

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FA CULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

**DETECÇÃO DE AGENTES TUMORIGÊNICOS E SUA  
CORRELAÇÃO COM A INSTABILIDADE DE MICROSATÉLITES  
E O PADRÃO DE METILAÇÃO DE PROMOTORES DOS GENES  
DA CADERINA-E E *MLH1* NO CÂNCER GÁSTRICO**

**CRISTIANE MELISSA THOMAZINI**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Marchesan Rodrigues  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nídia Alice Pinheiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

**Botucatu-SP**

**2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Thomazini, Cristiane Melissa.

Detecção de agentes tumorigênicos e sua correlação com a Instabilidade de Microsatélites e o padrão de metilação de promotores dos genes da caderina-E e *MLH1* no câncer gástrico/ Cristiane Melissa Thomazini. – Botucatu: [s.n.], 2005.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2005.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Marchesan Rodrigues  
Assunto CAPES: 40101053

1. Patologia. 2. Biologia Molecular

CDD 615.1

Palavras chave: Câncer gástrico; *Helicobacter pylori*; caderina-E; *hMLH1*; Instabilidade de Microsatélites

# Índice

<b>Resumo</b> .....	<b>5</b>
<b>Summary</b> .....	<b>8</b>
<b>Revisão da Literatura</b> .....	<b>10</b>
EPIDEMIOLOGIA .....	11
METILAÇÃO NO CÂNCER GÁSTRICO.....	13
<i>Caderina-E</i> .....	14
<i>hMLH-1 e Instabilidade de Microsatélites</i> .....	15
AGENTES TUMORIGÊNICOS.....	16
<i>Helicobacter pylori</i> .....	17
<i>Vírus de Epstein Barr</i> .....	19
<b>Objetivos</b> .....	<b>21</b>
OBJETIVO GERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>23</b>
<b>Trabalho 1</b> .....	<b>32</b>
INFEÇÃO POR <i>HELICOBACTER PYLORI</i> E CÂNCER GÁSTRICO: FREQUÊNCIA DE CEPAS PATOGÊNICAS CAGA E VACA EM PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO.....	33
<i>RESUMO</i> .....	34
<i>ABSTRACT</i> .....	35
<i>INTRODUÇÃO</i> .....	36
<i>MATERIAL E MÉTODOS</i> .....	37
<i>RESULTADOS</i> .....	40
<i>DISCUSSÃO</i> .....	44
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	46
<b>Trabalho 2</b> .....	<b>44</b>
FATORES ETIOLÓGICOS E MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER GÁSTRICO.....	49
<i>RESUMO</i> .....	50
<i>ABSTRACT</i> .....	51
<i>INTRODUÇÃO</i> .....	52
<i>MATERIAL E MÉTODOS</i> .....	54
<i>RESULTADOS</i> .....	58
<i>DISCUSSÃO</i> .....	72

<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	81
<b>Considerações Finais</b> .....	<b>90</b>
<b>Apêndice</b> .....	<b>92</b>
EXTRAÇÃO DO DNA .....	93
ANÁLISE DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO ATRAVÉS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>GAPDH</i> .....	94
DETECÇÃO DA PRESENÇA DA BACTÉRIA <i>HELICOBACTER PYLORI</i> ATRAVÉS DA AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO GENE <i>UREASEC</i> .....	95
GENOTIPAGEM DAS CEPAS DE <i>H. PYLORI</i> , AMPLIFICANDO SEUS PRINCIPAIS GENES DE VIRULÊNCIA: <i>VACA</i> ( <i>S1/S2</i> , <i>M1/M2</i> ) E <i>CAGA</i> .....	95
ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DAS ILHAS CpG DO PROMOTOR DO GENE <i>CADERINA-E</i> E <i>HMLH</i> POR MSP- PCR.....	96
REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DOS DNAs .....	99
ANÁLISE DA PRESENÇA DO VÍRUS DE <i>EPSTEIN BARR</i> (EBV) .....	101
ANÁLISE DE MSI EM BAT26 .....	102

## Resumo

O câncer gástrico (CG) permanece entre as principais causas de morte por câncer no Brasil. É fundamental a identificação de fatores etiológicos e de alterações moleculares que possam ser utilizados como biomarcadores para a detecção precoce, como alvos terapêuticos e fatores prognósticos. O presente estudo investigou a presença de infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e pelo vírus de *Epstein-Barr* em casos de câncer gástrico, bem como distinguiu-os pela identificação de biomarcadores moleculares, tais como instabilidade de microsátélites (MSI) pelo BAT-26 e hipermetilação de regiões promotoras dos genes da caderina-E e *hMLH1* no CG. Foram estudados 42 casos de CG, pareados com tumor e respectivo tecido normal, obtidos de tecido fixado em formalina e incluídos em parafina. Cortes histológicos foram realizados para o diagnóstico histopatológico e para extração do DNA. A identificação do *H. pylori* foi realizada por dois métodos: visualização direta ao microscópio óptico e pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes da *ureaseC*, *cagA*, *vacA* regiões *m* e *s*. Para detecção do EBV, foram utilizadas as técnicas de PCR amplificando *EBNA-1* e por hibridização *in situ* (HIS). A análise de MSI foi feita por PCR com oligonucleotídeos (sendo um deles marcado por FAM) para BAT-26 usando seqüenciador automático ABI 3100 com análise pelo software GeneScan 3.1 (Perkin-Elmer). O padrão de metilação de regiões promotoras dos genes da caderina-E e *hMLH1* foi investigado por MSP-PCR. Os resultados para as 42 amostras de CG foram: 95% das amostras positivas para *H. pylori*, sendo 54,7% e 66,6% positivas para *cagA* e *vacA* respectivamente a cepa mais comumente encontrada foi *cagA m1/s1* com 45,2%. Para EBV pelas técnicas de HIS e PCR foram positivas 2,3%. 71,4% das amostras foram metiladas para caderina-E e 33,3% metiladas para *hMLH-1*. Para MSI foram consideradas positivas as amostras que apresentaram alteração de quatro ou mais pares de bases. Dessa forma obtivemos 16,6% de positividade para MSI. Os resultados encontrados por este trabalho nos permitem concluir que a presença do agente *Helicobacter pylori* e principalmente das cepas *cagA+ m1/s1* na tumorigênese gástrica é de alta relevância para a progressão da mesma. A baixa detecção do agente EBV nesta casuística quando comparada à literatura nos sugere um papel pouco ou não relevante deste agente na

carcinogênese gástrica. Foi possível estabelecer uma relação entre a hipermetilação do promotor do gene da *caderina-E* e infecção pelo *H. pylori*, nesta casuística estudada. Tal metilação correlaciona-se com casos metastáticos, assim é de vital importância um maior aprofundamento nesses estudos com a análise a nível protéico para assim se comprovar o real impacto desta metilação na biologia do tumor. É possível ainda inferir a relação entre infecção por cepas de *cagA+* do *Helicobacter pylori* e instabilidade de microsátélites nessas amostras tumorais. O trabalho com material de arquivo é de grande valia no sentido em que as amostras estão presentes na instituição e dados relacionados à sobrevivência do paciente podem ser acessados com maior facilidade.

## Summary

Gastric cancer remains as one of the most common causes of cancer death in many countries including Brazil. The identification of etiologic factors and molecular biomarkers is very important for early detection and prognosis of this tumor. The aim of the present study was to investigate the rates of infection by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and Epstein-Barr virus (EBV) and their relationships with molecular biomarkers, such as microsatellite instability (MSI) and hypermethylation of *E-cadherin* and *hMLH1* gene promoters in patients with gastric cancer.

Forty-two patients with gastric cancer were studied. *H. pylori* infection was evaluated by histology and PCR for *cagA* and *vacA* genotypes in samples from paraffin-embedded tissues obtained from the tumor and the non-neoplastic surrounding mucosa. EBV genome was assessed by *in situ* hybridization and PCR. MSI was performed by PCR. The methylation status of *E-cadherin* and *hMLH1* gene promoters were investigated by MSP-PCR. The presence of *H. pylori* was detected in 95% cases by PCR, being 57,7% and 66,6% positive for *cagA* and *vacA* respectively. EBV genome was found in only one patient (2,3%) by *in situ* hybridization. MSI was detected in 16,6% patients. Hypermethylation of *E-cadherin* and *hMLH1* gene promoters were detected in 71,4% and 33,3% cases respectively. A relationship between *H. pylori* infection and Hypermethylation of *E-cadherin* was found. We conclude that *H. pylori* infection is frequent in patients with gastric cancer. *H. pylori* strains harboring simultaneously *cagA* and *vacA* *s1/m1* genotypes correlated well with hypermethylation of *E-cadherin* gene promoter in the present series of gastric cancer patients.

**Key words** – Gastric cancer, *Helicobacter pylori*, Epstein-Barr virus, methylation, *E-cadherin*, *hMLH1*, microsatellite instability,

## Revisão da Literatura

### ***Epidemiologia***

O câncer gástrico (CG) representa a segunda causa de óbito mais freqüente no mundo, apresentando marcada variação geográfica em sua incidência. As maiores taxas são encontradas no Japão, Ásia Oriental, Europa Oriental e partes da América Latina, enquanto que as menores taxas estão na América do Norte, Austrália, Nova Zelândia e Índia (Correa, 1992; Miller *et al.*, 1996; Roder, 2002).

Em todo o mundo tem se observado uma diminuição nas taxas de mortalidade por CG nos últimos anos. No Brasil essa redução é mais significativa entre os homens, onde em 1979 a taxa era de 9,69/100.000 e em 2000 passou a ser 8,61/100.000, tendo, portanto, uma variação percentual relativa de -11,2%. Entre as mulheres, a redução neste mesmo período foi de 4,79/100.000 para 4,38/100.000, variando -8,5%. Acredita-se que essa diminuição nas taxas de mortalidade possa estar associada principalmente a uma mudança dos hábitos alimentares da população e também à melhora na qualidade do diagnóstico precoce dessa doença (Boletim Inca, 2005).

Este tipo de neoplasia é mais prevalente entre os homens em relação às mulheres numa proporção 2:1, sendo mais comum em negros do que em brancos (Craanen *et al.*, 1992 ; Correa, 1992).

Mais de 60% dos pacientes com câncer de estômago possuem idade superior a 65 anos de idade. A incidência por idade aumenta de 1,5 por 100.000/ano em indivíduos com menos de 30 anos de idade para 40 por 100.000/ano na faixa de 45 a 64 anos e, posteriormente aumenta para 140 por 100.000/ano em pessoas com mais de 75 anos de idade (Ferlay *et al.*, 1999).

O adenocarcinoma é responsável por mais de 90% das neoplasias malignas do estômago e está subdividido em 2 tipos: intestinal e difuso (Lauren, 1965). Esta classificação está baseada na histologia do tumor, caracterizando duas variedades de adenocarcinomas gástricos, que possuem diferenças: patológicas, epidemiológicas, etiológicas e comportamentais (Hermanek & Wittekind , 1995).

