



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANTONIA CATARINE GOMES VIEIRA

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *H. PYLORI* NAS VIAS
CARCINOGENICAS GÁSTRICAS ENVOLVENDO OS GENES *MYC* E *TP53***

FORTALEZA

2022

ANTONIA CATARINE GOMES VIEIRA

INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *H. PYLORI* NAS VIAS CARCINOGENÉTICAS
GÁSTRICAS ENVOLVENDO OS GENES *MYC* E *TP53*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V713i Vieira, Antonia Catarine Gomes.
Influência da infecção por H. Pylori nas Vias Carcinogênicas Gástricas envolvendo os genes MYC e TP53 / Antonia Catarine Gomes Vieira. – 2022.
51 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst.

1. Adenocarcinoma gástrico. 2. Helicobacter pylori. 3. MYC. 4. TP53. I. Título.

CDD 570

ANTONIA CATARINE GOMES VIEIRA

INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *H. PYLORI* NAS VIAS CARCINOGENICAS
GÁSTRICAS ENVOLVENDO OS GENES *MYC* E *TP53*

Aprovada em: 13/12/2022

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Ciências Biológicas do Centro de
Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção
do grau de Bacharelado em Ciências
Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Felipe Pantoja Mesquita
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A mim e a minha mãe Maria das Dôres

AGRADECIMENTOS

A Deus por me acolher nos momentos difíceis, me preencher e me fortalecer diante das Adversidades da vida.

À minha família, por todo carinho, compreensão e amor. Em especial, minha mãe que sempre esteve ao meu lado independente da situação. Sempre será para você e por você.

À Profa. Dr. Silvia Helena, pela paciência, carinho, atenção e apoio durante todo o período, do voluntariado até a defesa de monografia. Obrigada pela excelente orientação e por me permitir evoluir diante dos percalços da vida. Os seus ensinamentos foram e são de fundamental importância, estes que me incentivam a ser uma profissional melhor.

Aos participantes da banca examinadora, Dra Raquel Carvalho Montenegro e ao Dr Felipe Pantoja Mesquita, pelas valiosas colaborações, considerações e contribuições. Obrigada por fazerem parte de um dos mais importantes momentos da minha vida.

Ao Laboratório de Genética Molecular (LABGEM) da Universidade Federal do Ceará por me proporcionar vivências e experiências incríveis. Obrigada por me permitir evoluir, crescer e exercer minha independência, ao passo que me serve de porta para o mercado profissional.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular, em especial a Louise por toda paciência, dedicação, esforço e carinho. Obrigada por sempre me ajudar, e também pelas conversas e risadas.

À Universidade Federal do Ceará, em especial a coordenação do curso de Ciências biológicas, por toda assistência e trabalho prestado, e a Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis, pelo suporte financeiro durante vários períodos da graduação. Também agradeço ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), especialmente a FUNCAP e CNPq, pelo estímulo ao desenvolvimento do pensamento científico e pesquisa.

À minha melhor amiga, Beatriz, por me acolher e apoiar em todos os momentos. Por estar sempre ao meu lado, me incentivando e me dando forças. Obrigada pela assiduidade, sinceridade, amizade, carinho e pela compreensão. Você faz parte da minha família e da melhor versão que sempre serei.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo”.

José de Alencar

RESUMO

O câncer gástrico (CG) é o quinto câncer mais incidente e o quarto em mortalidade no mundo. O CG é extremamente heterogêneo e entre as moléculas observadas com alterações encontra-se os genes *MYC* e *TP53*, envolvidos com o ciclo celular e apoptose. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a relação entre presença de *H. pylori* e genótipos (*cagA*, *cagE* e alelos *vacA*), associando com a expressão de TP53 e de MYC. Foram estudados 82 pacientes com CG. A presença de *H. pylori* e genótipos foi realizada pela técnica de PCR. A superexpressão de MYC(+) e a expressão de TP53(p53+) foi detectada por imuno-histoquímica. A infecção por *H. pylori* foi observada em 85,4% (70/82) dos casos, sendo a *vacAs1* o genótipo mais frequente (87,1%; 61/70). Os genes *cagA* e *cagE* foram detectados em 62,8% (44/70) e 54,3% (38/70) dos casos respectivamente. TP53(+) foi detectada em 28,6% (20/70), e MYC(+) em 36,6% (30/82) no núcleo; 6,1% (5/82) no citoplasma, e 7,3 (6/82) para co-localização. As análises comparativas entre a frequência dos genes estudados ou em combinação mostraram que a positividade de MYC nuclear foi significativamente mais frequente nos tumores difusos (50%; 18/36), mostrando risco de aproximadamente 2x do tumor MYC nuclear desenvolver o subtipo difuso [p=0,025; OR = 2,8 (1,01 – 7,96)]. Nos casos *H. pylori* positivos, observou-se uma tendência ao risco para a dupla marcação MYCN(+)TP53(+) desenvolver o subtipo difuso [p=0,063; OR: 5,35 (0,63-65,33)]. Além disso, cepas *cagA* positivas e a presença de MYC nuclear foram significativamente mais frequente nos tumores difusos (10/17; 58,8%), apresentaram risco aproximadamente 8x maior para o desenvolvimento desse subtipo [p=0,006; OR = 8,21 (1,62 – 45,52)]. Os resultados indicam que, nos tumores difusos a via carcinogênica associada à expressão de TP53, e possivelmente influenciada por *H. pylori cagA*(+), parece ocorrer provavelmente por meio da proteína MYC.

Palavras-chave: Adenocarcinoma gástrico; *Helicobacter pylori*; MYC; TP53.

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is the fifth most incident cancer and the fourth in mortality worldwide. The GC is extremely heterogeneous and among the molecules observed with alterations are the *MYC* and *TP53* genes, involved with the cell cycle and apoptosis. Thus, the objective of this work was to investigate the relationship between the presence of *H. pylori* and the genotypes (*cagA*, *cagE* and *vacA* alleles), associated with the expression of TP53 and MYC. We studied 82 patients with GC. The presence of *H. pylori* and genotypes was performed using the PCR technique. MYC(+) overexpression and TP53(p53+) expression were detected by immunohistochemistry. *H. pylori* infection was observed in 85.4% (70/82) of the cases, with *vacAs1* being the most frequent genotype (87,1%; 61/70). The *cagA* and *cagE* genes were detected in 62.8% (44/70) and 54.3% (38/70) of cases, respectively. TP53(+) was detected in 28.6% (20/70), and MYC(+) at 36.6% (30/82) in the core; 6.1% (5/82) in the cytoplasm, and 7.3 (6/82) for co-localization. Comparative analyzes between the frequency of the genes studied or in combination showed that nuclear MYC positivity was significantly more frequent in diffuse tumors (50%; 18/36), showing approximately 2x risk of the MYC nuclear tumor developing the diffuse subtype [p=0.025; OR = 2.8 (1.01 - 7.96)]. In positive cases for *H. pylori*, there was a risk tendency for the double-labelled MYCN(+)TP53(+) to develop the diffuse subtype [p=0.063; OR: 5.35 (0.63-65.33)]. In addition, *cagA* positive strains and the presence of nuclear MYC were significantly more frequent in diffuse tumors (10/17; 58,8%), were approximately 8x more likely to develop this subtype [p=0,006; OR = 8,21 (1,62 – 45,52)]. The results indicate that, in diffuse tumors, a carcinogenic pathway associated with TP53 expression, and possibly influenced by *H. pylori cagA*(+), seems to occur probably through the MYC protein.

Keywords: Gastric adenocarcinoma; *Helicobacter pylori*; MYC; TP53.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Adenocarcinoma gástrico tipo intestinal (A) e tipo difuso (B).....	17
Figura 2 –	Microscopia eletrônica da bactéria <i>Helicobacter pylori</i>	19
Figura 3 –	Genoma circular de <i>H. pylori</i> , salientando a ilha de patogenicidade <i>cagPAI</i> e suas regiões.....	21
Figura 4 –	Desenho do estudo.....	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição da frequência de gênero entre os pacientes.....	33
Gráfico 2 – Frequência de imunocoloração de MYC (N: nuclear; C: citoplasmático; N/C: co-localização) e TP53 em ambos os subtipos histológicos.....	34
Gráfico 3 – Frequência dos genes de <i>H. pylori</i> em relação a ilha (<i>cagA</i> e <i>cagE</i>) e alelos <i>vacAs1/s2</i>	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Organização taxonômica da bactéria <i>Helicobacter pylori</i>	18
Tabela 2 –	Protocolos de PCR para detecção de <i>H. pylori</i> e seu genótipo.....	31
Tabela 3 –	Frequência de MYC e TP53 em ambos os subtipos histológicos.....	35
Tabela 4 –	Frequência de detecção de MYC e TP53 entre os subtipos histológicos	35
Tabela 5 -	Frequência de detecção de MYC e TP53 entre os subtipos histológicos dos casos <i>H. pylori</i> positivos.....	37
Tabela 6 –	Frequência das combinações de MYC e TP53 entre os subtipos histológicos dos casos <i>H. pylori</i> positivos.....	37
Tabela 7 –	Frequências da expressão de MYC e TP53 em ambos os subtipos histológicos considerando o gene <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i>	38
Tabela 8 –	Frequências da expressão de MYC e TP53 em ambos os subtipos histológicos considerando os casos <i>cagA</i> positivos.....	39
Tabela 9 –	Frequências da expressão de MYC e <i>TP53</i> em ambos os subtipos histológicos considerando os casos <i>cagE</i>	40
Tabela 10	Frequências da expressão de MYC em ambos os subtipos histológicos considerando alelos <i>vacA</i>	40
Tabela 11 –	Frequência das combinações da expressão de MYC e TP53 em ambos os subtipos histológicos considerando a presença de <i>H. pylori</i> (<i>cagA</i> e <i>cagE</i>) e alelos <i>vacA</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>AID</i>	Citidina desaminase induzida por ativação
<i>CG</i>	Câncer Gástrico
<i>cagA</i>	<i>cytotoxin-associated gene A</i>
<i>cagE</i>	<i>cytotoxin associated gene E</i>
<i>cagPAI</i>	Ilha de patogenicidade <i>cag</i>
CTAB	Brometo de cetil trietilamonio
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
LABGEM	Laboratório de Genética Molecular
LI	Labelling index
IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional de Câncer
NaCl	Cloreto de Sódio
OMP	Proteínas da Membrana Externa
OR	Odds Ratio
PCR	Reação em cadeia de polimerase
TCGA	The Cancer Genome Atlas
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SST4	Sistema de Secreção do Tipo IV
<i>vacA</i>	<i>vacuolating cytotoxin A</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Câncer Gástrico.....	16
1.1.1	<i>Epidemiologia.....</i>	16
1.1.2	<i>Características Histológicas.....</i>	16
1.1.3	<i>Etiologia.....</i>	17
1.2	<i>Helicobacter pylori</i>.....	18
1.2.1	<i>Fatores de Virulência.....</i>	19
1.2.1.1	<i>vacA.....</i>	20
1.2.1.2	<i>Ilha de Patogenicidade Cag (cagPAI).....</i>	20
1.2.1.2.1	<i>cagA.....</i>	21
1.2.1.2.2	<i>cagE.....</i>	22
1.3	Oncogênese Gástrica.....	22
1.3.1	<i>MYC.....</i>	23
1.3.2	<i>TP53.....</i>	23
2	JUSTIFICATIVA.....	25
3	PERGUNTA DE PARTIDA	26
4	HIPÓTESE	26
5	OBJETIVOS.....	27
5.1	Objetivo Geral	27
5.2	Objetivos específicos.....	27
6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
6.1	Considerações Éticas e casuística.....	28
6.2	Extração do DNA.....	28
6.3	Imuno-histoquímica.....	29
6.4	Detecção dos genes de <i>Helicobacter pylori</i>.....	30
6.5	Análise de dados.....	31
7	RESULTADOS.....	33
7.1	Caracterização dos pacientes estudados	33
7.2	Genes <i>MYC</i> e <i>TP53</i>.....	33
7.3	Detecção de <i>H. pylori</i> e genótipos (<i>cagA</i>, <i>cagE</i> e alelos <i>vacA</i>) em ambos os subtipos histológicos.....	36

7.4	Correlação de <i>H. pylori</i> com os genes <i>MYC</i> e <i>TP53</i>	36
8	DISCUSSÃO.....	42
9	CONCLUSÃO.....	45
10	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer gástrico

1.1.1 Epidemiologia

O câncer gástrico (CG) é um dos principais problemas de saúde pública a nível mundial, ocupando o quarto lugar em mortes por câncer no mundo (GLOBOCAN 2020, ILIC., 2022). Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) (2020) mostraram que, no Brasil, estima-se que para cada ano do triênio 2020 a 2022 sejam diagnosticados 21.230 novos casos de CG, sendo o quarto mais incidente entre os homens e o sexto entre as mulheres.

