

Ana Cristina Gobbo César

Investigação de aneuploidias, deleção e expressão do gene
TP53 e infecção pelo *Helicobacter pylori* em lesões
benignas e adenocarcinomas gástricos



1910001173



ANA CRISTINA GOBBO CÉSAR

**Investigação de aneuploidias, deleção e expressão
do gene *TP53* e infecção pelo *Helicobacter pylori*
em lesões benignas e adenocarcinomas gástricos**

**Tese apresentada para obtenção
do Grau de Doutor em Genética.**

São José do Rio Preto - SP

2003



ANA CRISTINA GOBBO CÉSAR

**Investigação de aneuploidias, deleção e expressão do gene
TP53 e infecção pelo *Helicobacter pylori* em lesões
benignas e adenocarcinomas gástricos**



1.1.173/03

Orientadora: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva

São José do Rio Preto – SP

2003



4616.33

C421i

40101110

UNESP
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências

ANA CRISTINA GOBBO CÉSAR

Investigação de aneuploidias, deleção e expressão do gene
TP53 e infecção pelo *Helicobacter pylori* em lesões
benignas e adenocarcinomas gástricos

César, Ana Cristina Gobbo.

Investigação de aneuploidias, deleção e expressão do gene *TP53* e infecção pelo *Helicobacter pylori* em lesões benignas e adenocarcinoma gástrico / Ana Cristina Gobbo César – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003

162 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ana Elizabete Silva

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Adenocarcinoma gástrico. 2. Estômago - Inflamação - Úlcera. 3. Metaplasia intestinal. 4. *Helicobacter pylori*. 5. FISH - Técnica. 6. Gene *TP53* -. Deleção - Imunoistoquímica. 7. Reação em cadeia de polimerase. I. Silva, Ana Elizabete. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616.33



Ana Cristina Gobbo César

Investigação de aneuploidias, deleção e expressão do gene *TP53* e infecção pelo *Helicobacter pylori* em lesões benignas e adenocarcinomas gástricos

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

5º Examinador

São José do Rio Preto, 26 / 02 / 2003



A Dada, por sua sempre presente, sempre possível e verdadeira amizade.

A Mãe, Dra. Ana Elizabeth Silva, pela atenção e dedicação com que me apoiou, proporcionando a realização de um sonho.

As Filhas: Dra. Lucila Regina Martelli, Maria Aparecida Speranza, Agnes Cristina Fari-Costa e Andréa Borguetti Carvalho de Franco Sales, por terem vindo participar da banca examinadora pelo longo período de proficiência, enriquecendo muito o trabalho realizado.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, Campus de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro da FAPESP e PROAP/CAPES.

As Filhas: Dra. Elaine Helena Teixeira, Patrícia Maria Corrêa e Paula Ranaia Liberatore, pelo auxílio e suporte técnico durante a realização deste trabalho.

As amigas e familiares: Joana Rodrigues dos Santos, pela amizade, apoio e encorajamento sempre me oferecidos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Genética, em especial, a todos do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, que acompanharam comigo as etapas e etapas desta etapa.

Aos funcionários do Setor de Endoscopia, Centro Cirúrgico e Patologia do Hospital de Base e os da Biblioteca e Pós-Graduação em Genética do IBILCE-UNESP, pela colaboração, paciência e dedicação.

Aos técnicos: Helio Reis César e Maria Glória César e minha mãe Edna Regina Gobbo César, pelo carinho e incentivo em todos os momentos.

Agradecimentos

À **Deus**, por estar sempre presente, tornando possível a realização de mais esse trabalho;

À Profa. Dra. **Ana Elizabete Silva**, pela amizade e dedicação com que me orientou, possibilitando a realização de um sonho;

Às Profas. Dras. **Lúcia Regina Martelli**, **Márcia Aparecida Sperança**, **Agnes Cristina Fett-Conte** e **Andréa Borduchi Carvalho de Franco Salles**, por terem aceito participar da banca examinadora, pela leitura cuidadosa da proforma, enriquecendo muito o trabalho realizado;

À Profa. Dra. **Marileila Varella Garcia** pelas dicas e sugestões;

À Profa. **Adriana Barbosa dos Santos** e ao Prof. Dr. **Antonio José Manzato**, pelo auxílio prestado na análise estatística;

Às Profas. Dras. **Eloiza Helena Tajara**, **Patrícia Maluf Cury** e **Paula Rahal Liberatore**, pela amizade e sugestões preciosas durante a realização deste trabalho;

Ao amigo e funcionário **Josué Rodrigues dos Santos**, pela amizade, apoio e disposição que sempre me dispensou;

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Genética, em especial, a **todos** do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, que compartilharam comigo as alegrias e tristezas dessa etapa;

Aos funcionários do Setor de Endoscopia, Centro Cirúrgico e Patologia do Hospital de Base e os da Biblioteca e Pós-Graduação em Genética do IBILCE-UNESP, pela competência, paciência e dedicação;

Aos meus pais **Hélio Reis César** e **Nadyr Gobbo César** e minha irmã **Edna Regina Gobbo César**, pelo carinho e incentivo em todos os momentos.

SUMÁRIO

CAPÍTULO UM

INTRODUÇÃO: TAMBÉM CONFILOSOFIAS E ALIMENTAIS ENCONTROS
NA CARLINOGRINERIA E ENECA 10

OBJETIVOS 40

CAPÍTULO DOIS

COMPROMISSO E TENDÊNCIAS EUS HISTÓLOGO E MATEMÁTICA

UNIVERSIDADE E PONTIFICAL
ADEMOSIA E TENDÊNCIAS GATINCO
*A esperança é a base da vida humana.
Para viver, o homem não dispõe senão
da esperança, seu mais valioso
patrimônio.*

CAPÍTULO TRÊS

ANEXOS E UNAS E LECTARIS DE A TENDÊNCIA DE PONTIFICAL *José Zorilla*

MONIGNAL E ALTERNATIVAS E UNAS E LECTARIS DE A TENDÊNCIA DE PONTIFICAL

CONTEÚDO E OBJETIVOS

E LECTARIS

89

CAPÍTULO QUATRO

DELLUÇÃO E EXPERIÊNCIA E TENDÊNCIAS E LECTARIS

ADPNOE E LECTARIS E LECTARIS E LECTARIS *Goethe*

DELLUÇÃO E EXPERIÊNCIA E TENDÊNCIAS E LECTARIS

109

SUMÁRIO

CAPÍTULO UM:

INTRODUÇÃO - FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS ENVOLVIDOS
NA CARCINOGENESE GÁSTRICA10

OBJETIVOS.....40

CAPÍTULO DOIS:

COMPARAÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS HISTOLÓGICO E MOLECULAR
DO *HELICOBACTER PYLORI* EM LESÕES BENIGNAS E
ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS.....42

CAPÍTULO TRÊS:

ANEUPLOIDIAS DETECTADAS PELA TÉCNICA DE FISH EM LESÕES
BENIGNAS E ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS E ASSOCIAÇÃO
COM *HELICOBACTER*
PYLORI.....69

CAPÍTULO QUATRO:

DELEÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE *TP53* EM LESÕES BENIGNAS E
ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS E ASSOCIAÇÃO COM
HELICOBACTER PYLORI.....109

CAPÍTULO CINCO:

DISCUSSÃO.....142

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....149

CAPÍTULO SEIS:

CONCLUSÕES.....156

RESUMO.....158

ABSTRACT.....160

ANEXO 1162

Perfuração, Arguinos e Engenharia de Minas e Metalurgia

ISBN 978-65-4-28003

A obra está licenciada sob a Licença de Acesso de 2023

Título: Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese

gástrica

Fatores Genéticos e Ambientais envolvidos na Carcinogênese Gástrica

Autores: Ana Carolina Galvão César*, Ana Carolina Silva**, Erika

Matias e Silva***

* Mestre em Engenharia e Ciência - UFSCar, Universidade do Programa

de Pós-Graduação em Engenharia, Departamento de História - UNESP

2019, Universidade Federal de São Carlos

** Mestre em Engenharia e Ciência - UFSCar, Universidade do Programa

de Pós-Graduação em Engenharia, Departamento de História - UNESP

*** Mestre em Engenharia e Ciência - UFSCar, Universidade do Programa

de Pós-Graduação em Engenharia, Departamento de História - UNESP

Enviado para publicação em 12 de maio de 2023, por Ana Carolina Galvão

Rua Urupion, 2000 - Bairro Jardim, 13.083-900

13083-900 - São José do Rio Preto - SP

Telefone: (17) 3334-1111 - Fax: (17) 3334-1111

E-mail: aparelhos@ufscar.br - www.ufscar.br

Capítulo um

Periódico: Arquivos de Gastroenterologia (*Archives of Gastroenterology*)

ISSN 0004-2803

Aceito para publicação em 13 de agosto de 2002.

Título: Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica

Título em inglês: Genetics and environmental factors in gastric carcinogenesis

Autores: Ana Cristina Gobbo César*, Ana Elizabete Silva**, Eloiza Helena Tajara***

* Mestre em Genética e Evolução - UFSCar. Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia, UNESP - São José do Rio Preto-SP

** Doutora em Genética. Professora Assistente-Doutor, Departamento de Biologia, UNESP – São José do Rio Preto-SP

*** Livre Docente em Genética. Professora Adjunto, Departamento de Biologia, UNESP – São José do Rio Preto-SP

Endereço para correspondência: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva

Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Bairro Jardim Nazareth

15054-000 São José do Rio Preto-SP

Fone: (17)221-2384, Fax: (17)221-2390

e-mail: anabete@bio.ibilce.unesp.br



RESUMO - O câncer gástrico é o segundo tipo mais comum de neoplasia no mundo. A carcinogênese de estômago é um processo de múltiplos passos, podendo manifestar-se em várias etapas como gastrite superficial, gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, como um carcinoma. Essas condições costumam ser seqüenciais e ocorrer num período de muitos anos como resultado da exposição a uma variedade de fatores endógenos e exógenos, os quais causam alterações genéticas. Os recentes avanços da Genética Molecular têm mostrado que o acúmulo dessas várias alterações, incluindo a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor, resultam no desenvolvimento do câncer. Alterações genéticas descritas em carcinomas gástricos incluem amplificações e mutações dos genes *c-ERBB2*, *K-RAS*, *c-MET* e *TP53*. O ganho de cromossomos também foi encontrado em várias combinações com perda de outros cromossomos e pode estar associado com a expressão elevada de oncogenes, que contribuem com a progressão tumoral. Essas mudanças genéticas em carcinomas evidenciam o processo de múltiplas etapas da carcinogênese gástrica, por meio do acúmulo de uma série de alterações.

DESCRITORES - gastrite, úlcera gástrica, atrofia, câncer gástrico, alterações cromossômicas, genes.



O câncer de estômago é o segundo tipo mais comum de neoplasia em incidência e mortalidade, sendo duas vezes mais freqüente no sexo masculino do que no feminino⁽¹⁾, principalmente entre os idosos. A freqüência na população é baixa aos 40 anos e aumenta progressivamente com a idade até atingir seu valor mais elevado por volta dos 70 anos nos homens e um pouco mais tarde nas mulheres⁽¹⁴⁾.

As estatísticas mundiais mostram uma distinta variação geográfica⁽¹⁴⁾. Por exemplo, taxas elevadas são encontradas no Japão, Chile, China, Portugal e Rússia enquanto, em outros países, essas taxas têm declinado, como na França, Reino Unido, Austrália, Canadá e Estados Unidos. No Brasil, as estimativas para 2002 apontaram para mais de 20 mil casos novos e 11 mil óbitos⁽²⁷⁾ sendo, na cidade de São Paulo, o tipo de neoplasia mais comum entre os homens e o terceiro entre as mulheres⁽¹⁾.

O prognóstico do câncer gástrico avançado é extremamente ruim, com taxas de sobrevivência de cinco anos entre 5 a 15%⁽⁵⁾. Tal fato é consequência do diagnóstico ser realizado em estágios avançados na maioria dos casos e dessa doença mostrar taxa de recorrência próxima a 80%, mesmo quando é realizada a gastrectomia⁽¹⁴⁾. O prognóstico depende da extensão da invasão do câncer, do comprometimento das estruturas adjacentes e da presença ou ausência de metástases em nódulos linfáticos e outros órgãos distantes.



A tumorigênese gástrica, assim como de outros órgãos, é um processo de múltiplas etapas que, clinicamente, pode manifestar-se como gastrite, atrofia gástrica, ulcerações, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, como uma neoplasia maligna⁽¹¹⁾. Essas condições costumam ser sequenciais e ocorrer num período de muitos anos como resultado da exposição a uma variedade de fatores endógenos e exógenos. As principais conseqüências da ação de tais fatores são as mutações somáticas, como em oncogenes e genes supressores de tumor, que conferem às células vantagens seletivas de proliferação⁽¹⁰⁾.

A gastrite é a lesão que mais freqüentemente afeta o estômago e é definida como uma inflamação da mucosa gástrica. A gastrite aguda é raramente observada em biópsia de rotina, por causa de sua característica transitória. Na gastrite crônica, as lesões vão desde um processo inflamatório superficial até a atrofia do epitélio, que é evidenciada pela perda significativa de estruturas glandulares e mostra-se algumas vezes associada a metaplasia intestinal. Aproximadamente 10% dos pacientes com atrofia gástrica desenvolvem carcinoma em um período de 15 anos⁽⁹⁾ sendo, por isso, considerada uma lesão pré-maligna⁽²⁰⁾.

Em 60-80% dos casos, existe uma associação entre gastrite e úlcera gástrica. Vários dados da literatura mostram que entre os fatores etiológicos da úlcera estão defeitos primários na resistência da mucosa ou alterações quantitativas ou qualitativas do seu muco, além de alguns

fatores ambientais, como a ingestão de aspirina não-tamponada, álcool e medicamentos antiinflamatórios não-esteróides^(2,11).

Os pacientes com úlceras apresentam níveis reduzidos ou normais de ácido gástrico. Hansson *et al.*⁽²²⁾ mostraram que, entre aqueles com redução na produção desse ácido e pangastrite, existe um risco maior de câncer do que nos pacientes com úlcera duodenal, que têm níveis elevados de ácido e geralmente também exibem gastrite, predominantemente na região antral. É importante referir que a ressecção gástrica como tratamento da úlcera não diminui esse risco⁽⁵⁵⁾.

Eventualmente, acompanhando uma gastrite ou durante o processo de cicatrização da mucosa gástrica, é observada a metaplasia intestinal, que é decorrente da transformação do epitélio de revestimento e glandular em células absortivas colunares metaplásicas intercaladas por células caliciformes de morfologia intestinal. Essa lesão está associada à infecção por *Helicobacter pylori*⁽¹⁹⁾ e, embora as características do intestino delgado predominem, em algumas situações as características do epitélio colônico estão presentes, originando a metaplasia do tipo incompleto, que é o mais relacionado ao câncer gástrico⁽³⁰⁾.

Com uma gastrite crônica de longa duração, o epitélio desenvolve alterações citológicas, incluindo alterações de tamanho, formato e orientação das células epiteliais com atipia dos núcleos. Essas alterações displásicas podem se tornar tão graves a ponto de constituírem um carcinoma *in situ*^(11,34), principalmente do tipo intestinal que provém de

formas atróficas de gastrite. Já o tipo difuso surge originalmente, sem evolução por meio de displasia.

O adenocarcinoma representa 90-95% dos casos de neoplasias malignas do estômago⁽¹¹⁾, sendo classificado com base em aspectos histopatológicos e clínicos em dois tipos: intestinal e difuso⁽⁶¹⁾. As lesões tipo intestinal são as mais freqüentes, bem diferenciadas, dependentes de fatores ambientais e associadas com a presença de lesões pré-cancerosas, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia⁽⁵⁷⁾. São encontradas predominantemente em homens e em indivíduos mais idosos. O tipo difuso é pouco diferenciado, tem prognóstico ruim e não está associado a lesões pré-cancerosas⁽⁵⁹⁾. É um pouco mais freqüente em mulheres e pacientes jovens e tem uma alta ocorrência familiar, principalmente entre indivíduos com tipo sanguíneo A⁽¹⁴⁾.

Diferenças nos critérios de diagnóstico do câncer gástrico inicial entre patologistas japoneses e ocidentais, resultam na falta de entendimento por parte dos clínicos. Segundo Ming and Hirota⁽⁴²⁾, que exemplificam a opinião de autores ocidentais, a maioria dos carcinomas gástricos são diagnosticados após um ano da presença de displasia, sugerindo que o câncer já estava presente no momento da detecção dessa lesão pré-cancerosa. Portanto, ambas lesões ocorreriam concomitantemente e, o desenvolvimento do carcinoma seria mais freqüentemente em áreas com displasia severa. Já na opinião dos

patologistas japoneses, a gastrite atrófica com metaplasia evoluiria diretamente para o câncer sem a etapa de displasia, sendo bem representada no trabalho fundamental de Nakamura *et al.* ⁽⁴⁵⁾.

FATORES ETIOLÓGICOS DO CÂNCER GÁSTRICO

Existem muitos dados epidemiológicos sugerindo que fatores genéticos e ambientais têm um papel importante na etiologia do câncer gástrico. Entre esses últimos, estão o consumo elevado de sal, álcool, cirurgia gástrica anterior, infecção por *H. pylori* e história de lesões benignas ^(1,11,14). Existem também indicações de que a ingestão ou a formação intragástrica de compostos nitrosos ou outras substâncias genotóxicas, assim como o refluxo de bile em indivíduos com gastrite-*Helicobacter pylori* positivo, induzem ao aparecimento da metaplasia intestinal e de lesões neoplásicas ^(12,39,47).

No caso de compostos nitrogenados e seus metabólitos, acredita-se que sua ação esteja relacionada com a inibição de vitamina C e de outros antioxidantes que protegem o DNA ^(14,35,70). São capazes de provocar a desaminação de purinas e pirimidinas do DNA, do mesmo modo que o óxido nitroso, já referido como responsável por mutações de ponto no gene supressor de tumor *TP53* ⁽⁵²⁾.

Ao contrário desses compostos, os carotenóides, as vitaminas C e E, o folato e o selênio presentes em frutas e vegetais estão relacionados com a diminuição no risco de aparecimento do câncer gástrico ⁽¹⁾.

Um fator ambiental bastante estudado é a presença do *H. pylori*, considerado o principal agente etiológico em mais de 95% das gastrites crônicas e responsável pelo aumento do risco de câncer em até nove vezes⁽³⁷⁾. É reconhecido como agente desencadeante de diferentes alterações gástricas, como inflamação crônica assintomática, dispepsia, úlcera, adenocarcinomas e linfomas^(40,66). Entretanto, a infecção por *H. pylori* parece não ser suficiente para o desenvolvimento do câncer, cujo risco é de apenas 1% entre os indivíduos infectados. Na África, por exemplo, a infecção por essa bactéria é observada em crianças de pouca idade, mas nem por isso o câncer gástrico é comum nesse país^(25,58). Apesar disso, 60-80% dos casos de neoplasia mostram a presença dessa bactéria⁽³⁷⁾.

O conhecimento sobre o papel do *H. pylori* na tumorigênese ainda é incompleto. Sabe-se que essa bactéria secreta urease, uma enzima responsável pela produção de amônia, além de proteases e fosfolipases, que degradam as glicoproteínas presentes na mucosa gástrica e danificam suas células⁽¹¹⁾. Outra característica importante é a virulência dessa bactéria, pois existe uma forte associação entre cepas *H. pylori*-*cagA* positivas e ulceração gástrica. O gene *cagA* (*cytotoxin-associated gene*) faz parte da chamada ilha de patogenicidade *cag*, cujos genes expressam proteínas do sistema de secreção tipo IV, capazes de transferir produtos bacterianos, incluindo a proteína *cagA*, para dentro das células do hospedeiro.

Um segundo gene relacionado a virulência, o *vacA*, é responsável pela codificação de uma citotoxina vacuolizante e apresenta uma ampla diversidade alélica. As isoformas descritas incluem s1a, s1b, s1c, s2, m1, m1a, m1*, m1-m2*, m2a e m2b, algumas delas com maior virulência, como s1/m1. Existem relatos de que a associação da variante s1a ao produto do gene *cagA* é responsável por um processo inflamatório severo na mucosa gástrica⁽³⁾.

O gene *iceA* também tem sido estudado em cepas de *H. pylori*, sendo suas principais variantes alélicas a *iceA1* e a *iceA2*. A função desses subtipos ainda não está clara. A expressão do alelo *iceA1* é regulada pelo contato entre o *H. pylori* e as células epiteliais do hospedeiro e alguns dados sugerem sua participação no desenvolvimento de ulceração péptica^(50,67), enquanto outros não⁽²⁸⁾.

Quanto aos fatores genéticos na tumorigênese gástrica, há indicações de que apenas 4% dos casos são familiares⁽¹¹⁾. Apoiando esses dados estão os estudos sobre as variações na incidência da doença em migrantes em decorrência de mudanças ambientais, principalmente dieta e fatores culturais. Na China, a frequência de câncer de estômago em homens foi 4 a 6 vezes mais elevada, quando comparada aos migrantes chineses residentes nos USA⁽¹⁾.



ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS E GÊNICAS ENVOLVIDAS NA CARCINOGENESE GÁSTRICA

O desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, prevenção e tratamento têm contribuído para a redução do câncer gástrico. Todavia, para que ocorra um maior progresso nessa área, ainda é necessário compreender melhor os mecanismos envolvidos nas várias etapas do processo tumorigênico⁽²¹⁾.

No modelo proposto por Fearon e Vogelstein⁽¹⁷⁾, a carcinogênese gastrointestinal é considerada o resultado de um processo de múltiplos passos, no qual anormalidades morfológicas são acompanhadas por um acúmulo progressivo de alterações genéticas. No caso especial do câncer gástrico, é observada uma elevada heterogeneidade nos padrões histológicos e nos genótipos celulares⁽⁶⁾, com uma crescente complexidade dos fenótipos benignos até os malignos (Figura 1). Por exemplo, são referidas perdas da região do braço curto do cromossomo 17 (17p) em 43% dos adenomas e em 67% dos carcinomas⁽³³⁾ e perda de heterozigosidade (processo que compreende a conversão do estado heterozigoto para homozigoto em função da perda de um dos alelos) em relação ao gene de reparo do DNA *hMSH2* e aos supressores de tumor *APC* e *TP53* em 45% das metaplasias e em 73% dos adenocarcinomas⁽³¹⁾.

Os mecanismos moleculares associados com a etiologia do tumor gástrico incluem alterações em vários genes. Por exemplo, no tipo

intestinal, ocorrem principalmente amplificações em *c-ERBB2*, *c-MET* e *CCNE1* (ciclina E), mutações no *K-RAS*, inativação do *APC*, *TP53*, *p16*, *MGMT* e *MLH1*, perda de heterozigosidade (LOH) do *TP73* e redução na expressão das proteínas p27 e nm23, enquanto, no tipo difuso, são citadas redução ou perda de função das caderinas, inativação do *TP53*, LOH da região 17q21, amplificação dos genes *K-SAM*, *c-MET* e *CCNE1* e redução na expressão das proteínas p27 e nm23 ^(8,15,41,44,49,54,63,64,68,69,71).

Os genes citados codificam receptores de membrana relacionados com a transdução de mensagens ao núcleo (*K-RAS*), receptores de fator de crescimento (*c-ERBB2*, *c-MET* e *K-SAM*), proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular como *TP53*, *APC*, *TP73* (mapeado em 1p36), *CDKN1A* (p27) e *CCNE1* ou proteínas de adesão (caderinas).

Várias alterações epigenéticas também atuam no processo multipassos da carcinogênese gástrica⁽⁷⁰⁾. Por exemplo, na etapa inicial, detectou-se a ativação da telomerase, observada em vários casos de metaplasia intestinal e adenomas gástricos. Essa enzima é responsável pela adição de seqüências teloméricas às extremidades dos cromossomos, para compensar as perdas que ocorrem em cada divisão celular.

Os dados citogenéticos, que podem trazer importantes informações sobre as regiões do genoma envolvidas na malignização, são relativamente escassos nas lesões de estômago. Esse fato é decorrente principalmente das dificuldades de análise de metáfases

obtidas em culturas de tumores primários. Mais recentemente, técnicas de citogenética molecular, como a Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) e a Hibridização Genômica Comparativa (CGH), têm enriquecido esses dados e indicado o envolvimento de diferentes cromossomos e regiões cromossômicas nos processos de iniciação e progressão tumoral^(21,32,33,48,62). Ambas as técnicas estão baseadas na propriedade de hibridização de moléculas de ácidos nucléicos complementares. Utilizam DNAs ligados a compostos fluorescentes que, após o procedimento de hibridização, permitem a marcação de segmentos do genoma e a identificação daqueles com número anormal de cópias ou mesmo com alterações estruturais.

A técnica de CGH, em função de suas características, tem revelado perdas e ganhos de diferentes segmentos. Os ganhos são mais freqüentes e envolvem principalmente as regiões 1q22-q31, 2q, 7pq, 8pq (8q23-qter), 9q33-qter, 13q, 17p11.2-q22, 18q e 20pq. Em especial, a banda 17q21 tem revelado alto nível de amplificação. As perdas afetam as regiões 4q32 e 17p e, menos freqüentemente, 1q, 5p, 9p, 18q e todo o cromossomo 21^(36,38,56).

A técnica de FISH também tem auxiliado no mapeamento de genes e na elucidação de alterações cromossômicas não definidas pela citogenética clássica. Sua principal vantagem é o fato de permitir o estudo tanto de metáfases como de núcleos interfásicos procedentes de células em cultura, tecidos frescos, material de arquivo embocado em parafina e



aspirado celular. Os resultados obtidos por essa técnica em tumores gástricos têm revelado, como no caso da CGH, um grande número de alterações cromossômicas numéricas. O ganho dos cromossomos 1, 2, 4, 7 e 20 é observado em estágios precoces da carcinogênese gástrica^(16,32,46). Por outro lado, trissomias e polissomias dos cromossomos 3, 6-8, 10-12, 15-17 e das regiões 7q31, 8q24, 9p21, 9p22-pter e 9p32-33 parecem estar relacionadas com transformação maligna e com invasividade ou com menor sobrevida^(4,26,32,56,60,62). Alguns dos genes presentes nessas regiões incluem os oncogenes *c-MET*, *c-MYC* e *c-ERBB2* e os supressores de tumor *CDKN2A*, *CDKN2B* e *TP53*^(23,26,44,56,60), esses últimos responsáveis pela regulação do ciclo celular.

As regiões 7q31 e 17p13.1 estão entre as mais afetadas. Na região 7q31 está mapeado o gene *c-MET*, que codifica um receptor de fator de crescimento (HGF) envolvido no controle da proliferação de células do fígado e do trato gastrointestinal e, provavelmente, é importante no reparo da mucosa danificada⁽⁶⁵⁾. Na região 17p13.1 está localizado o supressor de tumor *TP53*. A mutação ou a perda desse gene é um evento inicial na tumorigênese gástrica⁽²³⁾ e também tem sido observada em lesões benignas ou pré-cancerosas, como gastrite atrófica, metaplasia intestinal e displasia. Seu produto tem papel essencial na regulação da proliferação celular e, em presença de lesões no DNA, é responsável pelo bloqueio do ciclo celular entre as fases G1-S. Nos casos em que o DNA não é



reparado adequadamente, a proteína p53 ativa o processo de apoptose por meio da regulação transcricional e da interação direta com as proteínas bcl-2 e bax.

Ainda não está esclarecido se as alterações no gene *TP53* são desencadeadas pela inflamação provocada pelo *H. pylori*. Entretanto, Deguchi *et al.*⁽¹³⁾ observaram uma frequência mais elevada de mutações no *TP53* em pacientes com câncer gástrico infectados por *H. pylori* *cagA*+ do que nos grupos *H. pylori*-positivo/*cagA*-negativo e *H. pylori*-negativo.

Existem também indicações de que a infecção crônica pelo *H. pylori* seja responsável pela instabilidade genômica observada em alguns casos de gastrite atrófica crônica e pelo aumento da proliferação celular^(24,39) e da apoptose na mucosa gástrica, provavelmente em consequência da resposta inflamatória⁽²⁹⁾. Tem sido sugerido que a erradicação da infecção reverte o processo inflamatório e, conseqüentemente, a atrofia, a metaplasia e a instabilidade genômica^(7,18,24,39,46).

A proliferação celular na mucosa gástrica de indivíduos *H. pylori*-positivos ocorre independentemente da cepa ser *cagA*-positiva mas a taxa de apoptose é significativamente maior nos indivíduos infectados por essa cepa⁽⁴³⁾. Tal conclusão é, porém, controversa, sendo apoiada por alguns estudos realizados com cultura celular^(51,53), mas não por outros⁽⁶⁹⁾.

Em conclusão, parece que a infecção provocada pelo *H. pylori* atua como um co-fator na carcinogênese gástrica, favorecendo o



aparecimento de danos no DNA e alterando os processos de proliferação celular e apoptose. A somatória desse e de outros fatores ambientais, juntamente com a suscetibilidade genética, deve facilitar o aparecimento de alterações genéticas somáticas que acompanham a evolução de lesões pré-cancerosas a câncer gástrico, mas muitos estudos são ainda necessários para a devida avaliação da verdadeira importância e do grau de participação de cada um desses fatores nas diferentes etapas da tumorigênese.

COMENTÁRIOS FINAIS

A carcinogênese gástrica é um processo com múltiplas etapas, na qual as mudanças morfológicas são consequência das alterações genéticas, que ocorrem sucessivamente durante esse processo e podem levar a evolução de uma gastrite crônica em atrófica, associada ou não a metaplasia. Até essa etapa, as alterações na forma da célula e do núcleo podem ser revertidas, muitas vezes, após tratamento da infecção por *H. pylori* e mudanças na dieta e no estilo de vida. Todavia, uma parcela dessas gastrites atróficas associadas a metaplasia podem evoluir para displasia e, conseqüentemente, para o carcinoma *in situ*.

