

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR**

**ANGELA ROSA ANDRÉ**

**ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Helicobacter pylori* E  
DOS GENÓTIPOS *cagA* E *vacA* COM AS ALTERAÇÕES  
MOLECULARES DOS SUPRESSORES TUMORAIS *p53* E  
*p27* NOS ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS.**

FORTALEZA-CE

2008

**ANGELA ROSA ANDRÉ**

**ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Helicobacter pylori* E  
DOS GENÓTIPOS *cagA* E *vacA* COM AS ALTERAÇÕES  
MOLECULARES DOS SUPRESSORES TUMORAIS *p53* E  
*p27* NOS ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS.**

Dissertação submetida à  
Coordenação do Curso de Pós-  
Graduação em Patologia da  
Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em  
Patologia.

Área de Concentração: Patologia  
Tropical  
Orientadora: Profa. Dra. Sílvia  
Helena Barem Rabenhorst;

FORTALEZA – CE

2008

A573a André, Angela Rosa

Associação da presença de *Helicobacter pylori* e dos genótipos *cagA* e *vacA* com as alterações moleculares dos supressores tumorais *p53* e *p27* nos adenocarcinomas gástricos / Angela Rosa André. - Fortaleza, 2008.

144 f. : il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Helena Barem Rabenhorst.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Departamento de Patologia e Medicina Legal, Fortaleza-CE, 2008.

1. Neoplasias Gástricas. 2. *Helicobacter pylori*. 3. Carcinogênese. 4. Genes *p53*. 5. Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina *p27*. I. Rabenhorst, Sílvia Helena Barem (Orient.). II. Título.

CDD 616.99233

**ANGELA ROSA ANDRÉ**

**ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Helicobacter pylori* E  
DOS GENÓTIPOS *cagA* E *vacA* COM AS ALTERAÇÕES  
MOLECULARES DOS SUPRESSORES TUMORAIS *p53* E  
*p27* NOS ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS.**

Aprovada em 13/06/2008

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)**  
**Universidade Federal do Ceará - UFC**

---

**Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida**  
**Universidade Federal do Ceará - UFC**

---

**Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano**  
**Universidade Federal do Pará- UFPA**

---

**Profa. Dra. Márcia Maria Negreiros Pinto**  
**Universidade de Fortaleza - UNIFOR**

A Deus, Pai amado que me deu Família,  
Amigos, possibilidades, meios, orientação,  
apoio, fé, luz e força para a realização  
desse trabalho.

Ao meu querido Anjo da Guarda, amigo e  
protetor dos meus dias.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar aos meus Pais, Antônio André e Maria Rosa, exemplo genuíno e inspiração de vida.

Aos Pacientes e seus familiares, que mesmo no momento de pura ansiedade, medo e dor, se propuseram a participar do nosso estudo.

A Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst que, pela amizade, carinho, admirável dedicação, paciência, conhecimento, trabalho árduo e confiança em minha capacidade, me estimulou a realizar, perseverar e concluir esse trabalho.

A Profa. Dra. Márcia Valéria Pitombeira Ferreira, pela paciente e valorosa colaboração.

Ao Cirurgião Marcos Aurélio Pessoa Barros, pela dedicação, boa vontade e cordialidade, sempre presentes em cada uma das cirurgias por nós acompanhadas.

A Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini, pelo apoio irrestrito no andamento deste trabalho.

A doutoranda Adriana Ferrasi, pelo carinho, paciência e dedicação nas horas das cruéis dúvidas.

A Profa. Rosa Maria Salani Mota, por sua paciente e detalhada análise, a qual nos permitiu iniciar a efetiva materialização do nosso trabalho.

A minha família, fonte do exemplo de perseverança, da Força, da Fé, dos valores. Aconchego distante, real e vivo. Sempre.

Aos meus amigos, que me acompanharam no riso, no choro, no medo, na ansiedade e nas grandes e pequenas realizações. Que me estimularam e me fizeram acreditar sempre, por meio de muito, muito carinho.

Aos colegas de trabalho (Superiores, pares e subordinados), em especial à Equipe do SMC/HGeF e ao Cel Antonio André Cortes Marques, por sua confiança, valorização, carinho e apoio, essenciais na viabilização desse trabalho.

Ao Depto de Patologia/UFC-CE pela viabilização e manutenção da estrutura necessária ao nosso estudo e aperfeiçoamento. A cada um dos dedicados funcionários: meu muito obrigada.

Ao Hospital Universitário Walter Cantídeo e a Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza, pela colaboração e viabilização do presente estudo.

Ao laboratório LABOROCHA<sup>®</sup>, pelo fornecimento de material clínico proveniente da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza.

Ao Prof. Dalgimar Bezerra de Menezes, pela análise histopatológica dos tumores congelados e pelos valorosos ensinamentos. Sua dedicação, disposição e prestatividade são inesquecíveis.

A técnica laboratorial Margareth Gonçalves Maia pela exaustiva, freqüente, alegre e carinhosa dedicação.

As funcionárias Paula e Glícia, sempre pacientes e prontas para o auxílio.

Ao colega, companheiro e amigo querido, irmão do coração, Enfermeiro Marcos Antônio Pereira de Lima, pela presença e apoio irrestrito. Pela ternura, carinho, dedicação, lealdade e cumplicidade nesse árduo trabalho.

Ao colega, e querido amigo, Mário Henrique Girão Faria. Nosso mestre e aprendiz, amigo e mentor, pela paciência e dedicação, sempre tão crítica e carinhosa.

Ao amigo Jean Lima Prazeres, carinhoso incentivador.

A amiga, e irmã, Solange, meu iluminado “Anjo da guarda”, por tudo, sempre.

Aos colegas de Laboratório Carlos Henrique Paiva Granjeiro, Ana Claudia da Silva Mendes, Diogo Campos Sales, Thiago Fernando Vasconcelos Freire, Gervina Brady Moreira Holanda, Ailton Teles Fontenele Filho, Analice Marques Moreira, Germano Paulo Venceslau de Lima, Sérgio Beltrão Lima, pelo carinho e grande ajuda nas nossas numerosas horas de deliciosa convivência.

A todos os amigos do Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, pela alegria, dedicação, apoio companheirismo e carinho sempre.

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você  
estará fazendo o impossível".  
(São Francisco de Assis)

"A natureza jamais quebra suas próprias leis"  
(Leonardo da Vinci)

"A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma  
viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós".  
(Marcel Proust)



## Resumo

O carcinoma gástrico é a segunda causa de morte por câncer no mundo. No Ceará é o segundo mais freqüente entre os homens e o terceiro entre as mulheres. Dos cânceres gástricos os adenocarcinomas representam em torno de 95%. A doença tem sido associada a fatores genéticos e ambientais sendo demonstrada íntima relação com a infecção por *Helicobacter pylori*, principalmente associada à presença do gene *cagA* e genótipos *vacAs1m1*. Entretanto, apesar dos mecanismos pelos quais a bactéria promove a carcinogênese gástrica ainda não estarem esclarecidos, uma das hipóteses seria através da inativação de supressores tumorais. O objetivo do presente trabalho foi verificar, em adenocarcinomas gástricos, se a presença de *H. pylori*, e de seus genes *cagA* e *vacA*, está relacionada com a mutação e/ou alteração na expressão protéica dos supressores tumorais *p53* e *p27*. Neste estudo, 74 amostras de pacientes foram analisadas quanto à presença de *H. pylori*, *cagA*<sup>+</sup> e os genótipos de *vacA*, pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A análise mutacional do gene *p53* foi realizada por PCR-SSCP e a detecção da mutação/superexpressão do *p53* e expressão da proteína p27 pelo método imunohistoquímico. A bactéria foi detectada em 95% das amostras, das quais 63% eram *cagA*(+). Dentre os alelos de *vacA*, observou-se predomínio de *s1* (74%) e *m1* (82%), associados em 69% dos casos. Na análise mutacional do *p53* verificou-se que 72% dos casos exibiram alteração no padrão de mobilidade eletroforética, sendo esta associada significativamente à presença do gene *cagA*. Por outro lado, apenas 29% dos casos apresentaram detecção pelo método imunohistoquímico, não sendo encontrada associação com a *H. pylori*. A proteína p27 demonstrou acentuada redução em sua expressão (detectada em apenas 19% dos casos), não demonstrando atividade compensatória em relação à proteína p53 mutada e sem associação estatística dos casos negativos com a presença da *H. pylori*. Finalmente, os resultados sugerem que estes supressores simultaneamente inativados podem ser o ponto chave da desregulação do ciclo celular que, associados a outros fatores, favoreçam o desenvolvimento e progressão dos adenocarcinomas gástricos. Há indícios de que a presença bacteriana, e dos seus genes *cagA*(+) e *vacA/s1m1*, possam influenciar, de forma não esclarecida, as alterações moleculares ocorridas nos supressores tumorais *p53* e *p27*.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, Adenocarcinoma gástrico, Supressores tumorais, Carcinogênese gástrica.

## Abstract

Gastric carcinoma is the second cause of death by cancer in the world. On State of Ceara-Brazil is the second most frequent type of cancer in men and third in women. Adenocarcinomas account for approximately 95% of all malignant gastric neoplasms. It has been associated to genetic and environmental factors and a intimate relationship between the infection by the bacteria *Helicobacter pylori* and the gastric carcinoma have been related. The presence of the *cagA* gene and specific genotypes (*s1m1*) of the gene *vacA* have been detected in more pathogenic strains. Although the precise molecular mechanisms by which *H. pylori* could promote the process of gastric carcinogenesis are under investigation, one hypothesized mechanism involves the tumor supressor genes inactivation. The aim of the present study was to verify if the presence of *Helicobacter pylori*, *cagA* and *vacA* genes is related to mutations in the tumor supressor gene *p53* and altered expression of p53 and p27 proteins in gastric adenocarcinomas. Seventy-four (74) samples were analyzed to detect the presence of *H. pylori*, *cagA* and genotypes of *vacA* by Polymerization Chain Reaction (PCR). The mutational analysis of *p53* gene was performed by PCR-SSCP (Polymerization Chain Reaction for analysis of the Single-strand Conformation Polymorphism). Analysis of mutation or overexpression of p53 protein and p27 expression was detected by the immunohistochemical method. The bacteria was detected in 95% of the samples, 63% was *cagA(+)*. Among the *vacA* allele it was observed prevalence of *s1* (74%) and *m1* (82%), associated in 69% of the cases. Mutation analysis of *p53* demonstrated 72% of the cases with altered electrophoretic mobility; The alterations were significantly more frequent in the presence of the *cagA* gene. Immunohistochemical analysis detected only 29% of cases with the expression of p53 protein. The protein p27 showed accentuated reduction in its expression (detected in only 19% of the cases), it has not demonstrated compensatory activity in relation to the p53 altered protein, neither association to *H. pylori* presence. Finally, these data suggest that simultaneous inactivation of these tumor suppressors genes may be the key point of deregulation of the cellular cycle that, associated to the other factors, favor the development and progression of the gastric cancer. There is some evidence that the bacterial presence, *cagA* and *vacA/s1m1* genes, may influence, in a not understood way, the alterations observed in the tumor suppressors *p53* and p27.

Key words: *Helicobacter pylori*, Gastric adenocarcinoma, Tumor suppressors, Gastric carcinogenesis

# Índice de Ilustrações

## Lista de Figuras

Figura 1- Incidência de Câncer Gástrico em várias regiões do mundo, distribuído quanto ao sexo.....	16
Figura 2- Taxa bruta de incidência de Câncer Gástrico em regiões do Brasil.....	17
Figura 3- Distribuição anatômica dos tumores gástricos.....	19
Figura 4- Base molecular da carcinogênese gástrica.....	26
Figura 5- Modelo esquemático da Organização estrutural da proteína p53.....	29
Figura 6- Interação de p53 com a molécula de DNA.....	30
Figura 7- Ação bloqueadora da proteína p53 no ciclo celular. ....	33
Figura 8- Mecanismo básico de indução controle de p53 via Mdm2.....	34
Figura 9- Ação bloqueadora da proteína p27 no ciclo celular. ....	36
Figura 10- Organização genética do cluster de genes relacionados à produção da urease de <i>H. pylori</i> .....	39
Figura 11- Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo a procedência dos pacientes .....	55
Figura 12- Percentual de casos distribuídos segundo a profissão dos pacientes. ....	56
Figura 13- Percentual de casos distribuídos segundo o sexo .....	56
Figura 14- Percentual de casos distribuídos segundo a cor da pele.....	57
Figura 15- Percentual de casos distribuídos segundo o sexo e faixa etária.....	58
Figura 16- Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à presença dos fatores de risco por sexo .....	59
Figura 17- Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à presença de histórico familiar de câncer .....	59
Figura 18- Percentual de casos distribuídos quanto à localização anatômica dos tumores. ....	60
Figura 19- Percentual de casos distribuídos segundo a classificação de Laurén e a faixa etária dos pacientes.....	61
Figura 20- Percentual de casos distribuídos segundo a classificação de Laurén e sexo dos pacientes. ....	61
Figura 21- Percentual de casos distribuídos quanto ao estadiamento tumoral .....	62

Figura 22- Percentual de casos distribuídos quanto ao estadiamento tumoral e a faixa etária dos pacientes.....	63
Figura 23- Percentual de casos distribuídos segundo a classificação de Laurén e o estadiamento tumoral.....	63
Figura 24- Percentual de casos distribuídos quanto ao grau de diferenciação dos tumores. ....	64
Figura 25- Detecção do Gene <i>ureC</i> em gel de poliacrilamida.....	65
Figura 26- Distribuição da bactéria <i>H. pylori</i> nas diferentes regiões gástricas. ....	66
Figura 27- Distribuição bacteriana por sexo.....	66
Figura 28- Frequência de detecção de <i>H. pylori</i> em relação a faixa etária. ....	67
Figura 29- Distribuição do gene <i>cagA</i> . ....	67
Figura 30- Distribuição alélica do gene <i>vacA</i> . ....	68
Figura 31- Distribuição alélica de <i>vacA</i> em relação à presença do gene <i>cagA</i> . ....	68
Figura 32- Frequência de detecção de <i>H. pylori</i> em relação a Classificação de Laurén.....	69
Figura 33- Frequência de detecção de <i>H. pylori</i> nos tumores tipo intestinal e difuso.....	69
Figura 34- Distribuição de casos quanto a presença de <i>cagA</i> e a Classificação de Laurén.....	70
Figura 35- Distribuição dos casos quanto ao grau de diferenciação tumoral e a presença de <i>H. pylori</i> . ....	70
Figura 36- Percentual de casos distribuídos quanto a presença de <i>cagA</i> e a Diferenciação tumoral. ....	71
Figura 37- Percentual de casos distribuídos quanto ao estadiamento tumoral e a presença de <i>H. pylori</i> . ....	71
Figura 38- Percentual de casos distribuídos quanto a presença de <i>cagA</i> e estadiamento tumoral.....	72
Figura 39- Percentual de casos <i>cagA</i> (+) distribuídos quanto a Classificação de Laurén e estadiamento tumoral.....	72
Figura 40- Detecção imuno-histoquímica das proteínas p53 e p27 .....	73
Figura 41- Percentual de positividade da expressão nuclear das proteínas p53 e p27 .....	74
Figura 42- Percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 e p27 distribuído quanto à localização tumoral.....	74

Figura 43- Percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 e p27 distribuído quanto à Classificação de Laurén .....	75
Figura 44- Percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 e p27 distribuído quanto à diferenciação tumoral .....	75
Figura 45- Percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 e p27 distribuído quanto ao estadiamento tumoral.....	76
Figura 46- Percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 e p27 distribuído quanto a presença de <i>cagA</i> .....	76
Figura 47- Associação entre a presença do gene <i>cagA</i> e detecção imuno-histoquímica da proteína p27.....	77
Figura 48- Percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 e p27 distribuído quanto a variação alélica de <i>vacA</i> .....	78
Figura 49- Percentual de alterações no padrão de mobilidade eletroforética do gene p53, detectadas por PCR-SSCP. ....	78
Figura 50- Percentual de amostras com padrão de migração eletroforética alterado na análise por PCR-SSCP . ....	79
Figura 51- Gel de poliacrilamida a 12%, corados pela prata, após PCR-SSCP.....	79
Figura 52- Análise comparativa do percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 em relação à análise mutacional por PCR-SSCP .....	80
Figura 53- Análise mutacional de p53 em relação à presença de <i>cagA</i> .....	81
Figura 54- Associação entre a presença do gene <i>cagA</i> e mutações do gene p53/PCR-SSCP.....	81
Figura 55- Percentual de mutações do gene p53 (PCR-SSCP) em relação à detecção imuno-histoquímica de p27.....	82
Figura 56- Percentual de MEA do gene p53 (PCR-SSCP) e expressão imuno-histoquímica de p27 em relação a presença do gene <i>cagA</i> .....	82

## Lista de Tabelas

Tabela 1- Definição do TNM patológico para Câncer de Estômago.....	20
Tabela 2- Agrupamento por Estadiamento para Câncer de Estômago .....	21
Tabela 3- Referências dos Primers utilizados no presente estudo.....	52
Tabela 4- Casos de carcinoma gástrico distribuídos segundo a definição da profundidade da invasão tumoral (pT), comprometimento de linfonodos regionais (pN) e presença de metástases à distância (pM) .....	65
Tabela 5- Distribuição da bactéria <i>Helicobacter pylori</i> em casos de câncer gástrico, em diferentes partes do mundo.....	91
Tabela 6- Distribuição quanto à freqüência de expressão de p53 detectadas por IHQ em adenocarcinomas gástricos.....	97
Tabela 7- Detecção de alterações na mobilidade eletroforética do gene p53/PCR- SSCP em diferentes neoplasias malignas. ....	98
Tabela 8- Análise comparativa entre a detecção imuno-histoquímica (IH) e análise mutacional do gene p53 (SSCP) em diferentes neoplasias malignas.....	99

# Sumário

<b>1.0- INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1- Epidemiologia</b> .....	15
<b>1.2- Câncer gástrico</b> .....	19
<b>1.3- Estadiamento do Adenocarcinoma gástrico</b> .....	19
<b>1.3.1- Classificação dos Adenocarcinomas</b> .....	21
<b>1.4- Sinais e Sintomas</b> .....	22
<b>1.5- Etiologia</b> .....	23
<b>Fatores genéticos</b> .....	23
<b>Fatores ambientais</b> .....	24
<b>1.6- Carcinogênese Gástrica</b> .....	25
<b>1.6.1 - p53</b> .....	27
<b>Ciclo celular</b> .....	31
<b>Funções da proteína p53</b> .....	32
<b>1.6.2- p27</b> .....	35
<b>1.6.3- <i>Helicobacter pylori</i></b> .....	38
<b>1.7- <i>Helicobacter pylori</i> e câncer gástrico</b> .....	43
<b>2.0- OBJETIVOS</b> .....	45
<b>2.1- Geral</b> .....	45
<b>2.2- Específicos</b> .....	45
<b>3.0- MATERIAIS e MÉTODOS</b> .....	46
<b>3.1- Aspectos éticos</b> .....	46
<b>3.2-Coleta e armazenamento</b> .....	46
<b>3.3- Coleta de dados clínico-epidemiológicos e histopatológicos</b> .....	47
<b>3.4- Extração de DNA</b> .....	48
<b>3.5 -PCR-SSCP-Análise do Gene p53</b> .....	48
<b>3.6- Amplificação do gene <i>ureC/glmM</i></b> .....	49
<b>3.6.1- Genotipagem das cepas de <i>H. pylori</i> - Amplificação do gene <i>cagA</i></b> ..	50
<b>3.6.2- Genotipagem das cepas de <i>H. pylori</i> - Amplificação do gene <i>vacA</i></b> <b>(alelos <i>s1/s2</i> e <i>m1/m2</i>)</b> .....	51
<b>3.7- Método Imunohistoquímico</b> .....	52
<b>3.7.1- Análise Imuno-histoquímica</b> .....	53

3.8- Análise Estatística.....	54
4.0- RESULTADOS .....	55
4.1. Análise Clínico-epidemiológica.....	55
4.2. Análise Histopatológica .....	60
4.3. <i>Helicobacter pylori</i> e Câncer gástrico.....	65
4.3.1- Aspectos clínico-patológicos associados à presença de <i>H. pylori</i> ...	69
4.4. Análise imuno-histoquímica .....	73
4.4.1. Imuno-histoquímica e <i>Helicobacter pylori</i> .....	76
4.5- Análise Molecular de p53.....	78
5.0- DISCUSSÃO .....	84
5.1. Aspectos clínico-epidemiológicos.....	84
5.2. Aspectos Histopatológicos.....	88
5.3. Detecção de <i>Helicobacter pylori</i> e o câncer gástrico .....	90
5.4. Análise imuno-histoquímica e triagem mutacional .....	96
5.4.1- Alterações dos supressores tumorais p53 e p27 e <i>H. pylori</i> .....	102
6.0- CONCLUSÕES .....	107
7.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
ANEXOS.....	133

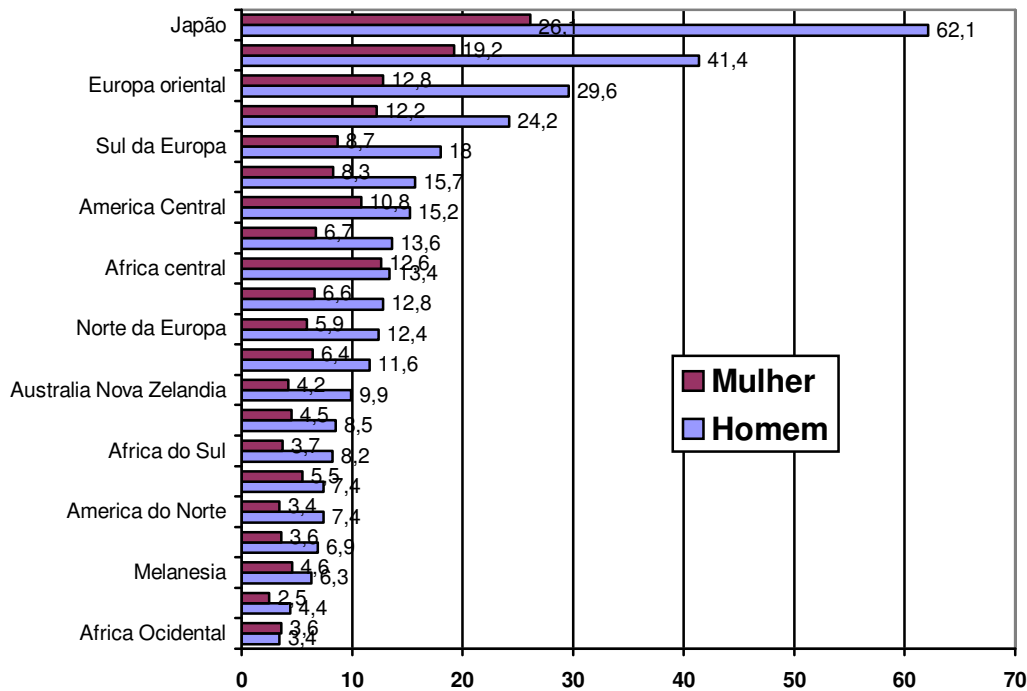


# INTRODUÇÃO

## 1.1- Epidemiologia

Dados estatísticos demonstram que o câncer atinge mais de 20 milhões de pessoas no mundo. No ano de 2002 foram estimados 10,9 milhões de novos casos e 6,7 milhões de mortes por câncer (PARKIN et al., 2005). Dados sobre a mortalidade no Brasil demonstram que, no ano de 2004, o câncer foi à segunda causa de morte entre as mulheres e a terceira entre os homens, representando 13,7% de todos os óbitos registrados no país (INCA, 2006). Dentre as doenças crônico-degenerativas as neoplasias malignas exigem uma abordagem diferenciada pois, além de representar um grande ônus social e institucional, apresentam crescente relevância como causa de morte (KLIGERMAN, 2001).

O câncer gástrico é o quarto tumor maligno mais freqüente no mundo, responde pelo segundo lugar em mortalidade por câncer e apresenta maior incidência, cerca de duas a três vezes, nos países em desenvolvimento (INCA, 2007). Segundo a *International Agency for Research on Cancer* – IARC (2005), as áreas com maior incidência (superior a 20/100.000 habitante) localizam-se na Ásia, especialmente Japão e China, Europa Oriental e partes da América Central e do Sul, incluindo Chile, Costa Rica e Brasil (Figura 1). O Japão detém a maior incidência de câncer de estômago no mundo, com índice de 44,1 por 100 mil habitantes (PARKIN et al., 2005), sendo esta a segunda maior causa de morte por câncer naquele país; na China tem sido reportada prevalência similar (PRINZ et al., 2006). Estudos realizados nos Estados Unidos (EUA) revelaram índices elevados em homens negros (STADTLÄNDER et al., 1999). Populações de baixo risco são encontradas entre brancos na América do Norte, Índia, Filipinas, maioria dos países da África, alguns países na Europa ocidental e Austrália (PLUMMER et al., 2004).



**Figura 1- Incidência\* de Câncer Gástrico em várias regiões\*\* do mundo, distribuído quanto ao sexo, 2002.**

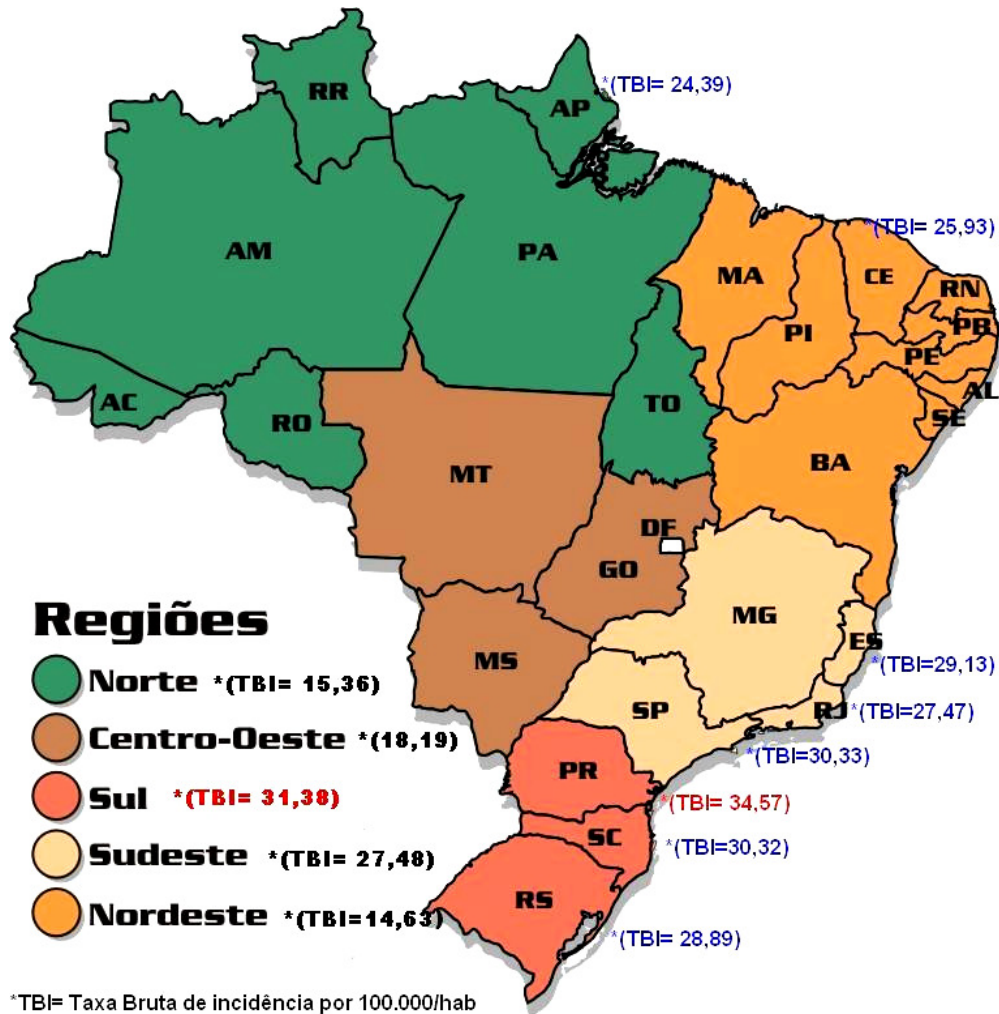
Fonte: International Agency for Research on Câncer – IARC, 2005.

\* Incidência calculada por 100.000 habitantes.

\*\*Regiões estabelecidas pela IARC

No Brasil, para o ano de 2008 é estimada a ocorrência de 21800 casos de câncer gástrico, em um total de 466.730 novos casos de câncer, sendo este o 6º tipo mais incidente. A taxa de incidência estimada entre os homens é de 15/100.000, enquanto nas mulheres de 8/100.000, exibindo uma relação homem: mulher de 1,88: 1,0. Na região Nordeste estima-se 3840 novos casos, sendo o segundo tipo mais freqüente de câncer entre os homens e o quarto entre as mulheres, não se considerando os tumores de pele não-melanoma (INCA, 2007).

Dentre os estados brasileiros o Ceará ocupa o sétimo lugar em número de casos, atrás de Paraná, São Paulo, Santa Catarina, Espírito Santo, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, correspondendo a uma taxa de 25,93/100.000, superior a taxa de incidência bruta nacional de 22,85/100.000 (Figura 2). Estima-se para o estado, em 2008, 1090 novos casos, sendo 290 na capital Fortaleza. (INCA, 2007). Vale observar que as altas Taxas Brutas de Incidência (TBI), observadas nas regiões sul e sudeste do Brasil (Figura 2), talvez se deva ao maior número de relatos da doença naquelas regiões, tendo em vista o grande número de estudos ali desenvolvidos.



**Figura 2– Taxa bruta de incidência de Câncer Gástrico em regiões do Brasil.**

Fonte dados: Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2007.

Fonte figura: Modificado de [www.unirio.br/mapa\\_brasil.jpg](http://www.unirio.br/mapa_brasil.jpg)

\* Incidência calculada por 100.000 Homens/Mulheres.

Há relatos nas últimas décadas de que a incidência do câncer gástrico tem diminuído no mundo (PARKIN et al., 1993, 2002; MUÑOZ e FRANCESCHI, 1997). Apesar das causas exatas não estarem esclarecidas é possível que este fato se deva especialmente à melhora nos hábitos alimentares da população, na conservação dos alimentos e também ao declínio na prevalência da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), tanto por meios indiretos, como a melhora nas condições sanitárias, quanto pela ação direta no diagnóstico e erradicação bacteriana (NARDONE, 2003). No Brasil se constata uma diminuição temporal das taxas de mortalidade por este tumor. No período entre 1979 e 2004 foi observada redução de 29,4% entre os homens e uma redução consideravelmente maior, de

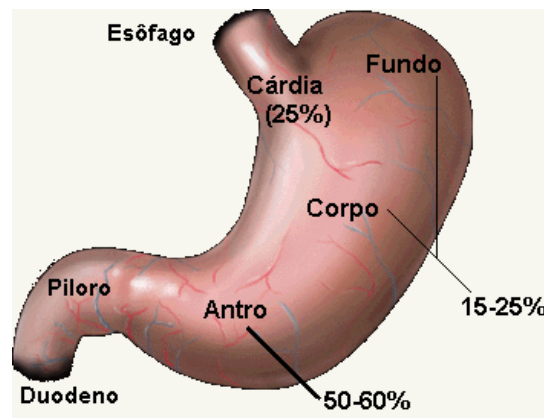
72,8%, entre as mulheres (INCA, 2006). Entretanto, apesar do declínio, o câncer gástrico continua dentre as localizações primárias mais incidentes e representa um desafio clínico pelo prognóstico geralmente ruim.

Um dos grandes problemas relacionados ao câncer gástrico é que, na maioria dos pacientes, o diagnóstico ocorre em estágios avançados (KONTUREK et al., 2006), restringindo as opções terapêuticas. Soma-se o fato de ser, o câncer gástrico, amplamente resistente à radioterapia e quimioterapia sendo a intervenção cirúrgica, na maior parte dos casos, o único tratamento com potencial curativo (NARDONE, 2003). Nestes tumores observa-se alta incidência de metástases e recorrência tumoral (WANG et al., 2004). As metástases mais comuns são para fígado, superfícies peritoneal e linfonodos não adjacentes. Muitas vezes as lesões gástricas volumosas podem acometer, por continuidade, o esôfago, fígado, intestino, pâncreas e diafragma. As células tumorais podem também desprender-se da serosa e, por meio da cavidade abdominal, envolver o peritônio ou implantar-se em órgãos intra-abdominais. Apesar da profundidade de invasão da parede gástrica se relacionar com menor sobrevida, o comprometimento linfático regional parece ser mais fidedigno como fator prognóstico (GREENE/AJCC, 2002).

A taxa de sobrevida média, após 5 anos, varia de 18% a 28% entre os países em desenvolvimento e desenvolvidos, respectivamente, sendo a média mundial estimada em torno de 21% (INCA, 2006). Kim (2003) relata que entre Coreanos residentes nos Estados Unidos (EUA), apenas 10 a 20% de todos os casos de câncer gástrico são diagnosticados em estágios iniciais, reduzindo a sobrevida para algo em torno de 10 a 20%. A autora ressalta ainda que nas regiões mundiais com alta prevalência da doença, 10 a 40% dos casos são detectados precocemente, aumentando a sobrevida para taxas que variam de 10 a 50%. No Japão a Fotofluoroscopia tem sido utilizada desde a década de 1960 para triagens populacionais em massa, visando à detecção precoce da doença. Além disso, os sistemas de diagnóstico e tratamento são bem estruturados naquele País, aumentando sua taxa de sobrevida para aproximadamente 52% em cinco anos (PARKIN et al., 2002). Nos casos em que a doença está limitada ao estômago e sem comprometimento linfonodal, a sobrevida pode aumentar para até 55% (GREENE/AJCC, 2002).

## 1.2- Câncer gástrico

Anatomicamente o estômago se divide em cinco regiões: cárdia, fundo, corpo, antro e piloro. A maior parte dos tumores (50 a 60%) se localiza na porção distal do estômago, antro e piloro; cerca de 25% na cárdia e de 15 a 25% no corpo e fundo (COTRAN, 2000). Nas últimas décadas têm se observado um aumento na incidência de tumores na região proximal, cárdia e fundo, sendo que estes possuem um pior prognóstico que os outros sítios anatômicos (WERNER, 2001; GREENE/AJCC, 2002).



**Figura 3– Distribuição anatômica dos tumores gástricos**

(COTRAN, 2000).

Figura adaptada de [www.sciencebob.com](http://www.sciencebob.com)

Histopatologicamente o câncer gástrico se origina freqüentemente na mucosa de revestimento do estômago, sendo o tipo mais comum o adenocarcinoma gástrico (95% dos casos). Os outros tipos encontrados são os linfomas gástricos (4%), os tumores carcinóides (3%) e os mesenquimais (2%), que incluem os leiomiossarcomas, schwanoma e os tumores estromais gastrointestinais (GIST) se originando na parede do órgão (COTRAN, 2000; SMITH et al., 2006).

## 1.3- Estadiamento do Adenocarcinoma gástrico

O estadiamento de uma neoplasia maligna avalia o seu grau de disseminação, refletindo sua taxa de crescimento e a extensão da doença, além do tipo de tumor. O estadiamento clínico é estabelecido a partir dos dados do exame

físico, exames complementares e da exploração cirúrgica, sendo essencial na seleção e avaliação do tratamento. Entretanto, todos os casos devem ser confirmados histologicamente, permitindo assim o estadiamento patológico, o qual se baseia nos achados cirúrgicos e no exame anátomopatológico da peça operatória. O estadiamento patológico pode ou não coincidir com o estadiamento clínico e não é aplicável a todos os tumores, contudo é a base para se estabelecer o estadiamento tumoral, sendo diretamente relacionado ao prognóstico (GREENE/AJCC, 2002).

O denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, preconizado pelo AJCC (*American Joint Committee on Cancer, 2002*), baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente, indicando a extensão da doença (Tabela 1). Além das graduações numéricas, as categorias T e N podem ser subclassificadas em graduações alfabéticas (a, b, c).

**Tabela 1** - Definição do TNM patológico para Câncer de Estômago

**Tumor Primário (pT)**

<b>TX</b>	Tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Sem evidência de tumor primário
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor invade a lâmina própria ou submucosa
<b>T2</b>	Tumor invade a muscular própria ou subserosa
<b>T2a</b>	Tumor invade a muscular própria

**Tumor Primário (pT)**

<b>T2b</b>	Tumor invade subserosa
<b>T3</b>	Tumor invade a serosa sem invadir estruturas adjacentes
<b>T4</b>	Tumor invade estruturas adjacentes

**Linfonodos Regionais (pN)**

<b>NX</b>	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Sem metástase para linfonodos regionais
<b>N1</b>	Metástase em 1 a 6 linfonodos regionais
<b>N2</b>	Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais
<b>N3</b>	Metástase em mais de 15 linfonodos regionais

**Metástase à distância (pM)**

<b>MX</b>	Presença de metástase a distância não pode ser avaliada
<b>M0</b>	Sem metástase à distância
<b>M1</b>	Com metástase à distância

Adaptado do *Cancer Staging Handbook* (AJCC, 2002).

Tanto as graduações numéricas como as alfabéticas expressam o nível de evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos. O símbolo "X" é utilizado quando uma categoria não pode ser devidamente avaliada (GREENE/AJCC, 2002; INCA, 2005).

Quando as categorias T, N e M são agrupadas em combinações pré-estabelecidas, ficam distribuídas em estádios que variam de I a IV, podendo ainda ser subclassificados em A e B (Tabela 2). O estadiamento agrupa tumores com uma mesma classificação histopatológica e extensão, os quais apresentam evolução clínica, resposta terapêutica e prognóstico semelhante (GREENE/AJCC, 2002; INCA, 2005).

**Tabela 2** - Agrupamento por Estadiamento para Câncer de Estômago

<b>Estadiamento</b>	<b>Combinações TNM</b>		
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T1	N1	M0
	T2a/b	N0	M0
<b>II</b>	T1	N2	M0
	T2a/b	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T2a/b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
<b>IIIB</b>	T3	N2	M0
<b>IV</b>	T4	N1-3	M0
	T1-3	N3	M0
	Qualquer	Qualquer	M1

Adaptado do *Cancer Staging Handbook* (AJCC, 2002).

### 1.3.1- Classificação dos Adenocarcinomas

Diferentes classificações histopatológicas foram propostas para os tumores gástricos, devido a grande diversidade de arranjos histológicos e arquitetônicos descritos (ESPINOZA et al., 1999). Dessa forma, o adenocarcinoma pode ser classificado em subtipos com características morfológicas distintas. Uma das sistematizações propostas é a da Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO), a qual contém cinco categorias: Tubular, Papilar, Mucinoso, Anel-de-Sinete e Indiferenciado (ESPEJO e NAVARRETE, 2003). A classificação freqüentemente

utilizada pelos patologistas ocidentais é a de Laurén (1965) a qual divide o câncer gástrico em dois tipos histomorfológicos bem distintos: Tipo intestinal e tipo difuso, diferentes quanto à epidemiologia, patogênese, evolução clínica e perfil genético.

