI*-160 C/A SNP (18). The involvement of these SNPs with susceptibility to gastric cancer is discordant in the literature (19).

*MLH1* (human MutL homolog 1) and *MSH2* (human MutS protein homolog 2) are genes located on the 3p21.3 and 2p21 chromosomes, respectively. These enzymes participate in DNA mismatch repair (MMR) system, correcting DNA base mismatches left uncorrected by DNA polymerase, being essential for replication fidelity. The efficient DNA MMR requires the function of MutL and MutS homologues, working as heterodimers, in which MutL homologues are composed by MLH1-PMS2, MLH1-PMS1 and MLH1-MLH3 and MutS homologues by MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 (20). Cells with deficient MMR can present insertion or deletion of nucleotide bases at microsatellite sequences causing microsatellite instability (MSI), which is a phenomenon described in gastric adenocarcinoma (21). Promoter methylation of *MLH1* and *MSH2* represents a major cause of microsatellite instability (MSI) and had been previously reported in gastric cancer (22,23). *MLH1* methylation was also found associated with SNP -93 G/A (rs1800734) in colorectal cancer (24).

As it is pointed out, some of the methylation status of the genes above described have controversial results. Some are barely explored and have clinical and histological characteristics, except for the *CDHI* gene, which is not considered. Based on this fact, the present study aimed to investigate the relationship between the methylated genes in gastric cancer and its association with *H. pylori* virulence genes. In addition, the influence of the *CDHI* and the *MLH1* SNPs in the methylation status was verified.

## MATERIAL AND METHODS

### *Clinical Specimens*

The present study was approved by the Hospital Ethics Committee of the Federal University of Ceará, Brazil, and all subjects signed and filled a consent form before inclusion. A total of 125 adenocarcinoma samples included in this study were obtained from patients who had undergone gastrectomy at the University Hospital Walter Cantídio, at Santa Casa de Misericórdia and at Hospital Geral, all located in Fortaleza (Ceará – Brazil). Histological and clinical data of gastric cancer cases were obtained from histopathological records and reviewed by a pathologist of the team.

### *DNA extraction*

Genomic DNA was extracted from frozen tumor tissue using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) technique, adapted from Foster and Twell (25). The DNA extraction was done only in fragments that showed more than 80% of tumor cells. DNA quality was analyzed by 1% of agarose gel electrophoresis, and quantity was determined using the NanoDrop® 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA).

### *DNA Bisulfite Modification and Methylation-Specific PCR*

Extracted DNA of tumor tissue was modified by sodium bisulfite to determine the methylation status of the *COX-2*, *CDKN2A*, *CDH1*, *MLH1* and *MSH2* genes by MS-PCR as previously described by Ferrasi et al. (23). The primers targeted to the studied promoter gene regions are described in Table I. PCR was performed in a 25µL reaction volume, containing 1x Platinum Taq buffer, 3.0mM MgCl<sub>2</sub> (*CDKN2A*, *CDH1*, *MSH2*) or 1.5mM MgCl<sub>2</sub> (*MLH1* and *COX-2*), 0.4mM of each dNTPs, 0.4mM (*COX-2*, *CDH1*), 0.64µM (*CDKN2A*), 0.24mM (*MLH1*) or 1.0µM (*MSH2*) of each primer set, 1U of Platinum Taq DNA Polymerase® (Invitrogen, Foster, CA, USA), and 50ng of treated DNA. Water and DNA from peripheral lymphocytes of healthy donors were used as negative controls. The PCR products were separated in 6% of non-denaturing polyacrylamide gel and subsequently submitted to silver staining.

Table I. PCR primer sets, annealing temperature and size of PCR products used for MS-PCR

Gene	Primer		Annealing (°C)	PCR product (bp)	Reference
	Forward	Reverse			
<i>COX-2</i>	M: TTAGATACGGCGGGCGGGC	TCTTTACCCGAACGCTCCG	59	161	26
	U: ATAGATTAGATATGGTGGTGGTGGT	CACAATCTTTACCCAAACACTTCCA	65	171	
<i>CDKN2A</i>	M: TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACC GCGACCGTAA	70	150	27
	U: TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA	70	151	
<i>CDH1</i>	M: TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT	TAATAAAAATTCACCTACCGAC	57	115	28
	U: TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTG	CACAACCAATCAACAACACA	53	97	
<i>MLH1</i>	M: TATATCGTTCGTAGTATTCGTGT	TCCGACCCGAATAAACCCAA	66	153	29
	U: TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	64	124	
<i>MSH2</i>	M: TCGTGGTCGGACGTCGTTTC	CAACGTCTCCTTCGACTACACCG	60	157	30
	U: GGTTGTTGTGGTTGGATGTTGTTT	CAACTACAACATCTCCTTCAACTACACCA	60	157	

#### Genotyping of *CDH1* and *MLH1* Polymorphisms

The genetic polymorphisms of *CDH1* -160 C/A, -347 G/GA and *MLH1* were detected by PCR-RFLP. PCR was carried out in a total volume of 20µL, containing 50ng genomic DNA, 0.5µM (*CDH1*) and 0.4µM (*MLH1*) of each primer and 1X Master Mix (Promega Madison WI). The primers and PCR conditions used are given in Table II. The same PCR product was submitted to enzyme digestion with *HincII* (*CDH1* -160 C/A), *BanII* (*CDH1* -347 G/GA), separately, and *PvuII* (*MLH1* -93 G/A). The digestion products are also described in Table II.

**Table II. PCR primer sets and restriction used for genotyping *CDHI* and *MLHI* SNPs**

<i>CDHI</i>	Primers (5'→3')	Annealing (°C)	PCR product (bp)
<b>F</b>	GCCCCGACTTGTCTCTCTAC	61	446
<b>R</b>	GGCCACAGCCAATCAGCA		
<b><i>MLHI</i></b>			
<b>F</b>	AGTAGCCGCTTCAGGGA	50	259
<b>R</b>	CTCGTCCAGCCGCCGAATAA		
<b>Restriction Products</b>			
<b><i>CDHI</i> -160C/A</b>	C/C 446bp	C/A 446, 368 and 78 bp	A/A 368 and 78 bp
<b><i>CDHI</i> -347G/GA</b>	G/G 263, 115 and 68 bp	G/GA 331, 263, 115 and 68 bp	GA/GA 331 and 115 bp
<b><i>MLHI</i> -93 G/A</b>	G/G 134 and 125 bp	G/A 259, 134 and 125 bp	A/A 259 bp

#### *Detection of H. pylori infection and genotyping virulence genes*

*H. pylori* infection was detected by means of the amplification of the *ureC* gene using primers for PCR, as described by Lima et al. (31) For the *H. pylori*-positive samples, the *vacA* alleles and *cagA*, *cagE* and *virB11* genes were identified by PCR according to Lima et al. (31), *cagT*, *cagG*, *cagM* (32), *hopQ* (33), *flaA* (34) and *oipA* (35).

#### *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 ( $\chi^2$ ) or Fisher's exact test. For the total of samples, we performed the decision tree analysis to relate *H. pylori* virulence genes and methylation status. This method uses binary recursive partitioning whereby observations are repeatedly bifurcated into "nodes", based on the considered parameters factors for predicting outcome, which in this study was methylated or unmethylated status. WEKA software was used to evaluate all potential variables, and selected the best variable on which to split. Particularly, the J48 algorithm available at WEKA was used for our experiments. In this analysis, it was considered six parameters variables (*cagA*, *cagE*, *virB11*, *cagT*, *cagG*, *cagM*) for selection in the tree building process. Three folds were used for pruning. The results were considered statistically significant when the p-values were less than 0.05.



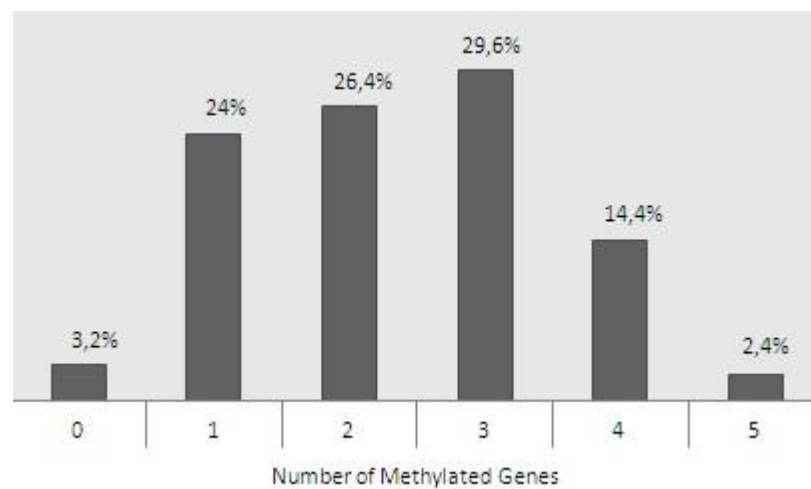
## RESULTS

### *Patients and Sample Characterization*

Among the 125 gastric adenocarcinoma samples collected the median age was 63.5 years old. The intestinal subtype was slightly more frequent than diffuse subtype (54.4% vs 45.6% respectively) and non-cardia region was the predominant tumor location (76.8%). Most tumors were in advanced stages, with only 12.8% were classified as stage I. The genotypic distributions of both *CDHI* and *MLHI* SNPs were in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium and their frequencies were: *CDHI* -160 C/A: 53.2% C/C, 37.1% C/A and A/A 9.7%; *CDHI* -347: G/GA, 63% G/G, 31% G/GA and 6% GA/GA; *MLHI* G/G 58.9%, G/A 34.7% and A/A 6.5%.

*MSH2* was the most frequent promoter gene methylated (82.4%), followed by *COX-2* (52.8%), *CDHI* (40%), *CDKN2A* (39.2%) and *MLHI* (20.8%). Figure 1 shows the distribution of the cases according to the number of methylated genes. It is important to note that only 14 (11.2%) samples presented *MLHI* and *MSH2* unmethylated. The concomitance of 3 methylated genes was the most frequent group (29.6%) with *COX-2/MSH2/CDHI* and *COX-2/MSH2/CDKN2A* were the most frequent combinations. Taking age into account, using a cutoff of 50 years old, patients diagnosed at age  $\geq 50$  years old had higher frequency of *CDHI* promoter methylation than patients diagnosed at age  $< 50$  years old ( $p=0.028$ ).

**Figure 1. Distribution according to the number of methylated genes.**



### *Polymorphisms and Methylation of CDH1 and MLH1*

No relationship was found between the presence of the *CDH1* SNPs (-160C/A and -347 G/GA) even when the genotypes of the SNPs were combined. When the *MLH1* SNP was analyzed, a tendency of association was found between the GA genotype and *MLH1* unmethylation ( $p=0.064$ ). No significant results were found between the genotypic distribution of *CDH1* and *MLH1* SNPs regarding histological subtypes and tumor location.

### *Relationship between Promoter Methylation and histological subtypes and tumor location*

No significant differences were found when the methylation status was crossed with the histological subtypes, even when the genes were analyzed in combination. Otherwise, it was observed that tumors located in the cardia region *MLH1* were significantly less methylated than these located in the non-cardia region ( $p=0.035$ ) (Table III).

**Table III. Distribution of promoter gene methylation according to tumor subtype and location. M= methylated; U= unmethylated**

		Intestinal N (%)	Diffuse N (%)	X <sup>2</sup>	p		Cardia N (%)	Non-cardia N (%)	X <sup>2</sup>	p
<i>CDKN2A</i>	M	28 (41.2)	21 (36.8)	0.24	0.621	M	14 (48.3)	35 (36.5)	1.31	0.253
	U	40 (58.8)	36 (63.2)			U	15 (51.7)	61 (63.5)		
<i>MLH1</i>	M	13 (19.1)	13 (22.8)	0.26	0.612	M	2 (6.9)	24 (25)	4.43	<b>0.035*</b>
	U	55 (80.9)	44 (77.2)			U	27 (93.1)	72 (75)		
<i>COX-2</i>	M	33 (48.5)	33 (57.9)	1.09	0.296	M	15 (51.7)	51 (53.1)	0.03	0.894
	U	35 (51.5)	24 (42.1)			U	14 (48.3)	45 (46.9)		
<i>CDH1</i>	M	27 (39.7)	23 (40.4)	0.01	0.941	M	14 (48.3)	36 (37.5)	1.08	0.299
	U	41 (60.3)	34 (59.6)			U	15 (51.7)	60 (62.5)		
<i>MSH2</i>	M	57 (83.8)	11 (80.7)	0.21	0.648	M	24 (82.8)	79 (82.3)	0.00	0.953
	U	46 (16.2)	11 (19.3)			U	5 (17.9)	17 (17.7)		

### *Relationship between Promoter Methylation and TNM staging*

Among the methylated promoter genes, only *CDH1* promoter methylation was associated with advanced extension (T3 and T4) of the primary tumor ( $p=0.049$ ). However, when the genes were combined, an association between *CDKN2A-M/MLH1-U* and the absence of distance metastasis ( $p=0.019$ ) was found. When the cases were classified

according to subtype, intestinal subtype tumors also presented a hypermethylation of *CDHI* associated with advanced extension (T3 and T4) of the primary tumor ( $p=0.016$ ).