Muitas alterações genéticas observadas em lesões metaplásicas e adenomas são encontradas nas neoplasias gástricas, demonstrando a sua heterogeneidade ao longo do processo de malignização.

Os critérios histopatológicos são extremamente importantes para definir e dar suporte ao diagnóstico e prognóstico, todavia, são limitados e



subjetivos, gerando muitas vezes discordância entre observadores diferentes, principalmente quanto às lesões displásicas e carcinoma *in situ*. Por exemplo, os patologistas japoneses, ao contrário dos ocidentais, não consideram a existência de lesões displásicas, o que confunde os clínicos.

Tais dificuldades apontam para a necessidade de uma classificação que utilize critérios menos subjetivos. Os avanços na área molecular abrem a possibilidade de utilização de marcadores genéticos que, somados aos dados histopatológicos e imunoistoquímicos poderá levar a diagnósticos e prognósticos mais seguros.



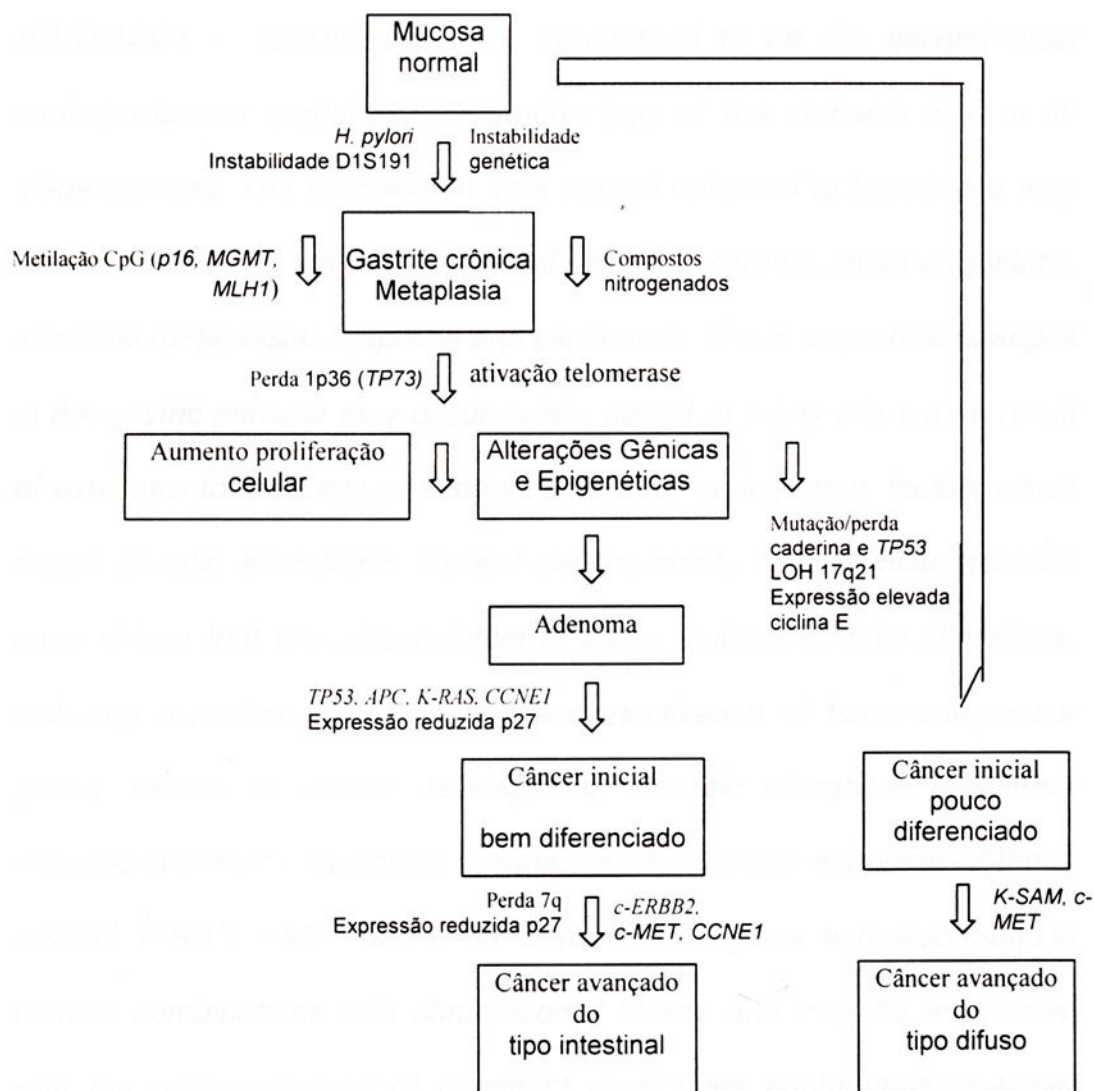


Figura 1 – Progressão maligna do adenocarcinoma tipo intestinal e difuso com as alterações genéticas e epigenéticas associadas (modificado de Tahara, 1998 e Yasui *et al.*, 2000; 2001).

César ACG, Silva AE, Tajara EH. Genetics and environmental factors in gastric carcinogenesis

ABSTRACT - Gastric cancer is considered to be the second most common cancer worldwide. Carcinogenesis of the stomach is a multi-stage process. The progression from normal epithelial to tumor cells may involve at least 6 stages: superficial gastritis, chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia and carcinoma. These sequential changes in the gastric mucosa may occur over a period of many years as a result of exposure to a variety of exogenous and/or endogenous factors which cause genetic alterations. Recent developments in molecular genetics have shown that the accumulation of these multiple genetic alterations, including activation of oncogenes and inactivation of tumor-suppressor genes, results in cancer development. Genetic alterations previously reported in gastric carcinomas include amplifications or mutations of the c-ERBB2, K-RAS, c-MET and TP53. Chromosomal gains were also found in various combinations with chromosomal losses and may be associated with the overexpression of dominant oncogenes contributing to tumor progression. These accumulated genetic changes in carcinomas provide evidences for the stepwise mode of gastric carcinogenesis through the accumulation of a series of genetic alterations.

HEADINGS - gastritis, gastric ulcer, atrophic, gastric cancer, chromosome aberrations, genes.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AICR - American Institute for Cancer Research. World Cancer Research Fund. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington: Banta Book Group; 1997.
2. Anand BS, Graham DY. Ulcer and Gastritis. *Endoscopy* 1999;31:215-25.
3. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995;270:17771-7.
4. Blanco R, Lyda M, Davis B, Kraus M, Fenoglio-Preiseer C. Trisomy 3 in gastric lymphomas of extranodal marginal zone-B cell (mucosa-associated lymphoid tissue) origin demonstrated by FISH in intact paraffin tissue sections. *Hum Pathol* 1999;30:706-11.
5. Brien TP, Depowski MD, Sheehan CE, Ross JS, McKenna BJ. Prognostic factors in gastric cancer. *Mod Pathol* 1998;11:870-7.
6. Buonsanti G, Calistri D, Padovan L. Microsatellite instability in intestinal- and diffuse-type gastric carcinoma. *J Pathol* 1997;182:167-73.
7. Cahill RJ, Xia H, Kilgallen C, Beattie S, Hamilton H, O'Morain C. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial cell proliferation. *Dig Dis Sci* 1995;40:1627-31.
8. Chan AO, Lam SK, Chu KM, Lam CM, Kwok E, Leung SY, Yuen ST, Law SY, Hui WM, Lai KC, Wong CY, Hu HC, Lai CL, Wong J. Soluble E-



cadherine is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. *Gut* 2001; 48:808-11.

9. Cheli R, Giacosa A. Atrophic gastritis. In: Sherlock P., Morson B.C.; Barbara L.; Veronesi U. eds. *Precancerous Lesions for the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press, 1983.

10. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992;70:1727-31.

11. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Pathologic Basis of Disease*. 6 ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999.

12. Dani R. *Gastroenterologia Essencial*. Rio de Janeiro: Guanabara; 1998.

13. Deguchi R, Takagi A, Kawata H, Inoko H, Miwa T. Association between CagA+ *Helicobacter pylori* infection and p53, bax and transforming growth factor-beta-RII gene mutations in gastric cancer patients. *Int J Cancer* 2001;91:481-5.

14. De Vita VTJr, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer – Principles e Practice of Oncology*. 5 ed. (v.1). Philadelphia / New York: Lippincott-Raven; 1997.

15. Endoh Y, Sakata K, Tamura G, Ohmura K, Ajioka Y, Watanabe H, Motoyama T. Cellular phenotypes of differentiated-type adenocarcinomas and precancerous lesions of the stomach are dependent on the genetic pathways. *J Pathol* 2000;191:257-63.



16. Espinoza LA, Neto B J, Casartelli C. Pathological and Karyotypic Abnormalities in Advanced Gastric Carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;109:45-50.
17. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
18. Fraser AG, Sim R, Sankey EA, Dhillon AP, Pounder RE. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell proliferation. *Aliment Pharmacol Ther* 1994;8:167-73.
19. Genta R.M. *Helicobacter pylori* as a promotor of intestinal metaplasia and gastric cancer: an alluring hypothesis in search of evidence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:S25-S30.
20. Genta RM. Gastric atrophy and atrophic gastritis – nebulous concepts in search of a definition. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12:17-23.
21. Guan XY, Fu SB, Xia JC, Fang Y, Sham JST, Du BD, Zhou H, Lu S, Wang BQ, Lin YZ, Liang Q, Lim XM, Ju B, Ning XM, Du JR, Lim P, Trent JM. Recurrent chromosome changes in 62 primary gastric carcinomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;123: 27-34.
22. Hansson L, Nyren O, Hsing AW. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med* 1996;335:242-9.



23. Hao Y, Zhang J, Yi C, Qian W. Abnormal change of p53 gene in gastric and precancerous lesions and APC gene deletion in gastric carcinoma and near tissues. *J Tongji Med Univ* 1997;17(2):75-8.
24. Hibi K, Mitomi H, Koizumi W, Tanabe S, Saigenji K, Okayasu I. Enhanced cellular proliferation and p53 accumulation in gastric mucosa chronically infected with *Helicobacter pylori*. *Am J Clin Pathol* 1997;108:26-34.
25. Holcombe C. *Helicobacter pylori*: the African enigma. *Gut* 1992;33:429-31.
26. Igaki H, Sasaki H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Kimura T, Harada Y, Sugimura T, Terada M. Mutation frequency of the p16/CDKN2 gene in primary cancers in the upper digestive tract. *Cancer Res* 1995; 55:3421-3.
27. INCA – Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2002.
28. Ito Y, Azuma T, Ito S, Suto H, Miyaji H, Yamazaki Y, Kato T, Kohli Y, Keida Y, Kuriyama M. Sequence analysis and clinical significance of the *iceA* gene from *Helicobacter pylori* strains in Japan. *J Clin Microbiol* 2000;38:483-8.
29. Jang TJ, Kim JR. Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial cells of patients infected with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 2000;35:265-71.



30. Jass JR, Filipe MI. Variants of intestinal metaplasia associated with gastric carcinoma. A histochemical study. *Histopathol* 1997;3:191-9.
31. Kim YH, Kim NG, Lim JG, Park C, Kim H. Chromosomal alterations in paired gastric adenomas and carcinomas. *Am. J. Pathol* 2001;158:655-62.
32. Kitayama Y, Igarashi H, Sugimura H. Different vulnerability among chromosomes to numerical instability in gastric carcinogenesis: stage-dependent analysis by FISH with the use of microwave irradiation. *Clin Cancer Res* 2000;6:3139-46.
33. Kobayashi K, Okamoto T, Takayama S, Akiyama M, Ohono T, Yamada H. Genetic instability in intestinal metaplasia is a frequent event leading to well-differentiated early adenocarcinoma of the stomach. *Eur J Cancer* 2000;36:1113-9.
34. Kokkola A, Haapiainen R, Laxen F, Puolakkainen P, Kivilalkso E, Virtamo J, Sipponen P. Risk of gastric carcinoma in patients with mucosal dysplasia associated with atrophic gastritis: a follow-up study. *J Clin Pathol* 1996;49:979-84.
35. Kono S, Hirohata T. Nutrition and stomach cancer. *Cancer Causes Control* 1996;7:41-55.
36. Koo SH, Kwon KC, Shin SY, Jeon YM, Park JW, Kim SH, Noh MS. Genetic Alterations of Gastric Cancer: Comparative Genomic Hybridization and Fluorescence In Situ Hybridization Studies. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;117:97-103.



37. Kuipers EJ. Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:3-11.
38. Larramendy ML, El-Rifai W, Kokkola A, Puolakkainen P, Monni O, Salovaara R, Aarnio M, Knuutila S. Comparative genomic hybridization reveals differences in DNA copy number changes between sporadic gastric carcinomas and gastric carcinomas from patients with hereditary nonpolypoid colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;106:62-5.
39. Lynch DAF, Mapstone NP, Clarke AMT, Jackson P, Moayyedi R, Dixon MF, Quirke P, Axon ATR Correlation between epithelial cell proliferation and histological grading in gastric mucosa. *J Clin Pathol* 1999;52:367-71.
40. Ma JL, You WC, Gail MH, Zhang L, Blot WJ, Chang YS, Jiang J, Liu WD, Hu YR, Brown LM, Xu GW, Fraumeni JF Jr. *Helicobacter pylori* infection and mode of transmission in a population at high risk of stomach cancer. *Int J Epidemiol* 1998;27(4):570-3.
41. Maeta M, Saito H, Oka S, Tsujitani S, Ikeguchi N, Kaibara N. Mutated p53 in tumors, mutant p53 and p53-specific antibodies in the circulation in patients with gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19:489-95.
42. Ming SC, Hirota T. Malignant epithelial tumors of the stomach. In: Ming SC, Goldman H, editors. *Pathology of the gastrointestinal tract*. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. p.607-47.
43. Moss SF, Sordillo EM, Abdalla AM, Makarov V, Hanzely Z, Perez-Perez G, Blaser MJ, Holt PR. Increased gastric epithelial cell apoptosis



associated with colonization with *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains. *Cancer Res* 2001;61:1406-11.

44. Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, Matsuda M, Sakaguchi T, Hirao T, Nakano H. The prognostic significance of amplification and overexpression of *c-met* and *c-erbB-2* in human gastric carcinomas. *Cancer* 2000;88:1894-1902.

45. Nakamura K, Sugano H, Takagi K. Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearance. *Jpn J Cancer Res* 1968; 69:930-5.

46. Nardone G, Staibano S, Rocco A, Mezza E, D'Armiento FP, Insabato L, Coppola A, Salvatore G, Lucariello A, Figura N, De Rosa G, Budillon G. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut* 1999;44:789-99.

47. Oashima H, Friesen M, Malaveille C, Brouet I, Hautefeuille A, Bartsch H. Formation of direct-acting genotoxic substances in nitrosated smoked fish and meat products: identification of simple phenolic precursors and phenyldiazonium ions as reactive products. *Food Chem Toxicol* 1989;27:193-200.

48. Okada K, Sugihara H, Bamba M, Bamba T, Hattori T. Sequential Numerical Changes of Chromosomes 7 and 18 in Diffuse-Type Stomach Cancer Cell Lines: combined Comparative Genomic Hybridization,



Fluorescence In Situ Hybridization and Ploidy Analyses. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;118:99-107.

49. Park WS, Oh RR, Park JY, Shin MS, Lee HK, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY. Absence of mutations in the kinase domain of the Met gene and frequent expression of Met and HGF/SF protein in primary gastric carcinomas. *APMIS* 2000;108:195-200.

50. Peek RMJr, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:531-44.

51. Peek RM, Blaser MJ, Mays DJ, Forsyth MH, Cover TI, Song SY, Krishnan U, Pietenpol JA. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res* 1999;59:6124-31.

52. Poremba C, Uandell DW, Huang Q, Little JB, Mellin W, Schmid KW, Bocker W, Dockhorn-Dworniczak B. Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer: a molecular genetic and immunohistochemical study. *Virchows Arch* 1995;426:447-55.

53. Rudi J, Kuck D, Strand S, von Herbay A, Mariani SM, Krammer PH, Galle PR, Stremmei W. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. *J Clin Investig* 1998;102:1506-14.



54. Russo A, Bazan V, Migliavacca M, Tubiolo C, Macaluso M, Zanna I, Corsale S, Latteri F, Valerio MR, Pantuso G, Morello V, Dardanoni G, Latteri MA, Colucci G, Tomasino RM, Gebbia N. DNA aneuploidy and high proliferative activity but not K-ras-2 mutations as independent predictors of clinical in operable gastric carcinoma: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell' Italia Meridionale (GDIM) prospective study. *Cancer* 2001;92:294-302.
55. Safatle-Ribeiro A, Ribeiro U, Reynolds JC. Gastric stump cancer: What is the risk? *Dig Dis* 1998;16:159-68.
56. Sakakura C, Mori T, Sakabe T, Ariyama Y, Shinomiya T, Date K, Hagiwara A, Yamaguchi T, Takahashi T, Nakamura Y, Abe T, Inazawa J. Gains, losses and amplifications of genomic materials in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 1999;24:299-305.
57. Shiao YH, Rugge M, Correa P, Lehmann HP, Scheer WD. p53 alteration in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol* 1994;144:511-7.
58. Sierra R, Munoz N, Pena AS. Antibodies to *Helicobacter pylori* and pepsinogen levels in children in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent*. 1992;1:449-54.
59. Sipponen P, Kekki M, Siurala M. Precancerous conditions. In: Filipe, M.I., Jass, J.R. eds. *Gastric Cancer. Current Problems in Tumour Pathology*. London: Churchill Livingstone; 1985. p. 152-171.



60. Tahara E. Molecular mechanisms of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;119:265-72.
61. Tahara E. Molecular mechanism of human stomach carcinogenesis implicated in *Helicobacter pylori* infection. *Exp Toxicol Pathol* 1998;50(4-6):375-8.
62. Takahashi Y, Shintaku K, Ishii Y, Asai S, Ishikawa K, Fujii M. Analysis of MYC and chromosome 8 copy number changes in gastrointestinal cancers by dual-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;107:61-4.
63. Takahashi Y, Nagata T, Sataoshi A, Shintaku K, Eguchi T, Ishii Y, Fujii M, Ishikawa K. Detection of aberrations of 17p and p53 gene in gastrointestinal cancers by dual (two-color) fluorescence in situ hybridization and genechip p53 assay. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;121: 38-43.
64. Takano Y, Kato Y, van Diest PJ, Masuda M, Mitomi HC, Okayasu I. Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases. *Am J Pathol* 2000;156:585-94.
65. Tarasova NI, Rulong S, Oskarsson M. Cellular localization of met and its ligand hepatocyte growth factor/ scatter factor in human stomach epithelium. *Gastroenterol* 1996;110:1125.
66. Tytgat G.N. *Helicobacter pylori* in man: problems to be solved. *Dig Dis* 1998;16(4):192-7.



67. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, Boer W, Quint W. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 1998;115:58-66.
68. Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000;35:111-5.
69. Yasui W, Oue N, Kuniyasu H, Ito R, Tahara E, Yokozaki H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer* 2001;4:113-21.
70. Ward MH, Sinha R, Heineman EF. Risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus with meat cooking method and doneness preference. *Int J Cancer* 1997;71:14-9.
71. Werner M, Becker KF, Keller GC, Hofler H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:207-16.



Objetivos

1. O objetivo principal deste trabalho é analisar o impacto da implementação do Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) na produtividade e na satisfação dos clientes de uma empresa de serviços de consultoria.

2. Os objetivos secundários são: identificar as barreiras à implementação do SGQ, avaliar a eficácia das ações corretivas adotadas e medir o retorno sobre o investimento (ROI) do sistema.

3. O trabalho também visa estabelecer uma base teórica para a pesquisa, revisando a literatura sobre SGQ e seus efeitos na performance organizacional.

4. Por fim, o estudo pretende contribuir para a melhoria contínua das práticas de gestão de qualidade em empresas de pequeno e médio porte.

5. A metodologia utilizada será a pesquisa de campo, com coleta de dados por meio de questionários e entrevistas com gestores e funcionários da empresa.

6. Os resultados serão apresentados em uma linguagem clara e objetiva, com ênfase nas conclusões e nas recomendações para a prática.

OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos:

1. Comparar os resultados dos diagnósticos histológico e molecular do *H. pylori*, em lesões gástricas benignas (gastrite crônica não-atrófica e atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal) e nos adenocarcinomas gástricos;
2. Investigar, pela técnica de FISH, a ocorrência de aneuploidias envolvendo os cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 e deleções no gene *TP53*, em lesões gástricas benignas e nos adenocarcinomas gástricos;
3. Investigar por técnica imunoistoquímica a expressão da proteína p53 nas mesmas amostras de lesões gástricas benignas e de adenocarcinomas gástricos;
4. Investigar a associação das alterações citogenéticas e imunoistoquímicas das diferentes lesões benignas e adenocarcinomas com a infecção pelo *H. pylori* e outros parâmetros, e
5. Comparar os resultados obtidos em lesões gástricas benignas com aqueles de adenocarcinomas gástricos, tendo como padrão a mucosa gástrica histologicamente normal, com o intuito de ressaltar alterações genéticas que possam estar relacionadas com a progressão das lesões gástricas benignas, e com maior risco de malignização e, dessa forma, podendo ser utilizadas no diagnóstico precoce.

Comparação dos diagnósticos histológico e molecular do *Helicobacter pylori* em lesões benignas e adenocarcinomas gástricos

Capítulo dois



Periódico: Arquivos de Gastroenterologia (*Archives of Gastroenterology*)

ISSN 0004-2803

Título: Comparação dos diagnósticos histológico e molecular do *Helicobacter pylori* em lesões benignas e adenocarcinomas gástricos

Título em inglês: Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in benign lesions and gastric adenocarcinoma

Autores: Ana Cristina Gobbo César*, Patrícia Maluf Cury**, Spencer Luiz Marques Payão***, Paula Rahal Liberatore****, Ana Elizabete Silva*****

* Mestre em Genética e Evolução - UFSCar. Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia, UNESP - São José do Rio Preto-SP

** Doutora em Patologia. Professora Assistente-Doutor de Patologia, FAMERP – São José do Rio Preto-SP

*** Doutor em Morfologia – UNIFESP. Professor Assistente-Doutor em Genética, FAMEMA – Marília-SP

**** Doutora em Ciências Biológicas. Professora Colaboradora, Departamento de Biologia, UNESP – São José do Rio Preto-SP

***** Doutora em Genética. Professora Assistente-Doutor, Departamento de Biologia, UNESP – São José do Rio Preto-SP

Endereço para correspondência: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva

Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Bairro Jardim Nazareth

15054-000 São José do Rio Preto-SP

Fone: (17) 221-2384, Fax: (17) 221-2390

e-mail: anabete@bio.ibilce.unesp.br

RESUMO – A colonização do *Helicobacter pylori* está associada com gastrite crônica, úlcera péptica, metaplasia intestinal, adenocarcinoma e linfoma gástrico. O objetivo desse estudo foi comparar os resultados do diagnóstico histológico (coloração com Giemsa) usado de rotina na detecção do *H. pylori* com o diagnóstico molecular, obtido pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizadas biópsias ou fragmentos cirúrgicos de amostras frescas ou parafinadas de lesões benignas de 80 pacientes com gastrite crônica, gastrite atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal e de adenocarcinoma gástrico de 18 pacientes. As biópsias foram avaliadas histologicamente (coloração com hematoxilina-eosina e Giemsa) e pela PCR com a amplificação dos genes antígeno espécie-específico (H3H4) e urease A (H5H6) do *H. pylori* e por um dos genes do citocromo P450 humano (CYP1A1), como controle da qualidade do DNA. A infecção foi detectada em 43% (42/98) e 71% (70/98) dos pacientes, respectivamente, para os diagnósticos histológico e molecular ($p=0,0000$). O teste de PCR detectou o *H. pylori* em 27,5% (22/80) das lesões gástricas benignas e em 50% (9/18) dos adenocarcinomas gástricos, com diagnóstico histológico negativo para essa bactéria. Cerca de 2,5% das amostras, exclusivamente de lesões benignas, com diagnóstico histológico positivo apresentaram resultado molecular negativo, para ambos os primers. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre os métodos histológico e molecular, em metaplasia intestinal ($p=0,0179$) e adenocarcinoma gástrico ($p=0,0026$), provavelmente, devido à subdetecção do *H. pylori* pelo método histológico, e a baixa densidade da bactéria conseqüente à atrofia severa da mucosa gástrica, nesses dois tipos de lesões. Nossos achados demonstram que o método de PCR é mais eficaz para diagnosticar a infecção por *H. pylori*, principalmente, em metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico.

DESCRITORES - *Helicobacter pylori*, gastrite, gastrite atrófica, úlcera gástrica, metaplasia, adenocarcinoma, PCR.

INTRODUÇÃO

O *Helicobacter pylori*, um bacilo espiralado Gram-negativo, adaptado ao ambiente da mucosa gástrica⁽³³⁾, é reconhecido como o agente desencadeante de diferentes distúrbios gástricos, como inflamação crônica assintomática, dispepsia, úlcera, adenocarcinomas e linfomas⁽²⁵⁾. Esta bactéria atua como o principal fator etiológico em mais de 95% das gastrites crônicas e 20% das úlceras gástricas, sendo responsável pelo aumento do risco de câncer gástrico em até nove vezes^(31,46). Apesar de cerca de 60-80% dos casos das neoplasias gástricas terem diagnóstico positivo para *H. pylori*⁽³¹⁾, a infecção não é o único fator desencadeante, pois o risco é de aproximadamente 1% a 2% entre os indivíduos infectados⁽⁴⁶⁾. Na África, por exemplo, a infecção por esse bacilo é observada em crianças de pouca idade, mas nesse país a incidência de câncer gástrico não é elevada⁽²⁸⁾. Assim, outros fatores devem ser considerados como, a idade de infecção, as características do hospedeiro e o genótipo da cepa.

Estudos epidemiológicos indicam que aproximadamente 50% da população mundial está infectada pelo *H. pylori*, variando de 40% a 50% nos países desenvolvidos e de 70% a 90% nos países em desenvolvimento⁽⁵⁵⁾. No Brasil, há uma variação regional com frequências de 59,5% no Rio de Janeiro-RJ⁽⁴⁷⁾ a 96% em São Luís-MA⁽⁷⁾.

A transmissão dessa bactéria geralmente ocorre pelo contato pessoa-pessoa, principalmente durante a infância⁽⁵¹⁾, é influenciada pelo nível sócio-econômico, densidade populacional, nível educacional, condições de higiene e predisposição genética^(5, 25).

Embora o *H. pylori* seja definido como um agente carcinogênico classe I⁽²⁹⁾, seu papel na tumorigênese gástrica ainda não foi completamente estabelecido. Sabe-se que esse bacilo secreta urease, enzima responsável pela hidrólise da uréia excretada pelo estômago, em amônia e bicarbonato, neutralizando, assim, o pH ácido e permitindo a sua passagem através da camada de muco e a colonização da superfície do epitélio gástrico⁽⁵⁰⁾. Também produz proteases e fosfolipases que degradam as glicoproteínas presentes na mucosa gástrica e danificam suas células e induz a produção contínua de óxido nítrico pelos macrófagos e neutrófilos infiltrados na mucosa, por meio do aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintetase⁽¹⁴⁾. A formação intracelular de intermediários de nitrogênio reativo contribui para o aumento de danos ao DNA e de apoptose nas células gástricas⁽³⁹⁾. O *H. pylori* também é responsável pela inativação do ácido ascórbico, antioxidante que converte o nitrito em óxido nitroso, assim, inibindo a formação de compostos N-nitrosos reativos e prevenindo o aparecimento do câncer gástrico⁽³⁰⁾.

Outros mecanismos como a produção de anticorpos antigástricos, que facilitaria o aparecimento de gastrite severa e atrofia⁽¹⁹⁾, e a infecção por cepas *H. pylori* *cagA*, *vacA* e *iceA* positivas, que

conferem maior virulência^(4,41), também têm sido associados com a carcinogênese gástrica.

Vários métodos invasivos e não-invasivos estão disponíveis para o diagnóstico do *H. pylori*. Os primeiros requerem o uso da endoscopia para a realização de biópsias e obtenção da mucosa gástrica, seguidas pelas técnicas de detecção da atividade da urease, histologia, molecular e cultura^(27, 56). Os métodos não-invasivos compreendem os testes respiratório e sorológico⁽⁵⁴⁾.

Conforme o método empregado, há o risco de subestimativa da infecção, principalmente em pacientes com câncer gástrico, cuja mucosa pode ser atrófica e estar associada a metaplasia intestinal, aumentando a chance de subdetecção ou perda espontânea da infecção^(3, 22).

Com o objetivo de verificar a eficácia da metodologia utilizada de rotina na detecção do *H. pylori*, os resultados da análise histológica foram comparados com o diagnóstico obtido por PCR em diferentes tipos de lesões gástricas benignas e em adenocarcinoma gástrico.



MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram estudadas 98 amostras (31 gastrites crônicas não-atróficas, 13 gastrites atróficas crônicas, 18 úlceras gástricas, 18 metaplasias intestinais e 18 adenocarcinomas gástricos), sendo 91 obtidas de tecido fresco e sete amostras emblocadas em parafina. As amostras foram provenientes de 54 homens e 44 mulheres com idades entre 2 a 94 anos ($\bar{x}$ = 55,8; s = 20,8 anos). A maioria deles (85,7%) era de origem caucasóide, e apenas 14,3% de origem negróide. Em 74,4% dos casos, as amostras foram exclusivamente coletadas da região do antro, enquanto as demais amostras foram provenientes do corpo e do fundo do estômago. Como controle foram analisadas 10 amostras de tecido fresco de biópsias da mucosa gástrica histologicamente normal e *H. pylori* negativa, coletadas do antro, de oito indivíduos do sexo feminino e dois do sexo masculino, com idades entre 19 e 75 anos ($\bar{x}$ = 36,3; s = 21,8 anos), sendo 80,0% deles caucasóides e 20% negróides. Todas as amostras foram coletadas no Serviço de Endoscopia ou no Centro de Cirurgia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP, Brasil. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina (FAMERP) de São José do Rio Preto e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos os pacientes ou de seus responsáveis legais.

