

Análise das alterações genéticas e epigenéticas dos tumores gástricos infectados por *Helicobacter pylori* e Vírus Epstein-Barr

ADRIANA CAMARGO FERRASI

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini

Co-orientadora: Dra. Nídia Alice Pinheiro

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

**Rio Claro – SP
2007**

616.994 Ferrasi, Adriana Camargo
F378a Análise das alterações genéticas e epigenéticas dos tumores gástricos infectados por *Helicobacter pylori* e Vírus Epstein Barr / Adriana Camargo Ferrasi. – Rio Claro : [s.n.], 2007
68 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Maria Inês de Moura Campos Pardini

Co-orientador: Nídia Alice Pinheiro

1. Câncer. 2. Câncer gástrico. 3. Metilação. 4. Instabilidade de microssatélites. I. Título.

À Deus,
pela luz de minha vida.

À minha família,
por apoiar e aceitar minhas opções

Ao meu esposo Emerson:

Você é meu ponto de partida e regresso. Compartilhou comigo este sonho me incentivando a prosseguir, fossem quais fossem os obstáculos. Muito Obrigada.
Te amo!

Meus sinceros agradecimentos:

A todos os pacientes que em meio à dificuldade vivida, souberam contribuir para o progresso científico que certamente ajudará a outrem.

À minha querida orientadora **Profa. Dra. Maria Inês de M. C. Pardini (MIP)**, pela dedicada orientação, incentivo e, acima de tudo, pela amizade e compreensão em todos os momentos em que precisei.

À **Dra. Nídia Alice Pinheiro**, por dividir comigo os seus conhecimentos e me co-orientar no desenvolvimento desse trabalho.

À **Profa. Dra. Silvia Helena Barém Rabenhorst**, pelo interesse e disposição em me ajudar. Pelo fundamental auxílio na discussão dos meus resultados. Sinto-me privilegiada e muito honrada pela oportunidade de passar alguns dias sob sua orientação e “guarda” na cidade de Fortaleza-CE.

À **Dra. Otávia Luisa Caballero**, pela fundamental ajuda na discussão dos meus resultados.

Ao **Fabício Carvalho** pela ajuda nas análises de MSI e companhia durante a minha estadia em São Paulo.

Ao **Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer**.

À **Dra. Maria Marquesan Rodrigues**, pela colaboração nas análises histopatológicas e disposição em ajudar.

Às minhas grandes amigas **Rejane e Rosana** pelo incentivo e companheirismo de todos esses anos.

À querida **Marcinha Pena**, pela ajuda e dedicação em todos os momentos em que precisei. Muito obrigada!!

Às queridas amigas **Juliana, Camila, Chiara, Jú-Toxa, Cristiane e Patrícia**, pelo companheirismo e pelos almoços no “Japonês”.

Ao **Faberson Augusto Ferrasi**, pelo apoio e auxílio naqueles detalhezinhas no *layout* que só nós dois sabemos que fazem diferença!

Á **todos os amigos do Hemocentro**, em especial aos do Laboratório de Biologia Molecular pelo apoio, companheirismo, tolerância e compartilhamento de conhecimentos.

Aos amigos do **Laboratório de Genética Molecular – LABGEM**, pelo carinho com que me receberam.

À **Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanelli Cristofolletti**, nossa coordenadora, pelo empenho e dedicação à finalização desse trabalho.

Aos funcionários da **Seção de Pós Graduação** da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro e em especial a querida **Eloísa** pela paciência e dedicação aos alunos.

Ao **Hemocentro de Botucatu – Faculdade de Medicina – UNESP** que possibilitou o desenvolvimento experimental desta pesquisa.

Ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro que permitiu a minha permanência no laboratório.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho, a minha sincera e eterna gratidão.

POEMA DA PAZ

O dia mais belo? HOJE...
A coisa mais fácil? EQUIVOCAR-SE ...
O maior obstáculo? O MEDO...
O maior erro? ABANDONAR-SE ...
A raiz de todos os males? O EGOÍSMO...
A distração mais bela? O TRABALHO ...
A pior derrota? O DESALENTO...
Os melhores professores? AS CRIANÇAS ...
A primeira necessidade? COMUNICAR-SE ...
O mais feliz a se fazer? SER ÚTIL AOS DEMAIS...
O maior mistério? A MORTE...
O pior defeito? O MAU HUMOR...
A pessoa mais perigosa? A MENTIROSA...
O pior sentimento? O RANCOR...
O presente mais belo? O PERDÃO...
O mais imprescindível? A ORAÇÃO...
O caminho mais rápido? O CORRETO...
A sensação mais grata? A PAZ INTERIOR ...
A expressão mais eficaz? O SORRISO...
O melhor remédio? O OTIMISMO...
A maior satisfação? O DEVER CUMPRIDO...
A força mais potente do Universo? A FÉ...
As pessoas mais necessárias? OS PAIS...
A coisa mais bela de todas? O AMOR.

MADRE TEREZA DE CALCUTÁ

Prefácio

Nossa! O tempo passou e nem vi...

“Minha menina” já está defendendo o doutorado...

Essa menina que fui buscar numa sala de aulas, aos sábados, no Curso de Ciências Biológicas da UNESP de Bauru...

Adriana veio para Botucatu, depois de graduada, como aluna do Programa de Aprimoramento Profissional-FUNDAP- área de Diagnóstico e Pesquisa Laboratorial em Hematologia.

*Destacou-se pela seriedade e dedicação ao trabalho no diagnóstico da Leucemia Mielóide Crônica através da pesquisa do mRNA quimérico *bcr/abl*, pela técnica de nested PCR, que na época estávamos implantando.*

Pelas mãos da Tsioko, nossa inesquecível japonesa, no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro (que nessa época media 16m²), logo aprendeu com que comprometimento deve-se emitir o resultado de um exame laboratorial e levou isso consigo, para a Pesquisa.

Com esse mesmo comprometimento, desenvolveu o Mestrado e Doutorado. Incentivadas e apoiadas pelo Diretor do Hemocentro, Dr. Paulo Machado, aprendemos juntas, crescemos juntas.

Hoje, o Laboratório de Biologia Molecular tem um espaço físico privilegiado e um parque tecnológico instalado, como poucos no país. A Adriana participou desse processo de crescimento e muito contribuiu para viabilizá-lo.

Acredito que a formação de um doutor não deva ser feita pela realização de um trabalho de pesquisa unicamente. O doutorando deve ter uma posição de liderança junto aos outros alunos do laboratório, deve ensinar, colaborar com outros projetos em desenvolvimento, assumir responsabilidades pela segurança e bom funcionamento dos equipamentos de uso comum, comprar insumos, gerenciar estoques, estabelecer prioridades no emprego dos recursos, etc. E isso tudo, na bancada de trabalho, não numa mesa administrativa. Adriana fez tudo isso com grande competência e espírito de liderança.

Mas, existe a formalidade de um doutorado e prazos a serem cumpridos... logo agora que temos um “caldeirão de dados borbulhando” para serem explorados...

Digo isso para explicar o modelo de apresentação escolhido: uma sucessão de artigos, em diferentes etapas de elaboração (publicados, submetidos à publicação, em fase de redação e ainda outras colaborações realizadas dentro do período do doutorado).

O Anexo I, colocado no final deste volume, dá uma idéia dos dados brutos que poderão ainda ser explorados.

Através do olhar crítico de cada membro da banca examinadora, cada qual com uma formação peculiar, talvez ainda encontremos outros trabalhos que possam ser realizados a partir destes dados.

Drí, com o maior carinho, deixo de vê-la como “minha menina” e conto com você como uma colega de trabalho que deverá dar continuidade a tudo que construímos juntas...

Um grande abraço, MIP

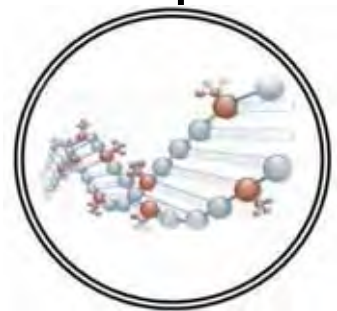
Índice

Artigo de Revisão: Câncer Gástrico	01
Artigo I: Methylation Status and MSI frequency in gastric carcinomas: association with <i>Helicobacter pylori</i> and <i>Epstein-Barr</i> Virus infection	26
Outros Artigos: Aspectos do carcinoma gástrico em dois estados brasileiros: São Paulo e Ceará	47
Outros Artigos: Caracterização dos adenocarcinomas intestinal e difuso de amostras de pacientes brasileiros	49
Outros Trabalhos em Colaboração: Relationship between the EBV infection and the expression of cellular oncoproteins in gastric carcinomas	51
Outros Trabalhos em Colaboração: Análise do polimorfismo C677T do gene da Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR) em tumores gástricos	63
Outros Trabalhos em Colaboração: Detecção de mutações no gene supressor de tumor p53 em câncer gástrico.....	64
Outros Trabalhos em Colaboração: Análise da Influência dos polimorfismos G1691A do Fator V (Leiden), G20210A da Protrombina e C677T do MTHFR na Etiologia do abortamento espontâneo recorrente.	65
Outros Trabalhos em Colaboração: Trombofilias e Abortos Recorrentes.	67
Anexo I.....	68

Câncer Gástrico

[ARTIGO DE REVISÃO]

Status: a ser submetido a um periódico científico nacional



Câncer Gástrico

[REVISÃO]

Introdução

O câncer gástrico já foi o tipo de câncer mais incidente em todo o mundo.[1] Atualmente, ocupa o quarto lugar devido ao aumento na incidência de outras neoplasias (principalmente pulmão) e ao declínio de sua ocorrência nos últimos 70 anos.[1,2,3] Contudo, permanece como um importante problema de saúde pública mundial por se tratar da segunda causa de óbito relacionado ao câncer mais ocorrente no mundo (~700.000 óbitos/ano), precedida apenas pelo câncer de pulmão.[1,2,4].

A distribuição geográfica do câncer gástrico é caracterizada por uma extensa variação internacional, as áreas de maior incidência incluem o Leste da Ásia (Japão, China), Leste da Europa e países da América Central e Sul. As menores incidências são encontradas no sul da Ásia, Norte e Leste da África, América do Norte, Nova Zelândia e Austrália.[2] No Brasil, analisando-se homens e mulheres em conjunto, identifica-se que o câncer de estômago foi o segundo com maior taxa de mortalidade em todas as regiões do país.[6] São estimados vinte e três mil novos casos para o ano de 2006, a um risco de 16 casos novos a cada 100 mil homens e 9 para cada 100 mil mulheres. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer [6], o câncer de estômago é o segundo mais freqüente entre homens nas regiões Norte e Nordeste e o terceiro nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Entre as mulheres, é o terceiro mais freqüente na região Norte e o quarto na região Nordeste; é também, o quinto mais freqüente nas demais regiões (Centro-Oeste, Sudeste e Sul).

A incidência de câncer de estômago eleva-se progressivamente com a idade, a maioria dos pacientes possui entre 50 a 70 anos ao diagnóstico e casos de pacientes mais jovens do que 30 anos são raros.[1,7] Observa-se que, embora este câncer acometa homens duas vezes mais do que mulheres, quando são avaliados grupos jovens, a taxa de incidência nas mulheres é sutilmente mais elevada do que entre os homens.[8]

Patologia e Histologia

O CG pode ocorrer em qualquer parte do estômago (figura 1) e os sítios mais comuns são a porção proximal do estômago (cárdia) que ocorrem em aproximadamente 25% dos casos, a porção distal (antro e piloro, não-cardia) em cerca de 50-60% dos casos e os demais no corpo e fundo.[9]

Estudos [10,11] revelam que, enquanto a incidência das lesões distais (corpo e antro) tem diminuído, os tumores proximais (cardia/gastro-oesofageal) têm sua incidência aumentada, onde relatos apontam um aumento das neoplasias da cárdia.[12]



Figura 1 - O estômago humano é dividido em cárdia, fundo, corpo e antro/píloro.

Fonte: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/63/Estomago.svg/790px-Estomago.svg.png>, acesso em 02/07/2007.

Os tumores podem ser classificados com base no aspecto macroscópico, utilizando-se a classificação de Borrmann [13], usualmente aplicada nos laudos de endoscopia. De modo geral, essa classificação agrupa os tumores em quatro tipos distintos: polipóide e vegetante (Borrmann I); lesão ulcerada com bordas elevadas (Borrmann II); lesão ulcerada infiltrando a parede gástrica (Borrmann III); lesões difusamente infiltrativas, também denominada "linite plástica" (Borrmann IV); tumor não-classificável (Borrmann V) [14], como esquematizado na figura 2.

Freqüentemente a neoplasia digestiva é do tipo adenocarcinoma e os remanescentes são predominantemente linfomas não-Hodgkin ou leiomiomas. Os adenocarcinomas gástricos também podem ser classificados quanto ao grau de diferenciação, isto é, quanto ao nível de semelhança morfológica com as células normais maduras do tecido de origem: indiferenciado ou anaplásico, pouco diferenciado, moderadamente diferenciado e bem diferenciado.[9,15]

Laurèn (1965) [16] classificou os adenocarcinomas gástricos em dois tipos, intestinal e difuso (figura 3). Essa classificação é baseada em achados microscópicos, onde o tipo intestinal é caracterizado pela presença de células tumorais com núcleos grandes e irregulares, formando estruturas tubulares semelhantes às encontradas no adenocarcinoma de cólon.

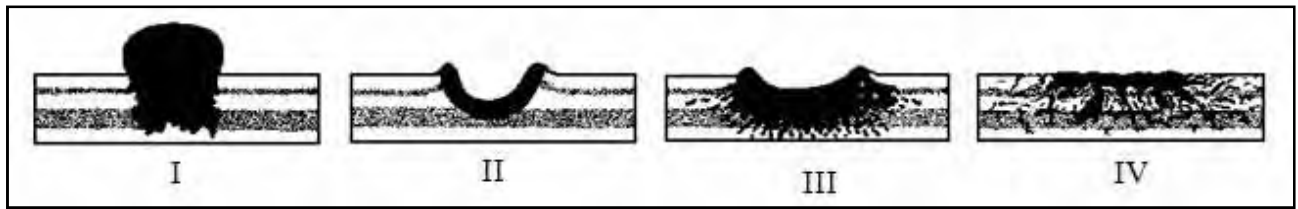


Figura 2 - Classificação de Borrmann. I - Lesão polipóide ou vegetante, bem delimitada; II - Lesão ulcerada, bem delimitada, de bordas elevadas; III - Lesão ulcerada, infiltrativa em parte ou em todas as suas bordas; IV - Lesão difusamente infiltrativa, não se notando limite entre o tumor e a mucosa normal. Figura modificada de <http://www.hslcase.com.br/images> acesso em 10/07/2007.

O tipo difuso parece originar-se diretamente de células gástricas mucosas (sem passar por metaplasia intestinal), as células neoplásicas são pouco diferenciadas, infiltrativas e separadas, que podem também estar em pequenos grupamentos, porém sem formar estruturas glandulares e com núcleos periféricos (células em sinete) devido à concentração de mucina em seu citoplasma.[17]

O tipo intestinal advém de situações pré-cancerosas, como atrofia gástrica ou metaplasia intestinal; Correa [18,19] postulou que a cadeia de eventos que ocorre durante o desenvolvimento do câncer gástrico intestinal envolve a transição da mucosa normal para uma gastrite crônica superficial que então leva à gastrite atrófica e metaplasia intestinal e finalmente, à displasia e ao adenocarcinoma. Este tipo é mais freqüente em áreas geográficas onde o risco de desenvolver a doença é mais elevado, acomete os indivíduos em idade mais avançada, com uma maior preferência pelo sexo masculino.[17,20] O tipo difuso está mais associado à ocorrência familiar deste tumor, acomete com maior freqüência indivíduos mais jovens e não se relaciona com condições pré-neoplásicas, o que sugere predisposição genética.[21] Em geral, o tipo difuso apresenta uma evolução clínica mais agressiva, podendo prosseguir para metástase precoce.[15,22] Baseados nessas diferenças tem-se sugerido que tumores gástricos do tipo intestinal e do tipo difuso são doenças distintas, com fatores etiológicos e biológicos específicos.[3,23,24]

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera quatro padrões histológicos básicos: tubular, papilar, mucinoso e células anel-de-sinete e recomenda para o diagnóstico o tipo predominante [26].

Sintomas e diagnóstico

Nos estadios precoces, o câncer de estômago cursa com sintomatologia pobre e inespecífica. Entretanto, algumas características como perda de peso, anorexia, fadiga, sensação de plenitude gástrica, vômitos, náuseas e desconforto abdominal persistente podem indicar o câncer de estômago em estadios mais avançados. Sangramentos gástricos são incomuns em lesões malignas, porém, a hematemesa ocorre em cerca de 10 a 15% dos casos de câncer de estômago.[6] A falta de sintomas precoces atrasa o diagnóstico do

câncer gástrico e conseqüentemente, 80-90% dos pacientes dos países ocidentais procuram por cuidados médicos nos estadios avançados da doença, tornando pobre o prognóstico.

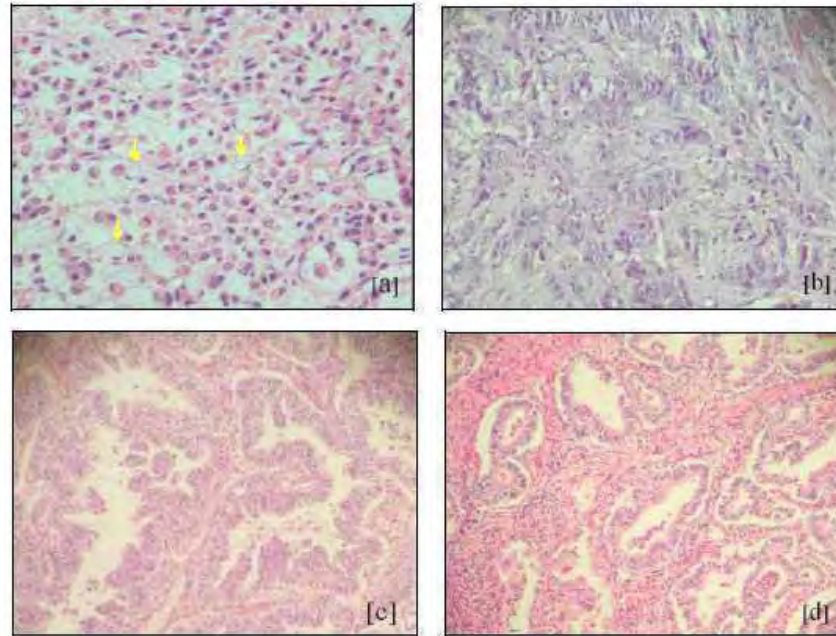


Figura 3 – Histopatologia dos adenocarcinomas gástricos do tipo difuso [a, b] e intestinal [c, d] (HE,400X). [a] Adenocarcinoma do tipo difuso pouco diferenciado: apresenta células pequenas difusamente dispersas, algumas em “anel-de-sinete” (setas amarelas). [b] Adenocarcinoma do tipo difuso indiferenciado. [c] Adenocarcinoma do tipo intestinal moderadamente diferenciado: nota-se a presença de estruturas papilares. [d] Adenocarcinoma do tipo intestinal moderadamente diferenciado: verifica-se uma arquitetura tumoral esboçando arranjos tubulares, infiltrando a camada muscular. Fonte: Lima (2006) [25].

O diagnóstico das neoplasias gástricas conta com métodos radiológicos e endoscopia digestiva alta e análise histopatológica da biópsia coletada durante a endoscopia.[27] Na radiografia do estômago, após a ingestão de bário como contraste, são realizadas radiografias seqüenciais que delineiam o interior do estômago, a procura por áreas anormais ou tumores. A endoscopia digestiva alta permite, além da observação e avaliação das lesões com documentação fotográfica, a coleta de material para estudo microscópico e diagnóstico histopatológico das lesões. Os dois exames são complementares no apoio diagnóstico e não são considerados mutuamente exclusivos.

Após diagnóstico do câncer gástrico, a determinação do estadio da doença é fundamental para a tomada de decisão terapêutica. O estadiamento tumoral pode ser baseado em dados clínicos ou patológicos, onde o primeiro é realizado com base na extensão do tumor (estabelecida através de exame físico auxiliado por exames radiográficos, endoscópicos e histológicos) e o patológico (pela observação microscópica do material proveniente de ressecção cirúrgica), visando avaliar a profundidade do tumor (T), presença de linfonodos comprometidos (N) e ocorrência de metástase à distância (M). A classificação

pTNM (tabela 1), estabelecida pelo *American Joint Committee on Cancer system* [28] utiliza tais dados para compor o estadiamento tumoral (tabela 2).