Uma hipótese sobre a carcinogênese gástrica foi proposta em 1992 por Correa (Correa, 1992). De acordo com essa hipótese, a carcinogênese gástrica é um processo multifatorial e de multiestágios que envolvem fatores ambientais e outros fatores, como:

secreção ácida, crescimento de bactérias, produção de compostos de nitritos e nitratos derivados da dieta. Como resultado na cascata de eventos haverá um epitélio gástrico normal sendo transformado ao longo do tempo em um adenocarcinoma do tipo intestinal (Correa, 1992).

O tipo intestinal ou bem diferenciado, (Japanese Gastric Cancer Association, 1998) cuja tendência é formar glândulas, inclui a transformação da mucosa normal numa mucosa semelhante ao epitélio intestinal, conhecido como metaplasia intestinal (MI), a qual aumenta o risco para CG. Subseqüentemente, a MI pode progredir para displasia e terminar no desenvolvimento de um carcinoma (Stemmermann, 1994). O tipo intestinal ocorre principalmente em indivíduos com idade mais avançada, é predominante entre os homens localiza-se principalmente no estômago distal e apresenta associação com a infecção por *Helicobacter pylori*.

Em contraste, o CG do tipo difuso é caracterizado por uma diminuição da coesão celular e grande produção de muco, que tende a substituir a mucosa gástrica pela formação das células em anel de sinete. O câncer do tipo difuso atinge principalmente indivíduos mais jovens e numa mesma proporção homens e mulheres, sua incidência tem apresentado ligeira elevação ao longo do tempo. Está associado a um pior prognóstico comparado com o tipo intestinal (Sipponen & Marshall, 2000).

O diagnóstico do CG ocorre em geral nos estágios avançados da doença o que dificulta o tratamento. Nas últimas décadas, muitos estudos sugerem que alterações genéticas bem como a presença de agentes tumorigênicos estariam envolvidos no desenvolvimento e na progressão do CG. Alguns exemplos dessas alterações genéticas são: a instabilidade genética, polimorfismos gênicos, reativação de telomerasas, transcritos anormais de CD44 incluindo o íntron 9 e a inserção de grupos metil nas ilhas CpG, levando a metilação de genes e de seus promotores (Leung *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2003a).

Dessa forma a patologia molecular pode ser útil não só no entendimento da patogênese do CG, mas também na busca por marcadores moleculares de prognóstico e diagnóstico para esta neoplasia (Becker *et al.*, 2000).

### **Metilação no Câncer Gástrico**

Muitas modificações genéticas têm sido identificadas no aparecimento e na progressão do CG, e essas se caracterizam por mudanças nas funções dos genes supressores de tumor, nos genes do sistema de reparo, juntamente com a instabilidade genética constituindo fatores primordiais para o desenvolvimento e a progressão desta neoplasia (Myung *et al.*, 2000; Chen-Wun *et al.*, 2002).

Estudos recentes têm demonstrado que alterações epigenéticas, que não afetam a seqüência primária do DNA, desempenham papel importante na tumorigênese. Como exemplo temos a metilação do DNA, que se caracteriza pela inserção de radicais metil nas ilhas de CpG do DNA.

Alguns trabalhos demonstraram que a metilação da região promotora de um gene está associada à demora na replicação do DNA e à inibição da transcrição. Como consequência ocorre desregulação do ciclo celular que contribui para o desenvolvimento do câncer (Delgado *et al.*, 1998; Jones & Wolffe, 1999; Jones, 1999). A metilação do promotor do gene *CDKN2A* que codifica para a proteína P16 foi detectada em 42% dos casos de CG (Shim *et al.*, 2000). Outros genes que são metilados no CG são: *APC* (*adenomatous polyposis coli*) em 77,5% dos casos, *caderina-E* de 67,5% (Zivny *et al.*, 2003) a 80,8% (Leung *et al.*, 2001). O gene *p16* encontra-se metilado de 43,8% (Kang *et al.*, 2003b) a 65,4% (Leung *et al.*, 2001) dos casos de CG. A metilação do gene *hMLH1* de 20% (Kang *et al.*, 2003a) a 34,6%, dos casos de câncer de estômago (Leung *et al.*, 2001). Kang e colaboradores (2003b) em estudo utilizando um painel de genes definiram que a metilação em genes supressores de tumores como o *APC* e a perda da adesão celular pela inativação do gene *caderina-E*, estão envolvidos em eventos precoces da oncogênese, enquanto que a metilação em *p14* e *p16* está associada aos estágios intermediários e avançados do CG.

Embora muitas alterações genéticas sejam comuns aos diferentes tipos de CG, algumas são características de determinados tipos histológicos. A inativação do gene *APC* é peculiar ao CG tipo intestinal, presente em até 60% dos tumores intestinais e 25% dos adenomas apresentam LOH ou metilação neste gene (Tahara, 1995). A perda alélica do locus do gene *DCC* (*deletion in colorectal cancer*) é encontrada em aproximadamente 50% dos casos de CG intestinal (Tahara, 1997). Com relação ao CG do tipo difuso as alterações

genéticas mais freqüentes são: a baixa expressão da proteína P16 (Becker *et al.*,2000) e a perda funcional do complexo caderinas/cateninas.

A expressão aumentada do gene *K-SAM* foi detectada em aproximadamente metade dos casos de cânceres de estômago do tipo difuso (Chan *et al.*, 2003; Shirin *et al.*, 2003) e a expressão aumentada de *c-met* (Becker *et al.*, 2000) em até 45% dos casos de CG tipo difuso (Zivny *et al.*,2003). Essas evidências suportam a hipótese de que vias genéticas distintas estejam envolvidas no desenvolvimento dos diferentes tipos histológicos de CG (Chen-Wun *et al.*, 2002).

### ***Caderina-E***

Dentre muitos genes metilados no CG a *caderina-E* desempenha um papel importante por apresentar uma alta freqüência de hipermetilação em tumores com metástase (Tamura *et al.*,2000). O gene *caderina-E (Epithelial)* pertence à lista de outros genes supressores tumorais, está localizado no cromossomo 16q22.1 e codifica para uma glicoproteína transmembrânica de mesmo nome. Este se trata de uma molécula de adesão celular que realiza ligação homofílica cálcio – dependente. A caderina-E conecta e complexa filamentos de actina com cateninas- $\alpha$ , - $\beta$  e - $\gamma$  (Tamura, 2004). Esta proteína pertence à família de proteínas responsáveis pela manutenção da integridade normal tecidual (Tamura, 2002). A perda de expressão da caderina-E ocorre em diferentes tumores humanos e parece estar relacionada com a progressão de um tumor primário para invasão e metástase. Muitas pesquisas vêm demonstrando que mecanismos envolvendo hipermetilação do gene *caderina-E* podem estar vinculados à perda de função do mesmo. A expressão anormal dessa molécula, devido à perda e redução da função, está freqüentemente associado a uma diferenciação em carcinomas e/ou invasão tumoral (Tamura, 2004). Outros autores dizem que a inativação da *caderina-E* por hipermetilação é comum nos dois tipos histológicos (Kim *et al.*, 2004). Em mais de 75% dos casos a mutação alélica resulta na completa inativação desta proteína. A mutação do gene *caderina-E* é tipicamente do tipo deleções *in frame*, removendo seqüências completas ou parciais do RNA mensageiro ou pontos de mutação que resultam numa simples mudança de aminoácido. Experimentos com cultura de células demonstraram que mutação em *caderina-*

E resulta na redução de adesão celular, alteração morfológica e aumento da motilidade celular (Hands Schuh *et al.*, 1999).

### ***hMLH-1 e Instabilidade de Microssatélites***

Seqüências específicas compostas por 1 ou até 5 nucleotídeos que se repetem, apresentando uma média de tamanho de 25 a 60 bases distribuídas ao longo do genoma humano são denominadas de microssatélites (Czopek *et al.*, 2002).

Em alguns tumores essas seqüências são instáveis, geradas por deslizamento da fita no processo de replicação do DNA e/ou na recombinação desigual dos cromossomos. Tal fenótipo é denominado instabilidade de microssatélites (MSI), e alguns estudos mostram sua presença em 25-40% dos casos de CG (Lindal, 1996; Zivny *et al.*, 2003).

MSI é estudada em muitos casos de câncer, incluindo CG (Mironov *et al.*, 1994; Rhyu *et al.*, 1994; Zelada-Hedman *et al.*, 1994). A maior parte dos casos de CG são tumores esporádicos e desta forma apresentam alta freqüência de instabilidade, a qual está associada a defeitos no sistema de reparo do DNA das células epiteliais (Lindal, 1996; Lee *et al.*, 2002). Uma alta freqüência de erros de reparo do DNA leva ao silenciamento de genes críticos cuja inativação pode promover o desenvolvimento tumoral. Provavelmente, essa alta freqüência de MSI no CG esporádico deva estar relacionada à inativação epigenética do gene *hMLH-1* em associação com a metilação de seu promotor e a perda da proteína *hMLH1* (Leung *et al.*, 1999).

Leung *et al.* demonstraram que a hipermetilação do gene *hMLH-1* está exclusivamente presente em alta freqüência no câncer gástrico tipo esporádico e que este conseqüentemente apresenta alta freqüência para MSI (Leung *et al.*, 1999).

A síndrome HNPCC tem como principal causa a instabilidade de microssatélites devido à mutação em genes do sistema de reparo tais como *MLH1* e *MSH2*. Muitos estudos relacionaram mutações nesses genes a um maior risco para o CG (Lynch & Smyrk, 1996; Watson & Lynch, 1993).

A freqüência de MSI no CG é de 10%, 20% em adenomas gástricos e 30% em adenomas associados a carcinomas (Kim *et al.*, 2001). A presença de MSI em estágios

precoces da oncogênese gástrica sugere que esta alteração possa ser útil como marcador de risco para CG (Becker *et al.*, 2000).

Otini e colaboradores (1997) mostraram que a frequência de MSI está associada de forma significativa com tumores distais no estômago. Palli e colaboradores (2001) demonstraram a relação entre o risco de hábitos alimentares, tais como consumo de carne vermelha e a presença de MSI.

A metilação do promotor de *hMLH-1* é observada na maioria dos CG esporádicos e apresentam alta frequência de MSI (Kang *et al.*, 2002).

Em 1997 foi realizado um *workshop* em Bethesda onde foram discutidas a nomenclatura e definição (entre outros aspectos) da instabilidade de microsátélites, visto que, existiam naquela época muitas definições e nomenclaturas para MSI, fazendo-se necessário um encontro de pesquisadores para que o termo fosse universalizado. Cinco microsátélites foram recomendados como painel de referência no estudo de HNPCC: BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 e D17S250. Ainda neste *workshop* foram definidos os termos MSI-H (alta MSI = MSI em mais de 2 *locus* ou em 2 *locus*), MSI-L (baixa MSI= MSI em 1 *locus*) e MSS (microsatélite estável = MSI em nenhum dos *locus* estudados) (Boland *et al.*, 1998).