Avaliação histológica

O diagnóstico histopatológico das lesões gástricas e adenocarcinomas foi estabelecido em teste cego, por dois patologistas do Serviço de Patologia do Hospital de Base, que observaram lâminas coradas por hematoxilina e eosina. A detecção da bactéria foi realizada usando lâminas coradas com Giemsa.

Avaliação molecular do *H. pylori*

A extração de DNA foi processada segundo a técnica fenol:clorofórmio de Sambrook *et al.*⁽⁴⁴⁾, em tecido fresco ou embocado em parafina das amostras de lesões gástricas benignas, adenocarcinomas e mucosa gástrica normal.

A presença dessa bactéria foi verificada por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O DNA de cada amostra foi amplificado separadamente para os genes *CYP1A1*, *H3H4* e *H5H6*. O gene constitutivo humano *CYP1A1* foi utilizado para verificar a integridade do DNA. Em todos os experimentos utilizou-se um volume final de 25µL, um controle negativo (sem DNA) para detecção de possível contaminação, e um controle positivo (DNA genômico *H. pylori* positivo).

O par de *primers* *CYP1A1-1* (5'-GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT-3') e *CYP1A1-2* (5'-CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC-3') amplificou um fragmento de 312pb e a reação de PCR foi desenvolvida como descrito por Abdel-Rahman *et al.*⁽¹⁾. Os *primers* *H3* (5'-TGG CGT

GTC TAT TGA CAG CGA GC-3') e *H4* (5'-CCT GCT GGG CAT ACT TCA CCA TG-3') produziram um fragmento de 296pb do gene responsável por uma proteína antigênica específica da superfície do *H. pylori*, e a reação foi processada segundo Hammar *et al.* ⁽²⁶⁾. O par de *primers* *H5* (5'-TGG CGT GTC TAT TGA CAG CGA GC-3') e *H6* (5'-CTC CTT AAT GTT TTT AC-3') amplificou um fragmento de 411pb do gene da urease A e, a PCR foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Clayton *et al.* ⁽¹²⁾.

Os produtos de reação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%, juntamente com um marcador de tamanho molecular de 100pb (Ladder Gibco DNA 100pb). Os fragmentos foram visualizados por coloração com nitrato de prata, de acordo com a técnica modificada por Ceron *et al.* ⁽¹⁰⁾.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando-se o teste de qui-quadrado (χ^2) de homogeneidade e o teste exato de Fisher, utilizando-se os programas *Statdisk V 8.1* ⁽⁵²⁾ e *Statistica* ⁽⁴²⁾, respectivamente. O nível de significância foi estabelecido para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na Tabela 1, encontram-se as frequências relativas e percentuais referentes aos resultados dos diagnósticos histológico e molecular do *H. pylori*, nas diferentes amostras.

Das 98 amostras avaliadas, 43% (42/98) e 72% (71/98) mostraram positividade para o *H. pylori*, respectivamente, pelo diagnóstico histológico e molecular.

Analizando-se separadamente as amostras de lesões gástricas benignas e adenocarcinomas gástricos, verificou-se que 27,5% (22/80) e 50,0% (9/18), respectivamente, das amostras com diagnóstico histológico negativo para *H. pylori* apresentaram resultado positivo no teste molecular, em pelo menos um dos pares de *primers* utilizados. O inverso também foi observado, ou seja, 2,5% (2/80) das amostras, exclusivamente de lesões benignas, com diagnóstico histológico positivo apresentaram resultado molecular negativo para ambos os *primers*.

Na maioria das amostras (80,6% - 79/98) houve uma concordância nos resultados do teste molecular para amplificação dos dois pares de *primers* H3H4 e H5H6, ou seja, ambos positivos ou negativos para a presença do *H. pylori*. Contudo, em 19,4% (19/98) dos casos observou-se amplificação para apenas uma seqüência. Nesses casos, considerou-se a amostra positiva para a infecção por *H. pylori*.

O teste χ^2 revelou diferenças estatisticamente significantes entre os resultados dos diagnósticos histológico e molecular, devido o número maior de amostras *H. pylori* positivas detectadas pela técnica molecular, tanto nos grupos de metaplasia intestinal ($p = 0,0179$), quanto nos de adenocarcinoma gástrico ($p = 0,0026$). Todavia, nas amostras de gastrites crônicas não-atróficas ($p = 0,0754$) e atróficas ($p = 0,6802$) e



úlcera gástrica ($p = 0,0543$), apesar do teste molecular ter detectado um número maior de amostras *H. pylori* positivo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. Considerando-se todas as amostras, independente do tipo de lesão, verificou-se que o teste molecular foi mais eficaz para o diagnóstico do *H. pylori* ($p = 0,0000$).

DISCUSSÃO

A infecção pelo *H. pylori* provoca alterações em muitos eventos relacionados com a patogênese do câncer gástrico, como a ocorrência de gastrite atrófica⁽¹³⁾, depleção da vitamina C do suco gástrico⁽⁶⁾, formação de radicais livres⁽¹⁶⁾ e a elevação da taxa de proliferação do epitélio⁽²³⁾. Contudo, os mecanismos patogênicos envolvidos na associação entre essa bactéria e a inflamação gástrica, ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se, porém, que as toxinas produzidas pela bactéria danificam a lâmina própria do epitélio de revestimento e glandular do estômago. Diante disso, a mucosa pode tentar regenerar-se, retornando assim ao estado normal ou desenvolver um processo reparador que leva ao aparecimento de metaplasia intestinal e atrofia glandular⁽²⁴⁾. Portanto, o *H. pylori* atua nas fases iniciais da carcinogênese gástrica, provocando o surgimento do processo inflamatório⁽⁵⁸⁾. Assim, a infecção por ele produzida precederia, até mesmo, mutações ou deleções em genes que participam do processo de

iniciação tumoral como *TP53*, *c-ERBB-2*, *CDH-1* (E-caderina) e *ciclina D1* (9, 15).

Apesar dos avanços metodológicos, ainda não há uma técnica infalível para o diagnóstico do *H. pylori* no estômago humano, tanto que são recomendados, no mínimo, dois métodos diferentes⁽⁴⁰⁾. Os métodos mais usados na prática clínica são o teste respiratório e o histológico, sendo a eficiência deste último muito questionada⁽³⁸⁾. A sensibilidade dos testes invasivos está relacionada diretamente com o número de biópsias coletadas.

O teste de urease é mais sensível do que o histológico, pois neste último, o transporte e o preparo inadequado da amostra, além da baixa quantidade de espécimens, podem contribuir para a subestimativa do diagnóstico⁽⁴⁸⁾. Deve-se considerar ainda, que outra fonte de erro no diagnóstico histológico é a presença de *H. pylori* atípicos, os quais apresentam mudanças morfológicas, ou seja, da forma bacilar para cocóide^(40, 48). Por outro lado, a presença de outros microorganismos com atividade urease, como *Proteus*, *Yersinia*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* ou de bactérias espirais como a *Campylobacter jejuni* podem fornecer um diagnóstico falso-positivo⁽³⁸⁾.

A metodologia por PCR, ainda não é largamente utilizada na prática clínica mundial, apesar de ser altamente específica e sensível na detecção de informações genéticas do *H. pylori* ^(20, 45). A presença de genes relacionados à virulência^(11, 57) ou mutações que conferem

resistência a antibióticos⁽⁸⁾ podem ser estudadas pela PCR, permitindo a indicação de terapêutica antimicrobiana específica.

Neste estudo, o método histológico detectou 43% das amostras *H. pylori* positivas, sendo que 31,6% (31/98) das amostras consideradas negativas pela coloração com Giemsa (falsos negativos) mostraram-se positivas pela PCR. Segundo Thoreson *et al.* ⁽⁴⁹⁾, este fato poderia ser explicado pela colonização irregular do *H. pylori* na mucosa gástrica ou pela contaminação das biópsias com DNA bacteriano, por meio do endoscópio. Esta última explicação é pouco provável, pois Paoluzi *et al.* ⁽⁴⁰⁾ não detectaram DNA do *H. pylori* na água usada na limpeza e desinfecção do equipamento de endoscopia, que rotineiramente é realizada com glutaraldeído 2%. No presente estudo, a rotina de desinfecção foi rigidamente empregada e as biópsias foram colhidas das regiões mais representativas de cada tipo de lesão estudado.

Em outros relatos, a técnica molecular de PCR mostrou-se como a mais eficiente para o diagnóstico preciso da infecção pelo *H. pylori*, por meio da amplificação do DNA bacteriano em biópsias⁽¹⁸⁾, como também em outros tipos de amostras como suco gástrico^(17, 36) e fezes⁽²⁾.

A prevalência de amostras *H. pylori* positivas detectadas por PCR (71,4%), no presente trabalho, encontra-se dentro da variação de 59,5% a 96,0%, observada em outros estudos em populações brasileiras, que utilizaram, concomitantemente, diversos métodos de diagnóstico, como teste de urease, cultura e coloração de Gram, hematoxilina-eosina



e/ou Giemsa. Essas investigações têm relatado diferenças na frequência da infecção pelo *H. pylori*, provavelmente relacionadas às técnicas empregadas, com porcentagens de 76,3% na cidade de São Paulo-SP⁽²¹⁾, 89,6% em Campinas-SP⁽³⁴⁾, 85,2% em Botucatu-SP⁽³²⁾, 61,7% em São José do Rio Preto-SP⁽³⁵⁾, 59,5% no Rio de Janeiro-RJ⁽⁴⁷⁾, 83% em Santa Maria-RS⁽³⁷⁾ e 96% em São Luís-MA⁽⁷⁾.

Também ficou evidente, no presente estudo, a maior eficácia do teste molecular em comparação com o diagnóstico histológico. Quando se considera separadamente cada um dos tipos de lesões, nas amostras de gastrite crônica (não-atrófica e atrófica) e úlcera gástrica, o método histológico teve resultados estatisticamente similares ao molecular, apesar de, nesse último grupo, o teste molecular ter detectado um número muito maior de casos *H. pylori* positivos.

A maior diferença observada entre os dois métodos foi encontrada nos grupos de metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico, podendo ser explicada pelas mudanças ocorridas na mucosa (como a diminuição da quantidade de muco), que resultam na migração do *H. pylori* para outras regiões do estômago ou até mesmo, a perda da infecção. Nas regiões metaplásicas, a presença escassa do *H. pylori* ocorre devido a sua menor afinidade pelo muco produzido pelas células caliciformes, que é constituído de mucopolissacarídeos ácidos, diferentemente das células mucíparas da mucosa gástrica que

apresentam um muco de composição neutra⁽⁴³⁾. Esses fatores podem contribuir para um resultado histológico falso-negativo.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou uma maior eficácia da técnica de PCR em comparação com o diagnóstico histológico, principalmente nas amostras de metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico, ressaltando a necessidade do uso de metodologias mais específicas e sensíveis na detecção do *H. pylori*, evitando a subestimativa da infecção.

César ACG, Cury PM, Payão SLM, Liberatore PR, Silva AE.

ABSTRACT - *Helicobacter pylori* colonization is associated with chronic gastritis, peptic ulcers, intestinal metaplasia, adenocarcinoma and lymphoma of the stomach. The objective of this study was to compare the results of histology (Giemsa stained) used as routine to detect *H. pylori* with molecular diagnosis, obtained by Polymerase Chain Reaction (PCR). Biopsies or surgery fragments of fresh or paraffin-embedded samples of benign lesions of 80 patients with chronic gastritis, atrophic gastritis, gastric ulcer, intestinal metaplasia as well as gastric adenocarcinoma of 18 patients were obtained. The samples were examined histologically (hematoxylin-eosin-stained and Giemsa-stained), and PCR amplifications of species-specific antigen gene (H3H4) and urease A gene segment (H5H6) of *H. pylori* were carried out, using the cytochrome P450 human gene (CYP1A1) as a DNA quality control. The infection was present in 43% (42/98) and 71% (70/98) of the patients, on the basis of histological and molecular diagnosis ($p=0.0000$), respectively. The PCR test detected *H. pylori* in 27.5% (22/80) of benign gastric lesions and 50% (9/18) of gastric adenocarcinoma, figures representing a negative histological diagnosis for this bacterium. About 2.5% of samples, exclusively benign lesions, with positive histology diagnose, reported negative molecular result to both primers. Statistically significant differences were found between histological and molecular methods in intestinal metaplasia ($p=0.0179$) and gastric adenocarcinoma ($p=0.0026$), probably due to lower

detection of *H. pylori* by the histological method, and the low density of bacteria because of severe atrophy in the gastric mucosa. Our findings suggest that the PCR method is more efficient to assess *H. pylori* infection principally in metaplasia and gastric adenocarcinoma.

HEADINGS - *Helicobacter pylori*, gastritis, atrophic gastritis, stomach ulcer, metaplasia, adenocarcinoma, PCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for genetic polymorphism of the GSTM and GSTT1 genes in human. *Cancer Letters* 1996;104:229-33.
2. Argyros FC, Ghosh M, Huang L, Masubuchi N, Cave DR, Grubel P. Evaluation of a PCR primer based on the isocitrate dehydrogenase gene for detection of *Helicobacter pylori* in feces. *J Clin Microbiol* 2000;38:3755-8.
3. Asaka M, Kimura T, Kudo M, Terada H, Mitani S, Miyazaki T, Miki K, Graham DY. Relationship of *Helicobacter pylori* to pepsinogen in an asymptomatic Japanese population. *Gastroenterol* 1992;102:760-6.
4. Ashour AAR, Collares GB, Mendes EN, Gusmão VR, Queiroz DMM, Magalhães PP, Carvalho AST, Oliveira CA, Nogueira AMMF, Rocha GA, Rocha AMC. *IceA* Genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from brazilian children and adults. *J Clin Microbiol* 2001;39:1746-50.
5. Baker KH, Hegarty JP. Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water is associated with clinical infection. *Scand J Infect Dis* 2001;33:744-6.
6. Banerjee S, Hawksby C, Miller S, Dahill S, Beattie AD, Maccoll KE. Effect of *Helicobacter pylori* and its eradication on gastric juice ascorbic acid. *Gut* 1994;35:317-22.
7. Bezerra JM, Vale AV, Lobato Filho JC, Martins SF, Albarelli AL, Freire SJA, Oliveira GE, Longo JC. Infecção gástrica por *Helicobacter pylori* em



pacientes sintomáticos da ilha de São Luís, MA: correlação endoscópica, anatomopatológica e microbiológica. Rev Soc Bras Med Trop 1996;29:245-50.

8. Bjorkholm B, Befrits R, Jaup B, Engstrand L. Rapid PCR detection of *Helicobacter pylori*-associated virulence and resistance genes directly from gastric biopsy material. J Clin Microbiol 1998;36:3689-90.

9. Blok P, Craanen ME, Offerhaus GJA. Molecular alterations in early gastric carcinomas: no apparent correlation with *H. pylori* status. Am J Pathol 1999;111:241-7.

10. Ceron RC, Santos JR, Bicudo HEMC. The use of gelatin to dry cellphane wound slab gels in an embroidering hoop. Rev Brasil Genet 1992;15(1):201-3.

11. Chisholm SA, Teare EL, Patel B, Owen RJ. Determination of *Helicobacter pylori* vacA allelic types by single-step multiplex PCR. Lett Appl Microbiol 2002;35:42-6.

12. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30:192-200.

13. Correa, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process – first American Cancer Society Award lecture on cancer epidemiology and prevention. Cancer Res 1992;52:6735-40.

14. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Pathologic Basis of Disease. 6 ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999.



15. Craanen ME, Blok P, Dekker W, Offerhaus GJA, Tytgat GNJ. Chronology of p53 protein accumulation in gastric carcinogenesis. Gut 1995;36:848-52.
16. Davies GR, Banatvala N, Collins CE, Sheaff MT, Abdi Y, Clements L, Rampton DS. Relationship between infective load of *Helicobacter pylori* and reactive oxygen metabolite production in antral mucosa. Scand J Gastroenterol 1994;29:419-24.
17. Dominguez-Bello MG, Cienfuentes C, Romero R, Garcia P, Gomez I, Mago V, Reyes N, Gueneau DE, Novoa P. PCR detection of *Helicobacter pylori* in string-absorbed gastric juice. FEMS Microbiol Letters 2001;198:15-6.
18. Fabre R, Sobhani I, Laurent-Puig P, Hedef N, Yazigi N, Visuzaine C, Rodde I, Potet F, Mignon M, Etienne JP. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. Gut 1994;35:905-8.
19. Faller G, Steininger H, Kränzlein J, Maul H, Kerkau T, Hensen J, Hahn EG, Kirechner T. Antigastric autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection, implications of histological and clinical parameters of gastritis. Gut 1997;41:619-23.
20. Fernando N, Holton J, Vaira D, Desilva M, Fernando D. Prevalence of *Helicobacter pylori* in Sri Lanka as determined by PCR. J Clin Microbiol 2002;40:2675-6.

21. Ferrari Jr AP, Geocze S, Trabulsi LR. *Campylobacter pylori* in dyspeptic patients. Rev Hosp S Paulo – Esc Paul Med 1989;1:65-8.
22. Fukuda H, Saito D, Hayashi S, Hisai H, Ono H, Yoshida S, Oguro Y, Noda T, Sato T, Katoh M, Terada M, Sugimura T. *Helicobacter pylori* infection, serum pepsinogen level and gastric cancer: a case-control study in Japan. Jpn J Cancer Res 1995;86:64-71.
23. Gao H, Wang JY, Shen XZ, Liu JJ. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial cell proliferation. World J Gastroenterol 2000;6:442-4.
24. Genta, RM. *Helicobacter pylori*, inflammation, mucosal damage, and apoptosis: pathogenesis and definition of gastric atrophy. Gastroenterol 1997;113:S51-5.
25. Go MF. Natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2002;16:3-15.
26. Hammar M, Tysabewicz T, Wadstrom T, O'Toole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;38:54-8.
27. Ho GY, Windsor HM. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Polymerase Chain Reaction tests. Gastroenterol Clin North Am 2000;29(4):903-15.
28. Holcombe C. *Helicobacter pylori*: the African enigma. Gut 1992;33:429-31.



29. International Agency for Research on Cancer, Schistossomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC, Lyon, 1994.
30. Kuipers EJ, Appelmelk BJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis. Biomedicine & Pharmacotherapy 1997;51:150-5.
31. Kuipers EJ. Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther 1999;13:3-11.
32. Ladeira MSP. Estudos, pelo Ensaio Cometa, dos danos no DNA de células da mucosa gástrica de portadores de gastrite crônica, infectados ou não pelo *Helicobacter pylori*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 179p, 1997.
33. Lee A, Hazell SL. *Campylobacter pylori* in health and disease: an ecological perspective. Microb Ecol Health Dis 1988;1:1-6.
34. Magalhães AFN, Almeida JRS, Guerrazzi F, Yamanaka A, Mesquita MA, Trevisan MAS, Ulson CM. Gastrite crônica associada ao *Helicobacter pylori* em pacientes com dispepsia não ulcerosa e com úlcera duodenal. Rev Paul Med 1991;109:197-203.
35. Mattos LC. Correlações dos fenótipos ABO, Lewis, secretor e polimorfismo molecular do locus ABO em pacientes infectados e não infectados pelo *Helicobacter pylori*. Tese de doutorado, Universidade Paulista, São José do Rio Preto-SP, 146p., 2000.
36. Matsukura N, Onda M, Tokunaga A, Kato S, Yamashita K, Ohbayashi M. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric juice by the polymerase chain reaction: comparison with findings in bacterial culture and the



detection of tissue IgA and serum IgG antibodies against *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol 1995;30:689-95.

37. Mello ES, Melo CR. Prevalência dos diferentes tipos de gastrites em pacientes com queixas digestivas altas. Arq Gastroenterol 1991;29:43-50.

38. Metz DC, Furth EE, Faigel DO, Kroser JA, Alavil A, Barrett DM, Montone K. Realities of diagnosing *Helicobacter pylori* infection in clinical practice: a case for non-invasive indirect methodologies. Yale J Biol Med 1998;71:81-90.

39. Pakodi F, Abdel-Salam OME, Debreceni A, Mózsik G. *Helicobacter pylori*. One bacterium and a broad spectrum of human disease: an overview. J Physiol 2000;94:139-58.

40. Paoluzi OA, Rossi P, Bernardi S, Marchione OP, Carnieri E, Luzzi I, Nardi F, Iacopini F, Paoluzzi P. Polymerase Chain Reaction assay is more accurate than rapid urease test, histology and culture in the invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol Intern 1999;12:5-10.

41. Peek RM, van Doorn LJ, Donahue JP, Tham KT, Figueiredo C, Blaser MJ, Miller G. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* gene expression in vivo and relationship to gastric pathology. Infect Immun 2000;68:5488-95.

42. Petrere Jr, M. Statística. Stat Soft Inc.; 1993.

43. Queiroz DMM, Mendes ENH. *Helicobacter pylori* e outros microorganismos espiralados gástricos: aspectos microbiológicos. In:

Castro LP, Rocha PRS, Coelho LGV. Tópicos em Gastroenterologia 4. São Paulo: MEDSI, 1993. p.235-48.

44. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1989.

45. Saruc M, Demir MA, Kucukmetin N, Kandiloglu AR, Akarca US, Yuceyar H. Histological and clinical predictive value of determination of tissue CagA status by PCR in *Helicobacter pylori* infected patients; results of the large population based study in western Turkey. Hepatogastroenterol 2002;49:878-81.

46. Scholte GHA, Van Door LJ, Cats A, Bloemena E, Lindeman J, Quint WGV, Meuwissen SGM, Kuipers EJ. Genotyping of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded gastric biopsy specimens: relation to histological parameters and effects on therapy. Am J Gastroenterol 2002;97:1687-95.

47. Solari CA, Araruna RPN, Eliane RMF, Hofer E, Dias G, Moraes G, Basilio CA, Rodriguez CMS, Luna LL. *Helicobacter pylori* in dyspeptic children and adults: endoscopic, bacteriologic and histologic correlations. Mem Inst. Oswaldo Cruz 1994;89:581-6.

48. Sütő G, Vincze A, Pakodi F, Hunyady B, Karadi O, Gramszegi M, Laszlo T, Mozsik G. ¹³C – Urea breath test is superior in sensitivity to detect *Helicobacter pylori* infection than either antral histology or rapid urease test. J Physiol 2000;94:153-6.

49. Thoreson ACE, Borre M, Andersen LP, Jorgensen F, Kilerrich S, Scheibel J, Rath J, Krogfelt KA. *Helicobacter pylori* detection in human



biopsies: a competitive PCR assay with internal control reveals false results. FEMS Immun Med Microbiol 1999;24:201-8.

50. Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E. *Helicobacter pylori* toxin is a urea permease that promote urea diffusion across epithelia. J Clin Invest 2001;108:929-37.

51. Torres J, Perez-Perez G, Goodman KJ. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. Arch Med Res 2000;31:431-62.

52. Triola, MF. Statdisk V 8.1. 8th ed., Addison Wesley Longman, Inc.; 2001.

53. Tytgat G.N. *Helicobacter pylori* in man: problems to be solved. Dig Dis 1998;16(4):192-7.

54. Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, Axon AT, Deltenre M, Hirschl AM, Gasbarrini G, O'Morain C, Garcia JM, Quina M, Tytgat GN. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new noninvasive antigen-based assay group. Lancet 1999;354:330-3.

55. Varanasi, R.V.; Fantry, G.T.; Wilson, K.T. *Helicobacter* 1998;3:188-94.

56. Weijnen CF, Hendriks HA, Hoes AW, Verweij WM, Verheij TJM, Wit NJ. New immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* infection compared with urease test, ¹³C breath test and histology: validation in the primary care setting. J Microbiol Meth 2001;46:235-40.

57. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA* e *vacA* status and



clinical outcome: studies in four different countries. J Clin Microbiol 1999;37:2274-9.

58. Yasui W, Oue N, Kuniyasu H, Ito R, Tahara E, Yokozaki H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. Gastric Cancer 2001;4:113-21.

Amostra	HISTOLÓGICA		MOLECULAR				χ^2	p	
	n	(%)		HspA		HspB			
		Pos	Neg	Pos	Neg	Pos			Neg
Quadrante superior positivo	38	18 (47.4%)	20 (52.6%)	12 (31.6%)	26 (68.4%)	12 (31.6%)	26 (68.4%)	0.18	0.6734
Quadrante inferior positivo	38	18 (47.4%)	20 (52.6%)	12 (31.6%)	26 (68.4%)	12 (31.6%)	26 (68.4%)	0.17	0.6802
Área pré-pilórica positivo	38	18 (47.4%)	20 (52.6%)	12 (31.6%)	26 (68.4%)	12 (31.6%)	26 (68.4%)	0.09	0.7553
Área pós-pilórica positivo	38	18 (47.4%)	20 (52.6%)	12 (31.6%)	26 (68.4%)	12 (31.6%)	26 (68.4%)	0.09	0.7579
Tudo o organismo positivo	38	18 (47.4%)	20 (52.6%)	12 (31.6%)	26 (68.4%)	12 (31.6%)	26 (68.4%)	0.00	0.9936
Total positivo	38	18 (47.4%)	20 (52.6%)	12 (31.6%)	26 (68.4%)	12 (31.6%)	26 (68.4%)	0.37	0.8000

HspA = *Helicobacter pylori* antigênio A; HspB = *Helicobacter pylori* antigênio B.

Tabela 1 – Frequências relativas e percentuais e os valores do teste de χ^2 das amostras de lesões benignas e de adenocarcinoma gástrico, para comparação dos resultados dos diagnósticos histológico e molecular da infecção pelo *H. pylori*.

Amostra	HISTOLOGIA				MOLECULAR				χ^2	p
	N	HISTOLOGIA (%)		MOLECULAR (%)						
		Hp-	Hp+	H3H4		H5H6				
				Hp-	Hp+	Hp-	Hp+			
Gastrite não-atr6fica	31	19/31 (61,2%)	12/31 (38,7%)	13/31 (41,9%)	18/31 (58,0%)	15/31 (48,3%)	16/31 (51,6%)	3,16	0,0754	
Gastrite atr6fica	13	5/13 (38,5%)	8/13 (61,5%)	4/13 (30,7%)	9/13 (69,2%)	6/13 (46,1%)	7/13 (53,8%)	0,17	0,6802	
Úlcera gástrica	18	7/18 (38,9%)	11/18 (61,1%)	3/18 (16,6%)	15/18 (83,3%)	3/18 (16,7%)	15/18 (83,3%)	3,70	0,0543	
Metaplasia	18	11/18 (61,1%)	7/18 (38,9%)	6/18 (33,3%)	12/18 (66,7%)	5/18 (27,7%)	13/18 (72,2%)	5,60	0,0179	
Adenocarcinoma	18	14/18 (77,8%)	4/18 (22,2%)	9/18 (50,0%)	9/18 (50,0%)	9/18 (50,0%)	9/18 (50,0%)	9,02	0,0026	
Total	98	56/98 (57,1%)	42/98 (42,8%)	35/98 (35,7%)	63/98 (64,3%)	38/98 (38,7%)	60/98 (61,2%)	17,57	0,0000	

Hp- = *H. pylori* negativo; Hp+ = *H. pylori* positivo; N = número de amostras



Aneuploidias detectadas pela técnica de FISH em lesões benignas e adenocarcinomas gástricos e associação com *Helicobacter pylori*

Capítulo três



Periódico: *Cancer Genetics and Cytogenetics*

ISSN 0165-4608

Título: Aneuploidias detectadas pela técnica de FISH em lesões benignas e adenocarcinomas gástricos e associação com *Helicobacter pylori*.

Título em inglês: Aneuploidies detected by FISH technique in benign lesions and gastric adenocarcinoma and association with *Helicobacter pylori*.

Ana Cristina Gobbo César¹, Aldenis Albanese Borim², Alaor Caetano³,
Patrícia Maluf Cury⁴, Ana Elizabete Silva¹.

1Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, IBILCE - UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil

2 Serviço de Cirurgia, Hospital de Base, São José do Rio Preto, SP, Brazil

3 Serviço de Endoscopia, Hospital de Base, São José do Rio Preto, SP, Brazil

4 Departamento de Patologia e Medicina Legal, FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Endereço para correspondência: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva

Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Bairro Jardim Nazareth

15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

Fone: (055) 17 221-2384, Fax: (055) 17 221-2390

e-mail: anabete@bio.ibilce.unesp.br



Resumo – A tumorigênese do câncer gástrico é atribuída a interação de fatores ambientais e genéticos, podendo manifestar-se numa sucessão de eventos que incluem gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal e displasia. A carcinogênese gástrica é fortemente associada com a infecção pelo *Helicobacter pylori*, contudo, os mecanismos genéticos subjacentes são ainda desconhecidos. No presente estudo, pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) investigou-se a ocorrência de aneuploidias, com a utilização de sondas centroméricas, dos cromossomos 3, 7, 8, 9, e 17 em núcleos interfásicos de lesões gástricas benignas (gastrite crônica, gastrite atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal) e de adenocarcinoma gástrico, e uma possível associação com a infecção pelo *H. pylori*. As aneuploidias mais freqüentemente encontradas foram monossomia e trissomia 7 em gastrite crônica; trissomias 7 e 8 em gastrite atrófica; trissomias 7 e 17 em úlcera gástrica; trissomias 7, 8, 9 e 17 em metaplasia intestinal e trissomias/tetrassomias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 em adenocarcinoma gástrico. Foi encontrada associação entre a infecção pelo *H. pylori* e aneuploidias desses cromossomos em gastrite atrófica ($p=0,0143$), úlcera gástrica ($p=0,0498$) e metaplasia intestinal ($p=0,0105$). No entanto, tal associação não foi observada entre as aneuploidias e o tipo histológico ou estadiamento dos adenocarcinomas gástricos, nem entre outros parâmetros como, sexo, idade, tabagismo e etilismo, que também foram investigados nos grupos de lesões gástricas benignas.