O tipo intestinal é mais diferenciado, composto por células com núcleos grandes e irregulares que ainda apresentam coesão celular, permitindo a formação de estruturas tubulares do tipo glandular. É geralmente associado com lesões precursoras como a gastrite crônica e a metaplasia intestinal. Geralmente afetam a porção distal do estômago sendo mais freqüente em pacientes de maior idade, especialmente homens (STADTLÄNDER et al., 1999; BRESCIANI et al., 2003).

O tipo difuso, ou indiferenciado, apresenta pequenas células não coesas que são difusamente dispersas e não formam estruturas glandulares, se arranjando em um padrão não-polarizado. Podem apresentar o núcleo periférico, aspecto denominado de células em “anel-de-sinete” devido a uma alta produção de mucina, com conseqüente descentralização nuclear. Normalmente origina-se sem lesões precursoras identificadas histologicamente, sendo pouco mais freqüente em mulheres e jovens (CÉSAR et al., 2002). Ocorre normalmente em pacientes com menos de 50 anos, podendo apresentar um padrão de crescimento infiltrativo, com prognóstico menos favorável que o tipo intestinal. (BRESCIANI et al., 2003). Tem sido demonstrado que a hereditariedade é um fator importante para este tipo histológico (WERNER, 2001; BROWN, 2002; NARDONE, 2003), especialmente na Síndrome do câncer gástrico familiar do tipo difuso (CALDAS et al., 1999; BRESCIANI et al., 2003). Em alguns casos observa-se a apresentação de um padrão histológico com características intermediárias entre os tipos intestinal e difuso, sendo os mesmos denominados como “padrão misto” (ESPEJO e NAVARRETE, 2003; STADTLÄNDER et al., 1999).

#### **1.4- Sinais e Sintomas**

Durante o desenvolvimento do carcinoma gástrico, os sinais e sintomas observados são inespecíficos. Observa-se perda de peso, anorexia, fadiga, sensação de plenitude gástrica, vômitos, náuseas e desconforto abdominal persistentes, sendo normalmente confundidos com manifestações dispépticas comuns. A presença de massa palpável na parte superior do abdome, aumento do tamanho do fígado, de linfonodos na região supraclavicular esquerda e nódulos



periumbilicais, podem indicar estágio avançado da doença. A hematêmese (vômito com sangue) ocorre em cerca de 10 a 15% dos casos de câncer de estômago. Dentre os métodos atualmente empregados para o diagnóstico do câncer gástrico, a endoscopia digestiva alta tem se mostrado o mais prático e eficiente, pois além da visualização direta da lesão, permite a realização de biópsias para a avaliação citológica e histopatológica da mesma (INCA, 2005).

## 1.5- Etiologia

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico, destacam-se a predisposição genética (CALDAS et al., 1999; BRESCIANI et al., 2003; LYNCH et al., 2005; TAMURA et al., 2006, CHAN, 2006) e os fatores ambientais (CORREA, 2003; ENGEL et al., 2003; KATO et al., 2004a; QIU et al., 2005).

### Fatores genéticos

Estudos recentes têm associado à presença de alterações genéticas germinativas no gene *CDH-1/caderina-E*, com o desenvolvimento da Síndrome do câncer gástrico familiar do tipo difuso. Este gene codifica a proteína caderina-E, a qual se relaciona à adesão celular (CALDAS et al., 1999; BRESCIANI et al., 2003; LYNCH et al., 2005; TAMURA, 2006; CHAN, 2006). Observa-se também o desenvolvimento do câncer gástrico como parte de um amplo espectro tumoral associado a algumas Síndromes hereditárias, caracterizadas pela ocorrência de carcinomas em outros órgãos; dentre elas, o Câncer Colorretal Hereditário não Polipóide (HNPCC) ou Síndrome de Lynch, a Síndrome de Li-Fraumeni (LFS), causada por mutações germinativas no gene p53, a Polipose adenomatosa familiar (FAP) e a síndrome de Peutz-Jeghers (WERNER et al., 2001; CALDAS et al., 1999).

Há ainda relatos de polimorfismos em genes relacionados à produção de algumas citocinas inflamatórias, como as Interleucinas 10 e 1 $\beta$  (IL-10, IL-1 $\beta$ ), Fator de Necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), Interferon (INF- $\gamma$ ) e prostaglandinas (PGE). Tais polimorfismos podem alterar a transcrição gênica com conseqüente alteração na resposta imunológica individual a doenças infecciosas (PRINZ et al., 2006; KONTUREK et al., 2003), especialmente a infecção por *H. pylori*. Polimorfismos

relacionados à produção da Interleucina 8 (IL-8) têm sido relacionados ao aumento do risco de úlcera e câncer gástrico (LAMARQUE e PEEK, 2003; PERMIN et al., 2005; KAMALI-SARVESTANI et al., 2006). Os indivíduos geneticamente predispostos a maior produção dessa citocina apresentam risco mais alto para o desenvolvimento da doença, pois apresentam uma resposta inflamatória mais acentuada à exposição à bactéria *H. pylori*, levando a indução de gastrite crônica, gastrite atrófica e finalmente câncer gástrico (KAMALI-SARVESTANI et al., 2006; OHYAUCHI et al., 2005). Há ainda, dentre os fatores genéticos, relatos de maior frequência de câncer gástrico entre indivíduos do grupo sanguíneo tipo A, especialmente entre os homens, sobressaindo-se o tipo difuso (STADTLÄNDER et al., 1999). Estima-se que 5-10% dos adenocarcinomas gástricos se devam a fatores hereditários (PARK et al., 2000). Além disso, dentre os fatores do hospedeiro são observadas também alterações na secreção gástrica ácida e hormonal (hipergastrinemia), além do aumento da proliferação celular pela ativação de protooncogenes (KONTUREK, 2003; EVERS, 2005; TAHARA, 2004).

## **Fatores ambientais**

Os fatores ambientais incluem o tabagismo, já identificado como um fator de risco (CÉSAR et al., 2002; YOU et al., 2000); o refluxo biliar crônico, o qual tem sido associado à metaplasia intestinal da cárdia, podendo apresentar um importante papel na carcinogênese nesse sítio gástrico (DIXON et al., 2002); o uso do álcool, com estudos controversos e não conclusivos para o carcinoma gástrico (BRITO, 1997; HAMADA et al., 2002; MAYNE e NAVARRO, 2002; ENGEL et al., 2003 ); cirurgia gástrica anterior e história de lesões, ainda que benignas (CÉSAR et al., 2002).

O tipo de dieta pode também influenciar no risco do desenvolvimento do câncer gástrico. Dieta rica em sal, a qual pode lesar a mucosa gástrica tornando-a mais suscetível à ação de agentes genotóxicos, ingestão de alimentos em conserva, defumados, carnes curadas, peixes secos e outros alimentos conservados em sal são fatores fortemente associados ao risco (BRITO, 1997); enquanto que dietas ricas em frutas, legumes frescos, ácido ascórbico ou vitamina C podem reduzir o risco de displasias e câncer gástrico (YOU et al., 2000; TEIXEIRA e NOGUEIRA,

2003). Os compostos *N*-nitrosos, como nitrosaminas, nitrosamidas e nitrosouréias, também apresentam atividade carcinogênica e podem ser formados endogenamente a partir da ingestão de nitritos e nitratos. Estes, além de encontrados na natureza são também amplamente utilizados na preservação de alimentos e como fertilizantes na agricultura. Os nitratos formados endogenamente têm sua síntese modulada por alterações funcionais do estômago, como hipocloridria ou acloridria, as quais podem permitir a colonização por bactérias redutoras de nitrato a nitrito (GOMES-CARNEIRO et al., 1997; RAJ et al., 2003).

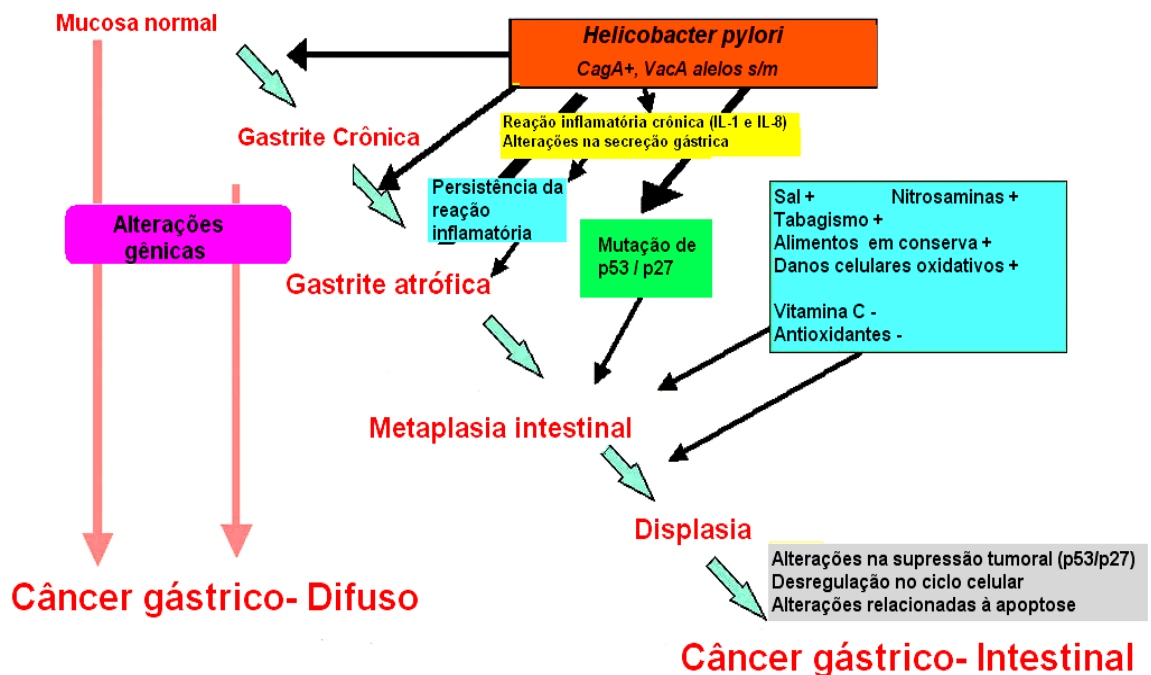
Dentre os agentes infecciosos, a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), considerada agente carcinogênico do grupo I pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1994), tem sido destacada nas últimas décadas visto sua relação com a gastrite crônica ativa, com o desenvolvimento de úlceras gástricas e duodenais e aumento do risco de câncer gástrico (PARSONNET, 1995; YAMAOKA et al., 1999a; MARSHALL, 2002; SUGIYAMA, 2004; PRINZ et al., 2006; CREW e NEUGUT, 2006). Há também evidências de associação entre a infecção pelo vírus Epstein-Barr, considerado um agente carcinogênico do grupo I (IARC, 1997), com o câncer gástrico (LIMA, 2006; STADTLÄNDER et al., 1999).

## 1.6- Carcinogênese Gástrica

A carcinogênese resulta de um processo com múltiplas etapas, as quais envolve uma transformação clonal e um desregulado crescimento de células que adquiriram mutações genéticas (TAHARA, 2004). O processo de transformação da mucosa normal até o estágio do câncer gástrico é influenciado por fatores ambientais como a alimentação, infecção por diferentes cepas de *H. pylori* e também por fatores do hospedeiro.

A carcinogênese gástrica é proposta ser iniciada por uma gastrite crônica a qual progride com atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia (WERNER et al., 2001). Estas condições costumam ser seqüenciais e ocorrer através de anos, como resultado da exposição aos vários fatores endógenos e exógenos (Figura 4), como esquematizado por Konturek et al. (2003). A metaplasia intestinal decorre da transformação do epitélio gástrico, glandular e de revestimento, após um processo inflamatório crônico, em células colunares e calciformes de morfologia intestinal.

Essa alteração é comumente associada à presença da bactéria *H. pylori* (PARSONNET, 1995; CÉSAR et al., 2002).



**Figura 4-Base molecular da carcinogênese gástrica.**

Adaptado de Konturek et al., 2003 (Cascata de Correa modificada-1992).

Para o adenocarcinoma gástrico tipo intestinal foi proposto por Correa (1975, 1992) um modelo da carcinogênese gástrica denominado “Cascata de Correa”. Esse modelo é descrito como uma série de eventos seqüenciais, onde se verifica padrões histopatológicos nos diferentes estágios pré-cancerosos, sendo os passos básicos: gastrite ativa crônica → gastrite atrófica (atrofia glandular) → metaplasia intestinal → displasia e finalmente o câncer gástrico (CORREA, 2003; KONTUREK et al., 2003). Este processo é precedido e acompanhado de diversas mudanças na biologia molecular das células mucosas, particularmente na área de regeneração das glândulas gástricas, de onde normalmente se origina o câncer. Identificam-se nesse processo diversas alterações em genes específicos que desempenham papéis importantes nas diversas funções celulares, os quais incluem os genes supressores tumorais p53 e p27 (CORDON-CARDO, 1995; SANDHU e SLINGERLAND, 2000; WERNER et al., 2001). A presença bacteriana também tem se mostrado um fator significativo nesse processo visto que, sua erradicação em

pacientes com câncer gástrico, em estágio inicial, é acompanhada por melhora na secreção ácida gástrica, remissão da gastrite localizada no corpo gástrico e decréscimo dos compostos nitrosos associados com a carcinogênese gástrica (UEMURA e OKAMOTO, 2000).

As alterações genéticas (na seqüência do DNA) e epigenéticas (no padrão de expressão gênica sem que haja mudança na seqüência do DNA) observadas no câncer gástrico são comuns a outros tipos de câncer e envolvem genes reguladores do ciclo celular (oncogenes), genes reguladores da apoptose, moléculas de adesão celular, genes supressores tumorais e genes envolvidos no reparo do DNA, sendo muitas vezes associadas a presença de *H. pylori* (TAHARA, 1993; YASUI et al., 2000; YOKOZAKI et al., 2001).

Dentre as alterações gênicas envolvidas no complexo processo tumorigênico, possuem destaque, pela sua função, os supressores tumorais. Os genes supressores tumorais codificam proteínas que inibem e/ou controlam a divisão celular, entretanto, as células em sua transformação maligna encontram meios de evasão a esses sinais supressores, bem como, a aqueles enviados pelas células vizinhas (WEINBERG, 1996). Além disso, mutações observadas nesses genes levam subsequentemente a alterações na expressão de proteínas envolvidas na proliferação celular. A conseqüência é a seleção clonal dessas alterações, as quais conferem as células vantagens seletivas de proliferação e sobrevivência, favorecendo o crescimento tumoral.

### **1.6.1 - p53**

O gene *p53* (TP53) é um supressor tumoral freqüentemente mutado em diversos tipos de câncer humano. Localiza-se no braço curto do cromossomo 17p13.1, abrange 20 Kb e contém 11 exons os quais codificam, principalmente, uma proteína de 53 kD, regulatória na replicação do DNA, proliferação celular e apoptose (HUSSAIN e HARRIS, 1998). O exon 1 é não codificante, se relacionando com o controle dos níveis da proteína p53 na célula (MOSNER et al., 1995). O exon 2 codifica a extremidade protéica N-terminal enquanto o exon 11 codifica a extremidade C-terminal. Os exons 4-9 codificam o domínio protéico de ligação ao DNA, nessa região se encontram os denominados pontos quentes (*hotspots*) para as

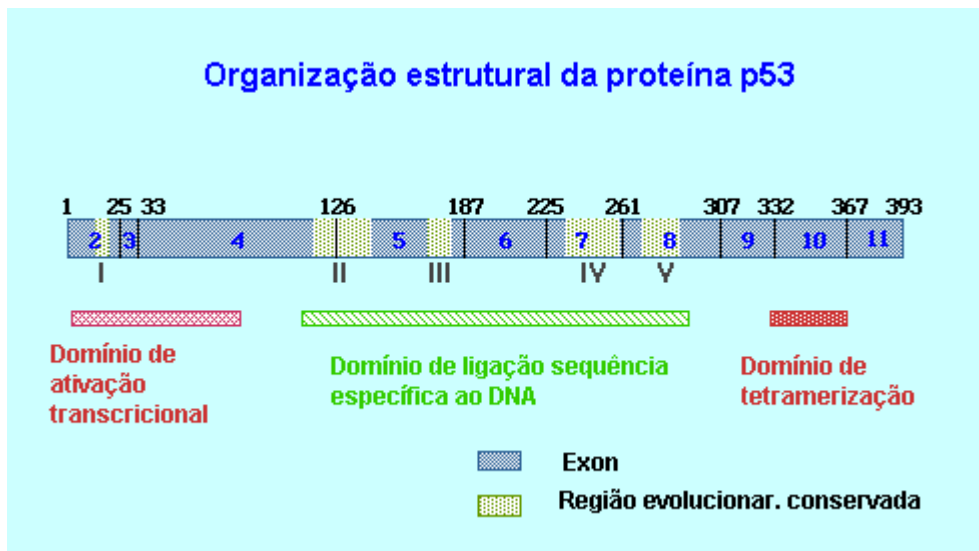
mutações detectadas em quase todos os tipos de câncer (GUIMARÃES e HAINAUT, 2002).

O papel protetor do gene *p53* é claramente ilustrado na Síndrome Familiar de Li-Fraumeni, na qual a transmissão de um alelo mutante predispõe ao desenvolvimento de múltiplas formas de câncer, dentre as quais predominam os sarcomas, câncer de mama e cérebro (GUIMARÃES e HAINAUT, 2002; OLIVIER et al., 2003). Mutações nesse gene levam à inativação da proteína *p53* e estão presentes na maioria dos cânceres invasivos. As mais observadas incluem perda de alelos, mutações de ponto (em torno de 75% “missense”, resultando na substituição de um aminoácido por outro) e inativação da proteína por sequestro por antígenos virais ou proteínas celulares (HAINAUT et al., 1998; GUIMARÃES e HAINAUT, 2002; SHIBATA et al., 2002; OLIVIER et al., 2003).

A fosfoproteína nuclear *p53* é composta por 393 aminoácidos e funciona como um fator de transcrição. É sintetizada continuamente e nas células normais está presente em baixas concentrações, não se acumulando em níveis significativos, por possuir meia vida curta, em torno de 5 a 20 minutos (FENOGLIO-PREISER et al., 2003).

A regulação dos níveis da proteína *p53* é mantida pela interação desta com a proteína Mdm2 em um mecanismo de “feedback” auto-regulatório. A Mdm2 é transcripcionalmente ativada por *p53* e inibe a sua atividade de três formas: Atuando como ubiquitina-ligase, o que leva a ubiquitinação de *p53* com conseqüente degradação pelos proteossomos; bloqueando a transativação mediada por *p53*, por ligação a seu domínio de transativação e induzindo seu transporte para o citoplasma, por conter um sinal de exportação nuclear, com conseqüente inativação funcional (CHÈNE, 2003, 2004). Danos ao DNA levam a uma fosforilação de *p53*, o que reduz sua ligação à Mdm2, com conseqüente diminuição de sua degradação e aumento na concentração intracelular. Dessa forma, a menor ligação com a Mdm2 resulta em maior atividade de *p53* no estímulo da transcrição gênica (ALBERTS et al., 2004). A forma mutada de *p53* possui maior estabilidade e meia-vida superior a da proteína selvagem, isso resulta em uma acumulação nuclear da mesma permitindo assim sua detecção pela técnica imuno-histoquímica. O acúmulo da proteína *p53* pode, por essa razão, ser considerada como um indicador da mutação do gene *p53* (ROVIELLO et al., 1999).

A organização estrutural da proteína p53, e a correlação dos domínios de atividade com os exons, são esquematizadas na figura 5. Estudos comparativos, entre diversas espécies, das seqüências de aminoácidos da p53 identificaram 5 regiões altamente conservadas, denominadas domínios I-V, os quais parecem ser cruciais para o adequado desempenho de suas funções (SOUSSI et al., 1990). Os resíduos dentro desses domínios apresentam diferentes freqüências de mutações; A maioria delas resulta em alterações nos resíduos de contato com o DNA (mutações nos codons 245, 248 e 273) ou de conformação da proteína (códon 175, 249 e 282), representando aproximadamente 30% das mutações detectadas em quase todos os tipos de câncer (GUIMARÃES e HAINAUT, 2002).



**Figura 5. Modelo esquemático da Organização estrutural da proteína p53.**

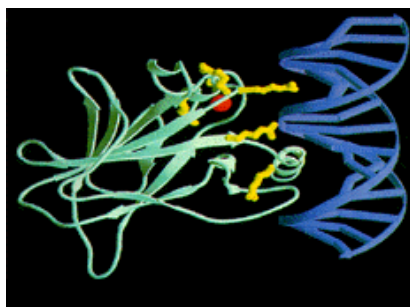
(Adaptado de [www.genome.ad.jp](http://www.genome.ad.jp)).

A p53 se apresenta com a arquitetura clássica de um fator de transcrição seqüência-específico. Sua forma ativa, com conformação em tetrâmero, possui uma região N-terminal (a.a. 1-100. exons 2-4), a qual contém o domínio transativador da transcrição; uma região central (a.a. 100-300. exons 5-8), hidrofóbica, a qual se liga a seqüências específicas do DNA; uma região C-terminal (a.a. 300-393. exons 9-11), altamente básica, domínio regulatório, transcricional e de tetramerização (GUIMARÃES e HAINAUT, 2002; LOKSHIN et al., 2007).

Na região N-terminal, encontra-se uma região rica em prolina (a.a 60-90) que possui papel seletivo na transativação e apoptose (LOKSHIN et al., 2007).

Nesse ponto verifica-se uma alta flexibilidade intramolecular, a qual permite a interação, de alta afinidade, com uma grande variedade de proteínas celulares. Além disso, como região transativadora da proteína, a região N-terminal se liga um grande número de proteínas celulares e virais, sendo alvo de inúmeras modificações pós-traducionais, que vão regular a atividade da p53 (SOUSSI e MAY, 1996). Esta região contém o sítio de ligação para a mdm2, principal regulador da estabilidade da proteína p53 (GUIMARÃES e HAINAUT, 2002).

O domínio de ligação ao DNA, localizado na região central, é ligado ao domínio de tetramerização (aa 325-355) por um conjunto de 25 aminoácidos, os quais contêm um sinal de localização nuclear. Sua estrutura consiste de 2 folhas  $\beta$  antiparalelas formando um suporte em “sanduíche” para os outros três elementos estruturais: um motivo alça-folha-hélice (LSH), que se liga ao sulco maior do DNA; alça L2, associada a alça L3 promovendo a estabilização da proteína; alça L3, que vai interagir com o sulco menor do DNA. As alças L2 e L3 são mantidas juntas por um átomo de zinco tetracoordenado com a Cys176 e Hys179, na alça L2, e Cys238 e Cys242, na alça L3 (Fig. 6). Estes três resíduos de cisteína são essenciais para ligação ao DNA e transativação, se encontrando mutados em uma grande diversidade de tumores. A grande maioria das mutações já mapeadas no *p53* se concentra nesta região (CHO et al., 1994; GUIMARÃES e HAINAUT, 2002; LOKSHIN et al., 2007).



**Figura 6– Interação de p53 com a molécula de DNA (Reproduzido de CHO et al., 1994)**

Observa-se a estrutura do domínio central de p53 (verde) ligando-se ao DNA (azul). Em amarelo, aminoácidos mutados relacionados à ligação ao DNA. Em vermelho o átomo de Zinco.

Na região C-terminal, básica, encontram-se três sinais de localização nuclear, que possibilitam a migração da proteína do citoplasma para o núcleo: um domínio de oligomerização, associado a tetramerização da p53; uma seqüência que reconhece o dano primário no DNA; um domínio regulatório da transcrição, o qual desempenha



um importante papel regulatório na ligação de p53 a seqüências específicas do DNA. Esta região pode se associar, de maneira seqüência-independente, com várias formas de DNA e RNA (LOKSHIN et al., 2007).

## **Ciclo celular**

O ciclo celular é controlado por diversos mecanismos os quais visam garantir a correta divisão celular. Esta divisão consiste em dois processos consecutivos, caracterizados pela replicação do DNA e pela segregação dos cromossomos duplicados nas duas células formadas. O ciclo é composto por quatro estágios: G1 (gap 1) onde a célula aumenta de tamanho e prepara-se para copiar seu DNA. A replicação ocorre na fase seguinte e é denominada fase S (síntese), ela permite que a célula duplique precisamente seus cromossomos. Após a replicação inicia-se a fase G2 (gap 2), durante a qual a célula prepara-se para a fase M (mitose), na qual a célula-mãe se divide para produzir duas novas células, com igual número de cromossomos. As células-filhas podem reentrar imediatamente em fase G1, e reiniciar o ciclo celular, ou podem pará-lo temporária ou definitivamente, entrando na fase G0 (quiescência ou repouso).

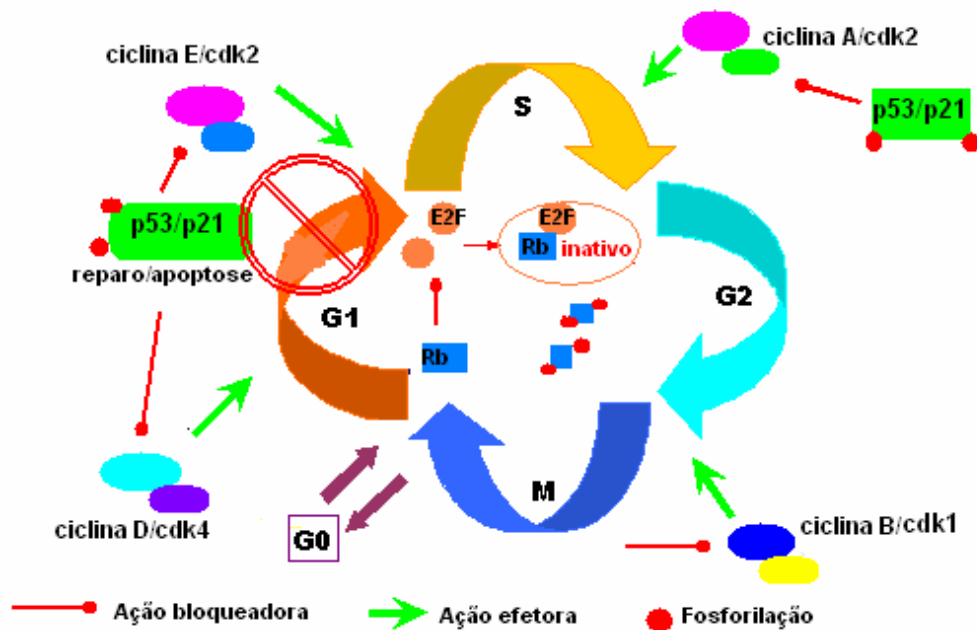
Entre as fases G1-S e G2-M estão os principais pontos de checagem celular (*checkpoints*), eles ocorrem entre as diferentes fases do ciclo e consistem na verificação, pela célula, da sua própria integridade funcional. O ponto G1/S é controlado pela via do pRB (proteína do retinoblastoma); Caso a célula ultrapasse este ponto, ela é compelida a replicar seu DNA. Na ocorrência de cópia incorreta ou lesões no DNA durante a fase S, a célula não ultrapassará o outro ponto de checagem G2/M, acarretando então a parada do ciclo ou apoptose (morte celular). A célula pára o processo de divisão para que a maquinaria de reparo — proteínas específicas capazes de corrigir os variados danos celulares — seja acionada e, após o reparo, possa dar continuidade ao ciclo. Por outro lado, quando o dano não puder ser corrigido, a eliminação da célula danificada ocorrerá por apoptose. Ambos os processos são dirigidos pela proteína p53, importante elo de conexão entre o ciclo celular e a apoptose, e também conhecida como “Guardião universal” do genoma (VERMEULEN et al., 2003; LOKSHIN et al., 2007).

Estudos sugerem que o início do reparo do DNA ou da apoptose, dependentes da p53 é determinado pelo nível de dano acumulado no DNA: baixos

níveis ativariam o reparo do DNA enquanto que altos níveis o suprimiriam, induzindo a apoptose celular (EL-DEIRY, 1998; OFFER et al., 2002; BARCINSKI, 2004).

### **Funções da proteína p53**

A ocorrência do estresse celular, com conseqüentes lesões do DNA, provoca uma fosforilação de p53 com conseqüente alteração de sua conformação, tornando a mais estável e levando ao seu rápido acúmulo nuclear. A proteína, atuando como um fator de transcrição, induz a síntese de uma cdkl (Inibidor de quinases dependentes de ciclinas) da família Cip/Kip denominada p21 (Waf1, Cip1), a qual inibe a atividade de complexos ciclinas/cdk (quinases dependentes de ciclinas) específicos das fases G1/S e S (A/cdk2 e E; D1/cdk4), impedindo a célula de prosseguir seu ciclo normal (Figura 7). Com o aumento de p21, os complexos ciclina-cdk por ela inibidos perdem a capacidade de fosforilar seu principal substrato, a Proteína Retinoblastoma (pRB). A pRB na sua forma hipofosforilada seqüestra então o fator de transcrição E2F, necessário para a síntese de DNA celular. O bloqueio na progressão do ciclo celular se dá então antes da fase S, viabilizando o reparo do DNA. Essa cdkl atua também, em menor extensão, bloqueando a ação dos complexos B/cdk1, os quais possuem ação específica na fase M do ciclo (CORDON-CARDO, 1995; VERMEULEN et al., 2003).



**Figura 7- Ação bloqueadora (fase G1/S) da proteína p53 no ciclo celular.**

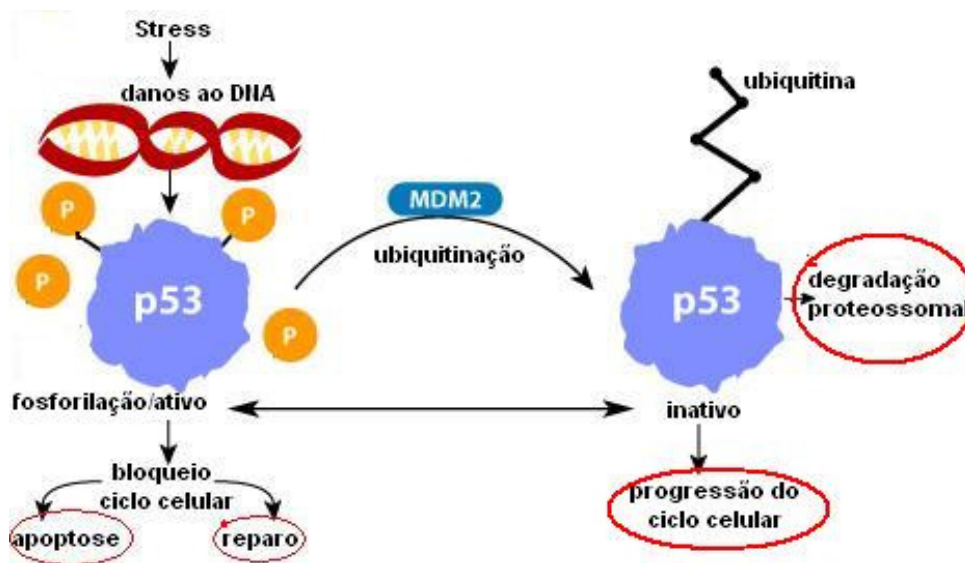
A ilustração acima esquematiza as vias pelas quais a transativação do p21 pelo p53 ocasiona a parada do ciclo celular.

(Adaptado de CORDON-CARDO, 1995).

Além de inibir a atividade do complexo ciclina-cdk a proteína p53 também pode se ligar ao PCNA (Antígeno nuclear de proliferação celular), fator essencial para a replicação do DNA. Após essa etapa, caso ocorra à persistência do dano, a célula pode ser induzida a apoptose (CORDON-CARDO, 1995; ALBERTS et al., 2004). Os mecanismos pelos quais a p53 induz a apoptose ainda não estão totalmente esclarecidos, entretanto, sua forma ativa pode induzir também a expressão de vários outros genes envolvidos com esse processo (EL-DEIRY, 1998; LACROIX et al., 2006).

Os fatores determinantes da resposta da célula à ativação da p53 ainda não estão totalmente esclarecidos. A combinação exata dos efetores ativados pela p53 pode diferir de uma célula para outra dependendo da natureza do sinal indutor, sua intensidade, o tecido considerado e o grau de diferenciação celular. Além disso, a ativação simultânea de diferentes vias bioquímicas na célula contribui de forma importante na determinação da resposta final da célula a um determinado estímulo, explicando, assim, a extrema heterogeneidade de respostas dependentes da p53 (PLUQUET e HAINAUT, 2001; GUIMARÃES e HAINAUT, 2002).

Quanto à inativação da p53 observam-se diferentes mecanismos: Inibição pela proteína celular Mdm2 (Fig. 8), pela ligação ao domínio N-terminal; modificações bioquímicas pós-traducionais; mutações gênicas; Inativação por oncoproteínas virais como a proteína E6 do Vírus do papiloma Humano (HPV); alterações nos reguladores da p53 e/ou nos seus genes alvos (LACROIX et al., 2006).



**Figura 8- Mecanismo básico de indução controle de p53 via Mdm2.**

A presença de quebra de na cadeia de DNA induz a expressão/ativação de p53 ocasionando o bloqueio do ciclo celular. A associação com a proteína Mdm2 com a proteína p53 induz a degradação da mesma via ubiquinina, inativando-a e restabelecendo a progressão do ciclo. (Adaptado de [www.emdbiosciences.com/sharedimages](http://www.emdbiosciences.com/sharedimages))

O desempenho da atividade supressora da p53 depende de sua integridade estrutural e funcional, que permita sua associação com as diversas proteínas co-regulatórias envolvidas no ciclo celular ou apoptose. Contudo, observa-se que a maior parte dos tumores humanos é acompanhada de alterações no gene *p53*. Em relação ao adenocarcinoma gástrico, Fenoglio-Preiser et al. (2003), em artigo de revisão, relata que as mutações de p53 ocorrem numa frequência de 0% a 77% dos casos. Há relatos de detecção da mutação ou perda de heterozigosidade (LOH) de p53 em cerca de 30% dos casos, independente do subtipo histológico (WERNER et al., 2001). Já Cho et al. (1999) verificou alterações nesse gene em 40%-60% dos carcinomas gástricos avançados, do tipo intestinal, e 20% dos carcinomas gástricos

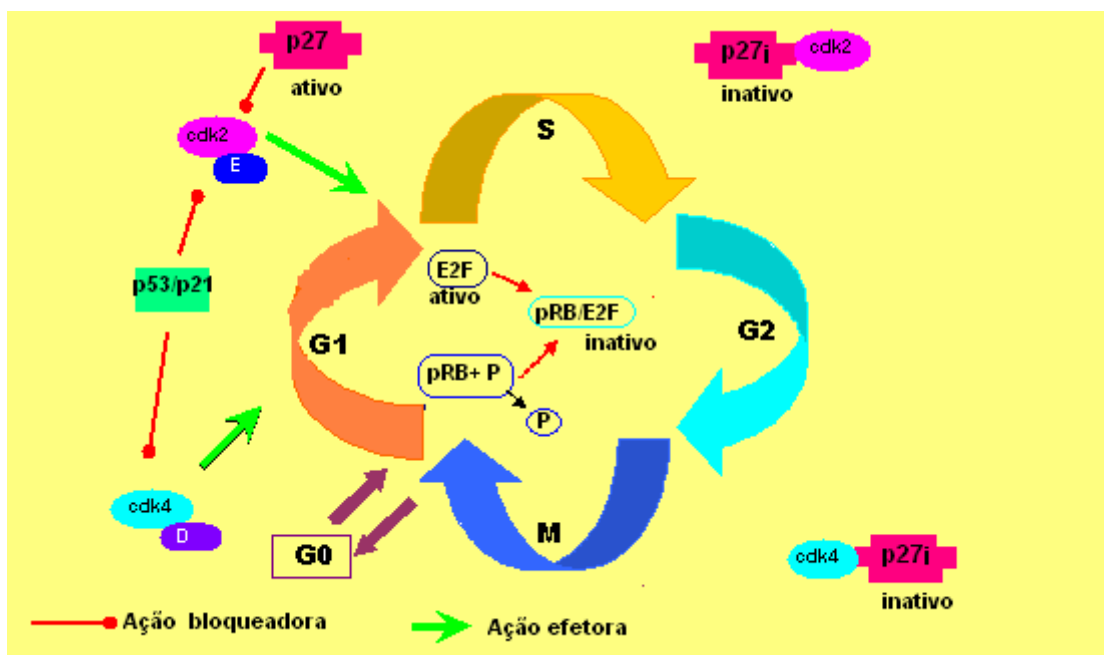
precoces. Postula-se que a presença de *H. pylori* possa induzir a ocorrência de mutações no gene *p53*.

Vale ressaltar que a diversidade de alterações associadas à proteína p53 pode muitas vezes não se refletir na sua detecção imuno-histoquímica, ou mesmo, essa detecção pode não estar necessariamente associada à mutação genética (LOUIS et al., 1993; CHO et al., 1999). Assim sendo, torna-se necessária à utilização de técnicas complementares no estudo da análise mutacional do *p53*. Para esse fim, uma técnica largamente utilizada é a PCR-SSCP (Técnica de Polimorfismo de Conformação de Fita Simples), que tem como base o fato de que, após a desnaturação do DNA, em condições que inibam a renaturação, as fitas simples formadas se reestruturam tridimensionalmente pela complementariedade entre suas bases. As fitas simples com diferentes seqüências de bases apresentam estruturas tridimensionalmente diferenciadas, o que se reflete em sua mobilidade eletroforética quando analisadas em gel de poliacrilamida. Neste caso, as moléculas são fracionadas pela resistência que sua conformação oferece à migração eletroforética e não pelo seu tamanho. A variação no padrão de bandas observadas no gel indica a presença de mutações ou polimorfismos gênicos. O método envolve três etapas: amplificação por PCR da região do gene de interesse, desnaturação do produto de PCR, eletroforese da fita simples de DNA através de um gel de pH neutro (SEUÁNEZ et al., 2004).

### 1.6.2- p27

O gene p27, localizado no cromossomo 12p13, codifica a proteína p27<sup>Kip1</sup>, a qual pertence à classe das proteínas inibidoras das cdk (cdkl). Sua família CIP/KIP é constituída pelas proteínas p27<sup>Kip1</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, e p57<sup>Kip2</sup>, as quais apresentam um domínio N-terminal inibidor. Atuam no ciclo celular como supressores tumorais, inibindo uma variedade de complexos ciclina-cdk. Ao contrário da família de inibidores denominada INK4, constituída pelas proteínas p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>, p18<sup>INK4C</sup> e p19<sup>INK4D</sup>, cuja ação inibitória é restrita as quinases cdk4 e cdk6, as proteínas da família CIP/KIP são consideradas cdkl universais por interagir com vários complexos ciclinas-cdk em resposta a sinais antiproliferativos, promovendo assim a parada no ciclo celular em sua fase G1 (SANDHU e SLINGERLAND, 2000; CHETTY, 2003; VERMEULEN et al., 2003).