1.1.2 Características Histológicas

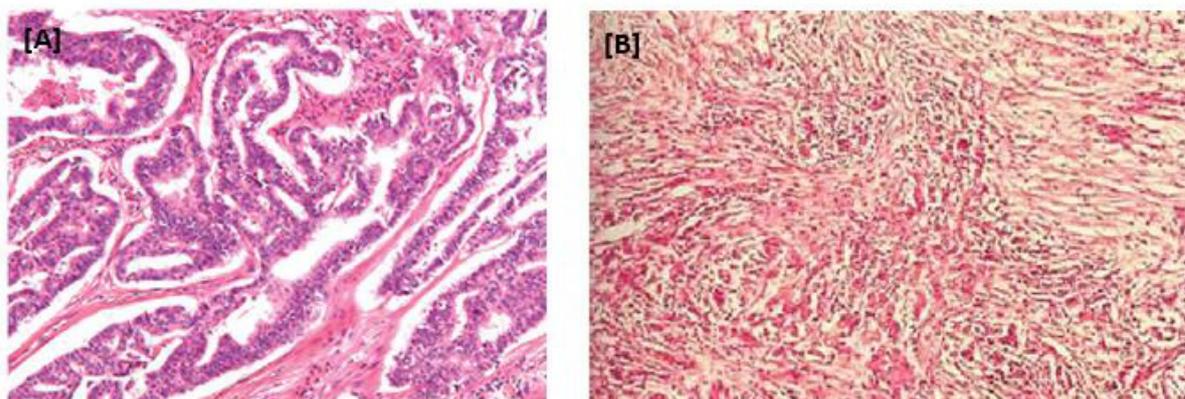
A carcinogênese gástrica é heterogênea podendo originar-se de diferentes formas histológicas. A classificação histológica divide esses tumores em não epiteliais e epiteliais, na qual dentre os tumores epiteliais estão incluídos os adenocarcinomas, representando cerca de 95% das neoplasias gástricas (CORREIA, et al., 2009).

Diante da diversidade de arranjos histológicos, e de acordo com a classificação mais comumente utilizada, os adenocarcinomas podem ser divididos em dois subtipos: intestinais e difusos (LAURÉN, 1965). O subtipo intestinal é mais diferenciado, caracterizado por apresentar células com núcleos grandes, irregulares e que apresentam coesão celular, viabilizando a formação de estruturas glandulares ou tubulares, semelhantes à do trato gastrointestinal. Esse subtipo é normalmente associado com lesões percussoras, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia, ocorrendo geralmente em pacientes mais velhos, com predileção pelo sexo masculino (BRESCIANI, et al., 2003; BRAY, et al., 2018).

O subtipo difuso, que geralmente inclui tumores pouco diferenciados, é constituído de pequenas células não coesas, difusamente dispersas e que não formam estruturas glandulares, podendo apresentar o núcleo periférico, devido a elevada produção de mucina, aspecto denominado de células em “anel-de-sinete”. Normalmente ocorre em pacientes mais jovens, podendo apresentar caráter hereditário, originando-se do epitélio normal, sem a ocorrência aparente de lesão pré-neoplásica, apresentando um padrão de crescimento infiltrativo, manifestando um comportamento mais agressivo,

com prognóstico menos favorável que o tipo intestinal (BRESCIANI, et al., 2003; HARTGRINK, et al., 2009).

Figura 1 - Adenocarcinoma gástrico tipo intestinal (A) e tipo difuso (B).



Fonte: HARTGRINK, et al., 2009; ESPEJO e NAVARRETE, 2003.

Os subtipos difuso e intestinal apresentam um comportamento biológico diferente, na qual a infecção por *H. pylori* parece ser fator de risco para o desenvolvimento de ambos (HUSSAIN e HAMID, 2014; BURKITT, et al., 2017). O tipo intestinal é frequentemente associado a infecção pela bactéria (WATANABE et al., 2012; MURATA-KAMIYA et al., 2007) na qual uma série de eventos sequenciais são descritos, que é a “Cascata de Correa” (CORREA, 1988; SAHA, et al., 2013). Quanto ao subtipo difuso, este apresenta evolução clínica agressiva podendo ter como evento precursor a gastrite com infecção por *H. pylori*. (VAUHKONEN, et al., 2006; CREW, et al., 2006).

1.1.3 Etiologia

O câncer gástrico (CG) se configura como uma doença de etiologia multifatorial e complexa, na qual fatores ambientais e aspectos genéticos do hospedeiro desempenham um papel primordial para o desenvolvimento de uma alteração fenotípica normal para neoplásica (TAMURA, 2006; PAKSERESHT, et al., 2011).

Dentre os fatores ambientais destacam-se o consumo excessivo de sal, a ingestão de alimentos enlatados e o baixo consumo de frutas e vegetais, estes que são fortemente indicados como fatores de risco para o CG (DICKEN, et al. 2005; NAKASHIMA, et al., 2012). Além da dieta, o consumo excessivo de álcool e o

tabagismo também são fatores associados ao CG (DEN HOED e KUIPERS, 2016; POOROLAJAL, et al., 2020).

A infecção por *Helicobacter pylori* é considerado o fator etiológico mais bem estabelecido no desenvolvimento do CG, sendo classificada, desde 1994, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um agente carcinogênico tipo I (MISRA, et al., 2014). Estima-se que a prevalência global da infecção pela bactéria seja cerca de 20%, em países desenvolvidos, a mais de 90% em países em desenvolvimento (BURUCOA & AXON, 2017), na qual, no Brasil, sua prevalência se dá em regiões de baixo saneamento, podendo atingir até 90%, variando entre as distintas regiões do país (SUZUKI, et al., 2013; MCDONALD, et al., 2015; VINAGRE, et al., 2015; RAMOS, et al., 2019). O risco da doença circunda a relação entre patógeno e hospedeiro, sendo está, por sua vez, dependente da composição do genoma da bactéria que, após a infecção, promovem a inflamação e que estão associados a um risco aumentado de câncer (PAKSERESHT, et al., 2011).

1.2 *Helicobacter pylori*

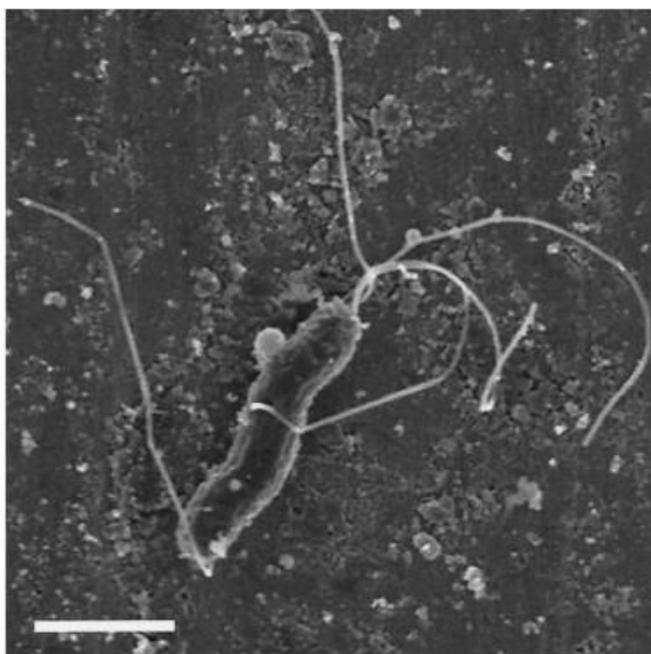
A bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), conhecida como um importante patógeno humano por quase quatro décadas, é classificada como um agente carcinogênico tipo I (PARKIN et al., 2002), sendo caracterizada como uma bactéria Gram-negativa, pleomórfica, microaerófila, espiralada e flagelada e altamente adaptada a um ambiente ácido, como o estômago humano.

Tabela 1 - Organização taxonômica da bactéria *Helicobacter pylori*

FILO <i>Proteobacteria</i>	FAMÍLIA <i>Helicobacteraceae</i>
CLASSE <i>Epsilonproteobacteria</i>	GÊNERO <i>Helicobacter</i>
ORDEM <i>Campylobacterales</i>	ESPÉCIE <i>Pylori</i>
NOME BINOMINAL: <i>Helicobacter pylori</i>	

Fonte: NCBI, 2022.

Figura 2 - Microscopia eletrônica da bactéria *Helicobacter pylori*.



Fonte: Solnick & Vandamme 2001.

H. pylori, está associada a diversas patologias gástricas (SUERBAUN & MICHETTI, 2002), estimando-se que a infecção pela bactéria seja responsável por 65% a 80% dos casos de CG (SITARZ, et al., 2018; RAMOS, et al., 2019), causando morbidade e mortalidade considerável.

1.2.1 Fatores de Virulência

O ambiente ácido do estômago é uma das principais barreiras após a entrada da bactéria no hospedeiro. Afim de neutralizar o ácido gástrico *H. pylori* produz a urease, uma proteína responsável por catalisar a hidrólise da ureia, produzindo ácido carbônico e amônia, sendo esta última utilizada pela bactéria para a síntese proteica (PINHEIRO JUNIOR, et al., 2004). A urease é relevante para a colonização da bactéria no estômago, sendo amplamente utilizada no diagnóstico clínico para confirmação da infecção por *H. pylori*.

Nesse contexto, além da urease, diversos fatores da bactéria estão envolvidos na patogênese gástrica. Existem aqueles envolvidos na adesão do epitélio gástrico, na colonização, no dano tecidual e na sobrevivência da bactéria no estômago, sendo estes divididos de acordo com as funções que desempenham (MOBLEY, et al., 2001). Dentre os fatores de virulência de *H. pylori* destacam-se o gene *cagA* (*cytotoxin-*

associated gene A), a Ilha de Patogenicidade do *Cag* (*cagPAI*), *vacA* (*vacuolating cytotoxin A*) e proteínas da membrana externa (OMPs), sendo estes genes extensivamente estudados na literatura (MOBLEY, et al., 2001; CHMIELA, et al., 2017; YOUSEFI, et al., 2019).

1.2.1.1 *vacA*

O gene *vacA* está presente em todas as cepas de *H. pylori* e é responsável por codificar a proteína citotóxica vacuolizante A (VacA), que tem como papel principal a indução de vacúolos nas células epiteliais gástricas do hospedeiro (MCCLAIN; BECKETT; COVER, 2017). VacA além de iniciar uma resposta inflamatória quando internalizada, também pode induzir a apoptose por meio da liberação do citocromo c quando transportada para as mitocôndrias. VacA também pode alterar vias de sinalização celular ao induzir a vacuolização, quando absorvida por pinocitose (MATSUNARI, et al., 2012; CHAUHAN, et al., 2019).

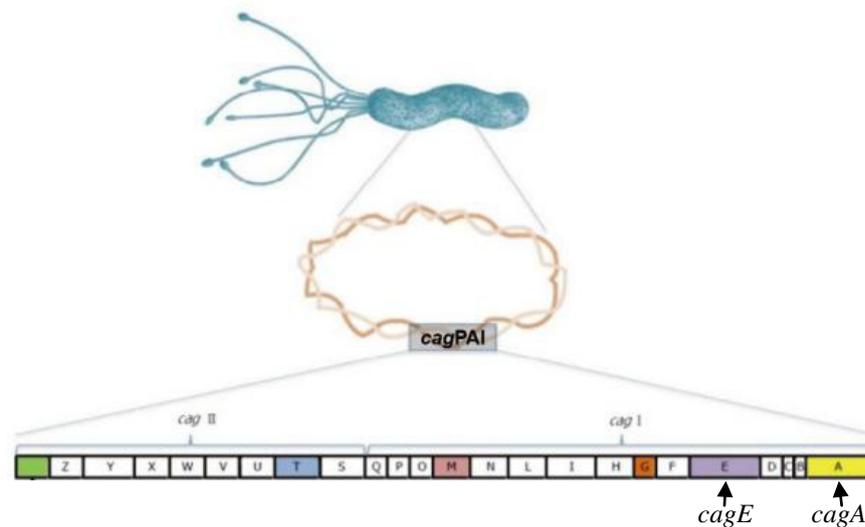
Apesar de *H. pylori* apresentar um gene funcional, nem todas as cepas secretam VacA. Sua composição baseia-se em regiões alélicas distintas, categorizadas com base na heterogeneidade nas estruturas do gene *vacA* dentro da região sinal (s), da região média (m) e da região intermediária (i). As sequências em cada uma dessas regiões podem ser subclassificadas em s1 e s2; m1 e m2 e i1 e i2 (RHEE; PARK; CHO, 2014). Vários estudos têm confirmado que cepas portadoras dos alelos *vacA* do tipo s1 estão associadas a um maior risco de úlcera péptica e câncer gástrico, comparadas com cepas tipo s2. Somado a isso, o alelo m1 de *vacA* também se mostrou mais associado ao desenvolvimento de lesão epitelial gástrica e câncer gástrico do que cepas *vacA* tipo m2. (FOEGEDING, et al., 2016; YAHIRO, et al., 2016).

1.2.1.2 Ilha de Patogenicidade do *Cag* (*cagPAI*)

A bactéria *H. pylori* possui, em seu genoma, uma região intitulada de ilha de patogenicidade *cag* (*cagPAI*), que comporta cerca de 31 genes, e que são cruciais no estabelecimento da sua patogenicidade (PACCHIANI et al., 2013). A ilha *cagPAI* é dividida em duas regiões: *cagI* e *cagII*, na qual os genes inseridos nessas regiões são responsáveis por compor o Sistema de Secreção Tipo IV (SST4), que é utilizado para injetar moléculas efetoras da bactéria na célula hospedeira, viabilizando que vias do metabolismo sejam moduladas pela bactéria, inclusive a expressão de proto-oncogenes

(COVACCI, ET AL., 2000; BATS, et al., 2018).