Portanto, a ocorrência de aneuploidias nos cromossomos 3, 7, 8, 9, e 17 indica uma instabilidade cromossômica crescente a partir de gastrite crônica que deve atuar nas etapas iniciais da tumorigênese gástrica.

Abstract - Tumorigenesis of gastric cancer is attributable to interacting environmental and genetic factors, through a sequence of events including chronic gastritis, atrophic gastritis, intestinal metaplasia and dysplasia. Gastric carcinogenesis is strongly associated with *Helicobacter pylori* infection, but the underlying genetic mechanisms are largely unknown. In the present study, the fluorescence in situ hybridization technique (FISH) was applied to investigate the occurrence of 3, 7, 8, 9, and 17 aneuploidies, using centromeric probes, in interphase nuclei of benign gastric lesions (chronic gastritis, atrophic gastritis, gastric ulcer, and intestinal metaplasia) and gastric adenocarcinoma, and possible associating with *H. pylori* infection. The aneuploidies most frequently found were monosomy and trisomy 7 in chronic gastritis; trisomies 7 and 8 in atrophic gastritis; trisomies 7 and 17 in gastric ulcers; trisomies 7, 8, 9 and 17 in intestinal metaplasia and trisomies/tetrasomies of chromosomes 3, 7, 8, 9 and 17 in gastric adenocarcinoma. Association was found between *H. pylori* infection and aneuploidies in atrophic gastritis ($p=0.0143$), gastric ulcer ($p=0.0498$) and intestinal metaplasia ($p=0.0105$). No association was observed between the aneuploidies and histological type or differentiation grade of gastric adenocarcinoma or benign gastric lesion with any other parameters tested, such as sex, age, tobacco and alcohol consumption. In conclusion, the occurrence of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17 aneuploidies indicates a growing chromosomal instability, from chronic gastritis, that may be present in the initial steps of gastric tumorigenesis.

Introdução

O câncer gástrico, mundialmente, atinge taxas elevadas de incidência e mortalidade, principalmente no Japão, Chile, China, Portugal, Costa Rica, Colômbia e Rússia, em que sua etiologia está estreitamente associada com a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* [1]. No Brasil, ele ocupa o quinto lugar em incidência (20.420 casos novos) e o segundo em número de óbitos, com estimativa de 11.000 óbitos [2]. A incidência de adenocarcinoma gástrico está diminuindo em países desenvolvidos, como resultado da queda no número de casos de infecção pelo *H. pylori* e melhoria dos padrões sócio-econômicos. Todavia, em países em desenvolvimento, esse tipo de tumor permanece como um sério problema de saúde [3].

O adenocarcinoma do tipo intestinal desenvolve-se por meio de uma seqüência de eventos como gastrite crônica, atrofia, metaplasia intestinal e displasia, somadas à presença do *H. pylori* e à dieta, que atuam como os principais fatores etiológicos desse tipo de neoplasia [1, 4]. O tipo difuso desenvolve-se originalmente, sem evolução a partir da displasia. Ainda não está esclarecido o mecanismo de ação do *H. pylori* na carcinogênese gástrica, mas sabe-se que essa bactéria é responsável pela formação intracelular de intermediários de nitrogênio reativo, contribuindo para o aumento de danos ao DNA, de apoptose e da proliferação celular [5].

Estudos citogenéticos clássicos e moleculares têm definido várias alterações numéricas envolvidas na carcinogênese gástrica, principalmente, os cromossomos 3, 6-8, 10-12 e 15-17 [6, 7, 8, 9, 10] e rearranjos estruturais como i(8q), i(9q), 9p+, 3p-, del(3q), i(5p) e 7q- [6]. No modelo proposto por Yasui *et al.* [11], a carcinogênese multipasso do estômago é considerada o resultado de várias alterações genéticas e epigenéticas, envolvendo oncogenes, genes supressores de tumor, genes de reparo de DNA, reguladores do ciclo celular e moléculas de adesão celular. Entre essas alterações destacam-se mutações no *K-RAS*, inativações do *APC*, *TP53*, *p16*, *MGMT* e *MLH1*, ampliações em *K-SAM*, *c-ERBB2*, *c-MET* e *CCNE1* (ciclina E), perda de heterozigosidade do *TP73* e redução ou perda na expressão das proteínas p27, nm23 e caderinas. Tais alterações diferem dependendo do tipo histológico, se intestinal (bem diferenciado) ou difuso (pouco diferenciado), sugerindo a presença de duas vias genéticas distintas [11, 12]. Todavia, poucos estudos genéticos abrangendo lesões gástricas benignas têm sido realizados [13, 14, 15].

Considerando-se a participação das lesões gástricas no desenvolvimento do câncer gástrico, avaliou-se nesses tipos de lesões a ocorrência de aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 em núcleos interfásicos, com a utilização da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), para comparar com a de adenocarcinoma e, investigar uma possível associação com a infecção pelo *H. pylori*.

Material e Métodos

Material

Foram analisadas 93 amostras de lesões benignas (38 gastrites crônicas, 13 gastrites atróficas, 21 úlceras gástricas e 21 metaplasias intestinais) provenientes de indivíduos sem história de câncer gástrico, e 20 adenocarcinomas gástricos obtidos a partir de biópsias ou fragmentos cirúrgicos frescos, coletados no Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP, Brasil, de pacientes não submetidos à tratamento quimio e radioterápico. A idade média e desvio-padrão dos pacientes foi $55,7 \pm 20,7$ anos (variação: 02 a 94 anos), sendo 62 do sexo masculino e 31 do feminino. Dez amostras de mucosa gástrica histologicamente normal de indivíduos sem história de câncer (dois homens e oito mulheres) foram usadas como controle. A idade média e desvio-padrão foi $36,3 \pm 21,8$ anos (variação: 19 a 75 anos). As amostras foram provenientes de indivíduos caucasóides (80%) ou negróides (20%). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina (FAMERP) de São José do Rio Preto e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos os pacientes ou de seus responsáveis legais.

Estudo histológico

A partir de cortes histológicos de cerca de $5\mu\text{m}$ e coloração com hematoxilina-eosina procedeu-se a análise microscópica, por dois



patologistas em teste-cego. Os tumores foram classificados em intestinal e difuso segundo Lauren [16] e também de acordo com o proposto pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) denominada classificação TNM, sendo as letras T, N e M referentes à extensão clínica do tumor primário, o envolvimento de linfonodos e a presença de metástases distantes. A classificação das gastrites e metaplasias foi realizada de acordo com o Sistema de Sydney [17]. As amostras foram cuidadosamente avaliadas quanto à presença de atrofia e metaplasia intestinal. O material também foi corado com Giemsa, para permitir a detecção da bactéria espiralada *H. pylori*.

Hibridização *in situ* fluorescente - FISH

A suspensão nuclear de cada amostra foi obtida por desagregação mecânica, como descrito por Kuo *et al.* [18].

Foram utilizadas as sondas centroméricas (Vysis Inc.) dos cromossomos 3, 7, 8 e 17 marcadas com digoxigenina (*Spectrum Green*) e do cromossomo 9 marcada com rodamina (*Spectrum Red*). As lâminas foram desidratadas e banhadas em ácido acético 70% e 1XPBS. Posteriormente, foram tratadas com pepsina 0,008% e fixadas em formaldeído 4%. Foram novamente lavadas em 1XPBS, desidratadas e secas.

As lâminas com a solução de sonda diluída foram co-denaturadas em estufa a 80°C por 8 minutos e depois incubadas em

câmara umedecida a 37°C, por um período que variou entre 16 a 48 horas (em média 20 horas). Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas para remoção do excesso de sonda, em uma solução 0,1% NP40/2XSSC, desidratadas e secas. As lâminas hibridizadas com as sondas marcadas com digoxigenina e rodamina receberam 10µL do contra-corante iodeto de propídeo e DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), respectivamente.

A análise citogenética foi realizada em microscópio Olympus BMAX60, por dois pesquisadores que contaram cerca de 150 núcleos em áreas diferentes da lâmina para cada sonda, totalizando 300 núcleos. A concordância entre os dois observadores foi de 95%. Para a documentação dos resultados foi utilizado o filme Elitechrome ASA 400 (Kodak).

Os critérios de análise foram seguidos de acordo com Eastmond *et al.* [19]. Para a análise citogenética foram consideradas somente lâminas que demonstravam pelo menos 90% de eficiência de hibridização. As aneuploidias foram consideradas significantes quando o valor observado era superior à média acrescida de quatro desvios padrões, calculado para cada sonda centromérica a partir da amostra controle de mucosa gástrica normal. Foram consideradas como monossomias para os cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17, respectivamente, as frequências acima de 10,0%, 11,0%, 11,0%, 8,5% e 7,5%, como trissomias, aquelas superiores a 10,0%, 9,0%, 8,0%, 8,5% e 7,0% e,

como tetrassomia, independente do cromossomo, aqueles casos com mais de 2,0% dos núcleos com quatro sinais.

Avaliação molecular do *H. pylori*

A extração de DNA foi processada segundo a técnica fenol:clorofórmio de Sambrook *et al.* [20], em biópsias ou fragmentos cirúrgicos das amostras de lesões gástricas benignas, adenocarcinomas e mucosa gástrica normal.

A presença dessa bactéria foi verificada por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O DNA de cada amostra foi amplificado separadamente para os genes *CYP1A1*, *H3H4* e *H5H6*. O gene constitutivo humano *CYP1A1* foi utilizado para verificar a integridade do DNA. Em todos os experimentos utilizou-se um volume final de 25µL, um controle negativo (sem DNA) para detecção de possível contaminação, e um controle positivo (DNA genômico *H. pylori* positivo).

O par de *primers* *CYP1A1-1* (5'-GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT-3') e *CYP1A1-2* (5'-CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC-3') amplificou um fragmento de 312pb e a reação de PCR foi desenvolvida como descrito por Abdel-Rahman *et al.* [21]. Os *primers* *H3* (5'-TGG CGT GTC TAT TGA CAG CGA GC-3') e *H4* (5'-CCT GCT GGG CAT ACT TCA CCA TG-3') produziram um fragmento de 296pb do gene responsável por uma proteína antigênica específica da superfície do *H. pylori*, e a reação foi processada segundo Hammar *et al.* [22]. O par de *primers* *H5* (5'-TGG



CGT GTC TAT TGA CAG CGA GC-3') e H6 (5'-CTC CTT AAT GTT TTT AC-3') amplificou um fragmento de 411pb do gene da urease A e, a PCR foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Clayton *et al* [23].

Os produtos de reação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%, juntamente com um marcador de tamanho molecular de 100pb (Ladder Gibco DNA 100pb). Os fragmentos foram visualizados por coloração com nitrato de prata [24].

Análise estatística

Para comparação das distribuições das porcentagens de núcleos com diferentes números de sinais dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 foi aplicado o teste de qui-quadrado (χ^2) de homogeneidade, usando o programa *Statdisk V.8* [25] e o teste exato de Fisher, aplicando o programa *Statistica* [26], calculado a partir dos totais de núcleos com um, dois, três ou quatro sinais, com o nível crítico de rejeição fixado em 5%. Esses testes também foram aplicados para comparar as amostras entre si e associá-las com parâmetros como idade, sexo, consumo de tabaco e álcool, localização, histologia e a presença do *H. pylori*. Calculou-se também o *odds ratio* (http://www.watson.hgen.pitt.edu/~dweeks/odds_ratio.html) com intervalo de confiança de 95%, para o caso em que o teste de χ^2 apresentou resultado significativo.



Resultados

Na Tabela 1 estão resumidos os dados da análise de FISH dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 nas amostras de mucosa gástrica normal (controle), lesões benignas e adenocarcinoma. Na mucosa normal, a maioria dos núcleos (~97,8%) apresentou dissomia para os cromossomos avaliados. Nas lesões benignas foram observadas freqüências crescentes de núcleos com um e/ou três sinais de alguns desses cromossomos, enquanto nos adenocarcinomas, as freqüências de núcleos com três e quatro sinais dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 foram significativamente mais elevadas quando comparadas com a mucosa normal e lesões benignas ($p=0,0000$).

Apenas os casos de lesões benignas e adenocarcinoma gástrico que apresentaram aneuploidias estão descritos, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3.

As lesões gástricas benignas estavam localizadas na maioria dos casos na região do antro, enquanto os adenocarcinomas tanto no antro como antro-corpo, sendo a maioria deles em estágio avançado (estádios III e IV). Observou-se um aumento progressivo na freqüência de casos com aneuploidias, ou seja, 21% (8/38) dos casos de gastrite crônica não-atrófica; 31% (4/13) das gastrites atróficas; 62% (13/21) das úlceras gástricas; 71% (15/21) das metaplasias intestinais e 100% dos adenocarcinomas gástricos (20 casos).



A aneuploidia mais freqüente nas lesões benignas foi a trissomia 7, presente em 10,5% das gastrites crônicas não-atróficas, 15% das gastrites atróficas, 31% das úlceras gástricas e 67% das metaplasias intestinais (Figura 1). Nas gastrites crônicas não-atróficas também foi detectada a monossomia 7 (7,9% dos casos), enquanto no grupo de gastrite atrófica crônica a trissomia 8, e no grupo de úlcera gástrica a trissomia 17 e, ainda em 14% dos casos, as monossomias 7 e 9. Nas metaplasias intestinais, as amostras do tipo completo apresentaram também trissomia 9 e as do tipo incompleto, as trissomias dos cromossomos 8 e 17 (Tabela 2). Em dez amostras de lesões benignas e em três de adenocarcinoma gástrico, não foi analisado o cromossomo 17.

Todos os 20 casos de adenocarcinomas gástricos analisados (Tabela 3), manifestaram aneuploidias múltiplas envolvendo os cinco cromossomos. A realização de hibridização simultânea (FISH *dual color*) com as sondas dos cromossomos 7 e 9, e 8 e 9, marcadas com fluorocromos diferentes, não evidenciou a ocorrência de poliploidização (dados não apresentados).

A perda cromossômica foi um evento raro nos adenocarcinomas, observando-se apenas monossomias 8 e 17 em um caso. Nos demais casos foi característico o ganho dos vários cromossomos, com 25% (5/20) deles apresentando trissomias/tetrassomias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17. Em ordem



decrecente (Figura 1), as aneuploidias mais freqüentes foram trissomias/tetrassomias 7 (95%), 17 (94%), 9 (85%), 8 (75%) e 3 (60%).

A comparação entre os adenocarcinomas do tipo intestinal e difuso em estadio inicial (I e II) e avançado (III e IV) em relação a freqüência de aneuploidias para cada um dos cromossomos avaliados, não evidenciou diferenças significantes da mesma forma, em metaplasia do tipo completa e incompleta.

A investigação de associação entre a ocorrência de aneuploidias e a infecção pelo *H. pylori* (Tabela 4) mostrou diferenças estatisticamente significantes para os grupos de gastrite atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal, evidenciando que as aneuploidias foram mais freqüentes nos casos *H. pylori* positivos. No entanto, a comparação entre os demais parâmetros como idade, sexo, tabagismo, etilismo, localização, histologia e grau de diferenciação, com a ocorrência de aneuploidias nos grupos de lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico, não evidenciou resultados significantes, com exceção da associação observada no grupo de gastrite crônica não-atrófica *H. pylori* positivo e o tabaco. Nesse caso, calculou-se também o *odds ratio* com intervalo de confiança de 95%, e obteve-se que a chance de fumantes apresentarem gastrite crônica não-atrófica associada ao *H. pylori* é 9,14 vezes maior do que para os não-fumantes.

A técnica de FISH possibilitou caracterizar algumas aneuploidias nos diferentes tipos de lesões gástricas (Figura 2): gastrite

crônica (-7, +7), gastrite atrófica (+7, +8), úlcera gástrica (+7, +17), metaplasia intestinal (+7, +8, +9, +17) e adenocarcinoma gástrico (+3, +7, +8, +9, +17). Algumas dessas aneuploidias estão ilustradas na Figura 3.

Discussão

Quando consideramos como referência o diagnóstico molecular para infecção pelo *H. pylori* constatamos uma frequência maior de aneuploidias nas amostras *H. pylori* positivas de gastrite atrófica crônica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal. Nos grupos de gastrite crônica não-atrófica e adenocarcinoma gástrico não foi observada tal associação, semelhante ao encontrado em amostras de câncer gástrico avaliadas pela técnica CGH por Van Grieken *et al.* [27]. Há evidências que o *H. pylori* atua nas fases iniciais da carcinogênese gástrica, provocando o surgimento do processo inflamatório [11], no entanto, não é observada correlação entre o tipo de cepa e a expressão de proteínas como p53, c-erbB-2, ciclina D1 e E-caderina [28, 29].

Estudos genéticos de lesões gástricas benignas são extremamente escassos. Weiss *et al.* [14] observaram aneuploidias em 5,2% e 8,5% dos casos de gastrite crônica não-atrófica e atrófica, respectivamente. Nesse último grupo de lesões, Teodori *et al.* [13] encontraram subpopulações de células com DNA aneuplóide em 45% das amostras, enquanto Abdel-Wahab *et al.* [15] observaram alterações na quantidade de DNA em 18,8%. Apesar das discrepâncias, a taxa de



aneuploidias detectadas em gastrite no presente estudo, encontra-se na faixa de variação relatada na literatura.

O grupo de úlcera gástrica apresentou frequência elevada de aneuploidias (62%), algo ainda não descrito na literatura, envolvendo principalmente, trissomias dos cromossomos 7 e 17. A progressão maligna de úlceras gástricas tem sido raramente descrita na literatura [30, 31], assim como sua coexistência com neoplasia gástrica [32] e aumento do risco de câncer gástrico [31]. Portanto, a úlcera e o câncer gástrico apresentam certos fatores de risco em comum, que podem ser melhor compreendidos a partir de estudos genéticos que possibilitem a identificação de alterações homogêneas para essas lesões.

Em metaplasia intestinal, considerada como uma lesão pré-cancerosa, as trissomias mais freqüentes foram 7 e 9 no tipo completo e, no tipo incompleto, que apresenta um epitélio colônico com características semelhantes às da mucosa do intestino grosso, também ocorreram trissomias 8 e 17. Essas mesmas alterações também foram observadas nas amostras de adenocarcinoma gástrico, semelhante ao relatado por outros autores em tumores gástricos bem diferenciados do tipo intestinal [11, 33].

Outras alterações já foram relatadas nesse tipo de lesão como mutações dos genes *TP53*, *APC* ou *K-RAS* [34], atividade da telomerase [35], hipermetilação de ilhas CpG em genes de reparo como o



hMLH1 [11] e instabilidade de microssatélites coincidente aos tumores gástricos [33].

O presente estudo consiste no primeiro relato de aneuploidias, evidenciando instabilidade cromossômica em metaplasia intestinal do tipo completa e incompleta, detectadas em pacientes sem história de câncer gástrico. Portanto, esses estudos reforçam a associação desse tipo de lesão como um precursor potente do adenocarcinoma do tipo intestinal, pois a ocorrência de alterações genéticas similares sugere que possam ter evoluído conjuntamente, podendo permitir um diagnóstico precoce do câncer gástrico.

Nos adenocarcinomas gástricos, a frequência de aneuploidias foi superior ao observado em metaplasias intestinais, ocorrendo principalmente, as trissomias/tetrassomias 7, 17, 9, 8 e 3, resultados similares aos obtidos por outros autores [7, 36, 37].

O ganho do cromossomo 7 é uma anormalidade primária em diferentes tumores malignos, incluindo o câncer gástrico [6, 10, 38, 39, 40, 41]. Contudo, essa trissomia tem sido também evidenciada em lesões não-neoplásicas como placas ateroscleróticas, sinovite reumatóide, artrite reumatóide, pielonefrite crônica e osteatose hepática [38, 42]. A trissomia 7 como um evento isolado, não pode ser considerada como uma alteração específica apenas de tumores, o ganho deste cromossomo poderia conferir vantagens para o crescimento de alguns clones celulares anormais, permitindo que estes progridam para estágios de maior

malignidade [43]. Em neoplasias gástricas, essa alteração parece estar envolvida nos estádios iniciais da transformação genética [6, 10, 37, 44].

O cromossomo 7 contém genes que expressam receptores e fatores de crescimento, como *EGF-R* (7p12), *HGF* (7q13) e o oncogene *c-MET* (7q31), que codifica para o receptor do *HGF* [45, 46]. Alguns estudos sugerem que a interação entre a expressão elevada dos genes *c-MET* e *HGF* em células estromais, está envolvida com a morfogênese e a progressão do câncer gástrico [47, 48], sendo a expressão elevada de *c-MET* evidenciada em câncer gástrico difuso em estadio avançado [49] e associada com maior agressividade dos carcinomas gástricos [50]. O *EGF-R* apresenta expressão elevada tanto em câncer gástrico inicial e avançado do tipo intestinal, como em tumor avançado do tipo difuso [49].

Na maioria das amostras analisadas foi observada o ganho do cromossomo 8. A trissomia 8 é considerada como um evento comum na tumorigênese gástrica, exercendo um papel importante no processo de diferenciação [51] e maior agressividade dos tumores [52]. Entretanto, essa alteração foi associada tanto com sobrevida longa e prognóstico bom [53], como com sobrevida reduzida, no caso de trissomia total do cromossomo 8 [54].

A trissomia do cromossomo 9 foi mais freqüente que a monossomia, sendo observada principalmente nas amostras de metaplasia e adenocarcinoma gástrico. O ganho das regiões 9p22-pter e 9p32-33 tem sido observado em tumores gástricos indiferenciados e em



estádios avançados, respectivamente [36, 55]. A monossomia 9 foi encontrada em apenas três casos de úlcera gástrica (14%) e em um caso de metaplasia intestinal (5%). A perda da região 9p21-24 (*CDKN2A* e *CDKN2B*) foi descrita em tumores gástricos primários [56].

Ganho do cromossomo 17 foi observado nas amostras de úlcera gástrica, metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico. Terada *et al.* [57] relatou o mesmo em tumores gástricos primários e sugeriu a associação com metástases nos nódulos linfáticos. Na região 17q12-21.32 localiza-se o oncogene *c-ERBB-2* (*HER-2/neu*) relacionado com o crescimento e diferenciação celular e um prognóstico bom em neoplasia gástrica [58, 59], enquanto outros autores têm associado-o com fenótipo tumoral mais agressivo [60, 61].

Entre as alterações numéricas do cromossomo 3, foi observada principalmente a trissomia, também já descrita em linhagem celular TMK-1 de carcinoma gástrico [62] e, em 50% ou mais de linfomas gástricos [63]. Guan *et al.* [64] detectaram o ganho da região 3q em 31% dos casos de tumores gástricos. O ganho das regiões 3q e 13q foi também observado em adenocarcinoma da junção gastroesofágica [65], entretanto, o mesmo não foi encontrado em outros estudos com câncer gástrico [55, 66, 67]. Possivelmente, as regiões 3q e 13q22 apresentem oncogenes que podem ter um papel importante na carcinogênese gástrica [64].



Os cromossomos avaliados neste estudo contêm genes que atuam como oncogenes ou supressores tumorais com participação na regulação do ciclo celular. Assim, aneuploidias desses cromossomos podem refletir a instabilidade cromossômica, em consequência da expressão alterada desses genes, ou podem ocorrer no processo de iniciação e desenvolvimento tumoral, acarretando um desbalanço gênico.

Os carcinomas gástricos não são considerados doenças homogêneas, já que apresentam diferentes padrões de alterações genéticas no desenvolvimento dos tumores do tipo intestinal e do tipo difuso [11, 68]. Contudo neste estudo, apresentaram freqüências similares de aneuploidias, independente do estadiamento e do tipo histológico.

A associação observada no grupo de pacientes com gastrite crônica não-atrófica *H. pylori* positiva e o tabaco, demonstrou que o cigarro associado com a infecção por essa bactéria aumenta em 9,14 vezes o risco do indivíduo desenvolver gastrite crônica. Na fumaça do cigarro são encontradas nitrosaminas, especialmente a 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, que atua na inibição da síntese de DNA e interfere na eliminação de células transformadas pelas células normais [69].

Os resultados evidenciaram que a técnica de FISH foi eficiente para o rastreamento de aneuploidias em lesões gástricas associadas com infecção pelo *H. pylori*, destacando principalmente a trissomia 7 como uma alteração inicial, ocorrendo nas gastrites crônicas

como um evento isolado, ou em associação com trissomia 8 nas amostras de gastrite atrófica crônica. Nas úlceras gástricas foram mais frequentes as trissomias 7 e 17, enquanto em lesões pré-cancerosas como metaplasia intestinal e no grupo de adenocarcinoma gástrico foi observado o ganho do cromossomo 7, frequentemente associado com as trissomias dos cromossomos 17, 9, 8 e 3.



Referências Bibliográficas

1. Kuipers EJ. Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:3-11.
2. Instituto Nacional Do Câncer-INCA, 2002. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acesso em 05 de janeiro de 2003.
3. Peterson WL. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:40-46.
4. Guarner J, Herrera-Goepfert R, Mohar A, Sanchez L, Halperin D, Ley C, Parsonnet J. Gastric atrophy and extent of intestinal metaplasia in a cohort of *Helicobacter pylori*-infected patients. *Hum Pathol* 2001;32:31-35.
5. Pakodi F, Abdel-Salam OME, Debreceni A, Mózsik G. *Helicobacter pylori*. One bacterium and a broad spectrum of human disease: an overview. *J Physiol* 2000;94:139-158.
6. Espinoza LA, Neto BJ, Casartelli C. Pathological and Karyotypic Abnormalities in Advanced Gastric Carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;109:45-50.
7. Beuzen F, Dubois S, Fléjou JF. Chromosomal numerical aberrations are frequent in oesophageal and gastric adenocarcinomas: a study using in situ hybridization. *Histopathol* 2000;37:241-249.
8. Fringes B, Mayhew TM, Reith A, Gates J, Ward DC. Numerical aberrations of chromosomes 1 and 17 correlate with tumor site in human gastric carcinoma of the diffuse and intestinal types. Fluorescence in situ hybridization analysis on gastric biopsies. *Lab Inv* 2000;80:1501-1508.
9. Koo SH, Kwon KC, Shin SY, Jeon YM, Park JW, Kim SH, Noh MS. Genetic Alterations of Gastric Cancer: Comparative Genomic Hybridization and Fluorescence *In situ* Hybridization Studies. *Cancer Genet Cytogenetic* 2000;117:97-103.
10. Okada K, Sugihara H, Bamba M, Bamba T, Hattori T. Sequential Numerical Changes of Chromosomes 7 and 18 in Diffuse-Type Stomach Cancer Cell Lines: combined Comparative Genomic Hybridization,



Fluorescence *In situ* Hybridization and Ploidy Analyses. Cancer Genet Cytogenet 2000;118:99-107.

11. Yasui W, Oue N, Kuniyasu H, Ito R, Tahara E, Yokozaki H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. Gastric Cancer 2001;4:113-121.

12. Tahara, E. Molecular mechanism of human stomach carcinogenesis implicated in *Helicobacter pylori* infection. Exp Toxicol Pathol 1998;50(4-6):375-378.

13. Teodori L, Capurso L, Cordelli E, De Vita R, Koch M. Cytometrically determined relative DNA content as indicator of neoplasia in gastric lesions. Cytometry 1984;5:63-70.

14. Weiss H, Gutz HJ, Schroter J, Wildner GP. DNA distribution pattern in chronic gastritis. I. DNA ploidy and cell cycle distribution. Scand J Gastroenterol 1989;24:643-648.

15. Abdel-Wahab M, Attallah AM, Elsahl MF, Eldousoky I, Zalata KR, El-Ghawalby NA, Gad El-Hak N, El-Ebidy G, Ezzat F. Correlation between endoscopy, histopathology, and DNA flow cytometry in patients with gastric dyspepsia. Hepatogastroenterol 1996;43:1313-1320.

16. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. Acta Pathol Microbiol Scand 1965;64:31-39.

17. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney Sistem. International workshop on the histopathology of gastritis. Houston 1994. Am J Surg Pathol 1996;20:1161-1181.

18. Kuo KL, Pimentel D. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with biotinylated DNA painting probes. Symposium Fourth International Workshop on Chromosomes of Solid Tumors. Tucson, AZ (USA), feb.24-26, p.1-4, 1991.



19. Eastmond DA, Schler M, Rupa DS. Advantages and limitations of using fluorescence *in situ* hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mut Res* 1995;348:153-162.
20. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
21. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for genetic polymorphism of the GSTM and GSTT1 genes in human. *Cancer Lett* 1996;104:229-233.
22. Hammar M, Tysabewicz T, Wadstrom T, O'Toole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;38:54-58.
23. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:192-200.
24. Ceron RC, Santos JR, Bicudo HEMC. The use of gelatin to dry cellphane wound slab gels in an embroidering hoop. *Rev Brasil Genet* 1992;15(1):201-203.
25. Triola, MF. *Statdisk V 8.1*. 8th ed., Addison Wesley Longman, Inc.; 2001.
26. Petrere Jr, M. *Statistica*. Stat Soft Inc.; 1993.
27. Van Grieken NCT, Weiss MM, Meijer GA, Hermsen MAJ, Scholte GHA, Lindeman J, Craanen ME, Bloemena E, Meuwissen SGM, Baak JPA, Kuipers EJ. *Helicobacter pylori*-related and -non-related gastric cancers do not differ with respect to chromosomal aberrations. *J Pathol* 2000;192:301-306.
28. Craanen ME, Blok P, Dekker W, Offerhaus GJA, Tytgat GNJ. Chronology of p53 protein accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1995;36:848-852.
29. Blok P, Craanen ME, Offerhaus GJA. Molecular alterations in early gastric carcinomas: no apparent correlation with *H. pylori* status. *Am J Pathol* 1999;111:241-247.