Um marcador altamente sensível a MSI é o *BAT-26*, que possui uma extensão de 26 adeninas. Por apresentar pouca variação entre os indivíduos é denominado monomórfico (Chapelle, 1999).

O *BAT-26* poliA dentro do gene *hMSH2* é suficiente para estabelecer o padrão de erros de replicação dos tumores, possuindo uma eficiência maior que 99% na identificação dessas regiões (Iacopetta & Hamelin., 1998).

### ***Agentes Tumorigênicos***

Estudos recentes têm demonstrado correlação entre CG e a presença de agentes infecciosos como *Helicobacter pylori* (Go, 2002; Takeuchi *et al.*, 2003) e o vírus *Epstein-Barr* (Chan *et al.*, 2003).

### ***Helicobacter pylori***

Em 1994 o *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) foi classificado pela Organização Mundial da Saúde como agente carcinogênico do grupo I para a ocorrência de neoplasias gástricas (IARC, 1994). Esse microorganismo está presente em 50% da população mundial, e apresenta mais que 70% de prevalência entre os países em desenvolvimento (Rivas-Traverso *et al.*, 2000).

A infecção por *H. pylori* está associada com diferentes processos patológicos gastroduodenais e com mais da metade dos casos de câncer de estômago (O'Connor *et al.*, 1996; GO, 2002). De modo geral, o *H. pylori* está associado com risco duas a seis vezes maiores para câncer de antro e corpo gástrico. Além disto, está associado ao desenvolvimento do linfoma gástrico do tipo MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*). Uma doença linfoproliferativa que resulta da estimulação contínua de antígenos provenientes da infecção crônica pelo *H. pylori*. A erradicação da bactéria leva à regressão do linfoma (Wotherspoon *et al.*, 1993).

Forman e colaboradores, em 1990, descreveram a presença de anticorpos contra essas bactérias no soro de indivíduos que posteriormente apresentaram CG. Outro trabalho demonstrou associação entre a prevalência de infecção por *H. pylori* e mortalidade por câncer de estômago (Forman, 1991).

O *H. pylori* coloniza locais inóspitos como a mucosa gástrica, mas para sobreviver num pH ácido este microorganismo desenvolveu a capacidade de neutralizar esse pH através da produção da enzima urease. Uma proteína que atua promovendo a hidrólise da uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando a produção de amônia. Esta atua como receptor de íons H<sup>+</sup>, gerando pH neutro ao redor da bactéria, o que confere ao *H. pylori* resistência à acidez gástrica (Weeks & Sachs, 2001).

Diferentemente da produção de urease, a qual é essencial para a sobrevivência da bactéria na mucosa gástrica, outros fatores de virulência conferem uma ampla diversidade genética as cepas de *H. pylori*, entre eles, os expressos por dois genes principais: *cagA* e *vacA* capazes de determinar diversos tipos de lesão no hospedeiro (Zambon *et al.*, 2003; Van Doorn *et al.*, 1998).

O gene *cagA* localiza-se numa ilha de patogenicidade, no cromossomo bacteriano, na qual foram identificados mais de trinta genes possivelmente associados à virulência bacteriana.

O gene *cagA* é responsável pela expressão de uma citotoxina (*cag* – *cytotoxin associated gen*) e também considerado como marcador da ilha de patogenicidade (Peek & Blaser, 2002; Björkholm *et al.*, 2003). Esta ilha contém genes homólogos aos de outras bactérias que codificam componentes do sistema de secreção tipo IV, que atua como “agulha” ao injetar a molécula efetora da bactéria na célula hospedeira, permitindo que a bactéria module vias do metabolismo celular da célula hospedeira, incluindo a expressão de proto-oncogenes (Covacci *et al.*, 1999; Covacci & Rappuoli, 2000).

Ao comparar-se cepas de *H. pylori cagA*- e cepas *cagA*+, essas últimas possuem maior capacidade de desenvolver determinadas doenças como o CG distal. Além disso, observou-se que cepas que apresentam esse gene produzem inflamação cinco vezes mais intensa do que a induzida por cepas que não o possuem (Queiroz *et al.*, 1998 e Peek & Blaser, 2002). Parsonnet e colaboradores (1997) mostraram que pacientes infectados por cepas que expressam *cagA* tem probabilidade 3 vezes maior de desenvolver o CG.

Outro gene, presente em todas as cepas de *H. pylori* é o *vacA*. Este é capaz de induzir a formação de canais seletivos de ânions nas células epiteliais, levando a exudação da urease e dessa forma pode contribuir para indução de danos ao DNA celular (Salama *et al.*, 2001; Tombola *et al.*, 2001).

O gene *vacA* compreende 2 porções variáveis: *s* e *m*. A região *s* codifica o sinal peptídico e está localizada no final da cadeia 5', possui 2 alelos *s1* e *s2*; e a região média (*m*) possui os alelos *m1* e *m2*. A combinação em mosaico dos alelos das regiões *s* e *m* determinam a produção de citotoxinas, responsáveis pelo grau de virulência da bactéria. As cepas portadoras do genótipo *vacA s1/m1* produzem grande quantidade de toxina, enquanto as cepas *s1/m2* produzem quantidade moderada, e as cepas *s2/m2* e *s2/m1* pouca ou nenhuma toxina (van Doorn *et al.*, 1998).

A presença do gene *vacA* é mais comum nos pacientes com CG do que entre pacientes com gastrite leve (Atherton, 1998).

Além do *H. pylori* outros agentes infecciosos, principalmente os vírus, estão associados com mecanismos de desregulação do ciclo celular e como consequência o desenvolvimento do câncer (Gulley, 2001; Verma, 2003).

### **Vírus de Epstein Barr**

O vírus de *Epstein-Barr* (EBV) é um vírus DNA pertencente à família *Herpesviridae* que compreende o vírus do herpes simples (*HHV-1*), o vírus da varicela zoster (*HHV-2*), o citomegalovírus (*HHV-7*) e o vírus associado ao sarcoma de Kaposi (*HHV-8*).

É considerado um dos vírus mais comuns em humanos, estima-se que mais de 95% dos adultos entre 35 e 40 anos apresentam evidências sorológicas de exposição prévia ao vírus (Trabulsi *et al.*, 1999).

A principal via de transmissão do EBV é a respiratória, através da dispersão do contato com a saliva contaminada e muito raramente ocorre em transfusões de sangue (White *et al.*, 1994).

O EBV está associado a inúmeros tumores tanto linfóides quanto epitelióide, como o linfoma de Burkitt's (zur Hausen *et al.*, 1970; Shiramizu *et al.*, 1991), doença de Hodgkin's (Weiss *et al.*, 1987; Weiss *et al.*, 1989), linfomas de células T (Jones, *et al.*, 1988), carcinoma de nasofaringe (zur Hausen *et al.*, 1970) e linfoepitelioma semelhante a carcinomas de muitos órgãos incluindo glândulas salivares (Krishnamurthy *et al.*, 1987), timo (Leyvraz *et al.*, 1985) e pulmão (Butler *et al.*, 1989).

A partir dos anos 90, muitos artigos descreveram a associação entre carcinoma gástrico e infecção pelo EBV. Em 1991, Shibata e colaboradores (1991) descreveram o primeiro caso de EBV em CG. Posteriormente, muitos autores têm pesquisado a prevalência do EBV nesta neoplasia em diferentes populações em todo mundo, entretanto ainda não se sabe qual o papel deste vírus no câncer de estômago (Karim & Pallesen, 2003; Corvalan *et al.*, 2005).

Embora para alguns autores a relação entre EBV e CG seja controversa, Geradts e colaboradores (2002) demonstraram associação de EBV com carcinoma gástrico em 16% dos casos de CG, em 67 a 100% dos casos de CG com estroma linfóide e 35% dos casos de câncer de coto gástrico.

Geradts e colaboradores (2002) observaram ausência de expressão da proteína P16 por imunohistoquímica em 90% dos casos de câncer gástrico associados ao EBV. Verificaram que esta alteração estava relacionada a inativação do gene *CDKN2A*, devido à metilação da região promotora desse gene.

Certos genes do EBV codificam proteínas homólogas a proteínas normais das células hospedeiras, como por exemplo, o gene *BRFH-1* cujo produto é uma proteína similar à *bcl-2*, cuja função é a inibição da apoptose. Outros produtos virais com importante papel oncogênico incluem o EBNA1 envolvido no rearranjo dos genes de imunoglobulina e na ativação de *c-myc* e *EBNA5*, que inibe a ação de proteínas codificadas por genes supressores como *pRb* e *p53*, sendo esse um dos prováveis mecanismos relacionados à patogênese de neoplasias (Yanai *et al.*, 1999; Soussi, 2000).

## Objetivos

### **Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi investigar o possível envolvimento de diferentes agentes infecciosos na patogênese do Câncer Gástrico, e avaliar a presença da hipermetilação de regiões promotoras de genes alvos, como possíveis marcadores moleculares para diagnóstico de pacientes portadores desta neoplasia.

### **Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

1. Detecção dos genes *ureaseC*, *cagA*, *vacA*, alelos *m* e *s* do *Helicobacter pylori* em amostras de câncer gástrico;
2. Detecção da presença do Vírus *Epstein Barr* pela amplificação de seqüências do gene *EBNA-1* e hibridação do mRNA para *EBER-1*, em amostras de câncer gástrico;
3. Detecção da frequência de instabilidade em microsátélites, utilizando como marcador BAT-26;
4. Determinação do padrão de metilação da região promotora do gene codificante da caderina-E e do gene *hMLH-1*;
5. Verificar correlações dos atributos estudados com os parâmetros anatomopatológicos, com a agressividade biológica e evolução da doença.

## Referências Bibliográficas

- Aguilar GR, Ayala G, Fierros-Zarate G. *Helicobacter pylori*: recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. *Salud Publica Mex.* 2001;43:237-47.
- Ashour AA, Magalhaes PP, Mendes EN, Collares GB, de Gusmao VR, Queiroz DM, et al. Distribution of *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;33:173-8.
- Atherton JC, Sharp PM, Cover TL, Gonzalez-Valencia G, Peek RM Jr, Thompson SA, et al. Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. *Curr Microbiol.* 1999;39:211-8.
- Atherton JC. *H. pylori* virulence factors. *Br Med Bull.* 1998;54:105-20.
- Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut.* 1997;40:701-3.
- Becker KF, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol.* 2000;9:5-11.
- Björkholm B, Falk P, Engstrand L, Nyren O. *Helicobacter pylori*: resurrection of the cancer link. *J Intern Med.* 2003;253:102-19.
- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 1995;55:2111-5
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58:5248-57.
- Boletim do Inca. Ministério da Saúde. Registro Nacional Tumoral. Diagnósticos de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, 2005
- Butler AE, Colby TV, Weiss L, Lombard C. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. *American Journal of Surgical Pathology.* 1989;13:632-9.
- Chan AO, Lam SK, Wong BC, Wong WM, Yuen MF, Yeung YH, et al. Promoter methylation of *E-cadherin* gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. *Gut.* 2003;52:502-6.
- Chapelle A. Review Testing tumors for microsatellite instability. *European Journal of Human Genetics.* 1999;7: 407-8.
- Chen-Wun W, Chin-Wen C, Wen-chang L. Gastric cancer: prognostic and diagnostic advance. *Exp Rev Mol Med.* 2002;21:110-115.

