



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Genética

Yvana Cristina Jorge

Análise da expressão da anexina-1 e galectina-1 na carcinogênese gástrica

Dissertação apresentada
para obtenção do Título
de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Elizabete Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Olinari

São José do Rio Preto – SP.
2010

Jorge, Yvana Cristina.

Análise da expressão gênica e protéica da anexina-1 e galectina-1 na carcinogênese gástrica / Yvana Cristina Jorge. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

95 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ana Elizabete Silva

Co-orientador: Sonia Maria Oliani

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética – Expressão. 2. Proteínas – Análise. 3. Estômago – Câncer. 4. *Helicobacter pylori*. I. Silva, Ana Elizabete. II. Oliani, Sonia Maria. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 616.33-006

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

YVANA CRISTINA JORGE

**Análise da expressão gênica e protéica da anexina-1 e
galectina-1 na carcinogênese gástrica**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Elizabete Silva
Professora Adjunta
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Dr^a. Kátia Ramos Moreira Leite
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Cristiane Damas Gil
Professora Adjunta
Universidade Federal de São Paulo

São José do Rio Preto, ____ de _____ de 2010

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Citogenética Humana e Biologia Molecular; Imunomorfologia e Estudos Genômicos, todos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP. Apoio financeiro na forma de bolsa de estudos fornecida pela CAPES.

Dedico esse trabalho ao meu eterno namorado, Leandro. Essa conquista também é sua, meu amor, pois sem suas palavras encorajadoras e seu sólido apoio durante todo esse trajeto, eu jamais teria conseguido chegar até aqui.

Agradecimentos...

A Deus, por ter-me permitido usufruir mais essa experiência enriquecedora ao lado de pessoas maravilhosas, as quais devo meu eterno agradecimento:

Aos amigos espirituais que estão presentes em minha existência, sempre trabalhando para minha evolução e que me ajudaram a caminhar sempre dentro dos princípios éticos e morais.

Aos pacientes, sem os quais esse trabalho não seria possível. Obrigada por me ensinarem a ver a pessoa por trás do código e, a me incentivarem a dar o melhor de mim na execução desse projeto.

Aos meus pais, Mário e Yvonete, que nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus sonhos. Se não fosse a compreensão de vocês ao longo da minha vida, essa conquista não teria sido possível.

Ao meu namorado, Leandro, por ser o alicerce que me sustenta todos os dias de minha vida. Jamais teria alçado esse vôo se não fosse pelo companheirismo e fé inabalável na minha vitória.

Aos meus familiares, que sempre desejaram meu sucesso. Obrigada por compreenderem todas as vezes que não pude estar com vocês porque estava cumprindo as minhas obrigações acadêmicas.

A minha orientadora Ana, que abriu meu caminho para a pesquisa. Se não fosse a sua confiança em mim, minha jornada acadêmica não teria se realizado de maneira tão satisfatória.

A minha co-orientadora Sonia, que me acolheu em sua equipe e ajudou-me a expandir meus horizontes. Obrigada por emprestar o laboratório e todos os reagentes de imuno-histoquímica para que eu concretizasse esse projeto.

A professora Paula Rahal, que tão gentilmente permitiu que eu usufruísse de seu laboratório para realizar meus experimentos. Obrigada pelo acolhimento e por ter sido minha orientadora no estágio de docência, me dando a oportunidade de crescer profissionalmente e pessoalmente.

A banca examinadora do meu exame geral de qualificação, Profas. Rejane Goés e Paula Rahal, cujas sugestões me permitiram melhorar meu trabalho. Obrigada pela dedicação de vocês, que tiveram uma postura crítica excelente.

A banca examinadora da minha defesa, Dr^a. Cristiane Damas Gil e Dr^a. Kátia Ramos Moreira Leite, pela disponibilidade em me auxiliar a melhorar esse trabalho. Tenho certeza que todas as sugestões contribuirão muito para meu crescimento.

Ao Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão por conceder tão prontamente o material para o diagnóstico molecular da *H. pylori*. Se não fosse a sua disposição em nos ajudar, eu teria gasto mais outros nove meses tentando acertar a técnica.

A todos os membros do Centro de Endoscopia Rio Preto, onde realizei parte da coleta das amostras, sendo sempre auxiliada pelo Dr. Alaor Caetano. Em especial, gostaria de agradecer a Cidinha, pois sem sua eficiência eu não teria terminado meu trabalho e, ao Dr. Frederico Almeida, que sempre me encorajou.

A todos os médicos, residentes e enfermeiras do Serviço de Endoscopia do Hospital de Base, onde coletei grande parte das amostras. Obrigada a todos vocês por permitirem que eu acompanhasse seu trabalho e, principalmente, por toda a paciência comigo, especialmente o Dr. Kenji Miyazaki.

A Dra. Célia Sebastiana de Jesus Fazzio, patologista do Hospital de Base, por ter-me ensinado a histologia mesmo estando sempre muito ocupada. Sua ajuda foi de fundamental importância na minha formação.

Aos técnicos do Serviço de Patologia, em especial ao Nilson, por ter me ajudado na obtenção dos cortes histológicos.

Ao Dr. Jorge Thomé, patologista do Instituto de Anatomia Patológica e Citopatológica, por ter-me cedido os blocos parafinados para que eu completasse meu estudo.

A minha querida amiga Mayra, por ter sido meu braço direito na execução desse projeto. Agradeço muito a você pelas horas de riso compartilhadas e por ter enxugado minhas lágrimas nos momentos de tristeza, principalmente quando víamos os géis de agarose da *H. pylori*.

A minha companheira de laboratório, Juliana, pelos momentos de confidências e conselhos que muito me ajudaram, tanto na vida pessoal quanto na profissional. Além disso, obrigada por compartilhar suas amostras comigo e por me ajudar a realizar parte da extração dos ácidos nucléicos.

As colegas de trabalho Daniela, Ana Flávia e Aline, que dividiram comigo momentos deliciosos e muitas risadas. Obrigada por tonarem o laboratório um lugar sempre gostoso de trabalhar.

A Márcia, minha co-orientadora de Iniciação Científica. Obrigada pela paciência e, principalmente, agradeço por ter me ensinado grande parte das técnicas de Biologia Molecular utilizadas ao longo da minha jornada acadêmica.

A Marina, por nunca ter me negado ajuda. Obrigada pela presteza e disponibilidade, pois sem sua paciência em me ensinar, eu nunca teria finalizado

esse trabalho. Você é uma pessoa maravilhosa e, só tenho a agradecer a Deus por ter-me dado a oportunidade de conviver com você.

A Érica, que nos estágios iniciais desse trabalho prestou-me ajuda infinita. Obrigada pela paciência e bondade sempre demonstradas.

Ao Leandro Araújo, por ter me ensinado tudo que sei sobre imuno-histoquímica. Sua paciência e amizade foram muito importantes no início desse trabalho.

A Ana Paula Girol, pelo auxílio na confecção da prancha de imuno-histoquímica. Obrigada pela disponibilidade e ensinamentos.

Aos colegas de pós-graduação, Paula e Bruna, que compartilharam da minha agonia e sempre me lembravam ‘que no fim, tudo dá certo’.

A amiga que me acompanha desde a Graduação, Marina Gobbo, que sempre foi um exemplo de dedicação e comprometimento com a pesquisa. Obrigada pela força nos momentos de fraqueza e por ter sido a responsável por inúmeros momentos inesquecíveis ao longo desses seis anos de convivência.

Aos colegas do Laboratório de Imunomorfologia, por todos os momentos divididos e por tornarem meu trabalho lá tão prazeroso. Obrigada pelos cafezinhos acompanhados de conselhos e risadas. Em especial, agradeço ao Lucas pela ajuda com a densitometria.

A todos os meus amigos ‘anjos da guarda’, por terem permitido o meu crescimento pessoal. Sem vocês, esse ano não teria sido tão proveitoso. Saber que existem pessoas tão maravilhosas como vocês no mundo deu-me forças para superar muitas barreiras.

Aos queridos colegas do bloco 2A, pelos momentos de descontração. Obrigada pelos deliciosos churrascos e festinhas que serviram para estreitarmos os laços de amizade.

Aos companheiros rotaractianos Daniela Bizzari, Gisele, George e Rodrigo Paula. Estar com vocês me tornou uma pessoa melhor. Obrigada pelos preciosos ensinamentos e por compartilharem dos mesmos ideais que eu. Jamais me esquecerei dos nossos momentos juntos.

Aos colegas de faculdade: “biólogos” - Ana Carla, Ana Paula, Renata, Fanny, Bianca e Paulo e – “computeiros” - Bruno, Leandro e André. Não poderia deixar de mencioná-los aqui, pois sem amigos não somos nada. Vocês foram fonte propulsora em vida. Obrigada pela amizade, sorrisos e lágrimas compartilhadas.

As ex-colegas de laboratório Fernanda, Cidinha, Marilanda e Isabella. Queridas, obrigada pela paciência, ensinamentos e conselhos durante o tempo em que estivemos juntas. Aprendi muito com todas vocês, tanto sobre pesquisa quanto sobre a vida.

A todos aqueles que torceram por mim, que não posso citar aqui, pois seriam mil páginas de nomes. Saibam que tenho em meu coração os votos de sucesso que cada um de vocês me deu. Agradeço pelos pensamentos bons enviados a mim e pelas orações em meu favor.

Aos maravilhosos mestres que me ensinaram muito não somente sobre a Biologia, mas também sobre a ética. Em especial, agradeço aos professores Flávio Manzini, Francisco Langeani, Rejane Goés, Cláudia Carareto, Sebastião Taboga e Lilian Casatti pelas aulas realmente inspiradoras.

A todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação, por sua disponibilidade e eficiência em nos ajudar. Em especial, a Silvinha, sempre tão empenhada em facilitar a vida dos estudantes.

A Soraia, da SAEPE, por ter sido sempre muito educada e paciente comigo.

Aos funcionários da biblioteca, que sempre me receberam de bom-humor e muitas vezes me animavam a estudar.

Ao IBILCE, por ter sido o local onde obtive minha formação profissional enquanto bióloga e, pela infra-estrutura que possibilitou a realização de mais essa etapa. Além disso, obrigada por ter possibilitado o encontro entre mim e grande parte das pessoas maravilhosas citadas aqui, em especial, meu namorado.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos que me acompanhou desde o início do mestrado.

A todos vocês, meu eterno agradecimento...

‘Even the same thing, seen from different points of view, gives rise to two entirely different descriptions, and the descriptions give rise to two entirely different theories, and the theories result in two entirely different sets of action. The initial way we see a thing determines all our subsequent dealings with it’.

Ronald David Laing

Resumo

No presente estudo foram investigados os níveis de expressão gênica e protéica da anexina-1 (*ANXA1*/AnxA1) e galectina-1 (*LGALS1*/Gal-1) na carcinogênese do estômago e associações com infecção pela *Helicobacter pylori* e o genótipo de virulência bacteriano *cagA*⁺. A análise foi realizada em 40 biópsias de mucosa gástrica com gastrite crônica (CG), 20 de câncer gástrico (GA) e 10 de mucosa normal (C), pelas técnicas de qPCR para quantificar os níveis de RNAm; imuno-histoquímica para caracterizar a expressão protéica na mucosa gástrica, e PCR para diagnóstico molecular da *H. pylori* e cepa *cagA*⁺. O estudo mostrou resultados inéditos quanto à expressão desses genes em gastrite crônica, ainda sem descrições na literatura. Foi demonstrada expressão relativa elevada do mRNA de *ANXA1* em 80% dos casos de GA (média de 4,38 + 4,77) e em 90% dos casos de CG (média de 4,26 + 2,03), sem diferença significativa entre os grupos ($p = 0,33$). O gene *LGALS1* apresentou expressão elevada em 60% dos casos GA (média de 2,44 + 3,26) e, expressão constitutiva na CG (média de 0,43 + 3,13), mostrando, portanto, diferença significativa entre os grupos ($p < 0,01$). A imuno-histoquímica revelou que as proteínas AnxA1 e Gal-1 não são expressas na mucosa normal. Ao contrário, durante o processo inflamatório de CG, imunomarcagem citoplasmática positiva para a AnxA1 foi observada na porção basal do epitélio e estroma e, para Gal-1 a expressão foi constatada na porção apical e borda estriada do epitélio além do estroma. No adenocarcinoma tipo intestinal foi observada expressão citoplasmática em toda extensão epitelial e estroma tanto para a AnxA1 quanto para a Gal-1. Por outro lado, no tipo difuso imunomarcagem positiva também foi observada no núcleo e membrana plasmática de ambas as proteínas. A infecção pela *H. pylori* não revelou associação com a expressão de ambos os genes, mas o genótipo *cagA*⁺ bacteriano está associado à expressão cerca de 2,5 vezes maior do gene *ANXA1* nos pacientes positivos para essa cepa no grupo GA ($p < 0,01$). Quanto ao tipo histológico do tumor não houve associação com os níveis de expressão de ambos os genes, mas associação positiva foi observada quanto aos níveis de expressão elevados da *ANXA1* e *LGALS1* com sexo feminino ao se comparar os grupos de câncer e gastrite. Em conclusão, expressão aumentada de *ANXA1* é observada desde os estágios iniciais da carcinogênese gástrica, enquanto a expressão de *LGALS1* encontra-se aumentada apenas no adenocarcinoma, indicando o envolvimento desses genes na carcinogênese do estômago.

Palavras-chave: câncer gástrico; gastrite; anexina-1; galectina-1; *Helicobacter pylori*; CagA.

Abstract

In this study we investigated the levels of gene and protein expression of annexin-1 (*ANXA1*/AnxA1) and galectin-1 (*LGALS1*/Gal-1) in gastric carcinogenesis and associations with *Helicobacter pylori* infection and bacterial virulence genotype *cagA*⁺. The analysis was performed in 40 biopsies of gastric mucosa with chronic gastritis (CG), 20 with gastric cancer (GA) and 10 of normal mucosa (C), by the techniques of qPCR to quantify mRNA levels, immunohistochemistry to characterize the protein expression in gastric mucosa, and PCR for molecular diagnosis of *H. pylori cagA*⁺ strains. This is the first study regarding the expression of these genes in chronic gastritis. High *ANXA1* expression levels were demonstrated in 80% of GA cases (mean 4.38 + 4.77) and in 90% of GC cases (mean 4.26 + 2.03), with no significant difference between groups ($p = 0.33$). High *LGALS1* gene expression was found in 60% of GA cases (average 2.44 + 3.26), and constitutive expression was found in CG (mean 0.43 + 3.13), showing therefore a significant difference between groups ($p < 0.01$). Immunohistochemistry revealed that the proteins AnxA1 and Gal-1 are not expressed in normal mucosa. In contrast, during the inflammatory process of CG, positive cytoplasmic immunostaining for AnxA1 was observed in the basal epithelium and stroma, and Gal-1 expression was detected in the apical portion and striated border of the epithelium and stroma. In intestinal-type adenocarcinoma was observed cytoplasmic expression in all epithelial and stromal extension for both AnxA1 and Gal-1. On the other hand, in diffuse-type adenocarcinoma positive immunostaining was also observed in the nucleus and plasma membrane of both proteins. Infection by *H. pylori* showed no association with the expression of both genes, but the genotype *cagA*⁺ is associated with about 2.5 times higher *ANXA1* expression in patients positive for this strain in the GA group ($p < 0.01$). Concerning the histological type of tumor no association was found regarding the expression levels of both genes, but positive association was observed comparing groups of cancer and gastritis for female gender and high expression of *ANXA1* and *LGALS1*. In conclusion, increased expression of *ANXA1* has been observed since the early stages of gastric carcinogenesis, while the expression of *LGALS1* is increased only in adenocarcinoma, indicating the involvement of these genes in gastric carcinogenesis.

Key-words: gastric cancer; gastritis; annexin-1; galectin-1; *Helicobacter pylori*; CagA.

Lista de abreviaturas e símbolos

µg – micro-grama

µL – micro-litro

µm – micrômetros

µM – micro-molar

ACTB – do inglês *β-actin*

ANXA1 – do inglês *Annexin-1*

AnxA1 – proteína anexina-1

APC - do inglês *adenomatous polyposis coli*

BabA - do inglês *blood group antigen-binding adhesion*

Bad - do inglês *BCL2-associated agonist of cell death*

Bcl2 – do inglês *B-cell CLL/lymphoma 2*

bp – do inglês *base pair*

C - controle

CagA - do inglês *cytotoxin-associated gene A antigen*

cag-PAI: do ingles *cag-Pathogenecity Island*

cAMP – Adenosina monofosfato cíclico

CDH1 – do inglês *E-cadherin*

cDNA – DNA complementar

CDRs – domínios de reconhecimento de carboidratos

CG – gastrite crônica

C-MET – do inglês *met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)*

C-MYC - do inglês *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*

CREB – do inglês *Cyclic-AMP response element binding protein A*

Crk - do inglês *v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)*

CYP1A1 – do inglês *cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1*

DAB – Diamino Benzidina

DEPC - do inglês di-etil pirocarbonato

DGC – do inglês *Diffuse Gastric Cancer*

dH₂O – água deionizada

ECSG – do inglês *Epithelial Surface Glycocalyx*

EGF - do inglês *epidermal growth factor*

EGFR – do inglês *epidermal growth factor receptor*

ERBB2 – do inglês *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)*

ERK/MAPK - do inglês *elk-related tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase*

FAK – do inglês *Focal Adhesion Kinase*

FPR – receptor de peptídeos formilados

GA – adenocarcinoma gástrico

Gab-1 - do inglês *GRB2-associated binding protein 1*

Gal-1 – proteína galectina-1

Grb2 - do inglês *growth factor receptor-binding protein 2*

H. pylori – *Helicobacter pylori*

HGF - do inglês *hepatocyte growth factor*

Hp-NAP – do inglês *neutrophil-activating protein A*

H-Ras - do inglês *v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*

IceA - do inglês *induced by contact with epithelium*

IGC – do inglês *Intestinal Gastric Cancer*

IL-12 – Interleucina-12

INCA – Instituto Nacional de Câncer

iNOS: do inglês *inducible Nitric Oxide Synthase*

JAM - do inglês *Junctional Adhesion Molecule*

kDa – kilo Dáltons - unidade de massa (1kDa corresponde a 10^{-12} gramas)

KRAS: do inglês *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

K-SAM - do inglês *fibroblast growth factor receptor 2*

LGALS1 – do inglês *lectin, galactoside-binding, soluble, 1*

LPSs - lipopolissacarídeos

MAP - do inglês *mitogen-activated protein*

Min – Minuto

MMR – do inglês *mannose receptor, C type 1*

mRNA – RNA mensageiro

ng - nanograma

°C – Grau Celsius – medida de temperatura

p16 - do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

p27 - do inglês *proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9*

PBS – do inglês *Phosphate Buffer Solution*

PIK3CA – do inglês *phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide*

PLA2 - do inglês *Phospholipase A2*

PLC-g - do inglês *phospholipase Cg*

PMNs - polimorfonucleares

PTEN – do inglês *phosphatase and tensin homolog*

qPCR - do inglês *quantitative Polymerase Chain Reaction*

RARβ - do inglês *retinoic acid receptor, beta*

rRNA – RNA ribossômico

RUNX3 - do inglês *runt-related transcription factor 3*

SabA – do inglês *sialic acid-binding adhesin*

Sec – Segundo

SHP-2: do inglês *Protein Tyrosine Phosphatase*

T4SS: Sistema de transporte tipo 4

TCR: Receptor de células T

T_h1 – Linfócitos T *helpers* 1

T_h2 – linfócito T *helper* 2

TP53 - do inglês *tumor protein p53*

TP53 – do inglês *tumor protein p53*

VacA - do inglês *vacuolating cytotoxin*

VEGF – do inglês *Vascular Endothelium Growth Factor*

WHO – do inglês World Health Organization

Sumário

I – Introdução.....	18
II – Objetivos.....	34
III – Capítulo 1: Overexpression of annexin-1 and galectin-1 in chronic gastritis and gastric cancer.....	35
IV – Discussão.....	64
V – Conclusões.....	70
Referências Bibliográficas.....	71
ANEXOS.....	82
Anexo A – Modelo do Termo de consentimento livre e esclarecido.....	82
Anexo B – Modelo do questionário aplicado aos participantes do estudo...	85
Anexo C – Tabela de caracterização das amostras.....	86
Anexo C.1 – Tabela de caracterização das amostras do grupo de gastrite crônica (CG).....	86
Anexo C.2 – Tabela de caracterização das amostras do grupo de adenocarcinoma gástrico (GA).....	87
Anexo C.3 – Tabela de caracterização das amostras do grupo controle (C).....	88
Anexo D – Padrão eletroforético das subunidades 18S e 28S do RNA em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.....	89
Anexo E - Padrão eletroforético para o gene da <i>ACTB</i> amplificado nas amostras de cDNA, evidenciando o fragmento de 613 pb.....	90
Anexo F – Valor da expressão gênica em log2.....	91
Anexo G - Médias dos valores de expressão gênica em log2 dos genes <i>ANXA1</i> e <i>LGALS1</i>.....	92
Anexo H – Eletroforese para detecção da bactéria <i>H. pylori</i> e do genótipo <i>cagA+</i> nas amostras de DNA.....	93
APÊNDICES.....	94
Apêndice A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	94
Apêndice B – Parecer do Comitê de Ética Ambiental.....	95

I – Introdução

O estômago é um órgão sacular que se une superiormente ao esôfago por meio da cárdia e inferiormente ao duodeno pelo piloro. Apresenta três regiões distintas - o fundo, o corpo e o antro – sendo que a principal característica da sua fisiologia é a secreção de ácido clorídrico (Figura 1). A mucosa gástrica também secreta muco e bicarbonato e, juntamente com a barreira epitelial, forma uma camada protetora contra diversas lesões, sendo a mais grave delas o câncer (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Apesar do considerável declínio nas taxas de incidência e mortalidade nas últimas décadas, o câncer de estômago apresenta-se, mundialmente, como o quarto tipo de neoplasia mais comum e a segunda causa de morte relacionada ao câncer (BRENNER; ROTHENBACHER; ARNDT, 2009). Contudo, observa-se uma variação na sua incidência, apresentando taxas mais elevadas na Coreia, Japão, leste da Ásia e Europa e áreas da América Latina (PEEK; BLASER, 2002). No Brasil, de acordo com a Estimativa de Incidência de Câncer, ocupa o quinto lugar em incidência entre as mulheres e o terceiro entre os homens, com uma estimativa de 21.500 casos novos para 2010 (INCA, 2010).