*Relationship between Promoter Methylation and the presence of H. pylori virulence genes*

Almost all samples were *H. pylori*-positive (116/125; 92.8%). Among these, 65.5% (76/116) were *cagA*+, 51.7% (60/116) *cagE*+, 59.5% (69/116) *virB11*+, 86.2% (100/116) *vacA* s1, 70.7% (82/116) *vacA* m1, 68.9% (80/116) *vacA* s1m1, 75.8% (88/116) *cagT*+, 60.3% (70/116) *cagG*+, 67.2% (78/116) *cagM*+, 67.2% (78/116) *hopQI*, 32.7% (38/116) *hopQII*, 51.7% (60/116) *flaA*+, and 95.7% (111/116) *oipA*+

When the promoter methylation of the studied genes was analyzed, it was observed that the presence of some *H. pylori* genes was associated with the absence of methylation and some with the methylation of the studied genes. Patients infected with *H. pylori vacAm1*+ or *cagG*+ had higher frequency of unmethylated *CDKN2A* ( $p=0.034$  and  $p=0.010$ , respectively), *vacAs1*+ was associated with *COX-2* and *CDHI* unmethylated genes ( $p=0.031$ ) and *hopQII* with *MLH1* unmethylated ( $p=0.032$ ) gene. On the other hand, patients carrying *cagE*+ and *virB11*+ strains had higher frequency of *MSH2* methylation ( $p=0.026$  and  $p=0.052$ , respectively).

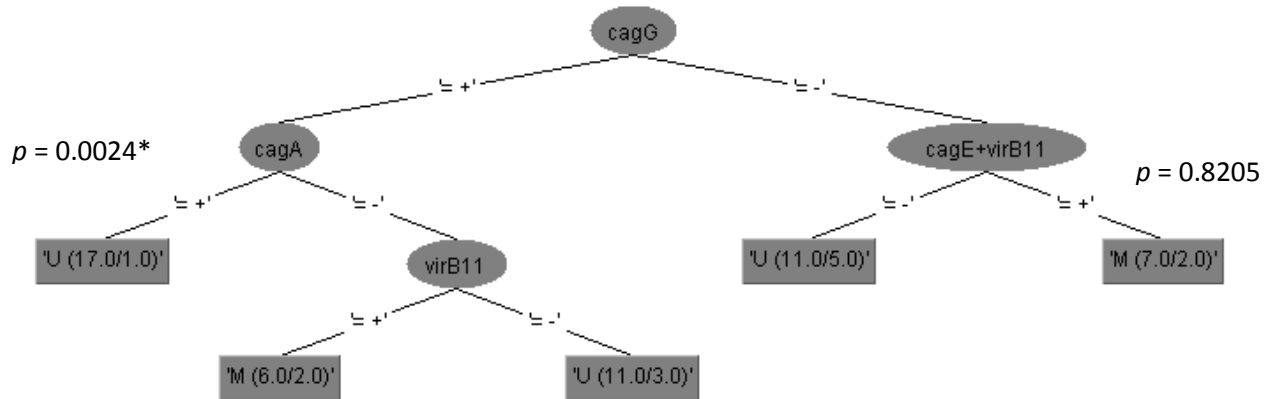
Considering *H. pylori* virulence, the strains were grouped in more and less virulent groups, using as division criteria for the *vacA* alleles (s1/s2) and the *cag*-PAI integrity – focused on *cagA*, *cagE* (*cagI* region) and *virB11* (*cagII* region) genes. The high virulence group was composed by *vacAs1* strains with at least one gene of *cag*-PAI and *vacAs2* strains with all *cag*-PAI genes cited above. The low virulence group was considered as those *vacAs1* and *vacAs2* strains without *cag*-PAI genes and *vacAs2* strains with the presence of genes of *cagI* or *cagII* regions. From this analysis, it was observed that the less virulent strains presented a tendency to low methylation of *MLH1* and *CDHI* genes ( $p=0.058$  and  $p=0.057$ , respectively).

The data were also analyzed using classification trees, whose purpose is to separate the best possible observations which belong to a class of those who belong to another class through a sequence of binary separations data. The trees were made according to the histological subtype to identify genes of *H. pylori cag* pathogenicity island that could be associated to the methylated status of the genes analyzed. Due of the high percentage of methylation found, *MSH2* gene did not generate any trees.

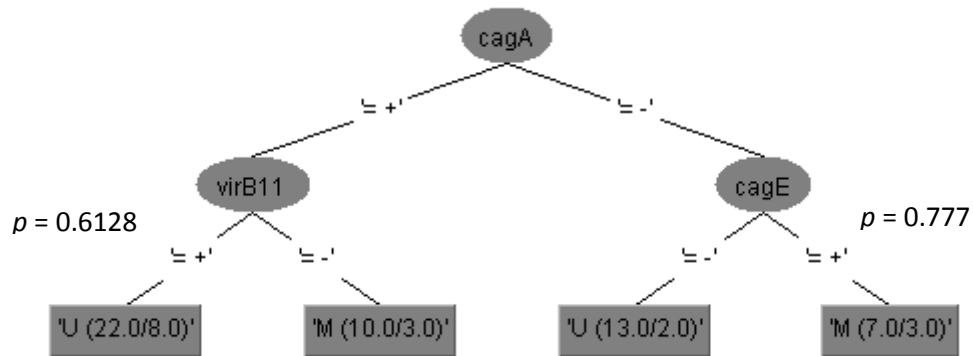
In general, *H. pylori* genes that contribute to methylation status are dependent on the histological subtype and the analyzed the gene. In diffuse subtype, some patterns were

observed, strains *cagE*+ or *virB11*+ (separately or together) were associated with a methylator profile. Interestingly, the presence of *virB11*+*cagA*+ strains was not associated with methylation for 2 of 4 genes (Figures 2-5). For tumors of intestinal subtype, the majority of *H. pylori* genes studied showed to be involved in the methylation status but it was dependent of the gene target and no consistence was observed.

**Figure 2. Classification tree of *CDKN2A* gene in diffuse gastric tumors**



**Figure 3. Classification tree of *CDH1* gene in diffuse gastric tumors**



**Figure 4. Classification tree of *COX-2* gene in diffuse gastric tumors**

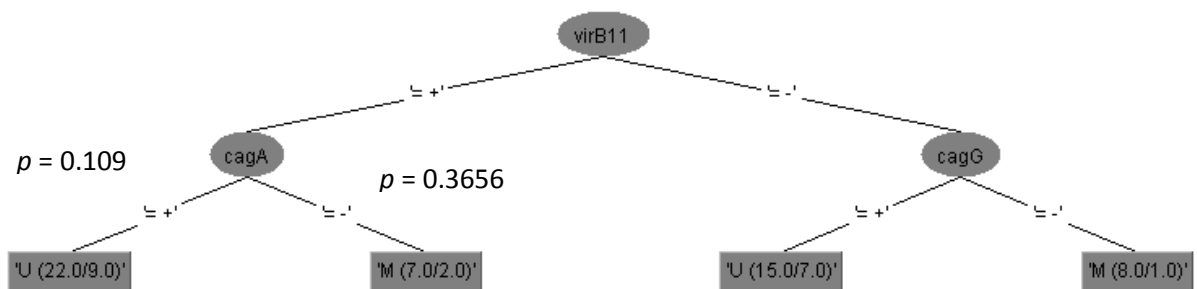
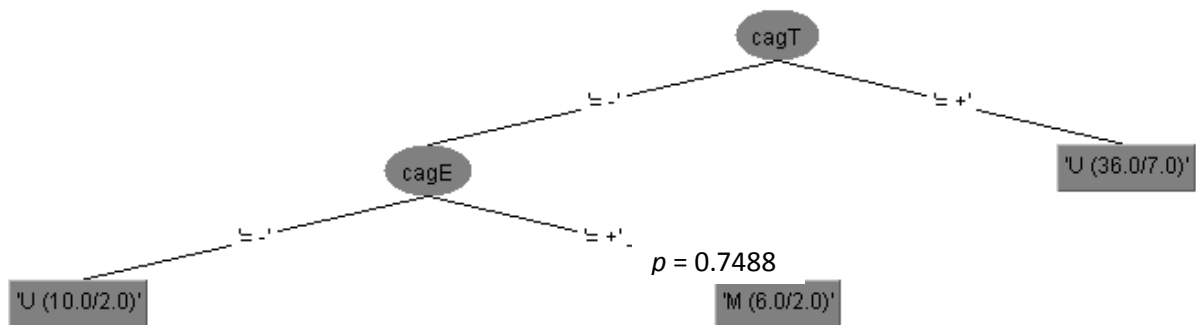


Figure 5. Classification tree of *MLH1* gene in diffuse gastric tumors



## DISCUSSION

Several tumor-related genes are silenced or down-regulated by aberrant promoter methylation in the tumors' development, including gastric cancer. The knowledge about methylation status of some key-genes in gastric carcinogenesis seems to be important to identify specific markers for diagnosis, treatment and prognosis. The present study brings up the methylation status of five genes usually methylated genes in gastric cancer analyzed in concomitance addressing the different aspects of these tumors (36). Besides, this study analyzed the methylation status of *MSH2* that is poorly covered by the literature, counting with only few other studies, which do not show a consensus in gastric cancer (22, 37-40). In addition, this study clarified the relation between the *CDH1* and *MLH1* SNPs and the methylation of these genes.

When the methylation status of genes was assessed *MSH2*, *COX-2* and *CDH1* were the genes which were found methylated more frequently. It drew attention the high frequency of *MSH2* promoter gene methylation in this study. Importantly, *MSH2* methylation is not well studied, and the few studies have lower methylation frequency varying from 13 to 18% in studies with Asian and Brazilian (Northern) patients (38-40), a much lower frequency than that found in the present study. Also contradictory to literature was the low percentage of *MLH1* methylation (40,41). The frequency of 11.2% of concomitance unmethylation shows that few gastric cancer cases possessed both repair enzymes not suppressed. Thus, downregulation of these enzymes through its methylation appears to be very important in gastric cancer. Then it can be noted in the studied population the relevance of *MSH2* in relation to *MLH1*.

Another contrasting point in our results is the high frequency of *COX-2* methylation, which disagrees with the majority of the others studies. It has been shown that the main regulatory mechanism of *COX-2* expression is the promoter methylation (42). In this context, Wang et al. (43) demonstrated that *COX-2* is primordially methylated at healthy gastric tissue and unmethylated in gastric cancer, showing that the demethylation is necessary for its expression. In agreement with our findings, elevated levels of *COX-2* methylation in gastric carcinomas was also observed in Huang et al. (11), Silva et al. (12) and Alves et al. (44) studies, suggesting that *COX-2* expression may not be required for carcinogenesis in the studied populations.

Literature data about *CDHI* promoter methylation frequency in gastric cancer tissue vary widely, from 36.36% to 94% in gastric tumors (12,13,18,45). The data from this study agrees with Borges et al. (18) and Corso et al study (46) in which the frequency of promoter *CDHI* methylation was around 40% of the cases. In addition to methylation, another factors can alter the expression of this gene, as the two polymorphisms at positions -160 C/A and -347 G/GA, that are described to reduce the transcriptional activity of *CDHI* (16,17). In this study, no interaction was found between these polymorphisms and methylation of *CDHI*. Two studies performed these analyzes, Liu et al. (45) from China and Borges et al. (18) from Northern Brazil. Only Borges et al. found a positive association between the A allele of *CDHI* -160 and hypermethylation, which is in disagreement with the present study. This discordance can be explained by the difference on the alleles frequencies. The study accomplished in Northern Brazil presented a -160A frequency of 63.8%, while the present study in Northwest Brazil represented only 28.2%, reflecting the regional ethnic composition (18).

Regarding *MLHI* -93G/A polymorphism, the tendency found in this study, of the heterozygous genotype (GA) be associated with a decreased of methylated status is contrasting with Miyakura et al. study (24) that found patients carrying A allele presented an increased risk of *MLHI* promoter methylation when researching colorectal cancer. This association with the heterozygous genotype can be explained by the smaller number of the cases and the different tumors analyzed, emphasizing that the present study is the first to make these analyses in gastric cancer cases. Some studies showed that the methylation pattern of genes seem to vary according to the histological subtype and the location of the gastric tumor. The preferential histological subtype to methylation seems to be a peculiarity of each gene, once there are genes more methylated in the intestinal subtype, and others in the diffuse one (41,44). In the present study, none of the genes analyzed showed significant differences in

the methylation according to the histological subtypes. Nevertheless, for the tumor location, it was found that tumors located at cardia region have *MLH1* significantly less methylated than these located in the non-cardia region. Although the present study has presented an intermediate frequency of *MLH1* promoter methylation compared to those seen in the literature, these cases were more frequent in the tumors located in the non-cardia region. This piece of data corroborates with the works of Kim et al. (41), who found *MLH1* more frequently methylated in the antrum, and Ottini et al. (21).