- Choe WH, Lee SY, Lee JH, Shim SG, Kim YH, Rhee PL, et al. High frequency of microsatellite instability in intestinal-type gastric cancer in Korean patients. *Korean J Intern Med.* 2005;20:116-22.
- Correa P. Human Gastric Carcinogenesis: a multistep and multifactorial Process - First American cancer Society Award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Research.* 1992;52:6735-40.
- Corvalan A, Ding S, Koriyama C, Carrascal E, Carrasquilla G, Backhouse C, et al. Association of a distinctive strain of *Epstein-Barr* virus with gastric cancer. *Int J Cancer.* 2005; [Epub ahead of print].
- Covacci A, Rappuoli R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J Exp Med.* 2000;191:587-92.
- Covacci A, Rappuoli. PCR amplification of *Helicobacter pylori* sequences. In: Lee A and Meigraud F, editors. *Helicobacter pylori: techniques of clinical diagnosis.* London; Saunders; 1996. p. 94-111.
- Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* 1999;284:1328-33.
- Craanen ME, Dekker W, Blok P, Ferwerda J, Tytgat GN. Time trends in gastric carcinoma: changing patterns of type and location. *Am J Gastroenterol.* 1992;87:572-9.
- Curi PR. Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas. 2nd ed. Tipomic: Botucatu, 1978.
- Czopek J, Bialas M, Rudzki Z, Zazula M, Pituch-Noworolska A, Zembala M, et al. The relationship between gastric cancer cells circulating in the blood and microsatellite instability positive gastric carcinomas. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16:128-136.
- Delgado S, Gomez M, Bird A, Antequera F. Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *The EMBO Journal.* 1998;17:2426-35.
- Fallone CA, Mitchell A, Paterson WG. Determination of the test performance of less costly methods of *Helicobacter pylori* detection. *Clin Invest Med.* 1995;18:177-85.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0 Lyon: IARC Press, IARC. Cancer Base, No.5., 2001.
- Forman D, Sitas F, Newell DG, Stacey AR, Boreham J, Peto R, Campbell TC, et al. Geographic association of *Helicobacter pylori* antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China. *International Journal of Cancer.* 1990;46:608-11.
- Forman D. The etiology of gastric cancer. *IARC Sci Publ.* 1991;(105):22-32.
- Galm O, Herman JG. Methylation-specific polymerase chain reaction. *Methods Mol Med.* 2005;113:279-91.

- Geradts J, Gulley ML, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. *Epstein-Barr Virus* in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. *J Clin Pathol.* 2002;55:669-75.
- Go MF. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16:3-15.
- Gulley ML, Pulitzer DR, Eagan PA, Schneider BG. *Epstein-Barr* virus infection is an early event in gastric carcinogenesis and is independent of bcl-2 expression and p53 accumulation. *Hum Pathol.* 1996;27:20-7.
- Gulley ML. Review Molecular Diagnosis of *Epstein-Barr Virus*-Related Diseases. *Journal of Molecular Diseases.* 2001;3:300-5.
- Halling KC, Harper J, Moskaluk CA, Thibodeau SN, Petroni GR, Yustein AS, et al. Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *Am J Pathol.* 1999;155:205-11.
- Handschuh G, Candidus S, Luber B, Reich U, Schott C, Oswald S, et al. Tumour-associated *E-cadherin* mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene.* 1999;18:4301-12.
- Harikumar R, Chettupuzha AP, Harish K, Kumar KS, Thomas V. Sub-site specific time trends of carcinoma stomach in North Kerala--a retrospective analysis. *Trop Gastroenterol.* 2005;26:76-9.
- Hassan HA, Sharma VK, Raufman JP. Changing trends in gastric carcinoma at a university medical center: a twelve-year retrospective. *J Clin Gastroenterol.* 2001;32:37-40.
- Hermanek P, Wittekind C. News of TNM and its use for classification of gastric cancer. *World J Surg.* 1995;19:491-5.
- Herrera-Goepfert R, Reyes E, Hernandez-Avila M, Mohar A, Shinkura R, Fujiyama C, et al. *Epstein-Barr* virus-associated gastric carcinoma in Mexico: analysis of 135 consecutive gastrectomies in two hospitals. *Mod Pathol.* 1999;12:873-8.
- Hong SH, Kim HG, Chung WB, Kim EY, Lee JY, Yoon SM, et al. DNA hypermethylation of tumor-related genes in gastric carcinoma. *J Korean Med Sci.* 2005;20:236-41.
- Iacopetta B, Hamelin R. Rapid and nonisotopic SSCP-based analysis of the *BAT-26* mononucleotide repeat for identification of the replication error phenotype in human cancers. *Hum Mutat.* 1998;12:355-60.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994;61:1-241.
- Isguder AS, Nazli O, Tansug T, Bozdog AD, Onal MA. Total gastrectomy for gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2005;52:302-4.

Ishiguro K, Kawakami K, Maeda K, Ishida Y, Omura K, Watanabe G. Microsatellite instability in gastric cancer is closely associated with *hMLH1* hypermethylation at the proximal region of the promoter. *Int J Mol Med*. 2003;12:603-8.

Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, Tubbs RR, Sciotto CG, Wahl R, et al. T-cell lymphomas containing *Epstein-Barr* viral DNA in patients with chronic *Epstein-Barr* virus infections. *New England Journal of Medicine*. 1988;318:733-41.

Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet*. 1999;15:34-7.

Jones PL, Wolffe AP. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol*. 1999;9:339-47.

Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest*. 2003a;83:635-41.

Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along multistep gastric carcinogenesis. *Lab Invest*. 2003b;83:519-26.

Kang GH, Lee S, Shim YH, Kim JC, Ro JY. Profile of methylated CpG sites of *hMLH1* promoter in primary gastric carcinoma with microsatellite instability. *Pathol Int*. 2002;52:764-8.

Karim N, Pallesen G. *Epstein-Barr* virus (EBV) and gastric carcinoma in Malaysian patients. *Malays J Pathol*. 2003;25:45-7.

Kim HS, Lee BL, Woo KD, Bae SI, Kim HW. Assessment of markers for the identification of microsatellite instability phenotype in gastric neoplasms. *Cancer Letters*. 2001;164:61-68.

Kim TY, Jong HS, Jung Y, Kim TY, Kang GH, Bang YJ. DNA hypermethylation in gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20:131-42.

Koriyama C, Akiba S, Iriya K, Yamaguti T, Hamada GS, Itoh T, Eizuru Y, et al. *Epstein-Barr* virus-associated gastric carcinoma in Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians in Sao Paulo. *Jpn J Cancer Res*. 2001;92:911-7.

Krishnamurthy S, Lanier AP, Dohan P, Lanier JF, Henle W. Salivary gland cancer in Alaskan natives, 1966-1980. *Human Pathology*. 1987;18:986-96.

Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2752-6.

Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt at histoclinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.

Lee HS, Choi IS, Lee HK, Kim SH, Yang HK, Kang GH, et al. Distinct Clinical Features and Outcomes of Gastric Cancers with Microsatellite Instability. *Mod Pathol*. 2002;15:632-40.

- Lee YC. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Korean J Gastroenterol*. 2005;46:159-65.
- Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. *hMLH1* promoter methylation and lack of *hMLH1* expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res*. 1999;59:159-64.
- Leung WK, Yu J, Ng EK, To KF, Ma PK, Lee TL, et al. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer*. 2001;91:2294-301.
- Leyvraz S, Henle W, Chahinian AP, Perlmann C, Klein G, Gordon RE, et al. Association of *Epstein-Barr* virus with thymic carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 1985;312:1296-9.
- Lindahl T, Tooze J. *Cancer Surveys*. vol 28 ed. Cold Spring Harbor Lab Press: New York, 1996.
- Liu P, Zhang XY, Shao Y, Zhang DF. Microsatellite instability in gastric cancer and pre-cancerous lesions. *World J Gastroenterol*. 2005;11:4904-7.
- Lo SS, Kuo HS, Wu CW, Hsieh MC, Shyr YM, Wang HC, et al. Poorer prognosis in young patients with gastric cancer? *Hepatogastroenterology*. 1999;46:2690-3.
- Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer*. 1996;78:1149-67.
- Michael-Robinson JM, Reid LE, Purdie DM, Biemer-Huttmann AE, Walsh MD, Pandeya N, et al. Proliferation, apoptosis, and survival in high-level microsatellite instability sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2347-56.
- Miller BA, Kolonel LN, Bernstein L, Young Jr. JL, Swanson GM, West D. *Racial/Ethnic Patterns of cancer in the US 1988-1992*. Bethesda: National Cancer Institute; MD; 1996.
- Mironov NM, Aguelon MA, Potapova GI, Omori Y, Gorbunov OV, Klimenkov AA, et al. Alterations of (CA)<sub>n</sub> DNA repeats and tumor suppressor genes in human gastric cancer. *Cancer Research*. 1994;54:41-4.
- Myung N, Kim MR, Chung IP, Kim H, Jang JJ. Loss of *p16* and *p27* is associated with progression of human gastric cancer. *Cancer Lett*. 2000;153:129-36.
- Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, Nishioka N, Tanaka H, Ohira M, et al. Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2536-40.
- Naumann M. Pathogenicity island-dependent effects of *Helicobacter pylori* on intracellular signal transduction in epithelial cells. *Int J Med Microbiol*. 2005;295:335-41.
- O'Connor F, Buckeley, M O'Morain, C. *Helicobacter pylori*: the cancer link. *JR Soc Méd*. 1996;86:674-8.
- Ottini L, Palli D, Falchetti M, D'Amico C, Amorosi A, Saieva C, et al. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with tumor location and family history in a high risk population from Tuscany. *Cancer Res*. 1997;57:4523-29.

Palli D, Russo A, Ottini L, Masala G, Saieva C, Amorosi A, et al. Red meat, family history, and increase risk of gastric cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 2001;61:5415-19.

Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with *CagA* positive or *CagA* negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 1997;40:297-301.

Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:28-37.

Pinto M, Oliveira C, Machado JC, Cirnes L, Tavares J, Carneiro F, et al. MSI-L gastric carcinomas share the *hMLH1* methylation status of MSI-H carcinomas but not their clinicopathological profile. *Lab Invest.* 2000;80:1915-23.

Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Oliveira AM, Oliveira CA, Magalhaes PP, et al. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer.* 1998;78:135-9.

Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene.* 1994;6:29-32.

Rivas-Traverso F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: Factores de virulência, patologia y diagnóstico. *Rev Biomed.* 2000;11:187-205.

Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2002;5:5-11.

Sakaguchi T, Watanabe A, Sawada H, Yamada Y, Yamashita J, Matsuda M, Nakajima M, Miwa T, Hirao T, Nakano H. Prognostic value of cyclin E and p53 expression in gastric carcinoma. *Cancer.* 1998;82:1238-43.

Salama NR, Otto G, Tompkins L, Falkow S. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun.* 2001;69:730-6.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994;17:914-21.

Saribasak H, Salih BA, Yamaoka Y, Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1648-51.

Seoane A, Bessa X, Balleste B, O'Callaghan E, Panades A, Alameda F, et al. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: relationship with histological subtype and tumor location. *Gastroenterol Hepatol.* 2005;28:60-4

Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM. Association of *Epstein-Barr* virus with undifferentiated gastric carcinoma with intense lymphoid infiltration: lymphoepithelioma-like carcinoma. *American Journal of Pathology.* 1991;139:469-74.

Shibata D, Weiss LM. *Epstein-Barr* virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 1992;140:769-74.

Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of *p16* hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab. Invest.* 2000;80:689-95.

Shiramizu B, Barriga F, Neequaye J, Jafri A, Dalla-Favera R, Neri A, et al. Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and *Epstein-Barr* virus association. *Blood.* 1991;77:1516-26.

Shirin H, Hibshoosh H, Kawabata Y, Weinstein IB, Moss SF. p16Ink4a is overexpressed in *H. pylori*-associated gastritis and is correlated with increased epithelial apoptosis. *Helicobacter.* 2003;8:66-71.

Sipponen P, Marshall BJ. Gastritis and gastric cancer western countries. *Gastroenterol Clin N Am.* 2000;29:579-92.

Soussi T. Cycle cellulaire et apoptose: le gene suppresuer de tumuer p53. *Med Sci.* 2000;16:496-72.

Stemmermann GN. Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. *Cancer.* 1994;74:556-64.

Tahara E. Molecular prognostic factors of gastric cancer. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Internacional G. C. Congress; held in Munich, Germany; Monduzzi. Editore Sp. A. Bologna, Italy 1997: 371-7.

Tahara R. Genetic alteration in human gastrointestinal cancers. *Cancer.* 1995;75:1410-7.

Takeuchi K, Ohno Y, Tsuzuki Y, Ando T, Sekihara M, Hara T, et al. *Helicobacter pylori* Infection and Early Gastric Cancer. *J Clin Gastroenterol.* 2003;36:321-4.

Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, et al. *E-cadherin* gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:569-73.

Tamura G. Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer *Histol Histopathol.* 2002;17:323-9.

Tamura G. Promoter methylation status of tumor suppressor and tumore-related genes in neoplastic and non-neiplastic gastric epithelia *Histol Histopathol.* 2004;19:221-8.

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

Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JAN. *Microbiologia* 3<sup>rd</sup> ed. Atheneu: S. Paul, 1999.

Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DM, et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1999;116:823-30

Van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asbroek M, Sousa JC, et al. Typing of *Helicobacter pylori vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. *Clin Microbiol.* 1998;36:1271-6.

- Verma M. Viral Genes and Methylation. *Ann NY Acad Sci.* 2003;983:170-80.
- Vo QN, Geradts J, Gulley ML, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. *Epstein-Barr* virus in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. *J Clin Pathol.* 2002;55:669-75.
- Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer.* 1993;71:677-85.
- Weeks DL, Sachs G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 2001;40:1249-59.
- Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. Detection of *Epstein-Barr* viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *New England Journal of Medicine.* 1989;320:502-6.
- Weiss LM, Strickler JG, Warnke RA, Purtilo DT, Sklar J. *Epstein-Barr* viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *American Journal of Pathology.* 1987;129:86-91.
- White D, Fenner F. *Medical Virology.* 4th ed. Academic Press: San Diego, California 1994.
- Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1993;342:575-7.
- Wu CW, Chen GD, Jiang KC, Li AF, Chi CW, Lo SS, et al. A genome-wide study of microsatellite instability in advanced gastric carcinoma. *Cancer.* 2001;92:92-101
- Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Chang MC, et al. Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;27:403-11.
- Yanai H, Murakami T, Yoshiyama H, Takeuchi H, Nishikawa J, Nakamura H, et al. *Epstein-Barr* virus-associated gastric carcinoma and atrophic gastritis. *J Clin Gastroenterol.* 1999;29:39-43.
- Zambon, CF, Novaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M. *Helicobacter pylori babA2, cagA, and s1 vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol.* 2003;56:287-91.
- Zelada-Hedman M, Iselius L, Gunven P, Weger A, Nordenskjold M, Skoog L, et al. Genetic rearrangements in sporadic and familial gastric carcinomas detected with microsatellite markers. *European Journal of Surgical Oncology.* 1994;20:667-673.
- Zivny J, Wang TC, Yantiss R, Kim KH, Houghton J. Role of therapy or monitoring in preventing progression to gastric cancer. *J Clin Gastroenterol.* 2003;36:S50-60.
- zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature.* 1970;228:1056-8.

# Trabalho 1

**Infecção por *Helicobacter pylori* e câncer gástrico: frequência de cepas patogênicas *cagA* e *vacA* em pacientes com câncer gástrico.**

*Helicobacter pylori* and gastric cancer: distribution of *cagA* and *vacA* genotypes in patients with gastric carcinoma.

Cristiane Melissa Thomazini<sup>1</sup>, Nídia Alice Pinheiro<sup>2</sup>, Maria Inês de Moura Campos Pardini<sup>2</sup>, Luís Eduardo Naresse<sup>3</sup>, Maria Aparecida Marchesan Rodrigues<sup>4\*</sup>.

1 . Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

2 . Pesquisadora Científica do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

3. Professor Livre-docente do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

4 . Professora Titular do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

**\*Endereço para correspondência:** Maria Aparecida Marchesan Rodrigues  
Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.  
Distrito de Rubião Júnior s/n. CEP 18 618 000 - Botucatu – SP  
e-mail: mariar@fmb.unesp.br

## RESUMO

**Introdução:** Apesar da alta frequência de infecção por *Helicobacter pylori* na população, somente uma minoria de indivíduos desenvolve câncer gástrico. É provável que a colonização da mucosa por cepas patogênicas, levando à maior agressão e inflamação da mucosa seja um dos elos da cadeia de eventos da oncogênese gástrica.

**Objetivos:** Investigar a frequência de cepas patogênicas *cagA* e *vacA* do *H. pylori* na mucosa gástrica de pacientes com câncer gástrico.

**Material e Métodos:** A pesquisa de *cagA* e dos alelos (*s* e *m*) do *vacA* foi feita por PCR em amostras de mucosa gástrica obtidas de material fixado em formalina e incluído em parafina, procedentes de 42 casos de câncer gástrico.

**Resultados:** O gene *cagA* foi detectado em amostras de 23 pacientes (54.7%) com câncer gástrico. O alelo *s1* do gene *vacA* foi identificado em amostras de 24 pacientes (57.1%) o alelo *m1* em amostras de 26 pacientes (61.9%) e *m2* em 3 amostras de câncer gástrico. Os alelos *s1* e *m1* foram identificados simultaneamente em 24 pacientes (45.2%) com câncer gástrico. O alelo *s2* foi identificado em amostras obtidas de 4 pacientes (9.5%) com câncer gástrico. A frequência de infecção pelo *Helicobacter pylori* foi similar em ambos os tipos histológicos de câncer gástrico, intestinal e difuso.

**Conclusões:** Os resultados confirmam a relevância dos genótipos patogênicos *cagA* e *vacA* do *H. pylori* para lesões orgânicas significativas tais como o câncer gástrico, sugerindo a participação desta bactéria na cadeia de eventos da oncogênese gástrica.

**Unitermos:** *Helicobacter pylori*, câncer gástrico, *cagA*, *vacA*.

## ABSTRACT

**Background** – The rates of *Helicobacter pylori* infection are very high worldwide, but only a minority of infected patients develops gastric carcinoma. This might be related, among several factors, to the colonization of the human stomach with pathogenic *Helicobacter pylori* strains.

**Objective:** To investigate the distribution of *cagA* and *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded gastric samples from patients with gastric cancer.

**Material and Methods:** Paraffin- embedded samples from 42 patients with gastric cancer were histologically examined and evaluated by PCR for *H. pylori cagA* and *vacA* (s and m regions) genotypes.

**Results:** The presence of *cagA* gene was detected in 23 (54.7%) patients with gastric cancer. The s1 allele from *vacA* gene was found in samples from 24 (57.1%) patients and the m1 allele in 26 (61.9%) patients. The s1m1 genotype was detected in 24 (45.2%) patients with gastric cancer. The s2 allele was found in samples from 4 patients (9.5%) patients. The distribution of *H.pylori* genotypes was similar in both intestinal and diffuse types of gastric carcinoma.

**Conclusion:** Our results confirm the relevance of the pathogenic *cagA*, *vacA H.pylori* genotypes for significant organic lesions, such as gastric cancer, suggesting a possible role for *H. pylori* in the pathogenesis of gastric carcinoma.

**Key Words** – *Helicobacter pylori*, gastric cancer, *cagA*, *vacA*.

## INTRODUÇÃO

O câncer gástrico permanece entre os problemas mais sérios de saúde em vários países, incluindo o Brasil (Fuchs & Mayer, 1995, Minist Saúde 2002). O diagnóstico geralmente é feito na fase avançada de progressão da doença, o que dificulta a eficácia dos procedimentos terapêuticos e o prognóstico dos pacientes (Chen-Wun et al, 2002). Torna-se, portanto, relevante à identificação de fatores que possam ser utilizados como biomarcadores de risco para esta doença.

Os fatores etiológicos envolvidos na gênese do câncer gástrico não são inteiramente conhecidos. Estudos epidemiológicos demonstram a importância de fatores ambientais, notadamente alimentares, na patogenia do câncer gástrico (Forman 1991; Correa 1992; Roder 2002). Recentemente um novo fator tem sido investigado na oncogênese gástrica. Postula-se que a infecção pelo *Helicobacter pylori* levando à gastrite crônica, à atrofia da mucosa e à metaplasia intestinal, tenha participação na cadeia de eventos da gênese do câncer gástrico (IARC 1994; O'Connor et al 1996; Peek & Blaser, 2002, Ladeira 2003). A presença da bactéria *H. pylori* tem sido fortemente relacionada à incidência de câncer gástrico, dessa forma, em 1994 essa bactéria foi classificada pela Organização Mundial da Saúde como agente carcinogênico do grupo I para a ocorrência de neoplasias gástricas (IARC, 1994). Muitos estudos mostram o possível envolvimento do *H. pylori* no processo carcinogênico do epitélio gástrico. A inflamação persistente provocada pela presença da bactéria pode levar ao aumento da proliferação celular e ao processo oxidativo, desencadeando alterações na conformação de proteínas e também danos no DNA (Jang, 2003). Como o processo carcinogênico envolve acúmulo de alterações genéticas o *H. pylori* poderia atuar na fase inicial da cadeia de alterações que leva ao câncer gástrico (Correa P, 1992). O *H. pylori* está presente em grande número da população mundial, no entanto, ínfima parcela dessa população desenvolve câncer gástrico. O risco é de apenas 1% entre os indivíduos infectados (César , 2002). Assim, as diferentes cepas da bactéria com padrões de virulência distintos poderiam atuar de forma

singular no hospedeiro, levando a diferentes graus de inflamação da mucosa gástrica. A virulência do *H. pylori* tem sido relacionada a diferentes fatores, incluindo a produção de urease, a presença de flagelos e citotoxina vacuolizante (Covacci , 1993).