Figura 3 - Genoma circular de *H. pylori*, salientando a ilha de patogenicidade *cagPAI* e suas regiões.



Fonte: Adaptado de COSTA et. al., 2015.

A integridade de *cagPAI* tem demonstrado relevância no sucesso da infecção por *H. pylori*, estando mais associada a doenças mais graves, inclusive ao câncer gástrico. Dentre os genes que compõem a ilha *cagPAI* destacam-se os genes *cagA* e *cagE*, ambos localizados na região *cagI*, e envolvidos com a integridade da patogenicidade da ilha, com alta frequência nas cepas relacionadas ao CG (DING, et al., 2004; SOZZI, et al., 2005; LIMA, et al., 2010).

1.2.1.2.1 *cagA*

O gene *cagA*, localizado na metade direita da ilha *cagPAI*, codifica uma proteína de mesmo nome (CagA) altamente imunogênica. Esse gene é considerado o fator de virulência de *H. pylori* mais estudado, sendo responsável por aproximadamente 60% das infecções (NAGASE, et al., 2015; TAKAHASHI-KANEMITSU; KNIGHT; HATAKEYAMA, 2020).

A citotoxina CagA, injetada na célula do hospedeiro via SST4, quando fosforilada, tornando-se essencial em processos celulares e vias de transdução de sinais

(DE VRIES, et al., 2008). Quando não fosforilada, CagA também tem efeitos patogênicos, que resultam em respostas pró-inflamatórias e perda de polaridade da célula (BAUER & MEYER, 2011; HANSEN, et al., 2020). Apontada como marcador de integridade da ilha *cagPAI*, CagA é a única proteína translocada para as células epiteliais gástricas, sendo sua presença associada ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer gástrico, pois cepas *cagA* positivas tendem a serem mais virulentas, além de induzirem altos níveis de expressão de citocinas, a exemplo IL-1b e IL-8 (BLASER e BERG, 2001; FALUSH, et al., 2003; DING, et al., 2004; NAGASE et al., 2015; CAMILO; SUGIYAMA; TOUATI, 2017; TAKAHASHI-KANEMITSU; KNIGHT; HATAKEYAMA, 2020),

1.2.1.2.2.*cagE*

Localizado na região *cagI* da ilha *cagPAI*, o gene *cagE* (*cytotoxin associated gene E*) de *H. pylori* é também citado como um bom marcador de cepas virulentas. Responsável por codificar uma proteína localizada na membrana interna da bactéria (CagE), com propriedade ATPase, essa proteína está associada ao sistema de transporte de substâncias na bactéria, estando também relacionada ao aumento da expressão de interleucina 8 (IL-8) pela célula do hospedeiro durante a infecção (ALDIBERT, 2001; KUTTER, et al., 2008). Estudos indicam que o gene *cagE* tem sido citado como melhor marcador para a região *cagI* de *cagPAI* do que o *cagA* (SOZZI et al., 2005; TANG, et al., 2008).

1.3 Oncogênese Gástrica

Para melhor entendimento da tumorigênese, moléculas envolvidas no ciclo celular, proliferação, reparo do DNA e apoptose são estudadas, com o objetivo de auxiliar no entendimento e compreensão de alvos terapêuticos específicos nos diferentes tipos de câncer. A identificação de genes com alterações por mutações e superexpressão, servem como uma ferramenta primordial na compreensão da gênese tumoral, resultando em possíveis estratégias de tratamento e desenvolvimento de novas medidas preditivas, preventivas e terapêuticas.

No câncer gástrico, os estudos são escassos sobre os marcadores envolvidos. A maioria dos relatos concentram-se no estudo de possíveis marcadores de proliferação celular. Nesse contexto, destacam-se os genes *MYC* e *TP53*, envolvidos com a indução

da parada da proliferação celular e apoptose. Além disso, quando associados a mutações resultam em processos ineficientes e alterações na expressão de proteínas envolvidas na proliferação celular, favorecendo o processo tumoral.

1.3.1 MYC

O oncogene *MYC*, localizado no braço longo da região cromossômica 8q24.1, apresenta três éxons e desempenha um papel fundamental na proliferação, regulação do crescimento, diferenciação celular, além de apoptose e angiogênese (FERNANDEZ, 2003; DE SOUZA, 2013; NCBI, 2018). Descrito como um elemento chave de vários processos na carcinogênese, sua elevada expressão foi mais frequente observada em pacientes com câncer gástrico do que em lesões pré-neoplásicas (KHALEGHIAN, et al., 2015).

A ativação inadequada de *MYC* tem sido associada a translocação ou inserção cromossômica, mutações, modificações epigenéticas, resistência da proteína *MYC* e amplificação gênica. A perda das funções de *MYC* podem contribuir para o fenótipo do tumor (FAN, et al., 2001; MILLER, et al., 2012). Estudos demonstram que o gene *MYC* expressa-se desregulado na carcinogênese gástrica, apresentando padrões distintos de alterações entre os subtipos histológicos. O tipo difuso de *Lauren* está associado a uma maior expressão de *MYC* e de mutações pontuais mais frequentes. Por outro lado, o subtipo intestinal relata um maior número de cópias desse gene, aumentando durante o processo da carcinogênese gástrica, relacionando-o a iniciação e progressão do tumor gástrico (CALCAGNO, et al., 2006; MILNE, et al., 2007; CALCAGNO, et al., 2008; DE SOUZA, 2013). O aumento de *MYC* também foi associado a infecção por *H. pylori* (CALCAGNO, et al., 2008), na qual sua expressão esteve relacionada a intensidade da alteração celular (ZHANG, et al., 2004), e a indução a apoptose em células de adenocarcinoma gástrico pela bactéria mediadas por uma aumentada expressão de mRNA de *MYC* (YANG, et al., 2003).

1.3.2 TP53

Localizado no braço curto do cromossomo 17p13.1, esse gene codifica, principalmente uma fosfoproteína nuclear de 53kDa, a TP53, que atua regulando diversos processos celulares, incluindo o controle do ciclo celular, reparo do DNA e indução apoptose (HAINAUT; HOLLSTEIN, 2000; SADEGHI, et al. 2013; BANIAK,

et al. 2016). Mutações no gene *TP53* resultam na inativação da proteína TP53 (AUBREY, et al. 2016), tornando-a incapaz de controlar a proliferação celular, resultando em um reparo ineficiente do DNA (OKI, et al., 2009). TP53 selvagem, que funciona como um fator de transcrição, é continuamente sintetizada, e não detectável por imuno-histoquímica, estando presente em baixas concentrações nas células normais, não acumulando-se em níveis superiores por possuir meia vida curta. A forma mutada dessa proteína levaria a formação de uma proteína anormal, que apresenta uma maior estabilidade e meia-vida superior a proteína selvagem, resultando em um acúmulo nuclear da mesma, este que pode ser detectado pela técnica de imuno-histoquímica (FENOGLIO-PREISER, et al., 2003; ANDO, et al., 2015)

O gene *TP53* é um supressor tumoral normalmente mutado em vários tipos de câncer. O sítio de mutação do *TP53* no câncer gástrico é amplo e a incidência relatada de mutações varia de 3,2% a 65% (OKI, et al., 2009), estando relacionada mais frequentemente ao adenocarcinoma do subtipo intestinal (ENDO, et al., 2000; BUSUTTIL, et al. 2014; XU et al. 2014) e a um comportamento biológico mais agressivo (TAHARA, et al., 2016). Outra característica relativa a TP53 é sua relação com infecções bacterianas, visto que podem modular a frequência de mutações possuindo potencial oncogênico inativador como parte do seu ciclo. Múltiplas mutações em *TP53* parecem ser causadas pela infecção por *H. pylori* (WEI, et al., 2010; SHIMIZU, et al. 2014).

2 JUSTIFICATIVA

O câncer gástrico (CG) é um câncer extremamente heterogêneo, o que justifica a classificação histológica não ser suficiente para prever os desfechos clínicos dessa doença. As classificações moleculares (Asiática e TCGA network) procuraram agrupar os tumores em categorias, mas também não foram bem sucedidas quanto à associação com prognóstico, sendo necessários novos estudos a fim de identificar moléculas envolvidas na carcinogênese gástrica.

Entre as moléculas observadas com alterações no CG destacam-se os genes *MYC* e *TP53*, envolvidos com o ciclo celular, reparo do DNA e apoptose. Alterações em genes da família *MYC* estão associadas a desregulação da proliferação celular, particularmente quando acompanhado pela mutação de moléculas importantes para os pontos de checagem do ciclo celular, como *TP53*.

Além de avaliar as expressões e alterações de *MYC* e de *TP53* respectivamente, também se mostrou relevante associar com infecção por *Helicobacter pylori*, visto que, a bactéria é o agente etiológico mais bem estabelecido no câncer gástrico, sendo considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da neoplasia.

A relevância desse estudo não se dá apenas na identificação dos genes relatados, mas também na importante relação deles dentro dos subtipos tumorais na carcinogênese gástrica, sendo fundamental para a definição de possíveis estratégias e desenvolvimento de novas medidas preditivas, preventivas e terapêuticas. Identificar um perfil, que combine moléculas com alterações, as características histológicas e os genótipos de *H. pylori* é essencial para predefinir o prognóstico do paciente. Um marcador molecular associado a um subtipo da doença é uma alternativa que busca auxiliar no entendimento desse câncer, este que ainda é um dos cânceres de pior prognóstico.

3 PERGUNTA DE PARTIDA

Existe uma relação entre a variação da expressão MYC e TP53 dependente do genótipo de *H. pylori*?

As possíveis associações encontradas diferem quanto ao subtipo histológico (intestinal/difuso)?

4 HIPÓTESE

A frequência e a combinação das alterações em MYC e TP53, presentes nos adenocarcinomas gástricos, são dependentes do genótipo de *H. pylori* e diferem entre subtipos histológicos do Câncer Gástrico.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Verificar se as alterações em *MYC*, *TP53*, independentes ou associadas, diferenciam vias carcinogênicas dependentes do genótipo de *H. pylori*.

5.2 Objetivos Específicos

- Detectar a expressão de *MYC* e *TP53* nos tumores gástricos intestinais e difusos;
- Detectar a presença de *H. pylori* e dos genes *cagA*, *cagE* e alelos *vacA* nos tumores coletados;
- Buscar um perfil molecular de valor prognóstico que correlacione os genótipos de *H. pylori* com as alterações moleculares aqui estudadas e o subtipo histológico de Lauren para CG.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Considerações Éticas e Casuística

O presente estudo faz parte do projeto integrado de pesquisa desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular - LABGEM, intitulado: “SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA DE ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS DE PACIENTES SUBMETIDOS À TERAPIA NEOADJUVANTE EM BUSCA DE UMA ASSINATURA MOLECULAR DE VALOR PROGNÓSTICO”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Ceará, sob parecer no. 5.136.545 (CAEE: 24629219.0.0000.5054). Um total de 82 amostras de tumores gástricos foram obtidos a partir de pacientes com câncer gástrico, submetidos a gastrectomia nos hospitais: Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC), Santa Casa de Misericórdia (SCMF) e Hospital Haroldo Juaçaba (ICC). Nos centros cirúrgicos dos respectivos hospitais, foram coletados por paciente 1(um) fragmento do tumor de DNA, que foi imediatamente transportado para o para o LABGEM, do Departamento de Patologia e Medicina Legal – DPML, e armazenado em freezer -80°, até o momento da extração de DNA, concordando com todas as condições ideais de assepsia, protocolos de coleta, transporte, armazenamento e não comprometendo a investigação da rotina hospitalar. As coletas foram realizadas após o devido consentimento por escrito do paciente, autorizando a coleta e o devido uso para fins científicos.

Além disso, de todos os casos analisados foram também realizados cortes histológicos de 5 µm, corados com Hematoxilina-Eosina, afim de avaliar o percentual de células tumorais. Foram consideradas amostras que continham um percentual maior ou igual a 80%. Em paralelo, também foram confeccionadas lâminas histológicas, que posteriormente foram submetidos à técnica de Imuno-histoquímica.

6.2 Extração do DNA

O DNA de alto peso molecular foi obtido a partir das amostras de tecido, após a confirmação da presença de pelo menos 80% de células, certificado pela análise do corte histológico do material congelado. O DNA foi extraído utilizando o método de extração com CTAB (Brometo de Cetil trimetil Amônio) descrito por Foster e Twell (1996), cujos principais passos são descritos a seguir:

1. Fragmentos de aproximadamente 0,5g foram maceradas com auxílio auxílio de bastão de vidro esterilizado, e em seguida transferiu-se para um tubo falcon de 15 ml;
2. Adicionou-se 6ml de tampão de extração (2% CTAB; 1,4M de NaCl; 20mM de EDTA; 100mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,2% de β -mercaptoetano), seguido de aquecido a 60°C em banho maria por 16 horas;
3. Seguiu-se a etapa de purificação com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e precipitação do DNA com 2/3 do volume de isopropanol gelado a 100%;
4. Adicionou-se 1M de NaCl para liberação do complexo DNA-CTAB;
5. O DNA foi precipitado com etanol 100% gelado; em seguida lavado com etanol 70% e colocado para secar em temperatura ambiente;
6. DNA foi ressuspendido em 50 μ l e armazenado em freezer a -15°C.