Tabela 1 - TNM Patológico

Tumor Primário (pT)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor invade a lâmina própria ou submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria ou subserosa
T2a	Tumor invade a muscular própria
T2b	Tumor invade subserosa
T3	Tumor invade a serosa sem invadir estruturas adjacentes
T4	Tumor invade estruturas adjacentes
Linfonodos Regionais (pN)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástase para linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 6 linfonodos regionais
N2	Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais
N3	Metástase em mais de 15 linfonodos regionais
Metástase à Distância (pM)	
Mx	Presença de metástase a distância não pode ser avaliada
M0	Sem metástase à distância
M1	Com metástase à distância

Adaptado do *Cancer Staging Handbook* (2002).⁽²⁸⁾

Tabela 2 - Agrupamento por Estadiamento

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

Adaptado do *Cancer Staging Handbook* (2002).⁽²⁸⁾

Tratamento

A ressecção cirúrgica (gastrectomia) de parte ou todo o estômago oferece a única possibilidade de cura ou taxas de sobrevivência elevadas em longo prazo. A localização, o tamanho, padrão e extensão da disseminação e tipo histológico do tumor são levados em consideração na determinação da abordagem cirúrgica.[6,29] Em estádios iniciais, quando o tumor ainda está limitado ao estômago, a área afetada e os linfonodos próximos são removidos. Nos estádios II ou III, quando o tumor também se estende para estruturas fora do estômago ou mais de 3 linfonodos estão comprometidos, a quimioterapia ou radioterapia podem ser usadas como tratamentos secundários que associados à cirurgia podem determinar melhor taxa de sucesso. Nos casos avançados, quando o tumor se espalhou para outras áreas do corpo, o tratamento é realizado com as mesmas modalidades (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), porém sem aspecto curativo. A intenção do tratamento será o alívio dos sintomas, aumento da sobrevida e proporcionar melhor qualidade de vida ao paciente.[29]

Sobrevida

A taxa de sobrevida global de cinco anos para todos os pacientes é muito baixa, com uma média de sobrevida após 5 anos de 28% e 18%, respectivamente, em países desenvolvidos e em desenvolvimento [6]. Dados Europeus [30] mostram que apenas aproximadamente 20% dos pacientes sobrevivem mais de cinco anos após o diagnóstico; nos Estados Unidos, a taxa de sobrevida relativa aos cinco anos é de 18% para os pacientes brancos [31]; o Japão apresenta a melhor taxa de sobrevida variando entre 47-71%, como resultado dos esforços desde 1960 no combate ao câncer de estômago, principalmente na implementação do diagnóstico precoce [32,33]. No Brasil, Bustamante-Teixeira e colaboradores (2006) [34] em um estudo pioneiro no país, apontam na cidade de Campinas-SP taxas de sobrevida de 32% após o primeiro ano e de 9% ao final de cinco anos.

Etiologia

O câncer gástrico possui uma etiologia complexa e multifatorial, onde os fatores ambientais, condições precursoras e fatores genéticos recebem grande ênfase como fatores causais.

Fatores Ambientais

[Dieta]

Certos hábitos alimentares estão sendo consistentemente associados ao aumento nos riscos de desenvolvimento de câncer gástrico. O consumo regular e em excesso de alimentos

salgados, mal conservados e defumados parecem aumentar significativamente os riscos a essa doença.[35,36,37,38] Estudos no Japão [3] sugerem que o recente declínio nas mortes por câncer gástrico naquele país tenha sido acompanhado por um declínio paralelo no consumo per capita de alimentos salgados e defumados. Apoiando essa hipótese, verifica-se que descendentes de populações que migram de regiões do mundo com alto risco (p.ex. Japão) para regiões de baixo risco (p.ex. E.U.A.) e modificam seus hábitos diários, apresentam um marcante declínio no risco de CG.[39,40] Evidências experimentais com modelos animais que receberam dieta rica em sal têm mostrado que a ingestão excessiva de sal leva à atrofia gástrica, além de estar associada a metaplasia e facilitar a carcinogênese gástrica na presença de outros carcinógenos.[41,42] Também, os nitritos usados para conservar alguns tipos de alimentos, como picles, salsichas e alguns tipos de enlatados, favorecidos pelo pH gástrico, reagem espontaneamente, formando compostos N-nitrosos, como a nitrosamina, conhecida como potente carcinógeno do trato digestivo superior.[43] Sua ação pode estar relacionada com a inibição da vitamina C e de outros antioxidantes que protegem o DNA e por serem capazes de provocar desaminação de purinas e pirimidinas, ocasionando mutações.[44,48] Entretanto, como revisado por Eichholzer & Gutzwiller [49], a relação entre dieta rica em nitritos e câncer permanece a ser melhor evidenciada.

Estudos ecológicos, caso-controle e de coorte realizados em populações de diversas áreas geográficas parecem indicar que o consumo regular de frutas e vegetais frescos protegem a mucosa gástrica do câncer.[44,45,46] Provavelmente, a proteção é proveniente dos efeitos antioxidantes de micronutrientes como ácido ascórbico (vitamina C), β -carotenóides, α -tocoferol (vitamina E) e folato presentes nos vegetais.[50] Uma revisão internacional [51] realizada pelo *World Cancer Research Fund–American Institute for Cancer Research* admitiu a existência de evidências convincentes de que a ingestão de vegetais frescos pode diminuir o risco de câncer oral, de faringe, laringe, pulmão, estômago, colon e reto. O consumo recomendado pela OMS é de pelo menos cinco porções diárias de frutas e vegetais (em torno de 400g por dia) [52]. Dados comparativos entre gêmeos mostraram que os indivíduos com hábitos de consumo reduzido de frutas e verduras apresentaram uma risco relativo (RR) igual a 5,5 (95% CI: 1,7 a 18,3) de desenvolverem câncer de estômago quando comparados com seus irmãos gêmeos com hábito de consumo regular de vegetais frescos. Pôde-se observar também que a proteção foi dose-dependente.[53] Contudo, resultados conflitantes ainda são produzidos, outros estudos [54,55,56] falham ao tentar associar consumo de vegetais frescos a proteção contra câncer gástrico. Nos Estados Unidos, um estudo de coorte envolvendo um grande número de indivíduos, mostrou um risco

relativo reduzido entre os homens que consumiam vegetais (RR = 0,79; 95% CI:0,67 a 0,93) e um inesperado risco aumentado entre mulheres com tais hábitos alimentares (RR = 1,25; 95% CI: 0,99-1,58)[57].

No Brasil, assim como em outros países, é observada uma variação marcante entre os estados no que diz respeito à diversidade nos hábitos alimentares. A possível associação entre os fatores nutricionais e câncer pode ser apoiada pelo *Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade* [58] realizado pelo Ministério da Saúde entre os anos de 2002 e 2003. Neste estudo, foi observado que nas regiões do Brasil que apresentam as maiores porcentagens de consumo de pelo menos cinco frutas ou legumes e verduras frescas por semana são as regiões onde o câncer gástrico está em menor frequência quando comparadas com as regiões em que o consumo é menor. Consumo reduzido de frutas e de vegetais, baixo nível sócio-econômico e tabagismo foram considerados como fatores de risco para o câncer de estômago em um estudo conduzido por Nishimoto e colaboradores [59] na cidade de São Paulo.

Os dados obtidos têm sido muitas vezes difíceis de interpretação, pois, a maioria dos estudos é retrospectiva e os dados foram fornecidos pelos pacientes, confiando à sua memória as informações de seus hábitos alimentares anteriores.

[Infecção por *Helicobacter pylori*]

Desde que a bactéria *Helicobacter pylori* (HP) foi relatada pela primeira vez por Marshall & Warren em 1983, tem-se atribuído um importante papel da infecção por HP na carcinogênese gástrica sustentada por estudos epidemiológicos que têm demonstrado correlações entre o risco de CG e a prevalência da infecção por essa bactéria.[45,60,61] A infecção por HP é aceita como a principal causa de características histológicas que levam a doenças gastroduodenais, incluindo úlcera péptica, gastrite crônica e linfoma de *MALT* (*mucosa associated lymphoid tissue*) [62] e é classificada como carcinógeno de classe I, no câncer gástrico, pela Organização Mundial da Saúde.[63]

O HP é uma bactéria *Gram* negativa que coloniza o estômago e está profundamente localizada nas criptas gástricas da camada mucosa. Destaca-se pela sua morfologia, espiralada com as extremidades arredondadas, que juntamente com a presença de cinco ou seis flagelos unipolares, garantem à bactéria uma motilidade que facilita a penetração no muco gástrico.[63] O HP produz urease, uma enzima essencial à colonização, pois ajusta o pH do meio gástrico. Pela hidrólise da uréia no suco gástrico e fluido extracelular, o organismo é capaz de gerar bicarbonato e amônia, os quais tamponam a acidez gástrica e

neutralizam o pH ao redor da bactéria, protegendo-a até que tenha acesso à camada de muco gástrico.[64]

Uma análise de dados em 13 países [65] demonstrou uma forte correlação entre a incidência de câncer gástrico e a prevalência de infecção por HP. Em países em desenvolvimento, freqüentemente 50 a 90% da população é hospedeira deste microorganismo. Observou-se que a infecção ocorre na infância e persiste até a idade adulta. Em países desenvolvidos, a prevalência é menos acentuada e sua maior incidência ocorre em indivíduos mais velhos, sugerindo que a melhora das condições de vida daquela população com o passar dos anos preveniu a infecção.[8,63]

Vários mecanismos têm sido implicados no papel do *H. pylori* no processo de carcinogênese gástrica. A ação do microorganismo na mucosa gástrica leva à esfoliação do epitélio, o que provoca um aumento da proliferação celular, normalmente acompanhada de células precursoras imaturas. Desta forma, a produção de muco é alterada, prejudicando a integridade e função protetora da mucosa gástrica. Adicionalmente, durante a resposta inflamatória do hospedeiro, ocorre estímulo das interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α e atração a neutrófilos e células inflamatórias mononucleares, as quais causam danos na superfície epitelial gástrica.[66,67] Essas alterações podem levar a perda das células parietais (atrofia), metaplasia intestinal e adenocarcinoma.[67] Notadamente, a inflamação causada por HP pode gerar radicais livres que podem contribuir para a ocorrência de mutações. Outro mecanismo estaria associado à participação do HP no desenvolvimento e progressão da gastrite crônica de uma forma não atrófica superficial para formas mais severas, incluindo gastrite atrófica com metaplasia intestinal em uma pequena proporção dos casos.[69] A infecção causa gastrite crônica em quase todos os indivíduos infectados[70,71] e esta se faz presente na grande maioria dos casos de câncer gástrico associada com um aumento do risco para essa condição [72]. Contudo, somente uma pequena porcentagem das pessoas infectadas com HP desenvolverá qualquer das complicações gástricas associadas à infecção, sugerindo que o desenvolvimento das doenças parece ser determinado pela combinação de vários fatores relacionados ao hospedeiro e ao microorganismo.[73]

A suscetibilidade genética individual, na realidade, deve ter um papel crítico em uma variedade de processos relevantes para a carcinogênese gástrica, incluindo a proteção da mucosa em face da infecção por HP e outros carcinógenos; a resposta inflamatória, que condiciona a manutenção, severidade e resultado da infecção por HP; o funcionamento da desintoxicação dos carcinógenos e proteção antioxidante; a variabilidade intrínseca dos processos de reparo do DNA e o controle da proliferação celular.[74].

À parte dos fatores relacionados ao hospedeiro, há determinantes específicos de virulência das cepas de HP que influenciam os resultados clínicos da infecção. Recentemente foram identificados dois importantes fatores de virulência, a citotoxina vacuolizante (*vacuolating cytotoxin*, VacA) e a proteína associada à citotoxina (*cytotoxin-associated protein*, CagA). Essas proteínas são codificadas, respectivamente, pelos genes *VacA* e *CagA*. [75] A citotoxina vacuolizante (VacA) induz a formação de vacúolos em células epiteliais gástricas *in vitro* [76] e está associada com úlcera péptica. Todas as cepas de *H. pylori* possuem o gene *VacA*, no entanto, foi observada uma variação considerável entre as linhagens, na atividade vacuolizante da toxina. A heterogeneidade dos alelos de *VacA* pode ser um fator determinante nas variações das doenças entre pacientes infectados por HP. Existem duas regiões variáveis no gene *VacA*: uma região de aproximadamente 50 pares de bases (pb), denominada s, localizada na região 5' terminal, que codifica um peptídeo sinal, onde são identificados os tipos s1 (com subtipos s1a, s1b e s1c) e s2, e uma região mediana do gene, em torno de 700 pb que apresenta os subtipos m1 e m2. [77]

A combinação em mosaico desses tipos alélicos distintos (s e m) determina a produção e a especificidade da atividade da citotoxina e está associada à patogenicidade bacteriana. Todas as linhagens possuem um dos tipos de seqüência sinal e um dos tipos da região mediana, desta forma as possíveis variantes seriam s1m1, s1m2, s2m2 e cepas com s2m1 não foram encontradas. As cepas do tipo s1m1 produzem altos níveis da toxina, o tipo s1m2 produz níveis de moderados a baixos da toxina, enquanto que s2m2 não produz citotoxina ativa. [78,79]. A seqüência sinal do tipo s1, mas não a do tipo s2, está fortemente associada à atividade de citotoxina *in vitro*, à úlcera péptica e à presença do *CagA*. [76]

CagA representa um possível marcador de virulência. Faz parte da ilha de patogenicidade cag (PAI), um segmento de 40 quilobases com aproximadamente 30 genes que desempenham papéis importantes na indução da inflamação (principalmente IL-8) e possuem homologia a genes que codificam proteínas do sistema secretor do tipo IV, os quais exportam proteínas das células bacterianas. [60,61,80] *CagA* está presente em aproximadamente 60 a 70% das cepas de HP e codifica uma proteína de alto peso molecular (120 a 140 quilodáltons). [81] O fator de virulência CagA é fortemente associado ao risco de carcinoma, enquanto que sua ausência implica, quando muito, em um baixo risco para adenocarcinomas difusos. [75,82,83] O gene *CagA* é terminal na ilha de patogenicidade e é utilizado como marcador para o *locus* cag inteiro. [84]

Embora haja uma forte correlação entre a atividade da citotoxina vacuolizante e a presença de *CagA*, os dois genes, *CagA* e *VacA*, localizam-se em *loci* distintos no genoma do *Helicobacter pylori* e mutações de *CagA* que resultem na perda da expressão da proteína

CagA, não afetar a produção de VacA, sugerindo que a expressão das duas proteínas seja independente.[85]

As populações de HP são extremamente diferentes, devido a mutações pontuais, substituições, inserções e/ou deleções em seu genoma. Um único hospedeiro pode abrigar várias cepas que, com o decorrer do tempo, podem sofrer mutações endógenas, rearranjos cromossômicos ou recombinações entre as cepas [85] e a genotipagem de *VacA* e a detecção de *CagA* poderá permitir a identificação de pessoas infectadas em diferentes níveis de riscos.[76]

[Infecção pelo Vírus *Epstein-Barr*]

O vírus *Epstein-Barr* (EBV) é um membro da Família *Herpesviridae*, mais freqüentemente adquirido na infância e, como o *Helicobacter pylori*, persiste até a idade adulta. Em adolescentes e adultos jovens, a infecção primária resulta em mononucleose.[86] O EBV foi originalmente isolado em biópsias do Linfoma de Burkitt, existindo uma associação significativa em pacientes imunocomprometidos e em doenças linfoproliferativas, linfomas nasais, doença de Hodgkin's e foi detectado em 2-16% dos carcinomas gástricos.[86,87] Pequenos RNAs de EBV foram encontrados em células do carcinoma gástrico, ainda no estágio intramucosa. EBV parece ser um dos fatores contributivos para o desenvolvimento do carcinoma gástrico e este vírus tem sido encontrado em muitos casos de carcinomas gástricos semelhantes a linfopitelioma e em pequenas, mas significantes proporções de adenocarcinomas gástricos comuns.[88,89] Gurtsevich e colaboradores [90] avaliaram a incidência do vírus *Epstein-Barr* associados a câncer gástrico entre pacientes russos. O envolvimento de EBV mostrou-se significativamente mais freqüente entre homens, especialmente em tumores do tipo menos diferenciados e localizados no estômago superior (cárdia e parte média). Pouco é conhecido sobre os mecanismos moleculares da ação de EBV na origem do câncer gástrico, porém, estudos com amostras de CG EBV-positivo têm mostrado uma alta freqüência da perda de expressão do gene *CDKN2A* (p16) maior do que os CG EBV-negativos.[91,92]

Fatores Genéticos e Epigenéticos

Alterações cromossômicas e outros defeitos genéticos têm sido associados ao câncer gástrico e vários estudos têm demonstrado evidências da predisposição genética a esta neoplasia. A maioria dos carcinomas gástricos ocorre esporadicamente e somente uma pequena proporção dos casos (8-10%) parece estar associada a fatores familiares [93], entretanto, parentes em primeiro grau de pacientes com câncer gástrico parecem ter riscos

duas a três vezes maiores de serem acometidos pela mesma doença.[93,94] Estudos moleculares têm demonstrado claramente que inúmeras alterações genéticas são responsáveis pelo desenvolvimento e progressão do câncer gástrico.[17,95,96] Frequentemente, as doenças neoplásicas apresentam múltiplas alterações genéticas que envolvem duas classes de genes: os supressores de tumor e os oncogenes. A inativação do primeiro, combinada à ativação de oncogenes pode levar a malignidade. Essas alterações genéticas podem ser herdadas ou ocorrer em células somáticas. As alterações genéticas no câncer gástrico são muito similares às encontradas no câncer de cólon, especialmente no adenocarcinoma intestinal.[94] Dentre essas alterações, são apontadas mutações e alterações na expressão de genes implicados na proliferação e morte celular (*TP53*, *BCL-2*, *SC-1*), na segregação cromossômica (*APC*), na adesão celular (*CDH1*, *β -catenina*), na transdução de sinal (*K-RAS*) e neoangiogênese (VEGF), entre outros.[94]. O gene *TP53*, o mais extensivamente estudado gene supressor tumoral, é frequentemente alterado em vários tipos de cânceres humanos, é encontrado mutado em 50% das neoplasias gástricas em estadios histologicamente avançados.[97]

A caderina-E é uma glicoproteína transmembrana expressa em células epiteliais, responsável pela adesão celular dependente de cálcio. Esta se liga a várias proteínas citosólicas incluindo as cateninas- α , - β e - γ formando um complexo ativo, necessário para a manutenção da adesão intercelular normal.[98,99] A caderina-E é também envolvida na inibição por contato da proliferação celular, pois induz a parada no ciclo celular pela regulação da proteína p27, envolvida na regulação do ciclo celular.[100] Sua sub-expressão tem sido encontrada em várias outras doenças, com potencial valor prognóstico. Adicionalmente, o gene *CDH1*, que codifica a proteína caderina-E, é um importante candidato na carcinogênese gástrica. Foram identificadas mutações somáticas neste gene em mais do que 50% dos tipos difusos de câncer gástrico.[101] ODA e colaboradores [102] descreveram a presença de mutações em um dos alelos no gene *CDH1* juntamente com a perda do alelo selvagem em 60% das neoplasias gástricas do tipo difuso. Dois tipos de eventos parecem silenciar *CDH1*: mutações somáticas e metilação.[103,104]

A metilação no DNA ocorre pela adição de um grupo metil ao carbono 5 da citosina, reação catalizada pela enzima DNA metil-transferase. Nos mamíferos, o principal alvo da metilação é a citosina próxima à guanina (5'-CpG-3'). As seqüências alvo da metilação não são distribuídas de maneira uniforme no genoma, mas, encontradas ao longo de regiões ricas em dinucleotídeos CG como as ilhas CpG e outras regiões repetitivas no genoma. As ilhas CpG são seqüências de aproximadamente 200 pares de bases (pb), encontradas principalmente nas regiões promotoras dos genes *housekeeping* e também em alguns outros

genes que se expressam em tecidos específicos. Silenciar um gene intacto através da metilação das seqüências controladoras adjacentes é um evento normal do desenvolvimento, da diferenciação e da inativação do cromossomo X, mas ocasionalmente, a metilação aberrante das ilhas CpG nos promotores poderá causar uma perda patogênica de função deste gene.[105]

Chan e colaboradores [106] encontraram metilação no gene da caderina-E em 58% das amostras de câncer primário e em 66% de metástases de CG nos linfonodos, resultados similares também foram apontados por TAMURA e colaboradores [107].

Kang e colaboradores [108] demonstraram a ocorrência de metilação dos genes *CDKN2A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), *DAP-quinase* (*Death-associated protein kinase*), *THBS1* (*Thrombospondin 1*) e *TIMP3* (*tissue inhibitor of metalloproteinase 3*) na metaplasia intestinal, o que sugeriria a ocorrência precoce da metilação na via da carcinogênese gástrica.

O gene *CDKN2A* codifica a proteína p16, que inibe as ciclinas dependentes de quinases (CDK) que por sua vez inativam a pRB1 (proteína retinoblastoma, necessária para a inibição do ciclo celular) por fosforilação. Assim, a perda da função de p16 leva à perda de função de pRB1 e a um ciclo celular inapropriado. Mutações ou deleções em *CDKN2A* foram relatadas em uma série de tumores.[109] Nos carcinomas gástricos e em algumas linhagens celulares de CG que não expressam p16, as alterações genéticas no gene são pouco freqüentes.[110] LEE e colaboradores [111] analisaram dez amostras de tumores gástricos quanto a deleções homozigotas e mutações genéticas no gene *CDKN2A* e não encontraram qualquer alteração genética nas amostras tumorais e em somente um dos tumores testados tinha mRNA para p16. Estes resultados sugerem que um mecanismo alternativo é responsável pela inativação de *CDKN2A* nestes tumores.[109] Toyota e colaboradores [112] relataram uma alta freqüência de hipermetilação do promotor de *CDKN2A* em amostras de câncer gástrico.

DAP-quinase (*Death-associated protein kinase*) é uma proteína quinase que participa de vários sistemas pró-apoptose induzidos por gama interferon. A perda da expressão de *DAP-quinase* associada à metilação da região promotora do gene *DAPK* deve resultar na supressão da morte celular por apoptose em vários carcinomas, incluindo o câncer gástrico.[112] Kang e colaboradores [113] encontraram metilação em *DAPK* em 56% das amostras de tumores gástricos analisadas. Estudos recentes têm associado metilação nesse gene com um fenótipo mais agressivo e metástases em alguns tumores humanos [113].