The methylation status of some genes and the histopathological parameters as TNM stage seem to be related according to the gene involved and its biological function. The importance of the *CDHI* gene in gastric carcinogenesis has been well demonstrated in several studies, once its product E-cadherin is an adhesion molecule that is expressed on epithelial cells, and this function classified the gene as a tumor and invasion suppressor (15). In the current study, when the gene methylation was analyzed individually, only methylated *CDHI* was found associated with advanced extension (T3 and T4) of the primary tumor, corroborating with other studies which found that *CDHI* methylation was associated with lymph node metastasis, serosae invasion and advanced TNM stages (III-IV) (13,47).

When the methylation status was seen with the genes combined, *CDKN2A M/MLH1 U* was related with the absence of metastasis. No other study has accomplished an analysis of these genes in combination. Xiong et al. (40), analyzing the methylation of some genes individually, found that a hypermethylation of *CDKN2A* was related with T4 and N1 stage either in cancer tissues or in remote normal-appearing tissues, but did not find any significant association with *MLH1* and *MSH2* methylation. The hypermethylation of *CDKN2A* is associated with the absence of the p16<sup>INK4a</sup> protein, which results in loss of the G1 check point, loss of apoptotic control and consequently of cell growth (48), which justifies the data from our study.

It is known that *H. pylori* induces aberrant promoter methylation in tumor suppressor genes indirectly by causing a chronic inflammation. Few studies analyze the virulence genes of *H. pylori* (23,44). In the present study, it was observed that the affected promoter genes seem to be variable according to the strain virulence involved in the infection. It was found that the individual presence of *vacAs1*, *vacAm1*, *cagG* and *hopQII* at the strains was associated with the unmethylation of *CDKN2A*, *COX-2*, *CDHI* and *MLH1* genes. On the other hand, *cagE* and *virB11* strains were associated with a high promoter methylation of *MSH2* gene. Classification trees were made in order to evaluate the interaction of *H. pylori* genes strains in methylation of host genes individually. None interaction patterns have been

repeated in tumors of intestinal subtype which appears to be a greater variation of *H. pylori* genes involved. This seems to be a reflection of the close relationship of this bacterium with the development of intestinal gastric tumors. Otherwise, the methylator pattern of *cagE* and *virB11* also appear in these analyzes, but restricted to diffuse subtype.

Studies have demonstrated that *cagE* and *virB11* genes stimulate the induction of IL-8 secretion by gastric epithelial cells (49,50). On its turn, it leads to chronic inflammation of the gastric mucosa, which is associated with the aberrant methylation of some genes (6). Thus, the individual presence of *cagE* and *virB11* *H. pylori* genes seems necessary to trigger an inflammation with a methylator pattern. In fact, when the strains were grouped in more and less virulent, the less virulent strains, where these genes were not included, presented a tendency of the unmethylation of *MLH1* and *CDH1* genes. A more virulent *H. pylori* strain could be involved in an exacerbated inflammatory response, strengthening the involvement in the methylation process. An experimental study or with a higher number of cases could better explain the association with individual *H. pylori* genes and inflammation and, consequently, with methylation.



## REFERENCES

1. Ferlay, J., *et al.* (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*, **136**, E359-E386.
2. Oluwasola, A.O. (2014) Genetic determinants and clinico-pathological outcomes of *Helicobacter pylori* infection. *Ann. Ib. Postgrad. Med.*, **12**, 22-30.
3. Ferreira, R.M., *et al.* (2014) Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genotypes in gastric carcinoma. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **28**, 1003-1015.
4. Fu, D.G. (2015) Epigenetic alterations in gastric cancer (Review). *Mol. Med. Rep.*, **12**, 3223-3230.
5. Zeng, W., *et al.* (2015) The clinicopathological significance of CDH1 in gastric cancer: a meta-analysis and systematic review. *Drug Des. Devel. Ther.*, **9**, 2149-2157.
6. Liu, J.B., *et al.* (2012) CpG island methylator phenotype and *Helicobacter pylori* infection associated with gastric cancer. *World J. Gastroenterol.*, **18**, 5129-5134.
7. Meissner, A. (2010) Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol.*, **28**, 1079-1088.
8. Kaneda, A., *et al.* (2014) DNA methylation accumulation and its predetermination of future cancer phenotypes. *J. Biochem.*, **156**, 63-72.
9. Konturek, P.C., *et al.* (2005) Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J. Physiol. Pharmacol.*, **56**, 57-73.
10. Song, S.H., *et al.* (2001) Transcriptional silencing of Cyclooxygenase-2 by hypermethylation of the 5 CpG island in human gastric carcinoma cells. *Cancer Res.* **61**, 4628-4635.
11. Huang, L., *et al.* (2006) Infrequent COX-2 expression due to promoter hypermethylation in gastric cancers in Dalian, China. *Hum. Pathol.*, **37**, 1557-1567.
12. Silva, M., *et al.* (2010) Gastric carcinoma and chronic gastritis: epigenetic regulation of CDH1 (E-Cadherin), CDKN2A (p16INK4A), PTGS2 (COX-2) and EGFR genes through methylation. *Acta Med. Port.*, **23**, 5-14.
13. Ben Ayed-Guerfali, D., *et al.* (2011) Hypermethylation of Tumor-Related Genes in Tunisian Patients With Gastric Carcinoma: Clinical and Biological Significance. *J. Surg. Oncol.*, **103**, 687-694.
14. Jiang, B., *et al.* (2015) Lack of association between the CDH1 polymorphism and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis. *Sci Rep.*, **5**, 7891.
15. Qu, Y., *et al.* (2013) Gene methylation in gastric cancer. *Clin Chim Acta*, **424**, 53-65.

16. Li, L.C., *et al.* (2000) A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter alters transcriptional activities. *Cancer Res.*, **60**, 873-876.
17. Shin, Y., *et al.* (2004) The E-cadherin -347G->GA promoter polymorphism and its effect on transcriptional regulation. *Carcinogenesis*, **25**, 895-899.
18. Borges, B.N., *et al.* (2010) Promoter Polymorphisms and Methylation of E-cadherin (CDH1) and KIT in gastric cancer patients from northern Brazil. *Anticancer Res.* **30**, 2225-2233.
19. Loh, M., *et al.* (2009) Meta-analysis of genetic polymorphisms and gastric cancer risk: Variability in associations according to race. *Eur. J. Cancer.*, **45**, 2562-2568.
20. Muro, Y., *et al.* (2015) DNA mismatch repair enzymes: Genetic defects and autoimmunity. *Clin Chim Acta.*, **442**, 102-109.
21. Ottini, L., *et al.* (1998) Mutations at coding mononucleotide repeats in gastric cancer with the microsatellite mutator phenotype. *Oncogene*, **16**, 2767-2772.
22. Gu, M., *et al.* (2009) Analysis of microsatellite instability, protein expression and methylation status of hMLH1 and hMSH2 genes in gastric carcinomas. *Hepatogastroenterology*, **56**, 899-904.
23. Ferrasi, A.C., *et al.* (2010) Helicobacter pylori and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. *World J. Gastroenterol.*, **16**, 312-319.
24. Miyakura, Y., *et al.* (2014) Haplotype defined by the MLH1 -93G/A polymorphism is associated with MLH1 promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancers. *BMC Res. Notes*, **7**, 835.
25. Foster, G.D., *et al.* (1996). *Plant gene isolation: principles and practice*. Wiley, England.
26. Akhtar, M., *et al.* (2001) Promoter methylation regulates Helicobacter pylori-stimulated cyclooxygenase-2 expression in gastric epithelial cells. *Cancer Res.*, **61**, 2399-2403.
27. Herman, J.G., *et al.* (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **93**, 9821-9826.
28. De Schutter, H., *et al.* (2009) Promoter methylation of TIMP3 and CDH1 predicts better outcome in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy only. *Oncol. Rep.*, **21**, 507-513.
29. Kang, G.H., *et al.* (1999) Correlation of methylation of the HMLH1 promoter with lack of expression of HMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. *Lab Invest.* **79**, 903-909.

30. Fang, J.Y., *et al.* (2006) Regulation of hMSH2 and hMLH1 expression in the human colon cancer cell line SW1116 by DNA methyltransferase 1. *Cancer Lett.*, **233**, 124-130.
31. Lima, V.P., *et al.* (2011) Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in Brazilian's patients: An association with histopathological parameters. *Cancer Epidemiol.*, **35**, e32-37.
32. Hsu, P.I., *et al.* (2002) Clinical Presentation in Relation to Diversity Within the *Helicobacter pylori* *cag* Pathogenicity Island. *Am. J. Gastroenterol.*, **97**, 2231-2238.
33. Sicinschi, L.A., *et al.* (2012) Non-invasive genotyping of *Helicobacter pylori* *cagA*, *vacA*, and *hopQ* from asymptomatic children. *Helicobacter*, **17**, 96-106.
34. Göttke, M.U., *et al.* (2000) Genetic variability determinants of *Helicobacter pylori*: influence of clinical background and geographic origin of isolates. *J. Infect. Dis.*, **181**, 1674-1681.
35. Yamaoka, Y., *et al.* (2000) A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7533-7538.
36. Oh, J.H., *et al.* (2015) DNA Methylation as Surrogate Marker For Gastric Cancer Review. *J. Cancer Prev.*, **20**, 172-178.
37. Wu, M.S., *et al.* (2000) Distinct Clinicopathologic and Genetic Profiles in Sporadic Gastric Cancer With Different Mutator Phenotypes. *Genes Chromosomes Cancer*, **27**, 403-411.
38. Moura Lima, E., *et al.* (2008) DNA mismatch repair gene methylation in gastric cancer in individuals from northern Brazil. *Biocell.*, **32**, 237-243.
39. Kim, H.G., *et al.* (2010) Aberrant methylation of DNA mismatch repair genes in elderly patients with sporadic gastric carcinoma: A comparison with younger patients. *J. Surg. Oncol.* **101**, 28-35.
40. Xiong, H.L., *et al.* (2013) Aberrant DNA methylation of P16, MGMT, hMLH1 and hMSH2 genes in combination with the MTHFR C677T genetic polymorphism in gastric cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **14**, 3139-3142.
41. Kim, K.J., *et al.* (2013) Differential clinicopathologic features in microsatellite-unstable gastric cancers with and without *MLH1* methylation. *Hum. Pathol.*, **44**, 1055-1064.
42. Shao, Y., *et al.* (2014) *Helicobacter pylori* infection, gastrin and cyclooxygenase-2 in gastric carcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* **20**, 12860-12873.

43. Wang, B.C., *et al.* (2005) Mechanism and clinical significance of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.*, **11**, 3240-3244.
44. Alves, M.K.S., *et al.* (2011) Inactivation of COX-2, HMLH1 and CDKN2A Gene by Promoter Methylation in Gastric Cancer: Relationship with Histological Subtype, Tumor Location and Helicobacter pylori Genotype. *Pathobiology*, **78**, 266-276.
45. Liu, Y.C., *et al.* (2005) Helicobacter pylori infection in relation to E-cadherin gene promoter polymorphism and hypermethylation in sporadic gastric carcinomas. *World J. Gastroenterol.*, **11**, 5174-5179.
46. Corso, G., *et al.* (2013) Somatic mutations and deletions of the E-cadherin gene predict poor survival of patients with gastric cancer. *J. Clin. Oncol.*, **31**, 868-875.
47. Liu, W.T., *et al.* (2007) Correlation of E-cadherin hypermethylation to tumorigenesis and development of gastric cancer (Abstract). *Ai Zheng.*, **26**, 1199-1203.
48. Tang, S., *et al.* (2003) Relationship between alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) genes of CDKN2A locus and gastric carcinogenesis. *Chin. Med. J.*, **116**, 1083-1087.
49. Hilleringmann, M., *et al.* (2006) Inhibitors of Helicobacter pylori ATPase Cagalpha block CagA transport and cag virulence. *Microbiology*, **152**, 2919-2930.
50. Li, S.D., *et al.* (1999) Multiple genes in the left half of the cag pathogenicity island of Helicobacter pylori are required for tyrosinekinase-dependent transcription of interleukin-8 in gastric epithelial cells. *Infect. Immun.*, **67**, 3893-3899.