Para assegurar a qualidade do material extraído, o mesmo foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo e observado em transluminador com luz UV (ultravioleta). A pureza do material foi estimada a partir da absorbância das amostras, assumindo uma equivalência de 50 μ g/ml para 1 unidade de absorbância a 260 nm, A concentração e a pureza do DNA foram determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop™ 3300 (Wilmington, DE, USA).

As amostras de DNA foram utilizadas para a detecção e amplificação dos genes de *H. pylori* (*UreC/gmM1*, *cagA*, *cagE* e alelos *vacA*).

6.3 Imuno-histoquímica

A expressão de MYC foi determinada nos 82 casos analisados, enquanto que TP53 foi determinada em apenas em 70 casos. Para a análise imuno-histoquímica das proteínas TP53 e MYC foram preparados cortes histológicos de 5 μ m, fixados em lâminas de vidro silanizadas (silano a 4%), as quais foram submetidas a técnica de imuno-histoquímica, com a utilização de anticorpos monoclonais (DakoCytomation®). O método utilizado foi o da estreptoavidina-biotina-peroxidase, adaptada de HSU et al. (1981) para a detecção das proteínas celulares, conforma descrito a seguir:

1. Desparafinização em estufa a 60°C por 120 minutos;

2. Desparafinização e hidratação em gradiente xilol-álcool-água;
3. Recuperação antigênica em Pascal utilizando tampão citrato 10mM, pH=6,0 (\pm 99°C), por 15 minutos;
4. Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos;
5. Incubação com anticorpo primário (DakoCytomation®) em geladeira por 16 horas (Diluição MYC 1:60; e TP53 1;60)
6. Detecção pelo sistema LSAB+ (DakoCytomation®), de acordo com as recomendações do fabricante;
7. Revelação pelo sistema DAB+ (3,3'-diaminobenzidine) (DakoCytomation®), conforme recomendações do fabricante;
8. Contra-corar com Hematoxilina de Harris a 40%;
9. Desidratação em gradiente de água-álcool-xileno;
10. Montagem com lamínulas e Bálsamo do Canadá.

Para análise imuno-histoquímica o índice de marcação LI (do inglês, *Labelling index*) foi estimado por meio da contagem manual, utilizando microscopia óptica. Foram selecionados campos aleatórios (magnificação de 400X), com representativa quantidade de células tumorais. Um mínimo de 300 células foram contadas e o índice de marcação foi calculado com base na seguinte fórmula:

$$LI = (\text{Total de células marcadas}) / (\text{Total de células contadas}) \times 100$$

As amostras foram examinadas em microscópio óptico e consideradas positivas para as proteínas que demonstrassem LI>10% (CALCAGNO, et al., 2013).

6.4 Detecção dos genes de *Helicobacter pylori*

A detecção da presença de *H. pylori* e genótipos nas amostras analisadas foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Para confirmação da infecção por *H. pylori*, amplificou-se a região interna que codifica a proteína urease (*ureC*) usando primers específicos, conforme descrito anteriormente por Lage, et al (1995). O gene *cagA* foi identificado usando os primers descritos por Domingo, et al (1999). O gene *cagE* e alelos *vacAs1/s2* foram identificados usando os primers descritos por Lima, et al.,

(2011). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% e corados com nitrato de prata. A tabela 2 discrimina os genes de *H. pylori*, iniciadores específicos, tempo de anelamento e referência dos protocolos utilizados.

Tabela 2 - Protocolos de PCR para detecção de *H. pylori* e seu genótipo.

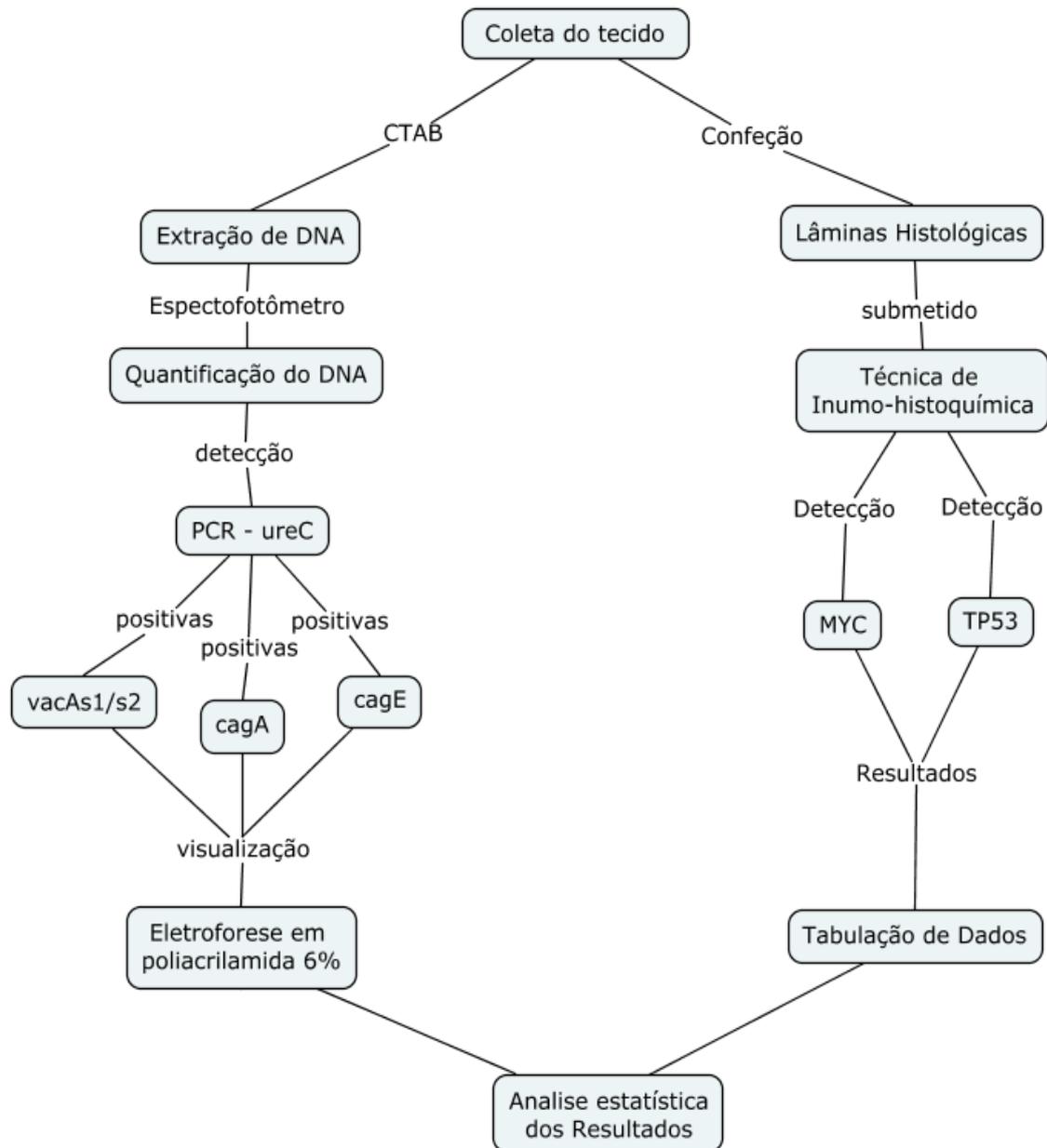
Gene	Primers	Anelamento	Tamanho do produto	Referência
<i>ureC</i>	F – 5’AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT -3’ R – 5’AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3’	55°C	294 pb	Lage, et al, 1995
<i>vacAs1/s2</i>	F – 5’ATGGAAATACAACAAACACAC-3’ R – 5’CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3’	55°C	259/286 pb	Lima et al, 2011
<i>cagA</i>	F – 5’ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGA GCGA – 3’ R – 5’TTAGAATAATCAACAAACATAACG CCAT – 3’	56°C	297 pb	Domingo et al., 1999.
<i>cagE</i>	F – 5’TTGAAAACCTTCAAGGATAGGATAG AGC – 3’ R – 5’GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC – 3’	56°C	509 pb	Lima, et al., 2011

6.5 Análise dos dados

Os dados clínicos–patológicos, assim como os resultados das PCRs e da técnica de imuno-histoquímica, foram tabulados e organizados, através de gráficos e tabelas com auxílio dos programas computacionais Microsoft Office Excel® 2019 e Microsoft Office Word® 2019 (Microsoft®, USA).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas estatístico EPINFO® e SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 10.0 e 17.0 para Windows, respectivamente. Os parâmetros foram calculados com intervalo de confiança de 95%. Em adição, realizou-se o Teste do Qui-quadrado (χ^2) e Teste Exato de Fisher. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

Figura 4 – Desenho do estudo.



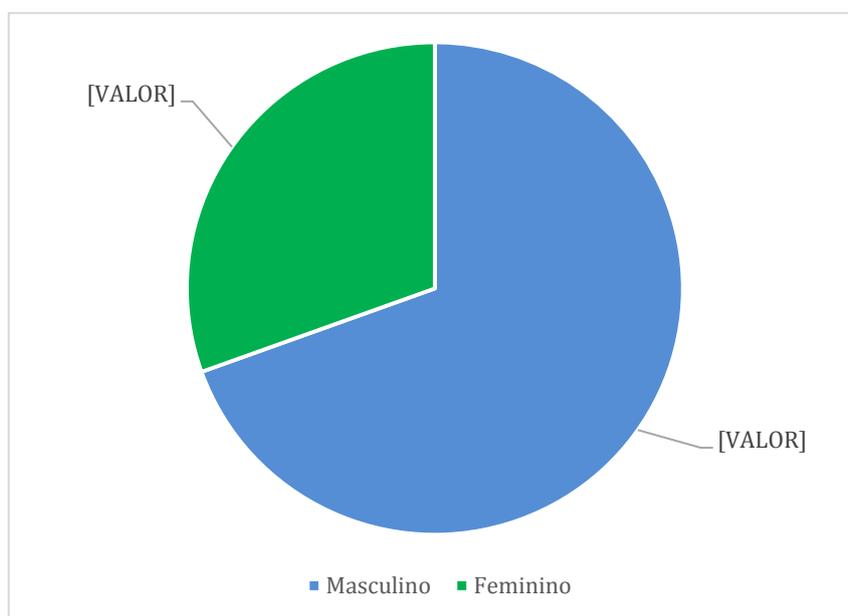
Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa, 2022.

7 RESULTADOS

7.1 Caracterização dos pacientes estudados

Neste estudo foram incluídos 82 pacientes com adenocarcinoma gástrico, sendo a mediana das idades dos pacientes de 64 anos, variando entre 23 e 90 anos. Quanto ao gênero, nessa amostragem 69,5% (57/82) eram do gênero masculino e 30,5% (25/82) do gênero feminino (Gráfico 1). Histologicamente os tumores foram classificados por *Lauren*, sendo 56,1% (46/82) do subtipo intestinal e 43,9% (36/82) do subtipo difuso.

Gráfico 1 - Distribuição da frequência de gênero entre os pacientes.

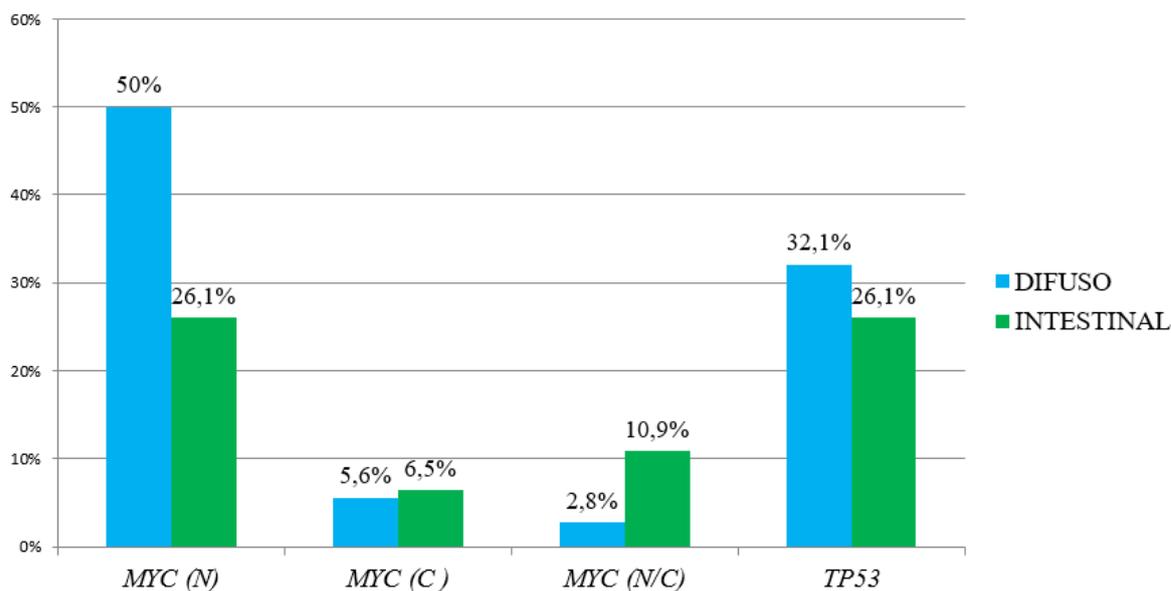


Fonte: Elaborada pelo autor do estudo, 2022.