As ciclooxigenases (Cox) são enzimas-chave responsáveis pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas que são mediadoras de processos inflamatórios.[114] As ciclooxigenases possuem duas isoformas, Cox1 e Cox2. Cox1 é expressa constitutivamente

em vários tecidos e está envolvida em várias funções fisiológicas, enquanto que Cox2 é induzida por estímulos patológicos, tais como inflamação, fatores de crescimento e citocinas produzidas por células tumorais.[114] A isoforma Cox2 é super-expressa em vários tipos de tumores.[115] Atualmente, estudos têm demonstrado que a desregulação da Cox2 pode ser provocada pela infecção por *Helicobacter pylori* [115] e que a desregulação na expressão dessa proteína pode contribuir para a carcinogênese gástrica pela inibição da apoptose, estímulo da proliferação celular e angiogênese.[116,117] Experimentos *in vitro* de Tsujii e colaboradores [118] demonstraram que a expressão da Cox2 está associada à resistência a apoptose e a um aumento no potencial de metástase. Toyota e colaboradores [119] encontraram metilação aberrante densa (maior do que 70%) em 5 de 33 linhagens celulares analisadas e metilação parcial em 10 destas linhagens; observaram também que a perda da transcrição do gene *COX2* estava correlacionada com a metilação do exon 1 daquele gene.

A instabilidade de microssatélites (MSI) é observada em 20-30% dos CG com uma frequência mais alta nos casos familiares.[120] Os microssatélites são seqüências de nucleotídeos repetitivas que são encontradas dispersas, porém conforme padrões, no genoma. As unidades repetidas que compreendem o microssatélite variam de 1 até 6 nucleotídeos, porém os mais comuns consistem de 2 nucleotídeos. O número de unidades de repetição em um microssatélite pode variar muito de um indivíduo para outro, apresentando um alto polimorfismo, o que torna os microssatélites marcadores altamente informativos para estudos genéticos de ligação, perda de heterozigosidade e testes de paternidade; as mutações que ocorrem nas regiões microssatélites, envolvendo o ganho ou a perda de unidades repetitivas, caracterizam a instabilidade de microssatélites.[121] Estes erros em regiões repetitivas ocorrem durante a replicação do DNA e devem ser corrigidos por um conjunto de enzimas que formam o sistema de reparo de erros de pareamento do DNA. No DNA humano os genes de reparo melhor estudados são os genes *hMLH1* e *hMSH2*. [122] Mutações nesses genes causam 90% da MSI encontrada em câncer colo-retal hereditário (HNPCC), porém, mutações em linhagens germinativas ou somáticas nestes genes são raramente observadas nos casos esporádicos ou familiares de câncer colo-retal não poliposo, sugerindo que outros genes estejam envolvidos nos erros de replicação nestes casos.[122] Há relatos de que pacientes com tumores coloretais e com tumores gástricos com MSI têm uma maior sobrevida do que aqueles com tumores sem MSI.[123] Muitos pesquisadores utilizam um painel para vários *loci* de MSI, porém o indicador mais sensível é o *locus* BAT-26.[123] BAT-26 é uma seqüência de 26 adenosinas (A) (variação entre indivíduos > que 5%) que podem apresentar 24, 25 ou 27 adenosinas e por isso é denominado de monomórfico. BAT-26 é altamente sensível à instabilidade de microssatélites. Recentemente

estabeleceu-se que a análise da seqüência de BAT-26 poliA localizado no quinto *intron* do gene de reparo de erros de DNA *hMSH2* é suficiente para a determinação do padrão de erros de replicação nos tumores.[124] A perda da expressão de hMLH1 tem sido associada à metilação na região promotora do gene *hMLH1* [124] e, séries de estudos [125,126,127] têm demonstrado que a metilação de *hMLH1* está fortemente associada com a MSI no câncer gástrico.

Outros Fatores Associados

Certas doenças têm sido consideradas como possíveis precursores do câncer gástrico como gastrites atrófica, acloridria, anemia perniciosa [128], metaplasia intestinal, úlceras gástricas crônicas e pólipos gástricos. A gastrite crônica atrófica e a metaplasia intestinal são lesões gástricas que podem progredir durante décadas até o câncer gástrico [97]. Modificações no epitélio gástrico e redução da produção de ácido clorídrico pelas células são os maiores indícios de que elas sejam etapas precursoras da neoplasia. Entretanto, apenas uma pequena porcentagem de pacientes com gastrite atrófica evolui para o câncer gástrico. A gastrectomia distal para corrigir desordens benignas, particularmente a úlcera péptica, parece estar associada com um aumento no risco de câncer gástrico.[129]

A relação entre tabagismo-dose dependente e câncer de estômago tem sido considerada [130], entretanto os estudos são ainda controversos e enquanto algumas avaliações não encontraram associações entre fumo e câncer gástrico [131], outras relatam evidências que suportam tal associação.[132,133,134]

Considerações Finais

As últimas décadas foram marcadas por avanços na biologia molecular que possibilitaram o desenvolvimento de marcadores genéticos que tornaram mais seguros e precisos o diagnóstico e prognóstico de algumas neoplasias malignas. O estabelecimento da relação entre *Helicobacter pylori* e doenças gástricas representou um grande salto no entendimento do câncer de estômago. É evidente que a carcinogênese gástrica resulta de uma interação entre fatores genéticos, bacterianos, ambientais e moleculares e, as pesquisas atuais visam a aplicação desses avanços na detecção precoce do câncer de estômago, bem como na prevenção ou desenvolvimento de terapias mais efetivas. Muito já aprendemos e desvendamos, contudo, a complexidade dos eventos que envolvem a tumorigênese gástrica torna instigante a pesquisa nas mais diversas áreas relacionadas ao tema. A satisfação sentida por pesquisadores que desvendam os intrincados eventos moleculares só não será

maior do que a satisfação compartilhada entre os clínicos que observarem o melhor prognóstico de seus pacientes quando a maioria deles for diagnosticada precocemente.

Referências Bibliográficas

1. PARKIN, D.M., BRAY, F., FERLAY, J., PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002. **CA Cancer J Clin.**, v.55, 74-108, 2005.
2. PARKIN, D.M. International variation. **Oncogene**, v. 23, p;6329-40, 2004.
3. HOWSON, C. P.; HIYAMA, T. & WYNDER, E. L., The decline of gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. **Epidemiol. Reviews**, 8:1-27. 1986.
4. PISANI, P., PARKIN, D.M., BRAY, F., FERLAY, J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. **Int. J Cancer**, v.83 (1), p.18-29, 1999.
5. BOING, A.F., VARGAS, S.A.L., BOING, A.C. A carga das neoplasias no Brasil: mortalidade e morbidade hospitalar entre 2002-2004. Rev. Assoc. **Med. Bras.** v.53,. 2007
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2006: Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro: INCA, 2006. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 24 jul. 2007.
7. KELLEY, JR., DUGGAN JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. **J Clin Epidemiol.**, v.56(1), p.1-9, 2003
8. PARKIN, D. M., BRAY, F. I., DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur J Cancer**, v.37, p.S4-66, 2001.
9. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, S. L. (Eds.) **Robbins-Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
10. BLOT, W.J., DEVESA, S.S, KNELLER, R.W., FRAUMENI, J.F. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. **JAMA.**, v.265, p.1287-9, 1991.
11. DEVESA, S.S., BLOT, W.J., FRAUMENI, J.F. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. **Cancer**, v.83, p. 2049-2053, 1998.
12. EL HAJE, A.A., FOLETTTO, H., KRUEL, N.F., ARAÚJO, P.A., EL HAJE, A.M.S.V., EL HAJE, S.A. Carcinoma gástrico: estudo comparativo relacionado à localização tumoral, resultados imediatos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, p.23-7, 1997.
13. 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. 865-79, 1926.
14. ESPEJO, E. J.; NAVARRETE, S. J. Classification of stomach adenocarcinomas. **Rev. Gastroenterol.** Peru, v.23, p.199-212, 2003.

15. WERNER, M., HÖFLER, H., BECKER, K.F., KELLER, G. Gastric Adenocarcinoma: Pathomorphology and Molecular Pathology. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.127, p. 207-216, 2001.
16. LAURÉN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. **Acta Pathol Microbiol Scand.** v.64, p.31-49, 1965
17. CORREA, P., SHIAO, Y. H. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.54(7 Suppl), p.1941s-1943s, 1994.
18. CORREA, P. A human model of gastric carcinogenesis. **Cancer Res.** v.48, p.3554-3560, 1988.
19. CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process - First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Res.**, v.52, p.6735-40, 1992.
20. LAUWERS, G. Y. Defining the pathologic diagnosis of metaplasia, atrophy, dysplasia, and gastric adenocarcinoma. **J Clin Gastroenterol.**, v.36, p.S37-43; 2003.
21. CORREA, P., CHEN, V. W. Gastric cancer. **Cancer Surv.**, v.19-20, p.55-76, 1994.
22. STADTLÄNDER, C. T. K-H.; WATERBOR, J. W. Molecular Epidemiology, Pathogenesis and Prevention of Gastric Cancer. **Carcinogenesis**, v.20, n.12, p.2195-2207, 1999.
23. JINAWATH, N., CHAMGRAMOL, Y., FURUKAWA, Y., OBAMA, K., TSUNODA, T., SRIPA, B., PAIROJKUL, C., NAKAMURA, Y. Comparison of gene expression profiles between *Opisthorchis viverrini* and non-*Opisthorchis viverrini* associated human intrahepatic cholangiocarcinoma. **Hepatology**. v.44, p.1025-38, 2006.
24. JI, J., CHEN, X., LEUNG, S. Y., CHI, J. T., CHU, K. M., YUEN, S. T., LI, R., CHAN, A. S., LI, J., DUNPHY, N., SO, S. Comprehensive analysis of the gene expression profiles in human gastric cancer cell lines. **Oncogene**, v.21, p.6549-56, 2002.
25. LIMA, M.A.P. **Estudo do Vírus Epstein-Barr (EBV) em adenocarcinoma gástrico: frequência, associação clinicohistopatológica e relação com a expressão das proteínas BCL-2, BAX E C-MYC.** Fortaleza, 2006. 146p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Universidade Federal do Ceará.
26. WATANABE, H., JASS, J.R., SOBIN, L.H. Histological typing of esophageal and gastric tumours. 2nd ed. **WHO International Histological Classification of Tumours.** Berlin: Springer-Verlag, 1990.
27. HALLISSEY, M.T., ALLUM, W.H., JEWKES, A.J., ELLIS, D.J., FIELDING, J.W. Early detection of gastric cancer. **BMJ**. v.301, p.513–5, 1990.
28. AJCC - American Joint Committee on Cancer. **Cancer Staging Handbook. From the AJCC Cancer Staging Manual.** 6.ed. Springer, 2002
29. BRENNAN, M.F. Current status of surgery for gastric cancer: a review. **Gastric Cancer**. v.8, p.64–70, 2005.

30. BERRINO, F., CAPOCACCIA, R., ESTÈVE, J., GATTA, G., HAKULINEN, T., MICHELI, A., *et al.* **Survival of cancer patients in Europe: The EURO CARE-2 study**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1999. (IARC Scientific Publications, 151).
31. KOSARY, C.L., RIES, L.A.G., MILLER, B.A., MANKEY, B.F., HARRAS, A., EDWARDS, B.K. **SEER cancer statistics review 1973-1992**. Bethesda: National Institutes of Health; 1995.
32. HISAMICHI, S., SUGAWARA, N. Mass screening for gastric cancer by X-ray examination. **Jpn J Clin Oncol.** v.14, p.211-23, 1984.
33. SASAKO, M. Principles of surgical treatment for curable gastric cancer. **J Clin Oncol** v.21, p.274-5, 2003.
34. BUSTAMANTE-TEIXEIRAI, M.T., FAERSTEIN, E., MARIOTTO, A.; BRITTO, A.V., MOREIRA-FILHO, D.C., LATORRE, M.R.D.O. Survival in gastric cancer patients in Campinas, São Paulo, Brazil. **Cad. Saúde Pública.** v.22, p.1611-18, 2006.
35. KIM, M.K., SASAKI, S., SASAZUKI, S., TSUGANE, S. Prospective study of three major dietary patterns and risk of gastric cancer in Japan. **Int J Cancer.** v.110, p.435-442, 2004.
36. RAMON, J. M., SERRA, L., CERDO, C., OROMI, J. Dietary factors and gastric cancer risk. A case-control study in Spain. **Cancer.** v. 71, p.1731-5, 1996.
37. VATANASAPT, V., SRIAMPORN, S., VATANASAPT, P. Cancer control in Thailand. **Jap J Clin Onc.**, v.32, p.82-91, 2002.
38. DE STEFANI, E., CORREA, P., BOFFETTA, P., DENEOPELLEGRINI, H., RONCO, A.L., MENDILAHARSU, M. Dietary patterns and risk of gastric cancer: a case-control study in Uruguay. **Gastric Cancer**, v.7, p.211-220, 2004.
39. KOLONEL, L. N., NOMURA, A. M., HIROHATA, T., HANKIN, J. H., HINDS, M. W. Association of diet and place of birth with stomach cancer incidence in Hawaii Japanese and Caucasians. **Am J Clin Nutr.**, v.34, p.2478-85, 1981.
40. COGGON, D., OSMOND, C., BARKER, D.J. Stomach cancer and migration within England and Wales. **Br J Cancer.**, v.61, p. 573-4, 1990.
41. TATEMATSU, M., TAKAHASHI, M., FUKUSHIMA, S., HANANOUCHEI, M., SHIRAI, T. Effects in rats of sodium chloride on experimental gastric cancers induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline-1-oxide. **J Natl Cancer Inst.**, v.55, p.101-106, 1975.
42. TAKAHASHI, M., HASEGAWA, R. Enhancing effects of dietary salt on both initiation and promotion stages of rat gastric carcinogenesis. **Princess Takamatsu Symp.** v. 16, p.169-182, 1985.
43. BOGOVSKI, P., BOGOVSKI, S. Animal species in which N-nitroso compounds induce cancer. **Int J Cancer.** , v.27, p.471-74, 1981.

44. KONO, S., HIROHATA, T. Nutrition and stomach cancer. **Cancer Causes Control.**, v.7, p. 41–55, 1996.
45. MUÑOZ, N., FRANCESCHI, S. Epidemiology of gastric cancer and perspectives for prevention. **Salud Publica Mex.**, v.39, p.318-30, 1997.
46. TERRY, P., LAGERGREN, J., HANSEN, H., WOLK, A., NYREN, O. Fruit and vegetable consumption in the prevention of oesophageal and cardia cancers. **Eur J Cancer Prev.**, v.10, p.365-9, 2001.
47. NOMURA, A.M., HANKIN, J.H., KOLONEL, L.N., WILKENS, L.R., GOODMAN, M.T., STEMMERMANN, G.N. Case-control study of diet and other risk factors for gastric cancer in Hawaii (United States). **Cancer Causes Control**, v.14, p.547-558, 2003.
48. POREMBA, C., UANDELL, D.W., HUANG, Q., LITTLE, J.B., MELLIN, W., SCHMID, K.W., BOCKER, W., DOCKHORN-DWORNICZAK, B. Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer: a molecular genetic and immunohistochemical study. **Virchows Arch.**, v.426, p.447-55, 1995.
49. EICHHOLZER, M., GUTZWILLER, F. Dietary nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. **Nutr Rev.**, v.56, p.95–105, 1998.
50. YUAN, J.M., ROSS, R.K., GAO, Y.T., QU, Y.H., CHU, X.D., YU, M.C. Prediagnostic levels of serum micronutrients in relation to risk of gastric cancer in Shanghai, China. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v.13, p.1772-1780, 2004.
51. WORLD CANCER RESEARCH FUND, AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective.** Washington: American Institute for Cancer Research, 1997.
52. AMERICAN HEART ASSOCIATION. AHA dietary guidelines: revision 2000. A statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the American Heart Association. **Circulation.**, v.102, p.2284-99, 2000.
53. TERRY, P., NYREN, O., YUEN, J. Protective effect of fruits and vegetables on stomach cancer in a cohort of Swedish twins. **Int J Cancer.**, v.76, p.35-37, 1998.
54. KNELLER, R. W. McLAUGHLIN, J. K., BJELKE, E. A cohort study of stomach cancer in a high-risk American population. **Cancer**, v.68, p.672-8, 1991.
55. BOTTERWEEK, A. A., BRANDT, P. A., GOLDBOHM, R. A. A prospective cohort study on vegetable and fruit consumption and stomach cancer risk in The Netherlands. **Am J Epidemiol.**, v.148, p.842-53, 1998.
56. JANSEN, M.C., BUENO-DE-MESQUITA, H.B., RASANEN, L., FIDANZA, F., MENOTTI, A., NISSINEN, A., FESKENS, E.J., KOK, F.J., KROMHOUT, D. Consumption of plant foods and stomach cancer mortality in the seven countries study. Is grain consumption a risk factor? Seven Countries Study Research Group. **Nutr Cancer**, v.34: 49-55, 1999;

57. McCULLOUGH, M.L., ROBERTSON, A.S., JACOBS, E.J., CHAO, A., CALLE, E.E., THUN, M.J. A prospective study of diet and stomach cancer mortality in United States men and women. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** v.10, p.1201-1205, 2001.
58. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (VIGISUS I). INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE CONTROLE DO CÂNCER. **Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis: Brasil, 15 capitais e Distrito Federal, 2002-2003.** Rio de Janeiro: INCA, 2004.
59. NISHIMOTO, I.N., HAMADA, G.S., KOWALSKI, L.P., RODRIGUES, J.G., IRIYA, K., SASAZUKI, S., *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, p.277-83, 2002.
60. PEEK, R. M. JR, BLASER, M. J. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nat Rev Cancer.**, v.1, p.28-37, 2002.
61. WELIN, M., HOLMGREN, N. M., NILSSON, P., ENROTH, H. Statistical model of the interactions between Helicobacter pylori infection and gastric cancer development. **Helicobacter.**, v.8(1), p.72-8, 2003.
62. GO, M. F. Review article: natural history and epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Aliment Pharmacol Ther.*, v.16 Suppl 1, p.3-15, 2002.
63. IARC, **Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Schistosomes, liver lukes and Helicobacter pylori.** Lyon, 1994. p.1-241.
64. MARSHALL, B., Helicobacter pylori: 20 Years. **On. Clin Med.**, v.2(2), p. 147-52; 2002.
65. THE EUROGAST STUDY GROUP. An international association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer. **Lancet.**, v.341(8857), p.1359-62, 1993]
66. GO, M. F., CROWE, S. E. Virulence and pathogenicity of Helicobacter pylori. **Gastroenterol Clin North Am.** v.29, p.649-70, 2000.
67. MONTECUCCO, C., RAPPUOLI, R. Living dangerously: How Helicobacter pylori survives in the human stomach. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v.2, p.457-66, 2001.
68. BJÖRKHOLM, B., FALK, P., ENGSTRAND, L., NYRÉN, O. *Helicobacter pylori*: resurrection of the cancer link. **J Int Med.**, v.253, p.102-119, 2003.
69. SIPPONEN, P. Atrophic gastritis as a premalignant condition. **Ann Med.**, v.21(4), p.287-90, 1989.
70. KUIPERS, E. J., PEREZ-PEREZ, G. I., MEUWISSEN, S. G., BLAZER, M. J. Helicobacter pylori and atrophic gastritis: importance of the cagA status. **J Natl Cancer Inst.**, v.87(23), p.1777-80, 1995.
71. VALLE, J., KEKKI, M., SIPPONEN, P., IHAMAKI, T., SIURALA, M. Long-term course and consequences of Helicobacter pylori gastritis. Results of a 32-year follow-up study. **Scand J Gastroenterol.**, v.31, p.546-50, 1996

72. SIPPONEN, P., KIMURA, K. Intestinal metaplasia, atrophic gastritis and stomach cancer: trends over time. **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, v.6 Suppl 1, p.S79-83, 1994.
73. ATHERTON, J. C., H. pylori virulence factors. **Br Med Bull.**, v.54(1), p.105-20, 1998.
74. GONZALEZ, C. A., SALA, N., CAPELLA, G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. **Int J Cancer**, v.100, p.249-260, 2002.
75. COVER, T. L., DOOLEY, C. P., BLASER, M. J. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. **Infect Immun.**, v.58(3), p.603-10, 1990.
76. RUDI, J., RUDY, A., MAIWALD, M., KUCK, D., SIEG, A., STREMMEL, W. Direct determination of *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA gene in gastric biopsies and relationship to gastrointestinal diseases. **Am J Gastroenterol.**, v.94(6), p.1525-31, 1999.
77. ATHERTON, J. C., CAO, P., PEEK, R. M. JR., TUMMURU, M. K., BLASER, M. J., COVER, T. L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J Biol Chem.**, v.270, p.17771-7, 1995.
78. DOORN, L. J., FIGUEIREDO, C., ROSSAU, R., JANNES, R., ASBROECK, M., SOUSA, J. C., CARNEIRO, F., QUINT, W. G. V. Typing of *Helicobacter pylori* vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. **J Clin Microb.**, v.36, p.1271-6, 1998
79. ATHERTON, J. C., PEEK, R. M., THAM, K. T., COVER, T. L., BLASER, M. J. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolation cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology.**, v.112, p.92-9, 1997.
80. TUMMURU, M. K., COVER, T. L., BLASER, M. J. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. **Infect Immun.** 1(5): 1799-809, 1993.
81. TUMMURU, M. K., SHARMA, S. A., BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. **Mol Microbiol.**, v.18(5), p.867-76, 1995.
82. PONZETTO, A., DE GIULI, M., SOLDATI, T., SANSEVERINO, P., MORGANDO, A. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cagA status. **J Natl Cancer Inst.**, v.88, p.1000, 1996.
83. PARSONNET, J., FRIEDMAN, G. D., ORENTREICH, N., VOGELMAN, H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. **Gut.**, v.40(3), p.297-301, 1997.
84. PEEK, R. M. JR, BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nat Rev Cancer.**, v.(1), p.28-37, 2002.