A transição pelas fases G1/S do ciclo celular determina a síntese protéica e replicação do DNA para a subsequente divisão celular (fase M), sendo um passo crítico no mecanismo de proliferação das células, dependente da atividade de cdk2 e ciclinas D1/E (SANDHU e SLINGERLAND, 2000). Na célula quiescente, estimulada por fatores de crescimento, ocorre um aumento nas concentrações das ciclinas E/D, resultando na ativação dos complexos ciclina D/cdk4 e ciclina E/cdk2 no ponto de restrição G1/S. A atividade ciclina E/cdk2 é maior no final de G1 e essencial para o início da fase S, em conjunto com outras cdk. A proteína p27 é um importante elemento regulador dessa fase e atua inibindo esse complexo impedindo assim que a célula atravesse o ponto de restrição no final da fase G1 (Fig. 9). Durante a proliferação celular, a proteína p27 permanece inativa (p27i), ligada ao complexo ciclina D/cdk4 ou cdk6. A presença de sinais antiproliferativos provoca a liberação e ativação de p27, com conseqüente bloqueio do complexo ativo ciclina E/cdk2 (BOUCHARD et al., 1999; PEREZ-ROGER et al., 1999; SANDHU e SLINGERLAND, 2000).



**Figura 9- Ação bloqueadora (fase G1/S) da proteína p27 no ciclo celular.**

A ilustração esquematiza o mecanismo pelo qual a proteína p27 atua bloqueando o complexo ativo cdk2/E e inibe a passagem pelo ponto de restrição G1-S do ciclo celular.

(Adaptado de CORDON-CARDO, 1995).

A p27 é fortemente expressa em células não proliferativas desempenhando também importante papel na regulação da progressão G0 a G1 (CHETTY et al., 2003). Além disso, está relacionada à regulação da apoptose, diferenciação e migração celular e resposta a estímulos inflamatórios, tornando-se uma proteína chave no controle da entrada do ciclo celular (EGUCHI et al., 2004).

O gene *p27* raramente se encontra mutado em neoplasias humanas (LEI et al., 2005), entretanto, sua expressão se encontra alterada em diversos tumores primários, incluindo os do trato gastrointestinal e fígado (CHETTY, 2003). Como ocorre com os outros supressores, a perda da atividade ou diminuição da expressão de p27 confere a célula displásica vantagens associadas a uma maior proliferação tumoral (BLAIN e MASSAGUE, 2002).

Outra alteração encontrada refere-se a sua localização; A proteína normalmente possui localização nuclear, entretanto, têm-se observado em alguns carcinomas de mama, esôfago e cólon, sua localização citoplasmática, o que sugere a hipótese de sua inativação por sequestro citoplasmático. Três estudos recentes (LIANG et al., 2002; SHIN et al., 2002; VIGLIETTO et al., 2002), relatam que a fosforilação da proteína p27 pela proteína-quinase B ativada (Akt/PKB), componente central da via Fosfatidil inositol quinase (PI3K), impossibilita a importação nuclear de p27, a qual fica aprisionada no citoplasma celular. O aprisionamento citoplasmático de p27 impossibilita sua atividade funcional, sendo que a cdk2 permanece ativa no núcleo mesmo na presença de sinais anti-mitogênicos.

A diminuição nos níveis de p27 pode se dever a um aumento de sua degradação proteossomal, seu principal mecanismo de regulação durante o ciclo celular, ou a outros mecanismos, incluindo a regulação transcricional (EGUCHI et al., 2004). Por outro lado, no caso das doenças gástricas, diversos estudos têm associado essas alterações com a presença da bactéria *H. pylori*. Shirin et al (2000) relata que a exposição crônica de células epiteliais gástricas a *H. pylori* pode induzir um fenótipo resistente a apoptose, sendo que a inibição ocorreria na fase de transição G1/S. Um dos possíveis mecanismos dessa ação bacteriana seria através da redução nos níveis da proteína p27.

Em diversas neoplasias a p27 tem sido focalizada como um fator prognóstico potencialmente relevante, o qual pode estar relacionado a tumorigênese e progressão tumoral (KUDO et al., 1998; HAN et al., 1999; SANDHU e

SLINGERLAND, 2000; CHETTY, 2003). Dentre os principais tumores com alteração do p27 encontram-se o de mama, próstata, cólon, fígado, estômago, pulmão, esôfago e mucosa oral (TSIHLIAS et al., 1999; ITO et al., 1999; HO e DOWDY, 2002; CHETTY, 2003; LEI et al., 2005).

### **1.6.3- *Helicobacter pylori***

A bactéria *H. pylori* é um bacilo gram-negativo, microaerófilo, móvel, não-esporulado, medindo aproximadamente 0,1 a 0,5 µm de largura e 3 µm de comprimento. Possui forma helicoidal ou espiralada, superfície lisa e extremidades arredondadas com 5 a 7 flagelos unipolares embainhados, cuja regulação, secreção e montagem são controladas por pelo menos 40 proteínas (MARSHALL, 2002; LADEIRA et al., 2003; MARAIS et al., 1999). Assim como as demais bactérias do gênero *Helicobacter*, *H. pylori* possui a capacidade de colonizar a mucosa gástrica sendo associada à gastrite, úlcera péptica, Linfoma MALT e carcinoma gástrico. A infecção é normalmente assintomática sendo na maioria das vezes não tratada, propiciando assim uma resposta inflamatória crônica, a qual pode se estender por décadas (PASSARO, 2002; MARAIS et al., 1999).

A bactéria apresenta uma distribuição cosmopolita sendo que a baixa condição sócio-econômica, má-nutrição, inadequadas condições sanitárias, dentre outros fatores relacionados, têm sido associados à sua alta prevalência mundial (BROWN, 2000; CORREA, 2003, 2004). Nos países em desenvolvimento a taxa de infecção é em torno de 50-90%, sendo geralmente adquirida na infância; já nos países desenvolvidos observam-se taxas de prevalência bem menores (5-20%) em jovens e indivíduos de até 40 anos (MARSHALL, 2002).

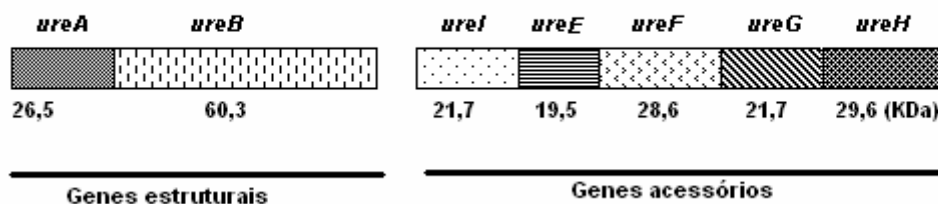
O mecanismo de transmissão mais provável é o contato pessoa-a-pessoa, inclusive entre familiares, especialmente mãe-filho. Essa evidência é reforçada pela observação de que em indivíduos de áreas com baixa condição sócio-econômica e educacional, condições sanitárias inadequadas e habitações aglomeradas ou superlotadas observam-se maiores taxas de infecção (ESCOBAR e KAWAKAMI, 2004; AHMED et al., 2006). Além da via fecal-oral, as vias oral-oral e gastro-oral são também sugeridas, pois a bactéria já foi detectada em placa dentária, inclusive de crianças (NGUYEN et al., 1993; ALLAKER et al., 2002). Outras secreções vem



sendo pesquisadas, entretanto, as fontes mais prováveis de infecção incluem saliva, placa dentária, fezes, refluxos gástricos ou vômitos, água não tratada e alimentos preparados em condições não-higiênicas (HULTEN, 1996; BROWN, 2000; AHMED et al., 2006).

Apesar da alta prevalência da infecção nos países em desenvolvimento e na população mundial (PLUMMER, 2004), apenas uma pequena proporção de 1-2% dos pacientes infectados desenvolve o câncer gástrico (KONTUREK et al., 2003). Esse fato sugere que outros fatores, ambientais e/ou do hospedeiro, devem atuar de forma importante se somando a ação bacteriana.

São diversos os fatores bacterianos associados a sua patogenicidade. Sua sobrevivência no ambiente ácido do estômago é possibilitada pela produção da enzima urease, a qual apresenta papel central na infecção bacteriana por viabilizar sua colonização na mucosa gástrica (LADEIRA et al., 2003). A bactéria localiza-se no interior ou sob a camada de muco que recobre o epitélio gástrico, aderida ou em contato íntimo com a membrana luminal das células da mucosa (MARSHALL, 2002; SCHREIBER et al., 2004). A urease produzida por *H. pylori* promove a hidrólise da uréia, fisiologicamente presente no suco gástrico, em amônia (NH<sub>3</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), com conseqüente alcalinização do ambiente gástrico (MOBLEY et al., 1995; BAUERFEIND et al., 1997). Sua produção é controlada por um grupo (*cluster*) de 7 genes, localizado no genoma bacteriano, os quais codificam as subunidades estruturais da enzima e outros elementos acessórios (Fig. 10).



**Figura 10- Organização genética do cluster de genes relacionados à produção da urease de *H. pylori*.**  
(Reproduzido de MOBLEY et al., 1995).

A urease possui massa molecular em torno de 550 kDa (quilodaltons). É constituída por seis cópias de cada uma das duas subunidades estruturais, *ureA* e *ureB*, codificadas pelos genes *ureA*, *ureB*. Em adição a esses genes estruturais, os genes acessórios *ureE*, *ureF*, *ureG* e *ureH* codificam proteínas necessárias a

incorporação do níquel para a produção da metaloenzima cataliticamente ativa (MOBLEY et al., 1995; BAUERFEIND et al., 1997; SCOTT et al., 2000), enquanto o *gene ureI* codifica uma proteína sensível ao pH, relacionada ao canal de uréia, o qual se localiza na membrana interna da parede celular bacteriana (VOLAND et al., 2003; LAMARQUE e PEEK, 2003). Como a maior parte da urease sintetizada situa-se no citoplasma e superfície bacteriana (MARAIS et al., 1999), a entrada de uréia no seu interior é controlada por essa proteína, em condições em que se faça necessária à alcalinização do meio (LADEIRA et al., 2003; WEN et al., 2003).

O gene *ureC*, atualmente denominado *g1mM* (DE REUSE et al., 1997) codifica uma proteína altamente conservada denominada UreC ou g1mM, uma fosfoglicosamina mutase que parece não possuir papel específico na produção da urease; entretanto, relata-se que assim como em outras bactérias, esse gene é essencial para o desenvolvimento celular bacteriano (DE REUSE et al., 1997; MOBLEY et al., 1995), sendo uma ferramenta específica utilizada na detecção molecular de *H. pylori* (LU et al., 1999). Além da urease, há indícios de que a bactéria desenvolva outras defesas intrínsecas especializadas no mecanismo de ácido-resistência (MARAIS et al., 1999).

A presença dos flagelos, produção de adesinas (genes *babA1*, *babA2*, *napA*) e diversas enzimas como hemaglutininas (gene *hpaA*), lipases e proteases permitem a adesão epitelial e degradação da camada de muco, facilitando a progressão bacteriana (MARAIS et al., 1999; LADEIRA et al., 2003; OLIVARES e GISBERT, 2006), além de apresentarem importante potencial imunogênico. A bactéria produz também enzimas como a superóxido dismutase, catalase e arginase, as quais conferem proteção bacteriana à resposta imune celular do hospedeiro (HAZELL et al., 1991). A resposta imune humoral, representada por anticorpos IgG e IgA direcionados às proteínas de membrana, flagelinas (FlaA/FlaB), adesinas, urease e lipopolissacarídeos (LPS) também é verificada nos indivíduos infectados (SUAREZ et al., 2006).

A bactéria apresenta duas outras citotoxinas amplamente estudadas e relacionadas à sua patogenicidade, codificadas respectivamente pelos genes *vacA* e *cagA*, detalhadas abaixo. Além destes, outros genes vem sendo associados à patogenicidade bacteriana, destes, os mais recentemente estudados são os genes *iceA* e *babA*. O gene *iceA* (induzido por contato epitelial), apresenta duas variantes alélicas, *iceA1* e *iceA2*, e tem sido sugerido como um fator associado a úlceras

pépticas e gastrite crônica (YAMAOKA et al., 1999b; WU et al., 2005). O gene *BabA* (fator de aderência associado ao grupo sanguíneo) codifica uma proteína externa de membrana (OMP), uma adesina bacteriana, que se liga ao fator B do grupo sanguíneo Lewis, nas células do epitélio gástrico. Essa OMP pode ser um importante produto de patogenicidade ao promover o contato entre a bactéria e o epitélio gástrico, facilitando assim a liberação de fatores de virulência como *cagA* e *vacA* (GATTI et al., 2006; COLBECK et al., 2006).

### 1.6.3.1– Gene *cagA*

Algumas cepas bacterianas possuem a denominada ilha de patogenicidade (PAI), um fragmento de DNA de 35-40 KDa, cepa específico, contendo um conjunto de 31 genes associados à estimulação de citocinas, alterações na sinalização celular e a um virulento aparato secretório extracelular tipo IV. Dentre estes, destaca-se o gene *cagA*, o qual codifica uma proteína com 120-140 kDa, altamente imunogênica, denominada *cagA* (*citotoxin- associated gene product A*). Esta proteína apresenta diversidade em sua seqüência de aminoácidos entre as diferentes cepas de *H. pylori* (STEIN et al., 2000; HIGASHI et al., 2002a; ODENBREIT et al., 2000; OLIVARES e GISBERT, 2006). As cepas *cagA*(+) são associadas com maior risco de úlcera péptica e adenocarcinoma, especialmente o tipo intestinal afetando o estômago distal (BLASER et al.,1995; ATHERTON, 1998; SHIBATA et al., 2002).

A provável base molecular para a ação patológica de *cagA* na interação entre *H. pylori* e a célula do hospedeiro é descrita por alguns autores: O sistema de secreção tipo IV é formado por uma estrutura cilíndrica que se conecta as células epiteliais. Após a adesão bacteriana à célula epitelial e formação desse sistema secretório, diversos elementos bacterianos virulentos, incluindo a proteína *cagA*, podem ser translocados para o interior das células do hospedeiro. Quando *cagA* é injetada para o interior da célula, ela é ativada por fosforilação por tirosinas celulares (SEGAL et al.,1999; STEIN et al., 2000; ASAHI et al., 2000; SUGIYAMA, 2004) e se liga especificamente a fosfatase SHP-2 ativando-a e induzindo transformações morfológicas nas células (HIGASHI et al., 2002b; YAMAZAKI et al., 2003). SHP-2 é uma proteína tirosina-fosfatase citosólica que, junto à proteína SHP-1, desempenha diversas funções regulatórias e estruturais, possuindo um importante papel positivo

na transdução do sinal mitogênico (FENG et al., 1993; FREEMAN et al., 1992; TSUJI et al., 2003). Além disso, a SHP-2 é ativamente envolvida na regulação da propagação, migração e adesão celular, sendo expressa de forma ubíqua em vários tipos celulares, incluindo as células epiteliais; já a SHP-1 é expressa especialmente em células hematopoiéticas (YU et al., 1998; TSUJI et al., 2003). A desregulação da SHP-2 por *cagA* pode induzir movimentos e proliferação anormal das células epiteliais gástricas (HIGASHI et al., 2002a) o que poderia, em parte, explicar a maior virulência das cepas *H. pylori cagA(+)* nas desordens gástricas.

### 1.6.3.2- Gene *vacA*

O gene *vacA* é constitutivo, codifica uma citotoxina vacuolizante, de 87 kDa, a qual induz vacuolizações nas células epiteliais gástricas. Entretanto, apesar do gene estar presente em todas as cepas de *H. pylori*, apenas 50-65% delas produzem a citotoxina (OLIVARES e GISBERT, 2006). O gene *vacA* possui duas regiões polimórficas, uma localizada na seqüência sinalizadora (*s*) e outra na região média ou central (*m*). A região *s* codifica o sinal peptídico e possui os alelos *s1* e *s2*, sendo que os subtipos *s1a/ s1b/ s1c* podem ser identificados dentre as cepas *s1*. A região média *m* possui os alelos *m1* e *m2* (ATHERTON, 1995). A produção de citocinas em cada cepa resulta das diferentes combinações entre os alelos da região *s* e *m*, determinando diferentes graus de virulência.

O mecanismo de ação dessa proteína é parcialmente compreendido; após translocação para o citosol, sua ação se dá pela interferência com o trânsito e formação dos endossomos, induzindo, de alguma forma, o processo de vacuolização celular (FIGUEIREDO et al., 2005; OLIVARES e GISBERT, 2006). Estudos *in vitro* sugerem que *vacA*, após inclusão celular, localiza-se na mitocôndria e modula a permeabilidade de sua membrana, sendo que este mecanismo pode estar associado à regulação mitocondrial da apoptose (WILLHITE e BLANKE, 2004 ). A ação de *vacA* no interior das células gástricas pode induzir múltiplas alterações fisiológicas. Além disso, a proteína pode promover um estímulo na ativação de mastócitos, com conseqüente resposta imune inflamatória, contribuindo para o aumento do risco da carcinogênese gástrica (SUPAJATURA et al., 2002).

## 1.7- *Helicobacter pylori* e câncer gástrico

Ainda não estão estabelecidos os mecanismos moleculares pelos quais a bactéria, ou os seus genes considerados patogênicos, se relaciona com a carcinogênese gástrica. É relatado por Zhang et al. (2004) que a presença de *H. pylori* pode promover um aumento na expressão de genes associados a apoptose (Bcl-2, Bid e Bax) tanto no adenocarcinoma gástrico quanto nos tecidos adjacentes das margens de ressecção tumoral, sendo mais evidente o aumento nos níveis de Bax, proteína pró-apoptótica, no grupo *H. pylori cagA(+)* do que no grupo *cagA(-)*. A expressão anormal dessas proteínas pode alterar o mecanismo de apoptose e desempenhar importante papel na carcinogênese gástrica.

A superexpressão de c-erbB-2, uma glicoproteína de superfície celular com atividade tirosina-quinase (GHADERI et al., 2002) também tem sido relacionada à infecção por *H. pylori* (JORGE et al., 2003). Essa proteína é freqüentemente superexpressa no carcinoma gástrico tipo intestinal, podendo ser usada como um marcador prognóstico de invasão tumoral e metástase linfonodal (NARDONE, 2003).

Há relatos da infecção por *H. pylori* contribuindo para o desenvolvimento do Adenoma gástrico, especialmente em pacientes com uma mutação truncada do gene supressor tumoral APC (NAKAMURA et al., 2002). Mutações nesse gene resultam na Polipose Adenomatosa de Cólon (APC), um tumor colônico resultante da progressão de pólipos, inicialmente benignos, que se desenvolvem após sua inativação. Mais de 60% dos tumores gástrico tipo-intestinal possuem mutações ou perda de heterozigosidade (LOH) do gene APC (TAHARA, 1995; WEINBERG, 1996).

A presença bacteriana parece interferir com os supressores tumorais *p27* e *p53*. Shirin et al (2000) relatam que a presença de *H. pylori* reduz a expressão de *p27* em células epiteliais gástricas cultivadas, cronicamente infectadas e também em células provenientes de amostras de biópsia gástrica. Em relação à *p53*, Wang et al (2002) observou uma superexpressão imuno-histoquímica associada à infecção por *H. pylori*, sugerindo que a bactéria possa induzir a mutação desse gene no processo inicial da carcinogênese gástrica.

Apesar das relações pontuais já estabelecidas entre a bactéria e o câncer gástrico, o modelo definitivo do seu mecanismo de ação no processo carcinogênico

não está ainda desenhado. É clara a necessidade de maiores estudos que possam elucidar essas relações, objetivando estabelecer novas ferramentas prognósticas e diagnósticas nesse tipo de câncer. Informações sobre a relação bacteriana, mais especificamente de suas toxinas *cagA* e *vacA*, com a mutação de *p53* e *p27*, dois supressores relevantes na tumorigênese gástrica, podem ser úteis no estabelecimento de uma possível via carcinogênica das neoplasias gástricas mediada por *H. pylori*.

# 1. OBJETIVOS

## 2.1- Geral

- Detectar a presença da bactéria *Helicobacter pylori*, do gene *cagA* e variações alélicas do gene *vacA*, em amostras de adenocarcinoma gástrico, relacionando-as com a presença de alterações no gene supressor tumoral p53 e expressão da proteína p27.

## 2.2- Específicos

- Detectar a frequência da bactéria *Helicobacter pylori* em amostras de adenocarcinoma gástrico em Fortaleza-CE;
- Detectar a frequência das cepas de *Helicobacter pylori cagA(+)* e a variação alélica do gene *vacA* nestas amostras;
- Realizar a triagem mutacional do gene *p53* pela técnica PCR-SSCP;
- Detectar a expressão imuno-histoquímica da proteína p53;
- Detectar a expressão imuno-histoquímica da proteína p27;
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica da proteína p53 com os achados da triagem mutacional pela técnica de SSCP;
- Correlacionar a presença da bactéria *Helicobacter pylori*, e seus respectivos genes, com as alterações encontradas para o gene *p53*;
- Correlacionar a presença da bactéria *Helicobacter pylori*, e seus respectivos genes, com a expressão imuno-histoquímica do gene p27.

## **3.0- MATERIAIS e MÉTODOS**

### **3.1- Aspectos éticos**

O presente trabalho foi aprovado, conforme recomendações das Resoluções 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará em reunião datada de 25/11/2004, protocolo nº 199/04 Of. Nº 712/04 (Anexo I), como parte do projeto “ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CÂNCER GÁSTRICO: ASSOCIAÇÃO COM FATORES EPIDEMIOLÓGICOS”.

Os pacientes incluídos neste estudo pertenciam ao Serviço de Cirurgia da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza-CE (SCMF) e do Hospital Universitário Walter Cantídeo/ Universidade Federal do Ceará (HUWC-UFC), e foram submetidos a gastrectomias, parcial ou total. Os mesmos foram inicialmente esclarecidos quanto aos objetivos do projeto e informados de sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC). Após os devidos esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa, foi apresentado aos pacientes que se voluntariaram como participantes, e respectivos responsáveis, o Termo de Consentimento livre e esclarecido (anexo II) para preenchimento e assinatura. Em seguida os pacientes foram indagados conforme questionário do “Cadastro de pacientes” (anexo III).

### **3.2-Coleta e armazenamento**

Foram obtidos tumores gástricos de 100 pacientes conforme protocolo de coleta (Anexo IV). Imediatamente após a retirada da peça cirúrgica foram coletados, de acordo com tamanho macroscópico da lesão tumoral, um mínimo de 2 e máximo de 4 fragmentos tumorais. O número de fragmentos obtidos dependia do tamanho do tumor, garantindo o não comprometimento da peça na posterior análise patológica. As amostras foram identificadas e armazenadas em tubo de polipropileno, próprios para congelamento, sendo em seguida rapidamente transportadas [tempo médio de uma hora (1h)] ao Laboratório de Genética Molecular (LABGEM) em recipiente com gelo e estocadas em nitrogênio líquido, até o



momento de sua análise para extração de DNA. As demais partes da peça cirúrgica eram enviadas aos serviços de patologia associados aos referidos hospitais, como parte da rotina dos mesmos. De todos os casos foram obtidos, junto ao Serviço de Diagnóstico Histopatológico responsável, o laudo histopatológico para a inclusão dos casos no estudo. Os critérios de inclusão observados foram:

- Diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma gástrico;
- Confirmação da presença de tumor em um dos fragmentos colhidos para extração;
- Existência de, no mínimo, dois blocos contendo amostra tumoral representativa;

Das 100 amostras coletadas apenas 70 casos preencheram os critérios de inclusão no trabalho e puderam ser pareadas (bloco e fragmento congelado). Em quatro casos, a extração de DNA foi satisfatoriamente realizada, não sendo possível à obtenção do material emblocado em parafina. Decidiu-se pela inclusão das mesmas nas análises moleculares, com o objetivo de se avaliar um maior número de amostras. Assim sendo, analisou-se o DNA de um total de 74 amostras, das quais 70 foram também analisadas imunohistoquimicamente.

### **3.3- Coleta de dados clínico-epidemiológicos e histopatológicos.**

Os dados clínico-epidemiológicos foram obtidos através de entrevista aos pacientes, ao médico-cirurgião responsável e também por consulta aos prontuários (Anexo III). Em análise consensual com o entrevistado os grupos étnicos foram classificados conforme a cor da pele em brancos, negros e pardos. Os dados histopatológicos tais como subtipo tumoral, grau de diferenciação, profundidade da invasão, acometimento de linfonodos e/ou metástases à distância foram extraídos dos laudos patológicos, presentes nos respectivos prontuários. A classificação utilizada foi a de Laurén (1965), em que são classificados os dois tipos histológicos, intestinal e difuso.

### 3.4- Extração de DNA

As amostras de tecido congeladas foram analisadas após serem submetidas à cortes de aproximadamente 5µm em micrótomo criostato, seguido de coloração com Hematoxilina-Eosina. As amostras avaliadas, com constituição mínima de 70% de células tumorais, foram submetidas à extração de DNA genômico. Utilizou-se a Técnica de extração com uso do detergente CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) adaptado do protocolo descrito por Foster e Twell (1996), cujos principais passos são descrito a seguir:

1. Fragmentos de aproximadamente 0,3 a 0,5g foram macerados em tubo tipo Falcon de 15mL com auxílio de bastão de vidro esterilizado;
2. Adicionou-se tampão de extração (2% CTAB, 1,4M de NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0 , 0,2% 2-Mercaptoetanol), na proporção de 6mL para cada 0,5g, seguido de incubação à temperatura ambiente por 16 horas;
3. Seguiu-se etapa de purificação com clorofórmio-álcool isoamílico (24/1) e precipitação do DNA com isopropanol a 100%;
4. Adicionou-se NaCl 1M, para a liberação do complexo DNA-CTAB;
5. O DNA foi precipitado com etanol 100%; seguido de lavagem com etanol 70% e ressuspensão em água Milli-Q estéril/DEPC 0,1%,
6. Armazenado em freezer à -14°C.

Para assegurar a qualidade do material extraído, 2µL de cada amostra de DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídeo, em tampão TAE, em seguida visualizados em transiluminador de luz UV (ultravioleta). As amostras de DNA foram utilizadas para: a) - amplificação (PCR) dos exons 5,6,7,8 do gene p53, seguido da triagem mutacional por SSCP; b) - detecção por amplificação dos genes bacterianos *UreC/gmM1*, *cagA* e alelos de *vacA*.

### 3.5 -PCR-SSCP-Análise do Gene p53

Os exons 5 a 8 do gene *p53* foram amplificados pela PCR com a utilização de primers específicos descritos na Tabela 3. O volume final da solução de reação foi de 25 µL, contendo 50 ng de DNA da amostra em: Tampão (200mM Tris-HCl, 500mM KCl- pH 8,4); 0,2 mM de deoxinucleotídeos trifosfato (dNTP), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>;

1U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) e 0,1  $\mu$ M de oligonucleotídeos iniciadores. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguido de 40 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto para exons 5 e 8, 63°C por 30 segundos para exons 6 e 7, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. A cada reação foi acrescentado um tubo controle negativo (DNA substituído por água). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE, corados com brometo de etídeo e visualizados em luz ultravioleta. Padrão de 100pb foi utilizado em cada corrida para confirmação da posição do fragmento. Os produtos esperados foram 196 pb (exon 5), 165 pb (exon 6), 159 pb (exon 7) e 290 pb (exon 8).

Os produtos de amplificação foram em seguida submetidos à técnica de SSCP. Para a corrida eletroforética foram utilizados 6 $\mu$ L das amostras diluídas em solução desnaturante (Formamida 95%, 20 mM EDTA, azul de bromofenol 0.05% e 0.05% de xileno cianol). A proporção utilizada (1:1 ou 2:1) foi relativa à intensidade do produto de amplificação obtido. As amostras foram submetidas a desnaturação a 97°C por 10 minutos, sendo imediatamente mergulhadas em banho de gelo triturado. Em seguida, 4 $\mu$ L das amostras foram rapidamente aplicados em gel de poliacrilamida a 12,5%, prontos para uso (GeneGel Excel 12.5/24 GE Healthcare<sup>®</sup>), sendo submetidas a uma corrente elétrica de 4W, a 4°C por 4 horas, na Unidade para eletroforese GENEPHOR<sup>®</sup>, conforme estabelecido em ensaios prévios. Utilizou-se padrão de peso molecular de 50/100 pb. A visualização dos padrões de bandas foi realizada por meio de coloração pela prata, com a utilização do Kit PlusOne DNA Silver Staining<sup>®</sup> (Amershambiosciences/GE Healthcare).

### 3.6- Amplificação do gene *ureC/glmM*

A presença de *H. pylori* foi detectada pela amplificação, por PCR, do gene *ureC/ glmM* com a utilização dos oligonucleotídeos (Tabela 3) que amplificam especificamente uma região de 294 pb (LAGE et al., 1995). Utilizou-se 100 ng de DNA total em 25  $\mu$ L de solução de reação a qual continha: Tampão de PCR 1x (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM), 1,5 U de *Platinum Taq DNA Polimerase* *Invitrogen*, 0,2 mM deoxinucleotídeos trifosfato (dNTP), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4  $\mu$ M de

cada oligonucleotídeo iniciador. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Como controle positivo foram utilizadas amostras cuja reação de PCR já havia sido positiva para este gene e as quais foram, no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro/FM-UNESP Botucatu, submetidas ao seqüenciamento de seu DNA em seqüenciador automático ABI Prism 377 e comparadas às seqüências depositadas nos bancos de dados genômicos públicos para verificar sua autenticidade<sup>1</sup>.

O produto de amplificação foi visualizado, com padrão de peso molecular 100 pb, em gel de poliacrilamida não desnaturante 6% (SAMBROOK et al., 2001), corado pelo nitrato de prata (SANGUINETTI et al., 1994).

### **3.6.1- Genotipagem das cepas de *H. pylori* - Amplificação do gene *cagA***

O gene *cagA* foi amplificado com os oligonucleotídeos específicos listados na Tabela 3. Utilizou-se 100 ng de DNA total em 25 µL de solução de reação a qual continha: Tampão (200mM Tris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5U de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) e 0,4 µM dos oligonucleotídeos específicos. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos (95°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 45 segundos, 72°C por 2 minutos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Como controle positivo foram utilizadas amostras previamente testadas e positivas para essa reação, cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro-FM-UNESP Botucatu.

---

<sup>1</sup> Informações fornecidas pela Dra Adriana Camargo Ferrasi / Universidade Estadual Paulista-Instituto de Biociências- Rio Claro, conforme dados utilizados em sua Tese de Doutorado em Ciências Biológicas: Biologia celular e molecular, no trabalho "Análise das alterações genéticas e epigenéticas em tumores gástricos infectados pelos agentes tumorigênicos *Helicobacter pylori* e Vírus Epstein-Barr" (2007). Conforme [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

O produto de amplificação foi visualizado em gel de poliacrilamida não desnaturante 6% (SAMBROOK et al., 2001), corado pelo nitrato de prata (SANGUINETTI et al., 1994). Utilizou-se padrão de peso molecular 100 pb.

### **3.6.2- Genotipagem das cepas de *H. pylori* - Amplificação do gene *vacA* (alelos *s1/s2* e *m1/m2*)**

Sítios do gene *vacA* (alelos *s1/s2* e *m1*) foram amplificado com o uso dos oligonucleotídeos específicos descritos na Tabela 3. Utilizou-se 100 ng de DNA total, em 25 µL de solução de reação contendo: Tampão de reação 1X (500mM KCl, 150mM Tris/HCl pH 8.0); 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U de AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems) e 0,4 µM dos oligonucleotídeos específicos. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 68°C por 2 minutos) e extensão final a 68°C por 7 minutos.

A reação de PCR para o alelo *m2* de *vacA* foi realizada com o uso de oligonucleotídeos específicos, desenhados em laboratório (Informação verbal)<sup>1</sup>. Utilizou-se 100 ng de DNA total em 25 µL de solução de reação a qual continha: Tampão de reação (500mM KCl, 150mM Tris/HCl pH 8.0); 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U de AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems)) e 0,4 µM dos oligonucleotídeos iniciadores. A mistura foi submetida a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 segundos, anelamento a 51°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos) e extensão final a 72°C por 07 minutos.

Como controle positivo foram utilizadas amostras previamente testadas e positivas para essa reação, cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro-FM-UNESP Botucatu.

O produto de amplificação foi visualizado em gel de poliacrilamida não desnaturante 6% (SAMBROOK et al., 2001), corado pelo nitrato de prata (SANGUINETTI et al., 1994). Utilizou-se padrão de peso molecular 50 e 100 pb.

**Tabela 3.** Referências dos Primers utilizados no presente estudo.

<b>Genes</b>	<b>Seqüência do primer</b>	<b>Produto (pb)</b>	<b>Referência</b>
<b>p53/E5</b>	5'-TAC TCC CCT GCC CTC AAC AA-3' 5'-CAC CAT CGC TAT CTG AGC A-3'	196	MURAKAMI et al., 1992; LOGULLO et al., 2000
<b>p53/E6</b>	5'- CAG GGC TGG TTT CCC AGG GTC CCC A-3' 5'-CAG GCG GCT CAT AGG GCA -3'	165	MURAKAMI et al., 1992; LOGULLO et al., 2000
<b>p53/E7</b>	5'-TCT GAC TGT ACC ACC ATC -3' 5'-GAG GCT GGG GCA CAG CAG GCC AGT G-3'	159	MURAKAMI et al., 1992; LOGULLO et al., 2000
<b>p53/E8</b>	5'-AGT GGT AAT CTA CTG GGA CGG -3' 5'- TAT CTC CAT CCA GTG GTT TC-3'	290	MURAKAMI et al., 1992; LOGULLO et al., 2000
<b>ureC</b>	5'-AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T-3' 5'-AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC -3'	294	LAGE et al., 1995
<b>cagA</b>	5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3' 5'-TTAGAATAATCAACAAACATAACGCCAT-3'	297	COVACCI e RAPPUOLI, 1996; DOMINGO et al., 1999
<b>vacA/m1</b>	5'- GGT CAA AAT GCG GTC ATG G -3' 5'- CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC -3'	290	ATHERTON et al., 1995
<b>vacA/m2</b>	5'-GAA CAT GTT TTA GTG AAA GC -3' 5'-ATG CTT TAA TAT CGT TGA GA -3'	192	GENBANK <sup>1</sup>
<b>vacA/s1</b> <b>vacA/s2</b>	5'- ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC -3' 5'- CTG CTT GAA TGC GCC AAA C -3'	259 (s1) 286 (s2)	ATHERTON et al., 1995

### 3.7- Método Imunohistoquímico

Para a análise imuno-histoquímica das proteínas p53 e p27, foram preparados cortes histológicos de 5 µm, fixados em lâminas de vidro limpas e tratadas com silano a 4%. Uma lâmina de cada bloco foi destinada à coloração pela Hematoxilina/Eosina para reavaliação histopatológica, no intuito de verificar a representatividade de células tumorais no bloco de escolha. Em seguida, as demais lâminas foram submetidas à técnica imuno-histoquímica, com utilização de anticorpos monoclonais (DakoCytomation®, EUA). O método utilizado foi o da estreptoavidina-biotina-peroxidase, adaptado de HSU et al. (1981) conforme descrito a seguir:

1. Desparafinização em estufa a 60°C por 120 minutos;
2. Passagem em xilol aquecido a 60°C por 30 minutos;
3. Desparafinização e hidratação em gradientes xileno-álcool-água;
4. Recuperação antigênica em forno de microondas utilizando tampão citrato 10mM pH=6,0 ( $\pm$  99°C), por 15 minutos;
5. Peróxido de hidrogênio a 3%, por 15 min para bloqueio da peroxidase endógena;
6. Incubação das lâminas com o anticorpo primário em geladeira (4-8°C) por 16 horas sendo:
  - p27kip1 -clone SX53G8- diluição utilizada: 1:150
  - p53 - clone DO-7 – diluição utilizada: 1:80
7. Detecção pelo sistema LSAB+ (DakoCytomation<sup>®</sup>), conforme recomendações do fabricante;
8. Revelação pelo sistema DAB+ (3,3'-diaminobenzidina) (DakoCytomation<sup>®</sup>), conforme recomendações do fabricante;
9. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris a 40%;
10. Desidratação em gradiente de água-álcool-xileno;
11. Montagem com lamínulas e Bálsamo do Canadá.

Foram incluídos espécimes clínicos, recomendados pelo fabricante, obtidas do arquivo de patologia do DPML/UFC, previamente testados como controles positivos: para a p53 utilizou-se três casos de câncer gástrico e para p27 dois casos de adenocarcinoma de cólon, incluídos em cada bateria de testes.

### **3.7.1- Análise Imuno-histoquímica**

As lâminas foram examinadas em microscópio ótico e quantificadas quanto a marcação nuclear para p53 e p27. Foram consideradas positivas as marcações de cor marron/castanho, evidenciadas pelo fundo azul-violáceo contracorado da Hematoxilina de Harris. Foram contadas 1000 (mil) células tumorais (objetiva de 40x), a partir das quais se estabeleceu o cálculo do índice de marcação **LI** (de *labelling index*) (LANDBERG e ROSS, 1993), segundo a fórmula:

$$LI (\%) = \frac{(\text{número de células imuno-positivas}) \times 100}{(\text{número total de células contadas})}$$

Foram considerados positivos os casos com mínimo de 5% das células analisadas positivas, ou seja,  $LI \geq 5$  (KUDO et al., 1998). Avaliou-se também o perfil de marcação no tecido tumoral, considerando como marcação focal a presença de ilha(s) de células tumorais marcadas e marcação difusa a presença dessas células dispersas no tecido analisado.

### **3.8- Análise Estatística**

Os dados clínico-patológicos, assim como os resultados das técnicas utilizadas, foram tabulados e demonstrados através de gráficos e tabelas como auxílio do programa Microsoft Excel 2000 (Microsoft®, EUA).

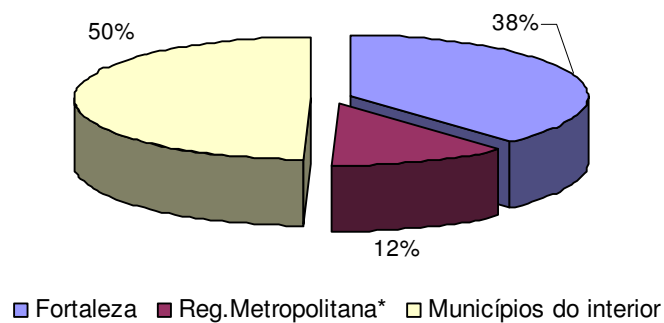
O programa utilizado para correlação e análise das variáveis categorizadas foi o SPSS® 13.0. O teste de normalidade na distribuição das variáveis quantitativas foi realizado pelo Teste de Shapiro-Wilk. As análises de correlação foram realizadas pelo Teste Exato de Fisher. A comparação entre os grupos, em relação à média das variáveis quantitativas foi realizada através do Teste t de Student, para os dados com hipótese de distribuição normal, e Mann-Whitney, no caso de não normalidade dos dados. Na análise das incidências foi construído o IC (intervalo de confiança) com coeficiente de confiança igual a 95%. As análises descritivas das variáveis categóricas foram feitas com utilização de tabelas e gráficos; nas análises quantitativas, pela utilização de quadros compostos de média, desvio padrão, mínima, mediana e máximo. Para a análise de variável qualitativa em relação a uma qualitativa ordinal, utilizou-se o Teste de associação Linear-linear. Foram considerados estatisticamente significantes valores de  $p < 0,05$ .