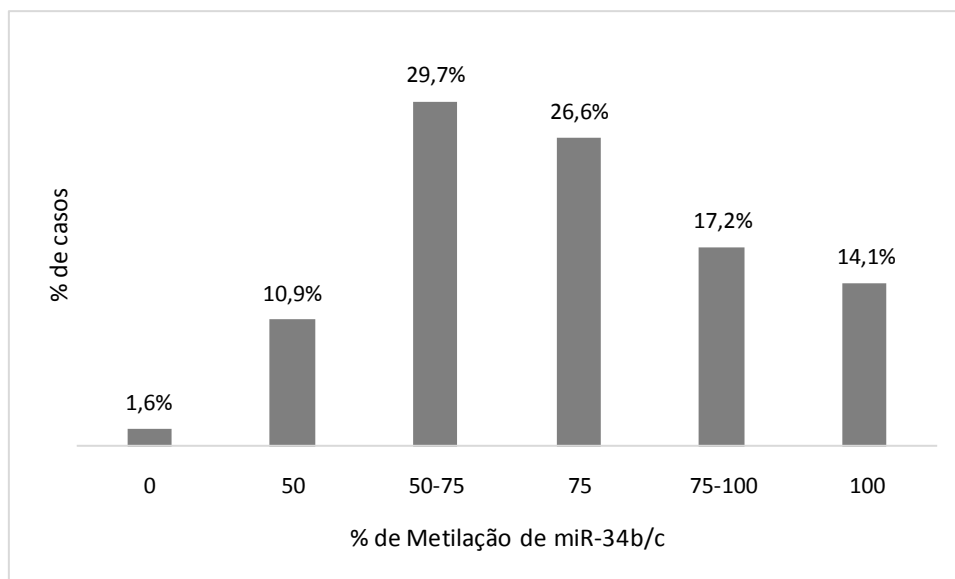
## 6.2 Resultados

Os demais resultados, que também foram objetivo desta tese e testam a hipótese 3, são apresentados a seguir.

### 6.2.1 Metilação de miR-34b/c

A metilação de miR-34b/c, realizada através da técnica de HRM, foi dada através de gradientes de percentual de metilação - 0%, 25%, 50%, 75% e 100% - sendo que alguns resultados se encontravam entre os percentuais estabelecidos. Assim, os percentuais de metilação do promotor de miR-34b/c foram distribuídos dentro dos percentuais estabelecidos e nos intervalos destes, como pode ser observado no Gráfico 1. Por esse gráfico, verifica-se que maioria dos casos (87,6%) apresentou metilação acima de 50%.

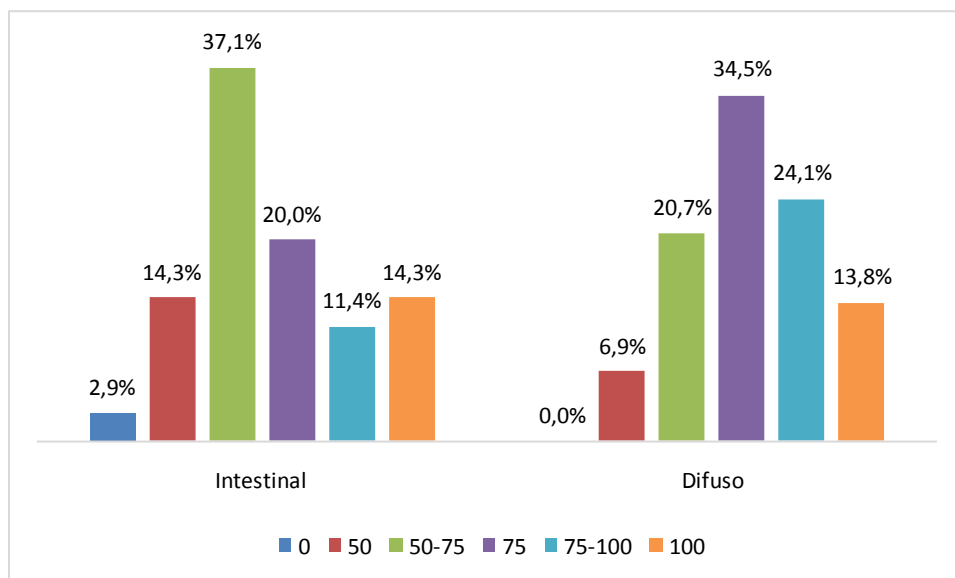
Gráfico 1. Distribuição percentual de metilação de miR-34b/c dos casos de câncer gástrico.



Quando levados em consideração o subtipo histológico e a localização tumoral, foi possível observar que dentre os tumores do subtipo intestinal a maior frequência de casos

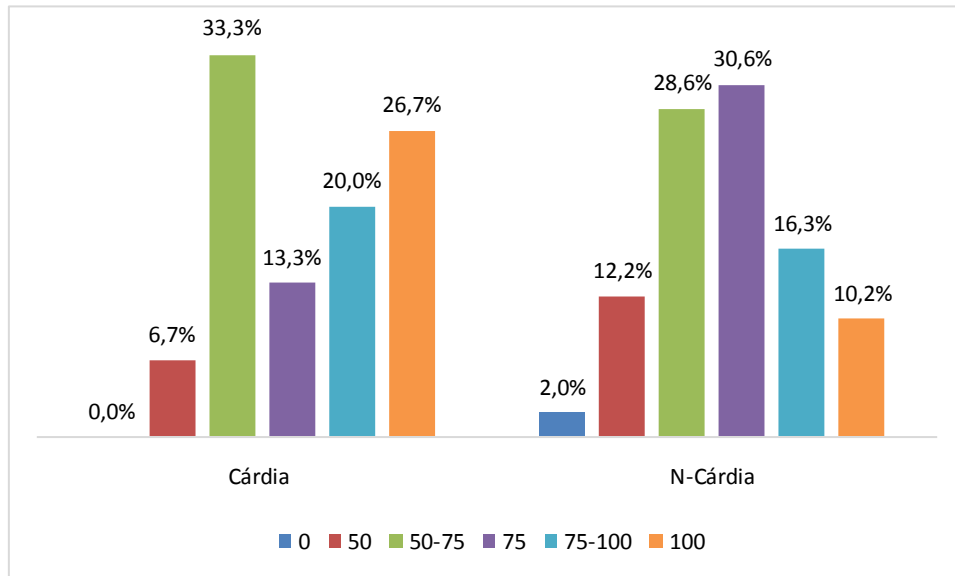
estava na faixa de metilação de 50-75%. Dentre os tumores do subtipo difuso, a maior frequência de casos metilados se encontrava na faixa de metilação de 75% (Gráfico 2). Não houve diferença estatística quando os tumores foram comparados quanto aos subtipos histológicos. Além disso, a soma das frequências das faixas 50-75% até 100% mostrou que os casos do subtipo difuso (93,1% de casos) são ligeiramente mais frequentemente metilados que os do subtipo intestinal (82,8% de casos) para o gene analisado.

Gráfico 2. Distribuição do percentual de metilação de miR-34b/c de acordo com a classificação do subtipo histológico.



Quanto à localização tumoral, os tumores da não-cárdia possuíram uma frequência ligeiramente maior de tumores pouco metilados (0% e 50%) que aqueles da cárdia. Embora a faixa de 50-75% de metilação possui frequência semelhante em ambas as localizações, os tumores da cárdia possuem a faixa de 75% com frequência menor que os tumores da não-cárdia, havendo um aumento de frequência até a faixa de 100%. O oposto parece ocorrer nos tumores da não-cárdia (Gráfico 3).

Gráfico 3. Distribuição do percentual de metilação de miR-34b/c de acordo com a localização tumoral.



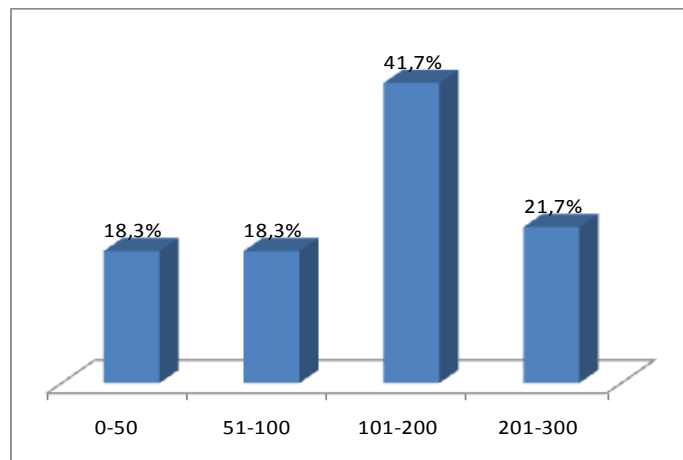
### 6.2.2 Expressão de c-MET

Dos 128 casos coletados, 68 não possuíam blocos disponíveis para a realização da Imunohistoquímica ou os não possuíam mais tecido tumoral. Assim, em apenas 60 casos foi possível realizar a detecção da expressão de c-MET. Desses 60 casos, 85% (51/60) eram positivos. Quando somente a positividade foi considerada e analisada quanto à parâmetros clínico-patológicos, não foi observada diferença significativa entre idade, sexo, localização tumoral e subtipo histológico (Tabela 5). A distribuição quanto à faixas de H-score é apresentada no Gráfico 4, no qual é possível observar que a a faixa de 101-220 foi a mais frequente, com 41,7% dos casos.

Tabela 5. Distribuição dos casos de câncer gástrico quanto a positividade de expressão de c-MET, de acordo com parâmetros clínico-patológicos.

		c-MET (-)	c-MET (+)	P
<b>Gênero</b>	Feminino	2	19	0.473
	Masculino	7	32	
<b>Idade</b>	<50	1	7	1.00
	≥50	8	44	
<b>Localização</b>	Cárdia	2	13	1.00
	Não-cárdia	7	38	
<b>Subtipo Histológico</b>	Intestinal	4	30	0.482
	Difuso	5	21	

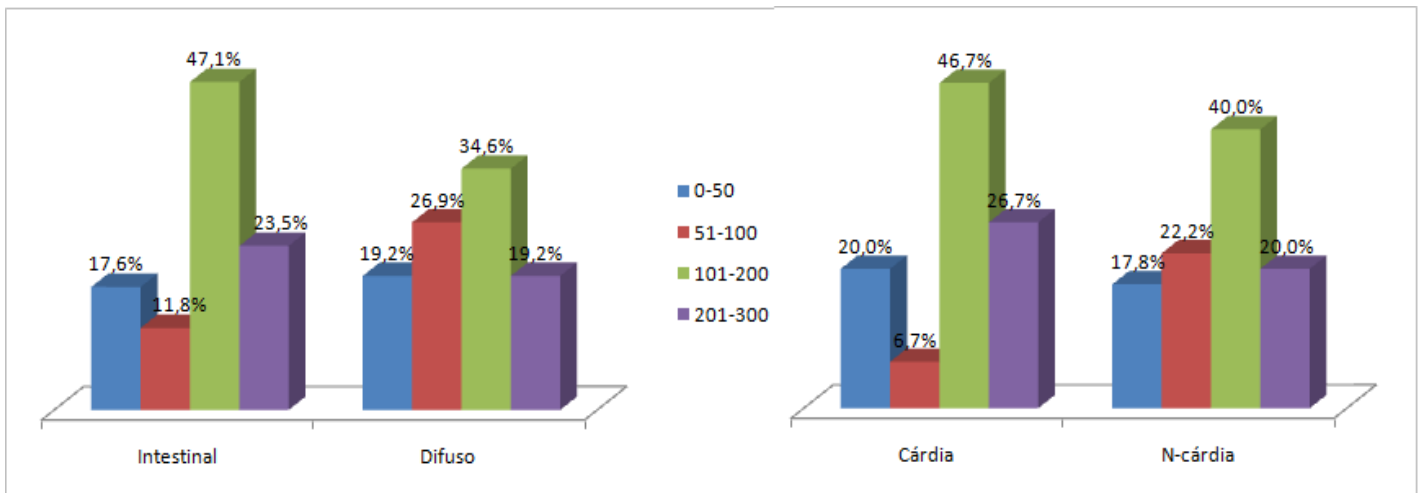
Gráfico 4. Distribuição dos casos de câncer gástrico em faixas de H-score (expressão de c-MET).



Quando a distribuição em faixas de H-score foi feita de acordo com os subtipos histológicos (Gráfico 5), observou-se que a faixa de 101-200 continuou a mais frequente, independente do parâmetro analisado (intestinal ou difuso, cárdia ou não-cárdia). Entretanto, essa faixa foi mais frequente dentre os tumores do subtipo intestinal que naqueles do subtipo difuso. Já a faixa de H-score de 51-100 foi menos frequente naqueles tumores do subtipo intestinal (11,8%) e localizados na cárdia (6,7%), quando comparados ao subtipo difuso (26,9%) e tumores da não-cárdia (22,2%), respectivamente.



Gráfico 5. Distribuição dos casos de câncer gástrico em faixas de H-score de acordo com os subtipos histológicos (à esquerda) e localização tumoral (à direita).



### 6.2.3 Correlação entre a Metilação de miR-34b/c e a Expressão de c-MET

A análise de correlação entre a metilação de miR-34b/c e a expressão de c-MET, apresentada no Gráfico 6, mostra que o aumento do percentual de metilação de miR-34b/c parece levar a um aumento da expressão da proteína c-MET, embora a correlação de Spearman não tenha sido baixa ( $r = -0.0502$ ). Observando caso a caso, foi visto que na maioria dos casos (8 dos 9 casos) cuja expressão de c-MET era negativa (H-score 0), havia um elevado percentual de metilação de miR-34b/c. Isso sugere que apesar da metilação de miR-34 b/c, a expressão de c-MET continuava regulada negativamente.