7.2 Genes *MYC* e *TP53*

A expressão de *MYC* foi detectada em 36,6% (30/82) no núcleo (N), 6,1% (5/82) no citoplasma (C) e 7,3% (6/82) para co-localização (N/C), com um total de 50% (41/82) casos positivos para *MYC*. A expressão de *TP53*, considerada pela imunoposição do gene, esteve presente em 28,5% (20/70) dos casos. No gráfico 2 ESTÃO descritas as frequências da imunocoloração de *MYC* e *TP53* considerando os subtipos histológicos estudados.

Gráfico 2 - Frequência de imunocoloração de MYC (N: nuclear; C: citoplasmático; N/C: co-localização) e TP53 em ambos os subtipos histológicos.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa. 2022.

Na tabela 3 as frequências de casos positivos para TP53 e MYC foram distribuídas de acordo com o subtipo histológico. Na análise da expressão de MYC foi considerada a localização do compartimento celular. Neste contexto, a positividade de MYC nuclear [MYC(N)(+)] foi significativamente mais frequente nos tumores difusos (50%; 18/36), mostrando risco de aproximadamente 2x do tumor MYC nuclear desenvolver o subtipo difuso [$p=0,025$; OR = 2,8 (1,01 – 7,96)]. Por outro lado, nos tumores intestinais a negatividade de MYC(N) [MYC (N) (-)] foi mais frequente (73,9%; 34/46). O pequeno número de amostras com marcação citoplasmática ou com co-localização não permitiu análises diferenciadas quanto aos subtipos histológicos. Considerando a expressão de TP53 [TP53(+)], sua positividade foi mais presente no subtipo difuso (9/28; 32,1%) contrastando com sua negatividade mais presente nos tumores intestinais (31/42; 73,8%).

Tabela 3 – Frequência de MYC e TP53 em ambos os subtipos histológicos.

		Intestinal	Difuso	P	OR
MYC (N) n=82	+	12/46 (26,1%)	18/36 (50%)	0,025	2,83 (1,01-7,96)
	-	34/46 (73,9%)	18/36 (50%)		
MYC (C) n=82	+	3/46 (6,5%)	2/36 (5,6%)	0,856	0,84 (0,06-7,81)
	-	43/46 (93,5%)	34/36 (94,4%)		
MYC (N/C) n=82	+	5/46 (10,9%)	1/36 (2,8%)	0,162	0,23 (0,004-2,27)
	-	41/46 (89,1%)	35/36 (97,2%)		
TP53 n=82	+	11/42 (26,1%)	9/28 (32,1%)	0,589	1,33 (0,40-4,30)
	-	31/42 (73,8%)	19/28 (67,9%)		

Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa. 2022; (N: nuclear; C: citoplasmático; N/C: co-localização).

Para verificar a relação da expressão de MYC com a expressão de TP53, 70 casos foram analisados atendendo essa perspectiva. No subtipo intestinal, a maioria dos casos TP53(+) foram MYC(N)(-) (90,9%; 10/11), enquanto que nos tumores difusos a presença de MYC(N)(+) e TP53(+) foi observada em um pouco mais da metade dos tumores gástricos (5/9; 55,6%). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as associações de MYC(N)(+)TP53(+) dentro de cada subtipo histológico (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência de detecção de MYC e TP53 entre os subtipos histológicos.

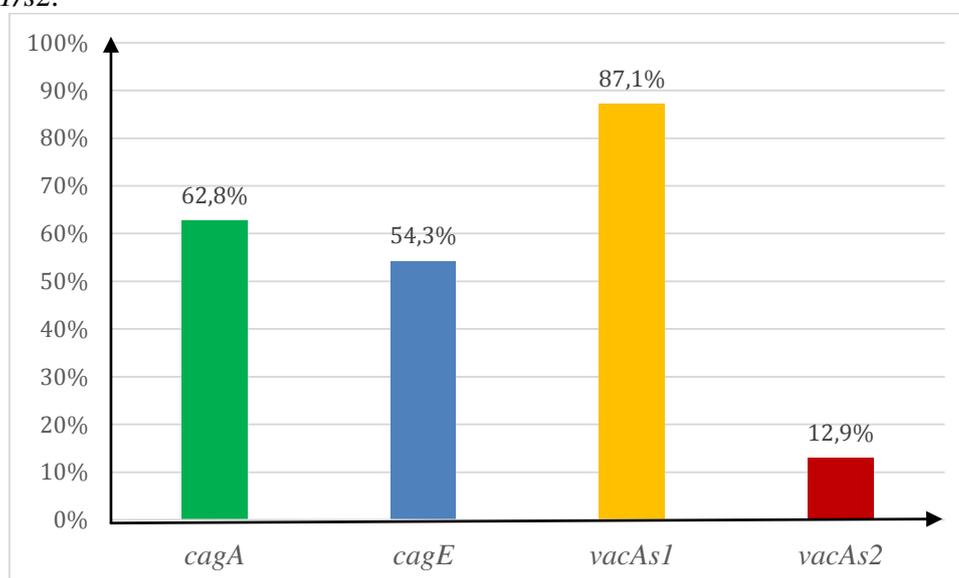
Genes		Intestinal (N=42)				Difuso (N=28)			
		TP53 (+)	TP53 (-)	TOTAL	P	TP53 (+)	TP53 (-)	TOTAL	P
MYC (N)	+	1/11 (9,1%)	9/31 (29%)	10/42	0,356	5/9 (55,6%)	10/19 (52,6%)	15/28	0,794
	-	10/11 (90,9%)	22/31 (71%)	32/42		4/9 (44,4%)	9/19 (47,4%)	13/28	
MYC (C)	+	1/11 (9,1%)	2/31 (6,7%)	3/42	0,697	0/9 (0%)	2/19 (10,5%)	2/28	0,822
	-	10/11 (90,9%)	29/31 (93,3%)	39/42		9/9 (100%)	17/19 (89,5%)	26/28	
MYC (N/C)	+	2/11 (18,2%)	3/31 (10%)	5/42	0,836	0/9 (0%)	1/19 (5,3%)	1/28	0,483
	-	9/11 (81,8%)	28/31 (90%)	37/42		9/9 (100%)	18/19 (94,7%)	27/28	

Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa. 2022; (N: nuclear; C: citoplasmático; C/N: co-localização).

7.3 Detecção de *H. pylori* e genótipos (*cagA*, *cagE* e alelos *vacA*) em ambos os subtipos histológicos

A infecção por *H. pylori*, detectada pelo gene *ureC*, esteve presente em 85,4% (70/82) dos pacientes. Dos casos *H. pylori*(+), os genes *cagA* e *cagE* foram detectados em 62,8% (44/70) e 54,3% (38/70) dos casos respectivamente, sendo cepas *vacAs1* o genótipo de *vacA* mais frequente (87,1%; 61/70) (Gráfico 3). Considerando a classificação de *Lauren* a frequência da infecção por *H. pylori* foi mais frequente no subtipo intestinal (58,6%; 41/70) do que no difuso (41,3%; 29/70).

Gráfico 3 - Frequência dos genes de *H. pylori* em relação a ilha (*cagA* e *cagE*) e alelos *vacAs1/s2*.



Fonte: Elaborado pelo autor do estudo (2022).

7.4 Correlação de *H. pylori* com os genes *MYC* e *TP53*

Analisando os casos *H. Pylori* [*UreC*(+)] com a expressão dos marcadores estudados, 67 casos foram analisados atendendo essa perspectiva. Foi observado que a maioria dos casos *TP53*(+) foram *MYC*(N)(-) (81,8%; 9/11), mantendo a associação inversa observada na amostra geral. Entretanto, quando se considera os subtipos histológicos observa-se que essa associação negativa é uma característica dos tumores intestinais, enquanto que nos tumores difusos, uma fração relevante dos casos (62,5%) foram *TP53*(+)*MYC*(N) (+) (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequência da expressão de MYC e TP53 entre os subtipos histológicos dos casos *H. pylori* positivos.

Genes		Intestinal (N=40)			Difuso (N=27)		
		TP53 (+)	TP53 (-)	P	TP53 (+)	TP53 (-)	P
MYC (N)	+	2/11 (18,2%)	11/29 (37,9%)	0,416	5/8 (62,5%)	11/19 (57,9%)	0,824
	-	9/11 (81,8%)	18/29 (62,1%)		3/8 (37,5%)	8/19 (42,1%)	
MYC (C)	+	1/11 (9,1%)	3/29 (10,3%)	0,906	0/8 (0%)	1/19 (5,3%)	0,508
	-	10/11 (90,9%)	26/29 (89,7%)		8/8 (100%)	18/19 (94,7%)	

Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa. 2022; (N: nuclear; C: citoplasmático)

De fato, nas comparações entre os subtipos, observou-se uma tendência ao risco para a dupla marcação MYCN(+)TP53(+) desenvolver o subtipo difuso [$p=0,063$; OR: 5,35 (0,63-65,33)] comparados com MYC(-)TP53(-), esta que foi mais presente nos tumores intestinais (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequência das combinações de MYC e TP53 entre os subtipos histológicos dos casos *H. pylori* positivos.

Combinações	Local	Difuso n=27	Intestinal n=40	Total n=67	P	OR
MYC(+) TP53(+)	N	5	2	7	0,063	5,35 (0,63-65,33)
	C	0	1	1	1	-
MYC(+) TP53 (-)	N	11	12	23	0,273	1,96 (0,49-7,93)
	C	1	2	3	0,957	1,07 (0,01-23,95)
MYC(-) TP53(+)		3	8	11	0,788	0,80 (0,10-4,92)
MYC (-) TP53(-)		7	15	22		Ref

Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa. 2022; (N: nuclear; C: citoplasmático; Ref: referência; Ref.: Referência).

Para verificar a relação entre o genótipo de *H. pylori* (*cagA*, *cagE* e alelos *vacA*) e a expressão de MYC e de TP53, os casos foram analisados atendendo essa perspectiva. Nas análises comparativas a negatividade de MYC nuclear com a presença de *cagA* foi significativamente ($p=0,042$) mais frequente no subtipo intestinal (77%; 20/26), contrastando com uma relevante positividade de MYC nuclear (62,5%; 10/16) nos tumores difusos (Tabela 7).

Tabela 7 – Frequências da expressão de MYC e TP53 em ambos os subtipos histológicos considerando o gene *cagA* de *H. pylori*.

Genes		Intestinal (N=40)			Difuso (N=27)		
		<i>cagA</i> (+)	<i>cagA</i> (-)	P	<i>cagA</i> (+)	<i>cagA</i> (-)	P
MYC (N)	+	6/26 (23,1%)	8/14 (57,1%)	0,042	10/16 (62,5%)	6/11 (54,5%)	0,679
	-	20/26 (77%)	6/14 (42,9%)		6/16 (37,5%)	5/11 (45,5%)	
MYC (C)	+	2/26 (7,7%)	1/14 (7,1%)	1	0/16 (0%)	1/11 (9,1%)	0,847
	-	24/26(92,3%)	13/14 (92,9%)		16/16 (100%)	10/11(90,9%)	
TP53	+	7/26 (26,9%)	2/14 (14,3%)	0,605	2/16 (12,5%)	5/11 (45,5%)	0,140
	-	19/26 (73,1%)	12/14 (85,7%)		14/16 (87,5%)	6/11 (54,5%)	

Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa. 2022; (N: nuclear; C: citoplasmático).

Quando analisamos apenas os casos *H. pylori cagA*(+) observou-se que nos casos infectados com cepas *cagA*(+) e a presença de MYC(N)(+) foi significativamente mais frequente nos tumores difusos (10/17; 58,8%). Ainda, cepas *cagA*(+)MYC(N)(+) apresentaram risco aproximadamente 8x maior para o desenvolvimento desse subtipo [$p=0,006$; OR = 8,21 (1,62 – 45,52)] (Tabela 8).

Tabela 8 – Frequências da expressão de MYC e TP53 em ambos os subtipos histológicos considerando o gene *cagA*(+).

		Intestinal	Difuso	Total	P	OR
MYC (N)	+	4/27 (14,8%)	10/17 (58,8%)	14/44	0,006	8,21 (1,62-45,52)
	-	23/27 (85,2%)	7/17 (41,2%)	30/44		
MYC (C)	+	2/27 (7,4%)	0/17 (0%)	2/44	0,685	0,00 (0,00- 8,48)
	-	25/27 (92,6%)	17/17 (100%)	42/44		
MYC (C/N)	+	2/27 (7,4%)	1/17 (5,9%)	3/44	0,675	0,78 (0,01-16,26)
	-	25/27 (92,6%)	16/17 (94,1%)	41/44		
TP53	+	9/26 (34,6%)	3/16 (18,8%)	12/42	0,451	0,43 (0,06-2,27)
	-	17/26 (65,4%)	13/16 (81,2%)	30/42		

Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa. 2022; (N: nuclear; C: citoplasmático; C/N: co-localização).