Em estudos recentes observamos que pacientes com infecção por *Helicobacter pylori* apresentaram danos no DNA das células epiteliais da mucosa gástrica (Ladeira et al 2004a), que se correlacionaram com a intensidade da resposta inflamatória na mucosa e com os genótipos patogênicos *cagA* e *vacA* do *H. pylori* (Ladeira 2004b). Estes resultados abrem a perspectiva de se investigar a possível correlação entre os diferentes genótipos da bactéria e as características clínico-patológicas do câncer gástrico.

A presente investigação visa avaliar a frequência de infecção por *Helicobacter pylori* em amostras de mucosa gástrica, a partir de material fixado em formalina e incluído em parafina, procedentes de pacientes com câncer gástrico, bem como caracterizar pela PCR (reação em cadeia da polimerase), com oligonucleotídeos específicos, os genótipos patogênicos *cagA*, *vacA* da bactéria, e verificar se há correlação com os parâmetros clínico-patológicos da doença.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Casuística**

Quarenta e dois casos de câncer gástrico diagnosticados e arquivados do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – *Unesp*, no período de 1998 a 2004, foram analisados neste estudo. As informações clínicas foram pesquisadas nos prontuários dos pacientes.

### **Seleção das Amostras e Estudo histopatológico**

Amostras de tumor e respectivo tecido normal, foram obtidas a partir de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 5µm corados por Hematoxilina-eosina foram submetidos a exame histopatológico para caracterização do tipo histológico, contaminação com tecido normal e do estadiamento das neoplasias. Os tumores foram classificados como intestinal ou difuso, de acordo com a classificação de Lauren (1965). Tumores com expressão morfológica combinada, intestinal e difusa, foram designados como

mistos. A gastrite foi classificada de acordo com a classificação de Sydney (Dixon, 1996). A pesquisa de *Helicobacter pylori* foi feita pelo exame histológico, na mucosa gástrica adjacente à neoplasia, em cortes corados pelo método de Giemsa. A confirmação e caracterização dos genótipos do *Helicobacter pylori* foi feita por PCR. O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.

#### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genótipos do *H. pylori***

Amostras do tumor e da mucosa adjacente à neoplasia foram obtidas de cortes histológicos do material fixado em formalina, incluído em parafina. A extração do DNA genômico dos tumores e respectivos tecidos normais de cada paciente foi feita através de tratamento com proteinase K e pelo *Kit Wizard DNA purification* (Promega) de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante.

#### **Detecção da presença do *H. pylori* através da amplificação por PCR dos genes: *ureaseC* e *cagA***

A integridade e qualidade das amostras extraídas foram verificadas através de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores para gene o constitutivo *GAPDH* (*Gliceraldeído 3 – fosfato*). A composição de bases dos oligonucleotídeos iniciadores, o tamanho das seqüências, as referências e a temperatura de anelamento utilizadas são apresentados na Tabela 1.

Foram investigadas seqüências específicas para o gene *UreaseC*, gene espécie-específica presente em todas as amostras de *H. pylori*, que codifica a enzima urease, bem como para o gene de virulência *cagA* (*cytotoxin associated gen A*) do *H. pylori*. A mistura de reação da PCR para detecção do gene *GAPDH* constou de: Tampão de reação 10x [200mM Tris-HCl, 500mM KCl (pH 8.4)], 1,5mM MgCl<sub>2</sub>(50mM), 0,4mM de cada dNTP(10mM), 1u de Platinum *Taq* DNA Recombinante (5u/μl) (Invitrogen Life Technologies), 5pmoles de cada oligonucleotídeos (sense e anti-sense), 1μl de DNA molde (concentrado) e água q.s.p. para 25.0 μl. Para a detecção dos genes *UreaseC* e *cagA* foi utilizado: Tampão de reação 10x [200mM Tris-HCl, 500mM KCl (pH 8.4)], 3,0mM MgCl<sub>2</sub>(50mM), 0,2mM de cada dNTP(10mM), 1u de Platinum *Taq* DNA *Platinum* (5u/μl) (Invitrogen Life Technologies), 5pmoles de cada

oligonucleotídeo (sense e anti-sense), 1 µl de DNA molde (concentrado) e água q.s.p. para 25.0 µl.

A eletroforese do DNA amplificado foi realizada em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante (Sambrook , 2001) corado com corado pelo nitrato de prata.

#### **Genotipagem das cepas de *H. pylori*, amplificando seus principais genes de virulência: *vacA* (*s1/s2*, *m1/m2*)**

Para a amplificação do gene *vacA* foram utilizados 1 µl de DNA e oligonucleotídeos específicos para cada região descritos na Tabela 1, onde também está descrito o tamanho do produto amplificado, a referência e a temperatura de anelamento utilizada. Na reação de PCR para os alelos *m1* e *m2* utilizou-se solução contendo: 1.5u de AmpliTaq Gold (5u/ml Applied Biosystems), Tampão 10x para PCR [100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl, 3,0mM de MgCl<sub>2</sub> 0.01% de gelatina] (Applied-Biosystems), 0,4mM de oligonucleotídeos iniciadores sense e anti-sense, 1 µl de DNA molde ( concentrado), 0,4 mM de dNTP's e água q.s.p. para 25 ml.

Na reação de PCR para a região *s* do gene *vacA* utilizou-se solução contendo: 1.0u de Accu Primer (Invitrogen Life Technologies), Tampão 10x para PCR [100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl, 0,4mM de dNTP's] 3,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4mM de oligonucleotídeos iniciadores sense e anti-sense, 1 µl de DNA molde ( concentrado) e água q.s.p. para 25 ml.

As reações foram realizadas em termociclador do tipo MJ Research, (Waretown, MA, USA). A visualização do produto da PCR foi realizada através de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante e corado com nitrato de prata.

Como controles positivos e negativos para *vacA* (*s1/s2* e *m1/m2*), *cagA* e *ureaseC* foram utilizadas amostras previamente genotipadas como positivas ou negativas e submetidas ao seqüenciamento em seqüenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems) e comparadas às seqüências depositadas nos bancos de dados genômicos públicos.

Genes	Oligonucleotídeos	Seqüência	Produto (pb)	* TA./ Tempo	Referência
<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH F</i> <i>GAPDH R</i>	5'- TGGTATCGTGCAAGGACTCATGAC -3' 5'- ATGCCAGTCAGCTTCCCGTTCAGC -3'	197	59° / 1'	Desenhados no laboratório
<i>ureaseC</i>	<i>HpgmMF</i> <i>HpgmMR</i>	5'- AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3'	294	55° / 30"	Lage , 1995
<i>cagA</i>	<i>D008</i> <i>R008</i>	5'- ATA-ATG-CTA-AAT-TAG-ACA-ACT-TGA-GCG-A-3' 5'- TTA-GAA-TAA-TCA-ACA-AAC-ATC-ACG-CCA-T-3'	297	54°/ 45"	Covacci & Rappuoli, 1996
<i>m1</i>	<i>VA3F</i> <i>VA3R</i>	5' -GGT-CAA-AAT-GCG-GTC-ATG-G- 3' 5'-CCA-TTG-GTA-CCT-GTA-GAA-AC-3'	290	52 ° / 1'	Atherton JC. , 1999
<i>m2</i>	<i>VA4F</i> <i>VA4R</i>	5'- ATG CTT TAA TAT CGT TGA GA-3' 5'- GAA CAT GTT TTA GTG AAA GC-3'	198	51 ° / 1'	Desenhados no laboratório
<i>s1 e s2</i>	<i>VA1F</i> <i>VA1R</i>	5' - ATG-GAA-ATA-CAA-CAA-ACA-CAC-3' 5'- CTG-CTT-GAA-TGC-GCC-AAA-C-3'	259 e 286	56° / 1'	Atherton JC. , 1999

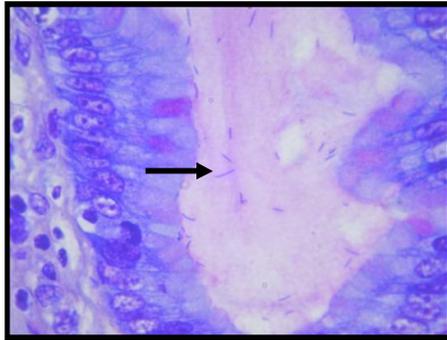
**Tabela 1- Oligonucleotídeos iniciadores, tamanho das seqüências amplificadas e referências e temperatura de anelamento (TA°C/Tempo) \*todos os genes foram amplificados com 40 ciclos.**

## RESULTADOS

Os atributos demográficos e anatomopatológicos são apresentados na Tabela 1. A idade dos pacientes variou de 27 a 78 anos, sendo a média 62,2 anos. 57,1% pacientes eram do sexo masculino e 42,9% do sexo feminino. O exame anátomopatológico demonstrou que a maioria das lesões (61,9%) eram situadas no antro gástrico e (38,1%) eram de localização proximal, no corpo gástrico ou na cárdia. O tipo histológico mais freqüente foi o adenocarcinoma intestinal, identificado em 34 pacientes (80,9%). O tipo difuso foi observado em 6 casos (14,2%) de câncer gástrico. Neoplasias com fenótipo morfológico misto,

constituídas por áreas de padrão intestinal e áreas de padrão difuso foram identificadas em 2 casos (4,7%).

A análise histológica da mucosa gástrica adjacente às neoplasias demonstrou em todos os casos a presença de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com neutrófilos no cório da mucosa, cuja intensidade variou de leve a grave. Metaplasia intestinal foi observada em 22 casos (52,3%). A pesquisa de *Helicobacter pylori* pelo método de Giemsa foi positiva em 36 casos (85,7%), Figura 1. A frequência de infecção pelo *Helicobacter pylori* foi similar em ambos os tipos histológicos de câncer gástrico, intestinal e difuso.



**Figura 1.** *Helicobacter pylori*: bacilos curvos no muco, junto à superfície epitelial (seta), em corte histológico de mucosa gástrica. Giemsa 400X.