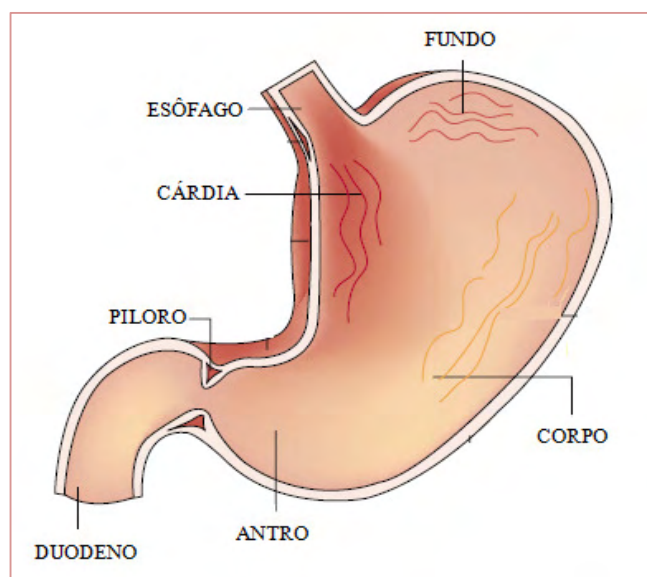


Figura 1. Anatomia do estômago, mostrando as três regiões morfologicamente distintas que o compõem – fundo, corpo e antro. Adaptado de PEEK; BLASER, 2002.

O adenocarcinoma gástrico representa 90-95% das neoplasias malignas do estômago e é classificado conforme características histopatológicas e clínicas em tipo intestinal ou difuso (LAUREN, 1965). O adenocarcinoma tipo intestinal (bem diferenciado) é mais prevalente em pessoas mais idosas e do sexo masculino, ao passo que o difuso (pouco diferenciado) ocorre em indivíduos jovens e principalmente em mulheres, apresentando, freqüentemente, condição hereditária (SAIKAWA et al., 2010).

A incidência do tipo intestinal tem aumentado na maioria dos países, ao contrário do difuso que permanece com taxas bastante estáveis (CARNEIRO et al., 2008). O adenocarcinoma tipo intestinal está geralmente localizado no corpo e antro do estômago, enquanto o tipo difuso localiza-se na região da cárdia, no terço superior do estômago (CERVANTES et al., 2007).

A progressão da doença é determinada por múltiplos fatores, incluindo a predisposição genética do indivíduo e fatores intrínsecos, infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* e outros fatores ambientais como a dieta e os hábitos tabagista e etilista (HAMAJIMA et al., 2006). Uma alimentação com baixo consumo de frutas e vegetais (LUNET; LACERDA-VIEIRA; BARROS, 2005) e consumo elevado de nitrato, alimentos defumados, enlatados, com corantes ou conservados no sal são fatores de risco para o aparecimento de câncer gástrico. Outros fatores como a má conservação dos alimentos e a ingestão de água proveniente de poços que contêm concentração elevada de nitrato também estão relacionados (INCA, 2010).

Os nitritos e nitratos usados para conservação de alguns tipos de alimentos se transformam em nitrosaminas no estômago, as quais têm ação carcinogênica potente. Portanto, são responsáveis pelos índices altos de câncer de estômago em populações que consomem alimentos com estes compostos de forma abundante e freqüente (INCA, 2010). Por outro lado, os carotenóides, as vitaminas C e E, o folato e o selênio presentes em frutas e vegetais e a refrigeração dos alimentos estão relacionados à diminuição do risco de aparecimento dessa neoplasia (SAIKAWA et al., 2010).

O hábito tabagista também é considerado um fator de risco significativo uma vez que os carcinógenos presentes no cigarro, como o clorofórmio e o etanol, agem na estimulação da proliferação celular. Além disso, evidências crescentes indicam que a nicotina, devido a sua ação na proliferação e apoptose em várias células cancerosas, é um dos componentes tumorigênicos mais ativos no cigarro. O tabagismo aumenta a angiogênese, os níveis de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e o crescimento tumoral, induzindo a fosforilação de Bad, uma proteína com atividade pró-apoptótica da família do *Bcl2*, responsável pela sobrevivência das células cancerosas (SHIN; CHO, 2005).

O efeito conjunto do fumo e do álcool tem um papel importante no desenvolvimento desta neoplasia, especialmente na região da cárdia (INOUE et al., 1994). A oxidação do etanol gera primariamente acetaldeído que apresenta efeitos carcinogênicos e mutagênicos diretos. Esse metabólito interfere em muitos sítios de síntese e reparo do DNA, o que pode resultar no desenvolvimento tumoral (JELSKI; SZMITKOWSKI, 2008).

Os mecanismos moleculares que participam da carcinogênese gástrica incluem alterações genéticas e epigenéticas em oncogenes, genes supressores de tumor, moléculas de adesão celular e reguladores do ciclo celular. Além disso, a instabilidade genética e as alterações de fatores de crescimento, bem como de citocinas, podem contribuir para a carcinogênese do estômago. Notavelmente, são observadas diferenças nas vias moleculares que direcionam o câncer tanto para o tipo intestinal quanto para o tipo difuso (SMITH et al., 2006).

Dentre esses mecanismos podem ser citadas alterações nos genes *CDH1*, *EGFR*, *ERBB2*, *MMR*, *KRAS*, *PIK3CA*, *C-MET*, *K-SAM*, *C-MYC*, *TP53*, *APC*, *RAR β* , *Bcl-2*, *RUNX3*, *PTEN*, *p27* e *p16* (revisão em CARNEIRO et al., 2008, PANANI, 2008). Algumas dessas alterações genéticas podem ser utilizadas como marcadores moleculares para o diagnóstico precoce e o prognóstico da doença, podendo auxiliar na conduta terapêutica dos pacientes.

A progressão do adenocarcinoma do tipo intestinal é descrita como um processo de múltiplas etapas, podendo manifestar-se a partir da gastrite crônica que evolui para atrofia glandular, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma, com

subseqüente disseminação metastática (CORREA, 1988). Portanto, um dos fatores mais importantes na carcinogênese do estômago é a inflamação da mucosa gástrica caracterizando a gastrite.

A gastrite aguda, em que ocorre infiltração de neutrófilos, é raramente observada em biópsias de rotina devido a sua característica transitória, enquanto a gastrite crônica, caracterizada pela presença de linfócitos e plasmócitos, é uma lesão bastante freqüente. Na gastrite crônica, as lesões vão desde processo inflamatório superficial até a atrofia do epitélio. Aproximadamente 10% dos pacientes com atrofia gástrica desenvolvem adenocarcinoma em um período de 15 anos (CHELI; GIACOSA, 1983), motivo pelo qual é considerada uma lesão pré-maligna (GENTA, 1998).

Os mecanismos pelos quais a inflamação crônica leva a lesões pré-cancerosas incluem a indução de estresse oxidativo, alteração da razão entre a taxa de proliferação e de apoptose, a secreção de citocinas inflamatórias (MATYSLAK-BUDNIK; MÉGRAUD, 2006), danos diretos ao DNA e estimulação da angiogênese. Além disso, a inflamação crônica do trato gastrointestinal também afeta a adesão e a transformação celular (LEE et al., 2009).

A *H. pylori* é o fator etiológico mais fortemente associado à gastrite crônica, úlcera péptica, linfoma MALT, câncer gástrico (HUANG et al., 2003; KANDULSKI; SELGRAD; MALFERTHEINER, 2008) e a suas lesões precursoras (ASAKA et al., 2001; XUE et al., 2001). Portanto, esta bactéria foi classificada, em 1994, pela Organização Mundial de Saúde (WHO) como carcinógeno humano classe 1. A *H. pylori* está presente em 90% dos pacientes com gastrite crônica que afeta o antro (ROBBINS; COTRAN, 2005) e, em 77% dos pacientes com tumores da região do corpo e do fundo do estômago (NGUYEN et al., 2008).

Essa bactéria Gram-negativa afeta cerca de metade da população mundial (PEEK; BLASER, 2002; SEPULVEDA; GRAHAM, 2003; SUERBAUM; JOSEPHANS, 2007), sendo transmitida pelas vias gastro-oral, oral-oral e fecal-oral (VALLE; VÍTOR, 2010). Em países em desenvolvimento, essa estimativa pode se estender para 80% da população, sendo o curso da infecção marcado por

diversas manifestações além da gastrite crônica, como problemas de crescimento e desnutrição devido a alterações nos processos de digestão e absorção de alguns nutrientes (AKÇAM, 2010).

Apesar da frequência elevada de pessoas infectadas, cerca de 70% delas são assintomáticas (VALLE; VÍTOR, 2010). A infecção geralmente ocorre na infância e alguns fatores estão relacionados, como desenvolvimento econômico e social (LEHOURS; YILMAZ, 2007), baixo nível educacional, carência de práticas higiênicas durante a infância, famílias com muitos membros, ausência de sanitários intra-domiciliares, bem como de tratamento de água para consumo (NOURAIE et al., 2009). Isso explica as maiores taxas de incidência de câncer de estômago em países em desenvolvimento.

A *H. pylori* está adaptada para colonizar o ambiente ácido do estômago. Muitos fatores, incluindo a produção da enzima urease, responsável pela degradação da uréia em amônia, e a proteína transportadora de uréia, são importantes na manutenção de um microambiente com pH neutro (SCOTT et al., 1998; WEEKS et al., 2000; AMIEVA; EL-OMAR, 2008). A secreção da urease, além de proteger contra a acidez do estômago, também causa inflamação e dano celular no epitélio (MOBLEY; HU; FOXAL, 1991).

Para colonizar o ambiente gástrico por um longo período, a *H. pylori* precisa não somente vencer as barreiras físicas e celulares, mas também subverter o sistema imune do hospedeiro. A proteína Hp-NAP apresenta atividade de ativação de neutrófilos e pode induzir o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) (SATIN et al., 2000). No entanto, a bactéria apresenta muitos fatores que reduzem a inflamação ou o reconhecimento pelo sistema imune. Além disso, apesar de ser um patógeno predominantemente extracelular, induz preferencialmente a resposta das células T_h1 que respondem aos patógenos intracelulares (BAMFORD et al., 1998).

Aproximadamente 20% das bactérias *H. pylori* do estômago estão aderidas ao muco das células epiteliais (HESSEY et al., 1990) e, apresentam tropismo pelas junções intercelulares, podendo causar mudanças no citoesqueleto (NECCHI et al., 2007). Essas observações sugerem que a adesão envolve

interações moleculares com a mucosa gástrica que podem levar à modificação da superfície celular.

Este processo de adesão da *H. pylori* pode ser usado para causar danos ao epitélio, induzir a inflamação e liberar toxinas. Particularmente, a proteína bacteriana SabA (*sialic acid-binding adhesin*) se liga à mucosa inflamada e ativa neutrófilos devido à sua semelhança às selectinas do hospedeiro (PETERSSON et al., 2006). Os fatores de virulência bacterianos CagA (*cytotoxin-associated gene A antigen*) e VacA (*vacuolating cytotoxin*) também estão intimamente relacionados à adesão, sugerindo que sua importância é a internalização de toxinas pela célula hospedeira (AMIEVA; EL-OMAR, 2008).

Além desses, outros fatores de virulência incluindo IceA (*induced by contact with epithelium*) e BabA (*blood group antigen-binding adhesion*) também permitem o sucesso na colonização da mucosa (PEEK; BLASER, 2002; LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003; RIEDER; FISCHER; HAAS, 2005; BACKERT; MEYER, 2006; AMIEVA; EL-OMAR, 2008). Na Figura 2 estão ilustrados os efeitos gerais dos fatores de virulência da *H. pylori* na mucosa gástrica.

O gene *vacA* codifica uma proteína responsável por vacuolizar as células hospedeiras e estimular a apoptose de células epiteliais (RUDI et al., 1998). Aproximadamente 50% das cepas de *H. pylori* expressam a proteína VacA e, sua expressão está relacionada a expressão do *cagA* (TUMMURU; COVER; BLASER, 1993). Cepas *vacA*⁺ são mais comuns entre indivíduos com câncer gástrico do que em indivíduos com gastrite (MIEHLKE et al., 2000). O gene apresenta ampla diversidade alélica, sendo algumas variantes de maior virulência como *vacA s1/m1/i1* (NGUYEN et al., 2008).

A proteína BabA, codificada pelo gene *babA2*, é uma proteína de membrana que se liga ao antígeno do grupo sanguíneo Lewis^b (Le^b) nas células epiteliais gástricas. As cepas bacterianas que possuem esse gene estão relacionadas ao adenocarcinoma de estômago (GERHARD et al., 1999). Sua presença está associada ao *cagA* e *vacA s1*; sendo que as cepas que possuem esses três genes conferem maior risco para o câncer gástrico. Cepas *babA*⁺ aderem

mais fortemente às células epiteliais, o que pode promover a carcinogênese (PEEK; BLASER, 2002).

O gene *iceA*, que codifica uma endonuclease que reconhece a sequência CATG, está associado à úlcera péptica e ao câncer gástrico, sendo que a expressão desse gene é regulada pelo contato da bactéria com as células epiteliais da mucosa gástrica (KUSTERS; VAN VLIET; KUIPERS, 2006).

A proteína CagA, codificada pelo gene *cagA* localizado na ilha de patogenicidade *cag*-PAI, interage diretamente com as células epiteliais do hospedeiro. A ilha *cag*-PAI contém mais de 30 genes, incluindo aqueles que coletivamente codificam o sistema de secreção tipo 4 (T4SS) que conecta o citoplasma bacteriano às células epiteliais do hospedeiro (ODENBREIT et al., 2000).

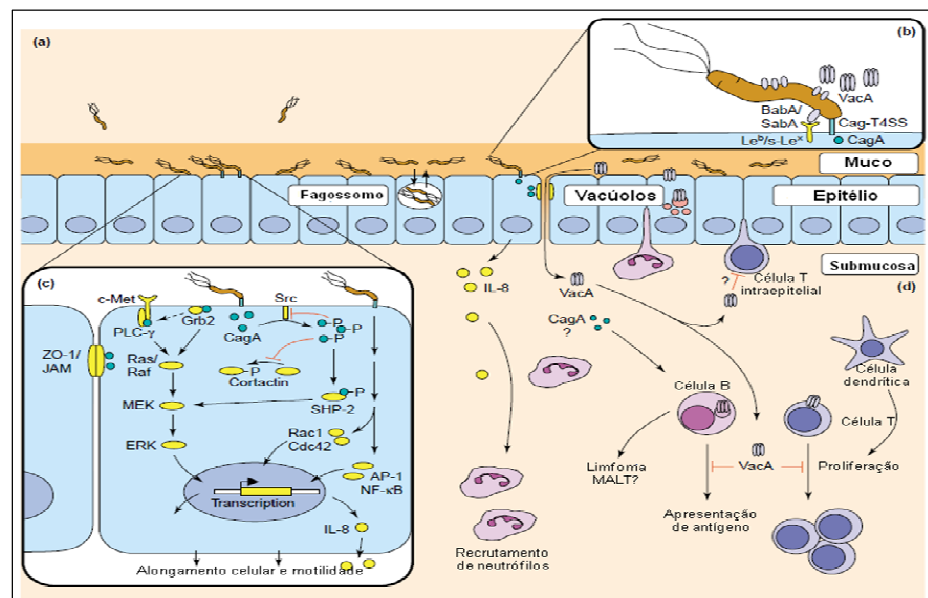


Figura 2. Representação esquemática destacando a interação entre *H. pylori* e a mucosa gástrica. (a) O sítio preferencial de adesão da bactéria é o muco. Algumas cepas se ligam ao epitélio pelas proteínas BabA ou SabA. (b) Proteínas excretadas na superfície bacteriana. (c) Transdução de sinais na célula epitelial desencadeada pela translocação da CagA da bactéria. (d) Possíveis efeitos de VacA nas células do sistema imune, como inibição da proliferação das células T e apresentação de antígenos pelas células B. Grb2 - *growth factor receptor-binding protein 2*; JAM - *Junctional Adhesion Molecule*; PLC-g - *phospholipase Cg*; SabA - *Sialic Acid-binding Adhesin*. Adaptado de RIEDER; FISCHER; HAAS, 2005.

Nas células hospedeiras, a cauda C-terminal da proteína CagA é alvo de fosforilação (YE et al., 2004) e, uma vez fosforilada pela família das Src quinases, CagA permanece próxima a membrana plasmática, onde interage com várias proteínas do hospedeiro, desencadeando sinais que ativam os receptores de fatores de crescimento de tirosina-quinases, como c-met. Desse modo, CagA afeta as atividades de proliferação, adesão e organização do citoesqueleto das células epiteliais (ATHERTON; BLASER, 2009).

Uma hipótese que unifica os múltiplos efeitos da proteína bacteriana fosforilada é que ela imita a função da proteína Gab-1, que serve como sítio de ligação para a tirosina fosfatase SHP2100 e c-met fosforilada (HAMADA et al., 2000). Assim como a Gab-1, CagA pode se ligar a proteína adaptadora Grb2 e, então, ambas ativam a proteína adaptadora Crk que irá ativar a via ERK/MAPK (ATHERTON; BLASER, 2009).

Além disso, CagA perturba o controle do ciclo celular e induz a invasão das células epiteliais pela ativação de metaloproteases de matriz (ISOMOTO et al., 2005). Isso tudo está relacionado à carcinogênese, sugerindo muitos mecanismos pelos quais CagA pode contribuir para o câncer.

A proteína CagA foi inicialmente utilizada como biomarcador para algumas doenças como úlcera péptica (HANSSON et al., 1996) e adenocarcinoma gástrico (OH; KARAM; GORDON, 2005). Alguns estudos indicam um risco 28,4 vezes maior para desenvolvimento de neoplasia em pacientes CagA positivos (GIANNAKIS et al., 2008). Cepas *cagA*⁺ também têm sido associadas com aumento da inflamação, proliferação celular e metaplasia da mucosa gástrica (ATHERTON; BLASER, 2009).