## 4.0. RESULTADOS

### 4.1. Análise Clínico-epidemiológica

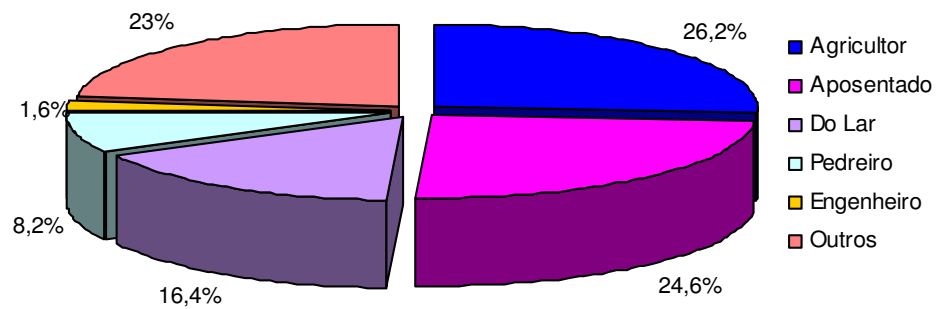
Dentre os 74 casos estudados observou-se que 38% dos pacientes foram procedentes da cidade de Fortaleza, sendo os demais provenientes de municípios da região metropolitana de Fortaleza, destacando-se Caucaia (4%) e Maracanaú (4%); e municípios do interior do Estado (Figura 11), destacando-se Aracati (2,7%) e Acarape (2,7%).



**Figura 11- Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo a procedência dos pacientes (n=74).**

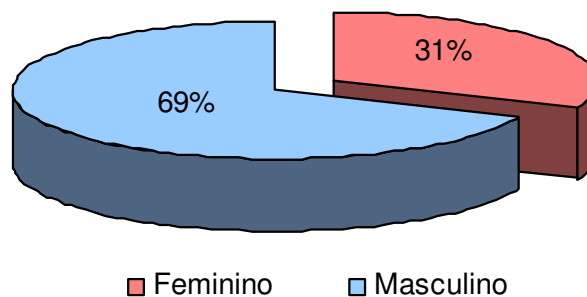
\*Região definida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

A atividade profissional predominante dos pacientes foi constituída de agricultores (16/61 [26%]) e indivíduos aposentados (15/61 [24,6%]), seguido das atividades do lar e pedreiro com 16,4% e 8,2%, respectivamente (Fig. 12). A maior parte dos indivíduos não possuía o ensino médio completo; apenas um indivíduo (1,6%) possuía nível superior, denotando a baixa escolaridade do grupo. Em treze, dos setenta e quatro casos estudados (17,6%), não foi possível a obtenção dessa informação.



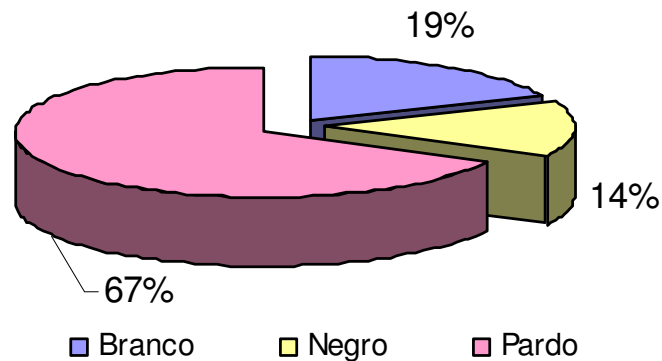
**Figura 12- Percentual de casos distribuídos segundo a profissão dos pacientes (n=61).**

Em relação ao sexo (Fig. 13), verificou-se que 51 (69%) pacientes eram do sexo masculino e 23 (31%) do sexo feminino. A razão observada foi de 2,2 homens para cada mulher (2,2: 1).



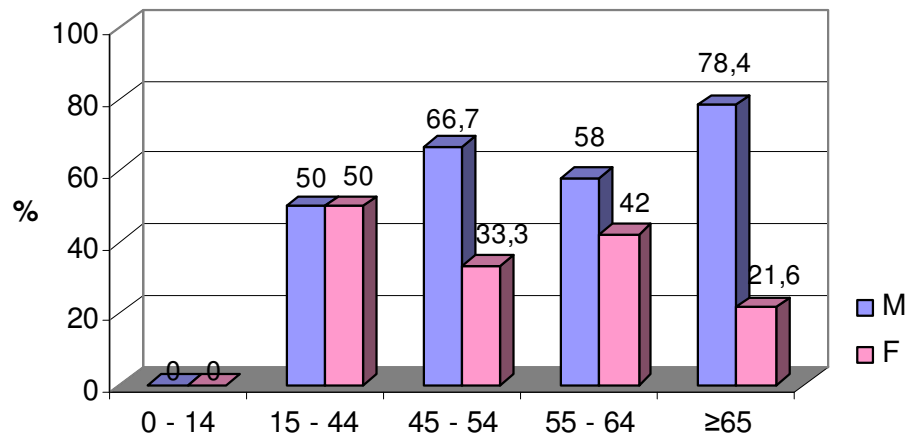
**Figura 13- Percentual de casos distribuídos segundo o sexo dos pacientes (n=74).**

A estratificação dos dados quanto à etnia dos pacientes demonstrou predomínio da pele parda, onde 50 (67%) indivíduos eram pardos, 14 (19%) brancos e 10 (14%) eram negros (Figura 14).



**Figura 14- Percentual de casos distribuídos segundo a cor da pele dos pacientes (n=74).**

A distribuição dos pacientes pela idade foi realizada acordo com a padronização da IARC, por ser a que mais se adequou à amostragem em estudo. Não houve registro de casos no intervalo de 0-14 anos; em contrapartida, 50% deles (37/74) se distribuíram nos pacientes com idade superior a 65 anos. A idade do grupo estudado variou entre 23 e 90 anos, sendo que apenas 5,4%, 2 homens e 2 mulheres, possuía idade inferior a 40 anos. A idade média ( $\pm dp$ ) do grupo de pacientes do sexo feminino foi 57,96 ( $\pm 13,52$ ) anos, e do sexo masculino 63,12 ( $\pm 12,29$ ) anos, as quais não diferiram significativamente entre si (Teste t-Student  $p=0,190$ ). Observou-se que entre a população mais jovem, intervalo 15-44 anos, a incidência foi idêntica para ambos os sexos. A partir dos 45 anos a proporção se altera gradativamente, atingindo nos pacientes com idade  $\geq 65$  anos a razão masculino:feminino de 3,6:1 (Figura 15). Ao se avaliar os grupos isolados por faixa etária, observa-se que a maioria dos pacientes, seja do sexo masculino (78,4%) ou feminino (69,6%), se concentram nas faixas etárias  $\geq 55$  anos.

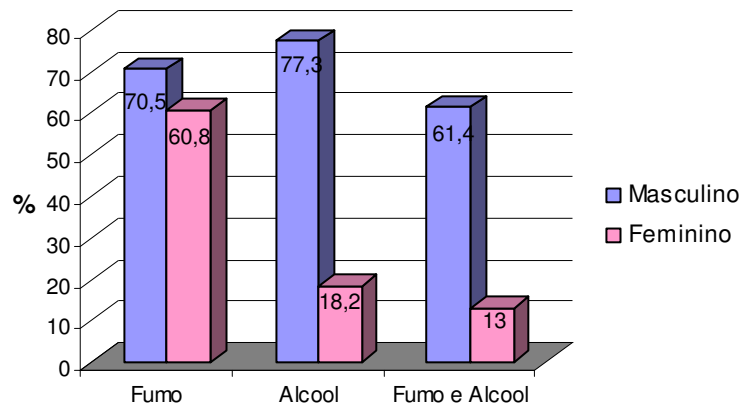


**Figura 15- Percentual de casos distribuídos segundo o sexo e faixa etária\* dos pacientes (n=74)**

Teste t-Student;  $p=0,190$

\*Faixa etária padronizada pela IARC.

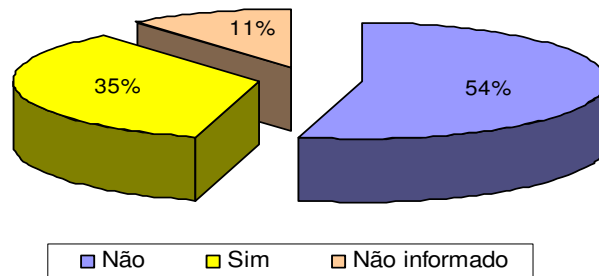
Na análise de fatores de risco, 45 (67,2%) pacientes relataram história de tabagismo (consumo de mais de 15 cigarros por dia) por mais de 15 anos, destes, 31% do sexo feminino e 69% do sexo masculino. Ao se avaliar a incidência de fumantes por sexo, não se detectou diferença significativa entre o grupo masculino (70,5%) e feminino (60,8%) (Teste exato de Fisher;  $p= 0,584$ ). Trinta e oito pacientes (57,5%) relataram história de etilismo (uso diário do álcool), dos quais 89,5% do sexo masculino. Quando verificado a incidência da ingestão de álcool por sexo (Figura 16), observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre o consumo no sexo masculino (34/44) e no feminino (4/22) ( $p<0,001$ ). Em 30 pacientes (45,5%) foi verificada a concomitância desses fatores de risco, sendo a maioria deles (90%) do sexo masculino. Em sete casos não se obteve as informações quanto ao tabagismo, e oito, quanto ao etilismo.



**Figura 16– Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à presença dos fatores de risco por sexo** (tabagismo [n=67], etilismo [66] e ambos [66]).

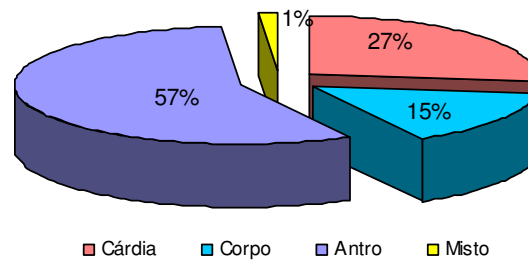
Teste Exato de Fisher; Tabagismo  $p = 0,584$  / Etilismo  $p < 0,001$

Quanto ao histórico familiar, 26/74 pacientes (35%) apresentaram história de algum tipo de câncer em parentes de até segundo grau (Figura 17); em 08 casos não foi possível à obtenção dessa informação. Em 10 casos houve associação do histórico familiar com tabagismo e etilismo; a média de idade desse grupo foi de 61,9 anos, sendo 90% do sexo masculino.



**Figura 17- Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à presença de histórico familiar de câncer** (n=74) .

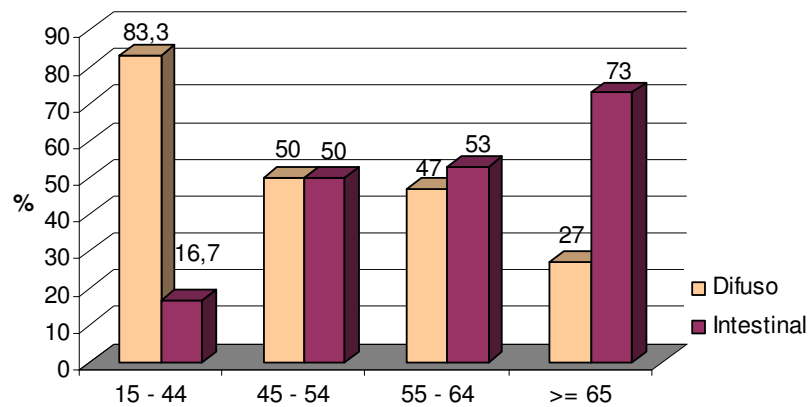
A localização anatômica mais freqüente na amostra estudada foi na região do antro (57%); os demais casos situaram-se na cárdia (27%), corpo (15%) e distribuição mista (1%), como mostrado na Figura 18.



**Figura 18– Percentual de casos distribuídos quanto à localização anatômica dos tumores (n=74).**

## 4.2. Análise Histopatológica

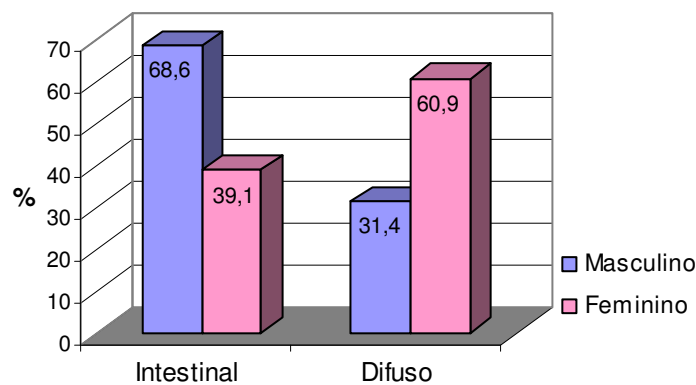
A Classificação de Laurén dos tumores revelou uma freqüência um pouco superior do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (59%), em relação ao tipo difuso (41%). No tipo intestinal, um maior aumento da freqüência foi observado em função da idade com aumento evidente na faixa etária acima de 65 anos (Fig. 19). Essa relação foi confirmada ao se utilizar o Teste de associação linear, o qual demonstrou existir aumento linear na incidência dos tumores tipo intestinal com o aumento da faixa etária  $p= 0,007$ . O tipo difuso, apesar da freqüência relativamente estável em todas as faixas, se sobrepôs ao tipo intestinal no grupo mais jovem (15-44 anos). Comparando-se a idade média dos pacientes distribuídos quanto aos 2 subtipos histopatológicos, verificou-se diferença estatística significativa entre a idade de incidência do tipo intestinal ( $64,59[\pm 13,46]$ ), que se mostrou superior à idade média de incidência do tipo difuso ( $57[\pm 11,53]$ ) (Teste t-Student  $p= 0,011$ ). Dentre os tumores estudados a presença de metaplasia intestinal foi relatada em apenas 23% do total de casos.



**Figura 19– Percentual de casos distribuídos segundo a classificação de Laurén e a faixa etária dos pacientes (n=74).**

Teste t-Student  $p=0,011$

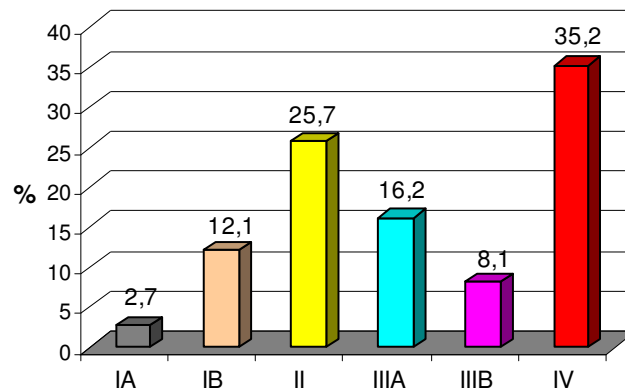
Quando se considera a Classificação de Laurén por sexo (Figura 20), observa-se que há diferença significativa ( $p=0,022$ ) na distribuição destes tumores. No sexo masculino ocorre maior frequência de casos do tipo intestinal (35/51), enquanto entre as mulheres a maior frequência é do tipo difuso (14/23).



**Figura 20- Percentual de casos distribuídos segundo a classificação de Laurén e sexo dos pacientes (n=74).**

Teste Exato de Fisher;  $p=0,022$

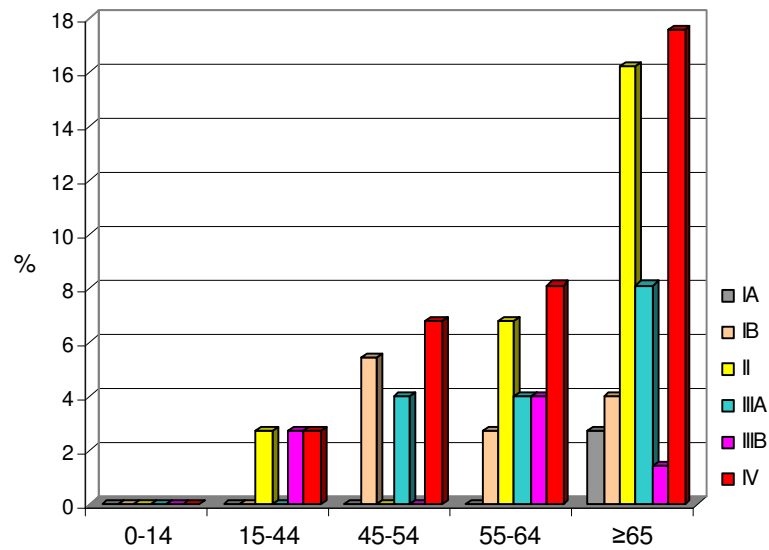
Em relação ao estadiamento tumoral (Figura 21), observou-se maior frequência de tumores nos estágios II, IIIA e, IV representando 77,1% dos casos; enquanto que os tumores em estágio inicial (IA e IB) representaram apenas 14,8% dos casos.



**Figura 21- Percentual de casos distribuídos quanto ao estadiamento tumoral (n=74).**

Distribuindo-se a idade da amostra estudada de acordo com o grau de malignidade, verificou-se um aumento progressivo de casos em função da faixa etária, à exceção do estadiamento IB e IIIB, nos quais houve redução percentual (Figura 22). A população na faixa etária de 15 a 44 anos apresentou frequência similar de tumores nos estádios mais avançados II, IIIB e IV. Não foram detectados casos no estágio IA/IB dentre os indivíduos com idade inferior a 45 anos. Na população com idade superior a 45 anos, observou-se uma frequência variável, com predomínio do estágio IV. Os tumores no estágio IV demonstraram aumento progressivo na frequência em função da idade. Por não ser possível à análise estatística destes dados por faixa etária, devido ao baixo número de casos em alguns estádios, avaliou-se segundo a idade média, não se observando diferença estatística significativa (ANOVA;  $p=0,607$ ).

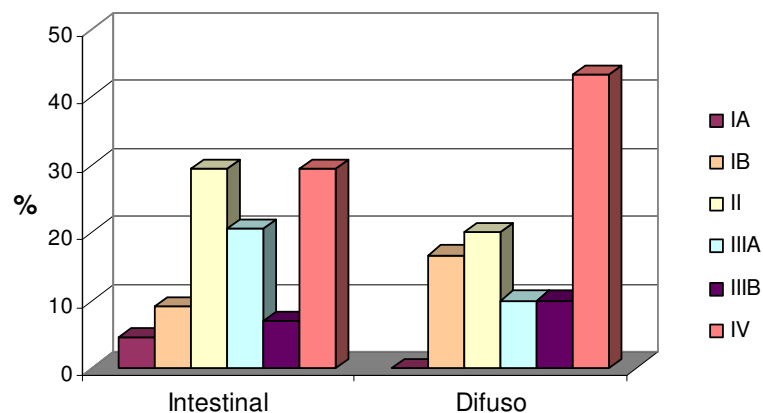




**Figura 22– Percentual de casos distribuídos quanto ao estadiamento tumoral e a faixa etária dos pacientes (n=74).**

ANOVA P = 0,607

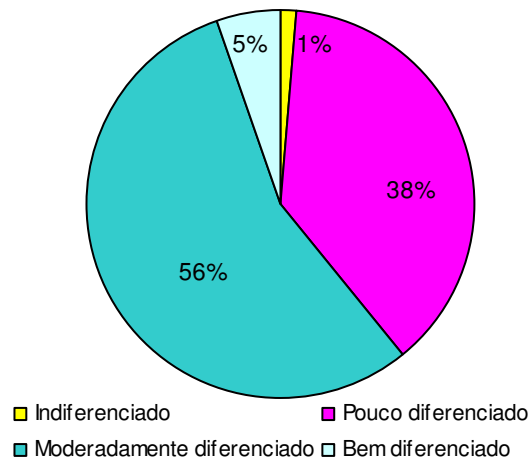
Ao se avaliar o estadiamento em relação à classificação de Laurén, observou-se que 93% dos tumores do tipo intestinal e 83,3% dos tumores do tipo difuso se distribuíram entre os estádios II-IV, mais avançados, que são os tumores denominados tardios nos estudos japoneses. Dentre os tumores tipo intestinal, observou-se maior distribuição nos estádios II, IIIA e IV, enquanto que os do tipo difuso, em sua maioria, se distribuíram nos estádios II e IV (Fig. 23). Os dois únicos casos no estágio IA eram, ambos, do tipo intestinal.



**Figura 23– Percentual de casos distribuídos segundo a classificação de Laurén e o estadiamento tumoral (n=74).**

Quanto ao grau de diferenciação tumoral, 94% (69) dos casos foram definidos como pouco ou moderadamente diferenciados (Fig. 24). Dentre os casos pouco diferenciados, 78,6% eram do tipo difuso (22/28). Relação inversa foi observada dentre os moderadamente diferenciados, onde 83% (34/41) eram do tipo intestinal. Os quatro (4) casos bem diferenciados pertenciam ao tipo intestinal, e o único (1) indiferenciado do estudo ao tipo difuso.

O baixo número de casos em algumas faixas etárias não permitiu análise estatística dos dados de diferenciação por faixa, sendo a análise realizada em relação à idade média. Quanto à média não foi observada diferença estatística significativa nessa correlação (ANOVA;  $p= 0,265$ ).



**Figura 24-** Percentual de casos distribuídos quanto ao grau de diferenciação dos tumores (n=74).

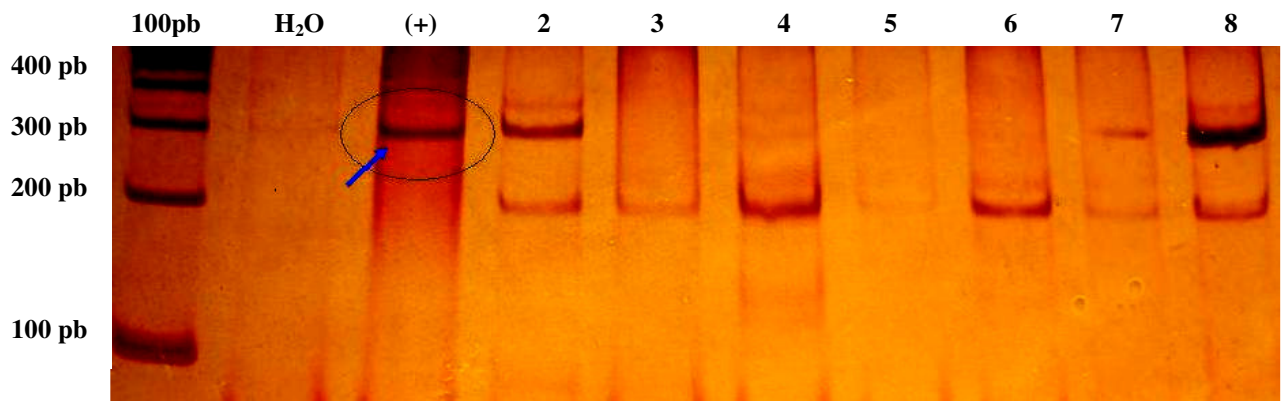
Os dados relacionados à profundidade de invasão, acometimento de linfonodos periféricos e metástases dos tumores estudados estão apresentados na Tabela 4. Observa-se que em 54% dos casos a neoplasia invade a serosa (pT3) e em 8,7% invade estruturas adjacentes (pT4). A metástase para linfonodos regionais (N) foi detectada em 68% dos casos, entretanto, a metástase a distância não pôde ser analisada na maioria dos casos amostrados, por ser uma análise clínica não constante nos prontuários, sendo detectada em somente 4,4% dos casos estudados.

**Tabela 4**– Casos de carcinoma gástrico distribuídos segundo a definição da profundidade da invasão tumoral (pT), comprometimento de linfonodos regionais (pN) e presença de metástases à distância (pM) (n=69).

INVASÃO (pT)		LINFONODOS (pN)		METÁSTASE (pM)				
	Nº de casos	%		Nº de casos	%		Nº de casos	%
T1	3	4,3	N0	22	32	MX	57	82,6
T2	23	33	N1	28	40,5	MO	09	13,0
T3	37	54	N2	16	23,2	M1	03	4,4
T4	6	8,7	N3	3	4,3			
<b>Total</b>	<b>69,0</b>	<b>100,0</b>	<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>100,0</b>	<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>100,0</b>

### 4.3. *Helicobacter pylori* e Câncer gástrico

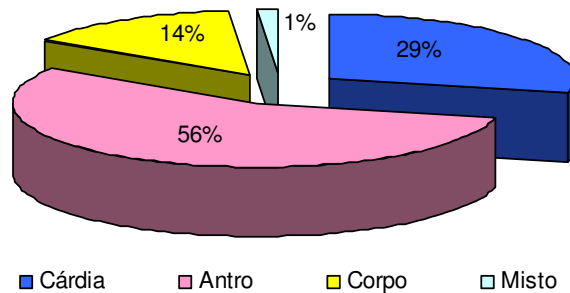
A figura abaixo (Fig. 25) exemplifica um gel de poliácridamida utilizado na detecção do gene *ureC/gMm1* de *H. pylori*.



**Figura 25- Detecção do Gene *ureC* em gel de poliácridamida**

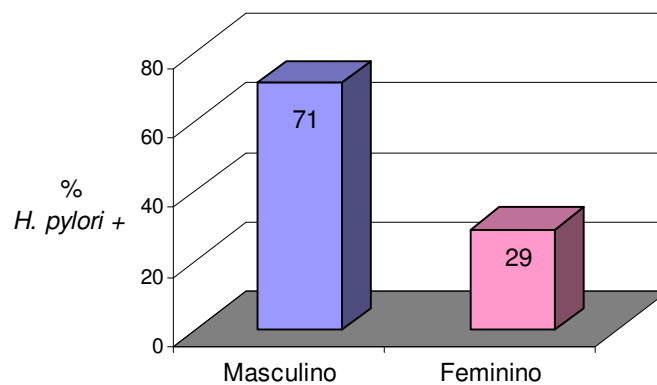
Observa-se fragmento de 294 pb (seta azul) no controle positivo (+). Casos positivos representados nas amostras 2, 7 e 8. Casos negativos estão representados pelas demais amostras (3, 4, 5 e 6). À esquerda padrão 100 pb e água (controle negativo).

A bactéria *H. pylori* foi detectada em 95% (70/74) das amostras analisadas, em tumores localizados principalmente no antro gástrico (Fig. 26). Dentre os casos relatados com metaplasia intestinal, verificou-se associação com *H. pylori* em 88% (15/17) deles.



**Figura 26**–Distribuição da bactéria *Helicobacter pylori* nas diferentes regiões gástricas (n=70).

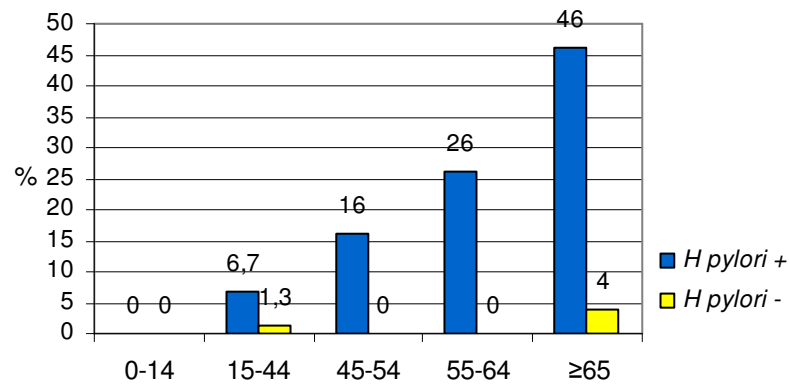
Na distribuição por sexo dos casos *H. pylori*(+)(Fig. 27), observou-se que 71% (50/70) dos casos *H. pylori*(+) eram homens, enquanto que 29% (20/70) eram mulheres. Embora essa diferença não seja significativa dentro do limite de  $p < 0,05$  pode-se observar, pelo teste exato de Fischer, uma tendência de predomínio da bactéria no sexo masculino ( $p = 0,086$ ).



**Figura 27**–Distribuição bacteriana por sexo (n=70).

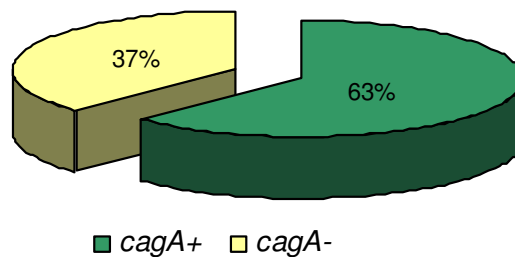
Teste Exato de Fisher;  $p = 0,086$

Em relação à idade, foi observado aumento gradativo na frequência bacteriana com o aumento da faixa etária (Fig. 28). Não foi possível verificar diferenças estatísticas pelas faixas etárias.



**Figura 28**–Frequência de detecção de *H. pylori* em relação a faixa etária (n=74).

O gene *cagA* foi detectado em 63% das amostras (44/70) analisadas (Fig. 29), enquanto que o gene *vacA* foi detectado em 87% destas (61/70).



**Figura 29**–Distribuição do gene *cagA* (n=70).

Dentre os alelos da região peptídica (*s*), o alelo *s1* foi o mais frequente, sendo detectado em 73,8% (45/61) das amostras, enquanto *s2* em 8,2% (5/61). Na análise dos alelos da região média (*m*), detectou-se *m1* em 82% (50/61) dos casos e *m2* em 18% (11/61).

Analisando-se a associação alélica (Fig. 30), verificou-se o predomínio de *s1m1*, presente em 69% dos casos *vacA*(+).

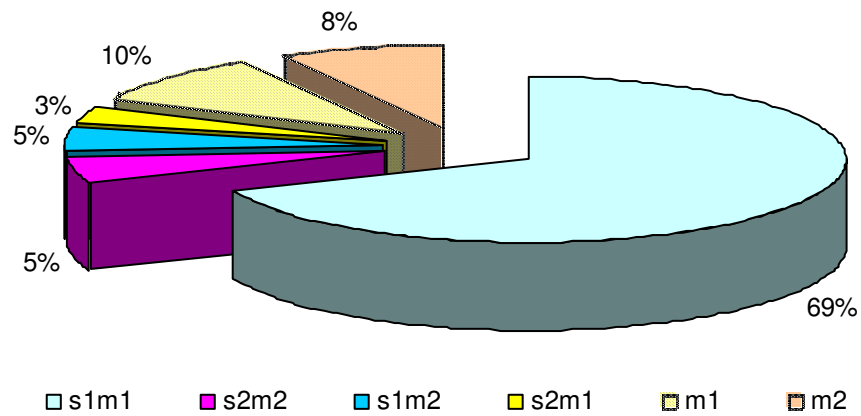


Figura 30–Distribuição alélica do gene *vacA* e alelos *m* (*m1* e *m2*) (n=61).

A associação entre o gene *cagA* e os alelos *s1m1/vacA* foi observada em 46% (32/70) dos casos *H. pylori*(+). Em 7,1% dos casos apenas o gene *cagA* foi detectado; em 4 casos (5,7%) não se detectou a presença de ambos os genes (Fig. 31).

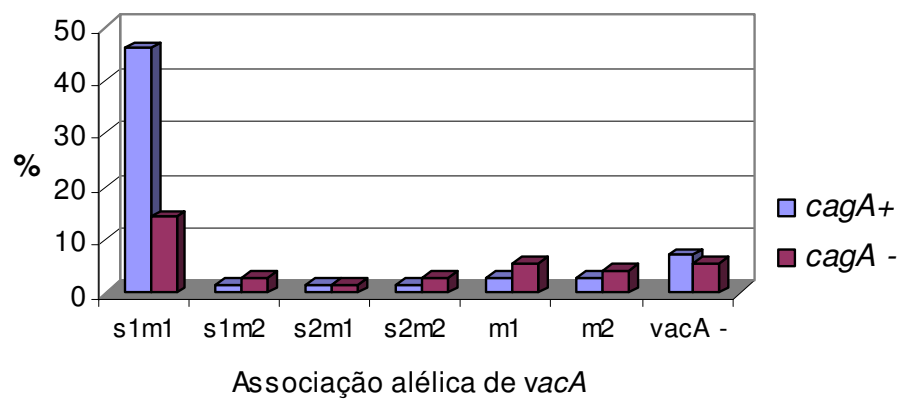
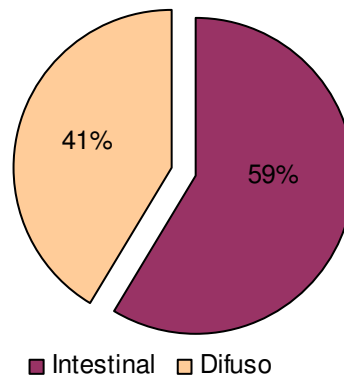


Figura 31–Distribuição alélica do gene *vacA* em relação à presença do gene *cagA* (n=70).

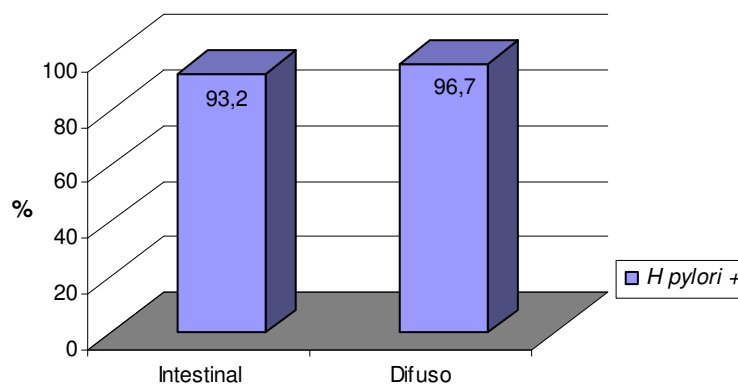
### 4.3.1- Aspectos clínico-patológicos associados à presença de *H. pylori*

Dentre os casos *H. pylori* positivos, 59% (41/70) eram adenocarcinomas do tipo intestinal e 41% (29/70) do tipo difuso (Fig. 32).



**Figura 32-** Frequência de detecção de *H. pylori* em relação a Classificação de Laurén (n=70).

A alta frequência de infecção bacteriana pode ser observada dentro dos tipos histológicos, onde dentre os tumores tipo intestinal 93,2% eram *H. pylori* positivos e dentre os difusos 96,7% (Fig. 33).

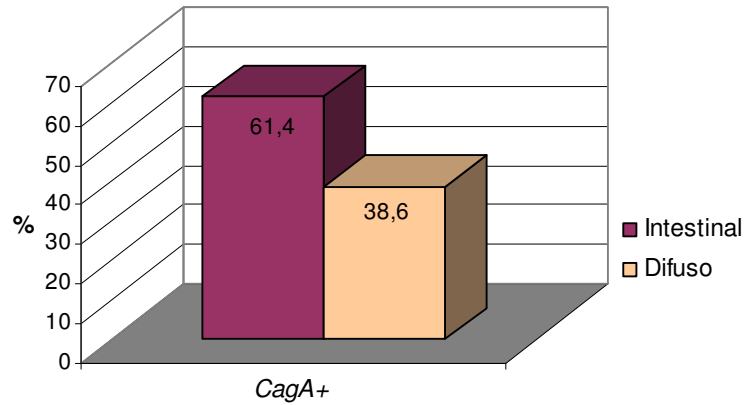


**Figura 33-** Frequência de detecção de *H. pylori* nos tumores tipo intestinal e difuso (n=74)

Teste exato de Fisher ( $p= 0,642$ )

Verificou-se uma maior frequência de infecção *H. pylori cagA(+)* (61,4%) entre os tumores do tipo intestinal (Fig. 34), apesar de não ter havido diferença estatística significativa entre ambos os grupos (Teste exato de Fisher  $p= 0,810$ ). Quanto à

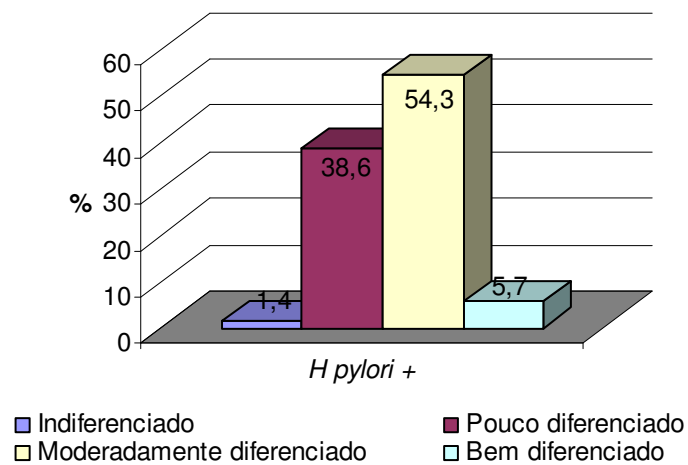
distribuição dos alelos *vacA/s1m1*, não houve predomínio para um determinado tipo histológico; sendo em ambos os tipos observada uma alta frequência dessa associação (67,6% no tipo intestinal e 71% no tipo difuso) .



**Figura 34-** Distribuição de casos quanto a presença de *cagA* e a Classificação de Laurén (n=44).

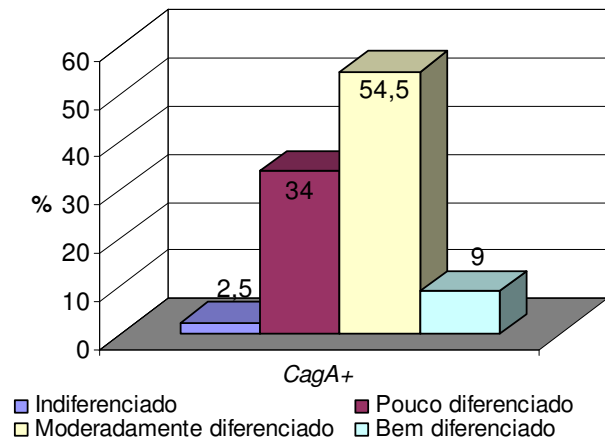
Teste exato de Fisher p= 0,810

A presença de *H. pylori* foi mais predominante nos tumores com perda da diferenciação (94,3%). Os mais freqüentes foram os tumores moderadamente diferenciados, seguido dos pouco diferenciados (Fig. 35). As cepas *cagA*(+) foram também predominantes nos tumores moderadamente diferenciados (Fig. 36); O mesmo ocorrendo com a distribuição dos alelos *vacA/s1m1*.