Gráfico 6. Correlação entre a metilação de miR-34b/c e a expressão de c-MET



### 6.3 Discussão

Estudos mostram que o miR-34b/c se encontra hipermetilado em vários tipos de câncer, como câncer de cólon, de mama, de pâncreas, de ovário, leucemia linfocítica crônica, dentre outros (SUZUKI et al., 2010; VOGT et al., 2011; DENEGERG et al., 2014; SUZUKI et al., 2014). Relativo ao câncer gástrico há somente dois estudos que analisam esse miRNA sob o aspecto da metilação (SUZUKI et al., 2010; SUZUKI et al., 2014). O trabalho de Suzuki et al. (2010), com cultura de células, mostra uma moderada metilação em tecidos gástricos normais infectados por *H. pylori* e uma elevada taxa de metilação em tecidos tumorais e adjacentes ao tumor, o que corrobora o elevado percentual de casos metilados do presente estudo, sugerindo um envolvimento para o desenvolvimento do tumor gástrico. Já Suzuki et al. (2014), analisando pacientes com câncer gástrico metacrônico, mostra que a metilação de miR-34b/c na mucosa não-tumoral tem um caráter preditivo para o risco do desenvolvimento da doença. Além da prévia detecção, a metilação desse miRNA pode ser usada como marcador de prognóstico desse câncer.

É importante ressaltar que o presente estudo é o primeiro a analisar o percentual de metilação de miR-34b/c em câncer gástrico e a levar em consideração o subtipo histológico e a localização do tumor. Tais análises mostram que a metilação desse miRNA varia de

acordo com esses parâmetros e, dessa forma, ressalta a importância dessas análises em separado, quando se tratar de miR-34b/c.

Quanto à expressão da proteína c-MET, observou-se que sua alta positividade no tecido tumoral gástrico encontrada neste estudo corrobora com a literatura, a qual relata que essa proteína é frequentemente superexpressa no câncer gástrico, sendo relacionada à progressão tumoral e à menor sobrevivência desses pacientes. Assim como no presente estudo, não foi encontrada associação entre a expressão de MET e localização e subtipo histológico na literatura (NOGUCHI et al., 2015; PALIGA et al., 2015; METZGER et al. 2016).

Quando os dados de expressão foram correlacionados com os de metilação de miR-34b/c foi observado um padrão variável. Esse dado pode ser justificado pelo fato de a expressão de MET parece ser regulada por outros miRNAs além do miR-34b/c como por exemplo, os miRNAs -1, -206 e -449-c, que inibem o crescimento, progressão tumoral, proliferação e migração celular (HAN et al., 2015; WU et al., 2015; ZHENG et al., 2015). Assim, nos casos de câncer gástrico analisados, a metilação de miR-34b/c não parece ser suficiente para o aumento da expressão de c-MET.

## 7. CONCLUSÃO

O status de metilação dos genes estudados parece ser dependente da localização tumoral e está relacionado também ao estadiamento TNM e ao subtipo tumoral. Além disso, cepas de *H. pylori* mais virulentas podem estar envolvidas nesse processo, aumentando a resposta inflamatória e levando à metilação desses genes.

Os polimorfismos -160 C/A e -347 G/GA do gene *CDHI* e -93 G/A do gene *MLH1* não influenciaram significativamente na metilação de seus respectivos promotores gênicos e nem apresentaram relação em parâmetros histopatológicos analisados.

A proteína MET está superexpressa em casos de câncer gástrico e a região promotora de miR-34b/c, hipermetilada, indicando um possível envolvimento desses fatores na carcinogênese do estômago, embora não tenha sido encontrada uma relação direta entre as duas variáveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782-787, 2000.
- AKHTAR, M. et al. Promoter methylation regulates *Helicobacter pylori*-stimulated cyclooxygenase-2 expression in gastric epithelial cells. **Cancer Res.**, v. 61, p. 2399-2403, 2001.
- ALM, R. A. et al. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: Analysis of the outer membrane protein families. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4155-4168, 2000.
- AVILÉS-JIMÉNEZ, F. et al. In vivo expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in patients with gastritis, ulcer, and gastric cancer. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 2, p. 594-601, 2012.
- AZEVEDO, N. F. et al. Coccoid Form of *Helicobacter pylori* as a Morphological Manifestation of Cell Adaptation to the Environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 10, p. 3423-3427, 2007.
- BARTSCH, H.; NAIR, J. Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions: potential lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies. **Mutat Res**, v. 591, n. 1-2, p. 34-44, 2005.
- BASSO, D.; PLEBANI, M.; KUSTERS, J. G. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v. 15, p. 14-20, 2010.
- BEN AYED-GUERFALI, D. et al. Hypermethylation of Tumor-Related Genes in Tunisian Patients With Gastric Carcinoma: Clinical and Biological Significance. **J. Surg. Oncol.**, v. 103, p. 687-694, 2011.
- BICKLEY, J. et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. **J. Med. Microbiol.**, v. 39, n. 5, p. 338-344, 1993.
- BLAIR, D. F. Flagellar movement driven by proton translocation. **FEBS Lett.**, v. 545, p. 86-95, 2003.
- BLASER, M. J.; ATHERTON, J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 321-333, 2004.
- BOCCACCIO, C.; COMOGLIO, P. M. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, p. 637-645, 2006.
- BOREN, T. et al. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood-group antigens. **Science**. v. 262, p. 1892-1895, 1993.
- CAO, P.; COVER, T. L. Two different families of hopQ alleles in *Helicobacter pylori*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 4504-4511, 2002.

- CAO, P. et al. Analysis of hopQ alleles in East Asian and Western strains of *Helicobacter pylori*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 251, p. 37-43, 2005.
- CENSINI, S. et al. CagA pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 14648-14653, 1996.
- CHIEN, M. H. et al. Effects of E-cadherin (CDH1) gene promoter polymorphisms on the risk and clinicopathologic development of oral cancer. **Head Neck**, v. 34, n. 3, p. 405-411, 2012.
- CHO, N. Y.; et al. Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. **J. Pathol.**, v. 211, p. 269-277, 2007.
- CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. **Cancer Res.** v. 52, p. 6735-6740, 1992.
- CORREIA, M.; MACHADO, J. C.; RISTIMÄKI, A. Basic aspects of gastric cancer. **Helicobacter**, v. 14, p. 36-40, 2009.
- COVER T. L.; BLANKE, S. R. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 320-332, 2005.
- DAY, J. J.; SWEATT, J. D. DNA methylation and memory formation. **Nature Neurosci.**, v. 13, p. 1319-1323, 2010.
- DENEBERG, S. et al. microRNA-34b/c on chromosome 11q23 is aberrantly methylated in chronic lymphocytic leukemia. **Epigenetics**, v. 9, n. 6, p. 910-917, 2014.
- DENG, Q. W. et al. Roles of E-cadherin (CDH1) genetic variations in cancer risk: a meta-analysis. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 15, n. 8, p. 3705-3713, 2014.
- DE SCHUTTER, H. et al. Promoter methylation of TIMP3 and CDH1 predicts better outcome in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy only. **Oncol. Rep.**, v. 21, p. 507-513, 2009.
- DING, H. et al. *Helicobacter pylori* Chaperone-Like Protein CagT Plays an Essential Role in the Translocation of CagA into Host Cells. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 1343-1349, 2012.
- DOLL, R. et al. Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors. **Br. J. Cancer**, v. 92, p. 426-429, 2005.
- EATON, K. A. et al. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2445-2448, 1996.
- FANG, J. Y. et al. Regulation of hMSH2 and hMLH1 expression in the human colon cancer cell line SW1116 by DNA methyltransferase 1. **Cancer Lett.**, v. 233, p. 124-130, 2006.

- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int. J. Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, 2015.
- FERRASI, A. C. et al. Helicobacter pylori and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. **World J. Gastroenterol.**, v. 16, p. 312-319, 2010.
- FISCHER, W. et al. Systematic mutagenesis of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. **Mol. Microbiol.**, v. 42, p. 1337-1348, 2001.
- FOSTER, G. D.; TWELL, D. J. **Plant gene isolation: principles and practice**. England: Wiley; 1996.
- FRANCO, A. T. et al. Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 102, p. 10646–10651, 2005.
- FRANCO, A.T. et al. Regulation of gastric carcinogenesis by Helicobacter pylori virulence factors. **Cancer Res.**, v. 68, p. 379–387, 2008.
- FRONZES, R.; CHRISTIE, P. J.; WAKSMAN, G. The structural biology of type IV secretion systems. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 703–714, 2009.
- FU, D. G. Epigenetic alterations in gastric cancer (Review). **Mol. Med Rep.**, v. 12, n. 3, p. 3223-3230, 2015
- GAO, L.; NIETERS, A.; BRENNER, H. Meta-analysis: tumour invasion-related genetic polymorphisms and gastric cancer susceptibility. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 28, n. 5, p. 565-573, 2008.
- GEIS, G. et al. Ultrastructure and chemical analysis of Campylobacter pylori flagella. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 436-441, 1989.
- GLADE, M. J. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/ World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. **Nutrition**. v. 15, p. 523–526, 1999.
- GO, M. F. Treatment and management of *Helicobacter pylori* infection. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 4, p. 471–477, 2002.
- GOLOGAN, A.; SEPULVEDA, A. R. Microsatellite instability and DNA mismatch repair deficiency testing in hereditary and sporadic gastrointestinal cancers. **Clin. Lab. Med.**, v. 25, n. 1, p. 179-196, 2005.
- GOODWIN, C. S. et al. Transfer of Campylobacter pylori and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. **Internat. J. Syst. Bacteriol.**, v. 39, p. 397-405, 1989.
- GU, M. et al. Analysis of microsatellite instability, protein expression and methylation status of hMLH1 and hMSH2 genes in gastric carcinomas. **Hepatogastroenterology**, v. 56, p. 899-904, 2009.

- HAN, C. et al. MicroRNA-1 (miR-1) inhibits gastric cancer cell proliferation and migration by targeting MET. **Tumor Biol.**, v. 36, p. 6715-6723, 2015.
- HE, L. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. **Nature**, v. 447, p. 1130-1134, 2007.
- HELLMIG, S.; HAMPE, J.; SCHREIBER, S. *Helicobacter pylori* infection in Africa and Europe: enigma of host genetics. **Gut**, v. 52, p. 1799, 2003.
- HERMAN, J. G. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 9821-9826, 1996.
- HERMEKING, H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. **Cell Death Differ.**, v. 17, n. 2, p. 193-199, 2010.
- HILL, P.; RODE, J. *Helicobacter pylori* in ectopic gastric mucosa in Meckel's diverticulum. **Pathology**, v. 30, p. 7-9, 1998.
- HUANG, J. Q. et al. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. **Gastroenterology**, v. 125, p. 1636-1644, 2003.
- HUANG, L. et al. Infrequent COX-2 expression due to promoter hypermethylation in gastric cancers in Dalian, China. **Hum. Pathol.**, v. 37, p. 1557-1567, 2006.
- HSU, P. I. et al. Clinical Presentation in Relation to Diversity Within the *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 97, p. 2231-2238, 2002.
- IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.**, v. 61, p. 1-241, 1994.
- IKENOUE, T. et al. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the cag pathogenicity island. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, p. 181-186, 2001.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2014: Incidência de câncer no Brasil**, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em: 15 jun. 2015.
- IORIO, M. V.; CROCE, C. M. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, p. 5848-5856, 2009.
- JIANG, B. et al. Lack of association between the CDH1 polymorphism and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis. **Sci Rep.**, v. 5, n. 7891, 2015
- JONES, P. A.; LAIRD, P. W. Cancer epigenetics comes of age. **Nature Genet.**, v. 21, p. 163-167, 1999.
- JOSENHANS, 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.**, v. 177, p. 3010-3020, 1995.

KANG, G. H.; SHIM, Y. H.; RO, J. Y. Correlation of methylation of the HMLH1 promoter with lack of expression of HMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. **Lab. Invest.**, v. 79, p. 903-909, 1999.

KAUSER, F. et al. The *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 5302-5308, 2004.

KHALIFA, M.; SHARAF, R.; AZIZ, R. *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen? **Gut. Pathogens.**, v. 2, p. 1-12, 2010.

KIM, V. N. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. **Mol. Cells**, v. 19, p. 1-15, 2005.

KONTUREK, J.W. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its Pathogenetic Role in Peptic Ulcer, Gastritis and Gastric Cancer. **J. Physiol. and Pharmacol.**, v. 54, p. 23-41, 2003.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKI, T. Gastric Cancer and *Helicobacter pylori* Infection. **J. Physiol. and Pharmacol.**, v. 57, p. 51-65, 2006.

KOZAKI, K. et al. Exploration of tumor suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. **Cancer Res.**, v. 68, p. 2094-2105, 2008.

KWOK, T. et al. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. **Nature**, v. 449, p. 862-866, 2007.

KUDO, T. et al. Correlation between *Helicobacter pylori* OipA protein expression and oipA gene switch status. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 2279-2281, 2004.

KURAOKA, K. et al. Correlation of a single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter with tumorigenesis and progression of gastric carcinoma in Japan. **Int. J. Oncol.**, v. 23, n. 2, p. 421-427, 2003.