30. Nagavo T. Histogenesis and precursors of human gastric cancer. Berlim, Germany: Springer Verlag, 1986, 115p.
31. Lee S, Iida M, Yao T. Risk of gastric cancer in patients with non-surgically treated peptic ulcer. Scand J Gastroenterol 1990;25:1223-1226.
32. Yamagata S, Hisamichi S. Precancerous lesions of the stomach. World J Surg 1979;3:1-3.
33. Kobayashi K, Okamoto T, Takayama S, Akiyama M, Ohno T, Yamada H. Genetic instability in intestinal metaplasia is a frequent event leading to well-differentiated early adenocarcinoma of the stomach. Eur J Cancer 2000;36:1113-1119.
34. Ochiai A, Yamaychi Y, Hirohashi S. p53 mutations in the non-neoplastic mucosa of the human stomach showing intestinal metaplasia. Int J Cancer 1996;69:28-33.
35. Yokozaki H, Yasui W, Tahara E. Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. Int Rev Cytol 2001;204:49-95.
36. Han K, Oh EJ, Kim YS. Chromosomal numerical aberrations in gastric carcinoma: analysis of eighteen cases using *in situ* hybridisation. Cancer Genet Cytogenet 1996;92:122-129.
37. Kitayama Y, Igarashi H, Sugimura H. Different vulnerability among chromosomes to numerical instability in gastric carcinogenesis: stage-dependent analysis by FISH with the use of microwave irradiation. Clin Cancer Res 2000;6:3139-3146.
38. Johansson B, Heim S, Mandhl N, Mertens F, Mitelman F. Trisomy 7 in nonneoplastic cells. Genes Chromosom Cancer 1993;6:199-205.
39. Dalessandro I, Zitzelsberger H, Hutzler P, Lehmann L, Braselmann H, Chimenti S, Höfler H. Numerical aberrations of chromosome 7 detected in 15 microns paraffin-embedded tissue sections of primary cutaneous melanomas by fluorescence *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. J Cutan Pathol 1997;24:70-75.
40. Hugson MD, Dickman K, Bigler SA, Meloni AM, Sandberg AA. Clear-cell and papillary carcinoma of the kidney: an analysis of chromosome 3,



- 7, and 17 abnormalities by microsatellite amplification, cytogenetics, and fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;106:93-104.
41. Barril N, Salles ABCF, Tajara EH. Interphase cytogenetic analysis of normal tissue of thyroid gland by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;114:162-164.
42. Roca F, Perez-Gomez JA, Cigedosa JC, Gomez E, Estevez M. Genetic heterogeneity of benign thyroid lesions static and flow cytometry karyotyping and *in situ* hybridization analysis. *Anal Cell Pathol* 1998;16:101-110.
43. Sainsbury JRC, Farndon JR, Sherbet VG, Harris AL. Epidermal-growth-factor receptors and estrogen receptors in human breast cancer. *Lancet* 1985;i:364-366.
44. Chun YH, Kil J, Suh YS, Kim SH, Kim H, Park SH. Characterization of chromosomal aberrations in human gastric carcinoma cell lines using chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;119:18-25.
45. Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, Fonatsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y, Birchmeier W. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7001-7005.
46. Wang Y, Minoshima S, Shimizu N. Precise mapping of the EGF receptor gene on the human chromosome 7p12 using an improved FISH technique. *Jpn J Hum Genet* 1993;38:399-406.
47. Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;119:265-272.
48. Tarasova NI, Rulong S, Oskarsson M. Cellular localization of met and its ligand hepatocyte growth factor/ scatter factor in human stomach epithelium. *Gastroenterol* 1996;110:1125.
49. Wu MS, Shun CT, Wang HP, Sheu JC, Lee WJ, Wang TH, Lin JT. Genetic alterations in gastric cancer: relation to histological subtypes,



tumor stage, and *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol 1997;112:1457-1465.

50. Han SU, Lee JH, Kim WH, Cho YK., Kim MW. Significant correlation between serum level of hepatocyte growth factor and progression of gastric carcinoma. World J Surg 1999;23:1176-1180.

51. Suzuki S, Tenjin T, Watanabe H, Matsushima S, Shibuya T, Tanaka S. Low level c-myc gene amplification in gastric cancer detected by dual color fluorescence *in situ* hybridization analysis. J Surg Oncol 1997;66:173-178.

52. Castedo S, Correia C, David L, Sobrinho-Simões M. Isochromosomes 8q. A recurrent change in gastric carcinoma. Cancer Genet Cytogenet 1991;54:137-138.

53. Panani AD, Ferti A, Malliaros S, Raptis S. Gastric cancer with an I(8q) and long survival. Cancer Genet Cytogenet 1992;58:214-215.

54. Panani AD, Ferti A, Malliaros S, Raptis S. Cytogenetic study of 11 gastric adenocarcinomas. Cancer Genet Cytogenet 1995;81:169-172.

55. Koizumi Y, Tanaka SI, Mou R, Kougane H, Kokowa A, Kitamura R, Yamauchi H, Ookubo K, Saito T, Tominaga S, Matsumura K, Shimada H, Tsuchida N, Sekihara H. Changes in DNA copy number in primary gastric carcinomas by comparative genomic hybridization. Clin Cancer Res 1997;3:1067-1076.

56. Sakakura C, Mori T, Sakabe T, Ariyama Y, Shinomiya T, Date K, Hagiwara A, Yamaguchi T, Takahashi T, Nakamura Y, Abe T, Inazawa J. Gains, losses and amplifications of genomic materials in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization. Genes Chromosom Cancer 1999;24:299-305.

57. Terada R, Yasutake T, Yamaguchi E, Hisamatsu T, Nakamura S, Ayabe H, Tagawa Y. Higher frequencies of numerical aberrations of chromosome 17 in primary gastric cancers are associated with lymph node metastasis. J Gastroenterol 1999;34:11-17.

58. Jain S, Filipe MI, Gullick WJ, Linehan J, Morris RW. c-erbB-2 protooncogene expression and its relationship to survival in gastric



carcinoma: an immunohistochemical study on archival material. *Int J Cancer* 1991;48:668-671.

59. Hilton DA, West KP. c-erbB-2 oncogene product expression and prognosis in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1992;45:454-456.

60. Yonemura Y, Ninomiya I, Ohoyama S, Kimura H, Yamaguchi A, Fushida S, Kosaka T, Miwa K, Miyazaki I, Endo Y. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinomas. *Cancer* 1991;67:2914-2918.

61. Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, Kinoshita T, Sasako M, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer its correlation with long-term survival of patients. *Cancer* 1993;72:3179-3184.

62. Ito H, Oda N, Ito M, Kameda T, Nakayama H, Tahara E. Cytogenetical analysis of the human gastric carcinoma cell line TMK-1. *Hiroshima J Med Sci* 1989;38:121-124.

63. Blanco R, Lyda M, Davis B, Kraus M, Fenoglio-Preiseer C. Trisomy 3 in gastric lymphomas of extranodal marginal zone-B cell (mucosa-associated lymphoid tissue) origin demonstrated by FISH in intact paraffin tissue sections. *Human Pathol* 1999;30:706-711.

64. Guan XY, Fu SB, Xia JC, Fang Y, Sham JST, Du BD, Zhou H, Lu S, Wang BQ, Lin YZ, Liang Q, Lim XM, Ju B, Ning XM, Du JR, Lim P, Trent JM. Recurrent chromosome changes in 62 primary gastric carcinomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genetic Cytogenetic* 2000;123:27-34.

65. Van Dekken H, Geelen E, Dinjens WN, Wijnhoven BP, Tilanus HW, Tanke HJ, Rosenberg C. Comparative genomic hybridization of cancer of the gastroesophageal junction: deletion of 14q31-32.1 discriminates between esophageal (Barret's) and gastric cardia adenocarcinomas. *Cancer Res* 1999;59:748-752.

66. Kokkola A, Monni O, Puolakkainen P, Larramedy ML, Victorzon M, Nordling S, Haapiainen R, Kivilaakso E, Knuutila S. 17q12-21 amplicon a novel recurrent genetic change in intestinal type of gastric carcinoma: a

comparative genomic hybridisation study. *Genes Chromosom Cancer* 1997;20:36-43.

67. Nessling M, Solinas-Toldo S, Wilgenbus KK, Borchard F, Lichter P. Mapping of chromosomal imbalances in gastric adenocarcinoma revealed amplified protooncogenes *MYC*, *MET*, *WNT2* and *ERBB2*. *Genes Chromosom Cancer* 1998;23:307-316.

68. Lin JT, Wu MS, Shun CT, Lee WJ, Sheu JC, Wang TH. Occurrence of microsatellite instability in gastric carcinoma is associated with enhanced expression of erbB-2 oncoprotein. *Cancer Res* 1995; 55:1428-1430.

69. Stadtländer CTKH, Waterbor JW. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis* 1999;20:2195-2208.



Tabela 1 – Distribuição e variação das porcentagens de núcleos com 1, 2, 3 e ≥ 4 sinais dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 nas amostras de mucosa gástrica normal (MGN), gastrite crônica não-atrófica (GCNA), gastrite atrófica crônica (GAC), úlcera gástrica (UG), metaplasia intestinal (MI) e adenocarcinoma gástrico (CG).

Casos	Cromossomo 3				Total	Cromossomo 7				Total	Cromossomo 8				Total	Cromossomo 9				Total	Cromossomo 17				Total
	1	2	3	>4		1	2	3	>4		1	2	3	>4		1	2	3	>4		1	2	3	>4	
MGN	3.1 (1.0-6.0)	93.7 (89.7-95.8)	2.7 (0.4-5.7)	0.5 (0.0-0.6)	3108	3.3 (1.2-5.7)	93.5 (89.3-97.1)	2.8 (1.0-5.0)	0.4 (0.0-0.6)	3096	3.7 (1.0-6.7)	94.4 (90.0-97.6)	1.9 (0.0-4.7)	0.0 (0.0-0.0)	3147	3.2 (1.5-5.5)	94.2 (91.3-96.9)	2.6 (1.0-5.0)	0.0 (0.0-0.0)	3088	2.8 (1.1-5.3)	95.8 (91.6-98.9)	1.3 (0.0-3.4)	0.1 (0.0-0.4)	2784
GCNA	4.4 (1.9-8.5)	91.7 (83.0-97.2)	3.7 (0.0-12.0)	0.2 (0.0-2.2)	11965	4.7 (0.9-15.9)	91.1 (80.8-97.8)	3.9 (0.3-12.3)	0.3 (0.0-1.7)	11818	5.3 (0.6-7.5)	91.7 (86.6-98.8)	2.9 (0.3-16.7)	0.1 (0.0-0.7)	11947	3.1 (1.2-8.5)	93.8 (82.7-97.6)	3.0 (0.6-10.0)	0.1 (0.0-2.0)	12108	2.7 (0.7-6.8)	94.5 (88.7-98.9)	2.3 (0.0-7.3)	0.5 (0.0-2.3)	8971
GAC	2.8 (0.6-5.7)	91.9 (86.0-96.3)	5.0 (0.9-9.7)	0.3 (0.0-1.4)	4167	3.9 (0.7-7.0)	90.7 (60.9-97.0)	5.0 (0.5-29.2)	0.4 (0.0-4.0)	4051	3.1 (0.6-6.6)	93.4 (82.1-97.8)	3.3 (0.6-10.9)	0.2 (0.0-1.6)	4152	3.8 (1.2-8.3)	91.4 (78.4-95.7)	4.7 (1.6-12.3)	0.1 (0.0-1.0)	4050	2.8 (1.4-4.8)	93.5 (88.6-96.3)	3.0 (0.9-7.0)	0.7 (0.0-3.0)	3139
UG	3.5 (1.2-10.0)	92.5 (84.5-97.7)	3.6 (0.3-10.9)	0.4 (0.0-2.1)	6908	9.4 (1.5-16.5)	83.7 (57.2-95.9)	5.7 (0.6-27.5)	1.2 (0.0-12.0)	6999	8.3 (1.4-16.1)	86.9 (76.8-97.5)	4.5 (0.3-18.1)	0.3 (0.0-0.9)	6898	4.8 (1.0-15.1)	88.9 (67.3-96.2)	5.6 (1.6-22.5)	0.7 (0.0-9.0)	6988	2.6 (0.7-8.0)	92.7 (83.4-97.4)	4.0 (0.0-10.3.5)	0.7 (0.0-4.3)	4970
MI	3.7 (0.7-15.2)	92.4 (68.7-96.8)	3.6 (0.0-13.4)	0.3 (0.0-2.6)	6549	3.9 (0.0-8.7)	83.6 (47.3-96.8)	10.8 (2.5-35.5)	1.7 (0.0-12.4)	6639	4.6 (1.2-22.5)	89.5 (68.2-97.2)	5.7 (0.3-27.9)	0.2 (0.0-1.0)	6715	3.5 (0.6-12.8)	91.2 (82.1-97.6)	5.0 (0.9-12.7)	0.3 (0.0-4.0)	6708	5.3 (2.4-8.1)	85.6 (81.8-93.8)	7.3 (2.1-13.9)	1.8 (0.0-3.2)	4200
CG	5.0 (0.9-8.7)	77.6 (54.0-96.9)	14.1 (0.9-31.4)	3.3 (0.0-12.7)	6192	3.3 (0.0-10.0)	66.8 (23.9-86.7)	21.8 (8.7-41.3)	8.1 (0.0-34.9)	6226	4.8 (0.0-16.3)	65.4 (6.6-90.4)	20.6 (2.3-67.0)	9.2 (0.0-82.3)	6195	3.2 (0.0-9.0)	77.1 (58.2-90.6)	16.9 (5.6-36.9)	2.8 (0.0-10.9)	6307	4.7 (0.8-10.0)	76.2 (53.7-92.2)	15.0 (5.2-33.2)	4.1 (0.0-14.8)	4419

Tabela 2 – Resultados do estudo histopatológico e da investigação citogenética molecular das amostras de gastrite crônica não-atrótica e atrótica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal.

Caso	Sexo/ Idade	Tabagismo/ Etilismo	H. pylori	Localização	Aneuploidias
Gastrite crônica (n = 38)					
GCS03	M/32	-/-	-	A	-7, +8*
GCS14	F/36	+/-	+	A	-7
GCM02	F/54	-/+	-	A	+7
GCM13	F/41	+/-	+	A	+7*
GCM14	M/44	+/-	+	A	+9
GCM17	F/34	+/+	+	A	+7
GCM18	M/54	+/+	+	A	+3, +7, +17
GCM19	F/58	-/-	+	A	-7
Gastrite atrótica crônica (n = 13)					
GAC05	F84	-/-	+	A	+8*
GAC07	M/65	+/+	+	N	+7, +8
GAC08	M/57	-/+	+	A	+7 / +7+7
GAC13	M/77	+/-	+	A/F	+9
Úlcera gástrica (n = 21)					
UG02	M/73	+/+	-	A	+17
UG03	M/52	+/+	-	A	+9 / +9+9
UG04	M/78	+/+	-	A	+7, +8*
UG05	M/64	+/+	-	A	-7*
UG06	M/43	+/-	+	A	+7 / +7+7, +8 -9, +17 / +17+17
UG07	F/51	∇	+	A	+3 / +3+3
UG12	M/28	+/+	+	A	-7, -9, -17
UG14	F/83	-/-	+	A	-9
UG15	M/43	+/+	+	A	-7, -8
UG16	F/82	-/-	+	A	-8
UG18	M/58	+/+	+	A	+7 / +7+7
UG19	F/62	+/-	+	A	+7 / +7+7, +8, +17 / +17+17
UG20	M/63	+/+	+	A	+9 / +9+9*
Metaplasia intestinal (n = 21)					
Completa					
MI01	F/50	-/-	-	A	+9
MI02	F/54	+/-	-	A	+7 / +7+7, +9 / +9+9
MI05	M/74	+/+	-	A	+17
MI10	F/70	-/-	+	A	+7
MI20	M/75	-/+	+	A	+9
MI21	F/91	+/-	+	A	+7*
Incompleta					
MI07	F/73	+/+	-	A	+7 / +7+7
MI08	F/46	+/-	+	A	+7, -9*
MI12	M/73	-/-	+	A	+8
MI13	F/80	-/-	+	A	+8*
MI14	M/94	+/+	+	A	+7 / +7+7*
MI17	M/75	+/-	+	F	+7, +8, +17
MI19	M/57	-/+	+	A	+7, +17
Completa e incompleta					
MI11	F/68	-/-	+	A	-3, +3 / +3+3, +7 / +7+7, -8, -17
MI18	M/47	+/+	+	A	+7 / +7+7, +8

F = feminino; M = masculino; A = antro; F = fundo; N = outras localizações;

* = cromossomo 17 não analisado.

Tabela 3 – Resultados do estudo histopatológico e da investigação citogenética molecular das amostras de adenocarcinoma gástrico.

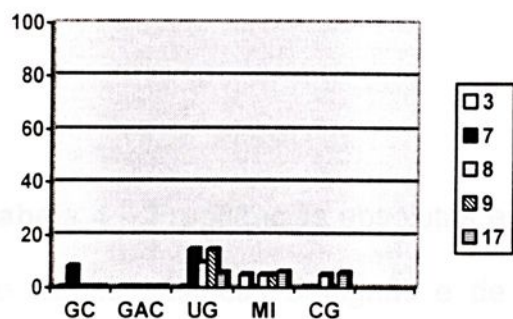
CASO	Sexo/ Idade	Tabagismo/ Etilismo	H. <i>pylori</i>	TNM/grau	L	Aneuploidias
Intestinal						
CG03	M/62	+/+	–	T3N2M0/III	A/C	+7 / +7+7, +8 / +8+8, +9 / +9+9, +17 / +17+17
CG04	M/63	+/+	–	T4N1Mx/IV	A/C	+3 / +3+3, +7 / +7+7, +8 / +8+8, +9, +17 / +17+17
CG05	M/62	+/+	–	φ	F/C	+3 / +3+3, +7, +8 / +8+8, +9 / +9+9, +17
CG06	M/66	+/+	–	TxNxM1/IV	A	+3 / +3+3, +7, -8, +9 / +9+9, -17
CG07	M/51	+/+	–	T4N1Mx/IV	A	+3 / +3+3, +7 / +7+7, +17
CG08	F/86	-/-	+	φ	F	+7 / +7+7, +8 / +8+8, +9 / +9+9
CG09	M/76	+/+	+	T3N0M0/II	A	+7 / +7+7, +9, +17 / +17+17
CG10	M/71	+/+	+	T3N0M0/II	A/C	+7 / +7+7, +8 / +8+8, +9*
CG14	M/72	+/+	+	TxNxM1/IV	A/C	+7 / +7+7, +8 / +8+8, +9 / +9+9, +17
CG15	M/77	+/+	+	TxN1M1/IV	A/C	+3 / +3+3, +7 / +7+7, +8 / +8+8, +9 / +9+9, +17
CG17	M/93	+/+	+	φ	F/C	+3, +7, +8, +17 / +17+17
CG19	M/58	+/-	+	T3N1M1/IV	A	+8, +9 / +9+9, +17
Difuso						
CG01	M/71	+/-	–	φ	Ca	+3 / +3+3, +7 / +7+7, +8 / +8+8, +9*
CG11	F/28	-/-	+	T4N2/IV	A	+3 / +3+3, +7 / +7+7, +8 / +8+8, +9 / +9+9, +17 / +17+17
CG12	M/83	+/+	+	T3N1/III	A/C/F	+3 / +3+3, +7 / +7+7, +9, +17 / +17+17
CG13	M/71	+/+	+	φ	Ca/C	+3, +7 / +7+7, +8 / +8+8, +9 / +9+9*
CG16	F/66	-/-	+	φ	A/C	+3 / +3+3, +7 / +7+7, +8 / +8+8, +9 / +9+9, +17 / +17+17
CG18	M/44	+/+	+	T1N0M0/I	A	+7, +8 / +8+8, +9, +17
CG20	F/38	-/-	+	T3N1M1/IV	A	+3 / +3+3, +7 / +7+7, +17
Indiferenciado						
CG02	M/48	+/+	–	T3N2M0/III	A	+7, +8 / +8+8, +9, +17 / +17+17

F = feminino; M = masculino; L = localização; A = antro; Ca = cárdia; C = corpo; F = fundo; N = outras localizações; * = cromossomo 17 não analisado; φ = dado não disponível.

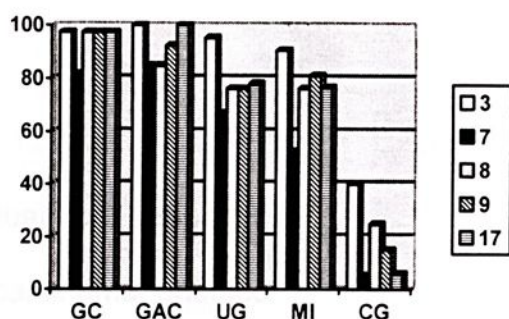


Legenda:

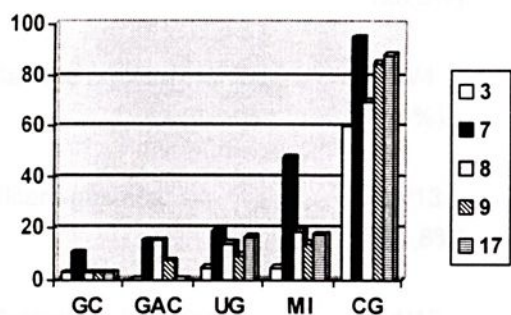
Figura 1 – Distribuição das porcentagens de casos com monossomia, dissomia, trissomia e tetrassomia para os cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 nas amostras de gastrite crônica (GC), gastrite atrófica crônica (GAC), úlcera gástrica (UG), metaplasia intestinal (MI) e adenocarcinoma gástrico (CG).



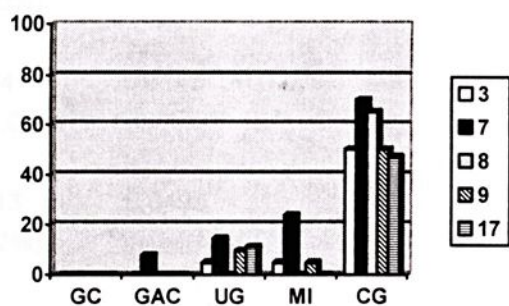
MONOSSOMIA



DISSOMIA



TRISSOMIA



TETRASSOMIA

Legenda:

Figura 2 – Caracterização de aneuploidias nos diferentes tipos de lesões

Tabela 4 – Frequências absolutas e percentuais das amostras de lesões gástricas benignas e de adenocarcinoma gástrico com aneuploidias e associação com a infecção pelo *H. pylori*.

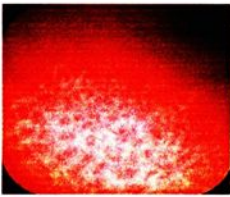
Amostra	Aneuploidias		p
	Hp-	Hp+	
Gastrite crônica	2/8 (25,0%)	6/8 (75,0%)	0,0660 ^a
Gastrite atrófica crônica	0/4 (0%)	4/4 (100,0%)	0,0143 ^a *
Úlcera gástrica	4/13 (30,8%)	9/13 (69,2%)	0,0498 ^b *
Metaplasia intestinal	4/15 (26,7%)	11/15 (73,3%)	0,0105 ^b *
Adenocarcinoma gástrico	7/20 (35,0%)	13/20 (65,0%)	0,0577

Hp- = *H. pylori* negativa; Hp+ = *H. pylori* positiva; ^a = teste exato de Fisher;

^b = teste de χ^2 ; * = estatisticamente significante.

Legenda:

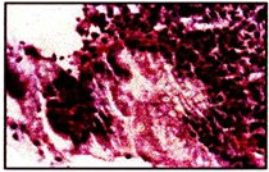
Figura 2 - Caracterização de aneuploidias nos diferentes tipos de lesões gástricas benignas e adenocarcinoma, evidenciando as visões endoscópica (E) e microscópica (M).



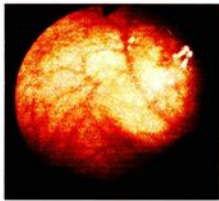
(E)

Gastrite crônica

-7, +7



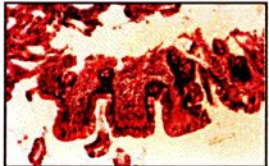
(M)



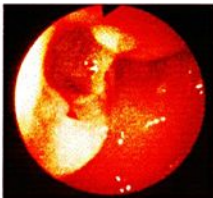
(E)

Gastrite atrófica

+7, +8



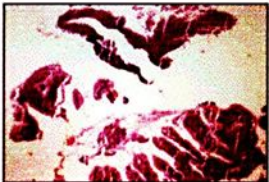
(M)



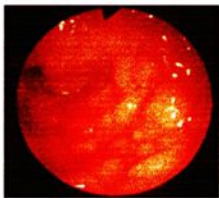
(E)

Úlcera gástrica

+7, +17



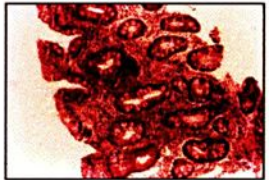
(M)



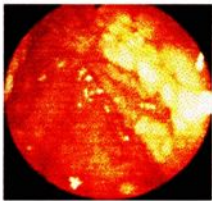
(E)

Metaplasia intestinal

+7, +8, +9, +17



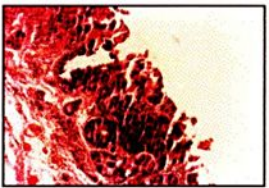
(M)



(E)

Adenocarcinoma gástrico

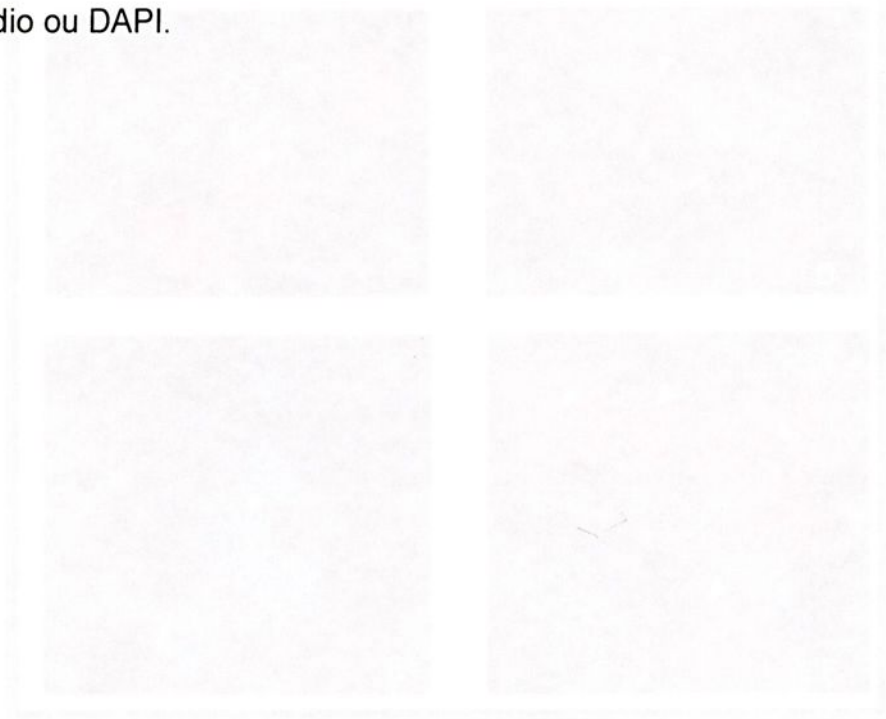
+3, +7, +8, +9, +17

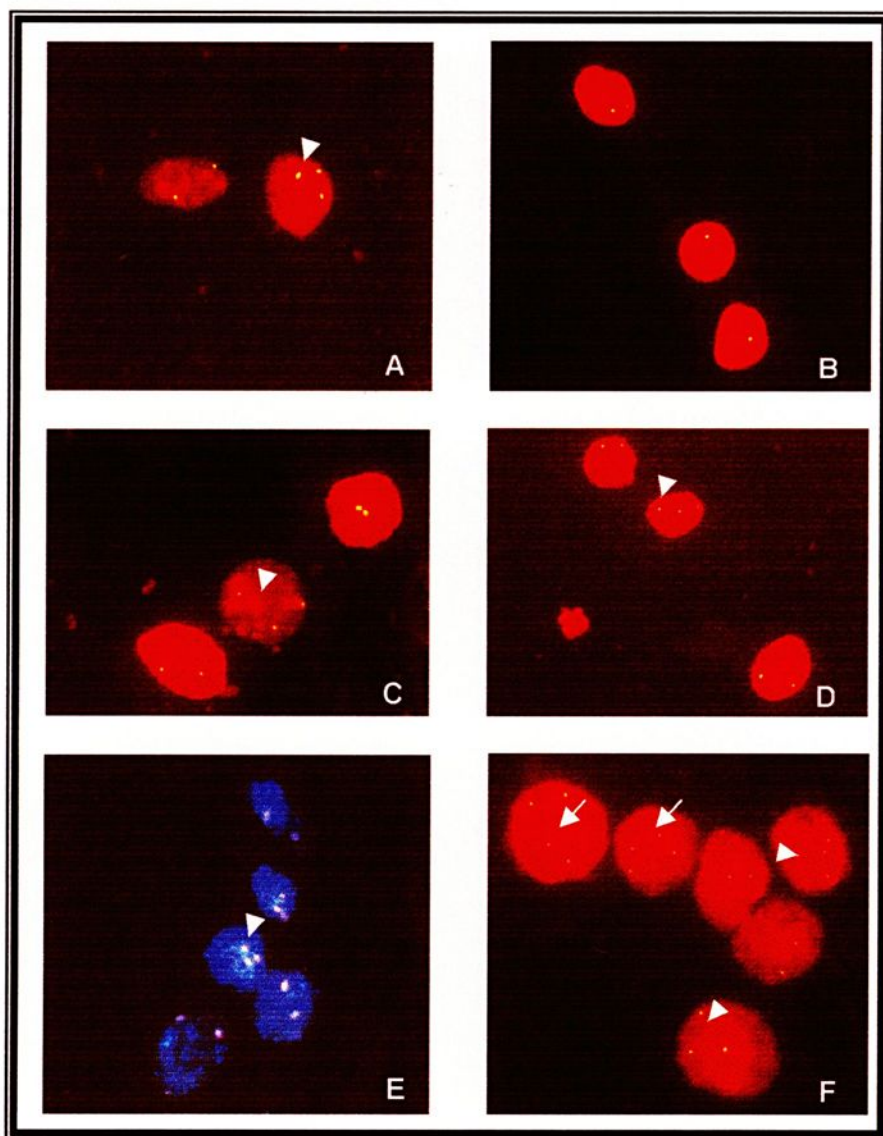


(M)

Legenda:

Figura 3 - Fotomicrografias mostrando núcleos submetidos a técnica FISH, com sondas alfa-centroméricas evidenciando: trissomia 3 (A) e monossomia 7 (B) em gastrite crônica; trissomia 7 em metaplasia intestinal (C); trissomia 8 em úlcera gástrica (D); trissomia 9 (E) e trissomia (seta curta) e tetrassomia do cromossomo 17 (seta longa) em adenocarcinoma gástrico (F). Os núcleos foram contracorados com iodeto de propídio ou DAPI.