85. ISRAEL, D. A., PEEK, R. M. Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.15(9), p.1271-1290, 2001
86. RUGGE, M., GENTA, R. M. Epstein-barr virus: a possible assonplice in gastric oncogenesis. **J Clin Gastroent**. v.29, p.3-5, 1999.
87. TAKADA, K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. **British Medical Journal**. v.53, p.255-261, 2000.
88. OSATO, T., IMAI, S. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. **Semin Cancer Biol.**, v.7, p.175-82, 1996.
89. BALDANTI, F., GROSSI, P., FURIONE, M., SIMONCINI, L., SARASINI, A., COMOLI, P., MACCARIO, R., FIOCCHI, R., GERNA, G. High levels of Epstein-barr virus DNA in blood of solid organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders. **J Clin Microb.**, v.38, p.613-9, 2000.
90. GURTSEVICH, V. E., GALETSKII, S. A., NERED, S. N., NOVIKOVA, E. V., IAKOVLEVA, L. S., LAND, C. H. E., DAVYDOV, M. I., KLIMENKOV, A. A., PETROVICHEV, N. N., TOKUNAGA, M. Detection and characterization of gastric carcinoma associated with epstein-barr herpes virus. **Vestn Ross Akad Med Nauk**. v.3, p.56-9, 1999.
91. SCHNEIDER, B. G., GULLEY, M. L., EAGAN, P., BRAVO, J. C., MERA, R., GERADTS, J. Loss of p16/CDKN2A tumor suppressor protein in gastric adenocarcinoma is associated with Epstein-barr virus and anatomic location in the body of the stomach. **Hum Pathol.**, v.31, p.45-50, 2000
92. VO, Q. N., GERADTS, J., GULLEY, M. L., BOUDREAU, D. A., BRAVO, J. C., SCHENEIDER, B. G. Epstein-barr virus in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. **J Clin Pathol.**, v.55, p.669-675, 2002.
93. LA VECCHIA, C., NEGRI, E., FRANCESCHI, S., *et al.* Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. **Cancer.**, v.70, p.50-55, 1992.
94. BEVAN, S., HOULSTON, R. S. Genetic predisposition to gastric cancer. **QJM.**, v.92(1), p.5-10, 1999.
95. STEMMERMANN, G., HEFFELFINGER, S. C., NOFFSINGER, A., HUI, Y. Z., MILLER, M. A., FENOGLIO-PREISER, C. M. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: oncogenes, tumor suppressor genes, and growth factors. **Hum Pathol.**, v.25(10), p.968-81, 1994.
96. TAHARA, E. Molecular biology of gastric cancer. **World J Surg.**, v.19(4), p.484-8, 1995.
97. CORREA, P., SHIAO, Y. H. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.54(7 Suppl), p.1941s-1943s, 1994.
98. TAKEICHI, M. Cadherins. a molecular family important in selective cell-cell adhesion. **Annu Rev Biochem**, v.59, p.237-52, 1990.

99. ALATTIA, J. R., KUROKAWA, H., IKURA, M. Structural view of cadherin-mediated cell-cell adhesion. **Cell. Mol. Life Sci.** v.55, p.359-367, 1999.
100. CROIX, B., SHEEHAN, C., RAK, J. W. FLORENES, V. A., SLINGERLAND, J. M. E-cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27_KIP1. **The Journal of Cell Bio**, v.142, p.557-571, 1998.
101. TAKEICHI, M. The cadherin cell adhesion receptor family: roles in multicellular organization and neurogenesis. **Prog Clin Biol Res.**, v.390, p.145-53, 1994.
102. ODA, T., KANAI, Y., OYAMA, T. E-cadherin gene mutation in human gastric carcinoma cell lines. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 91, p.1858-62, 1994.
103. YOSHIURA, K., KANAI, Y., OCHIAI, A., SHIMOYAMA, Y., SUGIMURA, T., HIROHASHI, S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.92(16), p.7416-9, 1995.
104. MACHADO, J. C., OLIVEIRA, C., CARVALHO, R., SOARES, P., BERX, G., CALDAS, C., SERUCA, R., CARNEIRO, F., SOBRINHO-SIMÕES, M. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. **Oncogene.** v.20, p.1525-8, 2001.
105. ATTWOOD, J. T., YUNG, R. L., RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci.**, v.59(2), p.241-57, 2002.
106. CHAN, A. O., LAM, S. K., WONG, B. C., WONG, W. M., YUEN, M. F., YEUNG, Y. H., HUI, W. M., RASHID, A., KWONG, Y. L. Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. **Gut.**, v.52, p.502-6, 2003.
107. TAMURA, G., YIN, J., WANG, S., FLEISHER, A. S., ZOU, T., ABRAHAM, J. M., KONG, D., SMOLINSKI, K. N., WILSON, K. T., JAMES, S. P., SILVERBERG, S. G., NISHIZUKA, S., TERASHIMA, M., MOTOYAMA, T., MELTZER, S. J. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. **J Natl Cancer Inst.**, v.92(7), p.569-73, 2000.
108. KANG, G. H., SHIM, Y. H., JUNG, H. Y., KIM, W. H., RO, J. Y., RHYU, M. G. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. **Cancer Res.**, v. 61(7), p.2847-51, 2001.
109. SHIM, Y. H., KANG, G. H., RO, J. Y. Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. **Lab Invest.**, v.80(5), p.689-95, 2000.
110. AKAMA, Y., YASUI, W., KUNIYASU, H., YOKOZAKI, H., AKAGI, M., TAHARA, H., ISHIKAWA, T., TAHARA, E. Genetic status and expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors in human gastric carcinoma cell lines. **Jpn J Cancer Res.**, v.87(8), p.824-30, 1996.
111. LEE, Y. Y., KANG, S. H., SEO, J. Y., JUNG, C. W., LEE, K. U., CHOE, K. J., KIM, B. K., KIM, N. K., KOEFFLER, H. P., BANG, Y. J. Alterations of p16INK4A and p15INK4B genes in gastric carcinomas. **Cancer.**, v.80(10), p.1889-96, 1997.

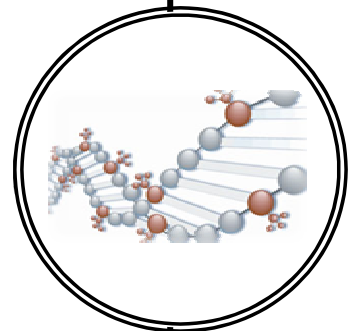
112. TOYOTA, M., AHUJA, N., SUZUKI, H., ITOH, F., OHE-TOYOTA, M., IMAI, K., BAYLIN, S. B., ISSA, J. P. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. **Cancer Res.**, v.59(21), p.5438-42, 1999.
113. KANG, G. H., LEE, S., KIM, J. S., JUNG, H. Y. Profile of aberrant CpG island methylation along multistep gastric carcinogenesis. *Lab Inv.*, v.83, p.519-26, 2003. S. Toyooka, K.O. Toyooka, K. Miyajima, J.L. Reddy, M. Toyota, U.G. Sathyanarayana, A. Padar, M.S. Tockman, S. Lam, N. Shivapurkar, A.F. Gazdar, Epigenetic Down-Regulation of Death-associated Protein Kinase in Lung Cancers, **Clin Cancer Res.**, v.9, p.3034-30, 2003.
114. WALKER, M.M. Cyclooxygenase-2 expression in early gastric cancer, intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori* infection. **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, v.14, p.347-9, 2002.
115. RISTIMAKI, A., HONKANEN, N., JANKALA, H., SIPPONEN, P., HARKONEN, M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. **Cancer Res.**, v.57(7), p.1276-80, 1997.
116. KIM, J. M., KIM, J. S., JUNG, H. C., SONG, I. S., KIM, C. Y. Upregulated cyclooxygenase-2 inhibits apoptosis of human gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. **Dis Dis Sci.**, v.45, p.2436-43, 2000
117. KONTUREK, P. C., KONTUREK, S. J., HARTWICH, A., HAHN, E. G. *Helicobacter pylori* infection and gastrin and cyclooxygenase expression in gastric and colorectal malignancies. **Regul Pept.**, v.93, p.13-19, 2002.
118. TSUJII, M., KAWANO, S., DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.94(7), p.3336-40, 1997.
119. TOYOTA, M., SHEN, L., OHE-TOYOTA, M., HAMILTON, S. R., SINICROPE, F. A., ISSA, J. P. Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. **Cancer Res.**, v.60(15), p.4044-8, 2000.
120. RENAULT, B., CALISTRI, D., BUONSANTI, G., NANNI, O., AMADORI, D., RANZANI, G. N. Microsatellite instability and mutations of p53 and TGF-beta RII genes in gastric cancer. **Hum Genet.**, v.98(5), p.601-7, 1996.
121. RHYU, M. G., PARK, W. S., MELTZER, S. J. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. **Oncogene.**, v.9, p.29-32, 1994.
122. IACOPETTA, B., GRIEU, F. Routine detection of replication error phenotype in clinical tumor specimens using fluorescence-SSCP. **BioTechniques**, v.28, p.566-70, 2000.
123. SANKILA, R., AALTONEN, L. A., JARVINEN, H. J., MECKLIN, J. P. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. **Gastroenterology**. v.110(3), p.682-7, 1996.
124. ZHOU, X. P., HOANG, J. M., LI, Y. J., SERUCA, R., CARNEIRO, F., SOBRINHO-SIMÕES, M., LOTHE, R. A., GLEESON, C. M., RUSSELL, S. E., MUZEAU, F., FLEJOU, J. F., HOANG-XUAN, K., LIDEREAU, R., THOMAS, G., HAMELIN, R. Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for

- matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. **Genes Chromosomes Cancer.**, v.21(2), p.101-7, 1998.
- 125.LEUNG, S. Y. , YUEN, S. T., CHUNG, L. P., CHU, K. M., CHAN, A. S., HO, J. C. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. **Cancer Res.**, v.59(1), p.159-64, 1999.
- 126.FLEISHER, A. S., ESTELLER, M., WANG, S., TAMURA, G., SUZUKI, H., YIN, J., ZOU, T. T., ABRAHAM, J. M., KONG, D., SMOLINSKI, K. N., SHI, Y. Q., RHYU, M. G., POWELL, S. M., JAMES, S. P., WILSON, K. T., HERMAN, J. G., MELTZER, S. J. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. **Cancer Res.**, v.59(5), p.1090-5, 1999.
- 127.KANG, G. H., SHIM, Y. H., RO, J. Y. Correlation of methylation of the hMLH1 promoter with lack of expression of hMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. **Lab Invest.**, v.79(7), p.903-9, 1999.
- 128.HSING, A. W., HANSSON, L. E., MCLAUGHLIN, J. K., NYREN, O., BLOT, W. J., EKBOM, A., FRAUMENI, J. F. Pernicious anemia and subsequent cancer. A population-based cohort study. **Cancer.**, v.71(3), p.745-50, 1993.
- 129.DUBROW, R. Gastric cancer following peptic ulcer surgery. **J Natl Cancer Inst.**, v.85(16), p.1268-70, 1993
- 130.KOIZUMI, Y., TSUBONO, Y., NAKAYA, N., KURIYAMA, S., SHIBUYA, D., MATSUOKA, H., TSUJI, I. Cigarette smoking and the risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan. **Int J Cancer.** v.112, p.1049-1055, 2004.
- 131.ENGELAND, A., ANDERSEN, A., HALDORSEN, T., TRETLI, S. Smoking habits and risk of cancers other than lung cancer: 28 years' follow-up of 26,000 Norwegian men and women. **Cancer Causes Control.** v.7, p.497-50, 1996.
- 132.GONZALEZ, C.A., PERA, G., AGUDO, A., PALLI, D., KROGH, V., VINEIS, P., TUMINO, R., PANICO, S., BERGLUND, G., SIMAN, H., NYREN, O., AGREN, A., MARTINEZ, C., DORRONSORO, M., BARRICARTE, A., TORMO, M.J., *et al.* Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). **Int J Cancer**, v.107, p.629-634, 2003.
- 133.NOMURA, A., GROVE, J. S., STEMMERMANN, G. N., SEVERSON, R. K., Cigarette smoking and stomach cancer. **Cancer Res.**, v.50(21), p.7084, 1990.
- 134.LAGERGREN, J., BERGSTROM, R., LINDGREN, A., NYREN, O. The role of tobacco, snuff and alcohol use in the aetiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia. **Int J Cancer.** v.1, p.340-6, 2000.

Methylation Status and MSI frequency in gastric carcinomas: association with *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr Virus infection

[ARTIGO 2]

Status: submetido ao Periódico Científico Internacional



Análise das alterações genéticas e epigenéticas dos tumores gástricos infectados por *Helicobacter pylori* e *Vírus Epstein Barr*

Methylation Status and MSI frequency in gastric carcinomas: association with *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr Virus infection.

[ARTIGO 1]

Autoria

Adriana Camargo Ferrasi¹, Nídia Alice Pinheiro¹, Silvia Helena Barem Rabenhorst², Otávia Luiza Caballero³, Maria Aparecida Rodrigues⁴, Fabrício Carvalho⁵, Celso Vieira de Souza Leite⁶; Márcia Valéria Pitombeira Ferreira², Marcos Aurélio Pessoa Barros²; Maria Inês de Moura Campos Pardini¹

¹Lab. Biologia Molecular, Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista/Campus de Botucatu / ²Depto. de Patologia e Medicina Forense – Universidade Federal do Ceará – UFC / ³Ludwig Institute of Cancer Research, New York-USA / ⁴Depto. de Cirurgia, Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista/Campus de Botucatu / ⁵Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo / ⁶Depto. de Cirurgia, Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista/Campus de Botucatu

Resumo

O câncer gástrico (CG) é um dos tipos mais comuns de câncer e apresenta altas taxas de mortalidade. Embora seja observada redução em sua incidência, o prognóstico para essa doença permanece ruim, principalmente quando o diagnóstico é feito nos estádios avançados. Recentes evidências têm identificado a metilação do DNA como um mecanismo importante na inativação de genes supressores de tumor. Infecção por *Helicobacter pylori* é considerada como um dos principais fatores etiológicos e o gene bacteriano *CagA* é associado com doenças gastroduodenais mais severas, incluindo câncer. Igualmente, o vírus *Epstein-Barr* é um outro agente infeccioso associado a pelo menos 10% dos casos de câncer gástrico. Neste estudo, nós determinamos o padrão de metilação dos genes *CDH1*, *DAPK*, *COX2*, *hMLH1* e *CDKN2A* e a frequência da Instabilidade de Microsatélites (MSI) em 89 amostras de tumores gástricos primários e buscamos por correlações com a infecção por *Helicobacter pylori* e vírus *Epstein Barr* e também, com características clinicopatológicas dos adenocarcinomas gástricos. *COX2* foi o gene com a maior frequência de metilação (63.5%) nestes pacientes, seguido por *DAPK* (55.7%), *CDH1* (51%), *CDKN2A* (36%) e *hMLH1* (30.3%). Nesse estudo, MSI foi associado com metilação em *hMLH1* e inversamente correlacionado com metilação do gene *DAPK*. Também, MSI foi inversamente correlacionado com presença de cepas *H. pylori CagA⁺*, sugerindo novas evidências para a associação entre MSI e melhor prognóstico.

Abstract

Gastric cancer (GC) is one of the most common cancer types and it is associated with high mortality frequencies. Although a decrease in the worldwide incidence is observed, the prognosis of this disease still remains poor, mainly when the diagnosis is carried out at advanced stages. Recent evidences have identified DNA methylation as an important mechanism for tumor suppressor gene inactivation. *Helicobacter pylori* infection is considered one of the most important etiological factors and the CagA gene is associated with more severe pathologies including cancer. Likewise, EBV is another infectious agent that has been associated with gastric carcinoma in at least 10% of the cases. In this study, we determined the promoter methylation status of the *CDH1*, *DAPK*, *COX2*, *hMLH1* and *CDKN2A* and MSI frequency in 89 primary gastric carcinomas and correlated the findings with the presence of *H. pylori* and *EBV* infections and also with clinicopathological features of gastric carcinomas. *COX2* was the most frequently hypermethylated gene (63.5%) in these patients, followed by *DAPK* (55.7%), *CDH1* (51%), *CDKN2A* (36%) and *hMLH1* (30.3%). In this study, MSI was correlated with *hMLH1* methylation, as shown before, and there was an inverse correlation between *DAPK* hypermethylation and MSI. Also, MSI was inversely correlated with *H. pylori* CagA⁺, providing new evidence for the association of MSI and better prognosis.

Introduction

Gastric cancer (GC) is one of the most common cancer types and it is associated with high mortality frequency.[1] In the last decades, a decrease in the worldwide incidence and some changes in therapeutical and diagnostic modalities have taken place. However, the prognostic of this disease remains poor, mainly when the diagnosis is undertaken at advanced stages.[2] The most effective therapy is still the surgical resection but in a significant number of the cases, especially in the advanced stages, it is only palliative. Thus, studies that elucidate the mechanisms that act in gastric carcinogenesis and search for possible markers that can assist in its earlier diagnosis as well in therapeutic approaches are relevant.

More than 90% of GCs are adenocarcinomas, which can be divided into intestinal or diffuse histological types. The natural history of GC is complex and not entirely understood. The most accepted hypothesis is related to the intestinal type, in which environmental factors, such as *Helicobacter pylori* (HP) infection, may play a role and it is characterized by precursor lesions of gastric mucosa, followed by intestinal metaplasia that can lead to dysplasia. In contrast, in the diffuse type carcinoma no precursor lesions have been identified to date.[3]

In gastric carcinogenesis, as well as in other tumors, mutations and deletions are important in tumor suppressor genes inactivation. However, many studies have identified the transcriptional silencing DNA methylation as a second mechanism responsible for tumor suppressor gene inactivation. Aberrant methylation of promoter CpG islands leads to DNA structural changes and as a consequent gene inactivation.[4,5] Several cancers, including colon, liver, breast, lung, melanoma and gastric shows aberrant methylation of multiple genes as *CDH1*, *DAPK*, *COX2*, *hMLH1*, *CDKN2A*. [6,7] Aberrant methylation in these tumor-related genes has also been frequently detected in gastric cancer (reviewed in Tamura, 2006).[8]

Microsatellite Instability (MSI) reflects an erroneous form of DNA replication in repetitive microsatellite sequences and has been considered a hallmark of mismatch repair gene inactivation. MSI was first described in tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC).[9] Studies have shown that MSI is associated with less aggressive tumor behavior and favorable prognosis in sporadic colorectal cancer.[10,11] In gastric cancer, MSI has been observed in a subset of gastric carcinomas with frequencies ranging from 13% to 39% [12,13] and has been recognized as one the earliest changes in the gastric carcinogenesis.[14] In gastric carcinomas, MSI status has been determined using BAT26 mononucleotide repeats because this marker is

quasimonomorphic in normal DNA and has shown high sensitivity and specificity for the identification of MSI phenotype.[12,15,16]

Helicobacter pylori, carcinogen Class I [17], is one of the most important etiological factors in GC .[18,19] *H. pylori* colonizes the gastric epithelium and causes an extended and severe inflammatory reaction that depends on factors including host genetic susceptibility, immune response, age at the time of initial infection, environment and virulence factors as cytotoxin-associated gene A (*CagA*) and vacuolating cytotoxin A (*VacA*).[19] The complex interactions among the different types of HP, inflammation and genetic features of the host should promote a cascade of morphologic events leading to gastric cancer.[20,21]

Apart from the accepted role of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of GC, the human *Epstein Barr Virus* (EBV) has been associated with gastric carcinoma in at least 10% of cases.[22] However, some regional differences were found. Countries with the highest incidences are Japan (19.3%) and Germany (18%).[22,24] In Brazil, frequencies of EBV infection between 8 and 11% were described.[25,26] The exact mechanism by which EBV contributes to the development of gastric cancers remains to be established.

Although there are many reports showing high frequencies of promoter hypermethylation in gastric carcinoma, in only a few studies MSI was also simultaneously analyzed, but no study has so far has also evaluated in the same samples the both microbiological agents. In this study, we determined the promoter methylation status of the *CDH1*, *DAPK*, *COX2*, *hMLH1* and *CDKN2A* and MSI frequency in 89 primary gastric carcinomas and correlated the findings with the presence of *H. pylori* (*CagA*⁺ and *CagA*) and EBV infections and also with clinicopathological features of gastric carcinomas.

Materials and methods

Samples

Eighty nine gastric adenocarcinomas and their corresponding adjacent normal tissue were obtained surgically from Brazilian patients at the Federal University of Ceara (Ceara state), Clinical Hospital of the Botucatu Medical College and Amaral Carvalho Hospital (Sao Paulo state) and immediately frozen in liquid nitrogen until micro-dissection and DNA extraction. Committee of Ethics in Research of each institutions approved this study and each subject signed an informed consent form before tissue was obtained. Histopathological analyses determined that the tumor specimens consisted mainly (>80%) of tumor tissues and that the adjacent tissue was free of tumor cells. The histological classification was made according to the Laurèn classification system [3] and the tumors were staged according to the TNM criteria.[27] DNA was extracted by standard methods [28] and its quality was evaluated by Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of *GAPDH*.