Dados recentes expandiram o conceito de que a inflamação é um componente crítico na progressão tumoral. Muitas neoplasias surgem a partir de sítios de infecção, irritação crônica e inflamação. Desse modo, o microambiente tumoral mantido pelas células inflamatórias é um componente indispensável no desenvolvimento neoplásico, uma vez que nele ocorrem processos como a proliferação celular, sobrevivência e migração (COUSSENS; WERB, 2002).

Além disso, células tumorais podem expressar moléculas de sinalização do sistema imune inato, como as selectinas e quimiocinas e seus receptores para invasão, migração e metástase (COUSSENS; WERB, 2002). Os mecanismos que mediam a inflamação incluem danos diretos ao DNA; inibição da apoptose e estimulação da angiogênese. A inflamação crônica do trato gastrointestinal também afeta a proliferação, adesão e transformação celular (LEE et al., 2008).

Portanto, um dos focos das pesquisas em câncer tem sido direcionado para o estabelecimento dos efeitos da inflamação crônica e na determinação dos mecanismos envolvidos neste processo. Uma melhor compreensão desses mecanismos poderia ajudar na estimativa de risco individual ou populacional para o câncer gástrico, além de melhorias no prognóstico dessa neoplasia.

Esses fatores justificam estudos em genes cujas proteínas estejam envolvidas na resposta inflamatória do hospedeiro à infecção pela *H. pylori*, podendo estar relacionados com a carcinogênese gástrica. Desse modo, as proteínas anti-inflamatórias anexina-1 (AnxA1) e galectina-1 (Gal-1), que são importantes moduladoras da resposta inflamatória, têm sido alvos de várias pesquisas não apenas em doenças inflamatórias, mas também em diversos tipos de neoplasias (revisão em HAYES; MOSS, 2004; ALMKVIST; KARLSSON, 2004).

A AnxA1 foi identificada em macrófagos peritoniais de ratos como uma proteína induzida por glicocorticóides com potente ação anti-inflamatória (FLOWER; BLACKWELL, 1979). Juntamente com outras doze proteínas, AnxA1 compõe a superfamília das anexinas dependentes de cálcio e que se acoplam a fosfolipídios, estando relacionadas a múltiplos processos moleculares e celulares (ALVES et al., 2008). Essa propriedade permite que essas moléculas se associem à membrana plasmática de modo reversível, estando, portanto, envolvidas na organização do citoesqueleto; no transporte de substâncias; no fluxo de íons; na diferenciação e na migração celular (GERKE; MOSS, 2002).

A AnxA1, cujo gene (*ANXA1*) localiza-se na região cromossômica 9q12-q21.2 (HUEBNER et al., 1988), apresenta 37 kDa e um domínio C-terminal altamente conservado entre as anexinas, que contém quatro (ou oito, no caso da AnxA6) seqüências repetidas de 70 aminoácidos. A seqüência N-terminal de cada

anexina é única e parece conferir a especificidade individual. No caso da AnxA1, o domínio N-terminal contém 44 aminoácidos e inclui sítios para fosforilação, glicosilação e acetilação (BUCKINGHAM et al., 2007).

Os receptores para as anexinas são da família dos peptídeos formilados (FPR) (GERKE; MOSS, 2002). Por meio de um membro desta família (FPRL-1) a anexina exerce suas ações contra-regulatórias no extravasamento de neutrófilos (GASTARDELO et al., 2009). Membros dessa família foram primeiro descritos nos neutrófilos humanos e monócitos como receptores quimioatrativos que respondem especificamente aos peptídeos n-formilados. Como apenas proteínas bacterianas e mitocôndrias são fontes naturais desses peptídeos, foi sugerido que os FPRs estão envolvidos na mediação do tráfego de fagócitos para os sítios de invasão bacteriana ou dano tecidual (JONH et al., 2008).

As anexinas são solúveis e localizam-se no citoplasma das células, movendo-se para a membrana plasmática quando a concentração de cálcio está elevada. As anexinas também se deslocam do citoplasma para o núcleo ou para fora da célula, sendo que ambos os processos parecem depender da sinalização por tirosina-quinases. A retenção nuclear da AnxA1 por mutações em sítios específicos no sinal de exportação nuclear resulta na diminuição da proliferação celular (ALVES et al., 2008). Sob condições de inflamação, a AnxA1 humana é exportada para fora da célula e pode ligar-se a receptores de membrana, inibindo o acúmulo de células inflamatórias nos locais de injúria (GERKE; MOSS, 2002).

Flower e Blackwell (1979) sugeriram que a ação anti-inflamatória era devida, em parte, pela inibição da atividade da enzima fosfolipase A2 (PLA2) e, conseqüentemente, da inibição da produção de ácido araquidônico e de eicosanóides pró-inflamatórios. Outro estudo demonstrou que outras enzimas além da PLA2 estão sob modulação pela AnxA1, como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (PARENTE; SOLITO, 2004).

Uma variedade de estudos tem demonstrado que a proteína AnxA1 apresenta maior expressão em células do sistema imune inato do que em células do sistema imune adaptativo. A análise em microscopia confocal e eletrônica de leucócitos PMNs mostrou que a proteína está parcialmente presente na superfície

celular e amplamente localizada em compartimentos citoplasmáticos segregados (D'ACQUISTO, 2009).

A expressão na membrana dessas células parece bloquear a sua interação com o endotélio ativado. Então, a liberação de enormes quantidades de AnxA1 seguida de adesão de PMNs na vasculatura inflamada garante que as PMNs se libertem do epitélio e continuem sua jornada na corrente sanguínea (D'ACQUISTO, 2009) (Figura 3).

A AnxA1 é expressa por diferentes macrófagos tecido-específicos, incluindo alveolar (AMBROSE et al., 1992), peritoneal (PEERS et al., 1993), sinovial (YANG et al., 1998) bem como nas células microgliais (MINGHETTI et al., 1999), o que sugere papel regulatório da molécula na atividade geral dos macrófagos (KAMAL, FLOWER, PERRETTI, 2005). Apesar da bem documentada atividade da AnxA1 nos neutrófilos e monócitos/macrófagos, pouco se sabe sobre sua atividade nos linfócitos. Os linfócitos B humanos parecem não expressar AnxA1, enquanto as células *natural killers* CD56+ expressam elevadas quantidades (KAMAL, FLOWER, PERRETTI, 2005).

Recentemente, foi descrito que a AnxA1 modela positivamente a intensidade de sinalização dos receptores de célula T, o que despertou interesse no estudo desta proteína na diferenciação dos linfócitos T (D'ACQUISTO et al., 2007; D'ACQUISTO; PERRETTI; FLOWER, 2008). D'Aquisto et al. (2009) relataram que a estimulação de células T resulta na ativação de uma via de sinalização na qual FPRL-1 é externalizado na superfície celular para ser ativado pela AnxA1 endógena que é simultaneamente liberada.

Alguns estudos também têm relatado a expressão de AnxA1 em células epiteliais como a mucosa nasal (RODRIGO et al., 2004; SENA et al., 2006), pulmão, placenta, timo, próstata e glândula submaxilar (BAI et al., 2004), laringe (SILISTINO-SOUZA et al., 2007) e epitélio escamoso cervical (WANG et al., 2008). No entanto, algumas células não expressam, ou expressam em baixa quantidade, essa proteína, como é o caso das células estromais cervicais (WANG et al., 2008), músculos, cérebro, fígado (BAI et al., 2004) e estômago (MARTIN et al., 2008).

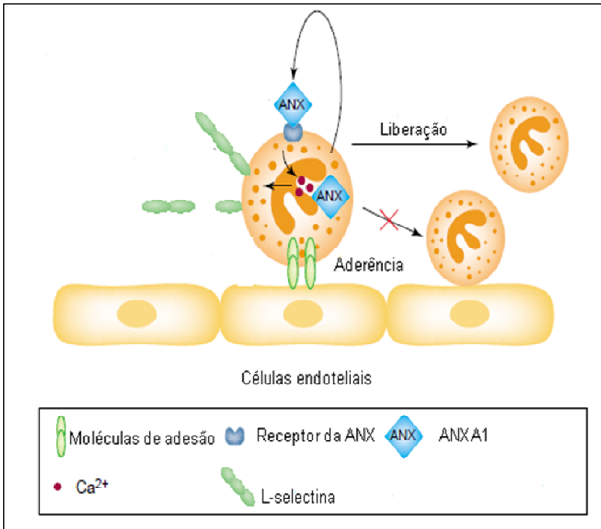


Figura 3. A hipótese da liberação de AnxA1. A adesão do leucócito (representado pelo neutrófilo) é o estímulo ótimo requerido para a mobilização de AnxA1. Quando não há estímulo, a AnxA1 está localizada no citoplasma, mas quando ocorre o estímulo, ela é externalizada na superfície celular e se ancora à membrana plasmática de modo Ca^{+2} -dependente. O mecanismo pelo qual a AnxA1 inibe a adesão do neutrófilo não está esclarecido. Adaptado de PERRETTI, 2003.

Outras funções relacionadas a essa classe de proteínas anti-inflamatórias são o crescimento celular, fusão de membrana, endocitose e exocitose, transdução de sinais, diferenciação de queratinócitos, apoptose, inibição da proliferação celular, regulação da proteína MAP (*mitogen-activated protein*), do fator de crescimento epidermal (EGF) e do fator de crescimento do hepatócito (HGF) (HUO; ZANG, 2005; ALVES et al., 2008; JONH et al, 2008). Portanto alterações genéticas e níveis de expressão anormal da AnxA1 podem contribuir para a origem de doenças relacionadas com processos inflamatórios, doença cardiovascular e câncer (ALVES et al., 2008).

Outra classe de proteínas envolvidas na resposta inflamatória é a família das galectinas, que têm a capacidade de se ligarem a resíduos glicosilados (PACIENZA et al., 2008). Essas proteínas reconhecem seqüências N-acetilglicosaminadas que podem estar presentes em N- ou O-glicanos nos glicoconjugados da superfície celular (RODIG et al., 2008). Elas estão envolvidas no crescimento celular, apoptose, adesão celular, resposta imune e transformação maligna. Apesar de terem sido descritas quinze proteínas dessa família nos

mamíferos, classificadas em três grupos conforme domínios de reconhecimento de carboidratos (CDRs) (HOKAMA, MIZOGUCHI, MIZOGUCHI, 2008) as galectinas 1 e 3 são as mais estudadas (PACIENZA et al., 2008).

As galectinas estão presentes no citosol e no núcleo e, apesar da ausência de um peptídeo-sinal, podem ser secretadas para o meio extracelular por vias desconhecidas. A galectina 1 (Gal-1) está presente no epitélio, endotélio e macrófagos ativados e, quando produzida pelas células circulantes ou endoteliais, pode induzir a ligação de leucócitos ao endotélio por meio da interação com os carboidratos da superfície celular, mediando a adesão quando a via da integrina é insuficiente (ALMKVIST; KARLSSON, 2004). Além de suas atividades extracelulares, as galectinas podem regular processos intracelulares como o *splicing* de pré-RNAm, progressão do ciclo celular e sobrevivência (RABINOVICH; ILARREGUI, 2009).

A Gal-1, cujo gene (*LGALS1*) foi mapeado em 22q13.1 (MEHRABIAN et al., 1993), regula a imunidade adaptativa pelo controle da sobrevivência das células T, da secreção de citocinas e da migração transendotelial. Além disso, a Gal-1 pode atuar como um elo entre a imunidade inata e adaptativa por modular a fisiologia dos neutrófilos, monócitos e células dendríticas, se apresentando como uma molécula de ação anti-inflamatória (le MERCIER et al., 2008).

Ela apresenta expressão elevada em células T CD4⁺CD25⁺ e, suas propriedades anti-inflamatórias têm sido estudadas em vários modelos de inflamação crônica e doenças auto-imunes como encefalomielite autoimune (OFFNER et al., 1990), artrite (RABINOVICH et al., 1999), uveíte (TOSCANO et al., 2006), hepatite (SANTUCCI et al., 2000) e diabetes (PERONE et al., 2006).

A Gal-1 mantém a homeostase das células T e, portanto é expressa no estroma do timo e nas células T ativadas, sendo que no timo ela promove a apoptose de células auto-reativas durante o seu desenvolvimento (revisão em DHIRAPONG et al., 2009).

Tem sido demonstrado que a Gal-1 pode induzir a apoptose dessas células pela ligação ao receptor de células T (TCR) (VESPA et al., 1999), o que resulta na reorganização da superfície das células T e, conseqüentemente, afeta a transdução

do sinal. Além disso, a Gal-1 é necessária para a ligação física e multimerização do TCR para induzir sinais de apoptose. É hipotetizado que a Gal-1 facilita a ativação da apoptose de células T pela via Faz/caspase (MATARRESE et al., 2005).

As células endoteliais humanas expressam níveis baixos de Gal-1 e, sua expressão aumenta consideravelmente na presença de citocinas e LPSs bacterianos. Quando isso ocorre, há uma redução na transmigração de neutrófilos e mastócitos para o local de inflamação e uma inibição da migração de eosinófilos (ALMKVIST; KARLSSON, 2004). O papel geral da galectina na tumorigênese está destacado na Figura 4.

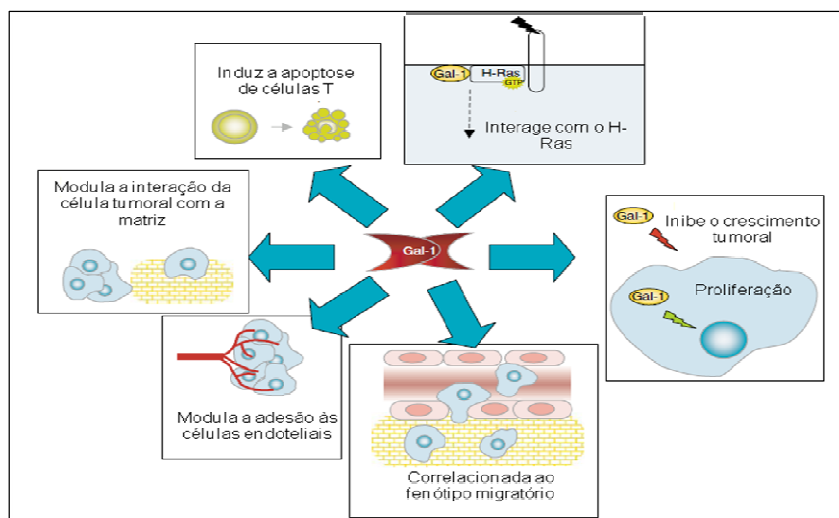


Figura 4. Contribuição da galectina-1 na progressão tumoral. Ela interage com o oncogene *H-RAS* e contribui para a ancoragem da H-RAS e para transformação tumoral. A proteína também modula o crescimento, adesão e migração celular, atuando, portanto, na metástase. Quando no meio extracelular, a galectina-1 inibe o crescimento tumoral, ao passo que intracelularmente, ela promove a proliferação celular. Ela também atua na angiogênese por modular as interações entre as células tumorais e endoteliais. Adaptado de RABINOVICH, 2005.

Durante o processo de iniciação e progressão tumoral, tem-se observado mudanças no padrão de expressão de genes envolvidos em diferentes vias metabólicas. Essas alterações podem estar associadas com a evolução tumoral e podem ter valor prognóstico (HAYES; MOSS, 2004). Portanto, mudanças nos

níveis de expressão de genes que atuam na resposta inflamatória, proliferação, migração, angiogênese e apoptose, como as anexinas e galectinas, devem ser esperadas dentre o conjunto de genes diferencialmente expressos no processo carcinogênico.

Estudos recentes têm mostrado expressão diferencial da AnxA1 em alguns tipos de câncer. Expressão elevada dessa proteína tem sido constatada em carcinoma de pâncreas, leucemia, câncer de pele, câncer de mama, carcinoma hepatocelular, câncer de esôfago e tumores gliais (revisão em LIN et al., 2008). Por outro lado, expressão reduzida ou perda de expressão foram observadas em neoplasias de próstata, esôfago, estômago, mama, cabeça e pescoço, carcinoma nasofaríngeal e câncer de laringe (revisão em ALVES et al., 2008; CAO et al., 2008; YU et al., 2008).

Também tem sido observada uma correlação inversa no nível de expressão da AnxA1 e a graduação histológica de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço e de esôfago e em linfoma não-Hodgkin (revisão em HAYES; MOSS, 2004). Yu et al. (2008) avaliaram a expressão da anexina-1 em câncer de estômago e observaram que a diminuição da expressão da proteína estava relacionada com a progressão tumoral, ou seja, perda da expressão em 64% dos tumores primários e em 86% dos nodos metastáticos, portanto sugerindo a AnxA1 como um biomarcador negativo no desenvolvimento e progressão tumoral.

De modo contrário, Wu et al. (2006) encontraram expressão elevada da proteína em câncer gástrico do tipo difuso quando comparado ao tipo intestinal. Enquanto, Martin et al. (2008) observaram um aumento de expressão da anexina-1 em úlceras gástricas, cuja marcação foi mais evidente no citoplasma celular nas regiões de cicatrização.

A expressão elevada de galectina-1 foi constatada em astrocitoma, melanoma, câncer de próstata, bexiga, ovário, carcinomas de células escamosas orais, carcinomas de tireóide e carcinomas de células escamosas da laringe e hipofaringe e linfomas de Hodgkin, na maioria dos casos relacionada com a agressividade e potencial metastático dos tumores (revisão em RABINOVICH, 2005; RODIG et al., 2008; SAUSSEZ et al., 2008a,b; DING et al., 2009). Em

tumores de bexiga, os níveis mais elevados de expressão foram observados em tumores de alto grau (LANGBEIN et al., 2007).

Embora as investigações indiquem a AnxA1 e Gal-1 como promissoras candidatas na modulação da resposta inflamatória e no desenvolvimento de neoplasias, pouco se conhece sobre sua expressão em tecido epitelial gástrico normal, inflamado e neoplásico, assim justificando estudos que investiguem a expressão dessas proteínas nestes tecidos.

II – Objetivos

Devido ao importante desempenho das anexinas e galectinas nos processos inflamatórios e neoplásicos e, em função do número restrito de informações sobre sua expressão na carcinogênese gástrica, o presente estudo teve por objetivo geral investigar a relação entre expressão gênica e protéica em processo inflamatório e neoplásico da mucosa gástrica associados à infecção pela *Helicobacter pylori*. Desse modo, os objetivos específicos foram:

a) avaliar a expressão quantitativa do mRNA dos genes *ANXA1* (anexina-1) e *LGALS1* (galectina-1) em gastrite crônica, câncer gástrico em comparação à mucosa normal pela técnica de PCR quantitativo (qPCR);

b) avaliar a expressão das respectivas proteínas por método imuno-histoquímico nas mesmas amostras;

c) investigar a ocorrência de infecção pela *H. pylori* e do genótipo *cagA+* nas amostras de gastrite e câncer gástrico e associação do padrão de expressão gênica com a infecção e genótipo bacteriano, e com outros parâmetros como sexo, idade e tipo histológico do tumor.

III – Capítulo 1: Overexpression of annexin-1 and galectin-1 in chronic gastritis and gastric cancer

Yvana Cristina Jorge¹, Mayra Mioto Mataruco¹, Leandro Pires Araújo¹, Marina Curado Valsechi¹, Alaor Caetano², Kenji Miyazaki³, Célia Sebastiana de Jesus Fazzio⁴, Jorge Alberto Thomé⁵, Paula Rahal¹, Sonia Maria Oliani¹, Ana Elizabete Silva^{1*}

¹ UNESP, São Paulo State University, Department of Biology, Campus São José do Rio Preto, SP, Brazil.

² Centro de Endoscopia Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

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

⁴ Legal Medicine Department and Pathology Service, Hospital de Base, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁵ Instituto de Anatomia Patológica e Citopatológica, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

***Corresponding author:**

Ana Elizabete Silva

UNESP – Departamento de Biologia

Rua Cristóvão Colombo, 2265

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

Phone: +55 17 3221-2384

e-mail: anabete@ibilce.unesp.br

Article Type: Research article

Key words: Annexin-1, Galectin-1, Gastric Carcinogenesis, *Helicobacter pylori*, *cagA*+

Artigo redigido de acordo com as normas do *International Journal of Cancer* (Online ISSN: 1097-0215).