© 2004 Blackwell Publishing Ltd *Journal of Internal Medicine* 255: 103–110

Periódico: *Journal of Gastroenterology*

ISSN 0944-1174

Título: Deleção e expressão do gene *TP53* em lesões benignas e adenocarcinomas gástricos e associação com o *Helicobacter pylori*.

Título em inglês: *TP53* gene deletion and expression in benign lesions and gastric adenocarcinoma and association with *Helicobacter pylori*

Autores: Ana Cristina Gobbo César¹, Marília de Freitas Calmon¹, Patrícia Maluf Cury², Aldenis Albanese Borin³, Alaor Caetano⁴, Ana Elizabete Silva¹

¹ Departamento de Biologia, UNESP - São José do Rio Preto, SP, Brazil

² Departamento de Patologia e Medicina Legal, FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brazil

³ Serviço de Cirurgia, Hospital de Base, São José do Rio Preto, SP, Brazil

⁴ Serviço de Endoscopia, Hospital de Base, São José do Rio Preto, SP, Brazil

Endereço para correspondência: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva

Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Bairro Jardim Nazareth

15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

Fone: (055) 17 221-2384, Fax: (055) 17 221-2390

e-mail: anabete@bio.ibilce.unesp.br

ABSTRACT

Background – The inactivation of the p53 gene by mutation or deletion occurs as initial event in gastric tumorigenesis, possibly associated with *Helicobacter pylori* infection. The aim of this study was to investigate the occurrence of TP53 gene deletion and expression in benign lesions and gastric adenocarcinoma and association with *H. pylori* infection and other parameters.

Methods – Specimens of 60 patients with benign gastric lesions (chronic gastritis, atrophic gastritis, gastric ulcer and intestinal metaplasia) and 16 with gastric adenocarcinoma were used. The immunohistochemical technique was employed to control the presence of protein p53 and the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, with direct fluorescent labeling probes, for the TP53 gene and chromosome 17, to investigate the deletion of this gene.

Results – No TP53 deletion was found in non-atrophic and atrophic chronic gastritis and gastric ulcer, but p53 positive immunoreactivity with low intensity was detected in 45% (5/11) and 12% (2/17), respectively, of these samples. TP53 gene deletion was observed in three of five intestinal metaplasia and in all three samples of gastric adenocarcinoma analysed. p53 overexpression was observed in two of 17 metaplasias and 12 of 16 gastric adenocarcinomas. No significant association was observed between p53 expression and *H. pylori* infection nor other parameters such

as sex, age, tobacco and alcohol consumption, stomach localization, histological type or differentiation grade.

Conclusions – The increase of detectable p53 in benign lesions (gastritis and gastric ulcer) may be due to overexpression of the wild-type protein, related to an inflammatory response of mucosa induced by other factors, endogenous or exogenous, seeing that no association with *H. pylori* infection was observed. In intestinal metaplasia, the overexpression may be related to wild-type and mutated forms, since some mutations of TP53 gene were reported in this type of lesion, thus lendign support to the hypothesis of joint evolution of intestinal metaplasia and gastric adenocarcinoma.

Key-words – benign gastric lesions, intestinal metaplasia, gastric adenocarcinoma, TP53 deletion, immunohistochemical.



Resumo

Introdução e objetivo – A inativação do gene *TP53* por mutação ou deleção ocorre como um evento inicial na tumorigênese gástrica, possivelmente associada à infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*. O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de deleção e expressão do gene *TP53* em lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico e associar com a infecção pelo *H. pylori* e outros parâmetros.

Material e Métodos – Foram utilizadas espécimens de 60 pacientes com lesões gástricas benignas (gastrite crônica, gastrite atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal) e de 16 com adenocarcinoma gástrico. Empregou-se a técnica imunoistoquímica para verificar a presença da proteína p53 e o método de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com sondas marcadas diretamente com fluorocromos para o gene *TP53* e o cromossomo 17, para investigação de deleção deste gene.

Resultados – A deleção do gene *TP53* não foi encontrada em gastrites crônicas não-atróficas e atróficas e em úlcera gástrica, mas a imunorreatividade positiva para p53 de intensidade fraca foi detectada em 45% (5/11) e 12% (2/17), respectivamente, dessas amostras. Foi observada a deleção do gene *TP53* em três das cinco amostras de metaplasia intestinal e em todos os três casos de adenocarcinoma gástrico analisados. A presença da proteína p53 foi verificada em dois dos 17 casos de metaplasia e em 12 dos 16 de adenocarcinoma gástrico. No entanto, não observou-se associação significativa entre a expressão da

p53 com a infecção pelo *H. pylori* e nem com outros parâmetros como sexo, idade, tabagismo e etilismo, localização no estômago, histologia ou grau de diferenciação.

Conclusões - O aumento de expressão da p53 encontrada nas lesões benignas (gastrite e úlcera gástrica) pode ser devido a superprodução da proteína selvagem, relacionada a uma resposta inflamatória da mucosa induzida por outros fatores, endógenos e exógenos, já que não observou-se associação com a infecção pelo *H. pylori*. Em metaplasia intestinal, a superexpressão da p53 pode estar relacionada com as formas selvagem e mutada, pois há relatos de mutações no gene *TP53* neste tipo de lesão, assim reforçando a hipótese da evolução conjunta da metaplasia e adenocarcinoma gástrico.

Palavras-chaves - gastrite, úlcera gástrica, atrofia, metaplasia intestinal, câncer gástrico, deleção *TP53*, imunoistoquímica.

Introdução

Os mecanismos moleculares associados com a etiologia da carcinogênese gástrica incluem alterações genéticas e epigenéticas afetando oncogenes, genes supressores de tumor, genes de reparo de DNA, reguladores do ciclo celular e moléculas de adesão celular, tendo a inativação do gene *TP53* como um evento inicial.^{1,2} Esse gene, localizado na região 17p13.1, apresenta diferentes propriedades que contribuem com a supressão tumoral. A proteína p53 é um fator de transcrição que atua na regulação da proliferação celular, apoptose e reparo do genoma. Ela inibe a transição da fase G1 para S do ciclo celular, permitindo que a célula repare seu DNA. Caso os danos sejam irreversíveis, a p53 inicia o processo de apoptose.³

O gene *TP53* é encontrado mutado ou deletado em mais de 50% dos tumores humanos, afetando principalmente os éxons 4 a 8,⁴ inclusive em câncer gástrico.^{5,6} Dentre as alterações, 85,6% são mutações *missense*, resultando na ausência ou alteração da proteína na célula; 8,1% são deleções ou inserções; 5,5% são mutações *nonsense* ou mutações *frameshift* e 0,8% são mutações neutras.⁴ Geralmente, um alelo do *TP53* sofre uma mutação que inativa a função da proteína e, posteriormente, o segundo alelo é deletado, resultando na perda de heterozigosidade.³ Nas células que perderam a função da p53, surge um estado de instabilidade genética, favorecendo o aparecimento de

amplificações gênicas, aneuploidias e outras alterações responsáveis pela progressão neoplásica.⁷

Mutações no gene *TP53* podem ser induzidas por radiação e agentes químicos como N-nitrosaminas que provocam principalmente transições G:C → A:T e transversões G:C → T:A.^{8,9,10,11} Na mucosa gástrica tais mutações podem ocorrer também pela ação do óxido nítrico, um potente mutágeno produzido por células inflamatórias como os macrófagos e neutrófilos, infiltrados na mucosa lesada, em resposta a presença da bactéria *H. pylori*. O óxido nítrico pode favorecer a ocorrência de transição G:C → A:T, um tipo de mutação que ocorre com maior frequência nos estágios iniciais da carcinogênese gástrica.¹²

A proteína p53 mutada apresenta vida média prolongada, acumulando-se no núcleo e, assim, podendo ser detectada por técnica imunoistoquímica. No entanto, nem sempre há uma correspondência entre a imunorreação positiva da p53 e mutações gênicas.¹³ Em câncer gástrico, alguns estudos têm confirmado a expressão aumentada da proteína p53 em 26,3% a 60% dos casos, relacionada com prognóstico pobre e maior propensão a metástases em linfonodos adjacentes,^{14,15} e outros não.^{16,17}

A deleção é outro evento importante para a inativação da proteína p53. Gomyo *et al.*¹⁸ detectaram deleção do *TP53*, pela técnica de FISH, em 10/13 (77%) dos carcinomas gástricos e Takahashi *et al.*⁵ identificaram um desbalanço entre o número de cópias do gene *TP53* e

do cromossomo 17 em núcleos interfásicos de carcinomas de estômago e cólon, indicando a perda de heterozigosidade do loco do *TP53* em 17p.

A mutação ou a perda do gene *TP53* já foi relatada em áreas de metaplasia intestinal e displasia, em pacientes com câncer gástrico.^{18,19} Contudo, são inexistentes estudos com esse gene e a proteína p53 em lesões gástricas benignas oriundas de pacientes sem história de câncer gástrico. Portanto, foram investigadas a deleção do gene *TP53* e a expressão da proteína p53, utilizando-se as técnicas de FISH e imunistoquímica, respectivamente, em lesões benignas e adenocarcinomas gástricos, e a associação desses eventos com a infecção pelo *H. pylori* e outros parâmetros, que podem contribuir com informações importantes para a melhor compreensão das etapas iniciais da carcinogênese gástrica.

Material e Métodos

Material

Foram estudadas 76 amostras frescas (8 mucosas gástricas normais, 15 gastrites crônicas não-atróficas, 2 gastrites atróficas crônicas, 17 úlceras gástricas, 18 metaplasias intestinais e 16 adenocarcinomas gástricos), obtidas por endoscopia ou cirurgia gástrica. As amostras de lesões benignas e adenocarcinoma gástrico foram provenientes de 41 homens e 27 mulheres com idades entre 2 a 94 anos ($\bar{x} = 60,26$; $s = 20,8$

anos). As biópsias de mucosa gástrica histologicamente normal e *H. pylori* negativa utilizadas como controle foram coletadas do antro, de indivíduos sem história de câncer, sendo seis do sexo feminino e dois do sexo masculino, com idades entre 20 e 75 anos ($\bar{x} = 48,75$; $s = 18,1$ anos). A maioria dos indivíduos era de origem caucasóide (80%) e 20% era negróide. Todas as amostras foram coletadas no Serviço de Endoscopia ou no Centro de Cirurgia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP, Brazil. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (FAMERP) de São José do Rio Preto e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos os pacientes ou de seus responsáveis legais.

O diagnóstico histopatológico das lesões gástricas benignas e adenocarcinomas foi estabelecido em teste cego, por dois patologistas do Serviço de Patologia do Hospital de Base. Os adenocarcinomas foram classificados em tipo intestinal e tipo difuso segundo Lauren²⁰ e as gastrites e metaplasias intestinais de acordo com o Sistema de Sydney.²¹

A infecção pelo *H. pylori* foi inicialmente rastreada pela avaliação histológica (coloração com Giemsa) e confirmada molecularmente por PCR, utilizando os *primers* *H3H4* e *H5H6*, específicos para as regiões que codificam, respectivamente, uma proteína antigênica de superfície²² e a enzima urease A.²³



Imunoistoquímica

Foi realizada a partir de cortes histológicos de aproximadamente 4 μ m em lâminas silanizadas, que foram, primeiramente, desparafinadas e hidratadas. Após, sofreram uma recuperação antigênica, com incubação em solução tampão de citrato e, em seguida, passaram por um bloqueio de peroxidase endógena, com imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol. Posteriormente, foram incubadas durante 16 a 18 horas, em câmara úmida, com o anticorpo primário monoclonal DO-7 (Novocastra, Newcastle, UK), que reage com um epítopo entre os aminoácidos 1 e 45 da proteína p53, diluído 100 vezes em solução tampão PBS. Este anticorpo reconhece tanto a forma selvagem como a mutante da p53. Depois de serem estabilizadas em estufa a 57°C por 90 minutos, as lâminas foram novamente incubadas com o anticorpo secundário anti-Ig (Novocastra) e depois com o Kit ABC (Novocastra), ambas durante 30 minutos a 37°C. Em seguida, as lâminas foram reveladas em local escuro com 3'3-Diaminobenzidine (Acros) por cinco minutos, desidratadas e, em seguida, montadas para análise em microscópio óptico.

Como controle positivo foi utilizada uma amostra de carcinoma de tecido mamário com expressão elevada da proteína p53, gentilmente fornecida pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Foram contadas cerca de 500 células de cada amostra por dois observadores. A imunorreação, como critério de positividade, foi visualizada pela presença de pequenos grânulos de cor castanho no núcleo das células. Para a documentação fotográfica utilizou-se o filme Kodak Ultra ASA 400.

Hibridização *in situ* fluorescente - FISH

A suspensão nuclear de cada amostra a partir de tecido fresco foi obtida por desagregação mecânica, como descrito por Kuo *et al.*²⁴

Para a hibridização foi utilizada a sonda de sequência única (LSI) do gene *TP53*, associada à sonda alfa-centromérica (CEP) do cromossomo 17 (Vysis Inc.), marcadas com rodamina (*Spectrum Orange*) e digoxigenina (*Spectrum Green*), respectivamente. As lâminas foram desidratadas e banhadas em ácido acético 70% e 1XPBS. Posteriormente, foram tratadas com pepsina 0,008% e fixadas em formaldeído 4%. Foram novamente lavadas em 1XPBS, desidratadas e secas.

As lâminas com a solução de sonda diluída foram co-denaturadas em estufa a 80°C por 8 minutos e depois incubadas em câmara umedecida a 37°C, por um período que variou entre 16 a 48 horas (em média 20 horas). Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas para remoção do excesso de sonda, em uma solução 0,1%

NP40/2XSSC, desidratadas e secas. As lâminas hibridizadas receberam 10µL do contra-corante DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), em seguida, foram cobertas com lamínulas de vidro para posterior análise.

A análise microscópica foi realizada por dois pesquisadores que contaram de 200 a 300 núcleos em áreas diferentes do campo, em microscópio Olympus BMAX60. A concordância entre os dois observadores foi de 95%. Na análise de deleção do gene *TP53*, para cada amostra foi calculada a razão gene/centrômero (G/C), ou seja, o número total de sinais do gene observado em cada caso dividido pelo número total de sinais do centrômero. Para a documentação dos resultados foi utilizado o filme Elitechrome ASA 400 (Kodak).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando-se o teste de qui-quadrado (χ^2) de homogeneidade e o teste exato de Fisher, utilizando-se os programas *Statdisk V 8.1*²⁵ e *Statistica*²⁶, respectivamente. O nível de significância foi estabelecido para $p < 0,05$.

Resultados

Os resultados da análise de deleção e expressão do gene *TP53* estão sumarizados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente, para as mucosas gástricas normais (controle) e lesões gástricas benignas e adenocarcinomas gástricos.

Mucosa gástrica normal

Nas cinco amostras de mucosa gástrica histologicamente normais (grupo controle) em que investigou-se a deleção do gene *TP53*, foram observados dois sinais do centrômero 17 em 98,4% dos núcleos (variação de 98,2% a 98,9%), enquanto 96,0% deles (variação de 94,1% a 97,4%) apresentaram dois sinais do gene *TP53*. A ausência de um ou dois sinais do centrômero 17 e do gene *TP53*, respectivamente, foi encontrada em 1,6% e 3,3% dos núcleos, enquanto a presença de três sinais foi observada apenas para o gene *TP53*, em 0,7% dos núcleos. A razão média gene/centrômero foi igual a 0,98 (razão balanceada) com número igual de sinais do gene e do centrômero (Figura 1A). Portanto, estabeleceu-se como deleção os casos com razão G/C menor que 0,9.

Das oito amostras de mucosa gástrica avaliadas para a expressão da p53, em metade delas não foi detectado imunorreatividade da proteína p53 (Figura 2A). No entanto, na outra metade, observou-se uma marcação fraca em 0,2% a 4,0% dos núcleos, assim considerou-se como positivo os casos com mais de 10% dos núcleos imunocorados.

Gastrite crônica não-atrófica e atrófica

A avaliação de deleção do gene *TP53* em 15 gastrites crônicas não-atróficas e duas gastrites atróficas crônicas revelou cerca de 90% dos núcleos com dois sinais do centrômero 17 (variação de 89,4% a 98,9%) e do gene *TP53* (variação de 81,0% a 96,5%). Portanto, todas as

amostras apresentaram a razão gene/centrômero balanceada, com valor igual ou acima de 0,9 (variação de 0,90 a 0,98), não evidenciando deleção desse gene.

O acúmulo da proteína p53 foi detectado em 45% (5/11) dos casos de gastrite crônica (Figura 2B), com uma variação de 12% a 31,4% dos núcleos marcados fracamente. Nenhuma imunorreatividade foi encontrada nos casos de gastrite atrófica.

Úlcera gástrica

Em três das 17 amostras de úlcera gástrica em que investigou-se a deleção do gene *TP53*, em 95,8% dos núcleos (variação de 94,4% a 98,7%) observou-se dois sinais do centrômero 17, enquanto 93,7% deles (variação de 92,5% a 94,6%) apresentaram dois sinais do gene *TP53*. A ausência de um ou dois sinais do centrômero 17 e do gene *TP53*, respectivamente, foi encontrada em 1,9% e 6,3% dos núcleos, enquanto a presença de três e quatro sinais foi observada apenas para o centrômero 17, respectivamente, em 1,9% e 0,4% dos núcleos. A razão gene/centrômero variou de 0,94 a 0,97, portanto, nenhuma das amostras apresentou deleção.

A imunoistoquímica revelou expressão nuclear positiva da proteína p53 em 12% (2/17) dos casos (Figura 2C), com 14,6% e 47,2% dos núcleos marcados fracamente em cada caso.

Metaplasia intestinal

Das cinco de 18 amostras de metaplasia com avaliação da deleção do gene *TP53*, a presença de dois sinais do centrômero 17 ocorreu em 88,6% dos núcleos (variação de 85,5% a 91,0%), enquanto 78,3% deles (variação de 67,5% a 86,9%) apresentaram dois sinais do gene *TP53*. A ausência de um ou dois sinais do centrômero 17 e do gene *TP53* foi encontrada, respectivamente, em 4,5% e 21,1% dos núcleos. A presença de três ou mais sinais foi observada para o centrômero 17 e o gene *TP53*, respectivamente, em 9,7% e 21,1 dos núcleos. A razão gene/centrômero variou de 0,78 a 0,92, evidenciando, portanto, três casos (60%) com deleção do gene *TP53*.

A imunorreatividade positiva da proteína p53 foi detectada em 12% (2/17) das amostras, uma do tipo completo e outra do tipo incompleto, com marcação fraca de 13% e 20,8% dos núcleos (Figura 2D).

Adenocarcinoma gástrico

A análise da deleção do gene *TP53* foi realizada com sucesso, em 19% (3/16) dos casos (Tabela 2). Foram observados dois sinais do centrômero 17 e do gene *TP53*, respectivamente, em 74,8% (variação de 57,1% a 92,2%) e 65,2% (variação de 51,7% a 73,2%) dos núcleos. A ausência de um ou dois sinais do centrômero 17 foi observada em 2,4% dos núcleos, enquanto para o gene *TP53* foi encontrada em



32,7%. A presença de três ou mais sinais foi observada para o centrômero 17 e o gene *TP53*, respectivamente, em 22,8% e 2,0% dos núcleos. A razão gene/centrômero variou entre 0,60 a 0,81, evidenciando deleção do gene *TP53* (Figura 1B) nas três amostras.

A avaliação imunoistoquímica detectou o acúmulo positivo da proteína p53 em 12 dos 15 casos analisados (80%), com marcação forte em 15,6% a 90,4% dos núcleos (Figura 2E). Dos casos com expressão aumentada, 7/10 (70%) eram do tipo intestinal e 5/5 (100%) do tipo difuso. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes quanto à frequência de amostras imunopositivas entre os grupos de adenocarcinoma gástrico e mucosa gástrica normal ($p = 0,0007$) e, concomitantemente com todos os grupos de lesões benignas ($p = 0,0000$).

Em todas as amostras (lesões benignas e adenocarcinoma) não foi observada a presença de marcação inespecífica e citoplasmática, nem associação entre a expressão da p53 com parâmetros como sexo, idade, tabagismo, etilismo, localização no estômago, histologia, grau de diferenciação e infecção pelo *H. pylori*.

Discussão

Mutações no gene supressor de tumor *TP53* têm sido encontradas na maioria dos tumores malignos,¹³ inclusive no câncer gástrico^{27,28} e em linhagens celulares desse tipo de tumor.²⁹



Em lesões gástricas benignas, ainda são escassos ou inexistentes os estudos para avaliação imunoistoquímica da expressão da p53 e deleção do gene *TP53*. No estudo ora realizado, os grupos de gastrite crônica atrófica e não-atrófica e úlcera gástrica não apresentaram deleção do gene *TP53*. Contudo, a expressão nuclear positiva da proteína p53 foi observada em alguns casos de ambos os grupos, com intensidade fraca, e frequência cerca 2 a 3 vezes menor de núcleos marcados em relação aos adenocarcinomas, independente da infecção pelo *H. pylori*, semelhante ao observado por Lan *et al.*³⁰

Marinone *et al.*³¹ e Petersson *et al.*³² detectaram um nível elevado de p53 em lesões gástricas como gastrite e metaplasia intestinal, provavelmente, relacionado com a resposta inflamatória induzida pelo *H. pylori*. Por outro lado, Craanen *et al.*³³ não observaram o acúmulo nuclear da proteína p53 em mucosa gástrica normal, gastrite crônica e metaplasia intestinal.

Petersson *et al.*³² também observaram uma expressão maior da proteína no grupo com gastrite crônica moderada antral do que no grupo com gastrite superficial. De modo contrário, no presente estudo a imunorreatividade positiva foi similar tanto no grupo de gastrite crônica superficial (3/8 casos) como moderada (2/7 casos), não observando-se relação com a infecção pelo *H. pylori*.

Jones *et al.*³⁴ relacionaram o aumento da proliferação celular e apoptose em células epiteliais gástricas com a infecção precoce

pelo *H. pylori*, que aceleraria a renovação celular e a produção da proteína p53 selvagem. Alguns autores observaram uma frequência maior de mutações no gene *TP53* em pacientes com câncer gástrico *H. pylori* positivo¹⁶ ou ainda associada com a cepa *cagA* positiva,³⁵ enquanto o contrário também foi descrito.³⁶

Como neste estudo não foi encontrada uma associação entre a expressão aumentada da p53 e a presença do *H. pylori*, pode-se sugerir, que além da infecção por essa bactéria, outros fatores, endógenos e exógenos, relacionados ao estilo de vida e hábito alimentar, com ação irritativa para a mucosa gástrica, também estejam envolvidos com a produção excessiva da proteína p53 selvagem, principalmente nas amostras de gastrite crônica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal, que apresentaram imunomarcação de intensidade fraca. Acredita-se que produtos gênicos virais e proteínas celulares tenham a capacidade de estabilizar a proteína p53 selvagem, elevando deste modo, sua taxa de expressão.^{37,38}

Nas metaplasias intestinais analisadas, a deleção do gene *TP53* foi detectada em 3/5 (60%) dos casos e o acúmulo nuclear da proteína p53 em apenas 2/17 (12%). Contrariamente, Gomyo *et al.*¹⁸ não encontraram deleção desse gene em 20 casos de metaplasia, obtidos de pacientes com câncer gástrico. Como a marcação da proteína p53 foi fraca nos dois casos do presente estudo, pode-se supor que seja devido tanto a expressão da proteína selvagem como mutada, já que alguns

estudos em metaplasia intestinal evidenciaram mutações no gene *TP53*.

15,19

Em adenocarcinoma gástrico, os três casos analisados apresentaram deleção do gene *TP53* e, em dois deles, do tipo intestinal e *H. pylori* positivos, também foi observada a expressão elevada da proteína p53. Sabe-se que o acúmulo nuclear dessa proteína ocorre principalmente devido a mutações *missense* que produzem a forma alterada com vida média prolongada,^{39,40} e não como consequência de deleção. No entanto, a deleção pode ocorrer como um segundo evento, levando à perda do alelo normal.^{5,40}

A deleção do *TP53* tem sido freqüentemente descrita em câncer gástrico, algumas vezes associada com trissomia/polissomia do cromossomo 17^{5,41} ou monossomia desse cromossomo.⁴² Nos adenocarcinomas ora avaliados, dois casos apresentaram trissomia/tetrassomia 17 e superexpressão da proteína p53. Nesses tumores, o alelo selvagem do gene *TP53* poderia ainda permanecer ativo, mesmo que um alelo sofresse mutação de ponto e o outro a deleção. Provavelmente, a proteína p53 mutante poderia atuar de modo negativo e dominante, competindo e inativando a p53 normal.⁴²

A expressão elevada da proteína p53 tem sido correlacionada com prognóstico pobre do câncer gástrico na população ocidental,⁴³ contudo esses resultados não foram confirmados na população oriental,¹² possivelmente em decorrência do tipo de mutação.

No presente estudo, a imunorreatividade nuclear positiva da p53 foi observada em 87% (13/15) dos adenocarcinomas gástricos, a maioria deles avançados (estádios III e IV). Todavia, não foi constatada associação da expressão da p53 com outros parâmetros como sexo, idade, tabagismo, etilismo, infecção pelo *H. pylori*, localização no estômago, tipo histológico e grau de diferenciação, como já relatado em estudos anteriores.^{44,45} No entanto, outros relatos associaram mutações e/ou expressão elevada do gene *TP53* com a região da cárdia,⁴⁶ o estágio tumoral, o tamanho do tumor e a redução do tempo de sobrevivência dos pacientes.⁴⁷

Conclusões

A deleção do gene *TP53* e a superexpressão da proteína p53 parecem ser eventos precoces em lesões gástricas, ocorrendo em pacientes com metaplasia intestinal sem história de câncer e em adenocarcinoma. Portanto, esses achados confirmam a participação de alterações no gene *TP53* nas etapas iniciais da carcinogênese gástrica, podendo ser utilizadas como indicadores de maior risco de malignidade.

Referências bibliográficas

1. Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000;35:111-5.
2. Yasui W, Oue N, Kuniyasu H, Ito R, Tahara E, Yokozaki H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer* 2001;4:113-21.
3. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-456.
4. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth, and division. *Cell* 1997;88:323-31.
5. Takahashi Y, Nagata T, Sataoshi A, Shintaku K, Eguchi T, Ishii Y, Fujii M, Ishikawa K. Detection of aberrations of 17p and p53 gene in gastrointestinal cancers by dual (two-color) fluorescence in situ hybridization and genechip p53 assay. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;121: 38-43.
6. Shibata A, Parsonnet J, Longacre TA, Garcia MI, Puligandla B, Davis RE, Vogelmann JH, Orentreich N, Habel LA. CagA status of *Helicobacter pylori* infection and p53 gene mutations in gastric adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2002;23:419-24.
7. Smith ML, Fornace AJ Jr. Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Genet Dev* 1995;7:69-75.
8. Hollstein MC, Peri L, Mandard AM, Welsh JA, Montesano R, Metcalf RA, Bak M, Harris CC. Genetic analysis of human esophageal tumors from two high incidence geographic areas: frequent p53 base substitutions and absence of ras mutations. *Cancer Res* 1991;51:4102-4106.
9. Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitadai Y. p53 mutations in primary human gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992;119:67-70.
10. Ranzani GN, Luinetti O, Padovan LS, Calistri D, Renault B, Burrell M, Amadori D, Fiocca R, Solcia E. p53 gene mutations and protein nuclear



accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:223-31.

11. Kubicka S, Claas C, Staab S, Kühnel F, Zender L, Trautwein C, Wagner S, Rudolph KL, Manns M. p53 mutation pattern and expression of c-erbB2 and c-met in gastric cancer: relation to histological subtypes, *Helicobacter pylori* infection, and prognosis. *Dig Dis Sci* 2002;47:114-21.

12. Tsuji S, Tsujii M, Sun WH, Gunawan ES, Murata H, Kawano S, Hori M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J Clin Gastroenterol* 1997;25:186-197.

13. Alves VAF, Bacchi CR, Vassalo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

14. Maehara Y, Tomoda M, Hasuda S, Kabashima A, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Prognostic value of p53 protein expression for patients with gastric cancer – a multivariate analysis. *Br J Cancer* 1999;79:1255-61.

15. Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-13.

16. Sasano H, Date F, Imatani A, Asaki S, Nagura H. Double immunostaining for c-erbB2 and p53 in human stomach cancer cells. *Hum Pathol* 1993;24:584-9.

17. Shun CT, Wu MS, Lin JT, Chen SY, Wang HP, Lee WJ, Wang TH, Chuang SM. Relationship of p53 and c-erbB2 expression to histopathological features, *Helicobacter pylori* infection and prognosis in gastric cancer. *Hepato-Gastroenterol* 1997;44:604-9.

18. Gomyo Y, Osaki M, Kaibara N, Ito H. Numerical aberration and point mutations of p53 gene in human gastric intestinal metaplasia and well-differentiated adenocarcinoma: analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) and PCR-SSCP. *Int J Cancer* 1996;66:594-9.