Bisulfite Modification and MSP (Methylation-Specific PCR)

DNA from both tumoral and normal tissues were subjected to treatment with sodium bisulfite as described.[29] Briefly, 2 µg of DNA were denatured by treatment with 2 µL 3M NaOH and the mixture was heated at 50°C for 20 minutes. Five hundred µL of bisulfite (0.24g) (Sigma-Aldrich) and hydroquinone (0.02g) mixture was added to the denatured DNA solution and heated at 70°C for 3 hours. Next, the DNAs were purified using Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), treated with 3M NaOH, precipitated in ethanol and resuspended in 50µL of distilled water and used immediately or stored at -80°C. The modified DNA was amplified with primers specific for either the methylated, or unmethylated sequences for the *hMLH1*, *COX2*, *DAPK*, *CDKN2A* and *CDH1*. Primers sequences and the annealing temperatures are listed in Table 1. PCR was individually performed in 25µL reaction volumes, containing 1x platinum *Taq* buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTPs, 0.4 µM of each primer set, 1 unit of Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), and 1µL of treated DNA. DNA methylated *in vitro* by Sss-I methylase (New England Biolabs) was used as a positive control and water and DNA from peripheral lymphocytes of healthy donors were used as negative controls. PCR products were separated on 6% non-denaturing polyacrylamide gels [28] that were subsequently submitted to silver-staining.[30]

Table 1. Primer Sequences and PCR conditions for MSP PCR analysis

GENE	Primer (5'-3') Foward	Primer (5'-3') Reverse	Size (bp)	T (°C)	Ref.
<i>COX2</i>	M TTAGATACGGCGGCGGCGGC	TCTTTACCCGAACGCTTCCG	161	68	[31]
	U ATAGATTAGATATGGTGGTGGTGGT	CACAATCTTTACCCAAACACTTCCA	171	67	
<i>DAPK</i>	M GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	CCCTCCCAAACGCCGA	98	65	[32]
	U GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	CAAATCCCTCCCAAACACCAA	116	65	
<i>CDH1</i>	M TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT	TAACTAAAAATTCACCTACCGAC	115	61	[29]
	U TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT	CACAACCAATCAACAACACA	97	59	
<i>hMLH1</i>	M TATATCGTTCGTAGTATTCTGT	TCCGACCCGAATAAACCCAA	153	65	[33]
	U TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	124	63	
<i>CDKN2A</i>	M TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGGACCGTAA	150	70	[29]
	U TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCAACCATATA	151	70	

M, methylated sequence; U, unmethylated sequence

Bisulfite sequencing analysis

For confirmation of the specificity of reaction, MSP-PCR products from each gene analyzed were cloned with TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) and sequenced using the ABI PRISM® BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Methylated as well as unmethylated PCR products were sequenced.

Microsatellite instability analysis

MSI analysis was performed using BAT26 primer set (5'-TGACTACTTTTGGACTTCAGCC-3', sense and 5'-AACCATTCAACATTTTAAACCC-3', antisense). Sense primer was labeled with 6-FAM. PCR amplification was performed in a final volume of 25 µL containing 1X PCR buffer, 3.0 mM MgCl₂, 0.2 µM dNTPs, 0.4 µM of each primer, 2 units of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 50 ng of DNA, and using the Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). The thermal conditions were 94°C for 5 min followed by 40 cycles (94°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min) and a final extension at 72°C for 7 min. The dye-labeled PCR products were analyzed with ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer using Genescan 3.7 software (Applied Biosystems). Both tumor and normal samples were analyzed. Negative (SW480 cells) and positive (HCT116 cells) controls for MSI had been included in all the analyses. Deletions or insertions of at least 4 bp were required for definition of instability [34] and all cases with MSI were repeated twice.

Helicobacter pylori and CagA detection

Detection of *H. pylori* in gastric samples was performed for PCR amplification with primers specific to *H. pylori UreaseC* gene. The primer sequence used (5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3', sense and 5'-CTTACTTTCTAACAATAACGC-3', antisense) [35] amplifies a 294 bp fragment. To detect *CagA*, the primer set 5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3' (sense) and 5'-TTAGAATAATCAACAAACATAACGCCAT-3' (antisense) [36], amplifying a 297 bp fragment, was used. Each primer set (*UreaseC* and *CagA*) was used in a independent PCR reaction in a final volume of 25 µL containing 1X PCR buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8.4) and 50 mM KCl], 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTPs, 0.4 µM of each primer set, 1 unit of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 100 ng of DNA, under the following conditions: for *UreaseC* PCR, initial denaturation at 94°C for 3 min. followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec., annealing at 58°C for 30 sec. and extension at 72°C for 2 min and final extension at 72°C for 5 min. *CagA* PCR included an initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec., annealing at 58°C for 45 sec. and extension at 72°C for 2 min. and final extension at 72°C for 5 min. Both tumor and normal samples were analyzed. Negative and positive controls were assayed in each run. PCR products were separated on 6% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis [28] and silver-stained.[30]

EBER in situ hybridization

The presence of EBV was assessed by RNA in situ hybridization with a 30bp biotinylated probe (5'-AGACACCGTCCTCACCACCCGGGACTTGTA-3') complementary to the RNA EBER1, an EBV transcript shown in high amounts in the nuclei of latently infected cells. After the deparaffinization and rehydration, endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ solution. Enzymatic digestion was performed with proteinase K (0.02µg/µL) for 13 min at room temperature, subsequently, the tissues were dehydrated in gradient of ethanol and dried. The slides were incubated with prehybridization solution (Denhardt's solution [3.5X]; SSC [4.5X]; EDTA [0.0075M]; SDS [0.35%]; denatured salmon sperm DNA [75µg/mL]; NaH₂PO₄ [0.75M]; dextran sulfate [10%]) for 60 min at 37°C in humid chamber. Soon after, the slides were incubated with hybridization solution (Denhardt's solution [2X]; formamide [50%]; dextran sulfate [2%]; NaH₂PO₄ [0.002M]; probe [0.3ng/µL]) for 16 hours at 37°C in humid chamber. Signal amplification was employed with anti-biotin antibody (clone BK, mouse, dilution 1:20; DakoCytomation®) and biotinylated anti-immunoglobulin antibody (polyclonal, rabbit, dilution 1:100; DakoCytomation®), the reaction was detected with the streptavidin-biotinperoxidase complex (DakoCytomation®) and the diaminobenzidine chromogen (DakoCytomation®). The slides were counterstained with Harris's hematoxilin. A case of nasopharyngeal carcinoma was used as positive control.

Statistical analysis

For statistical analysis the Chi-square test or Fisher's exact test were used. P-value ≤ 0.05 was considered to be of statistical significance.

Results

Patients and Tumor Characteristics

Eight-nine gastric adenocarcinoma samples were obtained from consecutive patients (60 males and 29 females). The medium age of these patients was 61 years (range 23-98 years). Eleven patients (12.4%) had early tumors (stage 0 and I) and 78 (87.6%) presented advanced tumors (stage II-IV). Intestinal type was found in 57 (64%) cases, diffuse in 31 (34.8%) cases, and mixed type in one (1.1%). Lymph node metastasis was present in 71 (79.8%) cases. In 65 tumors there was information about the anatomic subsite localization: 13 (20%) were located at cardia, 39 (60%) were located at antrum and 10 (15.4%) at body and three cases of mixed sites. The clinicopathological and epidemiological features of patients are shown in Table 2.

Table 2. Clinicopathological features of patients in the four stages.

Variables	Patients	Tumor Stage			
		0-I	II	III	IV
Age					
≤ 50	19	3 (15.8%)	2 (10.5%)	9 (47.4%)	5 (26.3%)
> 50	70	8 (11.4%)	11 (15.7%)	30 (42.9%)	21 (30%)
Gender					
Male	60	8 (13.3%)	8 (13.3%)	27 (45%)	17 (28.3%)
Female	29	3 (10.3%)	5 (17.2%)	12 (41.4%)	9 (31%)
Anatomic subsite					
Proximal (Cardia)	13	1 (7.7%)	1 (7.7%)	5 (38.5%)	6 (46.1%)
Distal (Antrum/body)	46	2 (4.3%)	9 (19.6%)	21 (45.7%)	14 (30.4%)
Mixed	3	0 (0%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	0 (0%)
Laurén type					
Diffuse	31	4 (12.9%)	4 (12.9%)	12 (38.7%)	11 (35.5%)
Intestinal	57	7 (12.3%)	9 (15.8%)	27 (47.4%)	14 (24.6%)
Mixed	1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	01 (100%)

Methylation Status

Bisulfite genomic sequencing of the representative PCR products of each gene showed that all cytosines at non-CpG sites were converted to thymine, excluding the possibility that successful amplification attributable to incomplete bisulfite conversion (data not shown).

Of the five genes analyzed for the methylation status, *COX2* gene was the gene most frequently hypermethylated (63.5%) followed by *DAPK* (55.7%), *CDH1* (51%), *CDKN2A* (36%) and *hMLH1* (30.3%). Figure 1 displays representative examples of the MSP products analyzed by electrophoresis on a polyacrylamide gel.

In the diffuse cases, methylation of *CDH1*, *COX2* and *CDKN2A* had higher frequencies in early stage tumors (0-I) with a tendency for a decrease with the tumor grades (mainly *CDH1* and *COX2*); on the other hand, in the intestinal type, the methylation status of *CDH1*, *COX2*, *hMLH1* and *CDKN2A* tended to increase from the earliest stages (0-I) to advanced stages (II-IV), ($P < 0.001$); (Figure 2A and 2B). In relation to the age, as shown in figure 3, the methylation status tend to increase with the age, the highest frequency of cases with promoter methylation was found in patients between 45 to 64 years old. Patients with more than 50 years had a higher frequency of methylation in *CDKN2A* ($P = 0.035$, table 3).

To evaluate the general methylation status, methylation index (MI), defined as the number of methylated genes divided by the number of genes tested, was calculated. Sixty one (68.5%) cases presented 2 or more methylated genes (index ≥ 0.4) and 14 (15.4%) had no methylation in any of the five tested genes (index = 0.0). The average MI was similar in all tumor stages.

Table 3 summarizes overall results of the correlation of promoter hypermethylation frequency of each gene and relevant clinicopathological parameters.

Microsatellite instability analysis

MSI was observed in 17.2% of gastric cancers. In this group, the medium age was 63 years and the frequency was equal among males and females patients. Most of the patients with MSI tumors (86.7%) had advanced disease and lymph node metastasis was present in 66.7% of these patients. Intestinal and diffuse adenocarcinomas had similar frequencies of microsatellite instability. MSI status tended to be higher in tumors located in the distal stomach region (27%) compared to cardia (7.7%). There was a significant correlation between MSI and the *hMLH1* hypermethylation ($P=0.001$). Conversely, a significant inverse correlation was demonstrated between *DAPK* promoter methylation and microsatellite instability ($P=0.012$).

Table 3. Association between genes methylation status and clinicopathological features, age, *H. pylori*, MSI and EBV.

	Total	Methylated Genes									
		<i>CDH1</i>	<i>P-value</i>	<i>DAP-kinase</i>	<i>P-value</i>	<i>COX2</i>	<i>P-value</i>	<i>hMLH1</i>	<i>P-value</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>P-value</i>
Mean age		60.2		59.9		60.9		63.1		62.5	
Age Group											
≤ 50	19	10 (52.6%)	0.883	8 (44.4%)	0.282	9 (50%)	0.179	6 (33.3%)	0.903	3 (15.8%)	0.035*
> 50	69	35 (50.7%)		41 (58.6%)		45 (67.2%)		21 (31.8%)		29 (42%)	
Gender											
Male	59	30 (50.8%)	0.938	33 (55.9%)	0.946	34 (59.6%)	0.289	21 (35%)	0.787	21 (35.6%)	0.830
Female	29	15 (51.7%)		16 (55.2%)		20 (71.4%)		11 (37.9%)		11 (37.9%)	
Nodal Metastase											
Ausent	17	8 (47.1%)	0.708	9 (50%)	0.586	11 (64.7%)	0.910	6 (33.3%)	0.903	6 (33.3%)	0.764
Present	71	37 (52.1%)		40 (57.1%)		43 (63.2%)		21 (31.8%)		26 (37.1%)	
Tumor site											
Cardia	13	8 (61.5%)	0.855	9 (69.2%)	0.427	10 (83.3%)	0.228	4 (30.8%)	0.304	8 (61.5%)	0.266
Antrum	38	21 (55.3%)		20 (52.6%)		21 (56.8%)		14 (37.8%)		14 (35.9%)	
Body	10	5 (50%)		7 (70%)		7 (70%)		1 (11.1%)		4 (40%)	
Misted	3	3 (100%)		2 (66.7%)		3 (100%)		0		0	
Laurèn											
Diffuse	30	17 (56.7%)	0.503	10 (33.3)	0.628	19 (63.3%)	0.973	8 (27.6%)	0.481	10 (33.3%)	0.628
Intestinal	57	28 (49.1%)		22 (38.6)		34 (63%)		19 (35.2%)		22 (38.6%)	
Mixed	1	0 (0.0%)		0		1 (100%)		0		0	
<i>H. pylori</i>											
CagA ⁺	55	31 (56.4%)	0.261	30 (54.5%)	0.782	35 (66%)	0.536	15 (28.8%)	0.410	22 (40%)	0.468
CagA ⁻	34	15 (44.1%)		19 (57.6%)		19 (59.4%)		12 (37.5%)		11 (32.4%)	
MS status											
MSI	14	5 (35.7%)	0.174	4 (26.7%)	0.012*	8 (53.3%)	0.349	10 (66.7%)	0.001*	4 (26.7%)	0.405
MSS	72	40 (55.6%)		44 (62%)		45 (66.2%)		16 (23.5%)		27 (38%)	
EBV											
Positive	5	1 (20%)	0.101	4 (80%)	0.346	4 (80%)	0.694	0	0.179	3 (60%)	0.462
Negative	48	28 (58.3%)		28 (58.3%)		33 (71.7%)		15 (31.9%)		21 (42.9%)	

Detection of *Helicobacter pylori*

The presence of *H. pylori* (HP) was identified in 98% of GC patients. From those, 63.2% were *CagA* positive (*CagA*⁺). The frequency of HP *CagA*⁺ infection was similar among intestinal and diffuse adenocarcinomas (64.5% vs 59.6%). In the intestinal type, *CDH1* hypermethylation was more frequent in HP *CagA*⁺ cases (55.8%) than in those with HP *CagA*⁻ (39.1%) cases, while this was not observed in the diffuse type. Also, *CagA*⁺ among the intestinal cases has shown a higher frequency of *hMLH1* methylation than diffuse *CagA*⁺ cases (31.8% vs 15.8%). On the other hand, hypermethylation of *DAPK* and *COX2* did not vary when the samples had been grouped by histotype and *CagA* presence. Regarding to MSI and the presence of *CagA*, MSI was inversely correlated with presence of *CagA* gene (p=0.012; table 3)

Detection of Epstein Barr Virus

Fifty-four tumors were analyzed and 5 (9.3%) specimens were EBV-positive (EBV⁺). According to histological classification, 4 patients presented intestinal type and one was diffuse. All EBV⁺ cases were advanced grade (III and IV stages) and had lymph node metastasis. Two cases were EBV⁻/HP⁻. All EBV⁺ cases were associated with HP presence, but, only one was HP *CagA*⁺. Although the number of EBV positive cases was small, most of them displayed *DAPK*, *COX2* and *CDKN2A* hypermethylation.

Discussion

In this study, we tested the methylation status of *CDH1*, *DAPK*, *COX2*, *hMLH1* and *CDKN2A* genes in 89 cases of gastric adenocarcinoma and their association with microsatellite instability, presence of *Helicobacter pylori CagA*⁺, Epstein Barr Virus and clinicopathological features.

The results show a tendency of methylation status increasing with the age. This find is according with the fact that gastric cancer occurs with more frequency in older individuals.[1] Moreover, previous studies showed that some tumor suppressor and tumor-related genes can be methylated as an age-related phenomenon, and be also present in various non-neoplastic tissues, suggesting an association between age-related methylation and GC development.

In this study, we demonstrate that 84.3% of gastric cancers analyzed have methylation in about one of five genes analyzed. *COX2* was the most gene found hypermethylated (63.5%) followed by *DAPK* (55.7%), *CDH1* (51%), *CDKN2A* (36%) and *hMLH1* (30.3%). An interesting observation we made in this study was related to difference in methylation profiles in diffuse and intestinal types. In diffuse cases, the global methylation

status, specially of *CDH1*, *COX2* and *CDKN2A*, has the highest frequency in early stage tumors (0-I) with a tendency for decreasing with tumor grades; while in the intestinal type, the methylation status for *CDH1*, *COX2*, *hMLH1* and *CDKN2A* tended to increase from the earliest (0-I) to advanced stages (II-IV); figure 2A and 2B. *CDH1* hypermethylation was more frequent at diffuse histotype.[37] In fact, a great difference could be verify in stage I tumors where all diffuse tumors had *CDH1* promoter methylation (100%) while just small fraction (28.6%) was found in the intestinal type suggesting that the methylation of the *CDH1* gene is an early event in diffuse-type gastric cancers. Since *CDH1* plays a fundamental role in maintaining cell differentiation, polarity and normal tissue architecture [37], the diffusely growing and low cell cohesion characteristic of CG diffuse type could be a function of *CDH1* down-regulation. Differences in the clinicopathological features between intestinal and diffuse may be determined by different pathogenic processes in these two histologic subtypes of gastric cancer.[20,21,38] The data presented in this study shows that methylation in same crucial genes could be an important pathway for the development of diffuse types. Identification of epigenetic differences between these two pathways could be of great importance for the understanding of gastric carcinogenesis and useful in the delineation of new therapeutic strategies.

The mechanisms that are implicated in *CDH1* promoter methylation are yet to be identified. The role of *H. pylori* in the regulation of *CDH1* expression has described in recently studies showing that after *H. pylori* eradication, the methylation in *CDH1* promoter is decreased.[39,40] In our study, we observed that in the intestinal cases hypermethylation in *CDH1* promoter was more frequent in the group *HP CagA*⁺ (55.8%) than in those with *HP CagA*⁻ (39.1%), indicating that *H. pylori CagA*⁺ may be involved in the *CDH1* methylation in theses tumors.

DAPK hypermethylation has been shown to be associated with aggressive and metastatic phenotypes in some human cancers.[32,41] In this study, we found a substantial frequency of *DAPK* methylation. We observed that lymph node positive cases show a slightly higher frequency of *DAPK* methylation as compared with unmethylated cases (57.1% vs 42.9%). An important finding in this study was the inverse correlation observed between *DAPK* hypermethylation and microsatellite instability. Although the mechanisms linking MSI to *DAPK* promoter methylation are not known, this finding may provide a clue towards a better understanding of the association of MSI and better prognosis. *DAPK* participates in the positive control of apoptosis. Banerjea *et al.* [42] found that a large number of pro-apoptotic genes upregulated in MSI-H colorectal cancers and these cancers were characterized by increased apoptosis.

Similar to the results reported previously [43], 36.4% of the cases displayed *CDKN2A* hypermethylated. *Epstein Barr* Virus seems to play an important role in the methylation of the *CDKN2A*, in gastric cancer [43,44] or in other cancer types.[45,46] Although 60% of the cases EBV-positive had methylation of *CDKN2A* gene, the interpretation of such results deserves caution because of the low number of EBV-positive cases. In our study, methylation in *CDKN2A* promoter was more frequent in patients over 50 years of age ($P=0.035$), and it was also present in some samples of non-neoplastic gastric epithelia (data not shown) suggesting a link between aging and cancer via increase in methylation. However, it is noteworthy that younger patients (< 50 years) who did not have *CDKN2A* methylation still developed gastric cancer suggesting that other factors may account for the gastric carcinogenesis in these patients. In order to better evaluate in our population the correlation between *CDKN2A* and EBV infection it will be necessary to increase the number of tumors analyzed for EBV.

Our study revealed that most of the gastric tumors (63.5%) exhibit aberrant methylation of *COX2*. The correlation between *COX2* promoter methylation and gene downregulation has been well documented in the literature [47,48] although overexpression of *COX2* has also been reported in gastric cancers and some precancerous tissues.[49] *COX2* overexpression is associated with enhanced proliferation, angiogenesis, resistance to apoptosis and tumorigenesis.[49] Despite of the apparent selective advantage given by *COX2* overexpression, our results and others [50,51] suggest that *COX2* overexpression may not be essential in all cases of gastric tumorigenesis. Recent studies have documented that *H.pylori*-induced inflammation is linked to *COX2* overexpression [52,53] and these findings led us to investigate whether *CagA* presence was related with methylation status of *COX2*. In this study, no significant correlation between *CagA* and *COX2* status methylation was found. Thus, *CagA* presence seems not to be the only mechanism involved in the control of *COX2* expression in HP positive gastric cells.

Methylation of promoter regions is reported to be the main cause of inactivation of *hMLH1* since it has been demonstrated that mutation of *hMLH1* is quite rare in gastric cancer.[54] In this study, was found a significant relationship between *hMLH1* methylation and MSI ($p=0.001$), corroborating other studies.[55-57] In fact, hypermethylation of this mismatch repair gene has been shown to play a major role in Microsatellite Instability in several cancers. The data from MSI analyses found in this study (17.2%) was in accordance with other reports in the literature which range from 13% to 39%.[12,58] The association between MSI and clinicopathological characteristics of gastric cancer remains unknown. While some studies reported that MSI gastric tumors are associated with location distal of the tumor, intestinal histotype, fewer lymph node metastases and better prognosis [58,59]

others reported that no association was observed among these parameters.[60,61] In our data, 33.3% of MSI positive patients had no positive lymph nodes (N0) whereas 18.1% of them MSS had no positive lymph, suggesting a tendency for a better prognostic. Studies have detected that the frequency of MSI-H in *H. pylori*-positive group was significantly higher than in *H. pylori*-negative group [62,63] indicating that this agent may play an important role in the genetic stability. Several studies have suggested that the virulence attributed to the *HP-CagA*⁺ strains is associated to a severe inflammatory response. It is known that in the gastric mucosa, reactive oxygen species are released as a result of *H. pylori* infection [63] and, that the expression of DNA mismatch repair proteins in mismatch-competent cells might be transiently suppressed in the presence of oxidative stress.[65] In this study, when the cases were divided in two groups (*HP-CagA*⁺ and *HP-CagA*) we observed that, in contrast of our expectations, MSI was inversely correlated with *CagA* gene ($p=0.012$), suggesting that, apart the *CagA*, other factors may contribute to MSI occurrence. These results require further exploration on larger numbers of cases.