Abbreviations:

ACTB: B-actin gene

AnxA1: Annexin-1

C: Control

CagA: Cytotoxin-associated gene A antigen protein

cag-PAI: cag-Pathogenecity Island

Cell-ECM: Cell-Extracellular Matrix

CG: Chronic gastritis

DGC: Diffuse gastric cancer

EGFR: epidermal growth factor receptor

FAK: focal adhesion kinase

GA: Gastric adenocarcinoma

Gal-1: Galectin-1

H. pylori: *Helicobacter pylori*

HGF: Hepatocyte growth factor

IGC: Intestinal gastric cancer

IL-12: Interleucine-12

iNOS: Inducible nitric oxide synthase

ITP: idiopathic thrombocytopenic purple

PCR: polymerase chain reaction

PIK3: Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide

PLA2: Phospholipase A2

qPCR: Quantitative pymerase chain reaction

SHP-2: protein tyrosine phosphatase

TP53: tumor protein p53

Support: This study was supported by the Brazilian agencies CAPES and CNPq.

Abstract

The aim of this study was to investigate the levels of mRNA and protein expression of annexin-1 (*ANXA1*) and galectin-1 (*LGALS1*) in gastric carcinogenesis and association with *H. pylori* infection and its *cagA*⁺ genotype. We analyzed 40 biopsies of chronic gastritis (CG), 20 of gastric adenocarcinoma (GA) and 10 of normal mucosa (C) by qPCR and immunohistochemical assays. High mRNA expression levels of *ANXA1* was observed in 80% (16/20) of GA cases (mean 4.38±4.77) and in 90% (36/40) of CG cases (mean 4.26±2.03), without significant difference between groups ($p=0.33$). However, for *LGALS1* in 60% (12/20) of GA cases the mRNA levels were slightly overexpressed (mean 2.44±3.26), but constitutive expression was found in CG (mean 0.43±3.13), thus showing significant difference between the groups ($p<0.01$). *H. pylori-cagA*⁺ strains was associated to higher *ANXA1* mRNA expression level only in GA group ($p<0.01$). Immunohistochemistry analysis showed that annexin-1 (AnxA1) and galectin-1 (Gal-1) proteins are not expressed in normal epithelium, but AnxA1 was detected in the mucosa (basal epithelium and stroma) in CG biopsies. In contrast, GA tissues showed immunostaining in all epithelium and stroma. The Gal-1 protein was expressed in the apical portion of epithelium, striated border and stroma in CG and, in all epithelial extension and stroma in GA. In conclusion, whereas *LGALS1* is overexpressed only in gastric cancer, *ANXA1* is upregulated in both gastritis and gastric adenocarcinoma, mainly related with *H. pylori-cagA*⁺ strains, therefore suggesting its role since early stages of gastric carcinogenesis.

Introduction

Chronic inflammation has been recognized as a process that can trigger cancer due to the host immune response with local expression of cytokines, chemokines, adhesion molecules and pro- and anti-inflammatory proteins that stimulate processes such as proliferation, survival, cell migration and neovascularization. The strongest association between chronic inflammation and malignancy is observed in gastric cancer induced by *Helicobacter pylori* infection [1].

The inflammatory process resulting by *H. pylori* infection triggers a cascade of events initialized by chronic gastritis that evolves to gastric atrophy, intestinal metaplasia, dysplasia, and finally carcinoma [2]. The bacterium is present in 90% of all chronic gastritis patients [3] and, in 77% of non-cardia gastric cancers [4].

Both intrinsic factors of the host and the bacterial virulence factors are associated with the gastric cancer development induced by *H. pylori*. Among the bacterial genes is *cagA*, which is detected in about 63% of patients with gastric cancer [5]. The CagA protein is internalized by the host epithelium cells, so it disrupts the cell cycle and induces cell invasion through activation of matrix metalloproteases [6].

Bacterial lipopolysaccharides activate several cell process including expression of annexin-1 (AnxA1) and galectin-1 (Gal-1), both anti-inflammatory proteins. During the inflammatory response, AnxA1 is translocated from the cell cytoplasm to the membrane resulting in a decrease on transmigration of inflammatory cells to the site of injury [7]. Besides, AnxA1 plays its anti-inflammatory role by inhibiting the phospholipase A2 (PLA2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) activities [8]. It is also associated with modifications on cytoskeleton, transport of molecules, ion flux, differentiation and migration, cell growth and apoptosis [9].

Gal-1, a member of a family of carbohydrate-binding proteins, may act as AnxA1 in inflammatory cells transmigration, being important as well in T cells apoptosis. It has been demonstrated that Gal-1 can promote T cell apoptosis by

linking to T-cell receptor thus triggering the Fas/caspase cascade [10]. It also contributes to different events associated with carcinogenesis, including tumor transformation, cell cycle regulation, apoptosis, cell adhesion, migration and inflammation [11,12].

Nevertheless, not many studies have evaluated the expression of those anti-inflammatory mediators in gastric mucosa, and in fact, regarding Gal-1 expression there is only one study in AGS cells [13]. Whereas AnxA1 was studied in gastric tissue for three groups with discrepant findings, as increased expression during ulcerative healing [14], loss of expression in metastatic gastric cancers [15], and higher expression in diffuse-type gastric cancer compared to intestinal-type [16].

Therefore, the aim of this study was to investigate the mRNA expression levels of annexin-1 and galectin-1 by quantitative PCR (qPCR) and expression levels of both proteins by immunohistochemical assay in inflammatory gastric lesion as chronic gastritis in comparison to gastric cancer. We also investigated a possible relationship between mRNA expression levels and *H. pylori* infection and its *cagA*+ virulence genotype in samples of precancerous and neoplastic lesions.

Materials and methods

Subjects

70 gastric biopsies were analyzed from individuals submitted to endoscopy at Hospital de Base and Centro de Endoscopia Rio Preto, both in São José do Rio Preto, SP, Brazil. The histopathological data was supplied respectively by the Pathology Service and Institute of Pathologic and Citopathologic Anatomy (IAPC).

The gastric cancer group (GA) comprised 20 individuals (14 men and six women) with a histopathologically confirmed diagnosis of gastric adenocarcinoma [17] with a mean age of 63.4 ± 14 years (range 41 to 90 years). Eleven cases were diagnosed as diffuse-type adenocarcinoma (DGC) and nine as intestinal-type adenocarcinoma (IGC). The chronic gastritis group (CG) was

composed of 40 individuals (18 men and 22 women) with a histopathologically confirmed diagnosis of chronic gastritis [18], with a mean age of 52.5 ± 15 years (range 23 to 82 years). The biopsies for PCR and immunohistochemical analysis were collected from the antrum and fund regions of the stomach.

The biopsies of control group (C) was obtained from 10 healthy individuals (seven men and three women) with no gastric dyspeptic complains and diagnosed as histologically normal, with mean age of 35 ± 10.8 years (range 19 to 52 years). None of the 70 subjects were under antibiotic or anti-inflammatory treatment. Epidemiological data on the study population were collected using a standard interviewer-administered questionnaire, with questions about current and past occupation, smoking habits, alcohol intake and family history of cancer. About 60% of all patients in GA group were smokers and 40% were drinkers while all patients in CG and C groups were non-smokers and non-drinkers.

The National Research Ethics Committee of the enrolled institution approved this work, and written informed consent was obtained from all individuals.

Nucleic acid extraction and cDNA synthesis

Soon after collection, the biopsies were stored in RNA later solution (Applied Biosystems) at -20°C until RNA extraction to preserve their integrity. The nucleic acid extraction was performed according to the protocol accompanying the reagent Trizol (Invitrogen) that allows the simultaneous extraction of RNA and DNA. RNA and DNA concentration was determined in a NanoDrop[®] ND1000 spectrophotometer.

DNA samples were stored at -20°C and used for molecular diagnosis of *H. pylori*. RNA integrity was visualized by presence of 18S and 28S bands on 1% agarose gel, and RNA samples were stored at -80°C . Total RNA was used for the synthesis of complementary DNA (cDNA) with the enzyme reverse transcriptase. cDNA was synthesized from 2.5 μg of total RNA using random primers and a High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), according to the

manufacturer's instructions. The integrity of all cDNA preparations was tested by PCR assay of a fragment of 613 bp gene *ACTB* (*-actin*) used as control for abundant transcripts, whose primers sequences were F: 5'-GGCATCGTGATGGACTCC-3' and R: 3'-GCTGGAAGGTGGACAGCG-5'. The PCR product was then visualized on 1% agarose gel.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)

The quantitative real-time PCR (qPCR) assay was performed by using the GenAmp 5700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and was carried out according to the instructions for the SybrGreen PCR Core Reagent (Applied Biosystems), using primers specific for the genes *ANXA1* and *LGALS1* [19]. The reference gene *ACTB* was used as internal control of the reaction. The sequences of primers are presented in Table 1.

The expression levels of *ANXA1*, *LGALS1* and *ACTB* mRNA were tested in triplicate and in all experiments negative controls were present. Samples of normal gastric mucosa were mixed to form a pool. The qPCR assays were performed in 10 µL of SYBRTM Green Master Mix (Applied Biosystems), 25 ng of cDNA and 0.4 µM of *ANXA1* and 0.5 µM *LGALS1* primers.

Thermal cycling conditions were: 2min at 50°C and 10min at 95°C for initial denaturation, followed by 40 cycles at 95°C for 15sec and 60°C for 1min, and a dissociation step at 95°C for 15sec, 60°C for 30sec and 95°C for 15sec. To calculate the differential expression we used the mathematical model proposed by Pfaffl [20]. The transcript levels were considered upregulated when the value of gene relative quantification RQ was greater than 2 when used Log₂ expression.

*DNA extraction and molecular diagnosis for *H. pylori-cagA**

To determine the infection by *H. pylori*, DNA samples were subjected to a multiplex PCR reaction containing primers for the bacterial gene *HpX* [21] and for *CYP1A1* (human housekeeping gene), which attests the integrity of DNA. Samples *H. pylori* positive were subjected to a second PCR to investigate the

virulence genotype *cagA*⁺ of the bacteria [22]. The primers sequences are described in Table 1.

In summary, we used 5.0 µL of 10X buffer, 5.0 µL of dNTPs (1.23 mmol/L, Invitrogen), 2.0 µL MgCl₂ (25 mmol/L), 2.0 µL of primers (10 nmol/µL, Invitrogen), 24.5 µL of dH₂O, 5.0 µL of genomic DNA and 0.5 µL of Taq DNA Polymerase (5U/µL, Invitrogen).

The material was processed in automatic thermocycler and it was initially subjected to a temperature of 94°C for 5min for denaturation to occur. Subsequently, amplification was subjected to 40 cycles at 94°C for 45sec, at 60°C for 30sec and at 72°C for 1min and 30sec. The final extension was for 7min at 72°C. The result was seen in 2.0% agarose gel stained with ethidium bromide, in which it was possible to observe fragments of 150 bp and 226 bp for the *CYP1A1* and *HpX* genes, respectively.

In the second PCR to determine the presence of *CagA* gene the same parameters of the previous reaction were used, except the annealing temperature, which in this case was 52°C. The result was observed in 1.0% agarose gel stained with ethidium bromide, in which it was possible to observe the fragment of 232 bp. Positive and negative controls were used in all experiments.

Immunohistochemistry study

Paraffin-embedded sections (4 µm) were incubated for 20min with sodium citrate at 96°C. Then, gastric fragments were treated with hydrogen peroxide (H₂O₂) at 3% diluted in methanol for 30min and washed three times in PBS (pH 7.4) for 15 min. Sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody rabbit polyclonal anti-*ANXA1* (Zymed Laboratories) and with polyclonal rabbit anti-*Gal-1* (Zymed Laboratories) working dilution of 1:2000 and 1:500, respectively, with 1% bovine serum albumin in PBS.

Then, sections were washed for 15min in PBS and incubated with a biotinylated secondary antibody, avidin-conjugated horseradish peroxidase, and enhanced with diaminobenzidine chromogenic substrate (detection kit LSAB) for 1h at room temperature. At the end of the reaction, sections were washed

thoroughly in distilled water, counterstained with hematoxylin, and mounted in BIOMOUNT (British BioCell International). Analysis was conducted with a microscope ZEISS AXIOSKOP 2, using the software AXIOVISION. For each section, 60 points were scored in epithelium and 60 in stroma cells. For statistics it was used the means of each section. Quantification of AnxA1 and Gal-1 proteins was performed with a high-power objective (x40) counting epithelial and stromal areas in 3 fields (20 points in each) of normal, gastritis and tumoral tissues.

Statistical analysis

Firstly, a test was performed to verify if the values had a normal distribution. The data obtained from quantification of mRNA were expressed as mean $\pm$ SD. To determine difference in mRNA relative expression levels between the groups it was used nonparametric Mann-Whitney test. However, to determine the relationship between gene expression and bacterial virulence factor, it was used the nonparametric t test with Welch's correction. Fisher's exact test was used to determine if there were significant differences between groups for presence of bacteria and *cagA* genotype, histological type of tumor, gender and age. The value of protein expression was shown as mean $\pm$ SME. The mean densitometry analysis on the proteins AnxA1 and Gal-1 were compared by ANOVA, followed if significant by the Bonferroni test. Analyses were performed using the software GraphPad InStat and GraphPad Prism4. The p value was considered significant if <0.05 .

Results

*Molecular diagnoses for *H. pylori*-cagA+*

Table 2 presents the results concerning the frequencies of cases with positive molecular diagnosis for *H. pylori* and cases featuring the *cagA*⁺ genotype in groups of CG and GA. All 10 samples of normal mucosa were confirmed by molecular testing as *H. pylori* negative.

From a total of 60 samples of case groups, 45% were *H. pylori* positive, being 40% (16/40) in CG group and 55% (11/20) in GA group, with no significant

difference between groups ($p = 0.29$). For the *cagA*⁺ genotype, 48% of samples were *cagA* positive, which 62.5% (10/16) in CG and 27.3% (3/11) in GA group, also showing no significant difference between groups ($p = 0.12$).

Gene expression analysis

The relative expression levels for *ANXA1* mRNA were increased compared to normal mucosa in 80% (16/20) of GA cases (mean 4.38 ± 4.77) and 90% (36/40) of CG cases (mean 4.26 ± 2.03), so there was no significant difference between the groups ($p = 0.33$).

For *LGALS1*, the mRNA relative expression values found were lower, only the GA group showed overexpression in 60% (12/20) of cases (mean 2.44 ± 3.26), while the CG group showed constitutive expression (mean 0.43 ± 3.13) with only 7.5% (3/40) of cases showing increased expression (Table 3). Thus, *LGALS1* mRNA relative expression was significantly higher in GA group than in CG group ($p < 0.01$).

The possible association of parameters such as age, gender and histological type of gastric cancer with *ANXA1* and *LGALS1* mRNA expression levels were evaluated by Fisher exact test (data not shown), but it was found association only of gender for both *ANXA1* ($p < 0.01$) and *LGALS1* ($p < 0.01$) mRNA comparing gastric cancer and gastritis groups, due to higher expression about 2-3 times in female gender.

ANXA1 and *LGALS1* mRNA expression levels were not associated with the *H. pylori* infection either (Table 4), but *cagA*⁺ genotype showed association with the *ANXA1* expression in GA group, due to a higher mRNA expression in *cagA* positive cases compared to *cagA* negative cases (6.40 vs. 2.77, $p < 0.01$).

Protein expression and by Immunohistochemistry assay

A low level of AnxA1 and Gal-1 expression was observed in stromal cells in normal mucosa (Figure 2A and 3A). In contrast, in the CG mucosa with inflammatory process it was observed cytoplasmic staining in both basal epithelium and stroma cells (Figure 2B). Similar pattern was observed in

intestinal-type adenocarcinoma, with the exception that all extension of the epithelium showed cytoplasmic immunostaining (Figure 2C). On the other hand, diffuse-type adenocarcinoma showed AnxA1 expression in tumor cell cytoplasm, nucleus and plasma membrane (Figure 2D). The mean optical densitometry of protein expression in epithelium and stroma in CG and GA are presented in Figure 2E.

We also investigated the Gal-1 expression in gastritis. The immunohistochemistry demonstrated that the protein is expressed in epithelium apical cytoplasm portion, in striated border and in stroma cells cytoplasm (Figure 3B). In intestinal-type adenocarcinoma Gal-1 is expressed in all epithelium extension and stroma cells (Figure 3C), and in diffuse-type adenocarcinoma protein translocation is observed in the plasma membrane and nucleus, which presented immunoreactivity besides cytoplasm (Figure 3D). Figure 3E shows the epithelium and stroma protein expression mean CG and GA groups.

The data density of AnxA1 and Gal-1 proteins in epithelial and stromal areas in CG and GA are shown in Table 6. For protein AnxA1 the mean density ranged from 182.5 to 192.0 in the epithelium and stroma in both groups. As for Gal-1 protein, these means were somewhat lower, between 152.2 to 161.3. Therefore, no significant differences were observed between groups concerning AnxA1 and Gal-1 expression in epithelium and stroma.

Discussion

In this study we evaluated the mRNA and protein expression of the anti-inflammatory proteins annexin-1 and galectin-1 in a group of precancerous lesion as chronic gastritis compared to gastric cancer and its association with infection by *H. pylori* and *cagA*⁺ genotype of the bacterium. We found high relative expression of *ANXA1* mRNA in 80% of cases of gastric cancer, with expression levels between 3 and 9 times higher (mean 4.38) compared with normal mucosa and *ACTB* reference gene. Similarly, in the inflammatory process, such as chronic gastritis, 90% of cases showed high expression level, with 3 to 8 times greater (mean 4.26).

Our study has shown slightly increased relative expression of galectin-1 only in the GA group (mean 2.44) in 60% of cases, with an increase of 2 to 7 times after normalization with *ACTB* reference gene and comparison with normal mucosa. On the other hand, in CG, the mean value was low (mean 0.43), suggesting that the gene is upregulated only in tumor tissue but not in gastritis. To the best of our knowledge, this is the first study that evaluated expression of annexin-1 and galectin-1 in chronic gastritis.

Studies on annexin-1 in neoplastic processes in the literature are still limited and the results are conflicting. For example, loss of expression was found in squamous cell carcinoma of the esophagus [23], prostatic adenocarcinoma [24], nasopharyngeal cancer [25], and cervical cancer [26]. Moreover, overexpression has been reported in leukemia [27], pancreatic adenocarcinoma [28], bladder transitional cell carcinoma [29] and oral cancers [30], thus suggesting that changes in expression levels of annexin-1 may be related to tissue type.

In gastric tissue, Martin et al. [14] reported that normal gastric mucosa shows very low expression of the protein AnxA1, while in ulcerative healing process there was an increased expression that promoted the reduction of the ulcerative process. On the contrary, Yu et al. [15] observed overexpression of both gene and protein annexin-1 in normal mucosa, but loss of expression in 64% of primary gastric tumors, mainly correlated with advanced stage and metastasis. While Wu et al. [16] have reported differential gene expression of *ANXA1* mRNA that was overexpressed in diffuse-type gastric cancer compared to intestinal-type.

In the present study, the immunohistochemical analysis showed positive immunoreactivity of AnxA1 protein in inflammatory and neoplastic process, but not in normal mucosa, thus confirming the results of mRNA expression analysis. In chronic gastritis, the immunostaining was mainly cytoplasmic, while in tumor cells, besides a cytoplasmic expression it was also observed immunostaining on nucleus and plasma membranes.

Alves et al. [31] showed 87.5% positivity for AnxA1 for larynx tumors, and the immunoreactivity increased in the membrane compared to the cytoplasm and nucleus. However, compared to normal tissue, nuclear and cytoplasmic

expression was lower. In esophageal carcinoma, Liu et al. [32] found an AnxA1 translocation from the nucleus to the plasma membrane.

Changes in the expression pattern of annexin-1 should be related with factors that influence their translocation and export, as the concentration of calcium in cells, considering that when intracellular calcium is increased, the AnxA1 is translocated to membranes [33]. Furthermore, it is reported that protein phosphorylation is also required for this process [19]. In tumor cells, calcium and other factors may be changed, resulting in an abnormal location of AnxA1. However, this relationship needs to be better understood and may be the link between inflammation, signal transduction, differentiation and cellular transport in cancer [31].

To date, little is known about mRNA and protein expression of galectin-1 in stomach carcinogenesis and in other types of cancer. Overexpression of galectin-1 has been reported in some types of cancers such as glioma [34], Hodgkin's lymphoma [35], squamous cell carcinomas of the larynx and carcinomas of the hypopharynx [36]. Conversely, there are also reports of low expression, as in chronic inflammation of nasal polyposis [19], and loss of expression in B-cell lymphoma [25].