**Figura 35-** Distribuição dos casos quanto ao grau de diferenciação tumoral e a presença de *H. pylori* (n=70).

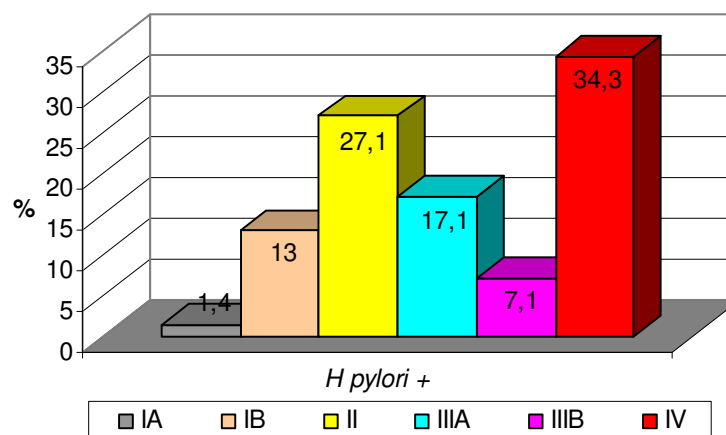




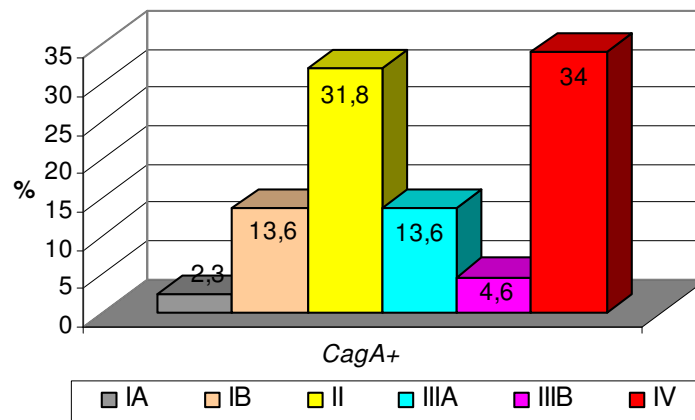
**Figura 36-** Percentual de casos distribuídos quanto a presença de *cagA* e a Diferenciação tumoral (n=44).

Ao se avaliar a presença bacteriana em relação ao estadiamento (Fig. 37), observou-se que a maior parte dos casos *H. pylori*(+) mostrou um padrão de distribuição de freqüências semelhante à da amostra, distribuindo-se nos estádios mais avançados, principalmente entre os estádios IV (34,3%) e II (27,1%). Essa distribuição não foi significativamente alterada pela presença do gene *cagA* (Fig. 38). Quanto à distribuição alélica do gene *vacA*, verificou-se a presença do alelo *s1m1* em todos os estádios tumorais, com predominância também nos estágios IV (21,3%) e II (16,4%).

Não foi possível análise estatística para esses parâmetros, devido ao baixo número de casos em alguns estádios.

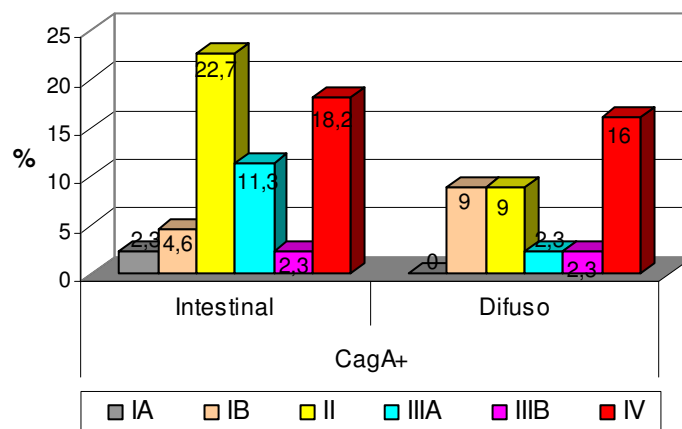


**Figura 37-** Percentual de casos distribuídos quanto ao estadiamento tumoral e a presença de *H. pylori* (n=70).



**Figura 38–** Percentual de casos distribuídos quanto a presença de *cagA* e estadiamento tumoral (n=44).

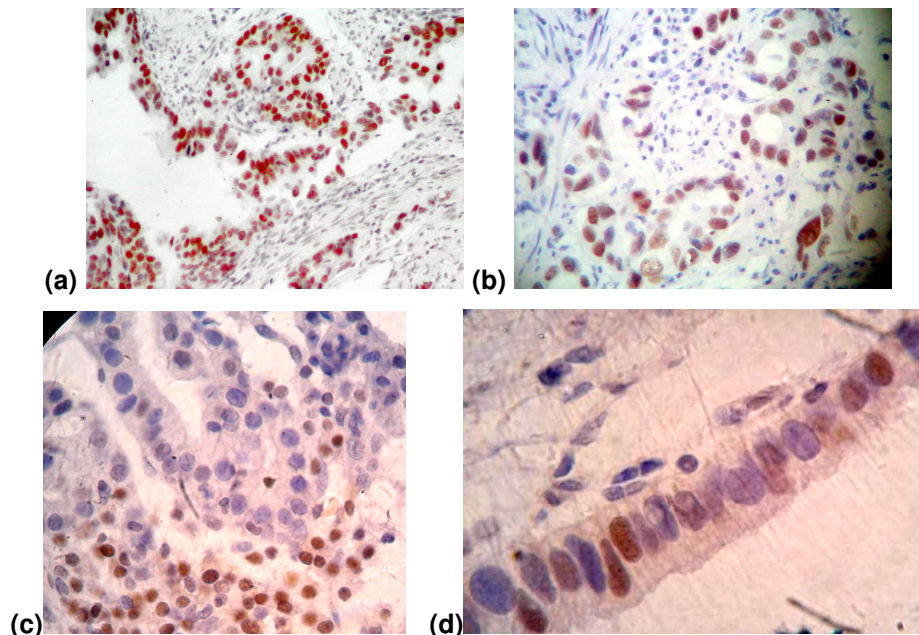
Apesar dos tumores amostrados serem em maior frequência no estágio IV, ao se relacionar o estadiamento e a Classificação de Laurén com a presença do gene *cagA* (Fig. 39), destacou-se dentre o grupo dos tumores intestinais com *H. pylori cagA(+)*, uma maior frequência dos tumores no estágio II (22,7%), seguido dos tumores em estágios IV (18,2%) e IIIA (11,3). Entretanto, na análise do grupo dos tumores difusos, verifica-se a ocorrência de uma mudança nesse padrão de distribuição; a maior frequência é de tumores no estágio IV (16%), seguido dos tumores IB (9%) e II (9%).



**Figura 39-** Percentual de casos *cagA(+)* distribuídos quanto a Classificação de Laurén e estadiamento tumoral (n=44).

#### 4.4. Análise imuno-histoquímica

Casos de câncer gástrico imuno-positivo para as proteínas p53 e p27 são ilustrados abaixo.

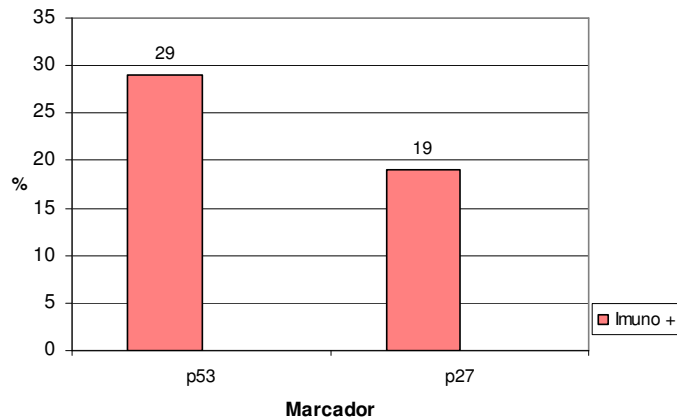


**Figura 40- Detecção imuno-histoquímica das proteínas p53 [a,b] e p27 [c,d]. As células positivas apresentam coloração nuclear castanho-marron [aumento 100x (a), 400x (b/c) e 1000x (d)].**

[a, b] Caso n° 25- Adenocarcinoma do tipo intestinal, moderadamente diferenciado, apresentando marcação nuclear intensa para p53. [c] e [d] Caso n° 52- Adenocarcinoma do tipo difuso, pouco diferenciado, com marcação nuclear moderada e intensa para p27.

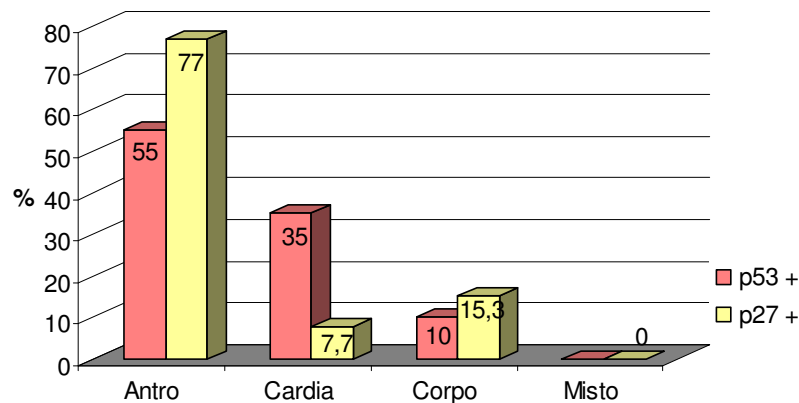
Na análise imuno-histoquímica detectou-se a proteína p53 em 29% (20/70) dos casos analisados. A proteína p27 foi detectada em 19% (13/70) destes (Fig. 41).

Nos 50 casos p53 (-), apenas 18% (9) foram p27(+). O contrário foi observado nos casos p53 positivos, dos 20 casos p53 (+) 80% (16) foram p27(-). Verificou-se não haver associação negativa ou positiva significativa entre esses marcadores (Teste exato de Fisher;  $p= 1,000$ ). Entretanto, observa-se que a frequência da não expressão da proteína p27 é alta nos tumores estudados.



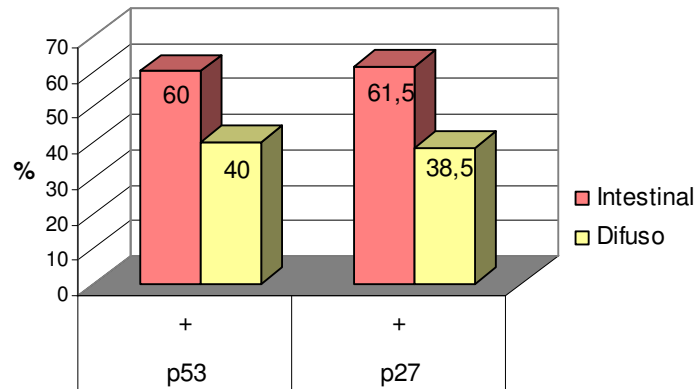
**Figura 41- Percentual de positividade da expressão nuclear das proteínas p53 e p27 por imunohistoquímica (n=70).**

A imunodeteção das proteínas p53 e p27 demonstrou que estas foram predominantes nos tumores localizados no antro gástrico. A segunda localização mais freqüente foi na cárdia para a imunodeteção do p53(+) e no corpo para p27 (Figura 42). Dentre os casos p27(-) 52% se localizaram no antro e 30% na cárdia.



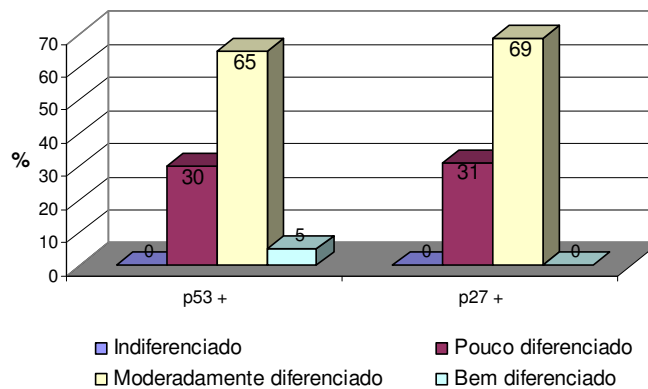
**Figura 42 - Percentual de positividade imunohistoquímica de p53 e p27 distribuído quanto à localização tumoral (p53 n= 20; p27 n= 13).**

A freqüência de imunomarcção da proteína p53 e da proteína p27 (Figura 43) foi semelhante entre os tipos intestinal e difuso ( $p= 1,000$ ), sendo que em ambos os tipos histológicos a freqüência da imunomarcção da proteína p53 foi superior ao da p27.



**Figura 43- Percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 e p27 distribuído quanto à Classificação de Laurén (p53 n= 20; p27 n= 13)**

A análise quanto à diferenciação tumoral demonstrou que a distribuição da frequência de imunomarcção, de ambos os supressores tumorais, seguiu o padrão de distribuição dos tumores gástricos (Fig. 44).



**Figura 44- Percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 e p27 distribuído quanto à diferenciação tumoral (p53 n=20; p27 n=13)**

Com relação ao estadiamento, observou-se a imunomarcção para a proteína p53 em todos os estágios da doença de forma semelhante a da amostragem desses tumores.

Com relação à proteína p27, uma expressiva e semelhante frequência foi observada nos tumores grau II, IIIA e IV (Fig. 45). Dentre os casos p27(-), observou-se que 38,3% eram tumores no estágio IV, 23% no estágio II e 14% no estágio IIIA.

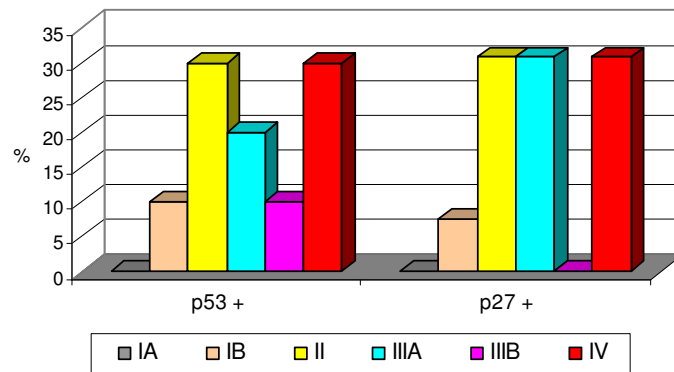


Figura 45- Percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 e p27 distribuído quanto ao estadiamento tumoral (p53 n=20; p27 n=13)

#### 4.4.1. Imuno-histoquímica e *Helicobacter pylori*

Ao se avaliar a expressão imuno-histoquímica dos supressores tumorais, p53 (mutado) e p27, em relação à presença de *H. pylori cagA(+)*, observou-se que as freqüências de imunopositividade de ambas as proteínas não foi modificada pela presença do gene *cagA* (Fig. 46). Nos tumores onde a imunopositividade de p53 foi observada, 95% dos casos eram *H. pylori (+)*, sendo 60% dos casos cepas *cagA(+)*. Por outro lado, cepas *H. pylori cagA(+)* também foram observadas em cerca de 60% dos tumores negativos para a imunopositividade do p53 (Fig. 46).

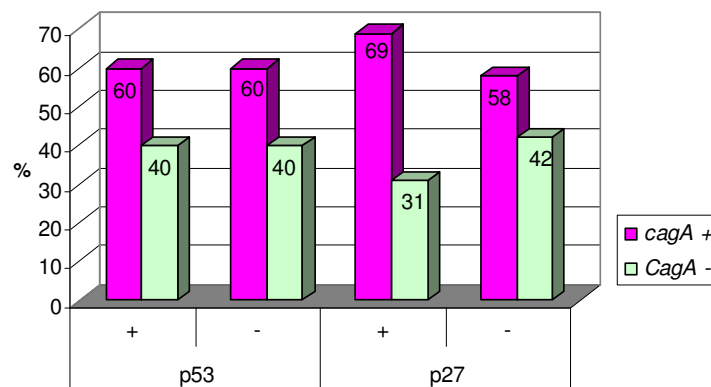
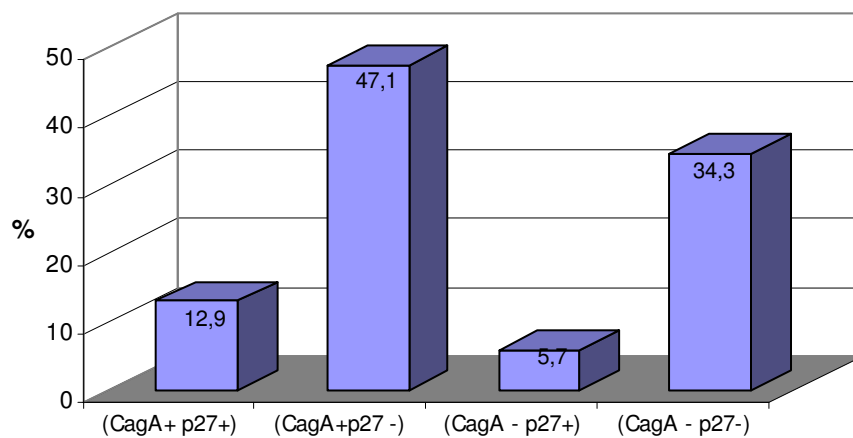


Figura 46- Percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 e p27 distribuído quanto a presença de *cagA* (n= 70).

Teste Exato de Fisher p= 1,000

Dentre os casos p27(+), a freqüência bacteriana foi de 100%, sendo 69% das cepas *cagA*(+). Já dentre os casos p27(-), 93% eram *H. pylori*(+) com 58% deles *cagA*(+).

Avaliando-se o comportamento da proteína p27 em relação ao *cagA*, observa-se alterações na sua expressão (Fig. 47) tanto na presença do gene (47,1%), quanto em sua ausência (34,3%). Não houve diferença estatística significativa na análise destes dados (Teste exato de Fisher;  $p = 1,000$ ).



**Figura 47- Relação entre a presença do gene *cagA* e a detecção imunohistoquímica da proteína p27 (n=70).**

Teste exato de Fisher;  $p = 1,000$

Quanto à distribuição alélica de *vacA*, observou-se o predomínio *s1m1*, independentemente da imunexpressão de p53 e p27 (Fig. 48). Verifica-se que, dentre os casos p27(-), a freqüência desses alelos é maior (52,5%) que nos casos onde esse supressor é normalmente expresso (15,3%). Já em relação à proteína p53 o mesmo não foi observado, a freqüência dos alelos *s1m1* foi maior (47,5%) nos casos p53(-) do que nos casos mutados p53(+), cuja freqüência foi de apenas 20%.

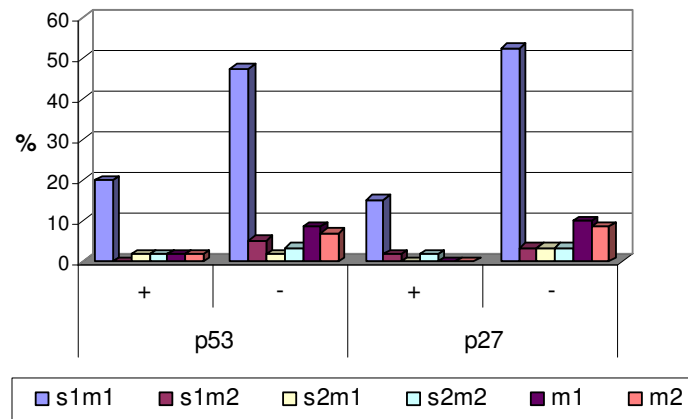


Figura 48- Percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 e p27 distribuído quanto a variação alélica de *vacA* (n=70)

#### 4.5- Análise Molecular de p53

Na triagem mutacional do gene *p53* por PCR-SSCP, detectou-se alterações no padrão de mobilidade eletroforética de 72% (53/74) dos casos (Figura 49). Categorizando por exons, em 35% (26) dos casos apenas um exon foi encontrado alterado, em 26% (19) dois exons possuíam mobilidade alterada e em 9,5% (7) foram detectadas alterações simultâneas em três exons, dos quais o exon 5 foi o mais frequentemente atingido. Nestes últimos, os exons mutados foram 5,6 e 7. Nenhum caso apresentou alteração simultânea nos quatro exons estudados.

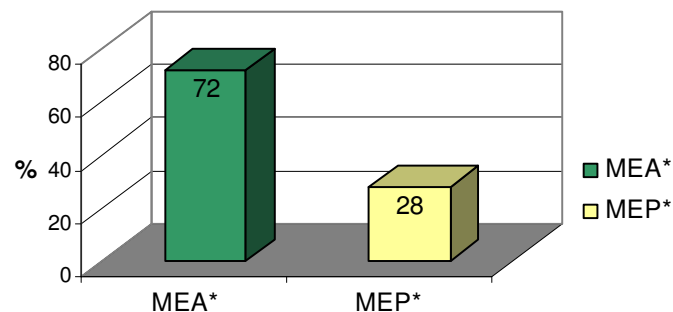


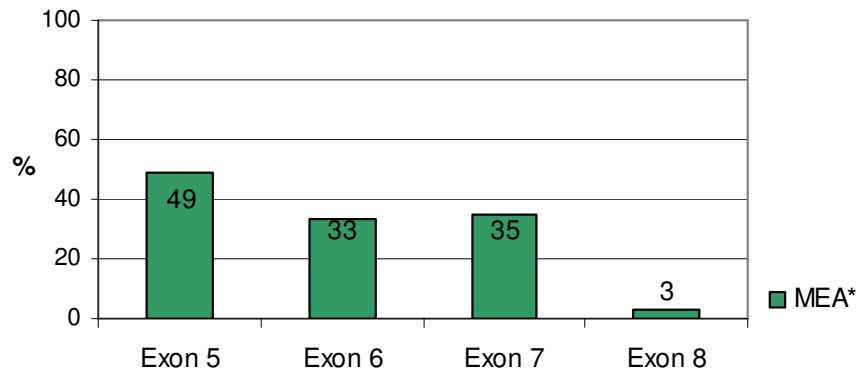
Figura 49- Percentual de alterações no padrão de mobilidade eletroforética do gene *p53*, detectadas por PCR-SSCP (n=74).

\*MEA: Mobilidade eletroforética alterada

\*MEP: Mobilidade eletroforética padrão

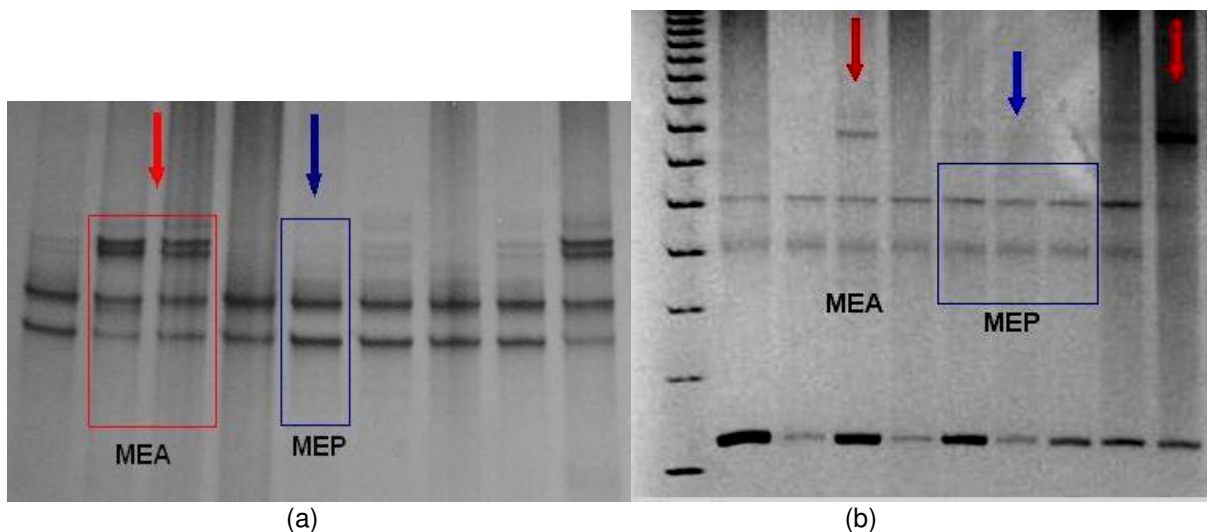


A Figura 50 mostra a freqüência de alterações eletroforéticas encontradas em cada exon. Neste estudo o exon 5 foi o que apresentou maior número de alterações no padrão de bandejamento (36/74), seguido do exon 6 (24/73) e exon 7 (26/74). O exon 8/9 apresentou mobilidade eletroforética alterada apenas em dois casos (3%).



**Figura 50– Percentual de amostras com padrão de migração eletroforética alterado (MEA)\* na análise por PCR-SSCP .**

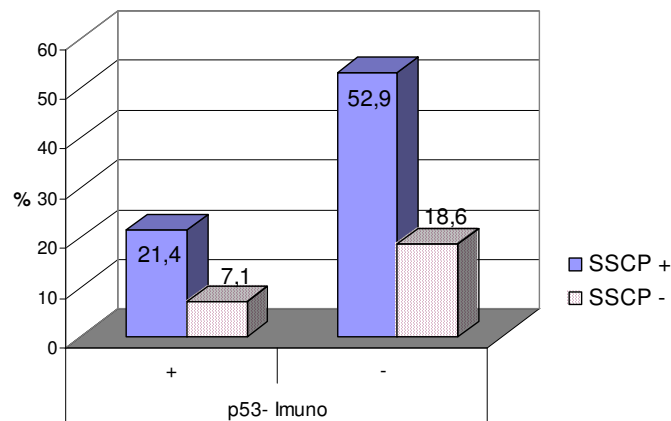
Casos de alterações na mobilidade eletroforética de p53, exons 5 e 7, são ilustrados abaixo.



**Figura 51- Gel de poliacrilamida a 12%, corados pela prata, após PCR-SSCP.**

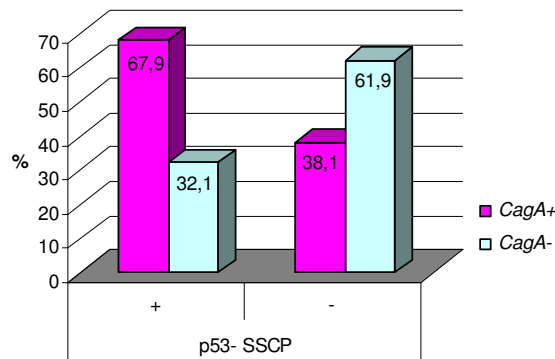
Análise dos exons 5 (a) e 7 (b), onde se observa a Mobilidade eletroforética padrão (em azul) e alterada (vermelho).

Ao se comparar às alterações detectadas no gene p53 com sua imunoexpressão, observa-se que apenas em 21,4% das amostras houve concordância, na detecção de alterações, entre ambas as técnicas (Fig 52). Foram detectados, por PCR-SSCP, 37 casos (52,9%) com mobilidade eletroforética alterada, os quais não exibiram alteração na expressão imuno-histoquímica. Já pela técnica imuno-histoquímica, cinco casos (7,1%) foram detectados positivos sem apresentarem alterações em sua mobilidade eletroforética por PCR-SSCP. A análise pelo Índice Kappa  $\{\kappa= 0,007 (\pm 0,078)\}$ , demonstra não haver boa concordância entre ambas às técnicas. O índice de discordância observado foi de 60%.



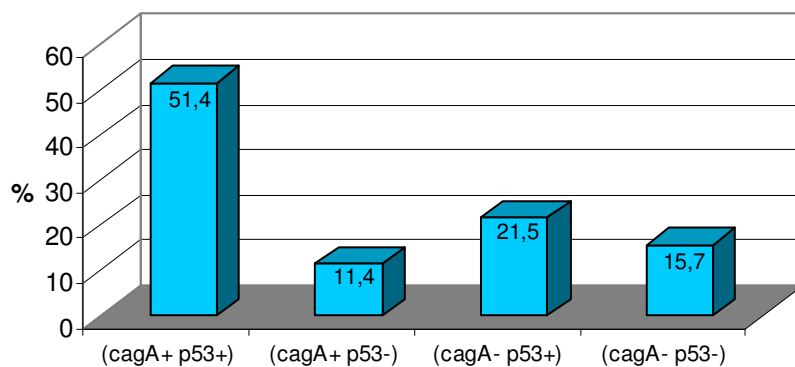
**Figura 52– Análise comparativa do percentual de positividade imuno-histoquímica de p53 em relação à análise mutacional por PCR-SSCP (n=70).**

Não se observou alterações significativas no padrão eletroforético apresentado, por exon, influenciadas pela presença de *H. pylori* (Teste exato de Fisher  $p \geq 0,594 \leq 1,000$ ) ou alelos *s1m1* do gene *vacA* ( $p \geq 0,703 \leq 1,000$ ). Entretanto, ao se avaliar a presença do gene *cagA*, observa-se que há associação estatística (Teste exato de Fisher;  $p= 0,034$ ) desta com as alterações eletroforéticas verificadas no gene p53 (Fig 53).



**Figura 53- Análise mutacional de p53 (PCR-SSCP) em relação à presença de *cagA* (n= 74)**  
 Teste exato de Fisher;  $p= 0,034$

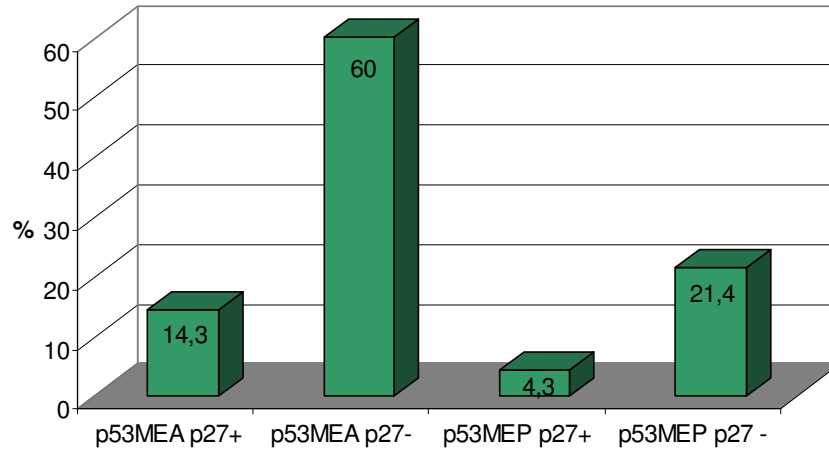
A distribuição das freqüências das alterações eletroforéticas do gene *p53* (*p53+*), associadas à presença de *cagA*, estão apresentadas na Figura 54. Observa-se que em 51,4% dos casos detectou-se a presença de mutações de *p53(+)* associadas à presença do gene. Além disso, somente em 21,5% do total dos casos estudados, verificou-se a presença dessas mutações em sua ausência.



**Figura 54– Associação entre a presença do gene *cagA* e mutações do gene *p53*/PCR-SSCP (n=70).**

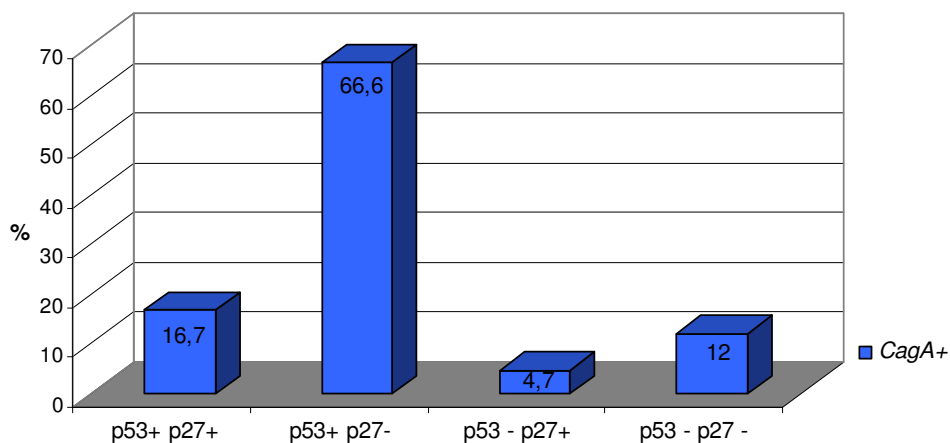
Considerando a alteração eletroforética do *p53* como indicação de mutação, observou-se que em 60% dos casos a atividade de ambos os supressores tumorais, *p53* e *p27*, se encontrou comprometida, tanto pela mutação no caso do *p53* quanto pela ausência no caso do *p27*. Em apenas 14,3% houve a mutação do *p53* com possível compensação pela presença de *p27*. Em 21,4% os tumores não apresentaram a mutação do *p53* e não houve expressão do *p27*. Assim em 35,7%

dos casos verifica-se a possibilidade de ação individual de pelo menos um dos supressores tumorais. Em 4,3% das amostras há indicação de atividade de ambos os supressores (Fig 55).



**Figura 55– Percentual de mutações do gene p53 (PCR-SSCP) em relação à detecção imuno-histoquímica de p27. (n=70)**

A figura 56 mostra a distribuição das alterações eletroforéticas do gene p53 associada à expressão de p27 frente à presença do gene *cagA*.



**Figura 56– Percentual de MEA do gene p53 (PCR-SSCP) e expressão imuno-histoquímica de p27 em relação a presença do gene *cagA*. (n= 42)**

Ao se avaliar estes parâmetros observa-se que os tumores *cagA*(+) apresentam uma alta frequência (66,6%) de alterações de ambos os supressores

tumorais. Em 95,3% dos casos pelo menos um dos supressores tumorais está alterado (p53+ e p27-). Apenas em 4,7% dos casos os dois supressores estão potencialmente ativos (p53- e p27+). Entretanto, não foi verificada diferença estatística significativa entre estas diferentes distribuições ( $p = 1,000$ ).

## 5.0- DISCUSSÃO

O câncer gástrico, devido à alta frequência mundial, prognóstico ruim e alta taxa de mortalidade, têm nas últimas décadas, sido foco de vários estudos objetivando um maior conhecimento dos processos carcinogênicos desencadeantes desses tumores, bem como dos fatores a eles relacionados.

No Brasil, as taxas de incidência desse tumor o colocam na sexta posição entre os demais tipos, sendo que Fortaleza ocupa, dentre as capitais brasileiras, a quinta colocação após São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte e Belém (INCA, 2007). Apesar disso, não se verifica a divulgação, no estado ou capital, de trabalhos delineando o perfil dessa doença no Ceará. No presente estudo, foram focalizados aspectos clínico-epidemiológicos, histopatológicos e moleculares, com o intuito de traçar os aspectos gerais da doença, em pacientes atendidos em dois hospitais públicos de Fortaleza-CE, analisando o impacto da presença de *Helicobacter pylori* e alguns de seus genes na carcinogênese gástrica e no comportamento dos supressores tumorais p53 e p27.

### 5.1. Aspectos clínico-epidemiológicos

Nesse estudo observou-se que, apesar da coleta ter sido realizada em dois Hospitais situados na Capital Fortaleza, pertencentes à Rede Pública de Saúde, 62% dos casos eram provenientes da Região metropolitana e interior do Estado do Ceará e apenas 38% dos casos eram oriundos de Fortaleza. Esse fato demonstra, como ocorre em outros estados do país, a grande migração de pacientes para as capitais à procura de atendimento médico-hospitalar, onde os hospitais da Rede pública prestam serviços a uma população bastante heterogênea.

Foi verificado que a maior parte dos pacientes eram agricultores, aposentados rurais, profissionais do lar e outras atividades não qualificadas, sugerindo baixa classe sócio-econômica da população analisada. Este dado é compatível com o de outros estudos, inclusive no Brasil, de que o câncer gástrico é mais frequente em populações com situação sócio-econômica mais baixa (NISHIMOTO et al., 2002; ALBERTS et al., 2003).

Ao se analisar a incidência da doença por sexo observa-se uma razão de 2,2 homens para cada mulher, corroborando com dados estatísticos mundiais (PARKIN et al., 2005; LEMES et al., 2003, ALBERTS et al., 2003). Observou-se que entre a população mais jovem, intervalo 15-44 anos, a incidência foi idêntica para ambos os sexos. A partir dos 45 anos a proporção se altera gradativamente, atingindo nos pacientes com idade  $\geq 65$  anos a razão masculino:feminino de 3,6:1 (Figura 15). Na amostra estudada esta diferença pode ser devida à maior incidência de casos nas idades mais avançadas, especialmente do sexo masculino.

A faixa etária encontrada neste estudo foi bastante variável, de 23 a 90 anos, sendo que para fins de análise foi calculada a idade média. Esta [57,96 ( $\pm 13,52$ )], apesar de compatível com a de Lemes et al. (2003), os quais encontraram idade média de 64,8 ( $\pm 13,4$ ) anos em estudo na cidade de Belo Horizonte- Minas Gerais, indica uma tendência, na população estudada, de incidência tumoral em idade inferior a do estudo mineiro. De acordo com a revisão de César et al. (2003) a freqüência desses tumores é baixa aos 40 anos, aumentando progressivamente com a idade até atingir valores máximos, em torno dos 70 anos. Na amostra em estudo foi possível verificar o aumento gradativo da freqüência em função da idade. O maior número de casos ocorreu acima dos 55 anos com aumento marcante da freqüência a partir dos 65 anos, especialmente entre os indivíduos do sexo masculino. Estes dados corroboram com aqueles relatados por vários outros autores (RIES et al., 2006; CREW e NEUGUT, 2006; STADTLÄNDER e WATERBOR, 1999).

Alguns estudos com população americana relatam contrastes marcantes quanto à incidência do câncer gástrico entre diferentes grupos raciais onde, indivíduos negros, do sexo masculino, apresentam taxas de incidência e mortalidade quase duas vezes maior que os indivíduos brancos e mulheres negras (CORREA, 2003; STADTLÄNDER e WATERBOR et al., 1999). No presente estudo tal fato não foi observado, sendo a maior parte dos indivíduos portadores da doença de cor parda, com uma minoria negra e branca, possivelmente refletindo a heterogênea constituição da população do estado do Ceará.

O tabagismo é um fator de risco na progressão da displasia e câncer gástrico, já sendo demonstrado que o consumo de ao menos 20 cigarros/dia pode aumentar o risco de câncer em torno de 50% (YOU et al., 2000). Kato et al. (2004a), em estudo na Venezuela, relata que em fumantes com consumo superior a 10 cigarros/dia, pode haver um aumento de 1,8 vezes no risco de metaplasia intestinal

e 3,6 vezes no risco de displasias quando comparados a não-fumantes. Relata-se que o tabagismo pode estar associado com 56% dos casos de adenocarcinomas da cárdia gástrica e com 59% dos casos não-cárdia (ENGEL et al., 2003). Os dados referentes ao tabagismo no presente estudo (67,2% de fumantes usuários por um mínimo de 15 anos) corroboram esses achados e são similares aos de Teixeira e Nogueira (2003), em estudo realizado no interior do estado de São Paulo, onde a freqüência foi de 66,7% em pacientes que referiam o hábito por um período entre 30 e 50 anos.

A freqüência verificada neste estudo quanto ao etilismo foi alta (57,5%), apesar de inferior à descrita por Teixeira e Nogueira (70,8%), indicando que este pode ser também um fator de risco relevante no desenvolvimento desta neoplasia. Mayne e Navarro (2002) relatam forte associação da ingestão de álcool com o desenvolvimento de Carcinoma de células escamosas do esôfago, não sendo o mesmo observado em relação ao Adenocarcinoma de esôfago e cárdia gástrica. Apesar de não haver evidências conclusivas sobre o aumento do risco de câncer gástrico associado ao etilismo há indícios de que sua ação seja sinérgica a do fumo (YOU et al., 2000; CREW e NEUGUT, 2006; KATO et al., 2004a). A ação do álcool se daria ao nível dos tecidos diretamente expostos, alterando o metabolismo celular, com ação imunossupressora e aumento da susceptibilidade celular aos carcinógenos (TEIXEIRA e NOGUEIRA, 2003).