In conclusion, our results confirm that methylation is an epigenetic early event in the molecular pathogenesis of gastric cancer. The methylation pattern of the genes studied suggests that gastric tumorigenesis can occur following different pathways. It seems that in the diffuse tumors, methylation can be an early and crucial event for tumorigenesis, where methylation in *CDH1* assumes an important role and that MSI is associated to *hMLH1* methylation, but not a very frequent, event. The inverse association between *DAPK* promoter methylation and MSI provided new data for elucidating the mechanisms involved in the association of MSI and better prognosis. Analysis of a larger number of patients is necessary to confirm our findings and to ascertain the significance of the association between promoter methylation, MSI and presence of infectious agents in gastric carcinogenesis. All EBV positive had high methylation index, indicating that EBV could play any role in the methylation process. We observed that *Helicobacter pylori* *CagA*⁺ may be involved in the methylation process of *CDH1* in the intestinal adenocarcinoma. Microsatellite Instability was inversely correlated with *CagA* gene, suggesting that others factors may contribute to MSI occurrence.

Acknowledgments: We thank Marcia Cristina Ribeiro Pena for her dedication and contributions to the study.

Funding: The authors thank to *National Council for Scientific and Technological Development* (CNPq, Brazil) for fellowships to the first author. This project was supported in part by *Foundation for the Support of Research in the State of São Paulo* (FAPESP, Brazil).

Conflict of interest: none to declare.

References

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics:2002. *CA Cancer J Clin* 2005;**55**:74-108.
- 2 Wu CW, Hsieh MC, Lo SS, *et al.* Prognostic indicators for survival after curative resection for patients with carcinoma of the stomach. *Dig Dis Sci* 1997;**42**:1265-69.
- 3 Laurèn 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* 1965;**64**:31-49.
- 4 Kass SU, Pruss D, Wolffe AP. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 1997;444-9.
- 5 Razin A, Cedar H. DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev* 1991;**55**:451-8.
- 6 Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004;**22**:4632-42.
- 7 Esteller M, Corn PG, Baylin SB, *et al.* A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;**61**:3225-9.
- 8 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;**12**:192-198
- 9 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;**58**:5248-57.
- 10 Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, *et al.* Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal. *Cancer Lancet* 2000;**355**:1745-50.
- 11 Samowitz WS, Curtin K, Ma K, *et al.* Microsatellite Instability in Sporadic Colon Cancer Is Associated with an Improved Prognosis at the Population Level1. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2001;**10**:917-23
- 12 Halling KC, Harper H, Moskaluk CA, *et al.* Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *Am J Pathol* 1999;**155**:205-11
- 13 Choi SW, Choi JR, Chung YJ, *et al.* Prognostic implications of microsatellite genotypes in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2000;**89**:378-83.
- 14 Ottini L, Falchetti M, Lupi R, Rizzolo, *et al.* Patterns of genomic instability in gastric cancer: clinical implications and perspectives. *Ann Oncol* 2006;**17**:97-102

- 15 Zhou XP, Hoang JM, Li YJ, *et al.* Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;**21**:101-7.
- 16 Masahiko M, Eiso H, Yoshiaki M, *et al.* Fluorescent-based BAT26 analysis for distinct screening of microsatellite instability in colorectal cancers. *Int J Oncol* 2003;**22**:807-13
- 17 IARC, Schistosomes liver flukes and *Helicobacter pylori* Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC Science* 1994;pp 1-241.
- 18 Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, *et al.* *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991;**325**:1127-31.
- 19 Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, *et al.* Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998;**115**:58-66.
- 20 Correa P. The biological model of gastric carcinogenesis. *IARC Sci Publ* 2004;**157**:301-10.
- 21 Correa P, Haenszel W, Cuello C, *et al.* A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975;**2**:58-60.
- 22 Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 2000;**53**:255-61.
- 23 Ishii H, Gobe G, Kawakubo Y, *et al.* Interrelationship between Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas and the expression of apoptosis-associated proteins. *Histopathology* 2001;**38**:111-19.
- 24 Ott G, Kirchner T, Muller-Hermelink HK. Monoclonal Epstein-Barr virus genomes but lack of EBV-related protein expression in different types of gastric carcinoma. *Histopathology* 1994;**25**:323-29.
- 25 Lopes LF, Bacchi MM, Elgui-de-Oliveira D, *et al.* Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma in São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004;**37**:1707-12.
- 26 Koriyama C, Akiba S, Iriya K, *et al.* Epstein-Barr virus-associated Gastric Carcinoma in Japanese Brazilians and Non-Japanese Brazilians in São Paulo. *Jpn J Cancer Res* 2001;**92**:911-7
- 27 Stomach. In: American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer 2002:99-106.
- 28 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press NY, 1989:368p.
- 29 Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 1996;**93**:9821-6

- 30 Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotechniques* 1994;**17**:914-21
- 31 Akhtar M, Cheng Y, Magno RM, *et al.* Promoter methylation regulates *Helicobacter pylori*-stimulated cyclooxygenase-2 expression in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 2001;**61**:2399-403.
- 32 Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation of the DAP-Kinase CpG Island Is a Common Alteration in B-Cell Malignancies. *Blood* 1999;**93**:4347-53.
- 33 Kang GH, Shim YH, Jung HY, *et al.* CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma, *Cancer Res* 2001;**61**:2847-51.
- 34 Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, *et al.* BAT26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997;**57**:300-3.
- 35 Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1995;**33**:2752-56.
- 36 Covacci A, Rappuoli R. PCR amplifications of *H. pylori* gene sequences, In: Lee A, Megraud F, ed *Helicobacter pylori*: techniques for clinical diagnosis. London, United Kingdom:W B Saunders Company Ltd 1996:94-111.
- 37 Graziano F, Humar B, Guilford P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. *Ann Oncol* 2003;**14**:1705-13.
- 38 Wu M, Yang K, Shun C, *et al.* Distinct clinicopathologic characteristics of diffuse- and intestinal-type gastric cancer in Taiwan. *J Clin Gastroenterol* 1997;**25**:646-9.
- 39 Chan AO, Peng JZ, Lam SK, Wong *et al.* Reversal of E-cadherin promoter hypermethylation status after *Helicobacter pylori* eradication - implication in gastric cancer chemoprevention. *Gastroenterology* 2004;**126**:333
- 40 Leung WK, Man EP, Yu J, *et al.* Effects of *Helicobacter pylori* eradication on methylation status of E-cadherin gene in noncancerous stomach. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:3216-21.
- 41 Tang X, Khuri FR, Lee JJ, *et al.* Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;**92**:1511-6.
- 42 Banerjea A, Ahmed S, Hands RE, *et al.* Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol Cancer* 2004;**3**:21.

- 43 Sakuma K, Chong JM, Sudo M, *et al.* High-density methylation of p14ARF and p16INK4A in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004;**112**:273-8.
- 44 Vo QN, Geradts J, Gulley ML, *et al.* Epstein-barr virus in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. *J Clin Pathol* 2002;**55**:669-75.
- 45 Tong JH, Tsang RK, Lo KW, *et al.* Quantitative Epstein-Barr virus DNA analysis and detection of gene promoter hypermethylation in nasopharyngeal (NP) brushing samples from patients with NP carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;**8**:2612-9.
- 46 Kim NR, Lin Z, Kim KR, *et al.* Epstein-Barr virus and p16INK4A methylation in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the cervix uteri. *J Korean Med Sci* 2005;**20**:636-42.
- 47 Kikuchi T, Itoh F, Toyota M, *et al.* Aberrant methylation and histone deacetylation of cyclooxygenase 2 in gastric cancer. *Int J Cancer* 2002;**97**:272-7.
- 48 Song SH, Jong HS, Choi HH, *et al.* Bang, Transcriptional silencing of cyclooxygenase-2 by hyper-methylation of the 5' CpG island in human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 2001;**61**:4628-35.
- 49 Chang YJ, Wu MS, Lin JT, *et al.* Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor kappaB activation. *Mol Pharmacol* 2004;**66**:1465-77.
- 50 Huang L, Zhang KL, Li H, *et al.* Infrequent *COX2* expression due to promoter hypermethylation in gastric cancers in Dalian, China. *Hum Pathol* 2006;**37**:1557-67.
- 51 Wang BC, Guo CQ, Sun C, *et al.* Mechanism and clinical significance of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005;**11**:3240-4.
- 52 Shen H, Sun WH, Xue QP, *et al.* Influences of *Helicobacter pylori* on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandinE2 synthesis in rat gastric epithelial cells *in vitro*. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;**21**:754-8.
- 53 Guo XL, Wang LE, Du SY, *et al.* Association of cyclooxygenase-2 expression with Hp-cagA infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;**9**:246-9.
- 54 Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000;**87**:200-3.
- 55 Herman JG, Umar A, Polyak K, *et al.* Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**68**:70-5

- 56 Kang GH, Shim YH, Ro JY. Correlation of methylation of the hMLH1 promoter with lack of expression of hMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. *Lab Invest* 1999;**79**:903-9.
- 57 Yao Y., Tao H., Kim JJ, *et al.* Alterations of DNA mismatch repair proteins and microsatellite instability levels in gastric cancer cell lines. *Lab Invest* 2004;**84**:915-22.
- 58 Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sajantila A, *et al.* Differences in genomic instability between intestinal- and diffuse-type gastric cancer. *Gastric Cancer* 2005;**8**:238-44.
- 59 Kim KM, Kwon MS, Hong SJ *et al.* Genetic classification of intestinal-type and diffuse-type gastric cancers based on chromosomal loss and microsatellite instability. *Virchows Arch* 2003;**443**:491–500
- 60 Wirtz HC, Muller W, Noguchi T, *et al.* Prognostic value and clinicopathological profile of microsatellite instability in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1998;**4**:1749-54.
- 61 Liu P, Zhang XY, Shao Y, *et al.* Microsatellite instability in gastric cancer and pre-cancerous lesions, *World J Gastroenterol* 2005;**11**:4904-7.
- 62 Li JH, Shi XZ, Lv S, *et al.* Effect of Helicobacter pylori infection on p53 expression of gastric mucosa and adenocarcinoma with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2005;**28**:4363-6.
- 63 Tanaka A, Watari J, Tanabe H, *et al.* Effect of eradication of Helicobacter pylori on genetic instabilities in gastric intestinal metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;**4**:194-202
- 64 Israel DA, Peek RM. Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;**15**:1271-90.
- 65 Chang CL, Marra G, Chauhan DP, *et al.* Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;**283**:148-154.

Figures

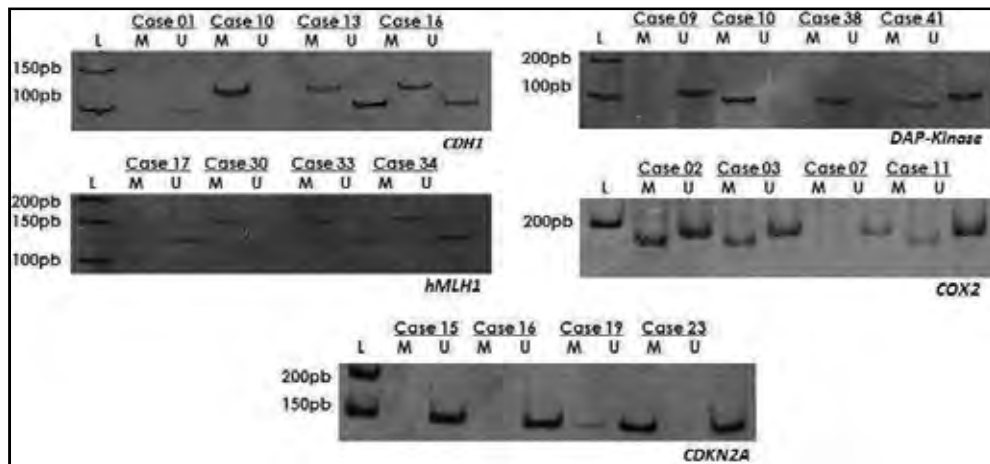


Figure 1 – Methylation analysis in gastric cancer. The studied gene is given on the right of the each panel. Lane U = amplified product with primers recognizing unmethylated sequences; Lane M = amplified product with primers recognizing methylated sequences; L = Ladder 50pb.

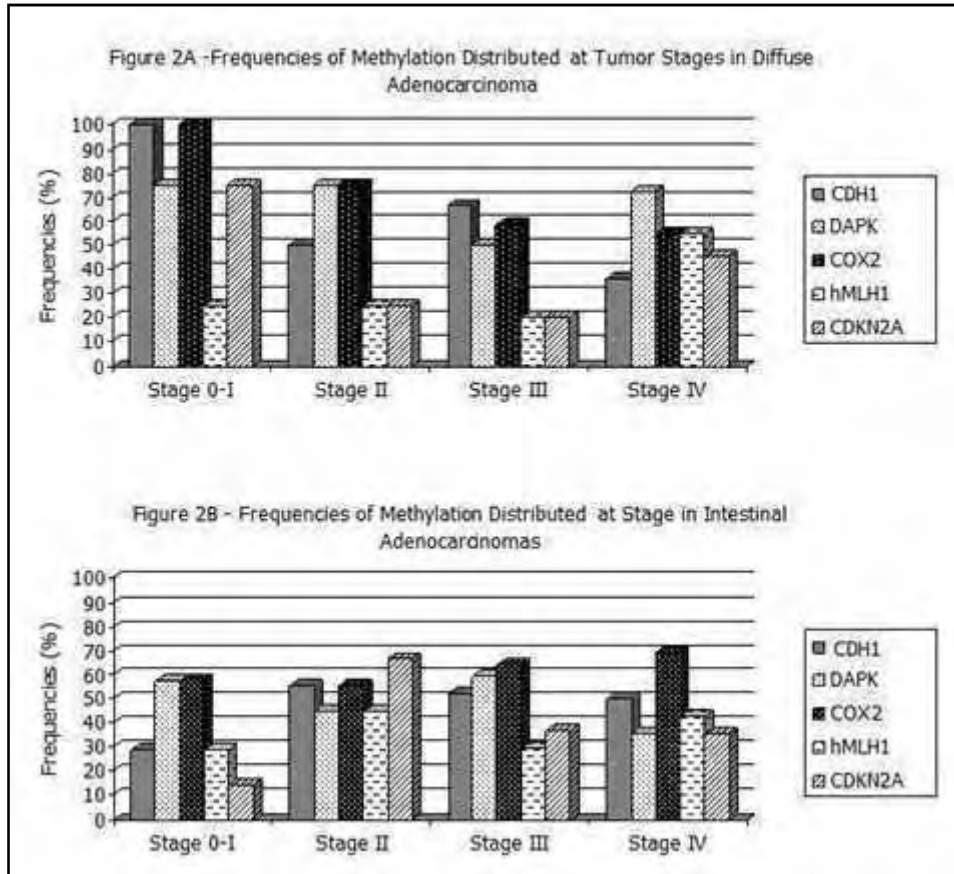


Figure 2A and 2B - Frequencies of methylation at *CDH1*, *DAPK*, *hMLH1*, *COX2* and *CDKN2A* distributed at tumor stages.

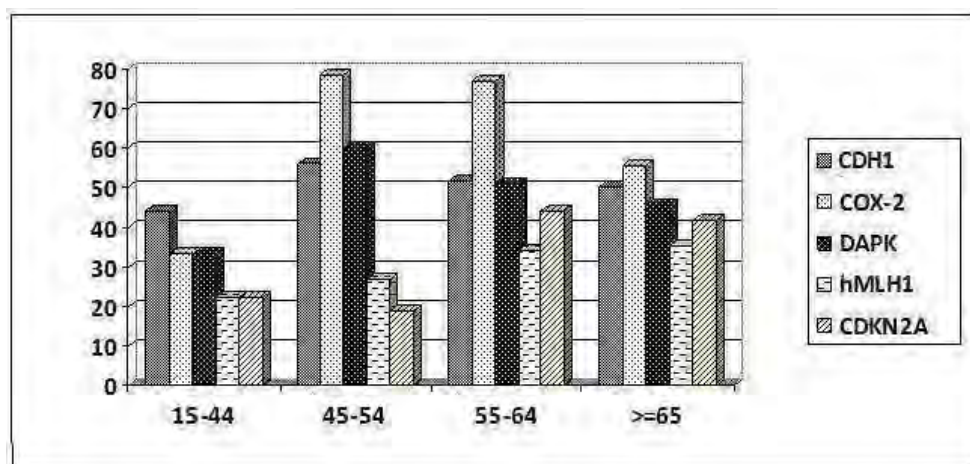
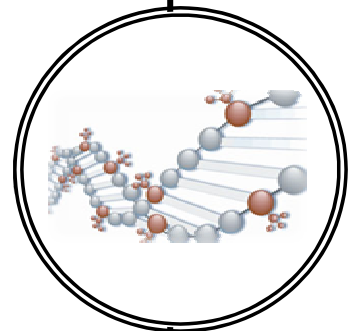


Figure 03 - Frequencies of methylation at *CDH1*, *DAPK*, *hMLH1*, *COX2* and *CDKN2A* distributed at age groups.

Outros artigos

[ARTIGO]

Status: em fase de redação



Análise das alterações genéticas e epigenéticas dos tumores gástricos infectados por *Helicobacter pylori* e *Vírus Epstein Barr*

Aspectos do carcinoma gástrico em dois estados brasileiros: São Paulo e Ceará.

[ARTIGO]

Status: Em fase de redação

Resumo

O Brasil apresenta uma variação marcante entre os estados no que diz respeito à incidência do câncer gástrico. O estado de São Paulo apresenta o maior número de casos registrados, cuja estimativa foi de 7070 novos casos para o ano de 2006, com taxas brutas de 23,11 novos casos e 11,53 a cada 100.000 homens e mulheres, respectivamente. No Ceará, embora o número de novos casos seja inferior (1129 novos casos) aos observados em São Paulo, as taxas brutas de incidência são similares (17,67 entre homens e 9,76 entre mulheres). Uma característica marcante dessa neoplasia é sua etiologia multifatorial, onde hábitos alimentares e a presença de agentes infecciosos são associados. Ambos os estados apresentam alta incidência desse câncer, conseqüência de características ímpares de miscigenação, colonização e hábitos de vida. Na literatura nacional, pouco pode ser encontrado sobre trabalhos que avaliam a prevalência de fatores de risco para câncer de estômago no Brasil. O objetivo desse estudo foi comparar os resultados das variáveis clínicas e anatomopatológicas, bem como a ocorrência da infecção por *Helicobacter pylori* entre casos de adenocarcinoma gástrico provenientes da cidade de Botucatu e região no estado de São Paulo e de Fortaleza e região no estado do Ceará, buscando evidências para traçar o perfil da neoplasia gástrica nessas duas regiões. Foi estudado um total de 89 amostras de adenocarcinoma gástrico que foram obtidas das peças cirúrgicas removidas durante gastrectomias totais ou parciais após o consentimento livre e esclarecido do paciente. Destas, 50 casos foram provenientes do Hospital Universitário Walter Cantídeo e da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza e 39 casos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu. No estudo analisaram-se as seguintes variáveis: sexo e idade dos pacientes, topografia do tumor (proximal ou distal), classificação histológica (Laurén), estadiamento (pTNM) e infecção/genotipagem de *Helicobacter pylori*. Nos 89 casos observou-se maior acometimento do sexo masculino, em uma razão de 2:1. Quando os casos foram agrupados de acordo com seu estado de origem, o grupo dos adenocarcinomas provenientes do estado de São Paulo (SP) apresentou uma razão homem:mulher aumentada (2,6:1) quando comparada aos casos de Fortaleza (1,6:1). O tipo intestinal predominou entre os casos paulistas (70% dos casos), mas nos casos provenientes de Fortaleza as freqüências entre os tipos histológicos intestinal e difuso foram similares. Em relação à idade, parece que a neoplasia gástrica manifesta-se mais tardiamente em São Paulo, visto

que os pacientes foram diagnosticados com idades entre 37 e 98 anos (mediana = 64) enquanto os pacientes cearenses tinham entre 23 e 77 anos (mediana = 60 anos) ao diagnóstico. O tipo intestinal foi bem representativo entre os casos de São Paulo e a relação entre tumor intestinal e idades mais avançadas é bem evidenciada pela literatura mundial. O adenocarcinoma gástrico proximal (cárdia) ocorreu preferencialmente na casuística cearense (31,6% desses casos), contudo devemos ter cautela ao analisar esses dados, pois essa variável foi perdida em alguns casos e os dados foram considerados em relação ao número total de casos em que a análise foi possível. Houve maior número de casos em estádios mais avançados da doença, independente da procedência do tumor (88% nos estádios II, III e IV). Ambas as casuísticas apresentaram-se com alta frequência (~90%) de infecção por *Helicobacter pylori*, com presença de cepas patogênicas *CagA*⁺ em 59% e 64% dos casos de Fortaleza e Botucatu, respectivamente. Os dados obtidos nesse estudo são um incentivo para a sua continuação, considerando uma maior casuística e a inclusão de outros dados etiológicos como tabagismo, etilismo, hábitos alimentares e predisposição familiar.