The relationship between overexpression of galectin-1 and the neoplastic process may be due to its antagonistic role in the recognition of tumor. Because this protein promotes apoptosis in activated T cells, it results in tumor non-recognition by the immune system [11]. It is also related to chemoresistance, since it inhibits the activity of the *TP53* gene, responsible for apoptosis of cells during chemotherapy[34].

In addition, Saussez et al. [36] showed that besides the increased expression of Gal-1 in tumors of the larynx and hypopharynx, the cellular localization of the protein was also different. In carcinomas, the protein was localized in the cytoplasm, whereas in tumors of lower stage, it could concentrate on nucleus. Our study showed a relationship between mRNA and protein expression levels of Gal-1, i.e. increased in gastric cancer, but constitutive in gastritis. The location of the protein was also different in both lesions, since in

gastritis it was observed cytoplasmic immunostaining and in tumor cells it was present in plasma membrane and nucleus as well.

When we compared the levels of *ANXA1* and *LGALS1* mRNA between the histopathological types of gastric cancer, no significant differences was observed (mean for *ANXA1* in IGC=3.46 and 4.90 in DGC, $p = 0.59$; mean for *LGALS1* in IGC= 2.06 and 2.91 for DGC, $p = 0.67$). However, Wu et al. [16] found overexpression of *ANXA1* mRNA in DGC (means of 4.08) but downregulation in ICG (mean of 0.98).

For *LGALS1* mRNA Chen et al. [37] observed by array assay that it was upregulated in TMC-1 cell lines, indicating that it may be involved with metastasis, so suggesting that it is important during progression of gastric carcinogenesis. However, our results may have been influenced by reduced number of samples in the gastric cancer group (11 diffuse-type and 9 intestinal-type), which may limit statistical analysis.

In addition, we found higher expression levels of *ANXA1* and *LGALS1* mRNA associated with female gender in the gastric cancer group compared to gastritis. It is well known that there is sexual dimorphism in the immune and inflammatory responses in humans. Women produce more vigorous cellular and humoral reactions, are more resistant to certain infections, and suffer a higher incidence of autoimmune diseases than males [38]. Thus it is possible that the hormonal differences may explain part of it. It has also been suggested that the *ANXA1* expression may differ in several types of cancer due to hormonal influence [39].

There are indications that *ANXA1* expression can be induced by 17β -estradiol in CEM-CCRF lymphoma cells, and in a *de novo* mechanism, mediated through cAMP and CREB [39]. According to the same authors, the increase in *ANXA1* expression is likely to be a result of activations of the gene transcription either directly or indirectly by the binding of 17β -estradiol to its receptor, so upregulating the gene activity. Regarding *LGALS1* mRNA expression level there is no data on differential expression between genders. We can hypothesize that due to the fact that women have a stronger immune response; it is plausible to

think that Gal-1 might be one of the molecules that also can present differential expression in females.

The inflammatory process of gastric mucosa observed during the cascade of progression of stomach carcinogenesis is often triggered by *H. pylori* infection. This bacterium is the cause of many gastrointestinal diseases such as peptic ulcer, chronic gastritis, gastric adenocarcinoma and lymphoma, although asymptomatic in most infected individuals [40].

In the present study, we compared the *ANXA1* and *LGALS1* mRNA relative expression levels with the infection by *H. pylori* and its *CagA* virulence factor. No association was observed between *H. pylori* infection and the expression levels of these two genes in both GA and CG groups. However, the *CagA* virulence factor was positively associated with overexpression of *ANXA1* in the GA group, since the mean of mRNA was approximately two times higher in patients infected by *cagA*⁺ strains (6.40 vs. 2.77).

The relationship between the presence of virulence factor *CagA* and gastric carcinogenesis is well documented. Western populations infected with *CagA* positive strains generally have accentuated inflammatory response, with increased risk of developing peptic ulcer and stomach cancer [41]. The phosphorylation of CagA protein activates SHP-2 (protein tyrosine phosphatase), which then inhibits the FAK (focal adhesion kinase), an enzyme that modulates adhesion, migration and cell survival [4]. Consequently, the decline in the activity of FAK triggers a rearrangement of the cytoskeleton known as the hummingbird phenotype, characterized by elongation and spreading of host cells [42]. Furthermore, CagA participates in the cell signaling by activating of PI3K and Ras pathways [1].

Alves et al. [31] suggested that AnxA1 is related to carcinogenesis due to the fact that it serves as a substrate for the EGFR and other kinases involved in tumor development, so it plays an important role in cell proliferation and differentiation [43]. AnxA1 may act through the modulation of mitogen-activated protein kinase signaling, calcium ion mobilization, apoptosis, and cell proliferation [39]. Moreover, the expression of AnxA1 in macrophages is well documented and during infection by *H. pylori*, monocytes and macrophages are

recruited and stimulate the T_h1 response. Consequently, there is an increased production of IL-12, which is associated with development of peptic ulcers in patients infected by *H. pylori cagA*⁺ strains [44].

Similarly, there are reports that Gal-1 has greater expression during carcinogenesis, since it act in different cell processes as inflammation, migration, cell cycle regulation, apoptosis and cell adhesion [11]. It is noteworthy that the *LGALS1* expression was observed increased by *H. pylori* infection, which indicates possible neoplastic progression of gastric epithelial cells by *H. pylori* [13]. This can be explained by the role that Gal-1 plays by binding to laminin and thereby modulating cell–ECM interaction. However, further investigations are needed to determine the relationship between neoplastic progression and the expression of galectin-1 by *H. pylori* in gastric epithelial cells.

Conclusions

In conclusion, our study showed overexpression of both *ANXA1* mRNA and protein in inflammatory lesion as chronic gastritis and gastric cancer, in which it was more upregulated in *H. pylori-cagA*⁺ strains cases, showing its role since early stages of gastric carcinogenesis. However, *LGALS1* was slightly upregulated only in gastric cancer, but not in gastritis, suggesting an association of this gene with progression of gastric cancer. However, the role of these proteins is not fully understood in carcinogenesis, so future investigations are still needed to help clarify the mechanisms by which they act in cancer.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Fuentes-Pananá E, Camorlinga-Ponce M, Maldonado-Bernal C (2009) Infección, inflamación y cáncer gástrico. *Salud pública de méxico* **51**:427-433
2. Correa P (1988) Human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* **48**: 3554-3560

3. Robbins T, Cotran RS, eds. **Stomach**. In *Pathologic bases of diseases*. 6th edition. Philadelphia: Saunders; 2005: 787-801.
4. Nguyen LT, Uchida T, Murakami K, Fujioka T, Moriyama M (2008) *Helicobacter pylori* virulence and the diversity of gastric cancer in Asia. J Med Microbiol **57**:1445–1453
5. Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH (2003) Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology **114**:1169-79
6. Isomoto H, Nishi Y, Ohnita K, Mizuta Y, Kohno S, Ueno H, Nakazato M (2005) The relationship between plasma and gastric ghrelin levels and strain diversity in *Helicobacter pylori* virulence. Am. J.Gastroenterol **100**:1425–1427
7. Gastardelo TS, Damazo AS, Dalli J, FlowerRJ, Perretti M, Olini SM (2009) Functional and Ultrastructural Analysis of Annexin A1 and Its Receptor in Extravasating Neutrophils during Acute Inflammation. Am J Pathol **174**:177-183
8. Parente L, Solito E (2004) Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. Inflamm res **53**:125–132
9. Gerke V, Moss SE (2005) Annexins: linking Ca²⁺ signaling to membrane dynamics. Nat. Rev. Mol. Cell Biol **6**:449–461
10. Matarrese P, Tinari A, Mormone E, Bianco GA, Toscano MA, Ascione B, Rabinovich GA, Malorni W (2005) Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. J Biol Chem **25**:6969–6985
13. Rabinovich GA (2005) Galectin-1 as a potential cancer target. Br J Cancer **92**:1188–1192
12. Gil CD, Cooper D, Rosignoli G, Perretti M, Olini SM (2006) Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. Inflamm Res **55**:99-107

13. Lim JW, Kim H, Kim KL (2003) Cell adhesion-related gene expression by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial AGS cells. *Int J Biochem Cell Biol* **35**:1284–1296
14. Martin GR, Perretti M, Flower RJ, Wallace JL (2008) Annexin-1 modulates repair of gastric mucosal injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**:G764–G769
15. Yu G, Wang J, Chen Y, Wang X, Pan J, Li Q, Xie K (2008) Tissue microarray analysis reveals strong clinical evidence for a close association between loss of annexin A1 expression and nodal metastasis in gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* **25**:695–702
16. Wu C, Lee Y, Wang T, Lee L, Kong W, Chen E, Wei M, Liang Y, Hwang T (2006) Identification of differential gene expression between intestinal and diffuse gastric cancer using cDNA microarray. *Oncology Reports* **15**:57-64
17. Lauren P (1964) The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* **64**:31-49
18. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P (1996) Classification and grading of gastritis: The updated Sydney System. *Am J Surg Pathol* **20**:1161-1181
19. Sena AAS, Provazzi PJS, Fernandes AM, Cury PM, Rahal P, Oliani SM (2006) Spatial expression of two anti-inflammatory mediators, annexin 1 and galectin-1, in nasal polyposis. *Clin Exp Allergy* **36**:1260–1267
20. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:45-48
21. Gatti LL, Lábio R, Silva LC, Smith MAC, Payão SLM (2006) *Cag A* positive *Helicobacter pylori* in Brazilian children related to chronic gastritis. *BJID* **10**:254-258
22. Peek RM, Blaser MJ (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat rev Cancer* **2**:28–36
23. Paweletz CP, Ornstein DK, Roth MJ, Bichsel VE, Gillespie JW, Calvert VS, Vocke CD, Hewitt SM, Duray PH, Herring J, Wang Q, Hu N, Linehan WN, Taylor PR, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Petricoin EF (2000) Loss of annexin 1

correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. *Cancer Res* **60**:6293–6297

24. Kang JS, Calvo BF, Maygarden SJ, Caskey LS, Mohler JL, Ornstein DK (2008) Dysregulation of annexin I protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Clin. Cancer Res* **8**:117–123

25. Rodrigo JP, Garcia-Pedrero JM, Fernandez MP, Morgan RO, Suárez C, Herrero A (2005) Annexin A1 expression in nasopharyngeal carcinoma correlates with squamous differentiation. *Am. J. Rhinol* **19**:483–487

26. Wang LD, Yang YH, Liu Y, Song HT, Zhang LY, Li PL (2008) Decreased Expression of Annexin A1 During the Progression of Cervical Neoplasia. *J Int Med Res* **36**:665-672

27. Falini B, Tiacci E, Liso A, Basso K, Sabattini E, Pacini R, Foa R, Pulsoni A, Favera RD, Pileri S (2004) Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *Lancet* **363**:1869–1870

28. Bai XF, Ni XZ, Zhao P, Liu SM, Wang HX, Guo B, Zhou LP, Liu F, Zhang JS, Wang K, Xie YQ, Shao YF, Zhao SH (2004) Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* **10**:1466-1470.

29. Sheng KH, Yao YC, Chuang SS, Wu H, Wu TF (2006) Search for the tumor-related proteins of transition cell carcinoma in Taiwan by proteomic analysis. *Proteomics* **6**:1058–1065

30. Lin CY, Jeng YM, Chou HY, Hsu HC, Yuan RH, Chiang CP, Kuo MY (2008) Nuclear Localization of Annexin A1 Is a Prognostic Factor in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Surg Oncol* **97**:544–550

31. Alves VA, Nonogaki S, Cury PM, Wünsch-Filho V, de Carvalho MB, Michaluart-Júnior P, Moyses RA, Curioni OA, Figueiredo DL, Scapulatempo-Neto C, Parra ER, Polachini GM, Silistino-Souza R, Oliani SM, Silva-Júnior WA, Nobrega FG, Tajara EH, Zago MA (2008) Annexin A1 subcellular expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology* **53**:715–727

32. Liu Y, Wang HX, Lu N, Mao YS, Liu F, Wang Y, Zhang HR, Wang K, Wu M, Zhao XH (2003) Translocation of annexin I from cellular membrane to the

nuclear membrane in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J. Gastroenterol* **9**:645–649

33. Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Hostettler A, Rescher U, Draeger A (2007) Annexins as intracellular calcium sensors. *Cell Calcium* **41**:207–219

34. le Mercier M, Lefranc F, Mijatovic T, Debeir O, Haibe-Kains B, Bontempi G, Decaestecker C, Kiss R, Mathieu V (2008) Evidence of galectin-1 involvement in glioma chemoresistance. *Toxicol Appl Pharmacol* **229**:172–183

35. Rodig SJ, Ouyang J, Juszczynski P, Currie T, Law K, Neuberg DS, Rabinovich GA, Shipp MA, Kutok JL (2008) AP1-Dependent galectin 1 expression delineates classical Hodgkin and Anaplastic Large Cell Lymphomas from other lymphoid malignancies with shared molecular features. *Clin Cancer Res* **14**:3338–3344

36. Saussez S, Decaestecker C, Lorfèvre F, Chevalier D, Mortuaire G, Kaltner H, André S, Toubreau G, Gabius HJ, Leroy X (2008) Increased expression and altered intracellular distribution of adhesion/growth-regulatory lectins galectins-1 and -7 during tumour progression in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. *Histopathology* **52**:483–493

37. Chen Y, Juan H, Huang H, Huang H, Lee Y, Liao M, Tseng C, Lin L, Chen J, Wang M, Chen J, Chen Y (2006) Quantitative Proteomic and Genomic Profiling Reveals Metastasis-Related Protein Expression Patterns in Gastric Cancer Cells. *Journal of Proteome Research* **5**:2727–2742

38. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM (2005) Sex hormones and the immune response in humans. *Human Reproduction Update* **11**:411–423

39. Ang EZ, Nguyen HT, Sim H, Putti TC, Lim LHK (2009) Annexin-1 Regulates Growth Arrest Induced by High Levels of Estrogen in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Res* **7**:266–74

40. Atherton JC, Blaser MJ (2009) Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J. Clin. Invest* **119**:2475–2487

41. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* **19**:449–490

42. Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, Hatakeyama M (2003) Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. J Biol Chem **278**:3664–3670
43. Radke S, Austermann J, Russo-Marie F, Gerke V, Rescher U (2004) Specific association of annexin 1 with plasma membrane-resident and internalized EGF receptors mediated through the protein core domain. FEBS Lett **578**:95-98
44. Hida N, Shimoyama T Jr, Neville P, Dixon MF, Axon AT, Shimoyama T Sr, Crabtree JE (1992) Increased expression of IL-10 and IL-12 (p40) mRNA in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa: relation to bacterial *cag* status and peptic ulceration. J Clin Pathol **52**:658–664

Table 1. Primers sequences used in *multiplex* PCR to determine *H. pylori* infection and *cagA*+ genotype and primers used in qPCR.

Gene	Sequence 5'-3'
<i>HpX</i>	F:CTGGAGARACTAAGYCCTCC R:GAGGAATACTCATTGCGAAGGCGA
<i>CYP1A1</i>	F:CTCACCCCTGATGGTGCTAT R:TTTGGAAGTGCTCACAGCAG
<i>cagA</i>	F:ATGACTAACGAAACTATTGATC R:CAGGATTTTTGATCGCTTTATT
<i>ANXA1</i>	F:GCAGGCCTGGTTTATTGAAA R:GCTGTGCATTGTTTCGCTTA
<i>LGALS1</i>	F:GGACATCCTCCTGGACTCA R:GTTGAAGCGAGGGTTGAAGT
<i>ACTB</i>	F:TGCCCTGAGGCACTCTTC R:CGGATGTCCACGTCACAC

Table 2. Distribution of infection by *H. pylori* and *cagA*+ strains into chronic gastritis (CG) and gastric adenocarcinoma (GA).

Status	CG N (%)	GA N (%)	p
<i>H. pylori</i>			
Positive	16 (40)	11 (55)	0.29
Negative	24 (60)	9 (45)	
Total	40 (100)	20 (100)	
Genótipo <i>cagA</i>+			
Positive	10 (62,5)	3 (27,3)	0.12
Negative	6 (37,5)	8 (72,7)	
Total	16 (100)	11 (100)	

N: Number of individuals; p<0,05 (significant difference)

Table 3. Comparison of *ANXA1* and *LGALS1* gene expression between chronic gastritis (CG) and gastric adenocarcinoma (GA) groups.

Variable	<i>ANXA1</i>		<i>LGALS1</i>	
	CG	GA	CG	GA
Relative Expression (mean±SD)	4.26±2.03	4.38±4.77	0.43±3.13	2.44±3.26
Relative expression Minimum	-2.97	-7.88	-10.78	-6.95
Maximum	8.90	9.29	10.91	9.28
P		0.33		<0.01*

*Significant difference

Table 4. Comparison between mRNA levels of *ANXA1* and *LGALS1* and infection by *H. pylori* and *cagA*+ strains in chronic gastritis (CG) and gastric adenocarcinoma (GA).

Variable	<i>ANXA1</i>		<i>LGALS1</i>	
	CG	GA	CG	GA
<i>H. pylori</i>				
Positive	16 (40%)	11 (55%)	16 (40%)	11 (55%)
(mean±SD)	4.04±2.59	3.91±5.48	-0.05±3.97	3.33±3.16
Negative	24 (60%)	9 (45%)	24 (60%)	9 (45%)
(mean±SD)	4.40±1.60	4.35±4.05	0.75±2.46	1.36±3.23
p	0.47	0.61	0.24	0.73
Genotype				
<i>cagA</i>				
Positive	10 (62.5%)	3 (27.3%)	10 (62.5%)	3 (27.3%)
(mean±SD)	2.91±2.74	6.40±3.00	-1.57±3.62	2.58±1.26
Negative	6 (37.5%)	8 (72.7%)	6 (37.5)	8 (72.7%)
(mean±SD)	5.49±1.56	2.77±6.52	1.89±3.74	2.80±3.10
p	0.14	< 0.01*	0.09	0.51

*Significant difference

Table 5. Densitometric data regarding to AnxA1 and Gal-1 expression on epithelium and stroma in chronic gastritis (CG) and gastric adenocarcinoma (GA).

	AnxA1		Gal-1	
	CG	GA	CG	GA
Epithelium				
Mean±S.E.M	182.5±4.44	184.2±6.36	156.6±5.61	160.9±6.15
p	1.00		0.63	
Stroma				
Mean±S.E.M	183.9±4.15	192.0±4.55	152.2±7.58	161.3±6.22
p	0.28		0.42	
p<0.05 (significant difference).				

Figure legends:

Figure 1. Expression analyze of annexin-1 (AnxA1). (A) Negative imunostaining on normal epithelium and very little immunoreactivity was detected in stroma. (B) Immunoreactivity on stroma cells cytoplasm and in basal portion of epithelium cytoplasm during gastritis. (C) Positive imunostaining on cytoplasm of stroma cells and in all cytoplasm extension of the epithelium in intestinal-type adenocarcinoma. (D) Immunoreactivity in cell cytoplasm of epithelium and stroma in diffuse-type adenocarcinoma. (E) Epithelium and stroma expression averages on C (Control), CG (Chronic Gastritis) and GA (Gastric Adenocarcinoma) groups. Bar: 20µm.

Figure 2. Expression analyze of galectin-1 (Gal-1). (A) Absence of imunostaining on normal epithelium and very little positivity is found on stroma cell. (B) Immunopositivity was found on stroma cells cytoplasm, on the apical portion of cytoplasm epithelium and striated border in gastritis. (C) Proteic expression on stroma cells cytoplasm and in all epithelium citoplasm extension, besides striated border, in intestinal-type adenocarcinoma. (D) Positive imunostaining on stroma and ephitelium cells cytoplasm in diffuse-type adenocarcinoma. (E) Epithelium and stroma expression averages on C (Control), CG (Chronic Gastritis) and GA (Gastric Adenocarcinoma) groups. Bar: 20µm.