Engel et al. (2003) ressalta que os riscos relacionados a estilo de vida, como etilismo e tabagismo, tendem a ser mais baixo entre as mulheres. Este fato foi também observado no presente estudo, onde se verificou que a maioria dos fumantes e etilistas eram do sexo masculino. A freqüência em relação ao etilismo foi significativamente maior (89,5%) entre os homens e talvez seja uma das explicações da menor freqüência de câncer gástrico encontrada entre as mulheres.

Além desses fatores, a predisposição genética ao câncer gástrico familiar tem sido descrita em diversos países, especialmente casos de mutações no gene *CDH1*. Vários tipos de mutações têm sido encontrados, as quais interferem com a função normal da proteína caderina-E e aumentam a susceptibilidade ao câncer gástrico do tipo difuso (ROVIELLO et al., 2007; MORE et al., 2007; CALDAS et al., 1999). Em um estudo envolvendo indivíduos de uma mesma família, Rocco et al. (2003) relata a observação de alterações genéticas apenas na presença da infecção por *H. pylori*, sugerindo que além do aspecto genético, o câncer gástrico familiar



pode ser influenciado também pela distribuição bacteriana intrafamiliar. No presente estudo, as informações fornecidas sobre histórico familiar de câncer se referiam, vagamente, a parentes de até segundo grau, os quais apresentaram frequência de 35% para algum tipo de câncer, sendo apenas quatro casos relatados como câncer gástrico. Esse baixo número de casos observados não viabilizou a análise estatística desse parâmetro.

A associação entre o tabagismo, etilismo e histórico familiar no presente estudo foi observada em um pequeno grupo (13,5%) com idade média de 61,9 anos e maioria do sexo masculino. Foi observado que as informações fornecidas pelos pacientes ou responsáveis eram normalmente vagas e algumas vezes inconsistentes, referindo casos de óbitos em família por doença crônica, sem o diagnóstico específico ou mesmo acompanhamento médico. Como as informações não foram obtidas de forma precisa nos casos estudados optou-se pela não inclusão das mesmas nas análises aqui realizadas.

A maior frequência dos tumores localizados no antro (57%), porção distal do estômago, seguido da cárdia ou porção proximal (27%), vem em encontro aos dados de outros autores. Estudo de Lemes et al. (2003) relata que 59% dos casos estudados possuíam localização distal. Figueiredo et al. (2002), em estudo de 222 casos em Portugal, verificou 53,6% dos carcinomas gástricos localizados no antro e 17,6% na cárdia. O predomínio no terço distal do estômago também é descrito por Shang e Peña (2005). Em relação à cárdia, Verdecchia et al. (2004) relata a ocorrência de variações na frequência (2% a 30%) em diferentes países da Europa. Tem sido observado que os tumores localizados na cárdia gástrica têm um pior prognóstico, se comparados ao de localização antral (CREW et al., 2006). Alberts et al. (2003), em artigo de revisão, caracteriza os tumores distais como mais associados à baixa classe sócio-econômica e tipo histológico intestinal, além de fortemente associados à infecção por *H. pylori*, esta tríade foi também verificada no presente estudo, onde 51% destes tumores apresentaram as três características.

Embora haja relatos recentes, nos EUA, de uma redução nos casos de tumores distais e aumento dos proximais entre os homens (CREW et al., 2006; ALBERTS et al., 2003), este fato não é ainda homoganeamente observado entre os diversos estudos mundiais. Assim sendo, pode-se concluir que a amostragem aqui utilizada apresenta resultados compatíveis com os demais dados mundiais quanto aos parâmetros clínico-epidemiológicos abordados.

## 5.2. Aspectos Histopatológicos

Na amostra estudada houve representação significativa dos adenocarcinomas difuso e intestinal, sendo este último um pouco mais freqüente (59%), fato também relatado por outros autores (MARIGO et al., 1997; PEREIRA et al., 2001; CAPUTO et al., 2002; LEMES et al., 2003; ARAÚJO-FILHO et al., 2006; CREW e NEUGUT, 2006). Ao se avaliar o estadiamento dos tumores tipo difuso e intestinal em relação à faixa etária foi observado uma relação inversa e significativa entre esses dois tipos histológicos. Os tumores intestinais apresentaram aumento significativo em sua freqüência nos pacientes com idade superior a 65 anos. Nos tumores do tipo difuso observou-se maior distribuição entre os adultos jovens, com idade até 44 anos, a qual diminuiu com o aumento da idade. Por outro lado, a freqüência dos tumores intestinais aumentou com a idade. Essa relação inversa entre os tumores intestinais e difusos com o aumento da idade é relatada em outros estudos onde há um consenso de que os tumores difusos acometem os indivíduos mais jovens (STADTLÄNDER et al., 1999; WERNER et al., 2001; CÉSAR et al., 2002; LEMES et al., 2003). De forma interessante, observa-se que os tumores do tipo intestinal foram predominantes no sexo masculino e os do tipo difuso no feminino. Essa observação é consistente com dados estatísticos, de diferentes regiões mundiais, também relatados pelos autores supra citados. Tais observações apontam a complexidade da tumorigênese gástrica e corroboram com as evidências de vias diferenciadas para estes subtipos tumorais.

Na análise do estadiamento tumoral foi observado o predomínio de tumores mais avançados (estágios II a IV). A invasão de serosa (pT3) foi observada em 54% dos casos e a de estruturas adjacentes (pT4) em 8,7%, sendo que em 68% deles se observou comprometimento linfonodal, demonstrando que o diagnóstico foi tardio em grande parte dos casos de câncer gástrico analisados neste estudo. Resultados similares são descritos em estudos de diversos países (CUNNINGHAM et al., 2005; ALBERTS et al., 2003), com exceção do Japão. Neste país, apesar das altas taxas de incidência, se observa uma maior freqüência na detecção de tumores em estágios iniciais, grande parte com estadiamento I, e taxas de sobrevida muito superiores às observadas mundialmente, conseqüências do amplo sistema de

rastreamento e controle da doença há décadas ali implantado (TOMINAGA, 2001; ALBERTS et al., 2003; INOUE e TSUGANE, 2005; HAMASHIMA et al., 2008).

A maior frequência de detecção tumoral em estágios avançados se reflete em uma menor sobrevida, já que as opções terapêuticas para essa neoplasia são restritas; explica-se assim as altas taxas de mortalidade encontradas para estes tumores (CORREA, 2004). Nos casos de diagnóstico precoce, com o tumor ainda restrito a mucosa gástrica, a taxa de sobrevida em 5 anos pode atingir 95% dos casos; por outro lado, o diagnóstico tardio a reduz para 10 a 20%, sendo ainda associado a piores prognósticos (CREW et al., 2006). Nos casos avançados, com comprometimento de outros órgãos e estruturas adjacentes, a ressecção cirúrgica pode não ser indicada limitando radicalmente as possibilidades terapêuticas (TAKENO et al., 2001). No presente estudo foi observado, durante o período de coleta, a ocorrência de casos nos quais a gastrectomia foi inviabilizada durante a intervenção da equipe cirúrgica, devido ao alto grau de comprometimento das estruturas adjacentes. É possível, por esse motivo, que na amostra estudada os tumores avançados (pT3 e pT4), mesmo sendo os mais frequentes, tenham sido subestimados. Por outro lado, o número reduzido de casos de tumores no estágio IIIB, pode se dever ao fato de que este, diferindo dos demais estágios avançados, refere-se a uma única combinação (pT3, pN2, pM0). Os dados deste estudo mostram que os tumores mais avançados não predominaram dentro de um tipo histológico, difuso e intestinal, pois em ambos os tipos, a distribuição quanto aos estadiamento foi semelhante.

Apesar do câncer gástrico ser mais incidente em indivíduos com idade mais avançada, não foi observada na amostra estudada uma relação da faixa etária com a gravidade da doença, pois, apesar de se observar um aumento da frequência da malignidade tumoral com o aumento da idade, estes dados não foram estatisticamente significantes.

Em relação à diferenciação tumoral, os casos em estudo se distribuíram, em sua maioria, entre pouco (38%) e moderadamente diferenciados (56%). Verificou-se que dentre os casos pouco diferenciados e indiferenciados houve predomínio do tipo difuso, enquanto todos os casos bem diferenciados eram do tipo intestinal. Essas observações são concordantes com as de outros estudos, os quais também ressaltam que o tipo difuso tem caráter indiferenciado, com curso clínico mais agressivo e com pior prognóstico que o intestinal (WERNER et al., 2001;

STADTLÄNDER et al., 1999). Não se verificou relação da diferenciação com a idade média do grupo analisado. Lamentavelmente, a diferenciação tumoral não é um aspecto comumente explorado na literatura e a carência de trabalhos com essa abordagem limitou maiores discussões.

A metástase a distância apresentou-se como um dado limitante na análise histopatológica por não haver sido descrito na maior parte dos casos (82,6%). O maior entrave verificado foi o de tal observação depender de avaliação clínica-laboratorial especializada e, posteriormente a essa análise, não constar nos laudos e/ou prontuários consultados.

### **5.3. Detecção de *Helicobacter pylori* e o câncer gástrico**

Dentre as 74 amostras analisadas no presente estudo, a grande maioria (95%) apresentou amplificação do gene *ureC/g1mM* de *H. pylori*. A maior parte destes casos se situou no antro gástrico (56%), corroborando com os relatos de que a bactéria é mais freqüentemente detectada no adenocarcinoma gástrico distal (AKHTER et al., 2007; TRAJKOV et al., 2007). Altas taxas de infecção bacteriana são observadas nas populações acometidas pelo câncer gástrico (PRINZ et al., 2006; KONTUREK et al., 2006). Kim (2003) relata que a bactéria é encontrada em 70 a 95% dos casos da doença. Observa-se que a freqüência bacteriana é variável de acordo com as diferentes populações mundiais e metodologias diagnósticas utilizadas. A tabela 5 ilustra essas variações.

**Tabela 5-** Distribuição da bactéria *Helicobacter pylori* em casos de câncer gástrico, em diferentes partes do mundo, incluindo o presente estudo.

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Método detecção</b>	<b>País/Estado</b>	<b>N</b>	<b>Detecção <i>H. pylori</i> (%)</b>
NOMURA et al.	1991	Sorologia	Japão/Hawaii	109	94
LEE et al.	1998	Teste urease	Korea	175	78,9
EKSTROM et al.	2001	* Sorologia ** <b>Imunoblot</b>	Suécia (Estocolmo)	298	* 72% ** <b>91%</b>
KONTUREK et al.	2002	Sorologia	Polônia	337	90,8
CAPUTO et al.	2002	Histológico	Itália (Catânia)	60	58
WANG et al.	2002	Histológico	EUA (Tennessee)	30	53
KATO et al.	2004b	Sorologia	Japão	2503	82,8
SUN et al.	2004	Teste urease Histológico	China	23	69,5
PALESTRO et al.	2005	Sorologia	Itália (Torino)	317	82,3
ARAÚJO-FILHO et al.	2006	Sorologia Histológico Teste urease	Brasil (Natal-RN)	56	60,7
THOMAZINI et al.	2006	Histológico* <b>PCR**</b>	Brasil (São Paulo)	42	* 85,7 ** <b>95</b>
TRAJKOV et al.	2007	Sorologia	Macedônia	60	70
MISRA et al.	2007	Histológico	Índia (Allahabad)	54	78
ARIF e SYED	2007	Histológico	Paquistão (Karachi)	50	70
ANDRÉ et al.	2008	<b>PCR</b> (ureC/gmM1)	Brasil (Fortaleza-CE)	74	<b>95</b>

Observa-se que a frequência bacteriana nos pacientes apresentando o CG é alta em diferentes partes do mundo. Além disso, maiores taxas são verificadas quando se utilizam técnicas moleculares, especialmente a PCR, para a detecção bacteriana. A associação entre a presença bacteriana e o desenvolvimento do câncer, além de outras desordens gástricas já é um consenso, sendo amplamente relatada na literatura mundial (UEMURA e OKAMOTO et al. 2000; MARSHALL, 2002; CORREA, 2003; HSU et al., 2007, MULLER et al., 2007).

A alta frequência de *H. pylori*, e seu aumento com a idade, verificados no presente estudo é semelhante aos dados de diversos outros trabalhos, conduzidos em populações heterogêneas de diferentes países, em pacientes acometidos ou não por desordens gástricas, inclusive o câncer (KONTUREK et al., 2006; SINGH e GOSHAL, 2006; BROWN; 2000; PASSARO et al., 2002). Observa-se nestes estudos que a prevalência da infecção bacteriana é bastante variável (15% a 92%) quanto à área geográfica, raça e idade das populações estudadas, sendo observadas taxas

mais altas de infecção nos países em desenvolvimento e estando relacionadas ao baixo nível sócio-econômico (SOUSA et al., 2001; MORAES e SILVA, 2003; AHMED et al., 2006). Rodrigues et al. (2005), estudando uma população de baixa renda, em Fortaleza- Ceará, também verificou aumento significativo na prevalência da infecção bacteriana com a idade; indivíduos de até 10 anos apresentaram taxa de 47,5%, a qual atingiu valores superiores a 87% nos adultos maiores de 60 anos.

No presente estudo, o predomínio observado da infecção bacteriana em homens é, possivelmente, reflexo da população estudada, já que a maior parte dos indivíduos acometidos por essa neoplasia foram do sexo masculino.

Uma diminuição da prevalência bacteriana tem sido observada dentre os brancos de classe média e alta, com idade até 50 anos, em países como EUA, Japão, China, Singapura (SINGH e GOSHAL, 2006). Apesar disso, Japão e China ainda apresentam altas taxas, que variam de 60% na população jovem (10-40 anos) a 80-90% nos pacientes acima de 50 anos (PRINZ, 2006; WANG et al., 2003). É provável que, além da melhora nos hábitos alimentares e higiênicos dessa população, esta redução esteja também relacionada com o melhor preparo e conservação alimentar. Infelizmente, essa diminuição ainda não se refletiu, de forma impactante, na redução dos casos de câncer gástrico, apesar de demonstrado que a erradicação bacteriana bloqueia a progressão da metaplasia e atrofia gástrica, além de promover melhora na gastrite em curso, reduzindo a incidência da doença (UEMURA e OKAMOTO, 2000; VIETH e STOLTE, 2006; KATO et al., 2007).

Apesar da alta incidência de infecção por *H. pylori*, somente uma pequena parcela da população infectada desenvolve o câncer gástrico (UEMURA et al., 2001; VIETH e STOLTE, 2006; HSU et al., 2007). Essa complexa interação, que determina o aparecimento da doença apenas em uma parte dos indivíduos infectados, é ainda alvo de numerosos questionamentos e pesquisas. A presença de fatores de virulência bacterianos associados a fatores genéticos e ambientais, possivelmente promove as condições necessárias ao desenvolvimento e evolução da doença.

A infecção pode induzir uma atrofia gástrica devido à agressão bacteriana direta e a reação inflamatória local com apoptose das glândulas gástricas (TSUJI et al., 2003). A maior produção de citocinas inflamatórias, estimulada pela presença bacteriana, afeta a resposta imune celular, estimulando a produção de radicais livres, especialmente espécies oxigênio reativas (ROS) e cloramina, um agente

oxidante tóxico produzido na mucosa como consequência da invasão pela bactéria (OLIVARES e GISBERT, 2006).

A presença bacteriana também estimula uma ação pró-carcinogênica mediada por prostaglandinas e ciclooxygenase (PGE/ COX-2), a qual inclui a estimulação da proliferação celular, inibição da apoptose, indução de angiogênese e efeito mutagênico direto nas células gástricas (KONTUREK, 2003). A inflamação severa provocada por *H. pylori* é implicada no desenvolvimento de danos na mucosa gástrica com intensa infiltração granulocítica e linfocítica, além de acentuada resposta imune celular (mediada por Linfócitos T helper 1- LTh1). A hiperexpressão das citocinas já referidas (IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$ ) é associada à infecção por *H. pylori*, mediando ou exacerbando a resposta imune celular (PRINZ et al., 2006). Brandt et al. (2005) sugere que o gene *cagA* pode atuar de forma multifuncional, tanto promovendo mudanças no citoesqueleto celular quanto ativando a produção do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e IL-8, fatores determinantes associados a resposta inflamatória crônica.

Álvares et al. (2006) relata que em pacientes com gastrite crônica associada à infecção bacteriana, especialmente cepas *cagA*(+), a intensidade e atividade inflamatória, bem como atrofia e metaplasia intestinal são significativamente maiores que entre os pacientes não infectados ou infectados por cepas *cagA*(-). Brito et al. (2003), em estudo no estado de Pernambuco-Brasil, verificou uma alta prevalência do gene *cagA* associado à úlcera duodenal e gastrite, o mesmo não sendo observado para *vac/s1*. Figueiredo et al. (2002) verificou que cepas com os alelos *s1*, *m1* e *cagA* eram mais prevalentes em pacientes com carcinoma gástrico, sendo associadas também com maior inflamação tecidual, dano epitelial, atrofia glandular e metaplasia intestinal do que aquelas que não os possuíam. A resposta individual a esses genes é bastante variável dentre diferentes populações, apesar do real motivo não estar ainda plenamente esclarecido. Sugere-se que características do hospedeiro ou da cepa infectante sejam os principais fatores envolvidos nessa diversidade observada.

Neste estudo, o gene *cagA* foi detectado em 63% dos casos *H. pylori* (+). Em relação aos alelos de *vacA*, *s1* (73,8%) e *m1* (82%) foram os predominantes, estando associados (*vacA/s1m1*) em 69% dos casos. As cepas com o genótipo *s1/m1* produzem grande quantidade de toxinas, cepas *s1/m2* uma quantidade moderada, enquanto que cepas *s2/m2* produzem pouca ou nenhuma toxina

(ATHERTON,1995; OLIVARES e GISBERT, 2006). A alta freqüência desses genes verificada nesse estudo é semelhante à relatada por outros trabalhos os quais tem, nos últimos anos, relacionado à presença do gene *cagA* e alelos de *vacA* a uma diversidade de desordens gástricas.

Ashour et al. (2002a) em estudo no Brasil, envolvendo crianças com úlcera duodenal, verificou uma freqüência semelhante ao do presente estudo para o gene *cagA* (69,1%). Em todos os casos de úlcera duodenal estavam presentes os alelos *s1* (100%) e *m1* (84,2%), enquanto o alelo *s2* foi encontrado somente em pacientes que não apresentavam úlcera. O autor demonstrou haver associação entre a presença de *cagA* e os alelos *s1/m1* de *vacA* com úlcera duodenal. Martins et al. (2005), estudando pacientes com úlcera péptica na região norte do Brasil, observou freqüência de 78% do gene *cagA* e do genótipo *vacA/s1m1*, os quais estiveram significativamente associados. Thomazini et al. (2006), em estudo conduzido em 42 pacientes com adenocarcinoma gástrico no estado de São Paulo, verificou freqüência bacteriana idêntica à do presente estudo, entretanto, a freqüência dos genes *cagA*, *s1*, *m1*, bem como a associação *s1m1* se mostrou inferior; o gene *cagA* foi detectado em 54,7% dos pacientes, os alelos *s1* e *m1* em 57,1% e 61,9%, respectivamente e a associação *s1m1* foi observada em 57,1% dos casos. Menores freqüências do genótipo *vacA/s1m1* são também relatadas em outras regiões do Brasil, para diferentes desordens gástricas inclusive o câncer, as quais variam de 35% em Belo Horizonte (ASHOUR et al., 2002b) a 59% no interior de São Paulo (RIBEIRO et al., 2003; GATTI et al., 2005).

Higashi et al. (2002) sugere que diferenças estruturais na proteína *cagA* estão associadas com as diferenças funcionais observadas em diferentes regiões com altas taxas de incidência do câncer gástrico, como Japão e Coréia. Evans e Evans (2001), ao examinar variações nos sítios de fosforilação de *cagA*, conclui que devido ao polimorfismo nestes sítios as moléculas não são igualmente ativas, acarretando uma diversidade funcional da proteína, justificando talvez as diferenças observadas nos diferentes indivíduos e populações. Verifica-se que nas regiões onde o câncer gástrico é mais freqüente ocorre a circulação endêmica da proteína biologicamente mais ativa. Segundo os autores acima citados, o potencial de *cagA* para iniciar a resposta na célula hospedeira seria variável, não se sabendo entretanto, de que forma esse polimorfismo poderia influenciar os epítomos protéicos. Ramelah et al. (2005), em estudo na Malásia, relata a heterogeneidade do gene



*cagA*, tipos A, B e C, relacionada a diferentes grupos étnicos ali residentes. Uma das variantes, o *cagA* tipo A, estaria mais associada a grupo étnico específico (Chinês) que apresenta maior risco para o desenvolvimento de úlcera péptica e câncer gástrico. A heterogeneidade do gene *cagA* é também relatada por Tomasini et al. (2003) que observou que a infecção por uma única cepa bacteriana pode incluir variáveis proporções de colônias com diferentes genótipos de *cagA*.

A diferente patogenicidade entre as cepas é também relatada quanto ao gene *vacA*. Montecucco e Bernard (2003) comentam que *vacA* parece induzir atividade tanto imunossupressora quanto pró-inflamatória, dependente do tipo celular a ela ligado. Sua ação pró-inflamatória seria mediada pela capacidade de promover a expressão da enzima COX-2 nos linfócitos T, neutrófilos e macrófagos, além de ativar a produção de outras citocinas como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina 6 (IL-6) pelos mastócitos. Martins et al. (2005), em estudo na região Norte do Brasil, observou associação entre os genótipos de *vacA/s1m1* e o gene *cagA*. Tal associação seria mais relacionada a metaplasia intestinal, intensa infiltração tecidual de neutrófilos e linfócitos, e maior atividade inflamatória do que as cepas *cagA(-)* e *vacA/s2* e *m2*.

Apesar da maior patogenicidade das cepas com o genótipo *cagA(+)* e *vacA/s1m1*, a relação entre esses genótipos é ainda desconhecida. Sabe-se que não há uma ligação física entre ambos no cromossomo de *H. pylori* (ASHOUR et al., 2001), entretanto, é possível que ocorra uma ação sinérgica entre esses genes, ou seus produtos gênicos, sendo os diferentes fenótipos talvez induzidos por fatores do hospedeiro, resultando em resposta inflamatória com diferentes proporções. Confirmando essa maior patogenicidade, foi observada no presente estudo uma alta frequência de *cagA* e *vac/s1m1* em tumores histologicamente avançados e clinicamente agressivos.

A detecção simultânea de alguns alelos de *vacA* foi verificada em um pequeno número de casos e provavelmente se deva à presença de uma co-infecção bacteriana mista, fato também referido por Ashour et al. (2002). O pequeno número de casos (2) dessa provável co-infecção não permitiu análises estatísticas para demais observações quanto ao seu significado.

A metaplasia intestinal foi relatada em pequena parte dos casos estudados, possivelmente pelo estágio avançado da maioria destes. Vale ressaltar que, como previamente abordada esta é uma alteração que ocorre nos estágios iniciais da

carcinogênese gástrica. Observou-se que os casos estiveram, em sua maioria, relacionados à presença de *H. pylori*, discordando de Yamazaki et al. (2003), que relata que a metaplasia intestinal e a atrofia glandular severa são acompanhadas do desaparecimento da colonização bacteriana. Ao contrário, Wang et al. (2002) verificou uma freqüência bacteriana alta (100%) relacionada tanto a metaplasia intestinal quanto ao carcinoma gástrico em estágio inicial.

Quando analisada a freqüência bacteriana dentre os tumores do tipo intestinal e difuso, verificou-se que esta foi similar entre ambos os tipos, fato também observado por Thomazini et al. (2006). Entretanto, quando se observa a presença de *cagA* verifica-se que nos tumores tipo intestinal esse gene é mais freqüente, apesar de não existir diferença significativa, indicando apenas, como descrito na literatura, uma relação de patogenicidade da bactéria com o tipo intestinal. Por outro lado, verificou-se o encontro da combinação *vacA/s1m1* na mesma proporção entre estes dois tipos histológicos, o que pode representar que nos tumores do tipo difuso a bactéria tenha participação na carcinogênese, mas por via diferente daquela observada no tipo intestinal.

Na análise do estadiamento e diferenciação tumoral, frente à presença de *H. pylori* e do gene *cagA*, verificou-se a maior freqüência bacteriana/*cagA*(+) dentre os tumores com estadiamento IV e II, apresentando moderada e pouca diferenciação. Essa distribuição dos tumores foi muito similar à observada na análise geral da amostra estudada, independente da presença bacteriana. O mesmo foi observado ao se analisar a distribuição dos estadiamentos quanto à classificação de Laurén na presença do gene *cagA*, a qual mostrou predomínio de casos no estágio IV e II, para ambos os tipos tumorais. Há carência na literatura de relatos com essa abordagem, dificultando maiores discussões.

#### **5.4. Análise imuno-histoquímica e triagem mutacional**

A detecção de mutações de *p53*, por imuno-histoquímica (IHQ) ou técnica molecular (SSCP), é utilizada em diferentes tumores no acompanhamento de recorrências pós-tratamento ou como um marcador de clonalidade tumoral já que, as células carcinomatosas, quando separadas da massa tumoral principal, apresentam o mesmo padrão de mutação e expressão de *p53* (CHO et al., 1999; GUIMARÃES e

HAINAUT, 2002). Entretanto, apesar de sua utilização como fator prognóstico em diversos tumores como os de mama, cólon e pulmão (LACROIX et al., 2006), seu real papel no adenocarcinoma gástrico é ainda alvo de pesquisas.

Estudos utilizando a detecção imuno-histoquímica da proteína p53 mostram uma frequência variada nos tumores gástricos. Um consenso é a sua presença nos tumores mais avançados (WANG et al., 2002). Entretanto, no presente estudo, apesar do grande número de casos com essa característica, foi observado uma frequência inferior àquelas relatadas na literatura (Tab. 6). Dois problemas técnicos poderiam justificar uma subestimativa da marcação imuno-histoquímica: padronização inadequada do anticorpo utilizado e perda antigênica por fixação inadequada (excessiva ou mesmo causada por formalina não tamponada). Considerando que foi encontrada alta positividade para outros marcadores pesquisados neste mesmo material, evidenciando sua qualidade, acredita-se que a redução encontrada, frente à observada na literatura, corresponda à frequência real na amostra estudada. Além disso, o anticorpo utilizado neste estudo — DO7, o qual reconhece os aminoácidos 19-26 (VOJTESEK et., 1992) — foi o comumente usado em outros trabalhos, sendo também utilizado em diferentes materiais e apresentando ótimos resultados.

**Tabela 6-** Distribuição quanto à frequência de expressão de p53 detectadas por IHQ em adenocarcinomas gástricos, observada por diferentes autores, incluindo o presente estudo.

<b>Autor</b>	<b>País</b>	<b>N</b>	<b>Expressão de p53(%)</b>
ANDRÉ, 2008	Brasil	70	29
LEE et al., 2008	Korea	152	56,6
BANI-HANI et al., 2005	Jordânia	89	51,7
LIN et al. , 2005	China	46	43,5
MATTAR et al., 2004	Brasil	22	63,6
LAN et al., 2003	China	64	76,2
LEE et al., 2003	Koréia	841	43
WANG et al., 2002	USA	30	60

ZHANG et al., 2001	China	20	75
-----------------------	-------	----	----

Por outro lado, na triagem mutacional por SSCP verificou-se uma alta frequência de alterações na mobilidade eletroforética (72%) do gene *p53*. A frequência de mutações verificada se situa entre os índices normalmente relatados para diversas neoplasias, em diferentes estudos (Tab. 7). Pela sua função chave como regulador do ciclo celular e reparo o gene *p53* vem sendo estudado há algum tempo e apresenta um espectro mutacional bastante amplo. Em uma revisão de 1994, Greenblatt et al., já relatava que 87% das mutações de *p53* se situam nos exons 5-8, sendo que a maioria dos estudos se restringe a estudá-los (Tab. 7). Fenoglio-Preiser et al. (2003) relata que dentre os sítios mutacionais mais comuns, além destes exons, encontram-se também os códonos 175, 248, 273, 282, 245 e 213.

**Tabela 7-** Detecção de alterações na mobilidade eletroforética do gene *p53*/PCR-SSCP em diferentes neoplasias malignas, incluindo o presente estudo.

Autor	Número casos	SSCP (+) (%)	Tipo de neoplasia	País/Exon
ANDRÉ, 2008	74	72	Câncer gástrico	Brasil Exons 5-8
VIDAURRETA et al., 2008	353	19,7	Cancer colorretal	Espanha Exons 5-8
MURTAZA et al., 2006	45	77,8	Carcinoma de esôfago	Índia Exons 5-8
BAHNASSY et al., 2005	50	30	Carcinoma de esôfago	Egito Exons 5-8
WANG et al., 2004	34	32,4	Câncer gástrico	Taiwan Exons 4-8
PHATAK et al., 2002	44	13,6	Glioma	(Índia) Exons 5-9
KLUMB et al., 2001	12	33,3	Linfoma Não-Hodgking	(Brasil) Exons 5-8/9
PINHEIRO&VILLA, 2001	122	3,3	Carcinoma cervical	Brasil Exons 5-8
HIRANUMA et al., 1998	45	40	Carcinoma oral	Japão Exons 5-8
NYLANDER et al., 1996	80	48	Carcinoma oral	(Suécia) Exons 5-9
MUNIRAJAN et al., 1996	53	21	Carcinoma oral	Índia Exons 5-8
NAGAI et al., 1995	47	49	Carcinoma Trato respiratório superior	Brasil Exons 4-8

Foi observada considerável discordância entre a análise do gene *p53* por SSCP e a detecção da proteína por IHQ. Em 52,9% dos casos as alterações gênicas

verificadas por SSCP não se refletiram na detecção imuno-histoquímica da proteína mutada. É possível que, nestes casos, as alterações tenham resultado na deleção ou formação da proteína truncada, não detectável pela imuno-histoquímica (HIRANUMA et al., 1998). Por outro lado, em uma pequena porção dos casos (7,1%), a proteína foi detectada pela IHQ sem a detecção de alterações gênicas por SSCP. Possivelmente este fato se deve à detecção da proteína selvagem, e fisiologicamente ativa, acumulada no núcleo como resultado de uma resposta a danos no DNA. Outra hipótese seria a presença de outras alterações gênicas, situadas fora daqueles pontos analisados, as quais poderiam influenciar os mecanismos de degradação protéica. Segundo Hiranuma et al. (1998), a ligação de proteínas virais ou mesmo celulares a proteína p53 selvagem, bem como danos ao DNA por agentes genotóxicos físicos ou químicos, poderiam estabilizar a proteína, levando a detecção IHQ, com resultados falso-positivos. Fenoglio-Preiser et al. (2003) também observa que a correlação entre ambas as técnicas é geralmente baixa no câncer gástrico. Como no presente estudo, diversos outros, utilizando ambas as técnicas de análise, relatam certo grau de discordância entre elas (Tab. 8).

**Tabela 8-** Análise comparativa entre a detecção imuno-histoquímica (IH) e análise mutacional do gene p53 (SSCP) em diferentes neoplasias malignas, incluindo o presente estudo.

Autor	N	Análise de p53		Concordância entre as técnicas		Observações
		Gene p53 SSCP (+)	Proteína p53 IH (+)	IH (+) e SSCP (+)	SSCP (+) e IH (+)	
ANDRÉ, 2008	70	72%	29%	28,6%	21,4%	Câncer gástrico
ASKMALM et al., 2004	266	28,2%	20%	38,9%	47,7%	Câncer de mama
CHANG et al., 2004	61	44%	46%	100%	89%	Pulmão
MATTAR et al., 2004	22	81,8%	63,6%	*	*	Câncer gástrico (*41 % dos casos discordantes)
PAN et al., 2004	97	52,6%	62,9%	59%	70,6%	Carcinoma retal
HWANG et al., 1999	23	17,4%	78,3%	22%	100%	Astrocitoma
ONO et al., 1997	48	23%	39,6%	61%	100%	Astrocitoma
LOUIS et al., 1993	34	32,4%	50%	41%	63,6%	Tumor astrocítico

A técnica SSCP é indicada para a triagem mutacional por sua alta sensibilidade e especificidade. É capaz de detectar alterações em amostras de DNA com apenas 1% de DNA tumoral, enquanto sua especificidade é algo em torno de 90-100%, quando comparada ao seqüenciamento do DNA (GAIDANO et al., 1991; CONDIE et al., 1993). Já a imuno-histoquímica é método amplamente utilizado como ferramenta diagnóstica e prognóstica nas rotinas dos laboratórios de patologia, sendo mais aplicável na detecção de marcadores relacionados ao câncer. Entretanto, apresenta menor sensibilidade e especificidade em relação à detecção da mutação do gene *p53* (DUENAS GONZALEZ et al., 1996).

Louis et al. (1993) relata que alterações no gene *p53* não são necessariamente associadas à sua detecção protéica, fato também verificado por Cho et al. (1999). Concluiu-se no presente trabalho que, conforme já abordado por estes autores, o procedimento ideal é a combinação de ambas as técnicas para a determinação das alterações de *p53*. Na impossibilidade desse procedimento, sugere-se a utilização de PCR-SSCP na triagem mutacional de *p53*, o qual se mostrou bastante sensível às diversas alterações desse gene observadas no presente estudo.

Além da proteína *p53*, que tem como um dos principais mecanismos de ação o bloqueio do ciclo celular pela interação com complexos específicos, inclusive o *cdk2/E*, a proteína *p27* atua também impedindo que a célula atravesse o ponto de restrição G1/S, por meio da inativação deste mesmo complexo. Considerando esse ponto comum entre essas proteínas, ambas com atividade supressora no ciclo celular, no presente estudo levantou-se a hipótese de que a *p27* poderia atuar de forma compensatória nos casos em que a *p53* se encontrasse mutada.

Na maior parte dos casos (81%) em que se detectou a mutação de *p53*, por PCR-SSCP, foi também observada a não detecção imuno-histoquímica de *p27*, sugerindo a inativação de ambas às proteínas no controle do ciclo celular via *cdk2*. Não se verificou indício da existência de alguma via compensatória entre estas proteínas, ou seja, nos casos em que uma delas estivesse suprimida a outra estivesse agindo como compensador na supressão tumoral. As alterações entre elas pareceram ocorrer de forma independente já que *p27* apresentou expressão reduzida também nos casos *p53(-)*, ou não mutados. Liu et al. (2001) e Al-Moundhri et al. (2005) também verificaram alterações nessas proteínas no câncer gástrico, sugerindo que a análise combinada de *p53* e *p27* possui adicional valor prognóstico.

A capacidade funcional de p53 é freqüentemente alterada no câncer; a perda de sua atividade transcricional e antiproliferativa representa importante papel no desenvolvimento e evolução das neoplasias, inclusive gástrica; o mesmo podendo ser observado quanto à proteína p27. As células expressando a proteína p53 mutada e reduzida expressão de p27 não possuem a plena capacidade de controlar a proliferação celular, o que resulta no reparo ineficiente do DNA e na instabilidade genética (LACROIX et al., 2006).

A redução da expressão do supressor tumoral p27 parece ser uma alteração relevante para o processo tumorigênico em diversos tumores, localizados tanto no sistema digestivo como em outros órgãos. A redução, observada no presente estudo, corrobora com dados relatados em diversos outros trabalhos com tumores de esôfago, cólon, reto e fígado (CHETTY, 2003; LEI et al., 2005), carcinomas oral de células escamosas (KUDO et al., 1998), mama, próstata e linfomas (LLOYD et al., 1999; TSIHLIAS et al., 1999). A detecção imuno-histoquímica reduzida (marcação inferior a 50%) dessa proteína tem sido relacionada à maior estadiamento, invasão e progressão tumoral, além de associada com baixos índices de sobrevivência e pior prognóstico nos diversos tumores.

Em relação ao câncer gástrico, Yasui et al. (2001) relata que a menor expressão de p27 está relacionada com o desenvolvimento e progressão da doença, estando correlacionada com a invasão tumoral e presença de metástases linfonodais. A avaliação do decréscimo, ou mesmo ausência, da proteína pode ser utilizada também na predição de falência do tratamento, além de fator prognóstico independente relacionado à sobrevida. Nitti et al. (2002) verificou associação da expressão reduzida da proteína com adenocarcinomas gástricos avançados e pouco diferenciados, considerando-a como um fator prognóstico negativo, com valor clínico potencial. O mesmo é abordado por diversos autores, os quais sugerem sua importância na progressão tumoral e metástase das células tumorais, além de indicá-la como útil na instalação de terapia adjuvante pós-cirúrgica (KIM et al., 2000; SGAMBATO et al., 2000; HAN et al., 1999). De acordo com a revisão de Lloyd et al. (1999), a utilidade de p27 como um marcador prognóstico e/ou diagnóstico é validada por diversos estudos. Vale ressaltar que a localização citoplasmática de p27 também se relaciona a piores prognósticos (BLAIN e MASSAGUE, 2002). Ainda assim, há estudos que discordam dessa utilização de p27 como um marcador no carcinoma gástrico (FEAKINS et al., 2000; MULLER et al., 2000).

Os reais mecanismos pelos quais a expressão de p27 é alterada não são ainda completamente estabelecidos. Mutações ou alterações no gene *p27* são raras e ao que parece o maior controle protéico se dá por mecanismos pós-transcricionais, os quais variam desde o controle traducional, na célula quiescente, até aos mecanismos proteolíticos intracelulares (KOFF, 2006). O mecanismo mais provável é o aumento de sua degradação, ou por alterações genéticas no sistema de degradação proteossomal, ou por ação de fatores específicos de crescimento tumoral, hormônios, ou outros fatores sobre a proteína p27 e seus elementos reguladores, como já sugerido por Jacks e Weinberg (1998).

#### **5.4.1- Alterações dos supressores tumorais p53 e p27 e *H. pylori***

Alguns autores têm encontrado relação entre a presença de *H. pylori* e a diminuição da expressão do supressor tumoral p27 e/ou mutação do p53. Neste estudo, na análise conjunta de *p53* e proteína p27, observou-se uma alta frequência (60%) de alterações ocorrendo simultaneamente, o que reforça a idéia de que a ação de ambos se encontra comprometida no câncer gástrico. A bactéria foi detectada na maior parte (95%) destes casos, sendo que em 66,7% deles o gene *cagA* estava presente. Tais dados sugerem que estas alterações possam se dever a uma influência bacteriana.

Foi verificada uma reduzida expressão de p27, *in vivo*, relacionada à presença bacteriana; a grande maioria (93%) dos tumores p27(-) eram também *H. pylori* (+). Entretanto, esses dados não foram estatisticamente significantes na amostragem analisada pois a bactéria foi detectada na totalidade dos casos p27(+). A reduzida expressão desse supressor relacionada à presença bacteriana tem sido descrito na literatura.

Shirin et al. (2000) observou, em cultivo de células, a supressão de sua expressão associada à presença de *H. pylori*, além disso, estas células apresentaram resistência a apoptose, mesmo na presença de agentes indutores como bactérias entéricas, agentes quimioterápicos e radiação.