Caracterização dos adenocarcinomas intestinal e difuso de amostras de pacientes brasileiros

[ARTIGO]

Status: Em fase de redação

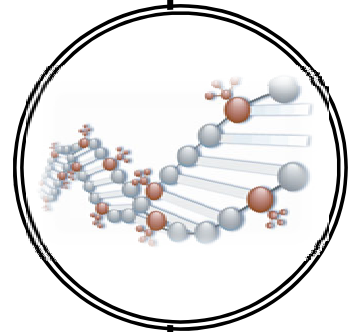
Resumo

Freqüentemente a neoplasia digestiva tem origem epitelial e por isso é denominado adenocarcinoma gástrico e os remanescentes são predominantemente linfomas não-Hodgkin ou leiomiomas. Laurèn (1965) classificou os adenocarcinomas gástricos em dois tipos, intestinal e difuso. Essa classificação é baseada em achados microscópicos, onde o tipo intestinal é caracterizado pela presença de células tumorais com núcleos grandes e irregulares, formando estruturas tubulares e semelhantes às encontradas no adenocarcinoma de cólon. O tipo difuso parece originar-se diretamente de células gástricas mucosas, as células neoplásicas são pouco diferenciadas, infiltrativas e separadas, que podem também estar em pequenos grupamentos, porém sem formar estruturas glandulares e com núcleos periféricos (células em sinete) devido à concentração de mucina em seu citoplasma. Os eventos que antecedem o câncer do tipo intestinal foram muito bem estabelecidos por Correa (1988) que postulou que a carcinogênese envolve a transição da mucosa normal para uma gastrite crônica superficial que então leva à gastrite atrófica e metaplasia intestinal e finalmente à displasia e ao adenocarcinoma. Pouco é conhecido sobre as origens do tipo difuso, mas parece não estar relacionada com condições pré-neoplásicas, sugerindo predisposição genética. Nas áreas geográficas de alto risco ao câncer gástrico, predomina o tipo intestinal, mais freqüente em indivíduos mais velhos e do sexo masculino e mais relacionado a fatores ambientais. Em contrapartida, o tipo difuso acomete indivíduos mais jovens, sem diferenças significantes na incidência entre homens e mulheres. Em geral, o tipo difuso apresenta uma evolução clínica mais agressiva, podendo prosseguir para metástase precoce. Baseados nessas diferenças têm-se sugerido que tumores gástricos do tipo intestinal e do tipo difuso são doenças distintas, com fatores etiológicos e biológicos específicos. Este estudo teve como objetivos a caracterização de 88 amostras de adenocarcinomas gástricos provenientes de peças cirúrgicas obtidas após gastrectomias totais ou parciais de pacientes atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídeo e na Santa Casa de Misericórdia da cidade de Fortaleza-CE e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu-SP. A classificação histopatológica dos adenocarcinomas foi realizada pelos patologistas das instituições de origem das amostras coletadas. Observamos, em nossos resultados, que o padrão histológico predominante foi o tipo intestinal (65%), denunciando um significativo risco ambiental entre os casos estudados.

O sexo masculino predominou nos dois grupos, contudo, a relação incidência homem:mulher foi mais elevada no tipo intestinal (2,4 homens:1 mulher) do que no tipo difuso (1,6:1), acompanhando a tendência mundial. A neoplasia gástrica foi diagnosticada em pacientes mais idosos nos casos intestinais (mediana = 65 anos; 23-98 anos) do que nos casos difusos (mediana = 58 anos; 25-87 anos). Em ambos os sexos, a idade média ao diagnóstico do tumor foi mais elevada nos casos intestinais do que nos casos difusos. Independentemente do tipo histológico, os tumores estudados foram diagnosticados tardiamente em aproximadamente 88% dos casos. Também, não se observou relação quanto a localização do tumor e tipo de neoplasia: em ambos os grupos, houve maior acometimento das porções distais do estômago. Os dados obtidos nos registros médicos quanto ao histórico de câncer na família revelou que 34% dos pacientes com tumores intestinais relataram ocorrência de qualquer tipo de câncer em parentes de primeiro grau, em detrimento dos 21% dos casos relatados pelo grupo difuso, entretanto tais resultados deverão ser analisados com cautela, pois esses dados foram obtidos confiando a memória dos pacientes. Nosso estudo apontou resultados semelhantes aos relatados em várias regiões de médio risco ao câncer de estômago. Adicionalmente, nossa população representa uma excelente amostragem devido a miscigenação étnica em nosso país. Consideramos o aumento da casuística, bem como a inclusão de outras variáveis como tabagismo, etilismo, hábitos alimentares e pesquisa por alterações moleculares para melhor caracterizarmos os dois tipos histológicos de tumores gástricos.

Outros Trabalhos em Colaboração

[ARTIGO]



Análise das alterações genéticas e epigenéticas dos tumores gástricos infectados por *Helicobacter pylori* e *Vírus Epstein Barr*

Relationship between the EBV infection and the expression of cellular oncoproteins in gastric carcinomas.

[ARTIGO]

Status: Aceito para publicação na Revista Diagnostic Molecular Pathology

Autoria

Marcos Antonio Pereira Lima¹, Marcos Aurélio Pessoa Barros², Márcia Valéria Pitombeira Ferreira¹, Maria Inês de Moura Campos Pardini³, Adriana Camargo Ferrasi³, Rosa Maria Salani Mota⁴, Sílvia Helena Barem Rabenhorst¹

¹Seção de Microbiologia, Depto de Patologia e Medicina Forense. Universidade Federal de Fortaleza / ²Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza / ³Lab. Biologia Molecular, Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista/Campus de Botucatu / ⁴Depto. de Estatística e Matemática Aplicada. Universidade Federal do Ceará

Abstract

Background: The Epstein-Barr virus (EBV) has been related to the tumorigenesis of about 10% of the gastric carcinomas. Several studies have demonstrated strong evidences of its relation in this process, however, most of the mechanisms used by the virus to control this process still unknown. In this context, the present study aimed to investigate possible EBV-induced tumorigenic pathways. Materials and Methods: One hundred cases of gastric carcinoma (67 males and 33 females), obtained from two hospitals in Fortaleza, were assessed by in situ hybridization (aimed to the EBER1 transcript) to detect the EBV. Immunohistochemistry technique was also accomplished to evaluate the expression of the cellular proteins BCL-2, BAX and c-MYC (nuclear and cytoplasmic staining), by streptavidin-biotin-peroxidase method. Results: The distribution by sex, age, anatomic site of the tumor and the histopathologic analysis of the cases, in general, reproduced the tendency of the world scientific bibliographies. Regarding virus detection by in situ hybridization, 8 (8%) cases exhibited strong staining situated in the nuclei of the tumor cells, 6 of these presenting diffuse pattern of staining, and 2 demonstrating focal pattern. Among the 100 cases only 2 of these presented infected lymphocytes. In general, the EBV demonstrated higher association with males (87.5%[$p=0.265$]), with tumors situated in the cardia (37.5% [$p=0.549$]), of advanced stage (IIIB and IV), of the intestinal type (87.5%[$p=0.136$]) and moderately differentiated (75%). The correlation with the results of the immunohistochemistry technique, demonstrated that none of the EBV-positive cases exhibited BCL-2 staining. Although the BAX and the c-MYC (nuclear) proteins have demonstrated significant positivity index and scores averages in the EBV-positive group,

these were lower than the values of the EBV-negative group, notably the c-MYC nuclear protein (Mann-Whitney test LI $p=0.039$ and HS $p=0.045$). The cytoplasmic staining of the c-MYC protein, revealed slightly upper staining values in the EBV-positive group. The balance between the BCL-2 and BAX proteins demonstrated that the majority of the evaluated cases, including the EBV-positive cases, exhibited apoptosis-orientation. Discussion: The results obtained in the present study, concerning the EBV frequency and the correlation with clinic-histopathologic data, reproduced findings of researches done in several world regions. The correlation with the proteins, suggests that *in vivo*, the virus is not related to the overexpression of BCL-2 and c-MYC (nuclear) that could act in synergism, promoting the tumor development. The suppression of the BAX expression can represent a viral mechanism for apoptosis inhibition. The results of the cytoplasmic c-MYC, point to a possible involvement of the EBV with transport mechanisms of the nuclear membrane, culminating with its accumulation in the cytoplasm.

Introduction

The Epstein-Barr virus (EBV) has been related to the carcinogenesis of the gastric carcinoma. The virus can be found in approximately 10 % of these tumors, demonstrating strong evidences of its relation such as the monoclonality of the viral genome, and the presence in almost all tumor cells.^{1 2 3 4} However, most of the mechanisms used by the virus to control this process still unknown. Several studies have demonstrated that the latent genes expressed in this tumor, (EBNA1, EBERs, LMP2A and BARF1) have an important role in this process. It has been related that EBERs and BARF1 can induce the overexpression of BCL-2 *in vitro*.^{5 6 7} Additionally, the LMP2A can activate the protein-kinase B (PKB), that phosphorylates several cytoplasmic proteins, including the pro-apoptotic protein Bad.⁸ These effects suggest that the EBV suppress the apoptosis, therefore, immortalizing the tumor cells. It has been reported that the EBNA1 contribute to the overexpression of the *c-MYC* oncogene in the context of the chromosomal translocation.^{9 10} So that, virtually the c-MYC-induced proliferative effect can act, in synergism with the BCL-2-induced anti-apoptotic effect, promoting cell transformation and driving the cells to the malignant phenotype. However, a few papers have analyzed *in vivo*, the association of the EBV with the expression of the referred cellular oncoproteins in gastric carcinomas. For this reason, we investigated the presence of the EBV by *in situ* hybridization and evaluated the expression of the apoptosis-involved proteins BCL-2, BAX and c-MYC, by immunohistochemistry.

Materials and Methods

Clinical Specimens

One hundred cases of gastric carcinoma surgically-resected were collected from two hospitals of the State of Ceará, Brazil: Walter Cantídeo Hospital at Federal University in Ceará, and Santa Casa de Misericórdia (a catholic beneficial institution), all located in Fortaleza, the capital of the state. It has been obtained from all these cases, specimens fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Histological sections of 5µm were performed and placed on silane-treated glass slides. Soon each slide have been deparaffinized with xylene and rehydrated in gradient of ethanol-water before the accomplishment of the techniques. The cases have been classified according to the Lauren's classification.¹¹

In Situ Hybridization

The presence of the EBV was assessed by RNA *in situ* hybridization with a 30bp biotinylated probe (5'-AGACACCGTCCTCACCACCCGGGACTTGTA - 3') complementary to the RNA EBER1, an EBV transcript shown in elevated amount in the nuclei of latently infected cells. After the deparaffinization and rehydration, endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ solution. Enzymatic digestion was performed with proteinase K (0,02µg/µL) for 13 min at environment temperature, subsequently, the tissues were dehydrated in gradient of ethanol and dried. The slides have been incubated with prehybridization solution (Denhardt's solution [3.5X]; SSC [4.5X]; EDTA [0.0075M]; SDS [0.35%]; denatured salmon sperm DNA [75µg/mL]; NaH₂PO₄ [0.75M]; dextran sulfate [10%]) for 60 min at 37°C in humid chamber. Soon after, the slides were incubated with hybridization solution (Denhardt's solution [2X]; formamide [50%]; dextran sulfate [2%]; NaH₂PO₄ [0.002M]; probe [0.3ng/µL]) for 16 hours at 37°C in humid chamber. To the signal amplification was employed anti-biotin antibody (clone BK, mouse, dilution 1:20; DakoCytomation®) and biotinylated anti-immunoglobulin antibody (polyclonal, rabbit, dilution 1:100; DakoCytomation®), the reaction was detected with the streptavidin-biotinperoxidase complex (DakoCytomation®) and the diaminobenzidine chromogen (DakoCytomation®). The slides were counterstained with Harris's hematoxilín. A case of nasopharyngeal carcinoma was used as positive control.

Immunohistochemistry

The expression of the proteins BCL-2, BAX and c-MYC was performed according to the method described by Hsu *et al.*¹² Briefly, after the deparaffinization and rehydration, antigen retrieval was carried out by microwave-treatment of the slides for 15 min in 10mM citrate buffer solution (pH 6.0). Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H₂O₂

solution. Primary antibodies were incubated for 16 hours at 4-8°C in humid chamber. For each protein, it was used the following antibody: anti-human BCL-2 (clone 124, mouse, dilution 1:80; DakoCytomation®), anti-human BAX (polyclonal, rabbit, dilution 1:400; DakoCytomation®) and anti-human c-MYC (clone 9E10, mouse, dilution 1:100; Labvision®). The reaction was detected with LSAB+ system (DakoCytomation®) and the diaminobenzidine chromogen (DakoCytomation®). The counterstaining was accomplished with Harris's hematoxylin. According to the manufacturer's recommendation, we used as positive controls: reactive lymphonode for BCL-2; colon carcinoma for BAX; Burkitt's lymphoma for c-MYC.

Evaluation of the Reactions

Regarding *in situ* hybridization, the presence of nuclear dark brown staining was considered as positive. According to the immunohistochemistry, the staining for BCL-2 and BAX proteins were cytoplasmic, and for c-MYC protein was nuclear and/or cytoplasmic. For immunohistochemistry, the percentage of tumor cells staining (*Labelling index* - LI) was proceeded using the following methods described previously.¹³ Only a LI \geq 5% was considered as positive. Besides, the intensity of staining (*H-score* - HS) was evaluated following methods described by McCarty *et al.*¹⁴

Statistical Analyses

The analyses was developed using the statistical programs EPINFO_ 6.04d version and SPSS 12.0. Statistically significant differences were evaluated by Fisher's exact test (2-sided) and Mann-Whitney U-test. The results were considered to be statistically significant when *p*-values were less than 0.05.

Results

Clinicopathological Analyses

Eight of 100 (8%) gastric carcinomas were EBV-positive, demonstrating strong staining specifically situated in the nuclei of tumor cells. In six of the EBV-positive cases almost all tumor cells were positive, while the other two cases exhibited a focal staining pattern. Only two of 100 cases displayed surrounding infected lymphocytes, coincidentally both presenting positive tumor cells. Non-cancerous gastric mucosa and dysplastic area have been always negative. Table 1 summarizes the clinicopathological data. There was a male predominance (87.5%) in the EBV-positive cases, but no statistically significant difference has been noticed. As regarded to the age distribution, there was a small reduction within the interval 55-64 in the EBV-positive cases. The average of the EBV-positive and EBV-negative groups were 59.7

and 61.3 years old respectively. The age distribution was similar between EBV-positive and EBV-negative groups. Although the anatomic localization has not been statistically significant, there was a discreet elevation of the EBV-positive tumors localized in the cardia (37.5%) compared with the EBV-negative group. The histological analyses revealed that most of the EBV-positive cases were classified as intestinal type (87.5%) and showed a predominance of the moderately differentiated tumors (75%). The tumor stage distribution was similar between both groups.

EBV and Cellular Oncoproteins

Among the EBV-positive gastric carcinomas, none expressed the BCL-2 protein and even EBV-negative group exhibited a low frequency of expression (5/100 cases) and low staining scores (LI, HS) averages. The assessment of the BAX expression demonstrated elevated values in EBV-positive group, however, smaller than EBV-negative group. Additionally, based on the balance between BCL2/BAX proteins, fifty-eight percent of the carcinomas exhibited apoptosis-orientation, three percent survival-orientation and thirty nine percent exhibited equilibrium.

The nuclear c-MYC expression showed very low values in EBV-positive group, demonstrating clearly the disparity between both groups, being verified statistic significances in these analysis (Mann-Whitney test: LI, $p=0.039$ and HS, $p=0.045$). Although, the cytoplasmic staining of the c-MYC protein in the EBV-positive carcinomas exhibited values more elevated than EBV-negative. It is important to notice that none EBV-positive cases presented nuclear and cytoplasmic staining concomitantly.

Table 1 - Comparison of EBV-positive and EBV-negative gastric carcinomas according to the clinicopathological findings.

	EBV(+) (n=8)	EBV(-) (n=92)	p-value
Sex			p=0.265
Male	7 (87.5%)	60 (65.2)	
Female	1 (12.5%)	32 (34.8)	
Age distribution *			
0-14	0 (0%)	0 (0%)	
15-44	1 (12.5%)	8 (8.7%)	
45-54	2 (25.0%)	18 (19.6%)	
55-64	1 (12.5%)	24 (26.1%)	
≥ 65	4 (50.0%)	42 (45.7%)	
Anatomic localization			p=0.549
Cardia	3 (37.5%)	20 (21.7%)	
Corpus	1 (12.5%)	22 (23.9%)	
Antrum	4 (50.0%)	50 (54.3%)	
Lauren's classification			p=0.136
Diffuse	1 (12.5%)	40 (43.5%)	
Intestinal	7 (87.5%)	52 (56.5%)	
Differentiation *			
Undifferentiated	0 (0%)	1 (1.1%)	
Poorly	2 (25.0%)	39 (42.4%)	
Moderately	6 (75.0%)	48 (52.2%)	
Well differentiated	0 (0%)	4 (4.3%)	
pTNM stage *			
I	1 (12.5%)	13 (14.1%)	
II	1 (12.5%)	18 (19.6%)	
III	3 (37.5%)	33 (35.9%)	
IV	3 (37.5%)	28 (30.4%)	

* It has not been possible to calculate the significance.

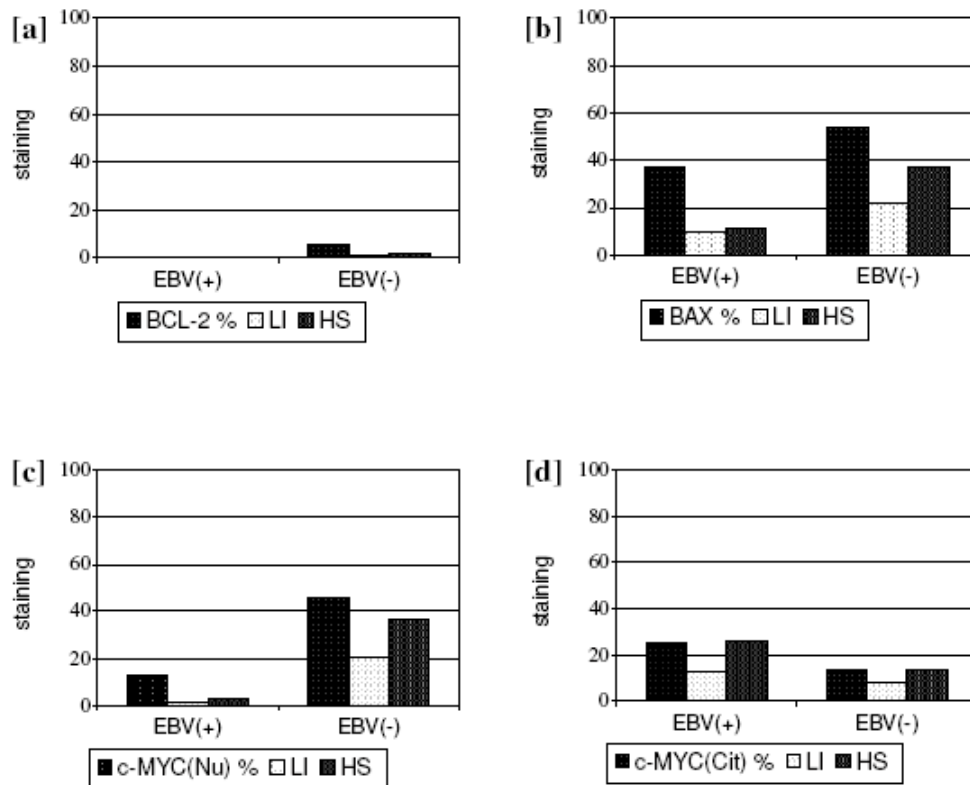


Fig.1. Relationship between detection of the EBV and positivity and staining scores averages (LI, HS) of the oncoproteins [a] BCL-2 (Mann Whitney test LI $p=0.357$ and HS $p=0.357$) [b] BAX (Mann Whitney test LI $p=0.140$ and HS $p=0.103$) [c] nuclear c-MYC (Mann Whitney test LI $p=0.039$ and HS $p=0.045$) and [d] cytoplasmic c-MYC (Mann Whitney test LI $p=0.650$ and HS $p=0.593$).