#### **Detecção e Distribuição dos alelos dos genótipos do *H. pylori* por PCR**

A Tabela 2 demonstra a distribuição dos genes *ureaseC*, *cag A* e de genótipos do *vacA* em amostras da mucosa gástrica de 42 pacientes com câncer gástrico.

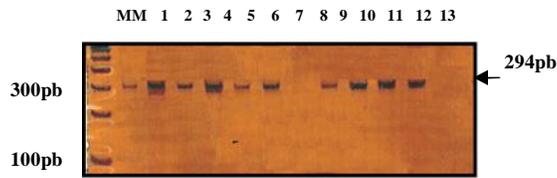
O gene *ureaseC*, espécie- específico para o *H. pylori* foi identificado em amostras obtidas de 40 pacientes (95%) com câncer gástrico (Figura 2). O gene *cagA* foi detectado em amostras de 23 pacientes (54,7%) com câncer gástrico (Figura 3). O alelo *s1* do gene *vacA* foi identificado em amostras de 24 pacientes (57.1%) e o alelo *s2* foi identificado em amostras obtidas de 6 pacientes (14.2%) com câncer gástrico (Figura 4). Três amostras apresentaram simultaneamente os alelos *s1/s2*. O alelo *m1* foi detectado em amostras de 26 pacientes (61.9%) (Figura 5) e o alelo *m2* foi encontrado em 3 amostras Figura 6. Duas amostras apresentaram os dois alelos *m1/m2*. A combinação alélica *s1* e *m1* foi identificada em 24 pacientes (57.1%) com câncer gástrico.

Variável	Categoria	Número de casos (%)
Sexo	Masculino	24 (57.1)
	Feminino	18 (42.8)
Local	Proximal	16 (38)
	Distal	26 (61.9)
Tipo histológico	Intestinal	34 (80.9)
	Difuso	6 (14.2)
	Misto	2 (4.7)
Estadio	I e II	8 (19)
	III e IV	34 (80.9)

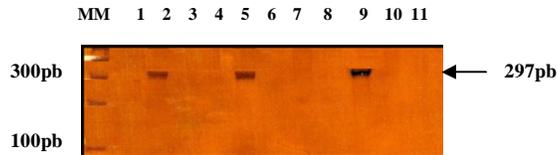
Tabela 2 – Atributos demográficos e patológicos dos casos de câncer gástrico

Genótipo	Pacientes (%)
<i>ureaseC</i>	40 (95)
<i>CagA</i>	23 (54,7)
<i>VacA s1</i>	24 (57.1)
<i>VacA m1</i>	26 (61,9)
<i>VacA s2</i>	4 (9,5)
<i>VacA s1 m1</i>	24 (57.1)

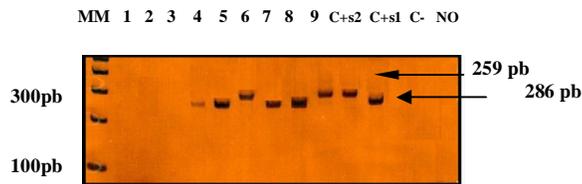
Tabela 3 - Distribuição dos genes *ureaseC*, *cagA* e de genótipos do *vacA* em amostras da mucosa gástrica de 42 pacientes com câncer gástrico



**Figura 2. Amplificação de *ureaseC* (produto de 294 pb).** Foto de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corado por nitrato de prata. 1-6 e 8-10, amostras positivas para *ureaseC*. 7, amostra negativa para *ureaseC*. 11, controle positivo para *ureaseC*. 12, controle negativo. 13, amostra sem DNA. MM, marcador de peso molecular de 100pb. (Invitrogen).



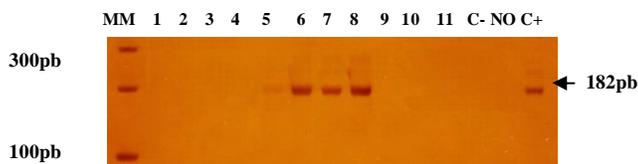
**Figura 3. Amplificação de *cagA* (produto de 297 pb).** Foto de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corado por nitrato de prata. 2 e 5, amostras positivas para *cagA*. 1; 3; 4; 6-8, amostras negativas para *cagA*. 9, controle positivo para *cagA*. 10, controle negativo. 11, amostra sem DNA. MM, marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).



**Figura 4. Amplificação do gene de *vacA s1/s2* (produtos de 259pb e 286pb).** Foto de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corado por nitrato de prata. 1; 2 e 3, amostras que não amplificaram e foram repetidas. 4; 5; 7 e 8, amostras positivas para *vacA s1*. 6 e 9, amostras positivas para *vacA s2*. C+s2, controle positivo para *vacA s2*. C+ s1, controle positivo para *vacA s1*. C-, controle negativo. No, amostra sem DNA. M, marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).



**Figura 5. Amplificação do gene de *vacA m1* (produto de 290pb).** Foto de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corado por nitrato de prata. 1; 2; 4; 6 e 8, amostras negativas para *vacA m1*. 3; 5; 7 e 9, amostras positivas para *vacA m1*. C+, controle positivo para *vacA m1*. C-, controle negativo. No, amostra sem DNA. M, marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).



**Figura 6. Amplificação do gene de *vacA m2* (produto de 182pb).** Foto de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corado por nitrato de prata. 1,2,3,4,9,10 e 11, amostras negativas para *vacA m2*. 5-8, amostras positivas para *vacA m2*. C+, controle positivo para *vacA m2*. C-, controle negativo. No, amostra sem DNA. M, marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).

## DISCUSSÃO

No presente estudo, descrevemos a análise de cepas do *H. pylori* por PCR na mucosa gástrica de 42 pacientes com câncer gástrico. A investigação foi retrospectiva, em amostras de tecido fixado em formalina e incluído em parafina. Tal abordagem foi oportuna, porque permitiu detectar *in situ* a presença de DNA do *H. pylori* e estimar a possível relação de cepas patogênicas desta bactéria com parâmetros clínico-patológicos do câncer gástrico.

No presente estudo a detecção do *H. pylori* foi avaliada por dois métodos: pela análise histológica, que permitiu a visualização direta da bactéria em 85,7% dos casos e pelo PCR, para o gene *ureaseC*, que demonstrou a presença de DNA da bactéria em 95% dos casos. O método de visualização direta ao microscópio é eficiente e de baixo custo, entretanto, requer habilidade diagnóstica do analista para identificar a bactéria (Fallone, 1995). Já o método de PCR, apesar do custo, é uma técnica que apresenta maior sensibilidade, como pode ser documentado por nossos resultados, visto que foi capaz de identificar o genótipo do *H. pylori* em 5 amostras que haviam sido negativas ao exame histológico.

O gene *cagA*, que é marcador da ilha de patogenicidade *cagPAI*, codificadora de componentes do sistema de secreção da bactéria (Censini , 1995; Odenbreit , 2000), foi identificado em 54,7% dos casos de câncer gástrico analisados no presente estudo. Estes dados estão de acordo com investigações prévias, que demonstraram que pacientes infectados por cepas de *H. pylori* que expressam o gene *cagA* tem maior probabilidade de desenvolver gástrico do que aqueles infectados por cepas que não expressam *cagA* (Blaser , 1995; Parsonnet , 1997). No Brasil, Queiroz e colaboradores (1998) demonstraram em estudo de casos controle desenvolvido em Belo Horizonte, Minas Gerais, que o status *cagA* tem alto impacto no risco para desenvolvimento de câncer gástrico distal .

Os alelos *s1* e *m1* do gene *vacA*, que codifica a produção da citotoxina vacuolizante (Szabo ,1999; Salama ,2001), foram detectados em 57.1% e 61.9% dos casos, respectivamente na presente investigação. A citotoxina *vacA* é considerada importante fator de virulência, visto que contribui para a produção de alcalóides pela urease, que podem induzir danos no DNA das células epiteliais (Tômbola 2001; Szabo , 1999, Salama , 2001). Em estudo recente observamos que a colonização da mucosa gástrica por cepas *cagA/ vacA s1/ m1* do *H.*

*pylori* associou-se à resposta inflamatória mais intensa e à maiores níveis de danos no DNA das células epiteliais (Ladeira , 2004). Estes dados referendam a correlação dos genótipos patogênicos *cagA* e *vacA* do *H. pylori* com a agressão crônica à mucosa expressa a nível morfológico por infiltrado inflamatório rico em enzimas e radicais livres capazes de lesar as células epiteliais. A reparação inadequada de lesões no DNA das células pode levar a mutações e à instabilidade genômica, constituindo a etapa de iniciação do processo de carcinogênese.

Com relação à combinação dos diferentes alelos do *Helicobacter pylori*, verificamos que cepas *cagA+s1m1* foram encontradas em maior número de casos de câncer gástrico . Na literatura observamos que cepas *cagA+ s1/m1* são mais virulentas (Atherton , 1997). Bactérias com o genótipo *m1* estão relacionadas com maior liberação de citotoxinas (Ashour, 2002). Dessa forma, a presença de cepas *cagA+ s1/m1* pode estar relacionada a maior agressão e inflamação na mucosa, contribuindo para a gênese do câncer gástrico.

Não encontramos diferenças quanto à distribuição dos genótipos *cagA* e *vacA* do *H. pylori* em relação ao sexo e à idade dos pacientes, bem como quanto aos tipos histológicos, intestinal ou difuso do câncer gástrico. Apesar da presente casuística ser pequena, nossos resultados estão de acordo com os relatados pelos estudos de Queiroz e colaboradores (1998), que também não observaram correlação dos genótipos da bactéria com atributos demográficos e com parâmetros histopatológicos do câncer gástrico.