Somado a isso, considerando a presença de *cagE* [*cagE*(+)], observou-se que nos casos infectados com cepas *cagE*(+) a presença de MYC(N)(+) também foi mais frequente em um pouco mais da metade dos tumores difusos (9/17; 52,9%), apesar de não apresentar diferença significativa ($p=0,130$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Frequências da expressão de MYC e TP53 em ambos os subtipos histológicos considerando o gene *cagE*.

		Intestinal	Difuso	Total	P	OR
MYC (N)	+	5/21 (23,8%)	9/17 (52,9%)	14/38	0,130	3,6 (0,74-18,24)
	-	16/21 (76,2%)	8 /17 (47,1%)	24/38		
MYC (C)	+	2/21 (9,5%)	0/17 (0%)	2/38	0,564	0,00 (0,00-6,55)
	-	19/21 (90,5%)	17/17 (100%)	36/38		
MYC (C/N)	+	2/21 (9,5%)	1/17 (5,9%)	3/38	0,678	0,59 (0,009-12,57)
	-	19/21 (90,5%)	16/17 (94,1%)	35/38		
TP53	+	8/21 (38,1%)	4/16 (25%)	12/37	0,625	0,5 (0,09-2,74)
	-	13/21 (61,9%)	12/16 (75%)	25/37		

Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa. 2022; (N: nuclear; C: citoplasmático; C/N: co-localização).

Quando consideramos a presença de *vacA*, foi observado que as cepas *vacAsI(+)*MYC(N)(+) foram significativamente mais frequentes no subtipo difuso (13/27; 48,1%), conferindo risco de aproximadamente 3x maior para o desenvolvimento desse subtipo [$p = 0,045$; OR = 3,66 (0,97 – 14,54)] (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequências da expressão de MYC em ambos os subtipos histológicos considerando alelos *vacA*.

Gene		<i>s1</i>			<i>s2</i>				
		Intestinal n=40	Difuso n=27	P	OR	Intestinal n=40	Difuso n= 27	P	OR
MYC (+)	N	13 (32,5%)	13 (48,1%)	0,045	3,66 (0,97-14,54)	1 (2,5%)	3 (11,1%)	0,857	0,75 (0,007-78,29)
	C	3 (7,5%)	1 (3,7%)	0,871	1,22 (0,02-18,72)	0 (0%)	0 (0%)	-	-
MYC (-)		22 (55%)	6 (22,2%)		Ref.	1 (2,5%)	4 (14,8%)		Ref.

Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa. 2022. (N: nuclear; C: citoplasmático; Ref: referência)

Considerando a combinação do genótipo bacteriano e os marcadores estudados (Tabela 11), foi observado uma relação estatisticamente significativa nos tumores difusos para cepas *vacAs1(+)**cagA(-)**cagE(-)* com MYC(N)(+)TP53(+) ($p=0,025$). Por outro lado, apesar da significância observada ($p=0,045$) entre cepas *vacAs1(+)**cagA(-)**cagE(+)* e ausência MYC(-)TP53(-) nos tumores difusos, o pequeno número amostral, apenas um caso, não permite considerar ou fazer inferências.

Tabela 11 - Frequência das combinações da expressão de MYC e TP53 em ambos os subtipos histológicos considerando a presença de *H. pylori* (*cagA* e *cagE*) e alelos *vacA*.

Combinação	s1 (n=58)		P	s2 (n=9)		P
	Difuso	Intestinal		Difuso	Intestinal	
MYC(+)/TP53(+) <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i>	1	3	0,349	1	0	-
MYC(+)/TP53(+) <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i>	2	0	0,025*	1	0	-
MYC(+)/TP53(-) <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i>	5	3	0,063	0	0	-
MYC(+)/TP53(-) <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i>	2	2	0,147	1	0	-
MYC(+)/TP53(-) <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i>	2	3	0,205	0	0	-
MYC(+)/TP53(-) <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i>	2	5	0,300	0	1	0,157
MYC(-)/TP53(+) <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i>	1	3	0,439	0	0	-
MYC(-)/TP53(+) <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i>	0	3	-	0	0	-
MYC(-)/TP53(+) <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i>	0	2	-	1	0	-
MYC(-)/TP53(+) <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i>	0	0	-	1	0	-
MYC(-)/TP53(-) <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i>	4	7	0,216	0	0	-
MYC(-)/TP53(-) <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i>	0	4	-	1	1	0,386
MYC(-)/TP53(-) <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i>	1	0	0,045	0	0	-
MYC(-)/TP53(-) <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i>	0	3	Ref.	1	0	ref.

Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa. 2022

8 DISCUSSÃO

Neste estudo foi analisado em uma série de adenocarcinomas gástrico a expressão de MYC e TP53 inferida pela imuno-expressão desse gene, o qual é usualmente não detectado na sua forma selvagem devido a sua meia vida curta. *MYC* e *TP53* atuam como fatores de transcrição e são envolvidos com o ciclo celular, reparo e o processo de apoptose. O MYC desregulado impõe um programa de crescimento celular, particularmente quando acompanhado pela mutação de moléculas importantes para os pontos de checagem do ciclo celular, como TP53 (GEISLER, et al., 2004; FARIA et al., 2005; ANAZETTI, et al., 2007). Assim, esse estudo foi desenvolvido para verificar a importância da expressão de MYC e TP53, bem como associação dos mesmos no CG, considerando os subtipos histológicos. Em adição, por ser a *H pylori* um fator etiológico bem estabelecido para o desenvolvimento do CG, a sua presença e seu genótipo, considerando os genes da ilha de patogenicidade *cagPAI* (*cagA*, *cagE*) e alelos de *vacA*, foram associados.

Considerando a expressão de MYC, foi observado que esta foi mais frequente no núcleo. Marcações citoplasmáticas e co-localização também foram observadas, porém, foram menos frequentes. O significado da marcação de MYC citoplasmático não é bem estabelecido, sendo raros os estudos nessa linha (YAMAMOTO, et al., 1987; FARIA, 2005). Como a série aqui apresentada possui um número muito pequeno de casos com MYC citoplasmático (5/82) não é possível fazer inferências a esse respeito. Por outro lado, a frequência significativa de MYC(N)(+) de 36,6% (30/82) está de acordo com a literatura, variando de 38,1% a 40% (ALVES, et al., 2010; KHALEGHIAN, et al., 2016; OLIVEIRA, et al., 2019). Por outro lado, a imunorreatividade de MYC foi mais frequente no subtipo difuso de *Lauren*, corroborando com os estudos de Khaleghian et al., (2016). A negatividade de MYC para tumores intestinais foi também observada no estudo do sudeste brasileiro de Oliveira, et al., (2019), entretanto em uma série do Iran, com número amostral de 50 casos, Khaleghian et al., estudo de (2015), não observou diferenças entre os subtipos estudados, mas em outro estudo de (2016) com número amostral maior verificou uma baixa positividade de MYC nos tumores intestinais (KHALEGHIAN et al., 2016), indicando a importância do número de casos analisado.

Nas análises relacionadas à expressão do supressor tumoral TP53, observou um discreto predomínio nos carcinomas do subtipo difuso, fato que pode ser justificado uma vez que a expressão aumentada de TP53 é marcador de mau prognóstico sobretudo nos tumores de tipo difuso (LIU, et al., 2001). A frequência relatada nesse estudo foi similar aos valores encontrados em classificações e em outros estudos de câncer gástrico (ANDRE, et al., 2010;

GONÇALVES, et al., 2011; CALCAGNO, et al., 2013; TAHARA et al. 2014; XU et al. 2014).

A combinação de alterações de MYC e TP53 pode definir um subconjunto de tumores em vários tipos de câncer (LEISERSON, ET AL, 2016), assim a positividade/negatividade foram combinadas. Nessas associações foi observado que, nos tumores intestinais a combinação com maior frequência foi de TP53(+)MYC(N)(-), enquanto que nos tumores difusos a presença de TP53(+)MYC(N)(+) foi a combinação mais observada. O comportamento de MYC associado a TP53 parece ter um importante papel na via de ativação dos tumores difusos, contribuindo para o avanço da progressão tumoral. Por outro lado, nos tumores intestinais essa dupla alteração (mutação e aumento de expressão; respectivamente) parece acontecer predominantemente associado a expressão do TP53 ou independente de ambos marcadores.

Na série estudada, a presença de *H. pylori* esteve frequente na maioria dos casos (85,4%; 70/82), o que está em acordo com outros estudos (ASHOUR, et al., 2002; ANDRÉ, et al., 2010; LIMA, et al., 2011). Como esperado, as frequências dos genes *cagA* e *cagE* estiveram acima de 50% nos casos analisados (ALVES, et al., 2010; GHOLIZADETOBNAGH, et a., 2017; BOONYANUGOMOL, et al., 2020; DOS SANTOS, et al., 2020). Em relação aos alelos de *vacA*, cepas *vacAs1* foi a predominante (87,1%; 61/70), sendo observada frequências similares na literatura (LIMA, et al., 2011; DOS SANTOS, et al., 2020). Essa alta frequência se deve ao caráter patogênico de *s1*, funcionalmente associadas à atividade vacuolizante in vitro e em contraste, *vacA* do tipo *s2* é invariavelmente não-vacuolante (ATHERTON, et al., 1995; LETLEY, et al., 2003; OLIVARES e GISBERT, 2006).

Vários relatos observam uma expressão de MYC aumentada em lesões gástricas pré-cancerosas associadas à infecção por *Helicobacter pylori* (CALGAGNO et al., 2008; GEORGE et al., 2020). Somado a isso, *H. pylori* também parece antagonizar a função de supressão tumoral de TP53 (WEI, et al., 2010; ANDO, et al., 2015). Quanto avaliamos MYC e TP53 e a presença de *H. pylori*, não houve diferença da expressão dos marcadores estudados quando a bactéria não foi considerada, o que é esperado pelo alto número de casos da infecção. Quando os tumores foram combinados com seus subtipos histológicos, foi observada uma tendência para a associação MYC(+)TP53(+), confirmando as observações.

Considerando a presença de *cagA* no genótipo bacteriano, a significância ($p=0,006$) de *cagA*(+) com MYC(N)(-) no subtipo intestinal (23/27; 85,2%) contrasta com a presença de MYC(N)(+) (10/17; 58,8%) nos tumores difuso, indicando vias carcinogênicas diferentes nesses tumores dependentes do genótipo bacteriano (Tabela 7). Para isso, é possível que fatores de virulência de *H. pylori*, como *cagA*, induzam mutações em genes reguladores

do ciclo celular e deficiências nos mecanismos de reparo (AHN & LEE, 2015). Em uma abordagem proteômica, foi observado que a entrada de *CagA* no hospedeiro resulta em sua associação com ASPP2, que após essa interação, este recruta seu alvo natural TP53 e inibe sua função apoptótica. Somado a isso, *cagA* também parece induzir a expressão aberrante de AID via NF- κ B nas células epiteliais gástricas do hospedeiro, provocando assim uma alta frequência de mutação em TP53 (MATSUMOTO et al. 2007; YONG, et al, 2015). A indução da expressão de TP53 pela infecção por *H. pylori* foi observada em gastrite crônica e lesões pré-neoplásicas, principalmente aquelas associadas a cepas *cagA* positivas (LI, et al., 2016). Em um estudo *in vivo* e *in vitro*, Wei, et al., (2015) observou que cepas *H. pylori*(+) expressam altos níveis de *cagA* e estão mais associadas ao risco de câncer gástrico, ao suprimirem mais fortemente TP53 em comparação com as cepas menos virulentas, sugerindo que a tumorigênese associada à infecção por *H. pylori* pode está associada à inibição da proteína TP53 por *CagA* (WEI, et al., 2015).

Somado a isso, as cepas *vacAsI*(+)MYC(N)(+) foram significativamente mais frequentes nos tumores difusos, quando combinadas com *vacAsI*(+)MYC(-). Diante das diferentes vias de sinalização celular, a β -catenina por exemplo, que é ativada por *CagA* através da via JAK-STAT3, inicia a expressão gênica para a proliferação celular. O peptidoglicano de *H. pylori* e a relevância de *vacA* se dá pelo fato de ambos potencializarem a sinalização de PI3K-AKT, e assim promoverem a migração de células, aumento da proliferação e redução da apoptose. *vacA*, *cagA* e o peptidoglicano da bactéria se coordenam podendo ativar a cascata de sinalização de NF- κ B e promovendo inflamação (NAKAYAMA, et al., 2009; ZHAO, et al., 2020).