Discussion

In this study, EBV was detected in 8% of the assessed gastric carcinomas, according to the reported results in various world regions ranging between 1.3 to 19.3%, demonstrating greater similarity with studies performed in China, France, Russia, Mexico and Brazil.^{15 16 17 18 19} As described, in six cases almost all tumor cells were EBV-positive while the other two cases demonstrated a focal staining pattern. According to Takada 3 the presence of the virus in the majority if not in all tumor cells, suggests that the virus displays an important role in the development of this neoplasm. Contrarily, the verification of EBV only in a portion of tumor cells (focal staining pattern), indicates that the infection had occurred after cellular transformation.²⁰ Curiously, during the experimental phase we observed frequent cytoplasmic staining, occurring especially in non-cancerous glandular arrangements, in some of these cases the hybridization technique was repeated omitting the anti-biotin antibody, being verified the same initial results. Thus, we have concluded that this finding was actually a nonspecific staining (background). Some authors have related that the gastric mucosa infection is mediated by infiltrated EBV-positive

lymphocytes.^{3 21} However, we found only two cases containing stained lymphocytes, contradicting the mentioned hypothesis. Perhaps, this event may occur due to the scarce amount of EBV-positive circulating lymphocytes. Alternatively, Osato and Imai²² has proposed that the gastric mucosal infection may be mediated by free virus presents in the swallowed saliva and due to its structural fragility (enveloped virus), the EBV could lose its infectivity explaining its low frequency in distal gastric carcinomas and the absence in intestinal tumors.^{2 15 23}

The results of the present study have also confirmed others researches showing that EBV-positive cases have a higher incidence in males.^{1 17 24 25} The age distribution of the EBVpositive group demonstrated a reduction within the interval 55-64 years old compared to the EBV-negative group, this variation may be a consequence of the small number of positive cases. Even so, the average of years of the EBV-positive group reproduced the results of others studies.^{26 27 28} Concerning to the anatomical localization, the slight elevation of EBVpositive tumors situated in the cardia is in agreement with researches done in several world regions.^{4 26 29 30}

The correlation between EBV infection and the Lauren's histological type remains controversial. Some authors point the intestinal type as the most frequently associated with EBV^{15 30 31} while others point the diffuse^{19 25 27 32 33} or even equivalence between both histological types.^{3 24 29} In this study, we observed a predominance of the intestinal type in the EBV-positive group. Additionally, Kijima *et al.*⁴ have reported that patients with EBVpositive carcinoma of the intestinal type have a worst prognostic compared to the patients with diffuse type. In this context, we have noticed that the majority of the EBV-positive cases belonged to the tumor stage III and IV. However, these values were similar to the verified in the EBV-negative group. So, it seems that the EBV does not induce a more aggressive phenotype in the associated neoplasms. According to the differentiation grade, the virus was associated exclusively with poorly and moderately differentiated tumors, especially the last one. Several studies have reported the two grades as the most frequent^{17 26 34 35}, just a few authors has pointed the poorly differentiated as the predominant grade.^{30 36} Regarding to the correlation between the EBV status and the expression of cellular oncoproteins, contrarily to what was expecting by us, none EBV-positive case express the BCL-2 protein. These results may not be due to the variation of the employed technique, considering that 37% of the carcinomas

presented lymphoid follicles strongly stained representing internal controls of the reactions. Despite Kume *et al.*³⁷ have reported an elevated expression of the BCL-2, in general other authors have demonstrated low positivity in EBV-infected carcinomas.^{1 36 38} In this scenario, the *in vitro* observed effects related to expression of the BCL-2 induced by viral transcripts (BARF1 and/or EBERs) does not seem to occur *in vivo*, where the virus have to subsist among diverse cellular factors. Nevertheless, we observed that the BAX expression overlapped the BCL-2, exhibiting an apoptosis orientation in the majority of the cases. But even so, the BAX expression in the EBV-positive group was smaller than in the EBV-negative group, indicating that the EBV can contribute to the apoptosis suppression by alternative mechanisms. It wasn't found any report regarding EBV presence and BAX expression in gastric carcinomas, impeding a comparison of findings. The apoptosis is a complex process that involve diverse factors (pro-apoptotic and anti-apoptotic), so that the investigation of others components of the apoptotic process (such as Bcl-xL, Bad, Bak, Bid) can contribute to know whether the apoptosis is really a mechanism used by the EBV in the cellular transformation. The evaluation of the c-MYC protein in the nuclei of the tumor cells exhibited a notable reduction of the positivity as well as the staining scores in EBV-positive group. In contrast, the detection of the c-MYC protein in the cytoplasm demonstrated more elevated values in the EBV-positive group. These results indicate that the EBV is not associated with the overexpression of the c-MYC situated in the nuclei where this oncoprotein may perform its functions.³⁹ Alternatively, the results point to a possible involvement with transport mechanisms of the nuclear membrane that could block the uptake of the protein into the nuclei of the tumor cells, culminating with its accumulation in the cytoplasm, explaining the exclusive cytoplasmic detection without nuclear concomitance. The relationship between EBV and c-MYC (nuclear or cytoplasmic) lacks of researches, denoting the importance of our study. In the study of Ishii *et al.*¹ the c-MYC positivity was similar between EBV-positive and EBV-negative groups, however, the nuclear and cytoplasmic staining was indiscriminately considered. In the present study, we assessed separately both staining, because the functional importance of the cytoplasmic c-MYC is not still completely understood. Some authors relate that this finding is destituted of functional meaning ⁴⁰, on the other hand, others researchers have demonstrated an elevation of cytoplasmic expression in function of the

malignant progression in carcinomas of the stomach ⁴¹, colon ⁴² and astrocytic tumors.⁴³ Our findings suggest that the proposed hypothesis about a possible EBV-mediated tumorigenic pathway, based on the synergic effect between the apoptosis inhibition by the BCL-2 protein expression and the cellular proliferating induced by the overexpression of c-MYC protein (nuclear) seems, in fact, not to happen. Proving that several effects observed *in vitro*, do not occur *in vivo*. Additionally, our results indicate that EBV should use other mechanisms or else other factors (as in the case of the apoptosis process) to promote the tumor development.

References

1. Ishii H, Gobé G, Kawakubo Y, Sato Y, Ebihara Y. Interrelationship between Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas and the expression of apoptosis-associated proteins. *Histopathology*. 2001; 38:111-119.
2. Morewaya J, Koriyama C, Akiba S, Shan D, Itoh T, Eizuru Y. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Papua New Guinea. *Oncol. Rep.* 2004 Nov; 12(5):1093-1098.
3. Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 2000;53: 255-261.
4. Kijima Y, Ishigami S, Hokita S, Koriyama C, Akiba S, Eizuru Y, Aikou T. The comparison of prognosis between Epstein-barr virus (EBV)-positive gastric carcinomas and EBV-negative ones. *Cancer Letters*. 2003;200:33-40.
5. Komano J, Maruo S, Kurozumi K, Oda T, Takada K. Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol.* 1999;73: 9827-9831.
6. Sheng W, Decaussin G, Sumne S, Ooka T. N-Terminal domain of BART1 gene encoded by Epstein-Barr virus is essential for malignant transformation of rodent fibroblasts and activation of BCL-2. *Oncogene*. 2001 Mar;20(10):1176-1185.
7. Wang Q, Tsao SW, Ooka T, et al. Anti-apoptotic role of BART1 in gastric cancer cells. *Cancer Letters*. 2005;20:1-14.
8. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat. Rev.Immunol.* 2001 Oct;1(1):75-82.
9. Ambinder RF, Mann RB. Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. *Am. J. Pathol.* 1994 Aug;145(2):239-252.
10. Drotar ME, Silva S, Barone E, Campbell D, et al. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1 and Myc Cooperate in Lymphomagenesis. *Int. J. Cancer*. 2003;106: 388-395.
11. Laurèn P. The Two Histological main types of Gastric Carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 1965;64:31-49.
12. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 1981;29:577-580.
13. Landberg G, Ross G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. *Cell Prolif.* 1993;26:427-437.
14. McCarty KSJr., Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1985;109(8):716-721.

15. Yuen ST, Chung LP, Leung SY, Luk IS, Chan SY, Ho J. In situ detection of Epstein- Barr virus in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 1994 Nov;18(11):1158-1163.
16. Selves J, Bibeau F, Brousset P, Meggetto F, Mazerolles C, Voigt JJ, Pradere B, Chiotasso P, Delsol G. Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in gastric carcinoma. *Histopathology.* 1996 Feb;28(2):121-127.
17. Galetsky SA, Tsvetnov VV, Land CE, Afanasieva TA, Petrovichev NN, Gurtsevitch VE, Tokunaga M. Epstein-Barr-virus associated-gastric cancer in Russia. *Int. J. Cancer.* 1997;73:786-789.
18. Herrera-Goepfert R, Reyes E, Hernandez-Avila M, Mohar A, Shinkura R, Fujiyama C, Akiba S, Eizuru Y, Harada Y, Tokunaga M. Epstein-Barr-virus associated gastric carcinoma in Mexico: Analysis of 135 consecutive gastrectomies in two hospitals. *Mod. Pathol.* 1999;12:873-878.
19. Koriyama C, Akiba S, Iriya K, Yamaguti T, Hamada GS, Itoh T, Eizuru Y, Aikou T, Watanabe S, Tsugane S, Tokunaga M. Epstein-Barr virus-associated Gastric Carcinoma in Japanese Brazilians and Non-Japanese Brazilians in São Paulo. *Jpn. J. Cancer Res.* 2001 Sept;92:911-917.
20. Luo B, Wang Y, Wang X, Liang H, Yan L, Huang B, Zhao P. Expression of Epstein- Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinomas. *World J. Gastroenterol.* 2005 Feb;11(5):629-633.
21. Imai S, Nishikawa J, Takada K. Cell-to-Cell Contact as an Efficient Mode of Epstein-Barr Virus Infection of Diverse Human Epithelial Cells. *American Society for Microbiology.* 1998;72(5):4371-4378.
22. Osato T, Imai S. Epstein-Barr vírus and gastric carcinoma. *Seminars in Cancer Biology.* 1996;7:175-182.
23. Cho YJ, Chang MS, Park SH, Kim HS, Kim WH. In Situ Hybridization of Epstein-Barr Virus in Tumor Cells and Tumor-Infiltrating Lymphocytes of the Gastrointestinal Tract. *Human Pathology.* 2001 Mar;32(3):297-301.
24. Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* 1992;140:769-774.
25. Tokunaga M, Uemura Y, Tokudome T, Ishidate T, Masuda H, Okazaki E, Kaneko K, Naoe S, Ito M, Okamura A, Shimada A, Sato E, Land CE. Epstein-Barr virus related gastric cancer in Japan: A molecular patho-epidemiological study. *Acta Pathologica Japonica.* 1993;43:574-581.
26. Takano Y, Kato Y, Saegusa M, Mori S, Shiota M, Masuda M, Mikami T, Okayasu I. The role of the Epstein-barr virus in the oncogenesis of EBV(+) gastric carcinomas. *Virchows Achieves.* 1999;434:17-22.
27. Oda K, Koda K, Takiguchi N, Nunomura M, Seike K, Miyazaki M. Detection of Epstein-Barr virus in gastric carcinoma cells and surrounding lymphocytes. *Gastric Cancer.* 2003;6:173-178.
28. Lopes LF, Bacchi MM, Elgui-de-Oliveira D, Zanati SG, Alvarenga M, Bacchi CE. Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma in São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2004;37(11):1707-1712.
29. Carrascal E, Koriyama C, Akiba S, Tamayo O, Itoh T, Eizuru Y, Garcia F, Sera M, Carrasquilla G, Piazuelo MB, Florez L, Bravo JC. Epstein-Barr-virus associated gastric adenocarcinoma in Cali, Colombia. *Oncol. Rep.* 2003 July;10(4):1059-1062.
30. Zur Hausen A, Rees BPV, Beek JV, Craanen ME, Bloemena E, Offerhaus GJA, Meijer CJLM, Brule AJCVD. Epstein-Barr virus in gastric carcinomas and gastric stump carcinomas: a late event in gastric carcinogenesis. *J. Vlin. Pathol.* 2004;57:487-491.
31. Harn HJ, Chang JY, Wang MW, Ho LI, Lee HS, Chiang JH, Lee WH. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma in Taiwan. *Hum. Pathol.* 1995 Mar;26(3):267-271.
32. Koriyama C, Akiba S, Coryalan A, Carrascal E, Itoh T, Herrera-Goepfert R, Eizuru Y, Tokunaga M. Histology-specific gender, age and tumor-location distributions of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Japan. *Oncol. Rep.* 2004 Sept;12(3):543-547.
33. Alipov G, Nakayama T, Nakashima M, Wen C, Niino D, Kondo H, Pruglo Y, Sekine I. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Kazakhstan. *World J. Gastroenterol.* 2005 Jan;11(1):27-30.

34. Leoncini L, Vindigni C, Megha T, Funto I, Pacenti L, Musaro M, Renieri A, Seri M, Anagnostopoulos J, Tosi P. Epstein-Barr virus and gastric cancer: data and unanswered questions. *Int. J. Cancer*. 1993 Apr;53(6):898-901.
35. Yoshiwara E, Koriyama C, Akiba S, Itoh T, Minakami Y, Chirinos JL, Watanabe J, Takano J, Miyagui J, Hidalgo H, Chacon P, Linares V, Eizuru Y. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Lima, Peru. *J Exp. Clin. Cancer Res*. 2005 Mar;24(1):49-54.
36. Lee HS, Chang MS, Yang H, Lee BL, Kim WH. Epstein-Barr Virus-Positive Gastric Carcinoma Has a Distinct Protein Expression Profile in Comparison with Epstein-Barr Virus-Negative Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2004 Mar;10:1698-1705.
37. Kume T, Oshima K, Shinohara T, Takeo H, et al. Low rate of apoptosis and overexpression of bcl-2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Histopathology*. 1999;34:502-509.
38. Gulley ML, Pulitzer DR, Eagan PA, Schneider BG. Epstein-Barr virus infection is an early event in gastric carcinogenesis and is independent of bcl-2 expression and p53 accumulation. *Hum. Pathol*. 1996 Jan;27(1):20-27.
39. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-Myc: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer*. 2002;2(10):764-776.
40. Orian JM, Vasilopoulos K, Yoshida S, et al. Overexpression of múltiple oncogenes related to histological grade of astrcytic glioma. *Br. J. Cancer*. 1992;66,(1):106-112.
41. Yamamoto T, Yasui W, Ochiai A, et al. Immunohistochemical detection of c-myc oncogene product in human gastric carcinomas: expression in tumor cells and stromal cells. *Jpn. J. Cancer Res*. 1987 Nov;78(11):1169-1174.
42. Royds JA, Sharrard RM, Wagner B, Polaczars SV. Cellular localization of c-myc product in human colorectal epithelial neoplasia. *J. Pathol*. 1992;166(3):225-233.
43. Faria MHG. Estudo Imuno-histoquímico das Alterações Moleculares nos Astrocitoma: Vias Tumorigênicas, Alvos Terapêuticos e Indicadores de Resistência. 2005. 168 p. Dissertation (Master's degree in Pharmacology) – Federal University in Ceará. Fortaleza.

Análise do polimorfismo C677T do gene da Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR) em tumores gástricos.

[ARTIGO]

Status: Em fase de redação

Autoria

Juliano Jampietro¹, Adriana Camargo Ferrasi¹, Maria Inês de Moura Campos Pardini¹, Silvia Helena Barem Rabenhorst², Nídia Alice Pinheiro¹

¹Lab. Biologia Molecular, Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista/Campus de Botucatu / ²Depto de Patologia e Medicina Forense. Universidade Federal de Fortaleza

Resumo

A enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR) apresenta um papel central no metabolismo do folato. Essa enzima catalisa a conversão de 5-10-metilenotetraidrofolato (5-10 TIF) em 5-metiltetraidrofolato (5-TIF, principal forma de folato plasmático circulante) que é um doador de grupamentos de carbono para a síntese de novo de metionina, precursora para síntese de adenosilmetionina sulfato (SAM), um importante doador de grupamentos metila para metilação do DNA. Tal atividade a torna crucial na manutenção da biossíntese de DNA e/ou RNA e metilação de DNA genômico. É amplamente aceito que na ausência desses eventos, instala-se uma instabilidade genômica, que pode ser crítica para transformação oncogênica de células humanas. O polimorfismo C677T no gene MTHFR está associado à expressão de uma enzima termolábil de atividade reduzida e afeta a disponibilidade da metionina, crucial para evitar o estado de hipometilação genômica, favorecendo uma possível ligação entre polimorfismos no gene MTHFR e a carcinogênese. O objetivo deste estudo foi a avaliação da frequência do polimorfismo C677T em amostras de adenocarcinomas gástricos. Nos 83 casos analisados, os genótipos do polimorfismo C677T foram correlacionados com dados clínicos dos pacientes, estadiamento, tipo histológico do tumor e ocorrência de instabilidade de microssatélites (MSI). A genotipagem do polimorfismo C677T foi realizada através da técnica PCR-RFLP. Dos casos analisados, foram encontrados 37,3%, 61,5% e 1,2% com os genótipos 677CC, 677CT e 677TT, respectivamente. Não foi encontrada associação entre genótipo 677TT e câncer gástrico. Não houve diferença significativa nas frequências genotípicas da C677T com relação ao sexo, localização do tumor ou estadiamento da doença. No entanto, foi encontrada uma forte correlação estatística entre o genótipo CT e tipo histológico intestinal. Nossos resultados sugerem que os efeitos deletérios advindos da baixa atividade da MTHFR, podem ser ter um papel importante nas origens do adenocarcinoma gástrico intestinal.

Detecção de mutações no gene supressor de tumor p53 em câncer gástrico.

[ARTIGO]

Status: Em fase de análise estatística e redação

Autoria

Juliana Gonçalves de Oliveira¹, Adriana Camargo Ferrasi¹, Rejane Maria Tomasini Grotto¹, Maria Inês de Moura Campos Pardini¹, Nídia Alice Pinheiro¹

¹Lab. Biologia Molecular, Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista/Campus de Botucatu

Resumo

O Câncer Gástrico é um dos cânceres mais comuns no Brasil e é responsável por uma alta taxa de morbidade. O gene p53 codifica uma proteína com papel importante na transcrição do DNA, regulando o ciclo celular e funcionando como supressor tumoral. A inativação de genes supressores tumorais tem sido freqüentemente observada na carcinogênese gástrica. Mutações em regiões específicas desse gene têm sido encontradas em vários tipos de tumores. O objetivo desse estudo foi avaliar a freqüência com que ocorrem mutações nos exons 5, 6, 7, 8 e 9 do gene p53 em 40 amostras de adenocarcinomas gástricos e buscar correlações dos resultados com dados clínicos, estadiamento e tipo histológico do tumor. A análise das mutações foi realizada por seqüenciamento dos exons 5 a 9 (em reações separadas) realizado em um seqüenciador automático (*ABI Prism 3100, Applied Biosystems*). Os dados já foram coletados e o projeto está em fase de estudo das mutações encontrada e análises estatísticas desses dados.

Análise da Influência dos polimorfismos G1691A do Fator V (Leiden), G20210A da Protrombina e C677T do MTHFR na Etiologia do abortamento espontâneo recorrente.

[ARTIGO]

Status: Em fase de redação

Autoria

Rodrigo Salgueiro Pardo¹, Adriana Camargo Ferrasi², Lenisa Pola Silva¹, Maria Inês de Moura Campos Pardini², Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini¹,

¹Ambulatório e Laboratório de Genética (ALAGE), Depto. de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências – Universidade Estadual Paulista/Campus de Bauru;

²Laboratório de Biologia Molecular, Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista/Campus de Botucatu²

Resumo

O abortamento espontâneo recorrente (AER) é caracterizado por dois ou mais abortamentos espontâneos com menos de 20-22 semanas de gestação. Sua principal causa reside em anomalias cromossômicas numéricas e/ou estruturais que podem ter sido herdadas dos pais ou desenvolvidas em período pós-zigótico e totalizam cerca de 50% dos diagnósticos de abortamentos. Entre os 50% restantes, destacam-se alterações morfológicas uterinas, doenças maternas, intoxicações farmacológicas e influências de ordem hormonal, imunológica e trombofílica, sendo esta última o alvo dessa pesquisa. Substituições de ponto como a G1691A no gene que codifica o fator V da coagulação sanguínea torna-o resistente à desativação pela proteína C ativada. Já a substituição G20210A no gene da protrombina leva ao aumento de sua concentração no sangue e, por conseguinte, do produto de sua conversão: a trombina. Ainda, pela substituição C677T no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase, aumenta-se a expressão de fator tecidual e diminui-se a atividade da proteína C, ambos efeitos com características pró-coagulantes. Esses três polimorfismos, por fim, levam à predisposição para o desenvolvimento de tromboembolismos e, durante gravidezes, AER podem ser devidos à trombose de vasos placentários. Assim, procurou-se determinar a frequência, até então desconhecida na região de Bauru, dos polimorfismos *FV G1691A*, *PT G20210A* e *MTHFR C677T* em dois grupos de 40 mulheres para se avaliar possíveis associações com a ocorrência de AER, pois o uso de anticoagulantes, ácido fólico e vitaminas do complexo B têm mostrado bons resultados na prevenção de AER. Os critérios de seleção de mulheres para compor o grupo Caso incluíam a ocorrência de AER sem causas definidas, com ou sem gestações a termo e cariótipos normais dos genitores e de pelo menos um dos abortamentos espontâneos. Para o grupo

Controle, entretanto, as mulheres deveriam ter uma ou mais gestações a termo, sem histórico de abortamento e nenhuma intercorrência gestacional potencialmente abortiva. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada através da técnica PCR-RFLP (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Não foi encontrada associação entre a ocorrência de AER e a qualquer dos polimorfismos estudados. Estes resultados sugerem que os polimorfismos Leiden do Fator V, A20210 e C677T, não representam um fator de risco para AER nos casos estudados. Os resultados observados nesse trabalho deverão ser confirmados com novos estudos em amostras maiores.

Trombofilias e Abortos Recorrentes.

[ARTIGO]

Status: Em fase de redação

Autoria

Lucilene Rosilho Mangerona¹, Anaglória Pontes², Adriana Camargo Ferrasi³, Maria Inês de Moura Campos Pardini³, Izolete Aparecida Thomazini Santos¹,

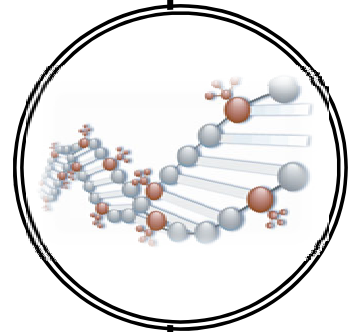
¹Laboratório de Hemostasia, Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista/Campus de Botucatu / ²Depto. De Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista/Campus de Botucatu / ³Laboratório de Biologia Molecular, Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista/Campus de Botucatu

Resumo

A perda gestacional recorrente idiopática é multifatorial, pois envolve fatores de risco clínicos e biológicos. A trombofilia pode ser definida como uma predisposição para trombose. Anormalidades na hemostasia que estão associadas com trombofilias clínicas incluem defeitos hereditários, tais como os anticoagulantes naturais Antitrombina III, Proteína S e Proteína C ou fatores de coagulação, os polimorfismos do fator V Leiden, do gene da protrombina (G20210A), da metilenotetrahidrofolato redutase-MTHFR (C677T), e defeitos adquiridos, tal como Síndrome Antifosfolípide e a Hiperhomocisteinemia. O presente trabalho foi realizado com 70 mulheres, sendo que 35 mulheres apresentavam 3 ou mais abortos recorrentes inexplicáveis, e 35 mulheres voluntárias clinicamente normais. Para todas as mulheres foram feitas as investigações para os anticoagulantes naturais da coagulação e investigação para as mutações do fator V Leiden, gene da protrombina G20210A e metilenotetrahidrofolato redutase MTHFR C677T e as deficiências adquiridas. Em nosso estudo, encontramos resultados estatisticamente significantes para a síndrome do anticorpo antifosfolípide (trombofilia adquirida). Foi também observado um grande número de defeitos trombofílicos adquiridos sendo que alguns estão em associação com a mutação do fator V Leiden e MTHFR C677T, porém mais pesquisas são necessárias para confirmar ou contestar as causas das trombofilias, e avaliar a eficiência e segurança da trombopprofilaxia em mulheres grávidas.

ANEXO I

[RESUMO DOS RESULTADOS GERAIS]



Análise das alterações genéticas e epigenéticas dos tumores gástricos infectados por *Helicobacter pylori* e *Vírus Epstein Barr*