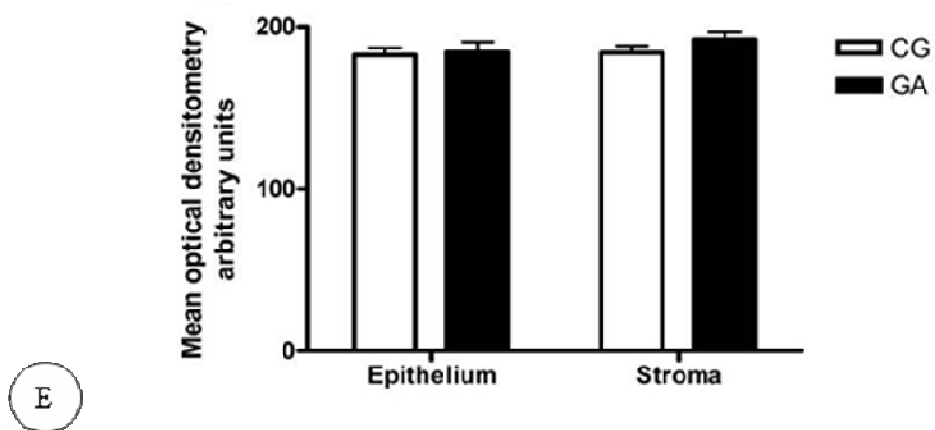
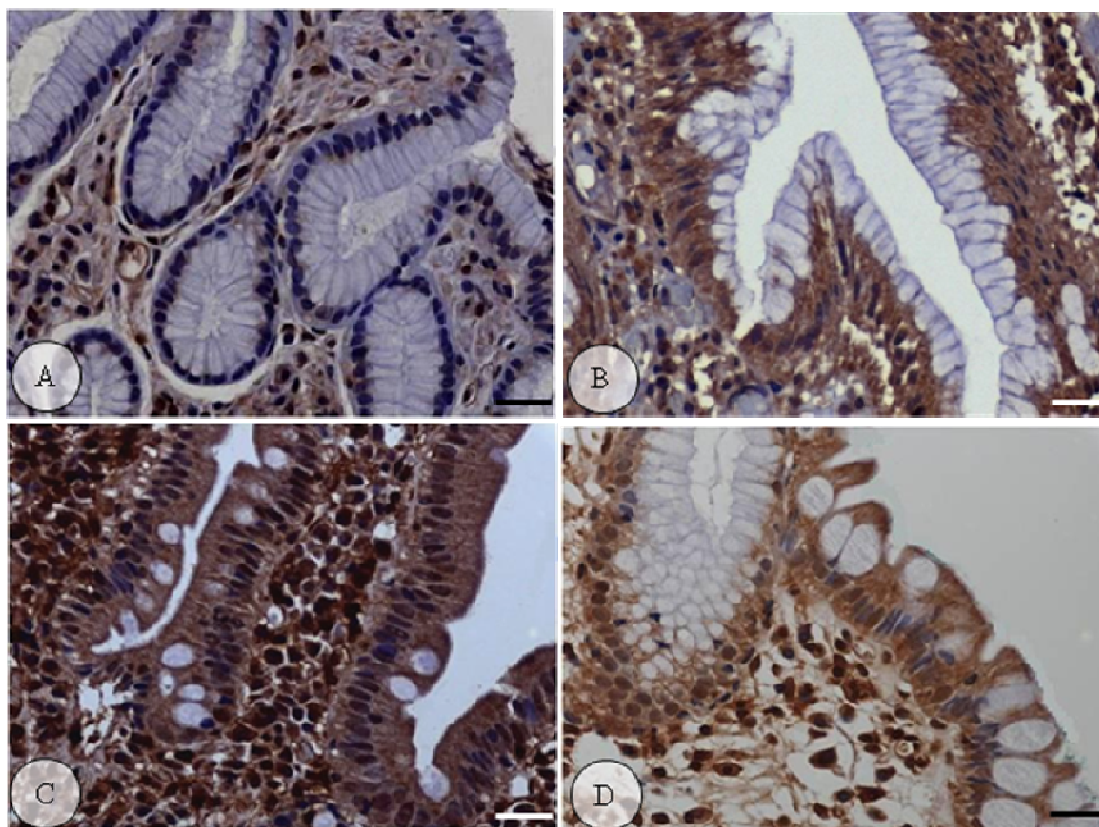


Figure 1.

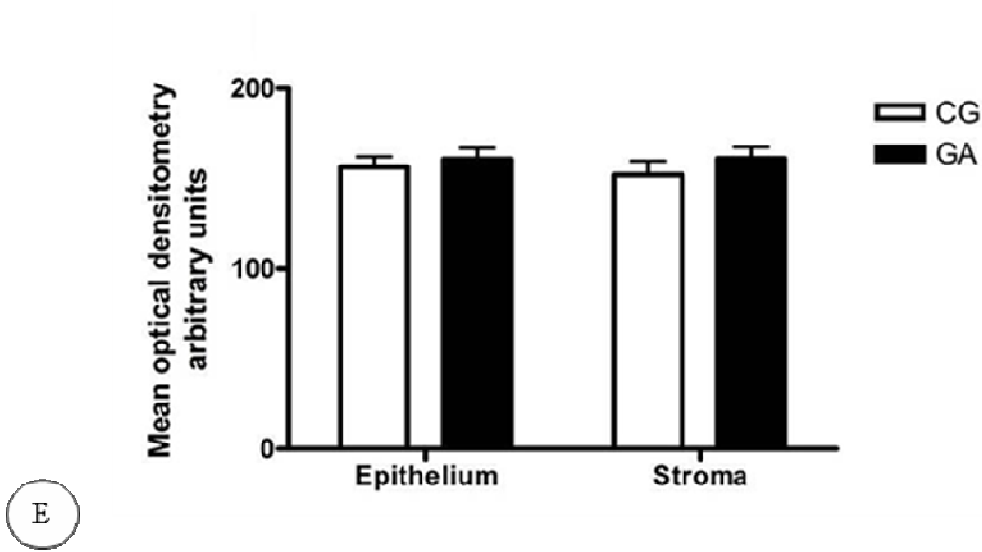
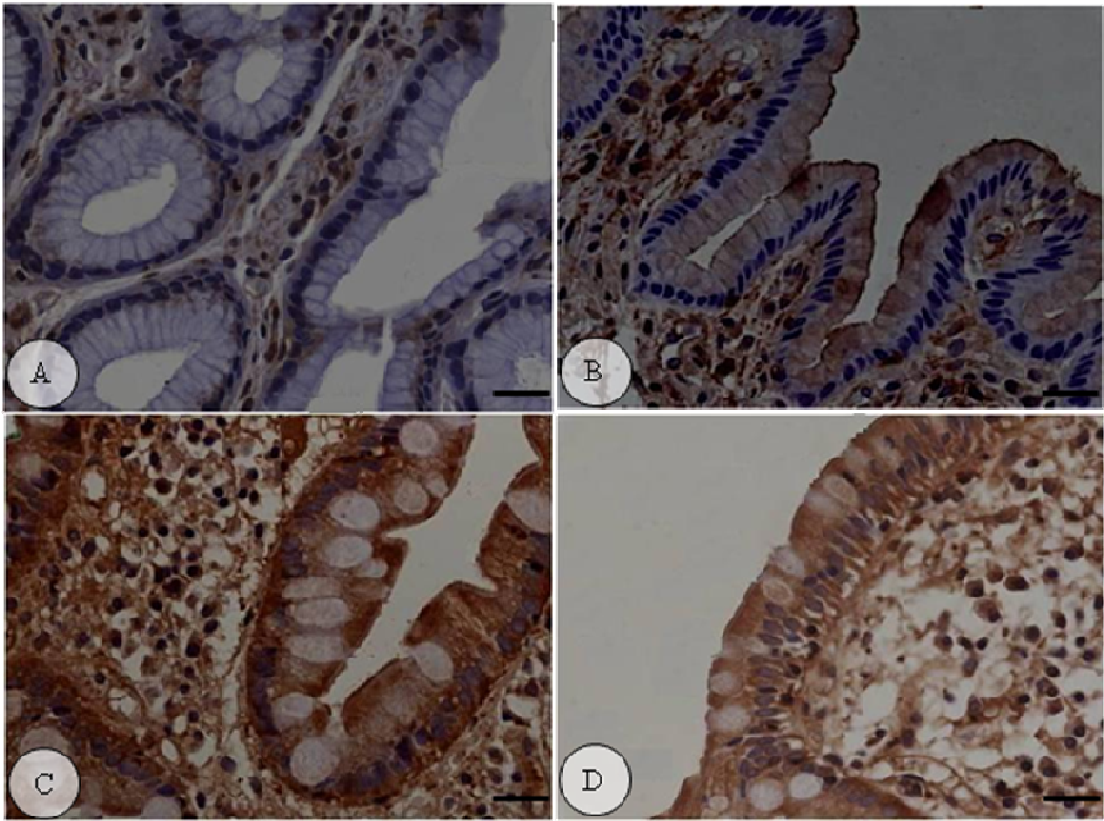


Figure 2.

IV – Discussão

A relação entre câncer e inflamação foi inicialmente estabelecida baseada na hipótese de que os tumores surgem em sítios de inflamação crônica devido ao fato de que algumas substâncias, juntamente com a injúria tecidual, aumentariam a proliferação celular (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Sabe-se que a gastrite crônica, uma lesão pré-neoplásica, é um processo inflamatório resultante, principalmente, da infecção pela *Helicobacter pylori* que desencadeia a cascata que culmina com o câncer gástrico (CORREA, 1988).

Nesse estudo, foi avaliada a expressão de duas proteínas com propriedades anti-inflamatórias, a anexina-1 e a galectina-1, e sua associação com a carcinogênese gástrica e infecção pela *H. pylori* e genótipo *cagA+* da bactéria. Apenas três grupos estudaram a expressão da anexina-1 em mucosa gástrica e, seus resultados foram discordantes. Martin et al. (2008) relataram que mucosa gástrica normal apresentava expressão muito baixa da proteína AnxA1, enquanto durante a cicatrização da úlcera havia um aumento na expressão que promovia a diminuição do processo ulcerativo.

Ao contrário, Yu et al. (2008) observaram expressão gênica e protéica elevadas em mucosa normal e perda de expressão em 64% do tumores gástricos primários, principalmente nos tumores mais avançados e metastáticos. Ainda há um outro estudo que demonstrou expressão diferencial entre os tipos histológicos de adenocarcinoma gástrico, apontando expressão gênica constitutiva (0,98) no tipo intestinal e expressão 4 vezes maior (4,08) no tipo difuso (WU et al., 2006).

Os resultados quanto ao padrão de expressão da anexina-1 em outros tipos de câncer são conflitantes, sugerindo que alterações nos seus níveis de expressão possam estar relacionadas com o tipo tecidual. Por exemplo, perda de expressão foi encontrada em carcinoma de células escamosas de esôfago (PAWELETZ et al., 2000; XIA et al., 2002), adenocarcinoma prostático (KANG et al., 2002) e neoplasia cervical (WANG et al., 2008). Por outro lado, expressão aumentada foi documentada em leucemia (FALINI et al., 2004), adenocarcinoma de pâncreas (BAI et al., 2004) e tumor de células transitórias da bexiga (SHENG et al., 2006).

No presente estudo observamos expressão elevada da *ANXA1* em 80% dos casos de câncer gástrico, com expressão entre 3 e 9 vezes maior em comparação com a mucosa normal, assim como em processo inflamatório, em que 90% dos casos de gastrite crônica apresentaram expressão alta, sendo 3 a 8 vezes maior que a mucosa normal.

Porém para *LGALS1* foi observada expressão relativa elevada apenas no grupo de câncer gástrico em 60% dos casos, com um aumento de 2 a 7 vezes em relação a mucosa normal. Ao contrário, no grupo de gastrite crônica, o valor médio encontrado foi próximo ao nível constitutivo, sugerindo que o aumento de expressão desse gene deve estar associado aos estágios mais tardios da carcinogênese gástrica.

No presente estudo, os níveis de expressão desses genes não foram observados associados com os tipos histológicos do câncer gástrico, em que não foi observada diferença significativa entre os tipos intestinal e difuso. Contudo, como já destacado, Wu et al. (2006) demonstraram que o gene *ANXA1* apresenta expressão elevada no adenocarcinoma tipo difuso em comparação com o tipo intestinal. Esses resultados discrepantes podem estar relacionados com o número reduzido de amostras de câncer gástrico avaliado no presente estudo (11 do tipo difuso e 9 do tipo intestinal), o que pode ter limitado a análise estatística. Portanto, são necessários outros estudos sobre o padrão de expressão desses genes nos subtipos histológicos de câncer gástrico.

A AnxA1 pode estar relacionada ao câncer uma vez que ela é responsável pela ativação da apoptose de neutrófilos, facilitando a subversão do sistema imune pelo tumor (D'ACQUISTO; PERRETTI; FLOWER, 2008). Além disso, a AnxA1 diminui o tráfego e aderência de leucócitos PMN (D'ACQUISTO, 2009). Além disso, desde sua descoberta como substrato de fosforilação pelo fator de crescimento epidermal por De et al. (1986), esta proteína tem sido implicada na carcinogênese por ativar a proteína quinase ativadora de mitose, mobilizar o cálcio e, modular a apoptose e proliferação (ANG et al., 2009).

Por atuar como substrato para o EGF, a AnxA1 é importante na proliferação e diferenciação celular (RADKE et al., 2004). Também possui sítios

de fosforilação de importantes moléculas de sinalização como as quinases associadas ao receptor do fator de crescimento do hepatócito e da proteína quinase C (CHUN-YAN et al., 2008).

Neste estudo, a análise imuno-histoquímica da AnxA1 mostrou imunorreatividade positiva em processo inflamatório e tumoral do estômago, mas não na mucosa normal, assim confirmando a análise de expressão gênica. Em gastrite crônica, imunomarcagem da AnxA1 foi principalmente citoplasmática, enquanto nas células tumorais, além da expressão citoplasmática, também se observou imunomarcagem nuclear e da membrana plasmática.

Alves et al. (2008) demonstraram positividade para AnxA1 nos tumores de laringe, sendo a imunorreatividade maior na membrana em comparação ao citoplasma e núcleo. Em carcinoma esofageal, Liu et al. (2003) constataram uma translocação da AnxA1 do núcleo para a membrana plasmática.

Essas diferenças podem ser explicadas pelos diferentes níveis de cálcio intracelular. Quando a concentração de cálcio está elevada, a AnxA1 está associada às membranas intracelulares e nuclear (MONASTYRSKAYA et al., 2007). Como na transformação tumoral muitos componentes celulares estão alterados, é plausível supor que o cálcio seja um deles e, conseqüentemente, a localização da proteína esteja alterada durante o processo neoplásico.

Quanto à expressão gênica e protéica da galectina-1 em gastrite e câncer de estômago, não há relatos disponíveis na literatura com exceção de Chen et al. (2006) que determinaram o perfil genômico e proteômico em células TMC-1, destacando o gene *LGALS1* como um dos genes com expressão aumentada nessa linhagem celular, sugerindo sua importância no processo metastático no estômago. Esse achado está de acordo com este estudo, em que foi observada expressão relativa elevada de *LGALS1* apenas no grupo de câncer gástrico.

Outros estudos também demonstraram expressão elevada de *LGALS1* em alguns tipos de neoplasias como glioma (le MERCIER et al., 2008), linfoma de Hodgkin (RODIG et al., 2008) e carcinomas de célula escamosa de laringe e hipofaringe (SAUSSEZ et al., 2008b). De modo contrário, também há informações de baixa expressão, como em processo inflamatório crônico de

polipose nasal (SENA et al., 2006) e perda de expressão em linfoma de células B difuso e mediastinal (RODIG et al., 2008).

Assim como a anexina-1, a galectina-1 pode também apresentar um papel antagonico no reconhecimento do tumor. Devido ao fato de essa proteína promover a apoptose de células T ativadas, ela resulta no não reconhecimento do tumor pelo sistema imune. Além disso, ela interage com o proto-oncogene *H-Ras*, mediando a transformação tumoral e modulando o crescimento, adesão e migração celular, atuando, portanto, na metástase. Ela também atua na angiogênese por modular as interações entre as células tumorais e endoteliais (RABINOVICH, 2005).

Em relação à localização imuno-histoquímica, a Gal-1 apresenta-se na membrana plasmática em tumores de laringe de alto grau, enquanto em tumores de menor estadiamento está associada ao núcleo (SAUSSEZ et al. 2008b). No entanto, para mucosa gástrica esse padrão é diferente. Nosso estudo demonstrou que nas células epiteliais, durante o processo inflamatório de gastrite, a expressão é citoplasmática, enquanto nas células tumorais a proteína encontra-se expressa no citoplasma, núcleo e membrana plasmática.

Também foi investigado se ocorria diferença no padrão de expressão dos genes relacionado ao gênero. Isso porque é estabelecida a existência de dimorfismo sexual entre a resposta imune e inflamatória, sendo que as mulheres apresentam-se mais resistentes a infecções e são mais acometidas por doenças auto-imunes do que os homens (BOUMAN et al., 2005). Essa diferença pode ser explicada em parte pelos hormônios. Ang et al. (2009) sugeriram que o padrão de expressão do gene *ANXA1* difere em vários tipos de câncer por influência hormonal. No presente trabalho foi encontrada expressão gênica duas vezes maior do *ANXA1* nas mulheres do grupo de câncer gástrico em comparação com os homens.

Alguns pesquisadores aceitam que o 17β -estradiol (metabólito ativo do estrógeno) modula positivamente a expressão do *ANXA1* em linhagem celular de linfoma, sendo esse mecanismo mediado pelo cAMP e CREB. Esse aumento na

expressão provavelmente é o resultado da transcrição gênica ativada direta ou indiretamente pela ligação do 17 β -estradiol ao seu receptor (ANG et al., 2009).

Expressão diferencial de *LGALS1* em mulheres no grupo de adenocarcinoma gástrico também foi encontrada. Mulheres apresentaram expressão 3 vezes maior que os homens. No entanto não há dados na literatura sobre essa associação. Pode-se hipotetizar que, devido ao fato de mulheres apresentarem resposta imune mais forte, o gene *LGALS1* também esteja diferencialmente expressos nas mulheres.

A *Helicobacter pylori* é o fator de risco mais fortemente associado ao desenvolvimento de úlceras gastrointestinais, ocorrendo em 60-80% das úlceras gástricas e em 95% das úlceras duodenais. Além disso, ela foi a primeira bactéria a ser classificada como carcinógeno pela Organização Mundial da Saúde devido a sua relação epidemiológica com o adenocarcinoma e linfoma gástricos (AMIEVA; EL-OMAR, 2008).

Estima-se que até 80% da população de países em desenvolvimento esteja infectada por essa bactéria (AKÇAM, 2010). Em indivíduos com gastrite crônica, a taxa de infecção é de 90% e, nos pacientes com câncer gástrico é de 60-80% (NGUYEN et al., 2008).

Entretanto, no nosso estudo, apenas 45% dos casos eram positivos para a bactéria, sendo a taxa de infecção de 40% e 55% nos grupos de adenocarcinoma gástrico e gastrite crônica, respectivamente. Esses valores abaixo da média relatada na literatura podem ser explicados pelo número reduzido de indivíduos analisados.

Também investigamos a associação entre o genótipo *cagA*⁺ bacteriano e expressão gênica. O fator de virulência bacteriano *CagA* ativa rearranjos do citoesqueleto e perturba as junções celulares, atuando na proliferação e inibindo a apoptose (BACKERT; MEYER, 2006), favorecendo desse modo a carcinogênese. O presente estudo apontou associação positiva entre o genótipo *cagA*⁺ e expressão elevada de *ANXA1* no grupo de câncer gástrico, com uma média de expressão gênica cerca de 2,5 vezes maior nos indivíduos positivos para essa cepa (6,40 vs. 2,77). A expressão da *AnxA1* em macrófagos é bem documentada

(AMBROSE et al., 1992; PEERS et al., 1993; YANG et al., 1998; KAMAL, FLOWER, PERRETTI, 2005) e, na presença da *H. pylori*, os monócitos e macrófagos são recrutados e estimulam a resposta de células T_h1. Conseqüentemente, há um aumento na produção de IL-12, que está associada ao desenvolvimento de úlceras pépticas na infecção por cepas *H. pylori cagA*⁺ (HIDA et al., 1999).

Em geral, estes resultados indicam uma participação principalmente da anexina-1 durante a progressão da carcinogênese do estômago, possivelmente relacionada à cepa de virulência *cagA*⁺ da *H. pylori*. Contudo, ainda são necessários estudos mais amplos para melhor compreensão dessa relação.