KUTTER, S. et al. Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 2161-2171, 2008.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADOR, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, p. 335-342, 2003.

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

LAGE, A. P. 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.**, v. 33, p. 2752-2756, 1995.

- LAI, C. H. et al. Association of IS605 and *cag*-PAI of *Helicobacter pylori* Isolated from Patients with Gastrointestinal Diseases in Taiwan. **Gastroenterol. Res. Pract.**, v. 2013, p 1-5, 2013.
- LAUREN, P. Two histological main types of Gastric Carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. **Acta Path. Microbiol. Scand.**, v. 64, p. 31-49, 1965.
- LETLEY, D. P. et al. Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 26734-26741, 2003.
- LI, L. C.; CHUI, R. M.; SASAKI, M. A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter alters transcriptional activities. **Cancer Res.**, v. 60, p. 873-879, 2000.
- LIMA, V. P. et al. The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 14, p. e613-e617, 2010.
- LIMA, V. P. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in Brazilian's patients: An association with histopathological parameters. **Cancer Epidemiol.**, v. 35, n. 5, p. e32-37, 2011.
- LING, F. et al. The *Helicobacter pylori* protein CagM is located in the transmembrane channel that is required for CagA translocation. **Curr. Microbiol.**, v. 67, p. 531-536, 2013.
- LINZ, B. et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. **Nature**, v. 445, p. 915-918, 2007.
- LIU, J. B. et al. CpG island methylator phenotype and *Helicobacter pylori* infection associated with gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, v. 18, n. 36, p. 5129-5134, 2012.
- LOGAN, R. P.; WALKER, M. M. ABC of the upper gastrointestinal tract: Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **BMJ.**, v. 323, p. 920-922, 2001.
- LOH, J. T. et al. *Helicobacter pylori* HopQ outer membrane protein attenuates bacterial adherence to gastric epithelial cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 289, p. 53-58, 2008.
- LU, H.; YAMAOKA, Y.; GRAHAM, D. Y. *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 653-659, 2005.
- MAEKITA, T. et al. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 989-995, 2006.
- MATOS, J. I. et al. *Helicobacter pylori* CagA and VacA genotypes and gastric phenotype: a meta-analysis. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 25, p. 1431-1441, 2013.
- MATTAR, R. et al. *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. **J. Med. Microbiol.** v. 56, p. 9-14, 2007.

- MEDINA-FRANCO, H. et al. Single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the E-cadherin gene in gastric cancer: case-control study in a young Mexican population. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 14, n. 8, p. 2246-2249, 2007.
- MEI, M. The MLH1 -93 promoter variant influences gene expression. **Cancer Epidemiol.**, v. 34, p. 93-95, 2010.
- MEISSNER, A. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 28, n. 10, p. 1079-1088, 2010.
- MEOLA, N.; GENNARINO, V. A.; BANFI, S. microRNAs and genetic diseases. **Pathogenetics** v. 2, n. 1, p. 7, 2009.
- METZGER, M. L. et al. MET in gastric cancer – discarding a 10% cutoff rule. **Histopathology**, v. 68, p. 241–253, 2016.
- MIGLIORE, C. et al. MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth. **Cancer Res.**, v. 68, n. 24, p. 10128-10136, 2008.
- MIZUSHIMA, T. et al. Decreased Adherence of cagG-Deleted *Helicobacter pylori* to Gastric Epithelial Cells in Japanese Clinical Isolates. **Helicobacter**, v. 7, p. 22-29, 2002.
- MONTECUCCO, C.; RAPPUOLI, R. Living Dangerously: How *Helicobacter pylori* Survives in the Human Stomach. **Mol. Cell Biol.**, v. 2, p. 457-466, 2001.
- NCBI – **National Center of Biotechnology Information**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 23 jul. 2015.
- MURATA-KAMIYA, N. Pathophysiological functions of the CagA oncoprotein during infection by *Helicobacter pylori*. **Microbes Infect.**, v. 13, p. 799–807, 2011.
- NA, H. K.; WOO, J. H. *Helicobacter pylori* Induces Hypermethylation of CpG Islands Through Upregulation of DNA Methyltransferase: Possible Involvement of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. **J. Cancer Prev.**, v. 19, p. 259-264, 2014.
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **NCCN Guidelines – Gastric Cancer**. Version 3.2015
- NIWA, T. et al. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. **Cancer Res.**, v. 70, n. 4, p. 1430-1440, 2010.
- NOGUCHI, E. et al. Clinical significance of hepatocyte growth factor/c-Met expression in the assessment of gastric cancer progression. **Mol. Med. Rep.**, v. 11, n. 5, p. 3423-3431, 2015.
- OHNO, T. et al. Relationship between *Helicobacter pylori* hopQ genotype and clinical outcome in Asian and Western populations. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 24, p. 462-468, 2009.

- O'KEEFFE, J.; MORAN A. P. Conventional, Regulatory, and Unconventional T Cells in the Immunologic Response to *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 13, p. 1-19, 2008.
- OLBERMANN, P. et al. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. **PLoS Genet.**, v. 6, p. e1001069, 2010.
- OLUWASOLA, A. O. Genetic determinants and clinico-pathological outcomes of *Helicobacter pylori* infection. **Ann. Ib. Postgrad. Med.**, v. 12, n. 1, p. 22-30, 2014.
- OWEN, R. J. et al. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori* in England: prevalence of cag pathogenicity island markers and IS605 presence in relation to patient age and severity of gastric disease. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 30, p. 65-71, 2001.
- PACCHIANI, N. et al. Echoes of a distant past: The cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 3, n. 11, p. a010355, 2013.
- PACHECO, AR. et al. Involvement of the *Helicobacter pylori* plasticity region and cag pathogenicity island genes in the development of gastroduodenal diseases. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p. 1053-1059, 2008.
- PAGLIACCIA, C. et al. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, p. 10212-10217, 1998.
- PAI, R. et al. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. **Nat. Med.**, v. 8, p. 289-293, 2002.
- PALIGA, A. et al. The Prognostic Significance of c-MET and EGFR Overexpression in Resected Gastric Adenocarcinomas. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 0, n. 0, p. 1-9, 2015.
- PELETEIRO, B. et al. Salt intake and gastric cancer risk according to *Helicobacter pylori* infection, smoking, tumor site and histological type. **Br. J. Cancer.**, v. 104, n. 1, p. 198-207, 2011.
- PERL, A. K. et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. **Nature**, v. 392, p. 190-193, 1998.
- PIAZUELO, M. B.; CORREA, P. Gastric cancer: Overview. **Colomb. Med.** v. 44, n. 3, p. 192-201, 2013.
- QU, Y.; DANG, S.; HOU, P. Gene methylation in gastric cancer. **Clin. Chim. Acta.**, v. 424, p. 53-65, 2013.
- ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. **Nat. Rev. Genet.**, v. 6, p. 597-610, 2005.
- SAHA, A. et al. *Helicobacter pylori* represses proton pump expression and inhibits acid secretion in human gastric mucosa. **Gut.**, v. 59, p. 874-881, 2010.
- SAITO, H. et al. Roles of virD4 and cagG genes in the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* using a Mongolian gerbil model. **Gut.**, v. 54, p. 584-590, 2005.

- SAUNDERS, N. J. et al. Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. **Mol Microbiol.**, v. 27, p. 1091-1098, 1998.
- SCHNEIDER, B. G. et al. Cytokine polymorphisms and gastric cancer risk: an evolving view. **Cancer Biol. Ther.**, v. 7, p. 157-162, 2008.
- SHANKS, A. M.; EL-OMAR, E. M. *Helicobacter pylori* infection, host genetics and gastric cancer. **J. Dig. Dis.**, v. 10, p. 157–164, 2009.
- SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 27-36, 2010.
- SHIN, Y. et al. The E-cadherin -347G->GA promoter polymorphism and its effect on transcriptional regulation. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 895-899, 2004.
- SHIOTA, S.; SUZUKI, R.; YAMAOKA, Y. The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. **J. Dig. Dis.**, v. 14, n. 7, p. 341-349, 2013.
- SICINSCHI, L. A. et al. Non-invasive genotyping of *Helicobacter pylori* cagA, vacA, and hopQ from asymptomatic children. **Helicobacter**, v. 17, n. 2, p. 96-106, 2012.
- SILVA, M. et al. Gastric carcinoma and chronic gastritis: epigenetic regulation of CDH1 (E-Cadherin), CDKN2A (p16INK4A), PTGS2 (COX-2) and EGFR genes through methylation. **Acta Med. Port.**, v. 23, n. 1, p. 5-14, 2010.
- SMITH, M. G. et al. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, n. 19, p. 2979-2990, 2006.
- SMOLKA, A. J.; BACKERT, S. How *Helicobacter pylori* infection controls gastric acid secretion. **J. Gastroenterol.**, v. 47, p. 609-661, 2012.
- SOMMER, F. et al. Lack of gastritis and of an adaptive immune response in interferon regulatory factor-1-deficient mice infected with *Helicobacter pylori*. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 396–402, 2001.
- SONG, S. H. et al. Transcriptional silencing of Cyclooxygenase-2 by hypermethylation of the 5 CpG island in human gastric carcinoma cells. **Cancer Res.** v. 61, p. 4628-4635, 2001.
- SOZZI, M. et al. Heterogeneity of cag genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 146, p. 262-270, 2005.
- STOICOV, C. et al. Coinfection modulates inflammatory responses and clinical outcome of *Helicobacter felis* and *Toxoplasma gondii* infections. **J. Immunol.** v. 173, p. 3329-3336, 2004.
- SUNDRUD, M. S. et al. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, p. 7727-7732, 2004.

SUZUKI, H. et al. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. **Carcinogenesis**. v. 31, p. 2066-2073, 2010.

SUZUKI, R. et al. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. **J Gastroenterol.**, v. 49, p. 1135–1144, 2014.

TABASSAM, F. H.; GRAHAM, D. Y.; YAMAOKA, Y. OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. **Cell Microbiol.** v. 10, p. 1008-1020, 2008.

TALARICO, S. et al. Pediatric *Helicobacter pylori* isolates display distinct gene coding capacities and virulence gene marker profiles. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 1680-1688, 2009.

TANAKA, J. et al. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. **Cell Microbiol.**, v. 5, p. 395-404, 2003.

TARASOV, V. et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. **Cell Cycle**, v. 6, p. 1586-1593, 2007.

TOMB, J. F. et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, v. 388, p. 539-547, 1997.

TOMBOLA, F. et al. The *Helicobacter pylori vacA* toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. **J. Clin. Invest.** v. 108, p. 929-937, 2001.

TSAI, K. W. et al. Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer. **Int. J. Cancer**, v. 129, n. 11, p. 2600-2610, 2011.

TUMMURU, M. K.; SHARMA, S. A.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 18, p. 867-876, 1995.

VAN DOORN, L. J. et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 115, p. 58-66, 1998.

VELHO, S. et al. Causes and consequences of microsatellite instability in gastric carcinogenesis. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 44, p. 16433-16442, 2014.

VIALA, J. et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. **Nat. Immun.** v. 5, p. 1166-1174, 2004.

VINCI S. et al. Genetic and epigenetic factors in regulation of microRNA in colorectal cancers. **Methods**, v. 59, p. 138-146, 2013.

VOGT, M et al. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. **Virchows Arch.**, v. 458, p. 313–322, 2011.

- WANG, M. Y. et al. Distribution of *Helicobacter pylori* virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in a region at high risk of gastric cancer. **Microb. Pathog.** v. 59-60, p. 13-18, 2013.
- WARREN, J. R.; MARSHALL, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet.**, v. 1, p. 1273-1275, 1983.
- WEN, S.; MOSS, S. F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v. 282, p. 1-8, 2009.
- WROBLEWSKI, L. E.; PEEK, R. M. Jr.; WILSON, K. T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, p. 713-739, 2010.
- WU, M. S. et al. Association of the -160 C > A promoter polymorphism of E-cadherin gene with gastric carcinoma risk. **Cancer**, v. 94, n. 5, p. 1443-1448, 2002.
- WU, Z. et al. MiR-449c inhibits gastric carcinoma growth. **Life Sciences**, v. 137, p. 14-19, 2015.
- YAMADA, H. et al. Association between CDH1 haplotypes and gastric cancer risk in a Japanese population. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 42, n. 12, p. 1479-1485, 2007.
- YAMAMOTO, H.; IMA, K. Microsatellite instability: an update. **Arch. Toxicol.**, v. 89, p. 899-921, 2015.
- YAMAOKA, Y.; KWON, D. H.; GRAHAM, D. Y. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 7533-7538, 2000.
- YAMAOKA, Y. et al. Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. **Gastroenterology**, v. 123, p. 414-424, 2002.
- YAMAOKA, Y. Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. **J. Infect. Dev. Ctries.** v. 2, p. 174-181, 2008.
- YANG, J. et al. Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer. **Mol. Med. Rep.**, v. 4, p. 1139-1143, 2011.
- XIE, K. et al. Methylation-associated silencing of microRNA-34b in hepatocellular carcinoma cancer. **Gene**, v. 543, n. 1, p. 101-107, 2014.
- XU, C. et al. Distribution of cagG gene in *Helicobacter pylori* isolates from Chinese patients with different gastroduodenal diseases and its clinical and pathological significance. **World J. Gastroenterol.**, v. 9, p. 2258-2260, 2003.
- XU, Y. et al. Expression and clinical significance of c-Met in advanced esophageal squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 15, n.6, p. 2-7, 2015.
- ZENG, W. et al. The clinicopathological significance of CDH1 in gastric cancer: a meta-analysis and systematic review. **Drug Des. Devel. Ther.**, v. 9, p. 2149-2157, 2015.