A presença de *cagE*(+)MYC(N)(+) foi mais frequente nos tumores difusos, contrastando com *cagE*(+) e MYC(N)(-) no subtipo intestinal, resultados que indicam também vias diferentes, apesar de não significativo. A importância de *cagE* pode ser observada através de sua frequência no câncer gástrico (ERZIN, et al., 2006; KATHONN, et al., 2017). No presente estudo, considerando os casos *H. pylori* positivos, *cagA* esteve presente em 62,8% (44/70), enquanto *cagE* esteve presente em 54,3% (38/70). Embora *cagA* tenha apresentado uma maior frequência de casos, *cagE* também se destaca em presença. Além disso, *cagE* tem sido sugerido como um bom marcador de patogenicidade (LIMA, et al., 2011).

9 CONCLUSÃO

- No subtipo intestinal, observou-se uma associação significativa entre a negatividade da expressão nuclear de MYC e a presença do gene *cagA*, indicando que nesses tumores a via tumorigênica por *H. pylori* não ocorre por meio da expressão de MYC;
- Por outro lado, nos tumores difusos, a via carcinogênica associada à expressão de TP53, e possivelmente influenciada por *H. pylori cagA(+)*, parece ocorrer provavelmente por meio da proteína MYC;
- Mais estudos são necessários, tanto correlacionando os achados com mais variantes, quanto aumentando o número amostral de pacientes.

REFERÊNCIAS

- ANDRÉ, A. R.; FERREIRA, M. V.; MOTA, R. M., et al. **Gastric adenocarcinomas and *helicobacter pylori*: correlation with p53 mutation and p27 immunoexpression.** *Cancer Epidemiol.*; 34: 618-25. 2010.
- AHN, H. J. E.; LEE, D. S. ***Helicobacter pylori* na carcinogênese gástrica.** *World J. Gastrointestinal.* *Oncol.* 7, 455-465. doi: 10.4251/wjgo.v7.i12.455. 2015.
- ALDIBERT, C.; BUROCOA, C.; JANVIER, B.; FAUCHERE, J. L. **Implication of the structure of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion.** *Infect Immun.* V. 69, p 1625-1629, 2001.
- ANDO, K.; OKI, E.; SAEKI, H.; YAN, Z.; TSUDA, Y.; HIDAKA, G.; KASAGI, Y.; OTSU, H.; KAWANO, H.; KITAO, H.; MORITA, M.; MAEHARA, Y. **Discrimination of p53 immunohistochemistry-positive tumors by its staining pattern in gastric cancer.** *Cancer Med.* 2015; 4 (1):75-83.
- ATHERTON, J.; CAO, P.; PEEK, R. J.; TUMMURU, M.; BLASER, M.; COVER, T. **Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration.** *J Biol Chem*; 270: 17771–17777. 1995. [PMID: 7629077]
- AUBREY, B. J.; STRASSER, A.; KELLY, G. L. **Tumor-suppressor functions of the tp53 pathway.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 6:pii: a026062.
- BANIAK, N.; SENGER, J. L.; AHMED, S.; KANTHAN, S. C.; KANTHAN, R. **Gastric biomarkers: a global review.** *World J Surg Oncol* 2016; 14:212.
- BATS, S. H., et al. **Biochemical characterization of the *Helicobacter pylori* Cag Type 4 Secretion System protein CagN and its interaction partner CagM.** *International Journal of Medical Microbiology*, v. 308, n. 4, p. 425–437, 2018.
- BAUER, B.; MEYER, T. F. **The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* and its association with gastric cancer and ulcer disease.** *Ulcers*, v. 2011, p. 1–23, 2011.
- BLASER, M. J.; MUSSER, J. M.; BERG, D. E. **Bacterial polymorphisms *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease.** *Journal Clinical Investigation.*, v. 107, n. 7, p. 767– 773, 2001.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A.; **Global Cancer Statistic 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 cancers in 185 Countries.** *Ca Cancer J Clin*; 0:1-31. 2018.
- BRESCIANI, C.; PEREZ, R. O.; GAMA-RODRIGUES, J. **Familial gastric cancer.** *Arq Gastroenterl.*, v. 40(2), p. 114-7, 2003.
- BURKITT, M. D.; DUCKWORTH, C. A.; WILLIAMS, J. M., et al. ***Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: Insights from in vivo and ex vivo models.** *Disease Models and Mechanisms*, v. 10, n. 2, p. 89–104, 2017.

- BURUCOA, C.; AXON, A. **Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection.** *Helicobacter*. v. 22, p. 1–5, 2017.
- BUSUTILL, R. A.; ZAPPAROLI, G. V.; HAUPT, S., et al. **Role of p53 in the progression of gastric cancer.** *Oncotarget*. 2014. Sept. 3 (Epub)
- BUTI, L.; SPOONER, E.; VAN DER VEEN, A. G., et al. ***Helicobacter pylori* Cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host.** *Proc Natl Sci USA.*; 108: 9238-43. 2011.
- CALCAGNO, D. Q.; LEAL, M. F.; ASSUMPÇÃO, P. P.; SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R. **MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis.** *World Journal of Gastroenterology*. v. 14, p. 5962, 2008.
- CALCAGNO, D. Q.; LEAL, M. F.; SEABRA, A. D.; KHAYAT, A. S.; CHEN, E. S.; DEMACHKI, S.; ASSUMPCAO, P. P.; FARIA, M. H.; RABENHORST, S. H. B.; FERREIRA, M. V.; DE ARRUDA CARDOSO SMITH, M; BURBANO, R. R. **Interrelationship between chromosome 8 aneuploidy, C-MYC amplification and increased expression in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma.** *World J Gastroenterol*.12: 6207-6211. 2006.
- CALCAGNO, D. Q.; FREITAS, V. M.; LEAL, M. F.; DE SOUZA, C. R.; DEMACHKI, S.; MONTENEGRO, R.; ASSUMPÇÃO, P. P.; KHAYAT, A. S.; SMITH, M. A. C.; DOS SANTOS, A. K.; BURBANO, R. R. **MYC, FBXW7 and TP53 copy number variation and expression in gastric cancer.** *BMC Gastroenterol.*, vol. 13, no. 1, p. 141, 2013.
- CAMILO, V.; SUGIYAMA, T.; TOUATI, E. **Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection.** *Helicobacter* 22:1–6. 2017.
- CHAN, A.O.; **E-cadherin in gastric cancer.** *World J Gastroenterol*. 12, 199-203. 2006.
- CHAUHAN, N.; TAY, A. C. Y.; MARSHALL, B. J., et al. ***Helicobacter pylori* VacA, a distinct toxin exerts diverse functionalities in numerous cells: An overview.** *Helicobacter*, v. 24, n. 1, p. 1–9, 2019.
- CHMIELA, M. et al. **Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer.** *World Journal of Gastroenterology*, v. 23, n. 9, p. 1521–1540, 2017.
- CREW, K. D.; NEUGUT, A. I. **Epidemiology of gastric cancer.** *World J Gastroenterol*. 2006; 21, 12:354-62
- CORREIA, M.; MACHADO, J. C.; RISTIMÄKI, A. **Basic aspects of gastric cancer.** *Helicobacter*. 2009; 14, 1: 36-40.
- CORREA, P. **Perspectives in Cancer Research A Human Model of Gastric Carcinogenesis**1. *Nutrition*, n. 13, p. 3554–3560, 1988.
- COVACCI, A.; RAPPUOLI, R. **Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cel.** *J Exp Med*. V. 191, p. 587-592, 2000.
- DA COSTA, D. M.; PEREIRA, E. S.; RABENHORST, S. H. **What exists beyond *cagA* and *vacA*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases.** *World J Gastroenterol*. 2015 Oct

7;21(37):10563-72. doi: 10.3748/wjg.v21.i37.10563. PMID: 26457016; PMCID: PMC4588078.

DEN HOED, C. M.; KUIPERS, E. J. **Gastric Cancer: How Can We Reduce the Incidence of this Disease?** *Curr Gastroenterol Rep*. 2016 Jul;18(7):34. doi: 10.1007/s11894-016-0506-0. PMID: 27184043; PMCID: PMC4868864.

DE SOUZA, C. R.; LEAL, M. F.; CALCAGNO, D. Q.; COSTA SOZINHO, E. K.; BORGES, B. N.; MONTENEGRO, R. C.; DOS SANTOS, A. K.; DOS SANTOS, S. E.; RIBEIRO, H. F.; ASSUMPÇÃO, P. P.; DE ARRUDA CARDOSO SMITH, M.; BURBANO, R. R. **Desregulação do MYC no câncer gástrico e suas implicações clínico-patológicas.** *PLoS Um*. 2013 Maio 22;8(5): e64420. DOI: 10.1371/journal.pone.0064420. PMID: 23717612; PMCID: PMC3661519.

DE VRIES, A. C. et al. **Gastric Cancer Risk in Patients With Premalignant Gastric Lesions: A Nationwide Cohort Study in the Netherlands.** *Gastroenterology*, v. 134, n. 4, p. 945–952, 2008.

DING, S.; O'HARA, A. M.; DENNING, T. L.; DIRDEN-KRAMER, B.; MIFFLIN, R. C.; REYES, V. E.; RYAN, K. A.; ELLIOTT, S. N.; IZUMI, T.; BOLDOGH, I.; MITRA, S.; ERNST, P. B.; CROWE, S. E. ***Helicobacter pylori* and H2O2 Increase AP Endonuclease-1/Redox Factor-1 in Human Gastric Epithelial Cells.** *Gastroenterology*, 2004; 127: 845-858.

DOMINGO, D; ALARCO, N. T.; PRIETO, N.; SANCHEZ, I.; LOPEZ-BREA, M. **status *cagA* e *vacA* de isolados clínicos espanhóis de *Helicobacter pylori*.** *J Clin Microbiol* ;37:2113-4. 1999.

DOS SANTOS, P. E.; MAGALHÃES A. L.; DE QUEIROZ, B. V.; DA SILVA JUNIOR, W. J., et al. ***Helicobacter pylori cagE, cagG, and cagM* can be a prognostic marker for intestinal and diffuse gastric cancer.** *Infect Genet Evol*. 2020.

ENDO, Y.; SAKATA, K.; TAMURA, G.; OHMURA, K.; AJIOKA, Y.; WATANABE, H.; MOTOYAMA, T. **Cellular phenotypes of differentiated-type adenocarcinomas and precancerous lesions of the stomach are dependent on the genetic pathways.** *J Pathol*;191:257-63, 2000.

ERZIN, Y.; KOKSAL, V.; ALTUN, S. et al. **Prevalência dos genótipos *vacA, cagA, cagE, iceA, babA2* do *Helicobacter pylori* e correlação com o resultado clínico em pacientes turcos com dispepsia.** *Helicobacter* 2006;11:574–80.

FARIA, M. H. G. **Estudo Imuno-histoquímico das Alterações Moleculares nos Astrocitoma: Vias Tumorigênicas, Alvos Terapêuticos e Indicadores de Resistência.** 2005. 168 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

FAN, X. M.; WONG, B. C.; WANG, W. P.; ZHOU, X. M.; CHO, C. H.,; YUEN, S. T.; LEUNG, S. Y; LIN, M. C.; KUNG, H. F.; LAM, S. K. **Inhibition of proteasome function induced apoptosis in gastric cancer.** *Int J Cancer*. 2001 Aug 15;93(4):481-8.

FOEGEDING, N. J.; CASTON, R. R.; MCCLAIN, et al. **An overview of *Helicobacter pylori* VacA toxin biology.** *Toxins*, v. 8, n. 6, p. 1–21, 2016.

FENOGLIO-PREISER, C. M.; WANG, J. STEMMERMENN, G. N.; NOFFSINGER, A. **TP53 and gastric carcinoma: a review.** Hum Mutat 2003; 21(3): 258-70.

FRADIQUE, C.; SILVA, G.; PUPO, A., et al. **Mutant p53 can support decision making in the treatment of gastric cancer.** Revista Portuguesa de Cirurgia (2015) (34):13-26.

FERNANDEZ, P. C.; FRANK, S. R.; WANG, L.; SCHROEDER, M.; LIU, S.; GREENE, J.; COCITO, A.; AMATI, B. **Genomic targets of the human c-MYC protein.** Genes Dev. 17 : 1115–1129, 2003.

FOSTER, G. D. ; TWEEL, D. **Plant gene isolation** ed., Principles and practice of Clinical Bacteriology Second ed., England: John Wiley & Sons; 1996.

GONÇALVES, A. R.; CARNEIRO, A. J.; MARTINS, I.; DE FARIA, P. A.; FERREIRA, M. A.; DE MELLO, E. L; FOGAÇA, H. S.; ELIA, C. C.; DE SOUZA, H. S. **Prognostic significance of p53 protein expression in early gastric cancer.** Pathol Oncol Res. 2011 Jun;17(2):349-55. doi: 10.1007/s12253-010-9333-z. Epub 2010 Nov 30. PMID: 21116760.

GEORGE, S.; LUCERO, Y.; TORRES, J. P.; LAGOMARCINO, A. J.; O'RYAN, M. **Gastric Damage and Cancer-Associated Biomarkers in *Helicobacter pylori*-Infected Children.** Front Microbiol. 2020;11:90. Published 2020 Feb 12.

HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. **p53 and human cancer: the first ten thousand mutations.** Adv Cancer Res 2000, 77: 81-137.

HARTGRINK, H. H.; JANSEN, E. P. M.; VAN GRIEKEN, N. C. T.; VAN DE VELDE, C. J. H. **Gastric cancer.** Lancet 2009; 374: 477–90.