IV – Conclusões

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

a) O gene *ANXA1* apresenta expressão elevada na mucosa gástrica inflamada e tumoral, com níveis médios de expressão cerca de 4,5 vezes maior em comparação a mucosa normal. Portanto, mudanças no padrão de expressão desse gene parecem ser um evento importante no início da carcinogênese gástrica, pois que apresenta expressão elevada já na gastrite, uma lesão pré-neoplásica;

b) Expressão aumentada de *LGALS1* está associada ao câncer gástrico, com nível médio de expressão moderadamente aumentado, ou seja, 2,4 vezes maior quando comparado à mucosa normal, mas não a gastrite crônica, que apresenta expressão constitutiva. Esses dados sugerem o seu envolvimento nos estágios avançados da carcinogênese do estômago;

c) As proteínas AnxA1 e Gal-1 não são expressas na mucosa normal, mas são observadas tanto em gastrite como câncer gástrico, mas com localização diferente, ou seja, com imunomarcacão apenas citoplasmática em gastrite, e também no núcleo e membrana plasmática no tumor.

d) O fator de virulência bacteriano *CagA* encontra-se associado positivamente à expressão elevada do gene *ANXA1* em câncer gástrico, uma vez que nas amostras *cagA*⁺ positivas a expressão desse gene é 2,5 vezes maior que nas amostras negativas;

e) Há indicação de associação do sexo feminino e aumento de expressão de *ANXA1* e *LGALS1* em câncer gástrico.

Referências Bibliográficas

- AKÇAM, M. *Helicobacter pylori* and Micronutrients. **Indian J Pediatr**, v.47, p.119-126, 2010.
- ALMKVIST, J.; KARLSSON, A. Galectins as inflammatory mediators. **Glycoconjugate J**, v.19, p.575-581, 2004.
- ALVES, V.A.; et al. Annexin A1 subcellular expression in laryngeal squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v.53, p.715-727, 2008.
- AMBROSE, M.P.; et al. Lipocortin I production by human alveolar macrophages. **Am J Resp Cell Mol Biol**, v.6, p.17-21, 1992.
- AMIEVA, M.R.; EL-OMAR, E.M. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterol**, v.134, p.306-23, 2008.
- ANG, E.Z.; et al. Annexin-1 Regulates Growth Arrest Induced by High Levels of Estrogen in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Mol Cancer Res**, v.7, p.266-74, 2009.
- ASAKA, M.; et al. Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in Japan: results of a large multicenter study. **Helicobacter**, v.6, p.294-299, 2001.
- ATHERTON, J.C.; BLASER, M.J. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. **J. Clin. Invest**, v.119, p.2475-2487, 2009.
- BACKERT, S.; MEYER, T.F. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. **Curr Opin Microbiol**, v.9, p.207-217, 2006.
- BAI, X.F.; et al. Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. **World J Gastroenterol**, v.10, p.1466-1470, 2004.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v.357, p.539-545, 2001.
- BAMFORD, K.B.; et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. **Gastroenterol**, v.114, p.482-492, 1998.

- BOUMAN, A.; HEINEMAN, M.J.; FAAS, M.M. Sex hormones and the immune response in humans. **Human Reproduction Update**, v.11, p.411–423, 2005.
- BRENNER, H.; ROTHENBACHER, D.; ARNDT, V. Epidemiology of stomach cancer. **Methods Mol Biol**, v.472, p.467-477, 2009.
- BUCKINGHAM, J.C.; et al. Annexin 1, Glucocorticoids, and the Neuroendocrine–Immune Interface. **Ann N Y Acad Sci**, v.1088, p.396–409, 2007.
- CAO, Y., et al. Loss of annexin A1 expression in breast cancer progression. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v.6, p.530-4, 2008.
- CARNEIRO, F.; et al. Molecular targets and biological modifiers in gastric cancer. **Semin Diagn Pathol**, v.25, p.274-87, 2008.
- CERVANTES, A.; et al. Molecular biology of gastric cancer. **Clin Transl Oncol**, v.9, p.208-15, 2007.
- CHELI, R.; GIACOSA, A. Chronic atrophic gastritis and gastric mucosal atrophy—one and the same. **Gastrointest Endosc**, v.29, p.23-25, 1983.
- CHEN, Y.; et al. Quantitative Proteomic and Genomic Profiling Reveals Metastasis-Related Protein Expression Patterns in Gastric Cancer Cells. **Journal of Proteome Research**, v.5, p.2727-2742, 2006.
- CORREA, P. Human model of gastric carcinogenesis. **CancerRes**, v.48, p.3554-3560, 1988.
- COUSSENS, L.M., WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v.420, p.860-867, 2002.
- D’ACQUISTO, F. On the adaptive nature of Annexin-A1. **Curr Opin Pharmacol**, v.9, p:521–528, 2009.
- D’ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R.J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **Brit J Clin Pharmacol**, v.155, p.152–169, 2008.
- D’ACQUISTO, F., et al. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. **Blood**, v.109, p.1095–1102, 2007.

- DE, B.K.; et al. A calcium-dependent 35-kilodalton substrate for epidermal growth factor receptor/kinase isolated from normal tissue. **J Biol Chem**, v.261, p.13784 – 92, 1986.
- DHIRAPONG, A.; et al. The immunological potential of galectin-1 and -3. **Autoimmun Rev**, v.8, p.360–363, 2009.
- DING, Y.M., et al. Increased expression of galectin-1 is associated with human oral squamous cell carcinoma development. **Oncol Rep**, v.21, p.983-7, 2009.
- FALINI, B.; et al. Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). **Lancet**, v.363, p.1869–1870, 2004.
- FLOWER, R.J.; BLACKWELL, G.J. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. **Nature**, v. 278, p. 456-459, 1979.
- GASTARDELO, T.S. et al. Functional and Ultrastructural Analysis of Annexin A1 and Its Receptor in Extravasating Neutrophils during Acute Inflammation. **Am J Pathol**, v.174, p.177-183, 2009.
- GEHARD, M., et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen adhesions. **Pro. Natl.Acad. Sci.USA**, v.96, p.12778-83, 1999.
- GENTA, R.M. Atrophy, metaplasia and dysplasia: are they reversible? **Ital J Gastroenterol Hepatol**, v.3, p.324-325, 1998.
- GERKE, V.; MOSS, S.E. Annexins: linking Ca²⁺ signaling to membrane dynamics. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**, v.6, p.449–461, 2005.
- GIANNAKIS, M.; et al. *Helicobacter pylori* evolution during progression from chronic atrophic gastritis to gastric cancer and its impact on gastric stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v.105, p.4358–4363, 2008.
- HAMADA, H.; et al. High incidence of reflux oesophagitis after eradication therapy for *Helicobacter pylori*: impacts of hiatal hernia and corpus gastritis. **Aliment Pharmacol Ther**, v.6, p.729-35, 2000.
- HAMAJIMA N.; et al. Genetic factors involved in the development of *Helicobacter pylori*-related gastric cancer. **Cancer Sci**, v.97, p.1129-38, 2006.

- HANSSON, L.E.; et al. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. **N. Engl. J. Med**, v.335, p.242–249, 1996.
- HAYES, M.J.; MOSS, S.E. Annexins and disease. **Biochem Biophys Res Commun**, v.322, p.1166–1170, 2004.
- HESSEY, S.J.; et al. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. **Gut**, v.31, p.134–138, 1990.
- HIDA, N.; et al. Increased expression of IL-10 and IL-12 (p40) mRNA in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa: relation to bacterial *cag* status and peptic ulceration. **J Clin Pathol**, v.52, p.658–664, 1992.
- HOKAMA, A.; MIZOGUCHI, E.; MIZOGUCHI, A. Roles of galectins in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 14, p.5133-5137, 2008.
- HUANG, J.Q.; et al. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. **Gastroenterol**, v.114, p.1169-79, 2003.
- HUEBNER, K.; et al. Chromosomal localization of the human genes for lipocortin I and lipocortin II. **Oncogene Res**, v.2, p.299-310, 1988.
- HUO, X.F.; ZHANG, J.W. Annexin1 regulates the erythroid differentiation through ERK signaling pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, v.331, p.1346–1352, 2005.
- INCA – Instituto Nacional do câncer, Ministério da Saúde. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**, Rio de Janeiro, 27 fev. 2010. Disponível em <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em: 24 nov. 2010.
- INOUE, M.; et al. Life-style and subsite of gastric cancer – joint effect of smoking and drinking habits. **Int. J. Cancer**, v. 56, p. 494-499, 1994.
- ISOMOTO, H.; et al. The Relationship between Plasma and Gastric Ghrelin Levels and Strain Diversity in *Helicobacter pylori* Virulence. **Am. J. Gastroenterol**, v.100, p.1425–1427, 2005.
- JELSKI, W.; SZMITKOWSKI, M. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. **Clin. Chim. Acta**, v.395, p.1–5, 2008.

- JONH, C.D.; et al. Annexin A1 and the formyl peptide receptor family: neuroendocrine and metabolic aspects. **Curr Opin Pharmacol**, v.8, p.765–776, 2008.
- KAMAL, A.M.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, p.39-48, 2005.
- KANDULSKI, A.; SELGRAD, M.; MALFERTHEINER, P. *Helicobacter pylori* infection: A clinical overview. **Digest Liver Dis**, v.40, p.619–626, 2008.
- KANG, J.S.; et al. Dysregulation of annexin I protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. **Clin. Cancer Res**, v.8, p.117–123, 2008.
- KUSTERS, J.G.; et al. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Microbiol Rev**, v.19, p. 449–490, 2006.
- LADEIRA, M.S.P.; SALVADORI, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, p.335-342, 2003.
- LANGBEIN, S.; et al. Gene-expression signature of adhesion/growth-regulatory tissue lectins (galectins) in transitional cell cancer and its prognostic relevance. **Histopathology**, v.51, p.681–690, 2007.
- LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand**, v. 64, p.31-49, 1965.
- LEE, K.; et al. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. **Carcinogenesis**, v.30, p.621–625, 2009.
- LEE, Y.; et al. Is Eradication of *Helicobacter pylori* the Feasible Way to Prevent Gastric Cancer? New Evidence and Progress, but Still a Long Way to Go. **J Formos Med Assoc**, v.107, p.591-599, 2008.
- LEHOURS, P.; YILMAZ, O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v.12, p.1–3, 2007.
- LI, C.; LANG, J.; LIU, H.; ZHOU, H. Expression of Annexin-1 in patients with endometriosis. **Chinese Medical Journal**, v.121, p.927-931, 2001.

- LIN, C.Y. et al. Nuclear Localization of Annexin A1 Is a Prognostic Factor in Oral Squamous Cell Carcinoma. **J Surg Oncol**, v.97, p.544–550, 2008.
- LIU, Y.; et al. Translocation of annexin I from cellular membrane to the nuclear membrane in human esophageal squamous cell carcinoma. **World J. Gastroenterol**, v.9, p. 645–649, 2003.
- LUNET, N.; LACERDA-VIEIRA, A.; BARROS, H. Fruit and Vegetables Consumption and Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. **Nutr Cancer**, v.53, p.1-10, 2005.
- MARTIN, G.R.; et al. Annexin-1 modulates repair of gastric mucosal injury. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.294, p.G764–G769, 2008.
- MATARRESE, P.; et al. Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. **J Biol Chem**, v.25, p.6969–85, 2005.
- MATYSIAK-BUDNIK, T.; MÉGRAUD, F. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. **Eur J Cancer**, p.708-716, 2006.
- MEHRABIAN et al. Two members of the S-lac lectin gene family, LGALS1 and LGALS2, reside in close proximity on human chromosome 22q12-q13. **Genomics**, v15, p.418-420, 1993.
- le MERCIER, M.; et al. Evidence of galectin-1 involvement in glioma chemoresistance. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.229, p.172–183, 2008.
- MIEHLKE, S.; et al. The *Helicobacter pylori vacA* s1, m1 genotype and *cagA* is associated with gastric carcinoma in Germany. **Int. J. Cancer**, v.87, p.322–327, 2000.
- MINGHETTI, L.; et al. Down-regulation of microglial cyclo-oxygenase- 2 and inducible nitric oxide synthase by lipocortin 1. **Br J Pharmacol**, v.126, p.1307-1314, 1999.
- MOBLEY, H.L.; HU, L.T.; FOXAL, P.A. *Helicobacter pylori* urease: properties and role in pathogenesis. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v.187, p.39–46, 1991.
- MONASTYRSKAYA, K.; et al. Annexins as intracellular calcium sensors. **Cell Calcium**, v.41, p.207–219, 2007.

- NECCHI, V.; et al. Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol**, v.132, p.1009–1023, 2007.
- NGUYEN, L.T.; et al. *Helicobacter pylori* virulence and the diversity of gastric cancer in Ásia. **J Med Microbiol**, v.57, p.1445–1453, 2008.
- NOURAIE, M.; et al. Childhood hygienic practice and family education status determine the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Iran. **Helicobacter**, v.14, p.40–46, 2009.
- ODENBREIT, S.; et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. **Science**, v.287, p.1497–1500, 2000.
- OFFNER, H.; et al. Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, v.28, p.177-184, 1990.
- OH, J.D.; KARAM, S.M.; GORDON, J.I. Intracellular *Helicobacter pylori* in gastric epithelial progenitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v.102, p.5186–5191, 2002.
- PACIENZA, N.; et al. The immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1 triggers human platelet activation. **Faseb J**, v.22, p.1113–1123, 2008.
- PANANI, A.D. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: Clinical implications. **Cancer Lett**, v.266, p.99–115, 2008.
- PARENTE, L.; SOLITO, E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. **Inflamm Res**, v.53, p.125–132, 2004.
- PAWELETZ, C.P.; et al. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. **Cancer Res**, v.60, p.6293–6297, 2000.
- PEEK, R.M.; BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nat ver Cancer**, v.2, p.28–36, 2002.
- PEERS, S.H.; et al. Glucocorticoid-and non-glucocorticoid induction of lipocortins (annexins) 1 and 2 in rat peritoneal leucocytes in vivo. **Br J Pharmacol**, v.108, p.66-72, 1993.

- PERONE, M.J.; et al. Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. **J Immunol**, v.177, p.5278-5289, 2007.
- PERRETI, M. The annexin 1 receptor(s): is the plot unravelling? **Pharm Sci**, v.24, p.574-579, 2003.
- PETERSSON, C.; et al. *Helicobacter pylori* SabA adhesin evokes a strong inflammatory response in human neutrophils which is down-regulated by the neutrophil-activating protein. **Med Microbiol Immunol**, v.195, p.195–206, 2006.
- RABINOVICH, G.A. Galectin-1 as a potential cancer target. **Br J Cancer**, v.92, p.1188–1192, 2005.
- RABINOVICH, G.A.; et al. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. **J Exp Med**, v.190, p.385-398, 1999.
- RABINOVICH, G.A.; ILARREGUI, J.M. Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: a challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments. **Immunol Rev**, v.230, p.144–159, 2009.
- RIEDER, G., FISCHER, W., HAAS, R. Interaction of *H. pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. **Curr Opin Microbiol**, v.8, p.67–73, 2005.
- ROBBINS, T.; COTRAN, R.S. **Pathologic bases of disease**. Saunders: Philadelphia, 2005.
- RODIG, S.J.; et al. AP1-Dependent Galectin-1 Expression Delineates Classical Hodgkin and Anaplastic Large Cell Lymphomas from Other Lymphoid Malignancies with Shared Molecular Features. **Clin Cancer Res**, v.14, p.3338-3344, 2008.
- RODRIGO, J.P. et al. Epidermal growth factor receptor gene amplification and E-cadherin expression in head and neck carcinomas. **Acta Otorrinolaringol Esp**, v.55, p.482-487, 2004.
- RUDI, J.; et al. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. **J. Clin. Invest.**, v.102, p.1506–1514, 1998.

- SAIKAWA, Y.; et al. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis. **Gastric Cancer**, v.13, p.11–24, 2010.
- SANTUCCI, L.; et al. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. **Hepatology**, v.31, p.399–406, 2000.
- SATIN, B.; et al. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. **J Exp Med**, v.191, p.1467–1476, 2000.
- SAUSSEZ, S.; et al. Increased expression and altered intracellular distribution of adhesion/growth-regulatory lectins galectins-1 and -7 during tumour progression in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. **Histopathology**, v.52, p.483–493, 2008a.
- SAUSSEZ, S.; et al. Serum Galectin-1 and Galectin-3 Levels in Benign and Malignant Nodular Thyroid Disease. **Thyroid**, v.18, p.705–712, 2008b.
- SCOTT, D.R.; et al. The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol**, v.114, p.58–70, 1998.
- SENA, A.A.S., et al. Spatial expression of two anti-inflammatory mediators, annexin 1 and galectin-1, in nasal polyposis. **Clin Exp Allergy**, v.36, p.1260–1267, 2006.
- SEPULVEDA, A.R.; GRAHAM, D.Y. Role of *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. **Gastroenterol Clin North Am**, v.31, p.517–535, 2003.
- SHENG, K.H.; et al. Search for the tumor-related proteins of transition cell carcinoma in Taiwan by proteomic analysis. **Proteomics**, v.6, p.1058–1065, 2006.
- SHIN, V.Y.; CHO, C. Nicotine and gastric cancer. **Alcohol**, v.35, p.259–264, 2005.
- SILISTINO-SOUZA, R.; et al. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. **Int. J. Cancer**, v.120, p.2582–2589, 2007.
- SMITH, M. G. et al. Cellular and molecular aspects os gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v. 12, p. 2979–2990, 2006.

- SUERBAUM, S.; JOSENHANS, C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. **Nat Rev Microbiol**, v.5, p.441–452, 2007.
- TOSCANO, M.A.; et al. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. **J Immunol**, v.176, p.6323-6332, 2006.
- TUMMURU, M.K.; COVER, T.L.; BLASER, M.J. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. **Infect. Immun.**v.61, p.1799–1809, 1993.
- VALE, F.F.; VÍTOR, J.M.B. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas. **Int J Food Microbiol**, v.138, p.1–12, 2010.
- VESPA, G.N.; et al. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. **J Immunol**, v.15, p.799–806, 1999.
- WANG, L.D.; et al. Decreased Expression of Annexin A1 During the Progression of Cervical Neoplasia. **J Int Med Res**, v.36, p.665-672, 2008.
- WEEKS, D.L.; et al. A H⁺-gated urea channel:the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. **Science**, v.287, p.482–485, 2000.
- WU, C.; et al. Identification of differential gene expression between intestinal and diffuse gastric cancer using cDNA microarray. **Oncol Rep**, v.15, p.57-64, 2006.
- XIA, S.H.; et al. Three isoforms of annexin I are preferentially expressed in normal esophageal epithelia but down-regulated in esophageal squamous cell carcinomas. **Oncogene**, v.21, p.6641–6648, 2002.
- XUE, F.B.; et al. Association of H. pylori infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. **World J Gastroenterol**, v.7, p.801-804, 2001.
- YANG, Y. et al. Antiinflammatory effect of lipocortin 1 in experimental arthritis. **Inflammation**, v.21, p.583-596, 1998.
- YE, W., et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric atrophy: risk of adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma of the esophagus and

adenocarcinoma of the gastric cardia. **J. Natl. Cancer Inst**, v.96, p.388–396, 2004.

YU, G., et al. Tissue microarray analysis reveals strong clinical evidence for a close association between loss of annexin A1 expression and nodal metastasis in gastric cancer. **Clin Exp Metastasis**, v.25, p.695–702, 2008.

VII – Anexos

Anexo A – Modelo do Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO PARA AUTORIZAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO EM REALIZAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA EM SER HUMANO DENOMINADA “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL E PROTÉICA DA ANEXINA-1 E GALECTINA-1 NA CARCINOGENESE GÁSTRICA E ASSOCIAÇÃO COM O GENÓTIPO *cagA* DA *Helicobacter pylori*.”