ZHENG, Z. et al. MicroRNA-206: Effective Inhibition of Gastric Cancer Progression through the c-Met Pathway. **Plos One**, v. 10, n. 7, e0128751, 2015.

### **Anexo I - Protocolo de Coleta no Centro Cirúrgico**

Durante todo o procedimento utilizar máscara e luvas estéreis.

- 1- Conferir o material a ser utilizado para coleta (Identificação do paciente, régua, caneta para tubo, criotubo estéril e protocolo a ser preenchido);
- 2- Identificar os tubos com o número da amostra, tipo de mucosa (tumoral ou normal) e a data (Ex.: CG-01-N1/D-M-2004);
- 3- Após a retirada da peça, colocá-la em cuba estéril e lavá-la com soro fisiológico estéril (se necessário). Secá-la com compressa estéril;
- 4- Colocar a peça em um campo azul estéril, em seguida a régua e a identificação logo abaixo da peça, tirar uma foto panorâmica e uma foto somente do tumor utilizando flash (total 2 fotos);
- 5- Com o auxílio de pinça e bisturi estéreis, coletar primeiramente quatro espécimes da mucosa normal (o mais distante do tumor), em seguida quatro espécimes do tumor (preferencialmente as bordas, evitando as áreas de necrose e fibrose), colocar o material colhido dentro do criotubo estéril e acondicioná-los imediatamente em recipiente com gelo;
- 6- Tirar uma foto da peça pós-coleta com flash e sem régua;
- 7- Preencher o cadastro do tecido da peça cirúrgica em duplicata e desenhar um esboço marcando os locais dos quais foram coletados, bem como as margens cirúrgicas e o tamanho do tumor;
- 8- Transportar imediatamente os tubos para armazenagem em nitrogênio líquido.



**Anexo II – Parecer do Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará**

Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 220/12

Fortaleza, 05 de julho de 2012.

**Protocolo COMEPE nº 326/11**

**Pesquisador responsável:** Silvia Helena Barem Rabenhorst.

**Título do Projeto:** "Estudo de suscetibilidade genética, caracterização de fatores etiológicos e identificação de marcadores com aplicabilidade para prevenção e prognóstico".

Levamos ao conhecimento de V.S<sup>a</sup>. que o Comitê de Ética em Pesquisa 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 nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 04 de julho de 2012.

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

Atenciosamente,

  
Dr. Fernando A. Costa Bezerra  
Coordenador do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
COMEPE/UFC

## Anexo III – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Fortaleza



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/HGF

Fortaleza, 24 de abril de 2013.

Ilma. Sra. comunicamos-lhe o parecer do CEP

Pesquisadora: **Sílvia Helena Barem Rabenhorst**  
Projeto Intitulado: **Polimorfismo de interleucinas e enzimas do sistema de reparo ao estresse oxidativo no câncer gástrico: associado com helicobacter pylori**  
Protocolo do CEP: **071002/10**

#### **Parecer:**

O CEP-HGF aprovou a Emenda do projeto acima citado pois o mesmo já havia sido aprovado neste CEP em 07/10/10, porém o pesquisador não conseguiu amostra suficiente e com isto solicitou uma extensão do prazo para coleta de dados feito apenas um Ad-referendum.

Lembramos ao pesquisador o cumprimento da referida Resolução na condução científica do seu projeto e ainda, o encaminhamento ao CEP do relatório final da pesquisa bem como à devolução dos resultados à comunidade

Atenciosamente,

  
Dr<sup>a</sup>. Ilvana Lima Verde Gomes  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HGF

## Anexo IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado pela Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst a participar como voluntário de uma pesquisa. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todas as etapas desta pesquisa sejam devidamente esclarecidas.

A pesquisa intitulada *Estudo de suscetibilidade genética, caracterização de fatores etiológicos e identificação de marcadores com aplicabilidade para a prevenção e prognóstico* está sendo realizada pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. O estudo em questão pretende analisar características genéticas do paciente e alguns hábitos que podem levar ao desenvolvimento do câncer gástrico, nos ajudando a identificar os fatores de risco, tais como a presença de uma bactéria chamada *H.pylori* e de um vírus chamado EBV. Estes microorganismos serão identificados por meio da presença do material genético destes agentes infectantes no tumor. Serão também observadas as alterações genéticas das células tumorais. Essas alterações serão vistas pela expressão de proteínas ou pela análise do DNA/RNA do tumor.

Participarão deste estudo 200 pacientes atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídeo. Portanto, concordando em participar, você será um dos pacientes participantes que permitem a coleta do material tumoral do estômago além de uma amostra de sangue necessários para o estudo. Esta coleta não irá afetar o diagnóstico da sua doença ou o tratamento. Paralelamente, serão anotadas algumas questões referentes a seus dados pessoais, como data de nascimento, hábitos de vida e em relação à sua doença. Estas informações serão retiradas do seu prontuário ou na ausência delas, serão perguntadas pessoalmente a você.

Sua participação não terá benefício direto imediato, em princípio, mas que poderá contribuir para que se entenda melhor os fatores de risco e alterações que propiciem o aparecimento do câncer gástrico. A identificação dos fatores de risco para o câncer gástrico servirá para direcionar medidas preventivas. Por outro lado, as alterações genéticas encontradas no material coletado auxiliarão no diagnóstico, na avaliação da gravidade da doença e também podem dar informações para novos tratamentos que estão sendo desenvolvidos.

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

Como sua participação é voluntária, você poderá abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isso resulte em qualquer penalidade ou perda de seus direitos onde você recebe atendimento médico.

Endereço da responsável pela pesquisa:

Nome: Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst

Instituição: Universidade federal do Ceará

Endereço: Rua: Marcos Macedo, 1301, Apto 802.

Telefone: 3366-8639/9994-5689

**ATENÇÃO:** Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a sua participação na pesquisa entre em contato com o Comitê de ética em pesquisa da UFC - Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo 3366-8344.

Eu, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos, RG: \_\_\_\_\_, declaro que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário da pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que após sua leitura tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. Declaro ainda estar recendo uma cópia assinado deste termo.

Fortaleza, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome do Voluntário \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Assinatura \_\_\_\_\_

Nome do Pesquisador \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Assinatura \_\_\_\_\_

Nome da testemunha \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Assinatura \_\_\_\_\_

(se o voluntário não souber ler)

Nome do profissional que aplicou o TCLE \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Assinatura \_\_\_\_\_

## Anexo V – 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 \_\_\_\_\_ Freqüência \_\_\_\_\_ Fum. passivo [ ]

[ ] Álcool Tipo \_\_\_\_\_ Freqüência \_\_\_\_\_

### 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

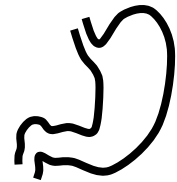
### Observações

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Nº de amostra Tumoral

congelada [ ] Nº de amostra Normal [ ]

Local Armazenamento: \_\_\_\_\_



2015 *Advances in Helicobacter pylori*

## What exists beyond *cagA* and *vacA*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases

Débora Menezes da Costa, Eliane dos Santos Pereira, Sílvia Helena Barem Rabenhorst

Débora Menezes da Costa, Eliane dos Santos Pereira, Sílvia Helena Barem Rabenhorst, Molecular Genetics Laboratory, Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Ceará 60430-270, Brazil

Author contributions: da Costa DM and Pereira ES contributed equally to this work and wrote the paper; Rabenhorst SHB designed the study and revised the paper.

Conflict-of-interest statement: The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Correspondence to: Dr. Sílvia Helena Barem Rabenhorst, Molecular Genetics Laboratory, Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo Street, 1315 - Rodolfo Teófilo - Fortaleza, Ceará 60430-270, Brazil. [srabenhorst@yahoo.com.br](mailto:srabenhorst@yahoo.com.br)  
Telephone: +55-85-99945689  
Fax: +55-85-32673840

Received: April 23, 2015  
Peer-review started: April 24, 2015  
First decision: June 2, 2015  
Revised: June 13, 2015  
Accepted: August 25, 2015  
Article in press: August 25, 2015  
Published online: October 7, 2015

### Abstract

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is present in more than half the world's population and has been

associated with several gastric disorders, such as gastritis, peptic ulceration, and gastric adenocarcinoma. The clinical outcome of this infection depends on host and bacterial factors where *H. pylori* virulence genes seem to play a relevant role. Studies of *cagA* and *vacA* genes established that they were determining factors in gastric pathogenesis. However, there are gastric cancer cases that are *cagA*-negative. Several other virulence genes have been searched for, but these genes remain less well known than *cagA* and *vacA*. Thus, this review aimed to establish which genes have been suggested as potentially relevant virulence factors for *H. pylori*-associated gastrointestinal diseases. We focused on the *cag*-pathogenicity island, genes with adherence and motility functions, and *iceA* based on the relevance shown in several studies in the literature.

**Key words:** *Helicobacter pylori*; Virulence genes; *Cag*-pathogenicity island; Motility genes; Adhesion genes

© The Author(s) 2015. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Core tip:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is present in more than half the world's population and has been associated with several gastric disorders. The clinical outcome of this infection depends on host and bacterial factors. Studies have established that *cagA* and *vacA* *H. pylori* genes are determining factors in gastric pathogenesis. This review aimed to examine which genes have been suggested as potentially relevant virulence factors for *H. pylori*, focusing on the *cag*-pathogenicity island, adherence and motility genes, and *iceA* based on the relevance shown in several studies.

da Costa DM, Pereira ES, Rabenhorst SHB. What exists beyond *cagA* and *vacA*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. *World J Gastroenterol* 2015; 21(37): 10563-10572 Available

## Characterization of Gastric Cardia Tumors: Differences in *Helicobacter pylori* Strains and Genetic Polymorphisms

Débora Menezes da Costa<sup>1</sup> · Eliane dos Santos Pereira<sup>1</sup> · Isabelle Joyce de Lima Silva-Fernandes<sup>1</sup> · Márcia Valéria Pitombeira Ferreira<sup>1</sup> · Sílvia Helena Barem Rabenhorst<sup>1</sup>

Received: 20 February 2015 / Accepted: 9 April 2015 / Published online: 24 April 2015  
© Springer Science+Business Media New York 2015

### Abstract

**Background** Gastric cancer results from a multifactorial process and is one of the most common causes of death worldwide. These tumors can arise in the distal stomach (non-cardia) and in the cardia region, presenting different characteristics and frequency of occurrence worldwide.

**Aims** To search for differences between tumors of different locations that could explain the presence of cardia tumors, considering *Helicobacter pylori* strains and genetic polymorphisms.

**Materials and Methods** DNA was extracted from gastric adenocarcinoma tissue of 127 patients. *Helicobacter pylori* genes were detected by PCR, and polymorphisms by PCR-RFLP.

**Results** Most of the tumors were located in non-cardia. The genotype 28152GA of *XRCC1* showed an increase in risk of cardia tumors. In analysis performed considering gender, women carrying *TNF*-308GA genotype showed a decreased risk of non-cardia tumors, while in men the decreased risk of non-cardia tumors was associated with *TNF*-308GG genotype. Genotypes combinations showed that the SNPs *RAD51* 135G>C, *XRCC3* 18067C>T, and

*XRCC1* 28152G>A had some combinations more frequent in cardia tumors, with an increased risk. Patients infected by *cagE*-positive strains presented a positive correlation with non-cardia tumors.

**Conclusion** The results showed some susceptibility differences between tumors of different locations. There was an increased risk relationship between three repair enzyme SNPs and cardia tumors, and the G allele of the cytokine gene *TNF* negatively influenced the development of non-cardia tumors. *Helicobacter pylori* strains seemed to be different in the cardia region, where they were less virulent than those located in the distal region of the stomach.