19. Shiao YH, Rugge M, Correa P, Lehmann HP, Scheer WD. p53 alteration in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol* 1994;144:511-7.

20. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31-9.
21. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney Sistem. International workshop on the histopathology of gastritis. Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-81.
22. Hammar M, Tysabewicz T, Wadstrom T, O'Toole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;38:54-8.
23. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:192-200.
24. Kuo KL, Pimentel D. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with biotinylated DNA painting probes. Symposium Fourth International Workshop on Chromosomes of Solid Tumors. Tucson, AZ (USA), feb.24-26, p.1-4, 1991.
25. Triola, MF. Statdisk V 8.1. 8th ed., Addison Wesley Longman, Inc.; 2001.
26. Petrere Jr, M. Statistica. Stat Soft Inc.; 1993.
27. Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, Kinoshita T, Sasako M, Saito T, Kobayahi M, Hirohashi S. Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer its correlation with long-term survival of patients. *Cancer* 1993;72:3179-84.
28. Joypaul BV, Newman EL, Hopwood D, Grant A, Qureshi S, Lane DP, Cuschieri A. Expression of p53 protein in normal, dysplastic, and malignant gastric mucosa: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1993;170:279-283.
29. Matozaki T, Sakamoto C, Matsuda K. Missense mutations and a deletion of the p53 gene in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:215-223.



30. Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58.
31. Marinone C, Martinetti A, Mestriner M, Seregini E, Geuna M, Ferrari L, Strola G, Bonardi L, Fea E, Bombardieri E. p53 Evaluation in gastric mucosa of patients with chronic *Helicobacter pylori* infection. *Anticancer Res* 2001;21:1115-1118.
32. Petersson F, Borch K, Franzen LE. Gastric epithelial proliferation and p53 and p21 expression in a general population sample. *Dig Dis Sci* 2002;47:1558-1566.
33. Craanen ME, Blok P, Dekker W, Offerhaus GJA, Tytgat GNJ. Chronology of p53 protein accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1995;36:848-52.
34. Jones NJ, Shannon PT, Cutz E, Yeger H, Sherman PM. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Pathol* 1997;151:1695-1703.
35. Deguchi R, Takagi A, Kawata H, Inoko H, Miwa T. Association between CagA+ *Helicobacter pylori* infection and p53, bax and transforming growth factor-beta-RII gene mutations in gastric cancer patients. *Int J Cancer* 2001;91:481-5.
36. Hongyo T, Buzard GS, Palli D, Weghorst CM, Amorosi A, Galli M, Caporaso NE, Fraumeni JF Jr, Rice JM. Mutations of the K-ras and p53 genes in gastric adenocarcinoma from a high incidence region around Florence, Italy. *Cancer Res* 1995;55:2665-72.
37. Chang F, Syrjänen S, Kurvinen K, Syrjänen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993;88:174-86.
38. Hall PA, Lane DP. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? *J Pathol* 1994;172:1-4.

39. Stemmermann G, Heffelfinger SC, Noffsinger A, Hui YZ, Miller MA, Fenoglio-Preiser CM. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: oncogenes, tumor suppressor genes, and growth factors. *Hum Pathol* 1994;25:968-981.
40. Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Ujr, Sakai P, Clarke MR, Fylyk SN, Ishioka S, Gama-Rodrigues J, Finkelstein SD, Reynolds JC. Integrated p53 histopathologic/genetic analysis of premalignant lesions of the esophagus. *Cancer Detect Prev* 2000;24:13-23.
41. Kobayashi M, Kawashima A, Mai M, Ooi A. Analysis of chromosome 17p13 (p53 locus) alterations in gastric carcinoma cells by dual-color fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 1996;149:1575-84.
42. Chene P. In vitro analysis of the dominant negative effect of p53 mutants. *J Mol Biol* 1998;281:205-209.
43. Roviello F, Marrelli D, Vindigni C, De Stefano A, Spina D, Pinto E. P53 accumulation is a prognostic factor in intestinal-type gastric carcinoma but not in diffuse type. *Ann Surg Oncol* 1999;6:739-745.
44. Fonseca L, Yonemura Y, De Aretxabala X, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I. p53 detection as a prognostic factor in early gastric cancer. *Oncology* 1994;51:485-490.
45. Ioachim E, Goussia A, Stefanou D, Agnantis NJ. Expression of p53 protein in gastric câncer: an immunohistochemical study with correlation to proliferation activity. *Anticancer Res* 1997;17:513-7.
46. Gleeson CM, Sloan JM, McManus DT, Maxwell P, Arthur K, McGuigan JA, Ritchie AJ, Russel SE. Comparison of p53 and DNA content abnormalities in adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia. *Br J Cancer* 1998;77:277-286.
47. Starzynska T, Markiewski M, Domagala W, Marlicz K, Mietkiewski J, Roberts SA, Stern PL. The clinical significance of p53 accumulation in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77:2005-12.

Tabela 1 – Resultados da deleção e expressão do gene *TP53* nas amostras de mucosa gástrica normal, gastrite crônica não-atrófica e atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal.

Caso	Sexo/ Idade	Tabagismo/ Etilismo	<i>H. pylori</i>	Histologia	Localização	Deleção <i>TP53</i> (G/C < 0,9)	Imuno p53 (> 10%)
Mucosa gástrica							
MGN01	M/35	-/-	-	Normal	Antro	0,98	0,2
MGN02	F/58	-/-	-	Normal	Antro	0,97	0
MGN03	F/75	-/-	-	Normal	Antro	0,98	0
MGN04	M/38	-/-	-	Normal	Antro	0,99	0
MGN05	F/20	-/-	-	Normal	Antro	0,99	0
MGN06	F/56	-/-	-	Normal	Antro	*	2,4
MGN07	F/66	-/-	-	Normal	Antro	*	4,0
MGN08	F/42	-/-	-	Normal	Antro	*	0,4
Gastrite crônica							
GCS01	F/22	-/-	-	superficial	Antro	0,93	2,0
GCS05	M/10	-/-	-	superficial	Antro	0,98	0,8
GCS06	M/02	-/-	-	superficial	Antro/fundo	0,97	15,6
GCS09	F/02	-/-	-	superficial	Fundo	0,95	0
GCS11	F/40	+/-	-	superficial	Antro	0,98	*
GCS13	F/56	+/-	+	superficial	Fundo	0,95	31,4
GCS14	F/36	+/-	+	superficial	Antro	0,94	0
GCS16	M/89	+/+	+	superficial	Fundo	0,98	12,0
GCM02	F/54	-/+	-	moderada	Antro	0,90	15,0
GCM05	M/60	+/+	+	moderada	Antro	0,96	*
GCM06	F/48	-/-	+	moderada	Antro	0,94	*
GCM14	M/44	+/-	+	moderada	Antro	0,95	*
GCM15	F/47	+/-	+	moderada	Antro	0,96	5,6
GCM16	F/57	-/-	+	moderada	Antro	0,96	12,8
GCM19	F/58	-/-	+	moderada	Antro	0,96	0,8
GAC03	M/80	+/-	-	atrófica	Fundo	0,90	2,2
GAC09	M/52	+/+	+	atrófica	Antro	0,93	3,6
Úlcera gástrica							
UG01	M/79	-/+	-		Antro	0,94	0
UG02	M/73	+/+	-		Antro	*	0,8
UG03	M/52	+/+	-		Antro	*	47,2
UG04	M/78	+/+	-	MIC/MII	Antro	*	9,6
UG05	M/64	+/+	-		Antro	*	0,8
UG06	F/51	*	+		Antro	*	0
UG07	M/63	+/+	+		Antro	*	1,2
UG08	M/71	+/+	+		Antro	*	0
UG09	F/72	-/-	+		Antro	0,97	14,6
UG10	M/28	+/+	+		Antro	*	6,0
UG11	M/68	+/+	+		Antro	0,95	0,8
UG12	F/83	-/-	+		Antro	*	3,2
UG13	M/48	+/+	+		Antro	*	0
UG14	F/82	-/-	+		Antro	*	1,2
UG15	F/45	-/-	+		Antro	*	6,4
UG16	M/71	+/+	+	MIC	Antro	*	0
UG17	M/63	+/+	+		Antro	*	0

Metaplasia intestinal

MI01	F/50	-/-	-	MICf	Antro	*	2,6
MI02	F/54	+/-	-	MICf	Antro	0,90	0
MI04	M/75	-/+	-	MIC	Antro	0,92	0,6
MI05	M/74	+/+	-	MIC	Antro	0,86	13,0
MI06	M/72	+/+	-	MIC	Antro	*	1,2
MI09	M/58	+/+	+	MICf	Antro	*	0
MI10	F/70	-/-	+	MIC	Antro	*	0,4
MI21	F/91	+/-	+	MIC	Antro	*	2,2
MI07	F/73	+/+	-	MII	Antro	*	0,8
MI08	F/46	+/-	+	MII	Antro	*	0
MI12	M/73	-/-	+	MII	Antro	*	0,4
MI13	F/80	-/-	+	MII	Antro	*	20,8
MI14	M/94	+/+	+	MII	Antro	*	3,4
MI15	M/22	-/-	+	MII	Antro	*	0,2
MI17	M/75	+/-	+	MII	Antro	*	0
MI11	F/68	-/-	+	MIC/MII	Antro	0,78	0,8
MI16	F/61	+/+	+	MIC/MII	Antro	*	10,0
MI18	M/47	+/+	+	MIC/MII	Antro	0,78	*

M= masculino; F= feminino; - = negativo; + = positivo; MIC=metaplasia completa; MICf= metaplasia completa focal; MII= metaplasia incompleta; MII f= metaplasia incompleta focal; * = dado não analisado.

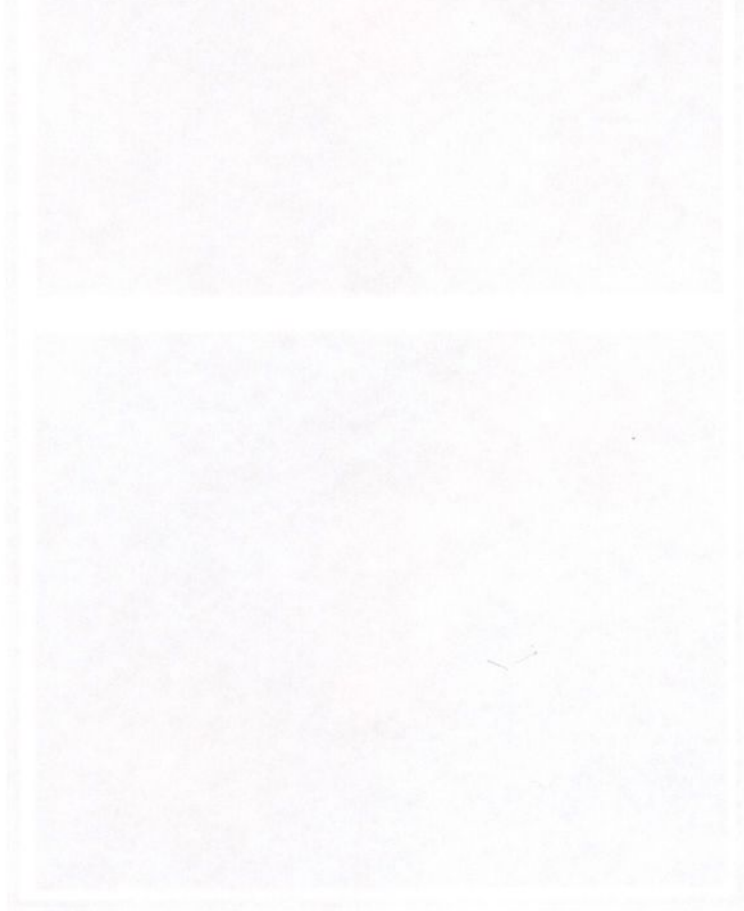
Tabela 2 - Resultados da deleção e expressão do gene TP53 nas amostras de adenocarcinoma gástrico.

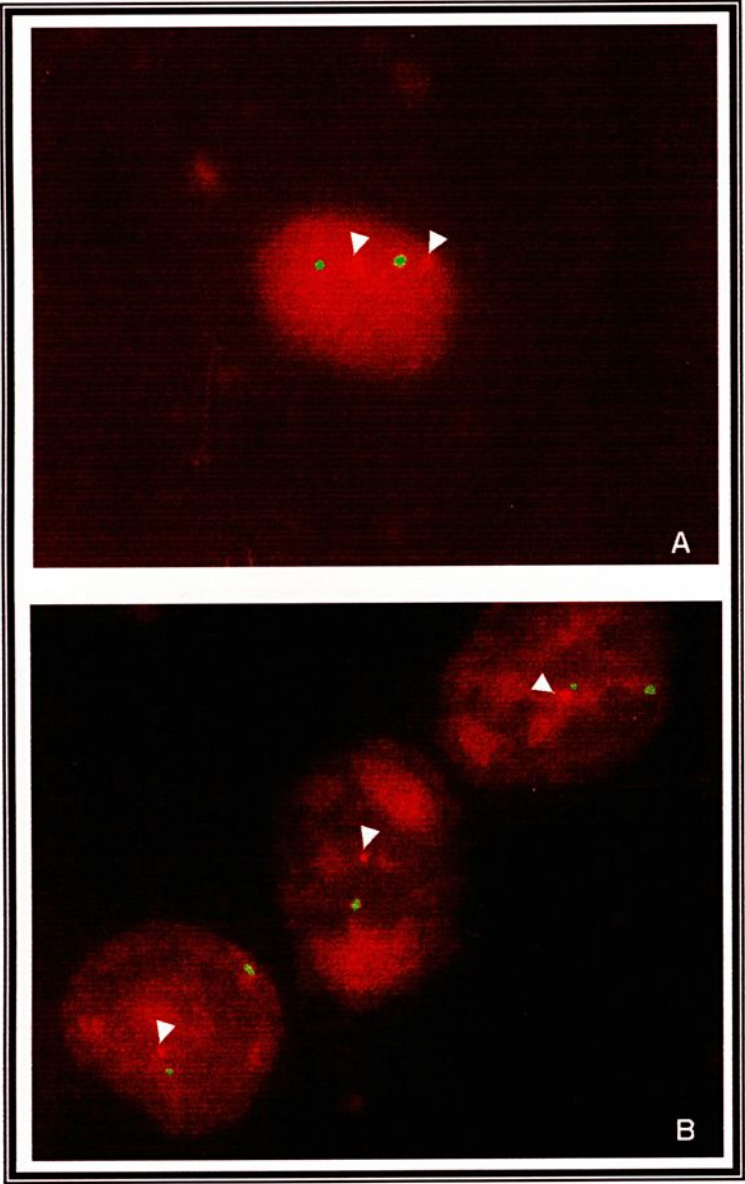
Caso	Sexo/ Idade	Tabagismo/ Etilismo	H. pylori	TNM estadio	Localização	Deleção TP53 (G/C < 0,9)	Imuno p53 (> 10%)
Intestinal							
CG04	M/63	+/+	-	T4N1Mx/IV	A/C	*	15,6
CG05	M/62	+/+	-	φ	F/C	*	20,8
CG06	M/66	+/+	-	TxNxM1/IV	A	*	2,0
CG07	M/51	+/+	-	T4N1Mx/IV	A	*	49,0
CG08	F/86	-/-	+	φ	F	0,81	88,2
CG09	M/76	+/+	+	T3N0M0/II	A	0,80	22,1
CG10	M/86	+/-	+	T3N1M1/IV	A/C	*	22,4
CG15	M/77	+/+	+	TxNxM1/IV	A/C	*	90,4
CG18	M/44	+/+	+	φ	A	*	0
CG20	F/38	-/-	+	T3N1M1/IV	A	*	5,8
Difuso							
CG01	M/71	+/-	-	φ	Ca	*	88,4
CG11	F/28	-/-	+	T3N0M0/II	A	0,60	*
CG12	M/83	+/+	+	T4N2/IV	A/C/F	*	32,8
CG13	M/71	+/+	+	T3N1/III	Ca/C	*	85,8
CG14	M/72	+/+	+	φ	A/C	*	21,4
CG17	M/93	+/+	+	φ	F/C	*	86,4

M= masculino; F= feminino; - = negativo; + = positivo; A= antro; Ca= cárdia; C= corpo; F= fundo; * = dado não analisado; φ = dado não disponível.

Legenda:

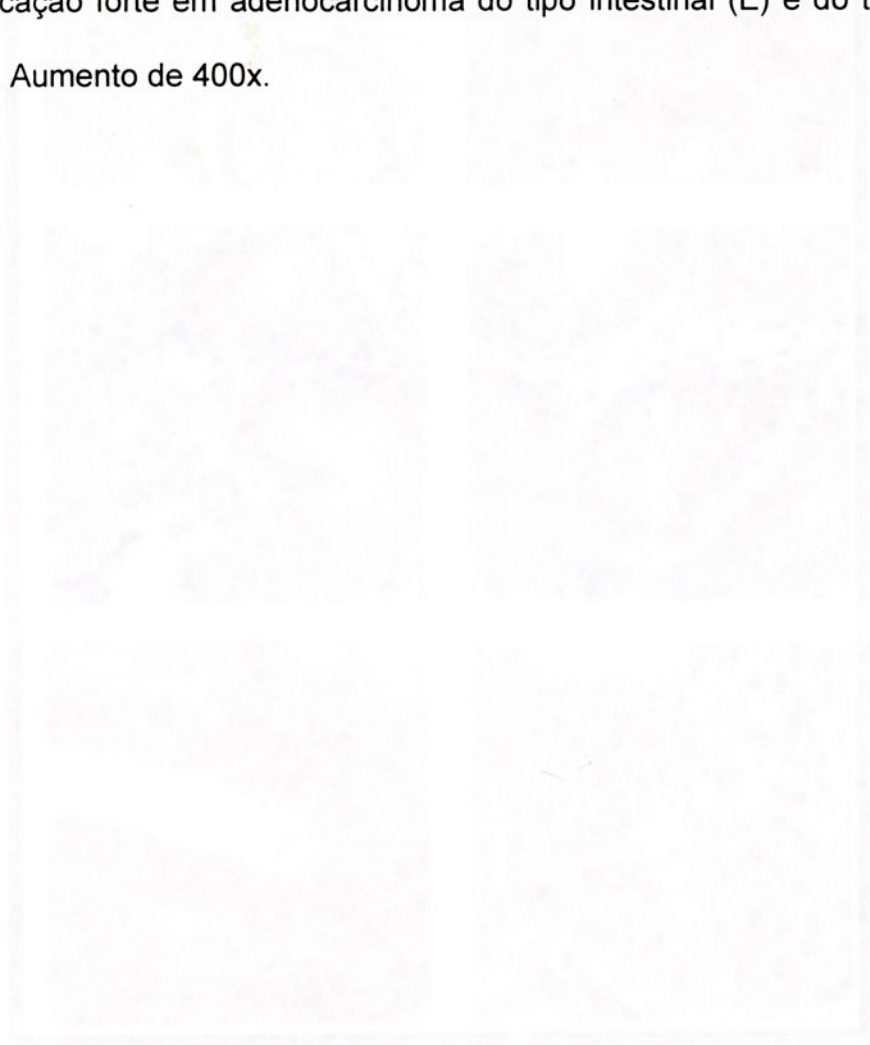
Figura 1 - Fotomicrografias de núcleos interfásicos evidenciando dois sinais do gene *TP53* (vermelho) e dois sinais do centrômero do cromossomo 17 (verde) em mucosa gástrica normal (A). Em adenocarcinoma gástrico, dois núcleos com deleção do gene *TP53* e um núcleo com monossomia do 17 (B). Os sinais do gene estão indicados pelas setas.

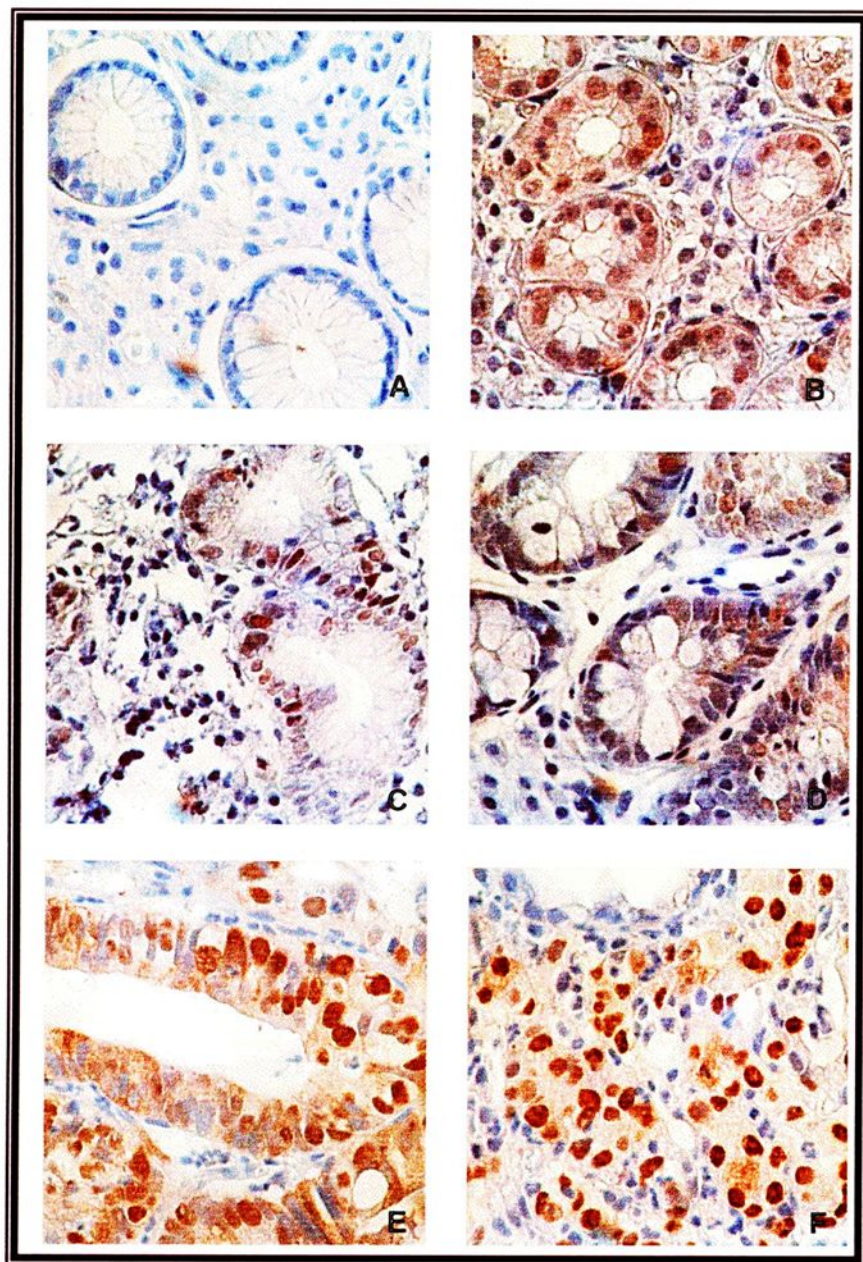




Legenda:

Figura 2 A-F – Imunoistoquímica da proteína p53 em cortes histológicos: ausência de marcação em mucosa gástrica normal (A); marcação fraca da p53 em gastrite crônica (B), úlcera gástrica (C) e metaplasia intestinal (D) e marcação forte em adenocarcinoma do tipo intestinal (E) e do tipo difuso (F). Aumento de 400x.





Discussão

As atividades de ensino e pesquisa em Física são fundamentais para a formação de profissionais e para o avanço da ciência. No entanto, a prática docente enfrenta diversos desafios, como a necessidade de atualização constante e a busca por metodologias inovadoras. A discussão aqui apresentada visa refletir sobre essas questões e propor caminhos para a melhoria da qualidade do ensino e da pesquisa em Física.

Um dos principais desafios enfrentados pelos professores de Física é a falta de formação continuada. Muitos docentes atuam há muitos anos sem ter tido a oportunidade de se atualizar em relação às novas descobertas e metodologias de ensino. Além disso, a carga horária reduzida para o planejamento e a execução de aulas também contribui para essa situação. É fundamental que as instituições de ensino ofereçam programas de formação continuada que atendam às necessidades dos docentes e que sejam integrados ao processo de trabalho.

Outro ponto importante a ser discutido é a necessidade de uma mudança na cultura institucional. Muitas vezes, o ensino e a pesquisa são tratados como atividades separadas, quando na verdade devem estar interligados. É preciso criar um ambiente que incentive a colaboração entre os docentes e que valorize tanto o ensino quanto a pesquisa. Além disso, é importante estabelecer mecanismos de avaliação que considerem o impacto do ensino e da pesquisa na formação dos alunos e no avanço da ciência.

Capítulo cinco

DISCUSSÃO

Apesar do declínio no número de casos de câncer gástrico nas últimas décadas, ele continua apresentando taxas elevadas de incidência e mortalidade mundialmente. No Brasil, aparece como a segunda causa de óbito entre os homens e a terceira entre as mulheres (INCA, 2002). Diferentes fatores, como dieta rica em sal, alimentos defumados, enlatados, consumo de álcool e tabaco, gastrectomia anterior, infecção por *Helicobacter pylori* e a predisposição genética, contribuem para o surgimento de alterações genotípicas (Guan *et al.*, 2000) e fenotípicas, que estão associadas com uma seqüência de eventos que incluem a gastrite crônica não-atrófica e atrófica, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, o câncer gástrico (Correa, 1992; Guarner *et al.*, 2001).

No trabalho ora realizado, as técnicas de FISH e imunoistoquímica foram empregadas no estudo de aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17, da deleção do gene *TP53* e expressão da proteína p53, em lesões gástricas benignas (gastrite crônica não-atrófica e atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal) e adenocarcinoma gástrico, e possível associação de tais alterações com a infecção pelo *H. pylori*. Estudos genéticos em lesões gástricas benignas ainda são escassos na literatura, principalmente em úlcera gástrica. Portanto, achados genéticos em lesões benignas poderão contribuir com novas formas de detecção precoce do câncer gástrico, cujo diagnóstico acontece em estágios avançados.

Considerando-se como referência o diagnóstico molecular para infecção pelo *H. pylori*, que mostrou-se mais sensível do que o histológico, principalmente, nas amostras de metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico, pode-se constatar a ocorrência de aneuploidias principalmente nas amostras *H. pylori* positivas de gastrite atrófica crônica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal. Nos grupos de gastrite

crônica não-atrófica e adenocarcinoma gástrico não foi observada associação entre essas variáveis. O mesmo foi observado por Van Grieken *et al.* (2000) em amostras de câncer gástrico avaliadas pela técnica de Hibridização Genômica Comparativa (CGH), que também não encontraram associação considerando-se o tipo de cepa do *H. pylori* (*cagA*, *vacA* e *iceA*). Acredita-se que o *H. pylori* atue nas fases iniciais da carcinogênese gástrica, provocando o surgimento do processo inflamatório (Yasui *et al.*, 2001).

O grupo de gastrite crônica (atrófica e não-atrófica) apresentou uma frequência baixa de aneuploidias envolvendo todos os cromossomos avaliados (23%), quando comparado aos de úlcera gástrica (62%), metaplasia intestinal (71%) e adenocarcinoma gástrico (100%). A deleção do gene *TP53* foi observada apenas no grupo de metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico e a expressão elevada da proteína p53 foi encontrada em frequência menor e intensidade mais fraca nos grupos de lesões gástricas benignas (gastrite crônica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal), em relação as amostras de adenocarcinoma gástrico, que apresentaram imunorreação positiva forte.

Em gastrite crônica não-atrófica e atrófica, as principais aneuploidias identificadas foram a monossomia e trissomia do cromossomo 7 e trissomias 7 e 8, respectivamente. Em ambos os grupos, não foi detectada a deleção do gene *TP53*, entretanto, o acúmulo nuclear da proteína p53 foi observado apenas nas gastrites crônicas não-atróficas (45% dos casos).

Nesse tipo de lesões, alguns poucos estudos têm relatado aneuploidias em 5,2% e 8,5% dos casos de gastrite crônica não-atrófica e atrófica, respectivamente (Weiss *et al.*, 1989). Teodori *et al.* (1984) encontraram subpopulações de células com DNA aneuplóide em 45% das amostras de gastrite com atrofia, enquanto Abdel-Wahab *et al.* (1996) observaram alterações numéricas em 18,8%. Apesar das discrepâncias, a

taxa de aneuploidias detectadas em gastrite no presente estudo, encontra-se na faixa de variação relatada na literatura.

A análise da deleção do gene *TP53* em gastrites crônicas era inexistente, até o momento. Entretanto, há algumas informações da expressão da proteína p53. Enquanto, Craanen *et al.* (1995) não observaram acúmulo nuclear da proteína p53 em mucosa gástrica normal, gastrite crônica e metaplasia intestinal, Marinone *et al.* (2001) e Lan *et al.* (2003) detectaram a expressão de p53 em lesões gástricas benignas e malignas, sendo que apenas os primeiros autores relacionaram com a resposta inflamatória induzida pelo *H. pylori*, principalmente, com a cepa cagA positiva, contudo, não foram detectadas mutações no *TP53*.

Nas úlceras gástricas, as aneuploidias mais comuns foram as trissomias dos cromossomos 7 e 17 e nenhuma amostra evidenciou a deleção do gene *TP53*. Entretanto, 12% (2/17) dos casos apresentaram imunorreatividade positiva da proteína p53. A progressão maligna de úlceras gástricas tem sido raramente descrita na literatura (Ellis *et al.*, 1979; Nagavo, 1986; Lee *et al.*, 1990), da mesma forma que sua coexistência com neoplasia gástrica (Yamagata & Hisamichi, 1979) e aumento do risco de câncer gástrico em pacientes com úlcera (Lee *et al.*, 1990).