HANSEN, L. M.; DEKALB, D. J.; CAI, L. P., et al. **Identification of Pathogenicity Island Genes Associated with Loss of Type IV Secretion Function During Murine Infection with *Helicobacter pylori*.** Infection and Immunity. v. 20, n. 6, p. 19, 2020

HUSSAIN, S. A.; HAMID, S. ***Helicobacter pylori* in humans: Where are we now?** Adv. Biomed. Res, 2014; 3: 63.

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

ILIC, M. & ILIC, I. **Epidemiology of stomach cancer.** World Journal of Gastroenterology, 28(12):1187-1203. 2022.

Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva, **INCA.** INCA, 2018.

KHATOON, J.; PRASAD, K. N.; PRAKASH RAI, R.; GHOSHAL, U. C.; KRISHNANI, N. **Associação de heterogenicidade da ilha de patogenicidade de *Helicobacter pylori cag* com úlceras pépticas e câncer gástrico.** Br J Biomed Sci. 2017 Jul;74(3):121-126. DOI: 10.1080/09674845.2017.1278887. Epub 2017 2 de junho. Errata em: Br J Biomed Sci. 2017 Jul;74(3):i. PMID: 28571523.

KHALEGHIAN, M.; JAHANZAD, I.; SHAKOORI, A.; EMAMI RAZAVI, A.; AZIMI, C. **Association Between Amplification and Expression of C-MYC Gene and**

Clinicopathological Characteristics of Stomach Cancer. Iran Red Crescent Med J. 2016 Jan 1;18(2):e21221. doi: 10.5812/ircmj.21221. PMID: 27175302; PMCID: PMC4863201.

KHALEGHIAN, M.; JAHANZAD, I.; SHAKOORI, A.; ARDALAN, F. A.; AZIMI, C. **Study of C-MYC amplification and expression in Iranian gastric cancer samples using CISH and IHC methods.** Adv Biomed Res. 2015 May 29;4:116).

KUTTER, S.; BUHRDORF, R.; HASS, J., et al. **Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies.** Journal of Bacteriology, v. 190, n. 6, p. 2161–2171, 2008.

LAGE, A. P.; GODFROID, E.; FAUCONNIER, A.; BURETTE, A.; BUTZLER, J. P.; BOLLEN, A.; GLUPCZYNSKI, Y. **Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens.** J Clin Microbiol. 1995 Oct;33(10):2752-6. doi: 10.1128/jcm.33.10.2752-2756.1995. PMID: 8567918; PMCID: PMC228568.

LAURÉN, P. **The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification.** Acta Pathol Microbiol Scand, v. 64, p. 31–49, 1965.

LI, L. T.; JIANG, G.; CHEN, Q. E.; ZHENG, J. N. (2015). **Ki67 é um alvo molecular promissor no diagnóstico de câncer (revisão).** Mol. Med. Rep. 11, 1566–1572. doi: 10.3892/mmr.2014.2914.

LIU, X. P.; TSUSHIMI, M.; KAWAUCHI, S., et al. **Expression of p21 and p53 proteins in gastric carcinoma: its relationships with cell proliferation activity and prognosis.** Cancer Lett. 2001; 170: 183-89.

LIMA, V. P.; SILVA-FERNANDES, I. J.; ALVES, M. K.; RABENHORST, S. H. **Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in Brazilian's patients: an association with histopathological parameters.** Cancer Epidemiol. 2011.

MATSUNARI, O.; SHIOTA, R.; SUZUKI, R., et al. **Association between *Helicobacter pylori* virulence factors and gastroduodenal diseases in Okinawa, Japan.** Journal of Clinical Microbiology, v. 50, n. 3, p. 876–883, 2012.

MCDONALD, A. M.; SARFATI, D.; BAKER, M. G., et al. **Trends in *Helicobacter pylori* infection among Māori, Pacific, and European Birth cohorts in New Zealand.** Helicobacter. v. 20, n; 2, p. 139, 145, 2015

MCCLAIN, M.; BECKETT, A. C.; COVER, T. L. ***Helicobacter pylori* vacuolating toxin and gastric cancer.** Toxins (Basel) 9:316. 2017.

MILLER, D. M., et al. **c-Myc and cancer metabolism.** Clin Cancer Res. v. 18, n. 20, p .5546-5553, 2012.

MISRA, V.; PANDEY, R.; MISRA, S. P.; DWIVEDI, M. ***Helicobacter pylori* and gastric cancer: Indian enigma.** World J Gastroenterol, 2014; 20: 1503-1509.

MILNE, A. N.; SITARZ, R.; CARVALHO, R.; CARNEIRO, F.; OFFERHAUS, G. J. **Early**

onset gastric cancer: on the road to unraveling gastric carcinogenesis. *Curr Mol Med* 2007; 7: 15- 28.

MOBLEY, H. L. T.; MENDZ, G. L.; HAZELL, S. L. editores. *Helicobacter pylori: Fisiologia e Genética*. Washington (DC): ASM Press; 2001. PMID: 21290711.

MURATA-KAMIYA, N. et al. *Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the β -catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells.* *Oncogene*, v. 26, n. 32, p. 4617–4626, 2007.

NAGASE, L.; HAYASHI, T.; SENDA, T. et Al. **Dramatic increase in SHP2 binding activity of *Helicobacter pylori* Western CagA by EPIYA-C duplication: Its implications in gastric carcinogenesis.** *Scientific Reports*, v. 5, n. October, p. 1–13, 2015.

NAKAYAMA, M.; HISATSUNE, J.; YAMASAKI, E.; ISOMOTO, H.; KURAZONO, H.; HATAKEYAMA, M. et al. **Inibição de GSK3 induzida por *Helicobacter pylori* VacA através da via de sinalização PI3K/Akt.** *J Biol Chem*. 2009;284:1612–9.

NCBI. **Gene: MYC proto-oncogene, Bhlh transcription fator [Homo sapiens (human)].** 2018.

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

OLIVEIRA, L. A.; OSHIMA, C. T. F.; SOFFNER, P. A., et al. **The canonical wnt pathway in gastric carcinoma.** *Arq Bras Cir Dig*. 2019 Jan 7;32(1):e1414. doi: 10.1590/0102-672020180001e1414. PMID: 30624523; PMCID: PMC6323632.

PACCHIANI, N.; CENSINI, S.; BUTI, L.; COVACCI, A. **Echoes of a distant past: The cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*.** *Cold Spring Harb. Perspect. Med*, 2013.

PAKSERESHT, M.; FORMAN, D.; MALEKZADEH, R., et al. **Dietary habits and gastric cancer risk in north-west Iran.** *Cancer Causes Control* 2011; 22:725-36.

PINHEIRO JÚNIOR, A. A.; GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M. *Helicobacter pylori*. *Hig. Aliment.*, [S.l.], v. 18, n. 120, p. 19-24, maio 2004.

OKI, E.; ZHAO, Y.; YOSHIDA, R., et al. **The difference in p53 mutations between cancers of the upper and lower gastrointestinal tract.** *Digestion* 2009; 79 Suppl 1:33-9.

POOROLAJAL, J. et al. **Risk factors for stomach cancer: a systematic review and metaanalysis** *Epidemiology and Health* Korean Society of Epidemiology. 2020.

RAMOS, M. F. K. P.; PEREIRA, M. A.; SAGAE, V. M. T., et al. **Gastric cancer in young adults: a worse prognosis group?.** *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 46(4):e20192256. 2019.

RHEE, K. H.; PARK, J. S.; CHO, M. J. *Helicobacter pylori*: **Bacterial strategy for incipient stage and persistent colonization in human gastric niches.** *Yonsei Medical Journal*, v. 55, n. 6, p. 1453–1466, 2014.

RUGGIERO, P. *Helicobacter pylori* infection: **what's new.** *Curr Opin Infect Dis*. 2012; 25:

337-44 23

SADEGHI, R. N.; DAMAVAND, B.; VAHEDI MOHSEN, M. et al. **Detection of p53 common intron polymorphisms in patients with gastritis lesions from Iran.** Asian Pacific J Cancer Prev 2013; 14:91-6.

SAHA, A. K.; MAITRA, S.; HAZRA, S. C. **Epidemiology of gastric cancer in the gangetic areas of west bengal.** ISRN Gastroenterol 2013:823-483.

SITARZ, R.; SKIERUCHA, M.; MIELKO, J., et al. **Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment.** Cancer Management and Research, 239-248. 2018.

SHIMIZU, T., et al. **Acúmulo de mutações somáticas em TP53 no epitélio gástrico com infecção por *Helicobacter pylori*.** Gastroenterology 2014, 147(2): 407-417.e3

SOZZI, M. et al. **Heterogeneity of cag genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection.** Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v. 146, n. 5, p. 262– 270, 2005.

SUERBAUM, S. & MICHETTI, A. ***Helicobacter pylori* infection.** N Engl J Med. v. 347, n.15, p.1174-1186, 2002.

SUZUKI, R. B.; LOPES, R. A. B.; LOPES, G. A. C., et al. **Low *Helicobacter pylori* primary resistance to clarithromycin in gastric biopsy specimens from dyspeptic patients of a city in the interior of São Paulo, Brazil.** BMC Gastroenterology, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2013.

TANG, et al., 2005. **基因的改变** NIH Public Access. Bone, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

TAHARA, T.; SHIBATA, T.; OKAMOTO, Y.; YAMAZAKI, J., et al. **Mutation spectrum of TP53 gene predicts clinicopathological features and survival of gastric cancer.** *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):42252-60. doi: 10.18632/oncotarget.9770. PMID: 27323394; PMCID: PMC5173132.

TAKAHASHI-KANEMITSU, A.; KNIGHT, C. T.; HATAKEYAMA, M. **Molecular anatomy and pathogenic actions of *Helicobacter pylori* CagA that underpin gastric carcinogenesis.** Cellular and Molecular Immunology, v. 17, n. 1, p. 50–63, 2020.

TAMURA, G. **Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer.** World J Gastroenterol. 2006 14;12:192-8.

VINAGRE, I. D. F.; QUEIROZ, A. L.; SILVA JUNIOR, M. R., et al. **Infecção pelo *Helicobacter pylori* em pacientes com diferentes doenças gastrointestinais do Norte do Brasil.** Arquivos de Gastroenterologia, v. 52, n. 4, p. 266–271, 2015.

VAUHKONEN, M.; VAUHKONEN, H.; SIPPONEM P. **Pathology and molecular biology of gastric cancer.** Best Pract Res Clin Gastroenterol 2006; 20, 651-674.

WATANABE, M. et al. **Development of gastric cancer in nonatrophic stomach with highly active inflammation identified by serum levels of pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody together with endoscopic rugal hyperplastic gastritis.** International Journal of Cancer, v. 131, n. 11, p. 2632–2642, 2012.

- WEI, J.; NAGY, T. A.; VILGELM, A.; ZAIKA, E., et al. **Regulation of p53 tumor suppressor by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells.** Gastroenterology. 2010 Oct;139(4):1333-43. doi: 10.1053/j.gastro.2010.06.018. Epub 2010 Jun 12. PMID: 20547161; PMCID: PMC2949494.
- WEI, J.; NOTO, J. M.; ZARKER, E. **Bacterial CagA protein induces degradation of p53 protein in a p14ARF-dependent manner.** Gut.2014.Jul 20 (Epub).
- XU, H. Y.; XU, W. L.; WANG, L. Q.; CHEN, M. B.; SHEN, H. L. **Relationship between P53 status and response to chemotherapy in patients with gastric cancer: a metaanalysis.** PLoS One 2014; 9:e95371.
- YANG, Y.; DENG, C. S.; PENG, J. Z.; WONG, B. C.; LAM, S. K.; XIA, H. H. **Effect of *Helicobacter pylori* on apoptosis and apoptosis related genes in gastric cancer cells.** Mol Pathol 2003; 56: 19-24.
- YAHIRO, K.; HIRAYAMA, T.; MOSS, J., et al. **New insights into VacA intoxication mediated through its cell surface receptors.** Toxins, v. 8, n. 5, p. 1–12, 2016.
- YONG, X.; TANG, B.; LI, B. S.; XIE, R.; HU, C. J.; LUO, G.; QIN, Y.; DONG, H.; YANG, S. M. ***Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways.** Cell Commun Signal. 2015 Jul 11;13:30. doi: 10.1186/s12964-015-0111-0. PMID: 26160167; PMCID: PMC4702319.
- YOUSEFI, B.; MOHAMMADLOU, M.; ABDOLLAHI, M., et al. **Epigenetic changes in gastric cancer induction by *Helicobacter pylori*.** J Cell Physiol. 2019 Dec;234(12):21770-21784.
- ZHAO, Y. ; ZHANG, J. ; CHENG, A. S. L., et al. **Câncer gástrico: genoma danificado por insetos.** *Oncogene* **39** , 3427–3442 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1241-4>.
- ZHANG, G. X.; GU, Y. H.; ZHAO, Z. Q., et al. **Coordinate increase of telomerase activity and c-Myc expression in *Helicobacter pylori* associated gastric diseases.** World J Gastroenterol 2004; 10: 1759-1762