O mesmo foi observado por Eguchi et al. (2003), o qual conclui que a bactéria aumenta a degradação proteossomal de p27, por via distinta da proteólise fisiológica (ubiquitina-independente), contribuindo assim para o aumento do risco de



câncer gástrico associado à infecção bacteriana crônica. Eguchi et al. (2004) sugere também possível ação regulatória de p27 na resposta apoptótica de células epiteliais gástricas, cultivadas na presença bacteriana. Adicionalmente, Yu et al. (2001) observou reversão nas alterações de p27, verificadas na metaplasia gástrica, após a erradicação de *H. pylori*. O mesmo foi relatado por Kim et al. (2006), que observou também que a bactéria promove uma diminuição da expressão epitelial de p27 através do aumento de sua degradação *in vivo*, concluindo que esse pode ser o mecanismo pelo qual ela media a hiperproliferação celular e carcinogênese gástrica. Kuzushita et al. (2005) observou que a colonização por *H. pylori* em ratos p27-deficientes colaborou com a carcinogênese gástrica. Finalmente, Lin et al. (2006) observou, em cultivo de células, que uma das proteínas de *H. pylori*, a GroES, além da indução de citocinas pró-inflamatórias promove o aumento na expressão de proteínas associadas à proliferação celular, além da diminuição na expressão de p27.

Quando se observa à presença do gene *cagA*, em relação à expressão do p27, parece haver uma influência não significativa estatisticamente. Entretanto, foi verificado neste estudo que em grande parte dos casos *cagA*(+) não se detectou a expressão de p27, podendo se inferir que é possível que esse gene possa influenciar os mecanismos de degradação dessa proteína, como já sugerido por Eguchi et al. (2003). Contudo, outras alterações devem contribuir para a não expressão de p27 já que, mesmo na ausência de *cagA* observou-se sua não detecção.

Além da alteração da expressão do supressor p27, outra alteração relatada, principalmente em câncer de mama, é o seu aprisionamento citoplasmático, causada pela fosforilação dentro do resíduo de localização nuclear da proteína p27, bloqueando o reconhecimento desse sítio pelos fatores de importação nuclear. Dessa forma a observação da presença desse supressor no citoplasma torna-se relevante (CLARKE, 2003; LIANG et al., 2002; BLAIN e MASSAGUÉ, 2002; SHIN et al., 2002; VIGLIETTO et al., 2002). Neste estudo não foi observado o fenômeno de aprisionamento citoplasmático do p27, sugerindo que esta alteração não seja fato comum em adenocarcinomas gástricos.

Em relação à *p53*, Ahmed et al. (2000) observou, em estudo *in vitro*, a inibição da proliferação celular epitelial gástrica na presença de *H. pylori*. Os autores sugerem que a bactéria exerça uma ação de modulação sobre as proteínas

regulatórias do ciclo celular por mecanismos diversos, dentre eles, pelo aumento na expressão de p53 e conseqüentemente de p21, ou pela diminuição na expressão da ciclina E. Lima et al. (2008) também observa uma alta frequência de mutações nesse gene associada à presença bacteriana. Shibata et al. (2002) relata que a mutação do *p53* é mais freqüente em pacientes infectados por cepas de *H. pylori cagA (+)* que nos pacientes não infectados ou infectados por cepas *cagA (-)*, apesar dos mecanismos não estarem ainda esclarecidos. No presente estudo, a análise realizada por exon não demonstrou associação das alterações eletroforéticas com a presença de *H. pylori*, alelos *vac/s1m1* ou gene *cagA*. Entretanto, ao se analisar as alterações de uma forma geral, agrupando os quatro exons estudados, verificou-se que elas eram realmente mais freqüentes, de forma significativa, na presença de *cagA*. Possivelmente essas alterações estejam relacionadas ao fato de que a inflamação crônica por *H. pylori* leva a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quais podem, por meio do stress oxidativo, lesar diretamente o DNA celular promovendo modificações gênicas potencialmente carcinogênicas (CHANG et al., 2004).

Apesar de não estar muito claro o papel de *cagA*, é relatado que a infecção por *H. pylori* promove a expressão da enzima óxido-nítrico sintase induzida (iNOS), além de sustentar a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos e neutrófilos envolvidos na resposta imune; o que pode promover danos às células epiteliais e ao DNA do hospedeiro, com conseqüente aumento no risco para a carcinogênese gástrica (SON et al., 2001; RIEDER et al., 2003). A relação é de tal importância que se observa uma menor expressão da iNOS após a erradicação bacteriana com terapia antimicrobiana (MANNICK et al., 1996).

Fisiologicamente, uma pequena quantidade de óxido nítrico é produzida, a partir da arginina, pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS) constitutiva do hospedeiro. Este, ao se difundir pela membrana celular, exerce diversas funções bioregulatórias como vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, regulação da neurotransmissão, além da ação citotóxica na resposta imune natural do hospedeiro, inclusive com atividade anti-tumoral (XU et al., 2002; XIA e WONG, 2003). Entretanto, por ser um radical livre, a molécula NO é altamente reativa e potencialmente tóxica, podendo participar da formação de compostos nitrosos carcinogênicos, além de causar desaminação nas bases do DNA, perda da integridade de suas fitas e inativação de suas enzimas de reparo (FELLEY-BOSCO,

1998). Uma das conseqüências desses danos ao DNA é promover o aumento na expressão de p53 para reparo ou indução da apoptose (XU et al., 2002). Esse aumento da proteína p53, segundo Forrester et al. (1996), poderia também atuar promovendo o controle da síntese de NO, por meio da supressão da expressão gênica da iNOS, desempenhando assim importante papel supressor na atividade carcinogênica e potencialmente mutagênica do óxido nítrico. Entretanto, a inativação mutacional de p53 pode acontecer em diversos tumores nos quais os níveis da NOS se encontra aumentado, inviabilizando sua ação e resultando no aumento do NO, acarretando assim os danos ao DNA a ele relacionados (GREENBLATT et al.; 1994). A acumulação de p53 e aumento na expressão da iNOS, detectada por imuno-histoquímica, é relatada por Feng et al. (2002), que conclui que estes podem ser fatores responsáveis pela carcinogênese gástrica e agressividade tumoral. No adenocarcinoma gástrico, Begnami et al. (2004) verificou um aumento da expressão da iNOS nos casos mais avançados da doença; também Wang et al. (2005) verificou um aumento em torno de 75% na atividade da NOS quando comparado ao tecido normal, reforçando a hipótese de que a produção excessiva de NO pode contribuir para a progressão do câncer. Além disso, o autor relata que a alta expressão da iNOS foi significativamente associada à mutação de p53 e proliferação celular tumoral, concluindo que a inativação de p53 e a superexpressão de iNOS desempenham um papel sinérgico na carcinogênese gástrica. O aumento no risco de câncer induzido pela alta freqüência de mutações de p53, devido à ação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e aldeídos é também abordada por Hussein e Harris (2006).

O epitélio gástrico é também constantemente exposto a moléculas oxigênio-reativas (ROS); no caso da infecção por *H. pylori*, há um estímulo na produção desses radicais livres pelas células inflamatórias envolvidas na resposta imune do hospedeiro, promovendo danos à mucosa gástrica e aumentando o risco de desenvolvimento do câncer gástrico (SMOOT et al., 2000). Baek et al. (2004) relata que a presença bacteriana induz alterações em diversas proteínas, demonstrando assim a importância do stress oxidativo relacionado a *H. pylori*, na patogênese das diversas desordens gástricas, incluindo a carcinogênese.

No presente estudo verificou-se que na maior parte dos casos *cagA*(+) foi detectada a mutação do gene p53, o que reforça a hipótese de sua relação com a mutação desse supressor tumoral, possivelmente mediada pelo stress oxidativo.

Entretanto, há indícios de que outros fatores sejam relevantes já que o *p53* também se encontrou mutado, porém em menor parcela, na ausência de *cagA*.

Para as proteínas *p53(+)* e *p27(-)*, observou-se maior frequência dentre os tumores localizados no antro gástrico, tipo intestinal de Laurén, com pouca ou moderada diferenciação e estadiamento IV e II. Fica clara a importância das alterações simultâneas desses supressores nos tumores estudados; verificando-se que na maior parte deles (60%) ambos estavam inativos, especialmente quando se avalia a presença do gene *cagA*.

Diante dos dados apresentados observa-se a relevância de estudos abordando as alterações de supressores tumorais em câncer gástrico de forma independente e também associada à presença de *Helicobacter pylori* e seus respectivos componentes patogênicos. Esses dados devem se somar os outros estudos que contribuirão para a elucidação das possíveis vias tumorigênicas, as quais concorrem para a formação desse tipo de neoplasia. Ao se entender a carcinogênese gástrica, poderão ser identificados marcadores de uso para diagnóstico precoce bem como de valor prognóstico, com os quais se beneficiará a população exposta aos diversos fatores de risco já estabelecidos. Adicionalmente, a ocorrência de uma alta frequência de tumores em estadiamentos avançados, ressalta a necessidade da implantação de métodos de diagnóstico precoce da doença em nosso Sistema de Saúde (SUS), no intuito de viabilizar o tratamento e aumentar a sobrevivência dos indivíduos acometidos.

## 6.0- CONCLUSÕES

- A frequência da bactéria *Helicobacter pylori* foi alta nas amostras de adenocarcinoma gástrico estudadas, situando-se entre os valores normalmente relatados para diferentes populações mundiais.
- A frequência de cepas de *Helicobacter pylori* apresentando o gene *cagA*(+) foi alta. Quanto à variação alélica de *vacA*, observou-se predomínio dos alelos *s1* e *m1*, considerados mais patogênicos, os quais estiveram associados na maioria dos casos analisados.
- A expressão da proteína p27 se encontrou reduzida na maior parte dos casos estudados. Não foi verificada ação compensatória dessa proteína nos casos p53(+).
- Na triagem mutacional do gene p53 foi detectado um alto número de alterações na mobilidade eletroforética das amostras analisadas, indicando a presença de mutações nesse supressor tumoral. A imunodeteção da proteína p53 apresentou resultados inferiores ao normalmente relatado na literatura.
- Não se observou correlação significativa entre a detecção imuno-histoquímica da proteína p53 com os achados da triagem mutacional do gene *p53*. A maior parte das alterações detectadas na triagem mutacional não se refletiu na detecção protéica pela imuno-histoquímica. Considerando-se a alta sensibilidade e especificidade da técnica de PCR-SSCP, concluiu-se que a triagem mutacional de *p53* é a mais adequada na análise das alterações de p53 relacionadas ao câncer gástrico.
- A presença de *Helicobacter pylori*, *cagA* e *vac/s1m1* não afetou de forma significativa à expressão imuno-histoquímica de p53. Por outro lado, a ocorrência de alterações detectadas por PCR-SSCP foi significativamente maior nos casos *cagA*(+), sugerindo que cepas portadoras desse gene possam colaborar para a indução da mutação de forma ainda não esclarecida.

- Apesar de uma menor expressão de p27 nos tumores *cagA*+, a presença de *Helicobacter pylori*, *cagA* e *vac/s1m1* não afetou de forma significativa a expressão imuno-histoquímica de p27.
- Os supressores tumorais p53 e p27 podem ser um ponto chave de desregulação do ciclo celular que, quando associados a outros fatores, os quais incluem a infecção por cepas patogênicas de *H. pylori*, podem favorecer o desenvolvimento e progressão da neoplasia gástrica.

## 7.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. et al. *Helicobacter pylori* inhibits gastric cell cycle progression. **Microbes Infect.**, v. 2(10), p. 1159-69, ago. 2000.

AHMED, K. S. et al. Prevalence study to elucidate the transmission pathways of *Helicobacter pylori* at oral and gastroduodenal sites of a South Indian population. **Singapore Med J.**, v. 47(4), p. 291-6, abr. 2006.

AL-HUMAYED, S. M. et al. Comparison of 4 laboratory methods for detection of *Helicobacter pylori*. **Saudi Med J.**, v. 29(4), p. 530-2, 2008.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALBERTS, S. R.; CERVANTES, A.; VAN DE VELDE, C. J. H. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. **Annals of Oncology**, v. 14, p. 31-36, 2003.

AL-MOUNDHRI, M. S. et al. The prognostic significance of p53, p27 kip1, p21 waf1, HER-2/neu, and Ki67 proteins expression in gastric cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study of 121 Arab patients. **J Surg Oncol.**, v. 91(4), p. 243-52, 2005.

ALLAKER, R.P. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. **J Med Microbiol.**, v.51(4), p. 312-317, Abr. 2002.

ALVARES, M.M.D. et al. *Helicobacter pylori* associated gastritis: topographical pattern, associated diseases and correlation with cagA status. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.42, n.1, p.51-59, 2006.

ARAÚJO-FILHO, I. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in advanced gastric carcinoma. **Arq Gastroenterol.**, v. 43(4), p.288-92, 2006.

ARIF, M.; SYED, S. Association of *Helicobacter pylori* with carcinoma of stomach. **J Pak Med Assoc.**, v. 57(7), p. 337-41, 2007.

ASAHI, M. et al. *Helicobacter pylori* cagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. **J Exp Med.**, v. 191, p. 593-602, 2000.

ASHOUR, A.A. et al. Associação entre cagA e alelos do vacA de *Helicobacter pylori* e úlcera duodenal em crianças no Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 38, n. 2, p. 79-85, 2002(a).

ASHOUR, A. A. et al. Distribution of vacA genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 33(3), p. 173-8, Jul. 2002(b).

ASKMALM, M. S. et al. Mutation and accumulation of p53 related to results of adjuvant therapy of postmenopausal breast cancer patients. **Acta Oncol.**, v. 43(3), p. 235-44, 2004.

ATHERTON, J.C. et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. **J. Biol. Chem.**, v. 270(30), p. 17771-7, 1995.

ATHERTON, J. C. *H. pylori* virulence factors. **Br. Med. Bull.**, v. 54, p. 105–120, 1998.

BAEK, H. Y. et al. Oxidative-stress-related proteome changes in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. **Biochem J.**, v. 379(2), p. 291-9, 2004.

BANI-HANI, K. E. et al. Combined evaluation of expressions of cyclin E and p53 proteins as prognostic factors for patients with gastric cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 11(4), p. 1447-53, fev. 2005.

BAHNASSY, A. A. et al. Human papillomavirus infection in Egyptian esophageal carcinoma: correlation with p53, p21, mdm2, C-erbB2 and impact on survival. **Pathol Int.**, v. 55(2), p. 53-62, fev. 2005.

BARCINSKI, M. A. Morte celular. In: **Casali** da Rocha, J. C.; **Gil** Ferreira, C. (Org.). **Oncologia Molecular**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, v.1, p.57-63, 2004.

BAUERFEIND, P. et al. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. **Gut**, v. 40, p. 25–30, 1997.

BEGNAMI, M. D. F. S. et al. Análise imuno-histoquímica das sintases do óxido nítrico em adenocarcinomas gástricos. **J Bras Pat Med Lab**, v. 40, n.5, p. 351-7, 2004.



BLASER, M. J. et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Res.**, v. 55, p. 2111–15, 1995.

BLASER, M. J.; ATHERTON, J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **J Clin Invest.**, v. 113(3), p. 321-33, Review, 2004.

BLASER, M. J. et al. Early-life family structure and microbially induced cancer risk. **PLoS Med.**, v. 4(1), p. e7, 2007.

BLAIN, S.W.; MASSAGUE, J. Breast cancer banishes p27 from nucleus. **Nat Med.**, v. 8(10), p. 1076-8, 2002.

BORRMANN, R. Geschwulste des Magens und Duodenums. In: Henke, F.; Lubarch, O. (ed) **Handbuch der speziellen pathologischen Anatomic und Histologic**. Springer: Berlin Heidelberg New York, p. 865-879, 1926.

BOUCHARD, C. et al. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. **EMBO J.**, v. 18(19), p. 5321-33, 1999.

BRANDT, S. et al. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102(26), p. 9300-5, 2005.

BRASIL. Ministério de Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999**, Rio de janeiro: INCA, 2002. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 23 mai. 2008.

BRASIL. Ministério de Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil**, Rio de janeiro: INCA, 2007. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 23 mai. 2008.

BRASIL. Ministério de Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **A situação do câncer no Brasil**, Rio de janeiro: INCA, 2006. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 23 mai. 2008.

BRESCIANI, C.; PEREZ, R. O.; GAMA-RODRIGUES, J. Familial gastric cancer. **Arq Gastroenterol.**, v. 40(2), p. 114-7, 2003.

BRITTO, A. V. Stomach cancer: risk factors. **Cad. Saúde Pública**; v. 13(1), p. 7-13, 1997.

BRITO, C. A. et al. Prevalence of cagA and vacA genes in isolates from patients with Helicobacter pylori-associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 98(6), p. 817-21, 2003.

BROWN, L.M. Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission. **Epidemiol Rev.**, v. 22(2), p. 283-97, Review, 2000.

BROW, C.D.; GATTER, K.C. Ki-67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v. 40, p. 2-11, 2002.

CALDAS, C. et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. **J Med Genet** ; 36:873-80, 1999.

CAPUTO, S. et al. Helicobacter pylori and gastric cancer. The incidence of infection in personal experience. **Minerva Chir.**, v. 57(5), p.649-55, 2002.

CÉSAR, A. C. G. et al. Fatores Genéticos e Ambientais Envolvidos na Carcinogênese Gástrica. **Arq Gastroenterol.**, v. 39(4), p. 253-259, Revisão, 2002.

CHAN, A.O. E-cadherin in gastric cancer. **World J Gastroenterol.**, v. 12(2), p. 199-203. Review, 2006.

CHANG, C. S. et al. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in H. pylori-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. **World J Gastroenterol.**, v. 10(15), p. 2232-40, 2004.

CHANG, M. Y. et al. High frequency of frameshift mutation on p53 gene in Taiwanese with non small cell lung cancer. **Cancer Lett.**, v. 222(2), p. 195-204, 2005.

CHÈNE, P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. **Nat Rev Cancer.**, v. 3(2), p. 102-9. Review, 2003.

CHÈNE, P. Inhibition the p53-MDM2 interaction: Targeting a protein-protein interface. **Mol Cancer Res.**, v. 2(1), p. 20-8. Review, 2004.

CHETTY, R. p27 Protein and cancers of the gastrointestinal tract and liver: an overview. **J Clin Gastroenterol.**, v. 37(1), p. 23-7. Review, 2003.

CHO, J. H.; ROE, I. H.; JIN, Y. J. Diagnostic p53 expression in gastric endoscopic mucosal resection. **J Korean Med Sci.**, v. 14(4), p. 412-6, 1999.

CHO, Y. et al. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. **Science.**, v. 265(5170), p. 346-55, 1994.

CLARKE, R. B. p27KIP1 phosphorylation by PKB/Akt leads to poor breast cancer prognosis. **Breast Cancer Res.**, v. 5(3), p. 162-3, Review, 2003.

COLBECK, J. C. et al. Genotypic profile of the outer membrane proteins BabA and BabB in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **Infect Immun.**, v. 74(7), p. 4375-8, Jul. 2006.

CONDIE, A. et al. Detection of point mutations in the p53 gene: comparison of single-strand conformation polymorphism, constant denaturant gel electrophoresis, and hydroxylamine and osmium tetroxide techniques. **Hum Mutat.**, v. 2(1), p. 58-66, 1993.

CORDON-CARDO, C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. **Am J Pathol.**, v. 147(3), p. 545-60. Review, Sep. 1995.

CORREA, P. *Helicobacter Pylori* Infection and Gastric Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 12, p.238-241, 2003.

CORREA, P. Is gastric cancer preventable? **Gut**, v. 53, p. 1217-1219, 2004.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, S. L. (Eds.) **Robbins-Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

COVACCI, A.; RAPPUOLI, R. PCR amplifications of *H. pylori* gene sequences, *In* A. Lee, A.; Megraud, F. *Helicobacter pylori*: techniques for clinical diagnosis. **W. B. Saunders Company Ltd.**, London, United Kingdom, p. 94–111, 1996.

CREW, K. D.; NEUGUT, A. I. Epidemiology of gastric cancer. **World J Gastroenterol.**, v. 12(3), p. 354-62. Review, 2006.

CUNNINGHAM, S. C. et al. Survival after gastric adenocarcinoma resection: eighteen-year experience at a single institution. **J Gastrointest Surg.**, v. 9(5), p. 718-25, 2005.

DE REUSE, H. et al. The *Helicobacter pylori* ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase. **J Bacteriol.**, v. 179(11), p. 3488-93, 1997.

DIXON, M. F. et al. Bile reflux gastritis and intestinal metaplasia at the cardia. **Gut**, v. 51, p. 351-355, 2002.

DOMINGO, D. et al. cagA and vacA status of Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 37(6), p. 2113-4, 1999.

DUENAS GONZALEZ, A. et al. Greater sensitivity of the PCR-SSCP technique compared with immunohistochemistry for the detection of exon 5 and 6 mutations of gene p53 in breast cancer. **Med Clin (Barc.)**, v. 106(19), p. 721-4, 1996.

EGUCHI, H. et al. *Helicobacter pylori* increases proteasome-mediated degradation of p27(kip1) in gastric epithelial cells. **Cancer Res. Aug.**, v. 63(15), p. 4739-46, 2003.

EGUCHI, H. et al. P27kip1 regulates the apoptotic response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*. **Gut**, v. 53(6), p. 797-804, 2004.

EKSTRÖM, A.M. et al. *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. **Gastroenterology.**, v.121(4), p.784-91, 2001.

EL-DEIRY, W.S. Regulation of p53 downstream genes. **Semin Cancer Biol.**, v. 8(5), p. 345-57. Review, 1998.

ENGEL, L. S. et al. Population attributable risks of esophageal and gastric cancers. **J Natl Cancer Inst.**, v. 95(18), p. 1404-13, 2003.

ESCOBAR, M.L.; KAWAKAMI, E. Evidence of mother-child transmission of *H. pylori* infection. **Arq Gastroenterol.**, v. 41(4), p. 239-44, 2004.

ESPEJO, E. J.; NAVARRETE, S. J. Classification of stomach adenocarcinomas. **Rev. Gastroenterol. Peru**, v.23, n. 3, p. 199-212, 2003.

ESPINOZA, L. A.; NETO, B. J.; CASARTELLI, C. Pathological and karyotypic abnormalities in advanced gastric carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 109, p. 45-50, 1999.

EVANS, D.J. Jr.; EVANS, D.G. Helicobacter pylori CagA: analysis of sequence diversity in relation to phosphorylation motifs and implications for the role of CagA as a virulence factor. **Helicobacter**, v. 6(3), p. 187-98, Review, 2001.

EVERS, B. M. Gastrointestinal growth factors and neoplasia. **Am J Surg.**, v. 190(2), p. 279-284, Review, 2005.

FARINATI, F. et al. Helicobacter pylori, inflammation, oxidative damage and gastric cancer: a morphological, biological and molecular pathway. **Eur J Cancer Prev.**, v. 17(3), p. 195-200, 2008.

FEAKINS, R. M. et al. p27(Kip1) loss does not predict survival in patients with advanced gastric carcinoma. **Cancer**, v. 89(8), p. 1684-91, 2000.

FELLEY-BOSCO, E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 17(1), p. 25-37, Review, 1998.

FENG, G.; HUI, C.; PAWSON, T. SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. **Science**, v. 259, p. 1607-11, 1993.

FENG, C. W. et al. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. **BMC Cancer**, v. 2, p. 8, 2002.

FENOGLIO-PREISER, C. M. et al. TP53 and Gastric carcinoma: A Review. **Human Mutation**, v. 21, p. 258-270, 2003.

FERRASI, A.C. **Análise das alterações genéticas e epigenéticas em tumores gástricos infectados pelos agentes tumorigênicos *Helicobacter pylori* e Vírus Epstein-Barr**, 2007. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas: Biologia celular e molecular)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

FIGUEIREDO, C. et al. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. **J Natl Cancer Inst.**, v. 94(22), p.1680-7, 2002.

FIGUEIREDO, C. et al. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v.10(1), p.14-20, Review, 2005.

FORRESTER, K. et al. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 93(6), p. 2442-7, 1996.

FOSTER, G. D.; TWELL, D. **Plant Gene Isolation. Principles and Pratics.** England: John Wiley & Sons Ltd., p 426, 1996.

FOX, J. G.; WANG, T. C.; Inflammation, atrophy and gastric cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 60–69, Review, 2007.

FREEMAN, R.; PLUTZKY, J.; NEEL, B.G. Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, p. 11239–43, 1992.

GAIDANO, G. et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 88(12), p. 5413-7, 1991.

GATTI, L.L. et al. *cagA* *vacA* alleles and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 51(4), p.231-5, 2005.

GATTI, L.L. et al Prevalence of *Helicobacter pylori* *cagA*, *iceA* and *babA2* alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. **Acta Trop.**, v. 100(3), p. 232-40, 2006.

GHADERI, A. et al. The expression of *c-erbB-1* and *c-erbB-2* in Iranian patients with gastric carcinoma. **Pathol Oncol Res.**, v. 8(4), p. 252-6, 2002.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; RIBEIRO-PINTO, L. F.; PAUMGARTTEN, F. J. Environmental risk factors for gastric cancer: the toxicologist's standpoint. **Cad. Saude Publica**, v.13(1), p. 27-38, 1997.

GREENBLATT, M. S. et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res.**, v. 54(18), p. 4855-78. Review, 1994.

GREENE, F. L. AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC); Stomach. In: **AJCC Cancer Staging Manual and Handbook**. 6.ed. Philadelphia, Ed. Springer, 2002. Cap 10, p. 111-118.

GUIMARÃES, D. P.; HAINAUT, P. TP53: a key gene in human cancer. **Biochimie.**, v. 84(1), p. 83-93. Review, 2002.

HAN, S. et al. Expression of p27Kip1 and cyclin D1 proteins is inversely correlated and is associated with poor clinical outcome in human gastric cancer. **J Surg Oncol.**, v. 71(3), p. 147-54, 1999.

HAINAUT, P. et al. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 26(1), p 205-13, 1998.

HAMADA, G. S. et al. Risk factors for stomach cancer in Brazil (II): a case-control study among Japanese Brazilians in Sao Paulo. **Jpn J Clin Oncol.**, v. 32(8), p. 284-90, 2002.

HAMASHIMA, C. et al. The Japanese guidelines for gastric cancer screening. **Jpn J Clin Oncol.**, v. 38(4), p.259-67, 2008.

HAZELL, S.L.; EVANS, D.J. Jr.; GRAHAM, D.Y. Helicobacter pylori catalase. **J Gen Microbiol.**, v. 137(1), p. 57-61, 1991.

HIGASHI, H. et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. **Science**, v. 295, p. 683–6, 2002a.

HIGASHI, H. et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99(22), p. 14428-33, 2002b.

HIRANUMA, H. et al. An analysis of the prognostic significance of p53 status for squamous cell carcinoma of the oral cavity treated by radiotherapy. **Oral Oncol.**, v. 34(6), p. 513-8, 1998.

HO, A.; DOWDY, S.F. Regulation of G1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor supressor genes. **Curr Opin Genet Dev.**, v. 12(1), p. 47-52. Review, 2002.

HOLCOMBE, C. Helicobacter pylori: the African enigma. **Gut**, v. 33, p. 429–431, 1990.

HSU, S.M. et al. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, p. 577-580, 1981.

HSU, P. I. et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric malignancy. **Am J Gastroenterol.**, v. 102(4), p.725-30, 2007.

HULTEN, K. et al. Helicobacter pylori in the drinking water in Peru. **Gastroenterology**, v. 110(4), p. 1031-5, 1996.

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C.C. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. **Cancer Res.**, v. 58, p. 4023-4037, 1998.

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. **J Nippon Med Sch.**, v. 73(2), p. 54-64, 2006.

HWANG, S. L. et al. Expression and mutation analysis of the p53 gene in astrocytoma. **J Formos Med Assoc.**, v. 98(1), p. 31-8, 1999.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.**, v. 61, p. 177-241, Lyon, jun. 1994.

INOUE M; TSUGANI S. Epidemiology of gastric cancer in Japan. **Postgrad Med J.**, v. 81(957), p. 419-24, Review, 2005.

ITO, R. et al. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in oral malignant tumors. **Pathobiology**, v. 67, p. 169-173, 1999.

JACKS, T.; WEINBERG, R. A. The expanding role of cell cycle regulators. **Science**. v. 280(5366), p. 1035-6, 1998.

JORGE, O. et al. Helicobacter pylori infection affects the expression of PCNA, p53, c-erbB-2 and Bcl-2 in the human gastric mucosa. **Rev Esp Enferm Dig.**, v. 95(2), p. 89-104, 2003.

KAMALI-SARVESTANI, E. et al. Association of H pylori cagA and vacA genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. **World J Gastroenterol.**, v. 12(32), p. 5205-10, 2006.



KATO, I. et al. Environmental factors in *Helicobacter pylori*-related gastric precancerous lesions in Venezuela. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 13(3), p. 468-76, 2004a.

KATO, M. et al. (Multi-Centre Study Group). Relationship between *Helicobacter pylori* infection and the prevalence, site and histological type of gastric cancer. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 20(1), p.85-9, 2004b.

KATO, M. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* for primary gastric cancer and secondary gastric cancer after endoscopic mucosal resection. **J Gastroenterol.**, v. 42(17), p. 16-20, Review, 2007.

KIM, D. H. et al. Reduced expression of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. **Histopathology.**, v. 36(3), p. 245-51, 2000.

KIM, K. E. Gastric Cancer in Korean Americans: Risks and Reductions. **Korean Korean Am Stud Bull.**, v. 13, p. 84-90, 2003.

KIM, S. S. et al. Altered expression of Skp2, c-Myc and p27 proteins but not mRNA after *H. pylori* eradication in chronic gastritis. **Mod Pathol.**, v. 19(1), p. 49-58, 2006.

KLIGERMAN, J. Estimativas sobre a incidência e mortalidade por câncer no Brasil. **Rev Bras Cancerol.**, v.47(2), p.111-14, Abr/Mai/Jun. 2001.

KLUMB, C. E. et al. p53 gene analysis in childhood B non-Hodgkin's lymphoma. **Sao Paulo Med J.**, v. 119(6), p. 212-5, 2001.

KOFF, A. How to decrease p27Kip1 levels during tumor development. **Cancer Cell.**, v. 9(2), p. 75-6, 2006.

KONTUREK, S. J. et al. *Helicobacter pylori* and CagA status, serum gastrin, interleukin-8 and gastric acid secretion in gastric cancer. **Scand J Gastroenterol.**, v. 37(8), p. 891-8, 2002.

KONTUREK, P. C. et al. *H. pylori* infection, atrophic gastritis, cytokines, gastrin, COX-2, PPAR gamma and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis. **Med Sci Monit.**, v. 9(7), p. SR53-66, Review, 2003.

KONTUREK, P. C. et al. Gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. **J Physiol Pharmacol.**, v. 57(3), p. 51-65, 2006.

KUDO, Y. et al. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. **Cancer.**, v. 83(12), p. 2447-55, 1998.

KUZUSHITA, N. et al. p27kip1 deficiency confers susceptibility to gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected mice. **Gastroenterology.**, v. 129(5), p. 1544-56, 2005.

LACROIX, M.; TOILLON, R.A.; LECLERCQ, G. p53 and breast cancer, an update. **Endocr Relat Cancer.**, v. 13(2), p. 293-325, Review, 2006.

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

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(10), p. 2752-6, 1995.

LAMARQUE, D.; M. PEEK, R. Jr. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**; v. 8(1), p. 21-30, Review, 2003.

LAN, J. et al. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. **World J Gastroenterol.**, v. 9(1), p. 54-8, 2003.

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

LEE, B. M. et al. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric adenocarcinoma. **Jpn J Cancer Res.**, v. 89(6), p.597-603, 1998.

LEE, H. K. et al. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in gastric cancer. **Int J Colorectal Dis.**, v. 18(6), p. 518-25, 2003.

LEE, D. Y. et al. Maspin and p53 protein expression in gastric adenocarcinoma and its clinical applications. **Appl Immunohistochem Mol Morphol.**, v.16(1), p.13-8, 2008.

LEI, P. P. et al. Expression and hypermethylation of p27 kip1 in hepatocarcinogenesis. **World J Gastroenterol.**, v. 11(29), p. 4587-91, 2005.

LEMES, L. A. O. et al. Gastric carcinoma: analysis of 289 consecutive gastrectomy specimens in Belo Horizonte, Brazil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**; v. 39, p. 57-63, 2003.

LIANG, J. et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. **Nat Med.**, v. 8(10), p. 1153-60, 2002.

LIMA, M. A. P.; RABERHORST, S. H. B. Associação do vírus de Epstein-Barr (EBV) com Tumores Sólidos. **Rev Bras Cancerol.**, v. 52(1), p. 87-96, 2006.

LIMA, V. P. et al. H pylori (CagA) and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas: correlation with p53 mutation and c-Myc, Bcl-2 and Bax expression. **World J Gastroenterol.**, v. 14(6), p. 884-91, 2008.

LIN, Y. F. et al. Comparative immunoproteomics of identification and characterization of virulence factors from Helicobacter pylori related to gastric cancer. **Mol Cell Proteomics.**, v. 5(8), p. 1484-96, 2006.

LIU, X. P. et al. Combined examination of p27(Kip1), p21(Waf1/Cip1) and p53 expression allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma. **Histopathology.**, v. 39(6), p. 603-10, 2001.

LLOYD, R. V. et al. p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. **Am J Pathol.**, v. 154(2), p. 313-23, Review, 1999.

LOGULLO, A. F. et al. A proposal for the integration of immunohistochemical staining and DNA-based techniques for the determination of TP53 mutations in human carcinomas. **Diagn Mol Pathol.**, v. 9(1), p. 35-40, 2000.

LOKSHIN, M. et al. p53 and p73 display common and distinct requirements for sequence specific binding to DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 35(1), p. 340-52, 2007.

LOUIS, D. N. et al. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v. 52(1), p. 31-8, 1993.

LU, J.J. et al. Comparison of five PCR methods for detection of Helicobacter pylori DNA in gastric tissues. **J Clin Microbiol.**, v. 37(3), p. 772-4, 1999.

LYNCH, H. T. et al. Gastric cancer: new genetic developments. **J Surg Oncol.**, v. 90(3), p. 114-33, 2005.

MANNICK, E. E. et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: Effect of antibiotics and antioxidants. **Cancer Res.**, v. 56(14), p. 3238-43, 1996.

MARAIS, A. et al. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 63(3), p. 642-74, Review, 1999.

MARIGO, C.; OKUYAMA, M. C.; SANTOS, G. C. Tipos histológicos e mortalidade por câncer gástrico em São Paulo. **Cad. Saúde Pública**, v. 13(1), p. 93-97, 1997.

MARSHALL, B. *Helicobacter pylori*: 20 years on. **Clin Med.**, v. 2(2), p. 147-52, Review, 2002.

MARTINS, L. C. et al. Clinical and pathological importance of *vacA* allele heterogeneity and *cagA* status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 100(8), p. 875-81, 2005.

MATSUZAKA, M. et al. The decreasing burden of gastric cancer in Japan. **Tohoku J Exp Med.**, v. 212(3), p.207-19, 2007.

MATTAR, R. et al. P53 and Rb tumor suppressor gene alterations in gastric cancer. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.**, v. 59(4), p. 172-80, 2004.

MAYNE, S.T.; NAVARRO, S. A. Diet, obesity and reflux in the etiology of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in humans. **J Nutr.**, v. 132(11), p. 3467S-3470S, Review, 2002.

MISRA, V. et al. Prevalence of *H. pylori* in patients with gastric cancer. **Indian J Pathol Microbiol.**, v.50(4), p.702-7, 2007.

MOBLEY, H.L.; ISLAND, M.D.; HAUSINGER, R.P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol Rev.**, v. 59(3), p. 451-80, Review, 1995.

MONTECUCCO, C.; DE BERNARD, M. Immunosuppressive and proinflammatory activities of the *VacA* toxin of *Helicobacter pylori*. **J Exp Med.**, v. 198(12), p. 1767-71, 2003.

MORAES, M. M. C.; SILVA, G. A. P. Fatores de risco para infecção pelo *Helicobacter pylori* em crianças. **J Pediatr. (Rio J.)**, v. 79(1), p. 21-28, 2003.

MORE, H. et al. Identification of seven novel germline mutations in the human E-cadherin (CDH1) gene. **Hum Mutat.**, v. 28(2), p. 203, 2007.

MOSNER, J. et al. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. **EMBO J.**, v. 14(18), p. 4442-9, 1995.

MULLER, W. et al. Prognostic value of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in gastric cancer. **Anticancer Res.**, v. 20(3A), p. 1787-92, 2000.

MULLER, L. B. et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection and gastric cancer precursor lesions in patients with dyspepsia. **Arq Gastroenterol.**, v. 44(2), p. 93-8, 2007.

MUNIRAJAN, A. K. et al. p53 gene mutations in oral carcinomas from India. **Int J Cancer.** V. 66(3), p. 297-300, 1996.

MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S. Epidemiology of gastric cancer and perspectives for prevention. **Salud Publica Mex.**, v. 39, p. 318-330, 1997.

MURAKAMI Y, HAYASHI K, SEKIYA T. Detection of aberrations of the p53 alleles and the gene transcript in human tumor cell lines by single-strand conformation polymorphism analysis. **Cancer Res.**, v. 51(13), p. 3356-61, 1991.

MURAKAMI Y. et al. Detection of DNA aberrations in human cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. **Tohoku J Exp Med.**, v. 168(2), p. 247-55, 1992.

MURTAZA, I. et al. study on p53 gene alterations in esophageal squamous cell carcinoma and their correlation to common dietary risk factors among population of the Kashmir valley. **World J Gastroenterol.**, v. 12(25), p. 4033-7, 2006.

NAKAMURA, S. et al. Impact of Helicobacter pylori infection and mucosal atrophy on gastric lesions in patients with familial adenomatous polyposis. **Gut.**, v. 51(4), p. 463-4, 2002.

NARDONE, G. Review article: molecular basis of gastric carcinogenesis. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 17(2), p. 75-81, Review, 2003.

NGUYEN, A.M. et al. Detection of Helicobacter pylori in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.**, v. 31(4), p. 783-7, 1993.

NISHIMOTO, I. N. et al. Risk factors for stomach cancer in Brazil (I): a case-control study among non-Japanese Brazilians in Sao Paulo. **Jpn J Clin Oncol.**, v. 32(8), p. 277-83, 2002.

NITTI, D. et al. Low level of p27(Kip1) protein expression in gastric adenocarcinoma is associated with disease progression and poor outcome. **J Surg Oncol.**, v. 81(4), p. 167-176, 2002.

NOMURA A. et al. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. **N Engl J Med.**, v. 325(16), p.1132-6, 1991.

NYLANDER, K. et al. A non-random deletion in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer.**, v. 73(11), p. 1381-6, 1996.

ODEBREIT, S. et al. Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. **Science**, v. 287, p. 1497–500, 2000.

OFFER, et al. The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. **Carcinogenesis**, v. 23(6), p. 1025-32, 2002.

OHYAUCHI, M. et al. The polymorphism interleukin 8 2251 A/T influences the susceptibility of Helicobacter pylori related gastric diseases in the Japanese population. **Gut**, v. 54, p. 330-335, 2005.

OLIVARES, D. GISBERT, J.P. Factors involved in the pathogenesis of Helicobacter pylori infection. **Rev Esp Enferm Dig.**, v. 98, p. 374-386, 2006.

OLIVIER, M. et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. **Cancer Res.**, v. 63(20), p. 6643-50. 2003.