Em metaplasia intestinal, considerada como uma lesão pré-cancerosa, a frequência de aneuploidias foi superior ao observado em úlceras gástricas apresentando principalmente trissomias dos cromossomos 7 e 9 no tipo completo e no incompleto, também as trissomias 8 e 17. A deleção do gene *TP53* foi observada em 60% (3/5) dos casos avaliados e a expressão da proteína p53 foi positiva em 12% (2/17) das amostras.

Lesões pré-cancerosas, como metaplasia intestinal e adenoma, apresentam várias alterações genéticas similares às encontrada em tumores gástricos bem diferenciados, ou seja, do tipo intestinal (Kobayashi *et al.*, 2000; Yasui *et al.*, 2001). Muitas dessas

alterações genéticas são detectadas, principalmente na metaplasia do tipo incompleto, sem ainda apresentar nenhuma mudança morfológica. A análise molecular dos casos de metaplasia intestinal poderá permitir um diagnóstico precoce do câncer gástrico, já que mutações nos genes *TP53*, *APC* ou *K-RAS* têm sido relatadas com frequência menor nessas lesões (Ochiai *et al.*, 1996). Cerca de 30% dos casos de metaplasia apresenta fraca, mas significativa atividade da telomerase, sugerindo a existência de hiperplasia das células basais ou a imortalização precoce de algumas células somáticas (Yokozaki *et al.*, 2001). Algumas metaplasias, ainda apresentam a hipermetilação da ilha CpG de genes de reparo como *hMLH1* e a redução de sua expressão, favorecendo a instabilidade genética e a progressão maligna (Yasui *et al.*, 2001). A instabilidade de microsatélites foi coincidente entre as metaplasias intestinais e os tumores gástricos malignos, originados dos mesmos pacientes (Kobayashi *et al.*, 2000). Estes estudos reforçam o argumento que esse tipo de lesão, quando manifesta alterações genéticas, pode ser um precursor do adenocarcinoma do tipo intestinal, pois ambos apresentam alterações moleculares similares, e podem ter evoluído conjuntamente.

Deleção do gene *TP53* não foi observada em metaplasia intestinal (Gomyo *et al.*, 1996). Entretanto, Ochiai *et al.* (1996) detectaram mutações desse gene em áreas de metaplasia intestinal, especialmente no tipo incompleta, encontradas em 74% dos pacientes com câncer gástrico, indicando que lesões metaplásicas com mutações do *TP53* aumentam o risco de câncer.

A análise imunoistoquímica deste estudo revelou acúmulo nuclear da proteína p53 em uma amostra de metaplasia intestinal completa, *H. pylori* negativa, na qual também foi detectada a deleção do gene *TP53*, e em outro caso de metaplasia intestinal incompleta, *H. pylori* positivo, com imunorreatividade positiva da p53. Em ambos, devido a marcação fraca, supõem-se que a proteína p53 expressa possa ser do tipo selvagem e/ou mutada, já que alguns estudos em metaplasia

intestinal evidenciaram a presença de mutações no gene *TP53* (Shiao *et al.*, 1994; Ranzani *et al.*, 1995; Ochiai *et al.*, 2000).

Nas amostras de gastrite crônica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal não constatou-se uma associação entre a expressão aumentada da p53 e a presença do *H. pylori*, podendo-se sugerir, que além dessa bactéria, outros fatores, endógenos e exógenos, relacionados ao estilo de vida e hábito alimentar, com ação irritativa para a mucosa gástrica, também estejam envolvidos com a produção excessiva da proteína p53 selvagem. Acredita-se que produtos gênicos virais e proteínas celulares tenham a capacidade de estabilizar a proteína p53 selvagem, elevando deste modo, sua taxa de expressão (Chang *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1994).

Nos adenocarcinomas gástricos, a frequência de aneuploidias foi superior ao observado em metaplasia, ocorrendo principalmente, trissomias e tetrassomias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17. A deleção do gene *TP53* e o acúmulo nuclear da proteína p53 foram observados em todas as três amostras analisadas e em 12 dos 15 casos, respectivamente.

Aneuploidias dos cromossomos 7, 8 e 17 têm sido freqüentemente relatadas em adenocarcinomas gástricos (Gomyo *et al.*, 1995; Han *et al.*, 1996; Yadav *et al.*, 1996; Beuzen *et al.*, 2000; Kitayama *et al.*, 2000). A trissomia 7, em neoplasias gástricas, é uma alteração comum (Espinoza *et al.*, 1999; Okada *et al.*, 2000; Chun *et al.*, 2000; Kitayama *et al.*, 2000), podendo estar envolvida nos estádios iniciais da transformação genética desses tumores, conferindo vantagens para o crescimento de alguns clones celulares anormais (Sainsbury *et al.*, 1985). Esse cromossomo contém genes que expressam receptores e fatores de crescimento, como *EGF-R*, *HGF* e *HGF-R* (Weidner *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1993), e o oncogene *c-MET*, alguns dos quais quando expressos em taxas elevadas podem estar envolvidos com a gênese e a progressão do câncer gástrico (Tahara, 1993; Tarasova *et al.*, 1996).



A trissomia 8 e a amplificação da região 8q24, que contém o oncogene *c-MYC*, têm sido observadas em vários tipos de tumores, inclusive no câncer gástrico (Takahashi *et al.*, 1998; Beuzen *et al.*, 2000), no qual exerce um papel importante no processo de diferenciação (Suzuki *et al.*, 1997). Geralmente, a amplificação do oncogene *c-MET* ocorre concomitantemente com a do *c-MYC* em carcinomas gástricos (Seruca *et al.*, 1995) e, parece haver uma correlação entre a amplificação destes genes e o estadio clínico e prognóstico da lesão (Kuniyasu *et al.* 1992).

Neste estudo a aneuploidia do cromossomo 3 não foi um evento comum nas amostras avaliadas, sendo observada principalmente nas amostras de adenocarcinoma gástrico (57,1%). A trissomia 3 foi detectada na linhagem celular TMK-1 de carcinoma gástrico (Ito *et al.*, 1989) e em 50% ou mais dos linfomas gástricos (Blanco *et al.*, 1999), sendo considerada uma das principais alterações nesse tipo de câncer. Guan *et al.* (2000) detectaram o ganho da região 3q em 31% dos casos de tumores gástricos estudados. O ganho das regiões 3q e 13q foi também observado em adenocarcinoma da junção gastroesofágica (van Dekken *et al.*, 1999), entretanto, o mesmo não foi encontrado em outros estudos com câncer gástrico (Kokkola *et al.*, 1997; Nessling *et al.*, 1998; Sakakura *et al.*, 1999). Possivelmente, as regiões 3q e 13q22 abriguem oncogenes que podem ter um papel importante na carcinogênese gástrica (Guan *et al.*, 2000).

A trissomia do cromossomo 9 foi observada, principalmente, nos grupos de metaplasia intestinal completa e adenocarcinoma gástrico. O ganho das regiões 9p22-pter e 9p32-33 tem sido observado em tumores gástricos indiferenciados e em estadios avançados, respectivamente (Han *et al.*, 1996; Koizumi *et al.*, 1997). No cromossomo 9 também estão localizados os genes supressores de tumor *p16* (*CDKN2A*, *MTS1*) e *p15* (*CDKN2B*), ambos localizados na região 9p21, os quais regulam o ciclo celular, porém, raramente a deleção dessa região

têm sido observada em adenocarcinomas gástricos (Hayashi *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998).

Na região 17q12-21.32 localiza-se o oncogene *c-ERBB-2* (*HER-2-neu*) relacionado com o crescimento e diferenciação celular, sendo que a expressão elevada de sua proteína está associada com fenótipo tumoral mais agressivo (Yonemura *et al.*, 1991; Uchino *et al.*, 1993), enquanto outros têm associado com um prognóstico bom em câncer gástrico (Jain *et al.* 1991; Hilton & Wesk, 1992).

Em adenocarcinoma gástrico, os três casos analisados apresentaram deleção do gene *TP53*. A mutação ou a perda desse gene é um evento inicial na tumorigênese gástrica e tem sido observada em lesões benignas ou pré-cancerosas, como gastrite atrófica, metaplasia intestinal e displasia (Hao *et al.*, 1997). Em amostras de mucosa normal e metaplasia intestinal, alguns estudos não encontraram evidências de alterações numéricas do cromossomo 17 e do gene *TP53*, entretanto, em carcinomas gástricos, trissomias e tetrassomias do 17 e deleção desse gene foram eventos freqüentes (Gomyo *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1996; Koo *et al.*, 2000).

Não foi observada associação entre a freqüência de aneuploidias e parâmetros como sexo, idade, hábitos de tabagismo e etilismo, localização no estômago, histologia e grau de diferenciação nos grupos de lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico. A exceção foi a associação observada entre o grupo de gastrite crônica não-atrófica *H. pylori* positivo e o tabaco, cuja *odds ratio* evidenciou que a chance de fumantes apresentarem gastrite crônica não-atrófica associada ao *H. pylori* é 9,14 vezes maior do que para os não-fumantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHAB, M. et al. Correlation between endoscopy, histopathology, and DNA flow cytometry in patients with gastric dyspepsia. **Hepatogastroenterol**, v.43, p.1313-1320, 1996.

BEUZEN, F.; DUBOIS, S.; FLÉJOU, J.F. Chromosomal numerical aberrations are frequent in oesophageal and gastric adenocarcinomas: a study using in situ hybridization. **Histopathol**, v.37, p.241-249, 2000.

BLANCO, R. et al. Trisomy 3 in gastric lymphomas of extranodal marginal zone-B cell (mucosa-associated lymphoid tissue) origin demonstrated by FISH in intact paraffin tissue sections. **Human Pathol**, v.30, p.706-711, 1999.

CHANG et al. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. **Am J Gastroenterol**, v.88, p.174-186, 1993.

CHUN, Y.H. et al. Characterization of chromosomal aberrations in human gastric carcinoma cell lines using chromosome painting. **Cancer Genet Cytogenet**, v.119, p.18-25, 2000.

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.6735-6740, 1992.

CRAANEN, M.E. et al. Chronology of p53 protein accumulation in gastric carcinogenesis. **Gut**, v.36, p.848-852, 1995.

ELLIS, D.J. et al. Gastric carcinoma and previous peptic ulceration. **Br J Surg**, v.66, p.117-119, 1979.

ESPINOZA, L.A.; NETO, B.J.; CASARTELLI, C. Pathological and Karyotypic Abnormalities in Advanced Gastric Carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet**, v.109, p.45-50, 1999.



GOMYO, Y. et al. Numerical and point mutation of *p53* gene in human gastric intestinal metaplasia and well-differentiated adenocarcinoma: analysis by Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and PCR-SSCP. **Int J Cancer**, v.66, p.594-599, 1996.

GUAN, X. Y. et al. Recurrent chromosome changes in 62 primary gastric carcinomas detected by comparative genomic hybridization. **Cancer Genetic Cytogenetic**, v.123, p.27-34, 2000.

GUARNER, J. et al. Gastric atrophy and extent of intestinal metaplasia in a cohort of *Helicobacter pylori*-infected patients. **Hum Pathol**, v.32, p.31-35, 2001.

HALL, P.A.; LANE, D.P. *p53* in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? **J Pathol**, v.172, p.1-4, 1994.

HAN, K. et al. Chromosomal numerical aberrations in gastric carcinoma: analysis of eighteen cases using *in situ* hybridisation. **Cancer Genet Cytogenet**, v.92, p.122-129, 1996.

HAO, Y. et al. Abnormal change of *p53* gene in gastric and precancerous lesions and *APC* gene deletion in gastric carcinoma and near tissues. **J Tongji Med Univ**, v.17(2), p.75-78, 1997.

HAYASHI, K. et al. High frequency of simultaneous loss of *p16* and *p16* beta gene expression in squamous cell carcinoma of the esophagus, but not in adenocarcinomas of the esophagus or stomach. **Oncogene**, v.15, p.1481-1488, 1997.

HILTON, D.A.; WEST, K.P. *c-erbB-2* oncogene product expression and prognosis in gastric carcinoma. **J Clin Pathol**, v.45, p.454-456, 1992.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER-INCA, 2002. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acesso em 5 de janeiro de 2003.

ITO, H. et al. Cytogenetical analysis of the human gastric carcinoma cell line TMK-1. **Hiroshima J Med Sci**, v.38, p.121-124, 1989.



JAIN, S. et al. c-erbB-2 protooncogene expression and its relationship to survival in gastric carcinoma: an immunohistochemical study on archival material. **Int J Cancer**, v.48, p.668-671, 1991.

KITAYAMA, Y.; IGARASHI, H.; SUGIMURA, H. Different vulnerability among chromosomes to numerical instability in gastric carcinogenesis: stage-dependent analysis by FISH with the use of microwave irradiation. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 3139-3146, 2000.

KOBAYASHI, M. et al. Analysis of chromosome 17p13 (p53 locus) alterations in gastric carcinoma cells by dual-color fluorescence in situ hybridization. **Am J Pathol**, v.149, p.1575-1584, 1996.

KOIZUMI, Y. et al. Changes in DNA copy number in primary gastric carcinomas by comparative genomics hybridization. **Clin Cancer Res**, v.3, p.1067-1076, 1997.

KOKKOLA, A. et al. 17q12-21 amplicon a novel recurrent genetic change in intestinal type of gastric carcinoma: a comparative genomic hybridisation study. **Genes Chromosom Cancer**, v.20, p.36-43, 1997.

KOO, S.H. et al. Genetic Alterations of Gastric Cancer: Comparative Genomic Hybridization and Fluorescence *In situ* Hybridization Studies. **Cancer Genet Cytogenetic**, v.117, p.97-103, 2000.

KUNIYASU, H. et al. Frequent amplification of *C-MET* gene in scirrhous type stomach cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v.189, p.227-232, 1992.

LAN, J. et al. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. **World J Gastroenterol**, v.9, p.54-58, 2003.

LEE, S. et al. Risk of gastric cancer in patients with non-surgically treated peptic ulcer. **Scand J Gastroenterol**, v.25, p.1223-1226, 1990.

MARINONE, C. et al. p53 Evaluation in gastric mucosa of patients with chronic *Helicobacter pylori* infection. **Anticancer Res**, v.21, p.1115-1118, 2001.

NAGAVO, T. **Histogenesis and precursors of human gastric cancer**. Berlim, Germany: Springer Verlag. 1986. 115p.

NESSLING, M. et al. Mapping of chromosomal imbalances in gastric adenocarcinoma revealed amplified protooncogenes *MYC*, *MET*, *WNT2* and *ERBB2*. **Genes Chromosom Cancer**, v.23, p.307-316, 1998.

OCHIAI, A.; YAMAYCHI, Y.; HIROHASHI, S. p53 mutations in the non-neoplastic mucosa of the human stomach showing intestinal metaplasia. **Int J Cancer**, v.69, p.28-33, 1996.

OKADA, K. et al. Sequential Numerical Changes of Chromosomes 7 and 18 in Diffuse-Type Stomach Cancer Cell Lines: combined Comparative Genomica Hybridization, Fluorescence *In situ* Hybridization and Ploidy Analyses. **Cancer Genet Cytogenet**, v.118, p.99-107, 2000.

RANZANI, G.N. et al. p53 gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.4, p.223-231, 1995.

SAINSBURY, J.R.C. et al. Epidermal-growth-factor receptors and estrogen receptors in human breast cancer. **Lancet**, v.i, p.364-366, 1985.

SAKAKURA, C. et al. Gains, losses and amplifications of genomic materials in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization. **Genes Chromosomes Cancer**, v.24, p.299-305, 1999.

SERUCA, R.; SANTOS, R.N.; DAVID, L. Sporadic gastric carcinomas with microsatellite instability display a particular clinico-pathologic profile. **Int J Cancer**, v.64, p.32-36, 1995.



SHIAO, Y.H. et al. p53 alteration in gastric precancerous lesions. **Am J Pathol**, v.144, p.511-517, 1994.

SUZUKI, S. et al. Low level c-myc gene amplification in gastric cancer detected by dual color fluorescence *in situ* hybridization analysis. **J Surg Oncol**, v.66, p.173-178, 1997.

TAHARA, E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.119, p.265-272, 1993.

TAKAHASHI, Y. et al. Analysis of MYC and chromosome 8 copy number changes in gastrointestinal cancers by dual-color fluorescence *in situ* hybridization. **Cancer Genet Cytogenet**, v.107, p.61-64, 1998.

TAKAHASHI, Y. et al. Detection of aberrations of 17p and p53 gene in gastrointestinal cancers by dual (two-color) fluorescence *in situ* hybridization and genechip p53 assay. **Cancer Genet Cytogenet**, v.121, p.38-43, 2000.

TARASOVA, N.I.; RULONG, S.; OSKARSSON, M. Cellular localization of met and its ligand hepatocyte growth factor/ scatter factor in human stomach epithelium. **Gastroenterol**, v.110, p.1125, 1996.

TEODORI, L. et al. Cytometrically determined relative DNA content as indicator of neoplasia in gastric lesions. **Cytometry**, v.5, p.63-70, 1984.

UCHINO, S. et al. Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer its correlation with long-term survival of patients. **Cancer**, v.72, p.3179-3184, 1993.

VAN DEKKEN, H. et al. Comparative genomic hybridization of cancer of the gastroesophageal junction: deletion of 14q31-32.1 discriminates between esophageal (Barret's) and gastric cardia adenocarcinomas. **Cancer Res**, v.59, p.748-752, 1999.

YONEMURA, Y. et al. Expression of c-myc and c-fos in gastric carcinomas. **Cancer**, v.67, p.2014-2018, 1991.

VAN GRIEKEN, N.C.T. et al. *Helicobacter pylori*-related and -non-related gastric cancers do not differ with respect to chromosomal aberrations. **J Pathol**, v.192, p.301-306, 2000.

WANG, Y.; MINOSHIMA, S.; SHIMIZU, N. Precise mapping of the EGF receptor gene on the human chromosome 7p12 using an improved FISH technique. **Jpn J Hum Genet**, v.38, p.399-406, 1993.

WEIDNER, K.M. et al. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.88, p.7001-7005, 1991.

WEISS, H. et al. DNA distribution pattern in chronic gastritis. I. DNA ploidy and cell cycle distribution. **Scand J Gastroenterol**, v.24, p.643-648, 1989.

WU, M.S. et al. Overexpression of mutant p53 and c-erbB-2 proteins and mutations of the p15 and p16 genes in human gastric carcinoma with respect to histological subtypes and stages. **J Gastroenterol Hepatol**, v.13, p.305-310, 1998.

YADAV, M. et al. Non-random primary and secondary chromosomal abnormalities in human gastric cancers. **Anticancer Res**, v.16, p.1787-1795, 1996.

YAMAGATA, S.; HISAMICHI, S. Precancerous lesions of the stomach. **World J Surg**, v.3, p.1-3, 1979.

YASUI, W. et al. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. **Gastric Cancer**, v.4, p.113-121, 2001.

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

YONEMURA, Y. et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinomas. **Cancer**, v.67, p.2914-2918, 1991.



Conclusões

Os resultados obtidos ao longo do trabalho de campo e em laboratório, bem como a análise estatística, permitem concluir que a contaminação do solo por metais pesados é uma realidade em áreas urbanas e industriais, especialmente em áreas próximas a rodovias e zonas de disposição de resíduos sólidos.

A contaminação do solo por metais pesados é uma realidade em áreas urbanas e industriais, especialmente em áreas próximas a rodovias e zonas de disposição de resíduos sólidos. A contaminação do solo por metais pesados é uma realidade em áreas urbanas e industriais, especialmente em áreas próximas a rodovias e zonas de disposição de resíduos sólidos.

A contaminação do solo por metais pesados é uma realidade em áreas urbanas e industriais, especialmente em áreas próximas a rodovias e zonas de disposição de resíduos sólidos. A contaminação do solo por metais pesados é uma realidade em áreas urbanas e industriais, especialmente em áreas próximas a rodovias e zonas de disposição de resíduos sólidos.

A contaminação do solo por metais pesados é uma realidade em áreas urbanas e industriais, especialmente em áreas próximas a rodovias e zonas de disposição de resíduos sólidos. A contaminação do solo por metais pesados é uma realidade em áreas urbanas e industriais, especialmente em áreas próximas a rodovias e zonas de disposição de resíduos sólidos.

Capítulo seis

A contaminação do solo por metais pesados é uma realidade em áreas urbanas e industriais, especialmente em áreas próximas a rodovias e zonas de disposição de resíduos sólidos.

CONCLUSÕES

1. O diagnóstico molecular do *Helicobacter pylori*, por meio da técnica de PCR, demonstra maior eficácia em comparação com o histológico, obtido por coloração Giemsa, principalmente em metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico, evitando a subestimativa da infecção;
2. A técnica de FISH evidencia a ocorrência de aneuploidias em lesões gástricas benignas destacando a monossomia e trissomia 7 como alterações iniciais em gastrite crônica; trissomias 7 e 8 em gastrite atrófica crônica; trissomias 7 e 17 em úlcera gástrica; trissomias 7, 8, 9 e 17 em metaplasia intestinal, em comparação com frequências mais elevadas de trissomias e tetrassomias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 em adenocarcinoma gástrico;
3. A deleção do gene *TP53* é observada em metaplasia intestinal de pacientes sem história de câncer e em adenocarcinomas, evidenciando a participação de alterações nesse gene nas etapas iniciais da carcinogênese e reforça a associação desse tipo de lesão como um precursor potente do adenocarcinoma gástrico;
4. As lesões gástricas benignas manifestam imunorreatividade positiva da proteína p53 com intensidade fraca e frequência de 2 a 3 vezes menor de núcleos marcados em relação aos adenocarcinomas gástricos. A expressão elevada da p53 em gastrite crônica e úlcera gástrica pode ser devido a proteína selvagem, enquanto em metaplasia intestinal pode refletir a forma mutada, já que este tipo de lesão compartilha alterações genéticas em comum ao adenocarcinoma;
5. A infecção pelo *H. pylori* está associada com a ocorrência de aneuploidias em lesões benignas como gastrite atrófica crônica, úlcera

gástrica e metaplasia intestinal, mas não com a expressão da proteína p53;

6. De modo geral, não há associação entre a ocorrência de aneuploidias ou expressão da p53 e parâmetros como sexo, idade, tabagismo, etilismo, localização, histologia e grau de diferenciação, nas amostras de lesões benignas e adenocarcinoma, exceto em gastrite crônica não-atrófica, em que o cigarro associado com à infecção pelo *H. pylori* aumenta em 9,14 vezes o risco do indivíduo desenvolver gastrite crônica não-atrófica.

RESUMO

O câncer gástrico é o segundo tipo mais comum de neoplasia no mundo. A carcinogênese de estômago é um processo de múltiplos passos, podendo manifestar-se em várias etapas como gastrite superficial, gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, como um carcinoma. Essas condições costumam ser seqüenciais e ocorrer num período de muitos anos como resultado da exposição a uma variedade de fatores como a dieta alimentar, o estilo de vida, a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* e condições pré-existentes que podem resultar em alterações genéticas. A infecção pelo *H. pylori* é epidemiologicamente associada com o desenvolvimento de câncer gástrico, contudo os mecanismos genéticos subjacentes são ainda desconhecidos. O objetivo deste estudo foi investigar pelas técnicas de FISH e imunoistoquímica, a ocorrência de aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 e a deleção e expressão do gene *TP53* em lesões gástricas benignas (gastrite crônica não-atrófica e atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal) e adenocarcinoma gástrico, e associá-las com a infecção pelo *H. pylori*, diagnosticada pela técnica de PCR. As aneuploidias mais freqüentemente encontradas foram monossomia e trissomia 7 em gastrite crônica; trissomias 7 e 8 em gastrite atrófica; trissomias 7 e 17 em úlcera gástrica; trissomias 7, 8, 9 e 17 em metaplasia intestinal e trissomias/tetrassomias 3, 7, 8, 9 e 17 em adenocarcinoma gástrico. Foi encontrada associação entre a infecção pelo *H. pylori* e aneuploidias em gastrite atrófica ($p=0,0143$), úlcera gástrica ($p=0,0498$) e metaplasia intestinal ($p=0,0105$), porém não houve associação entre a ocorrência de aneuploidias e o tipo histológico e estadiamento dos adenocarcinomas gástricos, nem entre outros parâmetros como o sexo, a idade, o tabagismo e o etilismo e a localização no estômago, os quais também foram avaliados nos grupos de lesões benignas. A deleção do gene *TP53* não foi encontrada em gastrites

crônicas não-atróficas e atróficas e em úlcera gástrica, mas a imunorreatividade positiva para a p53 foi detectada em 45% (5/11) e 12% (2/17), respectivamente, dessas amostras. Foi observada a deleção e expressão do *TP53* em 60% (3/5) e 12% (2/17) de metaplasias intestinais e 100% (3/3) e 80% (12/15) dos adenocarcinomas gástricos analisados, respectivamente. No entanto, não houve qualquer associação significativa entre a expressão da p53 e os parâmetros avaliados e a infecção pelo *H. pylori*. Os resultados indicam a ocorrência de aneuploidias nos cromossomos avaliados evidenciando uma instabilidade cromossômica de forma progressiva a partir de gastrite crônica, sugerindo sua participação durante a tumorigênese gástrica. A deleção do gene *TP53* apenas nas amostras de metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico corrobora a hipótese de que essas patologias compartilham alterações genéticas e evoluem conjuntamente. Por outro lado, o aumento de expressão da proteína p53 nos grupos de gastrite crônica e úlcera, pode ser devido a superprodução da proteína selvagem, relacionada a uma resposta inflamatória da mucosa induzida por outros fatores, endógenos e exógenos, já que não observou-se associação com a expressão dessa proteína e a infecção pelo *H. pylori*. Em metaplasia intestinal, a expressão aumentada da p53 pode estar relacionada com a forma mutada, já que mutações no gene *TP53* foram relatadas neste tipo de lesão.

Palavras-chave: lesões gástricas benignas; adenocarcinoma gástrico; *Helicobacter pylori*; FISH; deleção *TP53*; imunoistoquímica.

ABSTRACT

Gastric cancer is considered to be the second most common cancer worldwide. Carcinogenesis of the stomach is a multi-stage process, it may appear in various stages as superficial gastritis, chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia and, finally, carcinoma. These sequential changes in the gastric mucosa may occur over a period of many years as a result of exposure to a variety of factors such as diet, life style, *Helicobacter pylori* infection and preexisting condition, which cause genetic alterations. *H. pylori* infection is epidemiologically associated with the development of gastric cancer, but the underlying genetic mechanisms are largely unknown. The aim of this study was to investigate the occurrence of aneuploidies in chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17 and TP53 gene deletion and expression, using FISH and immunohistochemical techniques, respectively, in benign gastric lesions (non-atrophic chronic gastritis, atrophic gastritis, gastric ulcer and intestinal metaplasia) and gastric adenocarcinoma, and to associate these features with *H. pylori* infection, diagnosed by PCR molecular technique. The aneuploidies most frequently found were monosomy and trisomy 7 in chronic gastritis; trisomies 7 and 8 in atrophic gastritis; trisomies 7 and 17 in gastric ulcer; trisomies 7, 8, 9 and 17 in intestinal metaplasia and trisomies/tetrasomies 3, 7, 8, 9 and 17 in gastric adenocarcinoma. Association was found between *H. pylori* infection and aneuploidies in atrophic gastritis ($p=0.0143$), gastric ulcer ($p=0.0498$) and intestinal metaplasia ($p=0.0105$), but no association was found between the occurrence of aneuploidies and histological type and differentiation grade of gastric adenocarcinoma or benign gastric lesions, with any other parameters such as sex, age, tobacco and alcohol consumption, and localization of stomach. No TP53 deletion was found in non-atrophic and atrophic chronic gastritis and gastric ulcer, but p53 positive immunoreactivity in these samples was detected in 45% (5/11) and 12% (2/17), respectively. TP53 gene deletion

and expression were found in 60% (3/5) and 12% (2/17) of intestinal metaplasia and 100% (3/3) and 80% (12/15) of gastric adenocarcinoma analysed, respectively. There was no significant association between p53 expression and evaluated parameters and *H. pylori* infection. The results denote the occurrence of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17 aneuploidies showing increased chromosomal instability, from chronic gastritis, that may be a contributing factor in gastric tumorigenesis. TP53 gene deletion was found only in intestinal metaplasia and gastric adenocarcinoma, corroborating the hypothesis that these pathologies share genetic alterations and progress jointly. The increase of p53 protein expression in chronic gastritis and gastric ulcer is due to overproduction of the wild-type protein, related to an inflammatory response in mucosa induced by other factors, endogenous or exogenous, since no association between protein expression and *H. pylori* infection was observed. In intestinal metaplasia, p53 overexpression may be related with mutated form, seeing that mutations in the TP53 gene were reported in this type of lesion.

Key-words – benign gastric lesions; gastric adenocarcinoma; *Helicobacter pylori*; FISH; TP53 deletion; immunohistochemical.

ANEXO 1

I. IDENTIFICAÇÃO

Nome:.....Prontuário:.....

Data de nascimento:/...../..... Sexo: () F () M

Grupo étnico: () caucasóide () negróide () asiático

Endereço:.....Fone:.....

Cidade:.....Estado:.....

Profissão atual:.....Tempo de atuação:.....

Profissão anterior:.....Tempo de atuação:.....

II. DADOS PESSOAIS E FAMILIAIS

- Consumo de bebida alcoólica: () Sim () Não

Há quanto anos:.....Tipo de bebida:.....

- Consumo de cigarro: () Sim () Não

Há quanto anos:.....Quantidade (un/dia):.....

- Doenças anteriores:

() úlcera () gastrite () câncer (tipo:.....)

() outras (tipo:.....)

- Tratamentos anteriores: () Sim () Não

Tipo:.....

- Cirurgias anteriores: () Sim () Não

Tipo:.....

- Uso de medicamentos: () Sim () Não

Tipo: duração:.....

- História de câncer ou outras doenças na família (grau de parentesco):

() câncer (tipo:.....) () úlcera () gastrite

() outras (tipo:.....)

Data:...../...../..... Responsável pelo procedimento:.....



Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, 26 de fevereiro de 2003.

Ana Cristina

Ana Cristina Gobbo César