Eu, _____, brasileir_, (estado civil), (profissão), portador_ da CIRG-SSP-SP sob nº _____, inscrit_ no CPMF sob nº _____, domiciliad_ na cidade de _____, onde resido na rua _____, nº _____, assumo, para atingir os devidos fins legais, as seguintes declarações:

- Estou no gozo de plena e perfeita saúde mental;
- Recebi da pesquisadora Yvana Cristina Jorge, brasileira, solteira, bióloga, domiciliada nesta cidade, portadora da CIRG-SSP-SP sob nº 44.116.657-X, inscrita no CPMF sob nº 339.991.218-82, as explicações detalhadas, em linguagem leiga e acessível, que compreendi plenamente, sobre todos os procedimentos para a realização de pesquisa, bem como sobre os termos e as expressões médicas e científicas constantes deste documento;
- Que espontaneamente efetuei todas as disposições de vontades constantes no presente documento;
- Que pretendo me submeter à pesquisa e estou plenamente ciente das obrigações e riscos que assumo nesta oportunidade.

Desta forma, estando plenamente ciente e concorde em participar da pesquisa científica denominada “Avaliação da expressão transcricional e protéica da anexina-1 e galectina-1 na carcinogênese gástrica e associação com o genótipo *CagA* da *Helicobacter pylori*”, efetuei as declarações e autorizações que seguem abaixo:

Fui devidamente informado_ que esta é uma pesquisa científica muito importante, pois os pesquisadores pretendem obter conhecimentos de como as proteínas anti-inflamatórias (naturalmente existentes no interior do estômago) atuam em um estômago saudável, comprando como elas agem no estômago que possui lesões (feridas) e tumores.

Este estudo é necessário porque ainda não existem muitas informações sobre como estas proteínas anti-inflamatórias (anexina-1 e galectina-1) atuam no estômago. Os pesquisadores esperam que, obtendo maiores informações, seja possível num futuro próximo, conseguir tratamentos mais eficazes para a gastrite crônica e também para os tumores, seja através de prevenção ou medicamentos.

A pesquisa será realizada com pessoas que estão com gastrite crônica ou com câncer do estômago e que irão se submeter à biópsia no exame de endoscopia ou à cirurgia de estômago para a retirada do seu tumor.

Para realizar a pesquisa, será analisado no laboratório, o material retirado do meu estômago durante o exame de endoscopia digestiva ou durante a cirurgia.

Este material consiste num pequenino pedaço da parede do meu estômago que será retirado pelo médico, n_ (Nome do Serviço que fará a coleta), para a realização de biópsia.

Antes da realização do exame, me comprometo a participar de uma entrevista onde responderei a um questionário sobre meus dados pessoais e hábitos de vida.

Todas as informações fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo, sem identificação de nenhum participante. O material coletado será identificado apenas por um código.

Os resultados serão utilizados apenas para divulgação em reuniões científicas, também sem identificação dos participantes.

Após a pesquisa, o material biológico cedido pelos pacientes que participaram desta pesquisa será armazenado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana da UNESP.

Estão plenamente assegurados a todos os participantes da pesquisa, os seguintes direitos:

- liberdade para interromper a participação em qualquer momento, se julgarem necessário;
- garantia de sigilo absoluto de identidade.

Diante das informações descritas neste documento, concordo plenamente em participar livre e espontaneamente como sujeito de pesquisa e para tanto autorizo a coleta de dados do meu prontuário médico. Autorizo também que meu médico forneça o material colhido no meu exame/cirurgia e que o serviço responsável pelo diagnóstico histopatológico forneça o material embocado em parafina para a realização dos cortes histológicos pela pesquisadora.

Declaro que antes de assinar, efetuei a completa leitura do presente documento e que compreendi e concordo com o inteiro teor da sua redação.

São José do Rio Preto___ de _____ de 20___.

Assinatura

Anexo B – Modelo do questionário aplicado aos participantes do estudo.**Questionário**

1-Nome Completo:_____. Prontuário:_____.

2-Idade:_____. Sexo:_____.

3-Endereço:_____.

Cidade: _____.

4-Hábito etilista:_____. Hábito tabagista:_____.

5-Cirurgia de vesícula:_____. Outras cirurgias:_____.

6-Doenças crônicas: _____.

7-Motivo da Endoscopia:_____.

8-Medicação diária:_____.

9-Sob medicação antibiótica ou anti-inflamatória:_____.

10- História de câncer na família:_____.

11-Descrição do exame endoscópico:

Data:____/____/____.

Assinatura do paciente_____
Assinatura do pesquisador

Anexo C – Tabela de caracterização das amostras**Anexo C.1** – Tabela de caracterização das amostras do grupo de gastrite crônica (CG).

Código	Idade (anos)	Sexo	Etilismo	Tabagismo	Medicação
G1	56	F	N	N	IBP
G2	46	F	N	N	IBP
G3	59	M	N	N	IBP
G4	73	F	N	N	IBP
G5	50	F	N	N	IBP
G6	28	M	N	N	IBP
G7	58	F	N	N	IBP
G8	52	M	N	N	IBP
G9	27	F	N	N	IBP
G10	66	F	N	N	IBP
G11	71	M	N	N	IBP
G12	46	M	N	N	IBP
G13	48	M	N	N	IBP
G14	35	F	N	N	IBP
G15	49	M	N	N	IBP
G16	40	M	N	N	IBP
G17	32	M	N	N	IBP
G18	70	F	N	N	IBP
G19	54	M	N	N	IBP
G20	23	M	N	N	IBP
G21	44	F	N	N	IBP
G22	54	F	N	N	IBP
G23	63	M	N	N	IBP
G24	82	F	N	N	IBP
G25	59	M	N	N	IBP
G26	67	F	N	N	IBP
G27	62	F	N	N	IBP
G28	39	F	N	N	IBP
G29	51	F	N	N	IBP
G30	49	F	N	N	IBP
G31	48	F	N	N	IBP
G32	53	F	N	N	IBP
G33	27	F	N	N	IBP
G34	67	F	N	N	IBP
G35	55	F	N	N	IBP
G36	68	M	N	N	IBP
G37	80	M	N	N	IBP
G38	77	M	N	N	IBP
G39	34	M	N	N	IBP
G40	42	M	N	N	IBP

M: Masculino; F: Feminino; N:Não; IBP: Inibidor de bomba de prótons

Anexo C.2 – Tabela de caracterização das amostras do grupo de adenocarcinoma gástrico (GA).

Código	Idade (anos)	Sexo	Etilismo	Tabagismo	Medicação	Tipo histológico do tumor
CG1	64	M	N	S	ND	IGC ulcerado invasivo
CG2	90	M	S	S	Pressão	IGC ulcerado invasivo
CG3	78	M	N	S	RANITIDINA	IGC
CG4	46	M	N	S	IBP	DGC anel de Sinete
CG5	78	F	S	S	ND	DGC
CG6	56	F	N	N	ND	DGC
CG7	41	F	N	N	ND	DGC
CG8	48	M	N	N	ASPIRINA	DGC
CG9	68	M	N	N	ND	DGC
CG10	56	M	S	S	ND	IGC metastático
CG11	76	F	S	S	ND	IGC
CG12	75	M	N	N	ND	IGC
CG13	70	M	N	N	ND	IGC
CG14	46	M	S	S	ND	DGC
CG15	58	M	N	N	ND	DGC
CG16	51	M	S	S	ND	IGC
CG17	56	M	N	S	ND	IGC
CG18	86	F	N	S	ND	IGC
CG19	61	M	S	S	ND	DGC
CG20	64	M	S	N	ND	IGC

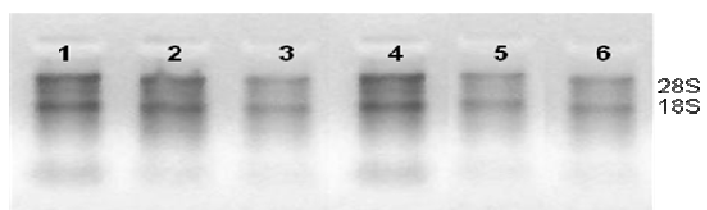
M: Masculino; F: Feminino; N: Não; S: Sim; ND: Não disponível; IBP: Inibidor de bomba de prótons; IGC: adenocarcinoma tipo intestinal; DGC: adenocarcinoma tipo difuso.

Anexo C.3 – Tabela de caracterização das amostras do grupo controle (C).

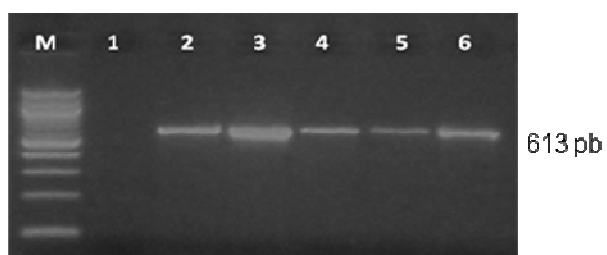
Código	Idade (anos)	Sexo	Etilismo	Tabagismo	Medicação
C1	30	F	N	N	N
C2	19	M	N	N	N
C3	43	M	N	N	N
C4	24	F	N	N	N
C5	36	F	N	N	N
C6	33	M	N	N	N
C7	52	M	N	N	N
C8	43	M	N	N	N
C9	32	M	N	N	N
C10	30	M	N	N	N

F: Feminino; N: Não

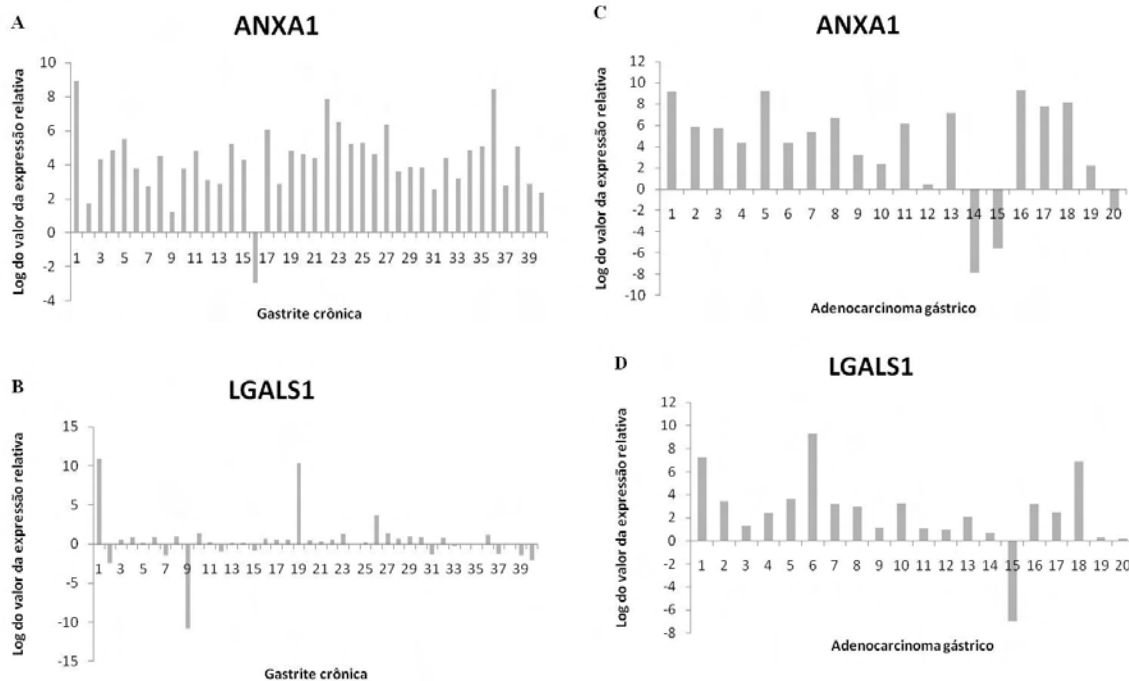
Anexo D – Padrão eletroforético das subunidades 18S e 28S do RNA em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Colunas 1, 2 e 3: amostras de CG; 4 e 5: amostras de GA; 6: amostra C.



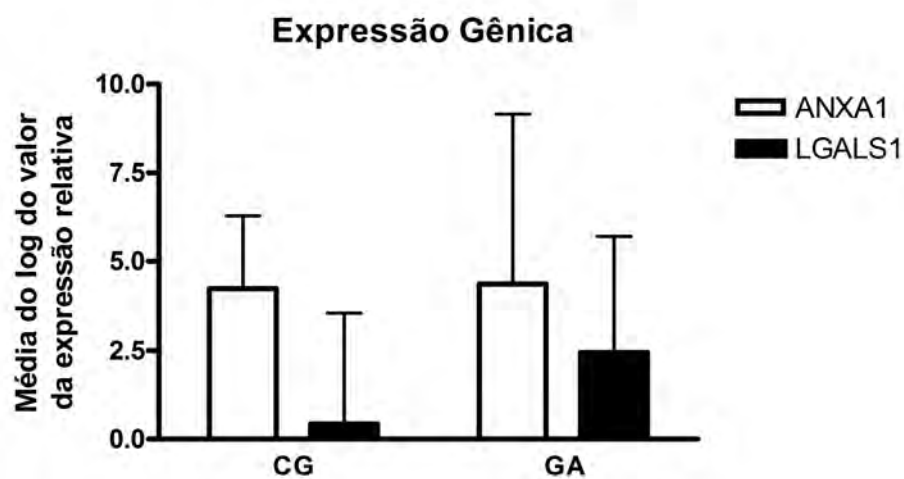
Anexo E - Padrão eletroforético para o gene da *ACTB* amplificado nas amostras de cDNA, evidenciando o fragmento de 613 pb. M: marcador molecular de 100 pb; Coluna 1: controle negativo da reação; 2- 6: amostras de CG.



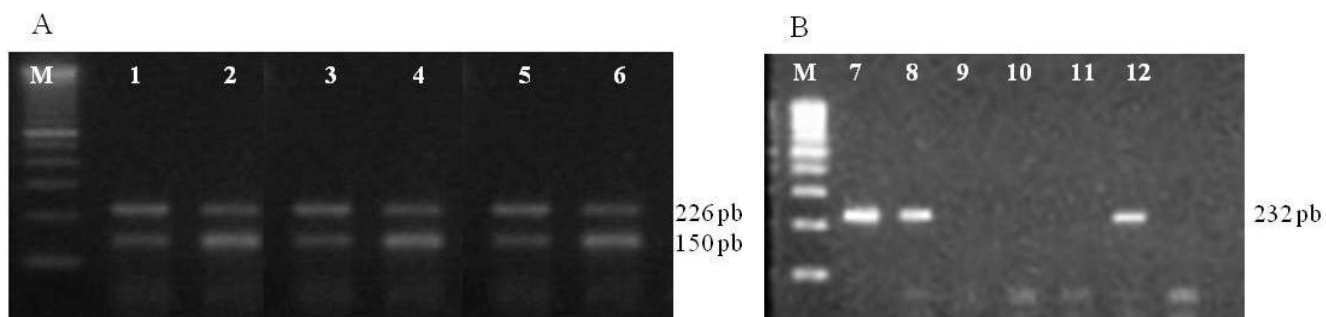
Anexo F – Valor da expressão gênica em log2. **ANXA1**: Expressão gênica nos grupos de gastrite crônica (A) e adenocarcinoma gástrico (C). **LGALS1**: Expressão gênica nos grupos de gastrite crônica (B) e adenocarcinoma gástrico (D).



Anexo G - Médias dos valores de expressão gênica em log2 dos genes *ANXA1* e *LGALS1* nos grupos de gastrite crônica (CG) e adenocarcinoma gástrico (GA).



Anexo H – Eletroforese para detecção da bactéria *H. pylori* e do genótipo *cagA*⁺ nas amostras de DNA. M: Marcador molecular de 100 pb. (A) Produto da reação de amplificação do gene *HpX* (150 pb) e do gene constitutivo *CYP1A1* (226 pb). Colunas 1 a 6: Amostras de CG positivas para *H. pylori*. (B) Amostras *H. pylori*-positivas submetidas à reação de amplificação para o gene *CagA*. Colunas 7, 8 e 12: amostras *cagA*⁺. 9, 10 e 11: amostras *cagA*⁻.



VIII – Apêndices

Apêndice A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto



PARECER CONSUBSTANCIADO PROJETO DE PESQUISA

IDENTIFICAÇÃO

Nome do pesquisador: Yvana Cristina Jorge
Departamento: Depto. Biologia
Instituição: IBILCE/UNESP
Projeto: "Avaliação da expressão transcricional e protéica da Anexina-1 e Galectina-1 na carcinogênese gástrica e associação com o genótipo *cagA* da *Helicobacter pylori*".

PARECER Nº 058/09

O presente parecer refere-se ao projeto de pesquisa "Avaliação da expressão transcricional e protéica da Anexina-1 e Galectina-1 na carcinogênese gástrica e associação com o genótipo *cagA* da *Helicobacter pylori*".

O projeto faz parte da tese de mestrado da pesquisadora Yvana sob a orientação da Profa. Dra. Ana Elizabete Silva do departamento de Biologia desta instituição, com ampla experiência em pesquisa. A pesquisadora recebe bolsa de auxílio CAPES e terá apoio financeiro da FAPESP para a realização dos exames laboratoriais.

Trata-se de um estudo com o objetivo de avaliar a associação existente entre genes codificantes das proteínas antiinflamatórias (anexina 1 e galectina 1) da mucosa gástrica com infecção pelo *Helicobacter pylori* genótipo *cagA*.

O câncer de estômago encontra-se como a quarta neoplasia mais comum e a segunda causa de morte relacionada ao câncer. A gastrite é a sua principal lesão percursora, sendo o *Helicobacter pylori* o fator etiológico com maior associação.

A investigação de fatores genéticos do hospedeiro (ser humano) pode contribuir para um melhor entendimento da doença.

A pesquisa da expressão gênica será feita através da técnica de PCR em tempo real e pelo método imuno-histoquímico, realizado em tecido gástrico. O material para pesquisa será obtido através de biópsia gástrica obtida durante a realização de endoscopia digestiva alta, realizadas no Hospital de Base. A casuística será composta por 60 indivíduos adultos, de ambos os sexos, independente da etnia, sendo 40 com diagnóstico de gastrite crônica e 20 com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico.

O projeto está bem elaborado com introdução, objetivo e material e métodos bem definidos. O TCLE está dentro das normas preconizadas.

A pesquisadora atende os termos da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, portanto o CEP aprova o projeto em questão.

- ☒ APROVADO
☐ COM PENDÊNCIA, máximo de 60 dias para atendimento
☐ RETIRADO
☐ NÃO APROVADO
☐ APROVADO, aguardar apreciação final da CONEP

Datas previstas para apresentação do relatório

1º relatório: setembro/2010 1º relatório: setembro/2011

São José do Rio Preto, 08 de setembro de 2009.


Prof. Dr. Raul Aragão Martins
 Coordenador do CEP

Rua Cristóvão Colombo, 2265 CEP 15054-000 São José do Rio Preto – SP – Brasil
 Tel (17) 3221-2456

Apêndice B – Parecer do Comitê de Ética Ambiental



Formulário 2

OFÍCIO: 22/2009

INTERESSADOS: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva
Yvana Cristina Jorge

ASSUNTO: Parecer

São José do Rio Preto, 21 de Agosto de 2009.

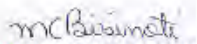
PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL

Trata o presente da análise do potencial de risco dos resíduos químicos a serem gerados do projeto de pesquisa intitulado, “Avaliação da expressão transcricional e protéica da Anexina-1 e Galectina-1 na carcinogênese gástrica e associação com o genótipo *cagA* da *Helicobacter pylori*”. Este projeto de pesquisa será enviado à FAPESP para solicitação de bolsa de mestrado a ser desenvolvido pela aluna Yvana Cristina Jorge, pós-graduanda do Programa de Genética. O projeto será executado Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana, do Depto. de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP – São José do Rio Preto, sob coordenação da Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, também deste Departamento.

Os resíduos químicos gerados em função de procedimentos de laboratório serão devidamente armazenados para posterior encaminhamento ao entreposto de coleta, ou ainda serão tratados e descartados na pia, ou serão incinerados, de acordo com sua natureza. A metodologia para descarte dos resíduos deverá ser realizada de acordo com pesquisa realizada pelo solicitante e encaminhada a Comissão de Ética Ambiental (CEA), que avaliou e aprovou o tratamento proposto.

Sendo assim, esta Comissão julga que os procedimentos estão de acordo com as normas estabelecidas pela CEA/IBLCE.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Márcia Cristina Bisinoti
Comissão de Ética Ambiental
Presidente
IBLCE/UNESP

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Departamento de Química e Ciências Ambientais
Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth CEP 13054-000 – São José do Rio Preto SP Brasil
Tel 17 221 2350 fax 17 221 2356