ONO, Y. et al. Accumulation of wild-type p53 in astrocytomas is associated with increased p21 expression. **Acta Neuropathol (Berl).**, v. 94(1), p. 21-7, 1997.

PALESTRO, G. et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection and intestinal metaplasia in subjects who had undergone surgery for gastric adenocarcinoma in Northwest Italy. **World J Gastroenterol.**, v. 11(45), p. 7131-5, 2005.

PAN, Z. Z. et al. Co-mutation of p53, K-ras genes and accumulation of p53 protein and its correlation to clinicopathological features in rectal cancer. **World J Gastroenterol.**, v. 10(24), p. 3688-90, 2004.

PEREIRA, L. P. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric cancer. **Arq Gastroenterol.**, v. 38(4), p. 240-6, 2001.

PARK, J. G. et al. Report on the first meeting of the International Collaborative Group on Hereditary Gastric Cancer. **J Natl Cancer Inst.**, v. 92(21), p. 1781-2, 2000.

PARKIN, D. M.; PISANI, P.; FERLAY, J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. **Int J Cancer**, v. 54, p. 594-606, 1993.

PARKIN, D. M. et al. Global Cancer Statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin.**, v. 55, p. 74-108, 2005.

PARSONNET, J. Bacterial infection as a cause of cancer. **Environ Health Perspect.**, v. 103(8), p. 263-268, 1995.

PASSARO, D.J.; CHOSY, E.J.; PARSONNET, J. *Helicobacter pylori*: Consensus and Controversy. **J Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 298–304, 2002.

PEREZ-ROGER, I. et al. Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). **EMBO J.**, v. 18(19), p. 5310-20, 1999.

PERMIN, H.; ANDERSEN, L. P. Inflammation, Immunity, and Vaccines for *Helicobacter* infection. **Helicobacter**, v. 10(1), p. 21-25, Review, 2005.

PHATAK, P. et al. Alterations in tumour suppressor gene p53 in human gliomas from Indian patients. **J Biosci.**, v. 27(7), p. 673-8, 2002.

PINHEIRO, N. A.; VILLA, L. L. Low frequency of p53 mutations in cervical carcinomas among Brazilian women. **Braz J Med Biol Res.**, v. 34(6), p. 727-33, 2001.

PLUMMER, M. et al. Epidemiology of gastric cancer. **IARC Sci Publ.**, v. 157, p. 311-26, Review, 2004.

PLUQUET, O.; HAINAUT, P. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. **Cancer Lett.**, v. 174(1), p. 1-15, Review, 2001.

PRINZ, C. et al. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Shifting the global burden. **World J Gastroenterol.**, v. 12(34), p. 5458-64, Review, 2006.

QIU, J. L. et al. Nutritional factors and gastric cancer in Zhoushan Islands, China. **World J Gastroenterol.**, v. 11(28), p. 4311-4316, 2005.

RAJ, A. et al. Occupation and gastric cancer **Postgrad Med J.**, v. 79(931), p. 252–258, 2003.

RAMELAH, M. et al. cagA gene variants in Malaysian Helicobacter pylori strains isolated from patients of different ethnic groups. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 44(2), p. 239-42, 2005.

RIBEIRO, M.L. et al. Clinical relevance of the cagA, vacA and iceA genotypes of Helicobacter pylori in Brazilian clinical isolates. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 36(3), p. 181-5, 2003.

RIEDER, G. et al. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in Helicobacter pylori-associated gastritis may represent an increased risk factor to develop gastric carcinoma of the intestinal type. **Int J Med Microbiol.**, v. 293(6), p. 403-12, 2003.

RIES, L. A.G. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, **National Cancer Institute**. Bethesda, 2006. Disponível em [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2004/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/)

ROCCO, A. et al. Is there a link between environmental factors and a genetic predisposition to cancer? A lesson from a familial cluster of gastric cancers. **Eur J Cancer.**, v. 39(11), p. 1619-24, 2003.

ROCCO, A; NARDONE, G. Diet, H pylori infection and gastric cancer: evidence and controversies. **World J Gastroenterol.**, v.13(21), p. 2901-12, 2007.

RODRIGUES, M. N. et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection in Fortaleza, Northeastern Brazil. **Rev Saude Publica.**, v. 39(5), p. 847-9, 2005.

ROVIELLO, F. et al. P53 accumulation is a prognostic factor in intestinal-type gastric carcinoma but not in the diffuse type. **Ann Surg Oncol.**, v. 6(8), p. 739-45, 1999.

ROVIELLO, F. et al. Hereditary diffuse gastric cancer and E-cadherin: Description of the first germline mutation in an Italian family. **Eur J Surg Oncol.**, v. 33(4), p. 448-51, 2007.

SANDHU, C.; SLINGERLAND, J. Deregulation of the cell cycle in cancer. **Cancer Detect Prev.**, v. 24(2), p. 107-18, Review, 2000.



SANGUINETTI, C.J. et al. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17(5), p. 914-21, 1994.

SARIBASAK, H. et al. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. **J Clin Microbiol.**, v. 42(4), p. 1648-51, 2004.

SCHREIBER, S. et al. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 101(14), p. 5024-9, 2004.

SCOTT, D.R. et al. Expression of the *Helicobacter pylori* ureI gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease. **Infect Immun.**, v. 68(2), p. 470-7, 2000.

SEGAL, E.D. et al. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 14559–64, 1999.

SEUÁNEZ, H. N. et al. In: José Cláudio **Casali** da Rocha; Carlos **Gil** Ferreira. (Org.). **Oncologia Molecular**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, v.1, p.13-27, 2004.

SGAMBATO, A. et al. Loss of p27Kip1 expression is a strong independent prognostic factor of reduced survival in N0 gastric carcinomas. **Cancer.**, v. 89(11), p. 2247-57, 2000.

SHANG, J.; PENA, A. S. Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. **World J Gastroenterol.**, v. 11(27), p. 4131-9, Review, 2005.

SHIBATA, A. et al. CagA status of *Helicobacter pylori* infection and p53 gene mutations in gastric adenocarcinoma. **Carcinogenesis**, v. 23(3), p. 419-424, 2002.

SHIN, I. et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. **Nat Med.**, v. 8(10), p. 1145-52, 2002.

SHIRIN, H. et al. Chronic *Helicobacter pylori* Infection Induces an Apoptosis-Resistant Phenotype Associated with Decreased Expression of p27kip1. **Infection and Immunity**, v. 68(9), p. 5321–5328, 2000.

SINGH, K.; GOSHAL, U. C. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer: An Asian enigma. **World J Gastroenterol.**, v. 12(9), p. 1346-1351, 2006.

SMITH, M.G. et al. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. **World J Gastroenterol.**, v. 12(19), p. 2979-2990, 2006.

SMOOT, D. T. et al. Influence of Helicobacter pylori on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. **Carcinogenesis.**, v. 21(11), p. 2091-5, 2000.

SON, H. J. et al. Interaction between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. **J Clin Gastroenterol.**, v. 33(5), p. 383-8, 2001.

SOUSA, M. B. et al. Prevalência de infecção por Helicobacter pylori em crianças avaliadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil. **Arq. Gastroenterol.**, v. 38(2), p. 132-137, 2001.

SOUSSI, T.; CARON DE FROMENTEL, C.; MAY, P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. **Oncogene.**, v. 5(7), p. 945-52, Review, 1990.

SOUSSI, T.; MAY, P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. **J Mol Biol.**, v. 260(5), p. 623-37, Review, 1996.

SOUTO, F. J. et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 93(2), p. 171-4, 1998.

STADTLÄNDER, C. T.; WATERBOR, J. W. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. **Carcinogenesis.**, v. 20(12), p. 2195-208, Review, 1999.

STEIN, M. et al. Tyrosine phosphorylation of the Helicobacter pylori CagA antigen after cag-driven host cell translocation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97(3), p. 1263-8, 2000.

SUAREZ, G.; REYES, V. E.; BESWICK, E. J. Imunne response to H pylori. **World J Gastroenterol.**, v. 12(35), p. 5593-5598, 2006.

SUGIYAMA, T. Development of gastric cancer associated with Helicobacter pylori infection. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 54(1), p. S12-20, 2004.

SUN, W. H. et al. Roles of Helicobacter pylori infection and cyclooxygenase-2 expression in gastric carcinogenesis. **World J Gastroenterol.**, v.10(19), p.2809-13, 2004.

SUPAJATURA, V. et al. Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. **J Immunol.**, v. 168, p. 2606–7, 2002.

TAHARA E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. **J.Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 119(5), p. 265-72, 1993.

TAHARA, E. Molecular biology of gastric cancer. **World J Surg.**, v. 19(4), p. 484-90, Review, 1995.

TAHARA, E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. **IARC Sci Publ.**, v. 157, p. 327-49, Review, 2004.

TAKENO, S. et al. Analysis of the survival period in resectable stage IV gastric cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 8(3), p. 215–221, 2001.

TAMURA, G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. **World J Gastroenterol.**, v. 12(2), p. 192-198, Review, 2006.

TEIXEIRA, J. B.; NOGUEIRA, M. S. Gastric cancer: risk factors in clients treated in tertiary care services of a municipality in the interior of the state of São Paulo. **Rev Lat Am Enferm.**, v. 11(1), p. 43-8, 2003.

TOMASINI, M. L. et al. Heterogeneity of *cag* genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. **J Clin Microbiol.**, v. 41(3), p. 976-80, 2003.

TOMINAGA S. An Estimate of the Potential for Cancer Prevention in Japan. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v. 2(4), v. 287-292, 2001.

TRAJKOV, D. et al. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. **Prilozi.**, v. 28(2), p. 25-38, 2007.

TSIHLIAS, J.; KAPUSTA, L.; SLINGERLAND, J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. **Annu. Rev. Med.**, v. 50, p. 401-23, 1999.

TSUJI, S. et al. Review article: inflammation-related promotion of gastrointestinal carcinogenesis – a perigenetic pathway. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 18(1), p. 82-89, 2003.

TSUJI, S. et al. Helicobacter pylori eradication to prevent gastric cancer: underlying molecular and cellular mechanisms. **World J Gastroenterol.**, v. 12(11), p. 1671-80, Review, 2006.

UEMURA, N.; OKAMOTO, S. Effect of Helicobacter pylori eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer in Japan. **Gastroenterol Clin North Am.**, v. 29(4), p. 819-27, 2000.

UEMURA N. et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. **N Engl J Med.**, v. 345(11), p. 784-9, 2001.

VERDECCHIA, A. et al. (EUROCARE WORKING GROUP). Explaining gastric cancer survival differences among European countries. **Int J Cancer.**, v. 109(5), p. 737-41, 2004.

VERMEULEN, K. Et al. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.** V. 36(3), p.131-49. Review, 2003.

VIDAURRETA, M. et al. Colorectal carcinoma prognosis can be predicted by alterations in gene p53 exons 5 and 8. **Int J Colorectal Dis.**, v. 23(6), p. 581-6, 2008.

VIETH, M.; STOLTE, M. Elevated risk for gastric adenocarcinoma can be predicted from histomorphology. **World J Gastroenterol.**, v. 12(38), p. 6109-6114, 2006.

VIGLIETTO, G. et al. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. **Nat Med.**, v. 8(10), p. 1136-44, 2002.

VOJTESEK, B. et al. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. **J Immunol Methods.**, v. 151(1-2), p. 237-44, 1992.

VOLAND, P. et al. Interactions among the seven Helicobacter pylori proteins encoded by the urease gene cluster. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 284, p. 96-106, 2003.

WANG, J. et al. Helicobacter pylori infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. **Dig Dis Sci.**, v. 47(1), p. 107-13, 2002.

WANG, J. Y. et al. Alterations of APC, c-met, and p53 Genes in Tumor Tissue and Serum of Patients with Gastric Cancers. **Journal of Surgical Research**, v. 120, p. 242-248, 2004.

WANG, Y. Z. et al. Expression of nitric oxide synthase in human gastric carcinoma and its relation to p53, PCNA. **World J Gastroenterol.**, v. 11(1), p. 46-50, 2005.

WEN, Y. et al. Acid-adaptative Genes of *Helicobacter pylori*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 5921–5939, 2003.

WEINBERG, R. A. How cancer arises. **Sci Am.**, v. 275(3), p. 62-70, 1996.

WERNER, M. et al. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v. 127(4), p. 207-216, 2001.

WILLHITE, D.C.; BLANKE, S.R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. **Cell Microbiol.**, v. 6(2), p. 143-54, 2004.

WU, C.C. et al. Clinical Relevance of the *vacA*, *iceA*, *cagA*, and *flaA* genes of *H pylori* strains isolated in Eastern Taiwan. **J Clin Microbiol.**, v. 43(6), p. 2913-5, 2005.

XIA, H. H.; WONG, B. C. Nitric oxide in *Helicobacter pylori*-induced apoptosis and its significance in gastric carcinogenesis. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 18(11), p.1227-30, 2003.

XU, W. et al. The role of nitric oxide in cancer. **Cell Res.**, v. 12, p. 311-20, Review, 2002.

YAMAOKA, Y. et al. Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. **J Clin Pathol.**, v. 52, p. 215–218, 1999(a).

YAMAOKA, Y. et al. Relationship between *H. pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. **J Clin Microbiol.**, v. 37(7), p. 2274-9, 1999(b).

YAMAZAKI, S. et al. The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. **J Infect Dis.**, v. 187(2), p. 334-7, 2003.

YASUI, W. et al. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. **J. Gastroenterol.**, v. 35(12), p. 111-5, 2000.

YASUI, W. et al. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. **Gastric Cancer** 4:(3):113–121, Review, 2001.

YOKOZAKI, H.; YASUI, W.; TAHARA, E. Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. **Int. Rev. Cytol.**, v. 204, p. 49-95, Review, 2001.

YOU, W. C. et al. Gastric dysplasia and gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors. **J Natl Cancer Inst.**, v. 92(19), p. 1607-12, 2000.

YU, D. et al. Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. **J Biol Chem.**, v. 273, p. 21125–31, 1998.

YU, J. et al. Effect of Helicobacter pylori eradication on expression of cyclin D2 and p27 in gastric intestinal metaplasia. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 15(9), p. 1505-11, 2001.

ZHANG, H. et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection on expressions of Bcl-2 family members in gastric adenocarcinoma. **World J Gastroenterol.**, v. 10(2), p. 227-230, 2004.

## **ANEXOS**

## Anexo I



Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 712/04

Fortaleza, 30 de novembro de 2004

Protocolo n° 199/04

**Pesquisador responsável:** Silvia Helena Barem Rabenhorst

**Dept°./Serviço:** Departamento de Patologia e Medicina Legal/UFC

**Título do Projeto:** “Alterações moleculares no câncer gástrico: associação com fatores epidemiológicos”

Levamos ao conhecimento de V.S<sup>a</sup>. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n°196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução n° 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 25 de novembro de 2004.

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

Atenciosamente,

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



## Anexo II

### TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

**Instituição:** DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL – UFC  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR – LABGEM

**Endereço:** Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, Porangabuçu, Fortaleza-CE.

**Investigadora Responsável:** Prof. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst.

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

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

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

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

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

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

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Endereço do paciente: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Nome da testemunha \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Assinatura do investigador: \_\_\_\_\_

## Anexo III

### Cadastro de Pacientes Submetidos a 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 \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Exam \_\_\_\_\_

H. pylori [ ]

Sítio anatômico \_\_\_\_\_ Est. Clínico T \_\_\_ N \_\_\_ M \_\_\_

Aspecto morfológico \_\_\_\_\_ Bormann \_\_\_\_\_

**Exame anatomopatológico N°:** \_\_\_\_\_

**Tratamento:** [ ] Radioterapia [ ] Quimioterapia [ ] Hormonioterapia [ ] Imunoterapia

Protocolo \_\_\_\_\_

**Cirurgia:** realizada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Cirurgião \_\_\_\_\_

**Responsável pela Coleta** \_\_\_\_\_

Tempo de ressecção da coleta: [ ] <1h [ ] 1h [ ] 2h [ ] 3h [ ] < ou =4h [ ] Outras

**Observações** \_\_\_\_\_

Nº de amostra Tumoral congelada [ ] Nº de amostra Normal [ ]

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



## **Anexo IV**

### **Protocolo de Coleta no Centro Cirúrgico**

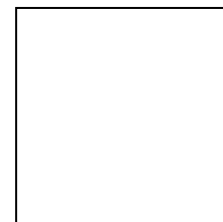
Durante todo o procedimento utilizar máscara e luvas estéreis

- 1-Conferir o material a ser utilizado para coleta (Identificação do paciente, máquina fotográfica, 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.: GC-001-N1/ D-M-2004);
- 3- Após a retirada da peça, colocá-la em uma cuba estéril e lavá-la com soro fisiológico estéril (se necessário). Secá-la com uma 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 das bordas, evitando 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 a 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 V

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR



### CADASTRO DO PESQUISADOR -2005

#### I. Dados Pessoais

Nome:	ANGELA ROSA ANDRÉ	Sexo:	FEM
Estado Civil:	SOLTEIRA	Data de nascimento:	23/02/1975
Naturalidade:	PARACATÚ	Estado:	MG
Endereço:	OSVALDO CRUZ 1415 AP 1002		
Bairro:	MEIRELES	Cidade:	FORTALEZA
Telefones:	(85) 3248 5117	9997 0196	CEP: 60125150
e-mail:	angelarandre@yahoo.com.br		
RG:	1400227 SSPDF	CPF:	96696745653

#### II. Formação Acadêmica (Graduação)

Curso:	FARMÁCIA-BIOQUÍMICA
Instituição:	UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS- UFGO
Ano da diplomação:	1997
Monitoria:	S( <input checked="" type="checkbox"/> ) N( <input type="checkbox"/> )
Disciplina:	QUÍMICA ANALÍTICA
Participação em outras atividades/programas	BOLSISTA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA- CNPq

#### III. Atividades no LABGEM

Mês/Ano de ingresso:	MARÇO/ 2004
Projeto(s) que participou:	CÂNCER GÁSTRICO
Bolsista:	Sim ( <input type="checkbox"/> ) Não ( <input checked="" type="checkbox"/> ) voluntário ( <input type="checkbox"/> )
Programa/Ano:	
Projeto de Pesquisa	
Título:	HELICOBACTER PYLORI E A EXPRESSÃO DE p27 e p53 NO CÂNCER DE ESTÔMAGO: ASSOCIAÇÃO COM FATORES EPIDEMIOLÓGICOS
Objetivo(s):	RELACIONAR A PRESENÇA BACTERIANA À MUTAÇÃO E/OU EXPRESSÃO DE P53 E P27 NO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.
Metodologia:	IMUNOHISTOQUÍMICA/ PCR-SSCP

Fortaleza, 28 de maio 2005.

Assinatura do pesquisador

## Anexo VI

### Orçamento Geral

IMUNO-HISTOQUÍMICA			
Reagentes e materiais	Origem	Qtd.	Valor
Ácido Cítrico	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 20,00
Água oxigenada 10 vol	Rioquímica <sup>®</sup>	5	R\$ 30,00
Álcool etílico 95°GL	Synth <sup>®</sup>	50	R\$ 80,00
Anticorpo monoclonal de camundongo anti-p53	DakoCytomation <sup>®</sup>	1	R\$ 1.050,00
Anticorpo monoclonal de camundongo anti-p27	DakoCytomation <sup>®</sup>	1	R\$ 1.500,00
Albumina Bovina (BSA)	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 1.800,00
Bálsamo do Canadá	QEL <sup>®</sup>	1	R\$ 50,00
Caneta hidrofóbica	DakoCytomation <sup>®</sup>	1	R\$ 380,00
Cx. de Lâmina	Bioglass <sup>®</sup>	15	R\$ 45,00
Cx. de Lamínulas	Bioglass <sup>®</sup>	15	R\$ 45,00
Cloreto de sódio	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 50,00
DEPC (dietil-piromcarbonato)	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 1.700,00
Hematoxilina	Nuclear <sup>®</sup>	1	R\$ 200,00
Kit de detecção (Dako) LSAB+	DakoCytomation <sup>®</sup>	1	R\$ 2.260,00
Kit DAB+ Líquido	DakoCytomation <sup>®</sup>	1	R\$ 305,00
Kit de detecção (Dako) ABC	DakoCytomation <sup>®</sup>	1	R\$ 1.200,00
Ponteiras descartáveis (Diversas)	Gilson <sup>®</sup>	2	R\$ 60,00
Proteinase K	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 350,00
Silano	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 1.035,00
Xileno	Synth <sup>®</sup>	50	R\$ 350,00
<b>SUBTOTAL</b>			<b>R\$12.510,00</b>

TÉCNICAS DE PCR			
Reagentes e materiais	Origem	Qtd.	Valor
Agarose	Gibco BRL <sup>®</sup>	1	R\$ 1.665,00
Azul de Bromofenol	Gibco BRL <sup>®</sup>	1	R\$ 100,00
Brometo de etídeo	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 116,00
dNTP	Invitrogen <sup>®</sup>	1	R\$ 400,00
Marcador de PM 100pb	Invitrogen <sup>®</sup>	1	R\$ 500,00
Pacote de tubos do tipo Eppendorf (Diversos)	Eppendorf <sup>®</sup>	4	R\$ 112,00
Ponteiras descartáveis (Diversas)	Gilson <sup>®</sup>	4	R\$ 90,00
Primers <i>Helicobacter pylori</i>	Invitrogen <sup>®</sup>	5	R\$ 1600,00
Primers p53	Invitrogen <sup>®</sup>	4	R\$ 1100,00
Taq polimerase/Reagentes para PCR	Invitrogen <sup>®</sup>	1	R\$ 350,00
Tampão TBE	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 450,00
Xileno Cianol	Gibco BRL <sup>®</sup>	1	R\$ 100,00
Kit GeneGel Excel 12.5/24	amershambiosciences/GE	3	R\$ 1.500,00
Kit PlusOne DNA Silver Staining	amershambiosciences/GE	1	R\$ 500,00
<b>SUBTOTAL</b>			<b>R\$8.583,00</b>

---

**COLETA DE ESPÉCIMES E EXTRAÇÃO DE DNA**


---

<b>Reagentes e materiais</b>	<b>Origem</b>	<b>Qtd.</b>	<b>Valor</b>
Álcool Isopropílico	Vetec <sup>®</sup>	3	R\$ 15,00
Álcool Isoamílico	Vetec <sup>®</sup>	1	R\$ 7,00
Clorofórmio	Vetec <sup>®</sup>	3	R\$ 30,00
CTAB	Gibco BRL <sup>®</sup>	1	R\$ 150,00
EDTA	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 553,00
Etanol P.A.	Vetec <sup>®</sup>	1	R\$ 105,00
Nitrogênio líquido	White Martins <sup>®</sup>	160L	R\$ 1.600,00
Pacote de Criotubos	Gilson <sup>®</sup>	2	R\$ 40,00
SDS	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 500,00
β-Mercaptoetanol	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 600,00
Tris Ultrapuro	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 382,00
<b>SUBTOTAL</b>			<b>R\$ 3.982,00</b>

---

**INSUMOS DA INSTITUIÇÃO**


---

<b>Equipamentos e materiais</b>	<b>Origem</b>	<b>Qtd.</b>	<b>Valor</b>
Agitador	-	1	R\$ 350,00
Balança de precisão	Celtac <sup>®</sup>	1	R\$ 2.100,00
Banho-Maria	Quimis <sup>®</sup>	1	R\$ 300,00
Câmara úmida	Erviagas <sup>®</sup>	1	R\$ 20,00
Câmera digital	Nikon <sup>®</sup>	1	R\$ 2.000,00
Capela de Fluxo Laminar	Pachane <sup>®</sup>	1	R\$ 4.000,00
Capela de exaustão	Quimis <sup>®</sup>	1	R\$ 250,00
Centrífuga refrigerada	Eppendorf <sup>®</sup>	1	R\$ 10.000,00
Conjunto de Micropipeta	Gilson <sup>®</sup>	1	R\$ 2.500,00
Contador de células manual	Herka <sup>®</sup>	1	R\$ 115,00
Cuba de Eletroforese	Gilson <sup>®</sup>	1	R\$ 800,00
Cuba de vidro	Duralex <sup>®</sup>	10	R\$ 100,00
Destilador/ Água Milli-Q	Milli-Q <sup>®</sup>	1	R\$ 1.050,00
Estufa	Fanem <sup>®</sup>	1	R\$ 800,00
Etiqueta para lâmina	Pimaco <sup>®</sup>	3	R\$ 10,00
Folha de papel de filtro	Ripax <sup>®</sup>	10	R\$ 5,00
Fonte elétrica para eletroforese	-	1	R\$ 400,00
Forno Microondas	Electrolux <sup>®</sup>	1	R\$ 360,00
Freezer (-20°C)	Prosdócimo <sup>®</sup>	1	R\$ 1.200,00
Geladeira	Electrolux <sup>®</sup>	1	R\$ 800,00
Lâmina para micrótomo	Leica <sup>®</sup>	1	R\$ 400,00
Cx. luvas de procedimento	Blowtex <sup>®</sup>	20	R\$ 80,00
Medidor de pH	Digimed <sup>®</sup>	1	R\$ 500,00
Microscópio óptico	Olympus <sup>®</sup>	1	R\$ 8.000,00
Micrótomo	Quimis <sup>®</sup>	1	R\$ 800,00
Micrótomo Criostato	Quimis <sup>®</sup>	1	R\$ 1.500,00
Transiluminador de luz Ultra-Violeta	-	1	R\$ 1.500,00
Vortex	Quimis <sup>®</sup>	1	R\$ 250,00
Termociclador	Eppendorff <sup>®</sup>	1	R\$ 20.000,00
Termômetro	BD <sup>®</sup>	1	R\$ 15,00
<b>SUBTOTAL</b>			<b>R\$ 60.205,00</b>
<b>TOTAL</b>			<b>R\$ 85.280,00</b>

## Anexo VII

(Publicação ISBN- Apresentação congresso)



ISBN: 85 – 60167 – 00 - 5

### Tema Livre

16

#### **AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA E DO PERFIL GENOTÍPICO DA BACTÉRIA *HELICOBACTER PYLORI* EM ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS DO CEARÁ**

ANDRE, A. R. ; PARDINI, M. I. M. C. ; FERREIRA, M. V. P. ; BARROS, M. A. . P. ; FERRASI, A. C. ; RABENHORST, S. H. B.  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

**Objetivos:** Determinar a frequência da bactéria *Helicobacter pylori*, a presença do gene *cagA* e a variação alélica das regiões *s* e *m* do gene *vacA* em adenocarcinomas gástricos (ACG).

**Casísticas e Métodos:** Foram coletadas amostras de 70 pacientes com ACG, gastrectomizados na Santa Casa de Misericórdia e no Hospital Universitário Walter Cantídio-UFC, Fortaleza-CE. Extraíu-se o DNA genômico de fragmentos com um mínimo de 70% de células tumorais. A presença de *H. pylori* (gene da UreaseC) e dos genes *cagA* e *vacA* (alelos *s/m*) foi determinada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos específicos; os produtos de amplificação detectados em gel de poliacrilamida corado pela prata.

**Resultados e Conclusão:** A bactéria *H. pylori* foi detectada em 66 (94,3%) casos; destes, 41% foram positivos para o gene *cagA*. Na análise dos alelos do *vacA*, 43 casos foram *s1* (65,1%) e 05 casos *s2* (7,6%). O alelo *m* foi detectado em 88% dos casos, sendo destes 73% *m1* e 15% *m2*. A combinação alélica verificada foi: 57,6% *s1m1*, 4,5% *s1m2*, 3% *s2m1* e 4,5% *s2m2*. A associação entre *cagA+* e a combinação *s1m1* de *vacA* foi detectada em 33,3% das amostras.

Detectou-se alta frequência de *H. pylori* nas amostras tumorais avaliadas, com menor detecção de *cagA+* do que referido na literatura. Os alelos *s1* e *m1* do gene *vacA*, relacionados a maior virulência bacteriana, foram os predominantes. A freqüente detecção de *H. pylori cagA+* e *vacA s1/m1* no adenocarcinoma gástrico sugere associação entre a carcinogenicidade dessa bactéria com genótipos específicos.

## Anexo VIII

(Publicação ISBN- Apresentação congresso)



ISBN: 85 – 60167 – 00 - 5

### Tema Livre

87

#### ASSOCIAÇÃO *HELICOBACTER PYLORI* COM MUTAÇÃO DO TP53 NO CÂNCER GÁSTRICO

ANDRE, A. R. ; PARDINI, M. I. M. C. ; FERREIRA, M. V. P. ; BARROS, M. A. P.; FERRASI, A. C.; RABENHORST, S. H. B.  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

**Objetivos:** Investigar a associação entre a presença de *H.pylori* cagA (+) com mutações do gene TP53 em adenocarcinoma gástrico.

**Casísticas e Métodos:** Analisou-se amostras obtidas de 70 pacientes com adenocarcinoma gástrico, gastrectomizados em dois Hospitais de Fortaleza-CE. Amostras com mínimo de 70% de células tumorais foram submetidas à extração de DNA genômico. Utilizou-se a técnica de PCR-SSCP para investigação da presença de mutações no gene TP53 (exons 5, 6, 7, 8/9). Pesquisou-se a presença de *H. pylori* (gene da UreaseC ) e do gene cagA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); os produtos de amplificação foram detectados em gel de poliacrilamida, corados pela prata.

**Resultados e Conclusão:** Dentre as amostras, 75,7% apresentaram padrão eletroforético alterado em pelo menos um dos exons analisados, sendo 66% no exon 5; 43,4% no exon 6; 47,2% no exon 7 e 3,8% no exon 8/9. A bactéria foi detectada em 94,3% dos casos, estando, em 78% destes, associada a mutações de p53. O gene cagA foi detectado em 27 casos (41%), estando, em 21 destes (89%), associado a mutações de p53.

Observou-se uma alta taxa de mutação do gene p53, principalmente nos exons 5, 6, e 7, codificadores da região de ligação protéica ao DNA. Essas regiões são consideradas *hot spot*, onde se observam a maioria das mutações de p53 no câncer humano. Foi verificada uma alta frequência de *Helicobacter pylori* no tecido tumoral associada com mutações de p53, inclusive entre as amostras cagA(+). Esta associação pode sugerir uma possível via carcinogênica mediada por *H. pylori*; contudo, este não parece ser um evento exclusivo, já que as mutações ocorrem também em sua ausência nestes tumores.



## Anexo IX

(Apresentação em Congresso)

ISSN 1415-4757

June 2005

Vol 28, 2 - supplement

**GENETICS  
and MOLECULAR BIOLOGY**

VIII CONGRESSO  
BRASILEIRO DE  
MUTAGÊNESE,  
CARCINOGENESE E  
TERATOGENESE AMBIENTAL  
3 a 6 de maio de 2005 - Natal-RN

SBMCTA  
2005

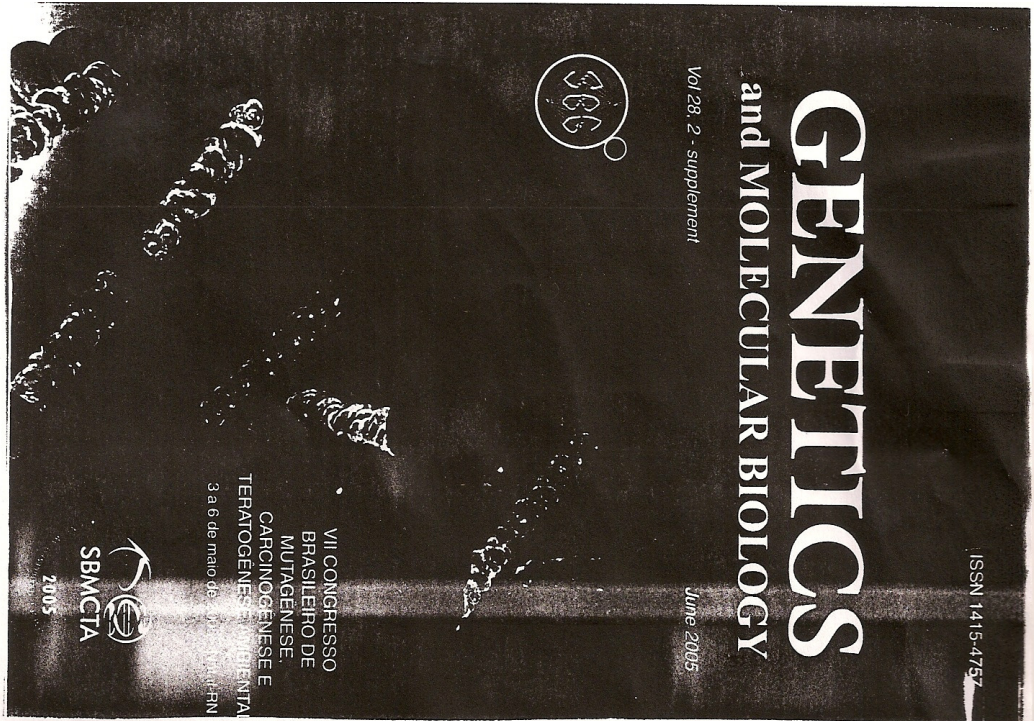
**P227****MUTACÃO DO p53 NO CÂNCER DE ESTÔMAGO: RELAÇÃO COM *Helicobacter pylori*.**

Angela Kosa Andrei<sup>1</sup>, Adriana Ferrasi<sup>2</sup>, Ailton Teles Fontenele Filho, Márcia Valéria Pinheiro Ferreira<sup>1</sup>, Maria Inês de M. Campos Parodi<sup>3</sup>, Sílvia Helena B. Rabenhorst<sup>1</sup>, Laboratório de Genética Molecular, Depto. de Patologia e Medicina Legal-FM, Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza, CE, 2 Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro - Depto. de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

O câncer gástrico é a segunda doença maligna fatal de ocorrência no mundo, sendo associado com estado sócio-econômico, fatores genéticos e ambientais. O adenocarcinoma gástrico é dividido em dois tipos histomorfológicos: "intestinal" e "difuso", diferentes quanto à epidemiologia, patogênese, evolução clínica e perfil genético. Diversas alterações genéticas têm sido associadas ao câncer. Uma das alterações mais frequentes é a do supressor tumoral p53. Mutações nesse gene levam a uma maior estabilidade da proteína p53, resultando numa maior concentração desta nos tecidos tumorais, permitindo assim sua detecção pelo método imunohistoquímico. Dentre os fatores ambientais envolvidos destaca-se a íntima relação entre a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (Hp) com o câncer gástrico, particularmente o tipo intestinal. O objetivo do presente trabalho foi detectar a mutação do gene p53 e associá-la com a presença de *H. pylori*, em tecido gástrico tumoral e normal. Para isso foram analisadas 23 amostras, obtidas após gastroscopias em pacientes com carcinoma gástrico, realizadas na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza, CE e no Hospital Universitário Walter Cantídio- UFC. DNA genômico foi extraído de fragmentos contendo mais de 70% de células tumorais e submetido à técnica de PCR-SSCP visando detectar a presença de mutação no gene p53 (exons 5, 6, 7, 8/9), e a presença de *H. pylori* (primers específicos para gene da ureaseC) em tecidos normais e tumorais. O material embalsamado em parafina, rotineiramente processado, foi utilizado para detecção da expressão tecidual de p53, pela técnica de imunohistoquímica, utilizando anticorpos monoclonais DAKO (Moise anti-human, clone DO-71, 80), em 21 amostras. Pela imunohistoquímica 47,6% dos casos foram positivos para p53, e a mutação foi detectada pela técnica de SSCP em 43,5%. Discordância entre o SSCP e a imunohistoquímica foi verificada em 47,6% dos casos analisados. Destas, 50% eram p53 positivas na imunohistoquímica e negativas pela SSCP. A detecção de *H. pylori* em tecidos normais foi de 95,7% e em tecidos tumorais 78,3%. Em 30% dos casos foi observada a presença do *H. pylori* sem mutação do p53, por ambas as técnicas; mas todos os que apresentaram mutação por SSCP foram *H. pylori* positivos. Em 21,7% dos casos não houve detecção bacteriana no tecido tumoral não sendo também detectada mutação do p53 pelo SSCP. O trabalho sugere uma forte relação entre a presença de *Helicobacter pylori* e a mutação do p53, não sendo este um evento exclusivo. A técnica de SSCP mostra-se necessária e complementar para a detecção de mutação do p53.

## Anexo X

(Apresentação em Congresso)



**P119** CORRELAÇÃO DA PRESENÇA DO VÍRUS DE EBERSTEIN-BARR (EBV) EM ADENOCARCINOMAS GÁSTRICO COM A EXPRESSÃO DE BCL-2.

Silvia Helena B. Reberthorst 1, Marcos Antonio P. de Lima 1, Ângela Rosa André 1, Adriana Ferrasi 2, Luciana Gomes Rocha de Arruda 3, Carlos Henrique Paiva Granjeiro 1, Maria Inês de Moura Campos Pariani 2, 1) Departamento de Patologia e Medicina Legal – UFC; 2) Departamento de Clínica Médica- FM- Ufesp- Boticari; 3) Laboratório.

Dentre os tumores malignos do estômago, os adenocarcinomas correspondem a aproximadamente 95% do total. Diversos fatores estão envolvidos na carcinogênese gástrica, tais como fatores ambientais, éticos e genéticos. Dentre os fatores etiológicos o mais relevante parece ser a presença do *H. pylori*, contudo, estudos em várias partes do mundo apontam para a participação do vírus de Epstein-Barr (EBV), nesse processo. Alguns autores correlacionam a presença do EBV com a ativação da expressão de algumas oncoproteínas, as quais poderiam explicar o seu papel na tumorigênese. Uma proteína comumente citada como ativada pelo EBV é a proteína anti-apoptótica Bcl-2. No intuito de verificar a presença do EBV em tumores de estômago, coletamos 20 casos de adenocarcinoma gástrico de pacientes submetidos à gastrectomia no Hospital da Santa Casa de Fortaleza e Universidade Walder Cantúlio da UFC. De cada paciente foram obtidos espécimes tumorais e de mucosa normal, para extração de DNA genômico e subsequente detecção viral através da técnica de PCR (utilizando *primers* específicos para o gene da proteína viral EBNA-1). A expressão de bcl-2, foi verificada através da técnica de imuno-histoquímica Streptavidina Biotina-Peroxidase (SABP), utilizando anticorpo monoclonal na diluição 1:40 (Dako; clone 124) em 12 dos casos estudados. Dentre os 20 casos analisados, 7 (35%) espécimes tumorais foram positivos para o EBV, sendo que 5 destes foram positivos concomitantemente em espécimes normais e tumorais, 2 apenas em espécimes tumorais e 10 casos positivos apenas em tecido normal. Dos 12 tumores analisados quanto à expressão de Bcl-2, apenas um caso foi positivo, sendo o mesmo, negativo para EBV. Nossos achados superam o percentual de associação do EBV com carcinoma gástrico, descrito na literatura usando a técnica de hibridização *in situ* (2-18%). Isso pode ser justificado pelo fato da técnica empregada ser diferente. No entanto, a demonstração do vírus exclusivamente em tecido tumoral, aponta para o envolvimento deste no desenvolvimento dessas neoplasias. Nesta amostra estudada não foi verificada correlação entre a presença do EBV e a expressão de Bcl-2.

Apoio Financeiro: CAPES, CNPq