**Keywords** Cardia tumors · *Helicobacter pylori* · Repair enzymes · Interleukins

### Introduction

Gastric cancer is one of the most common causes of death worldwide. The prognosis of this disease is poor, particularly in Brazil, with a 5-year survival rate of 20–30 %, since most cases are diagnosed with advanced stage [1]. While *Helicobacter pylori* infection is a well-established cause of gastric cancer, different environmental and genetic factors (e.g., *H. pylori* virulence genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the host's genes) are involved in different stages of the cancer process [2]. Gastric tumors can arise in the distal stomach (non-cardia) and in the cardia region, and in the last four decades, there has been an increase in cases of cardia cancer, mainly in developed countries with remarkable geographic aggregation [3, 4]. These tumors seem to be different in some characteristics, and they are now recognized as two different clinical entities. However, what predisposes the

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10620-015-3666-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Débora Menezes da Costa  
debora\_mcosta@hotmail.com

Sílvia Helena Barem Rabenhorst  
srabenhorst@yahoo.com.br

<sup>1</sup> Molecular Genetics Laboratory, Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Street Coronel Nunes de Melo, 1315 – Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará 60430-270, Brazil

## APÊNDICE B – Tabelas Complementares

	Casos CG N (%)
<b>Gênero</b>	
Feminino	43 (34,4)
Masculino	82 (65,6)
Média de idade (anos)	63,5
<b>Subtipo Histológico</b>	
Intestinal	68 (54,4)
Difuso	57 (45,6)
<b>Localização Tumoral</b>	
Cárdia	29 (23,2)
Não-cárdia	96 (76,8)
<b>Estadiamento</b>	
I	16 (12,8)
II	31 (24,8)
III	36 (28,8)
IV	42 (33,6)

Polimorfismos	Total N (%)	< 50 anos N (%)	≥ 50 anos N (%)	p
<b>CDH1 -160 C/A</b>				
CC	66 (53,2)	10 (55,5)	56 (52,8)	-
CA	46 (37,1)	7 (38,8)	39 (36,8)	0.992
AA	12 (9,7)	1 (5,7)	11 (10,4)	1.00
<b>CDH1 -347 G/GA</b>				
GG	78 (63)	12 (66,6)	66 (62,2)	-
GGA	39 (31)	5 (27,7)	34 (32,1)	0.710
GAGA	7 (6)	1 (5,7)	6 (5,7)	1.00
<b>MLH1 -93 G/A</b>				
GG	73 (58,9)	12 (66,6)	61 (57,4)	-
GA	43 (34,7)	3 (16,7)	40 (37,7)	0.142
AA	9 (6,5)	3 (16,7)	6 (4,9)	0.354



## APÊNDICE C – Árvores de Classificação Complementares

Figura 1. Árvore de classificação do gene *CDKN2A* geral (sem separar por subtipo)

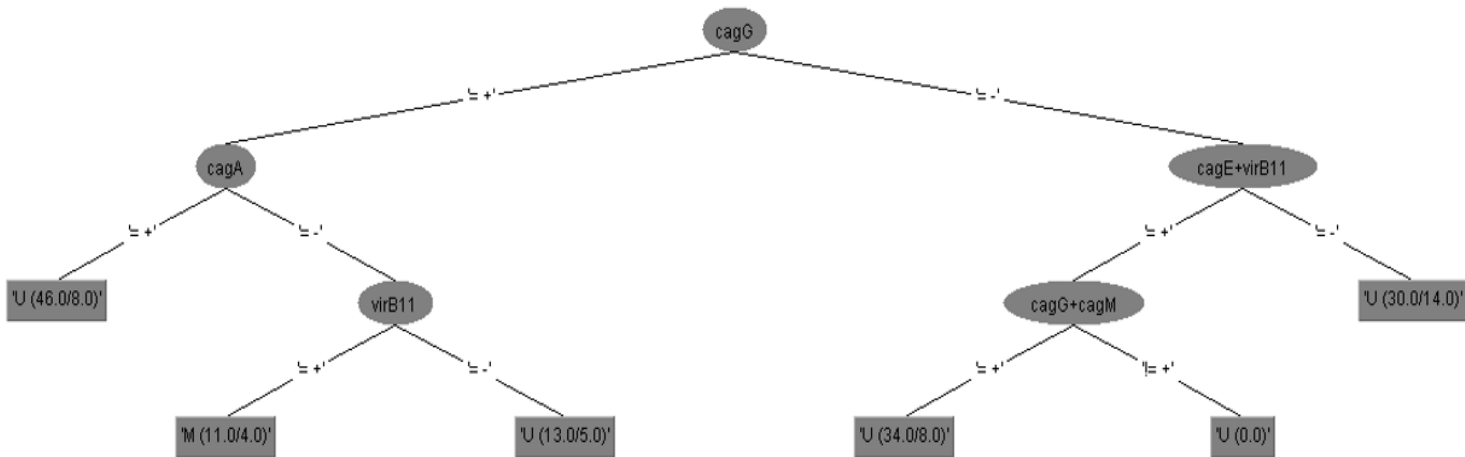


Figura 2. Árvore de classificação do gene *CDHI* geral (sem separar por subtipo)

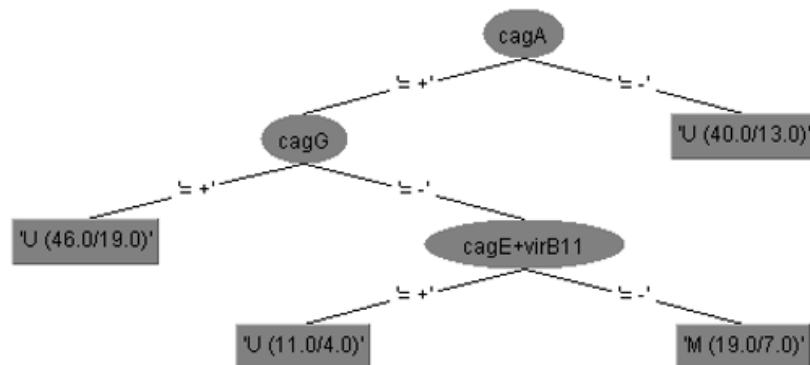


Figura 3. Árvore de classificação do gene *COX-2* geral (sem separar por subtipo)

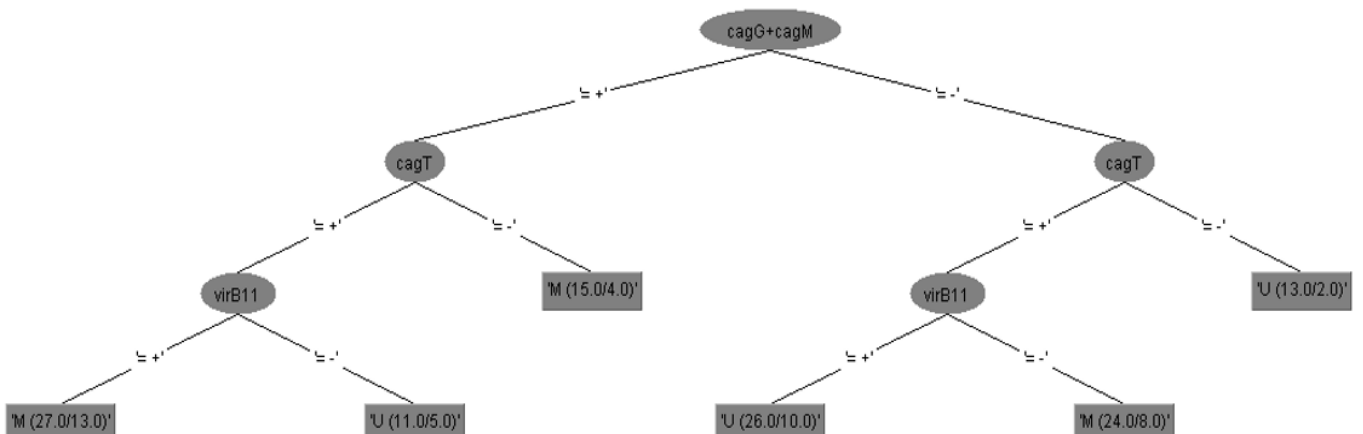


Figura 4. Árvore de classificação do gene *MLH1* geral (sem separar por subtipo)

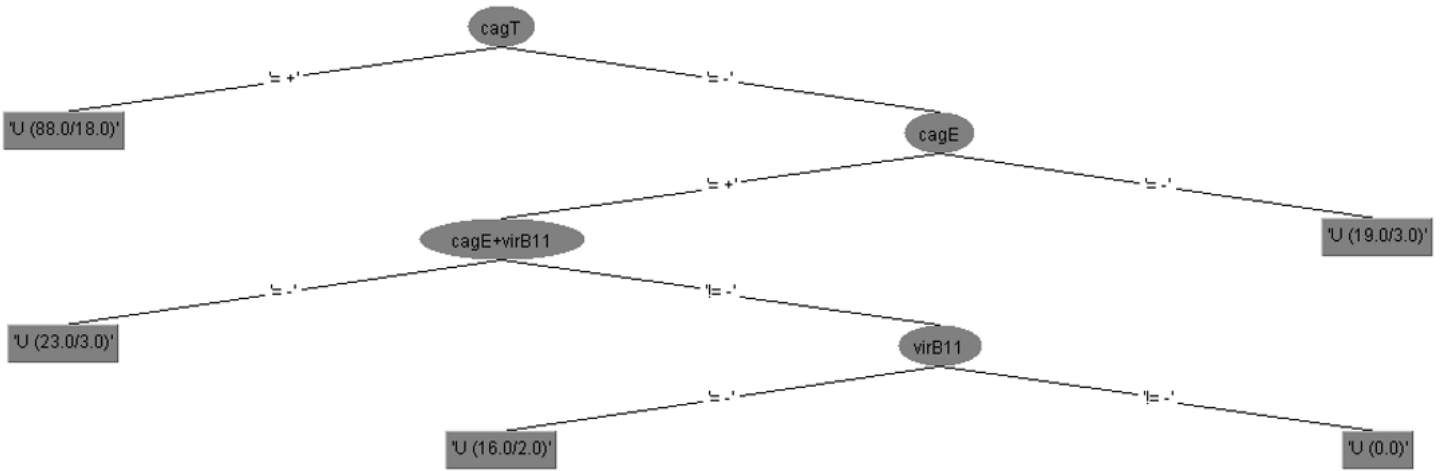


Figura 5. Árvore de classificação do gene *CDKN2A* em tumores do subtipo intestinal

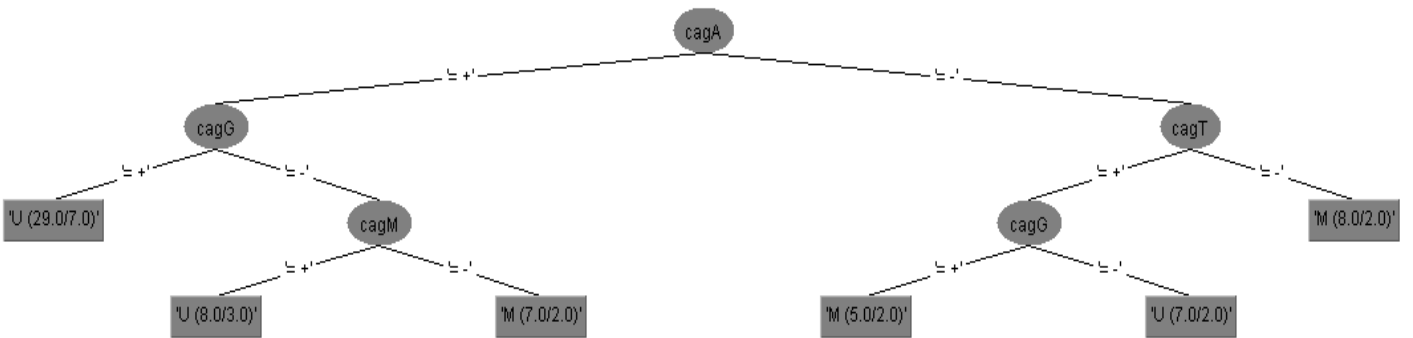


Figura 6. Árvore de classificação do gene *CDH1* em tumores do subtipo intestinal

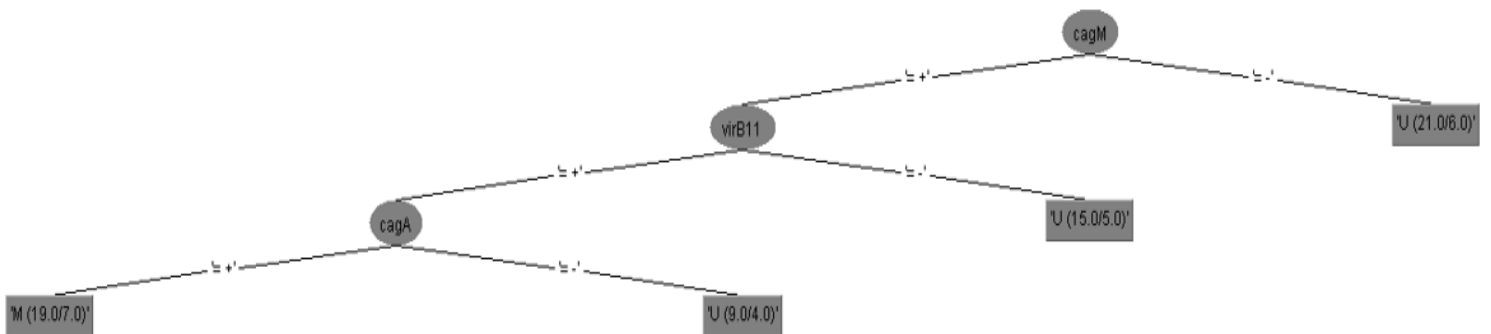


Figura 7. Árvore de classificação do gene *COX-2* em tumores do subtipo intestinal