Em síntese, a presença de infecção por *Helicobacter pylori* avaliada em nosso estudo pela análise histológica, permitiu a visualização direta da bactéria em 85,7% dos casos e pelo PCR, para o gene *ureaseC*, demonstrou a presença de DNA da bactéria em 95% dos casos, sendo a combinação alélica mais freqüente *cagA+ vacA s1/m1*. Estes resultados destacam a alta prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* no estômago de pacientes com câncer gástrico desta região estudada e confirmam a relevância do genótipo *cagA m1/s1* do *H. pylori* na patogênese do câncer gástrico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHEN-WUN W, CHIN-WEN C, WEN-CHANG L. Gastric cancer: prognostic and diagnostic advance. *Exp. Rev. Mol. Med*, 21: 110-115, 2002.
2. CORREA P. Human Gastric Carcinogenesis: a multistep and multifactorial Process- First American cancer Society Award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Research*, 52: 6735-6740, 1992.
3. D' AQUINO A. Prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* em pacientes com câncer gástrico. *J Bras Patol* 39(1):130, 2003.
4. FORMAN D. The etiology of gastric cancer. *IARC Sci Publ.*(105):22-32, 1991.
5. FUCHS CS, MAYER RJ. Gastric carcinoma. *N Engl J Med*. 333(1):32-41, 1995.
6. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 61:1-241, 1994.
7. LADEIRA, M.S.P et al. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. *J Bras Patol*, v. 39, p. 275 -82, 2003 .
8. LADEIRA, M.S.P et al. DNA damage in patients infected by *Helicobacter pylori*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* , v.13, p. 631-37, 2004.
9. LADEIRA, M.S.P et al. Relationships between *cagA*, *vacA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* and DNA damage in the gastric mucosa. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.44, p. 91-98, 2004.
10. O'CONNOR F, BUCKELEY, M O'MORAIN, C. *Helicobacter pylori*: the cancer link. *JR Soc Méd*; 86:674-8, 1996.
11. PEEK RM, Blaser MJ. Pathophysiology of *Helicobacter pylori*- induced Gastritis and Peptic Ulcer Disease. *Am J Med* 102:200-205, 1997
12. PEEK, R.M. Jr, BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*, v. 2, p. 28-37, 2002.
13. RODER, DM. The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer* 5:5-11, 2002.
14. SANGUINETTI CJ, DIAS Neto E, SIMPSON AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 17(5):914-21, 1994.
15. CENSINI, S. et al. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Nat Acad Sci*, v. 93, p. 14648-14653, 1996.
16. ODENBREIT, S. et al. Translocation of *Helicobacter pylori cagA* into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*, v. 287, p.1497- 500, 2000.
17. BLASER, M.J. et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, v. 55, p. 2111-2115, 1995.

18. PARSONNET, J. et al. Risk for gastric cancer in people with *cagA* positive and *cagA* negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, v. 40, p. 297-301, 1997.
19. QUEIROZ, D.M.M. et al. *CagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer*, v. 78, p.135-39, 1998.
20. SZABO, I et al. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin *vacA* of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J*, v. 18, p.5517-27, 1999.
21. SALAMA, N. R. et al. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun*, v. 69, p. 730 – 36, 2001.
22. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA 2002.
23. LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at histoclinical classification. *Acta Pathol Microbil Scand*, v.64, p. 31-49, 1965.
24. DIXON, M.F et al. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney System – International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol*, v. 20, p. 1161- 81, 1994.

## Trabalho 2

## **Fatores etiológicos e marcadores moleculares no câncer gástrico**

Cristiane Melissa Thomazini<sup>1,2</sup>, Nídia Alice Pinheiro<sup>2</sup>, Adriana de Camargo Ferrasi<sup>2</sup>, Fabrício de Carvalho<sup>3</sup>, Otávia Caballero<sup>3</sup>, Maria Inês de Moura Campos Pardini<sup>2</sup>, Luís Eduardo Naresse<sup>4</sup>, Maria Aparecida Marchesan Rodrigues<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Departamento de Patologia; Faculdade de Medicina, Unesp- Botucatu, 18618-000, SP, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório. de Biologia Molecular -Hemocentro; Unesp- Botucatu, 18618-000, SP, Brasil

<sup>3</sup>Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o câncer. São Paulo, SP, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Cirurgia e Ortopedia/UNESP –Botucatu; 18618-000, SP, Brasil

**Endereço para correspondência:** Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

Distrito de Rubião Júnior s/n. CEP 18 618 000 - Botucatu – SP

e-mail: mariar@fmb.unesp.br

## RESUMO

**Introdução** - O câncer gástrico permanece entre as principais causas de morte por câncer em vários países, incluindo o Brasil. A identificação de fatores etiológicos e de marcadores moleculares é fundamental para a detecção precoce e para o prognóstico desta neoplasia.

**Objetivos** – Investigar a presença de infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) em pacientes com câncer gástrico e sua possível correlação com marcadores moleculares, tais como instabilidade de microsatélites (MSI) e hipermetilação de promotores dos genes da caderina-E e *hMLH1*.

**Material e Métodos** – Foram estudados retrospectivamente 42 pacientes com câncer gástrico. A infecção por *H. pylori* foi avaliada por exame histológico e pela PCR para identificação dos genótipos *cagA* e *vacA*, em amostras do tumor e da mucosa gástrica adjacente, obtidas de material fixado em formalina e incluído em parafina. O genoma do EBV foi pesquisado por hibridização *in situ* e por PCR. A frequência de MSI foi investigada por PCR e o padrão de metilação dos promotores dos genes da caderina-E e *hMLH1* foi analisado por MSP-PCR.

**Resultados** – A presença de infecção por *H. pylori* foi identificada por PCR em 40 (95%) pacientes, sendo 57,7% e 66,6% positivos para *cagA* e *vacA* respectivamente. O genoma do EBV foi detectado em um paciente (2,3%) por hibridização *in situ*. 16,6% dos tumores foram positivos para MSI. Verificou-se hipermetilação dos promotores dos genes da caderina-E e *hMLH1* em 71,4% e 33,3% casos respectivamente. A alta frequência de hipermetilação do gene da caderina-E correlacionou-se com a infecção por *H. pylori*.

**Conclusão** – A frequência de infecção por *H. pylori* é alta em pacientes com câncer gástrico. A combinação alélica mais freqüente *cagA+* *vacA s1/m1* correlacionou-se com hipermetilação do gene da caderina-E, na presente série de casos de câncer gástrico.

**Unitermos** – Câncer gástrico, *Helicobacter pylori*, vírus de Epstein-Barr, metilação, caderina-E, *hMLH1*, instabilidade de microsatélites.

## ABSTRACT

**Introduction** - Gastric cancer remains as one of the most common causes of cancer death in many countries including Brazil. The identification of etiologic factors and molecular biomarkers is very important for early detection and prognosis of this tumor.

**Objective** - The aim of the present study was to investigate the rates of infection by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and Epstein-Barr virus (EBV) and their relationships with molecular biomarkers, such as microsatellite instability (MSI) and hypermethylation of *E-cadherin* and *hMLH1* gene promoters in patients with gastric cancer.

**Material and Methods** – Forty-two patients with gastric cancer were studied. *H. pylori* infection was evaluated by histology and PCR for *cagA* and *vacA* genotypes in samples from paraffin-embedded tissues obtained from the tumor and the non-neoplastic surrounding mucosa. EBV genome was assessed by *in situ* hybridization and PCR. MSI was performed by PCR. The methylation status of *E-cadherin* and *hMLH1* gene promoters were investigated by MSP-PCR.

**Results** - The presence of *H. pylori* was detected in 95% cases by PCR, being 57,7% and 66,6% positive for *cagA* and *vacA* respectively. EBV genome was found in only one patient (2,3%) by *in situ* hybridization. MSI was detected in 16,6% patients. Hypermethylation of *E-cadherin* and *hMLH1* gene promoters were detected in 71,4% and 33,3% cases respectively. A relationship between *H. pylori* infection and Hypermethylation of *E-cadherin* was found.

**Conclusion** - *H. pylori* infection is frequent in patients with gastric cancer. *H. pylori* strains harboring simultaneously *cagA* and *vacA s1-m1* genotypes correlated well with hypermethylation of *E-cadherin* gene promoter in the present series of gastric cancer patients.

**Key words** – Gastric cancer, *Helicobacter pylori*, Epstein-Barr virus, methylation, *E-cadherin*, *hMLH1*, microsatellite instability,

## INTRODUÇÃO

Embora em todo o mundo tenha se observado uma diminuição nas taxas de mortalidade o câncer gástrico (CG) ainda representa a segunda causa de óbito mais freqüente no mundo.

O adenocarcinoma é responsável por mais de 90% das neoplasias malignas do estômago e está subdividido em 2 tipos: intestinal e difuso (Lauren, 1965). O tipo intestinal ou bem diferenciado, (Japanese Gastric Cancer Association, 1998) ocorre principalmente em indivíduos com idade mais avançada, é predominante entre os homens localiza-se principalmente no estômago distal e apresenta associação com a infecção por *Helicobacter pylori*. Em contraste, o CG do tipo difuso está associado a um pior prognóstico comparado com o tipo intestinal (Sipponen & Marshall, 2000) e atinge principalmente indivíduos mais jovens e numa mesma proporção homens e mulheres, sua incidência tem apresentado ligeira elevação ao longo do tempo.

Estudos recentes têm demonstrado que alterações epigenéticas, que não afetam a seqüência primária do DNA, desempenham papel importante na tumorigênese. Como exemplo temos a metilação do DNA, que se caracteriza pela inserção de radicais metil nas ilhas de CpG do DNA.

Dentre muitos genes metilados no CG a *caderina-E* desempenha um papel importante por apresentar uma alta freqüência de hipermetilação em tumores com metástase (Tamura *et al.*, 2000). Esta proteína pertence à família de proteínas responsáveis pela manutenção da integridade normal tecidual (Tamura, 2002). A perda de expressão da caderina-E ocorre em diferentes tumores humanos e parece estar relacionada com a progressão de um tumor primário para invasão e metástase. A expressão anormal dessa molécula, devido à perda e redução da função, está freqüentemente associado a uma diferenciação em carcinomas e/ou invasão tumoral (Tamura, 2004). Experimentos com cultura de células demonstraram que mutação em *caderina-E* resulta na redução de adesão celular, alteração morfológica e aumento da motilidade celular (Hands Schuh *et al.*, 1999).

Além da metilação do DNA a instabilidade de microsátélites, geradas por deslizamento da fita no processo de replicação do DNA e/ou na recombinação desigual dos cromossomos está presente em vários tipos de câncer incluindo o CG em 25-40% dos casos (Lindal, 1996; Zivny *et al.*, 2003). Além disso, a metilação do promotor de *hMLH-1* é observada na maioria dos CG esporádicos e apresentam alta frequência de MSI (Kang *et al.*, 2002).

Estudos recentes têm demonstrado correlação entre CG e a presença de agentes infecciosos como *Helicobacter pylori* (Go, 2002; Takeuchi *et al.*, 2003) e o vírus *Epstein-Barr* (Chan *et al.*, 2003).

Em 1994 o *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) foi classificado pela Organização Mundial da Saúde como agente carcinogênico do grupo I para a ocorrência de neoplasias gástricas (IARC, 1994). A infecção por *H. pylori* está associada com risco duas a seis vezes maiores para câncer de antro e corpo gástrico. O *H. pylori* possui genes importantes que estariam envolvidos na carcinogênese gástrica como o: *cagA* e *vacA*. O gene *cagA* localizado na ilha de patogenicidade, é considerado como marcador da ilha de patogenicidade que codificam componentes do sistema de secreção tipo IV (Peek & Blaser, 2002; Bjökholm *et al.*, 2003) permitindo que a bactéria module vias do metabolismo celular da célula hospedeira, incluindo a expressão de proto-oncogenes (Covacci *et al.*, 1999; Covacci & Rappuoli, 2000). Ao comparar-se cepas de *H. pylori* *cagA*- e cepas *cagA*+, essas últimas possuem maior capacidade de desenvolver determinadas doenças como o CG distal (Queiroz *et al.*, 1998 e Peek & Blaser, 2002).

O gene *vacA* é capaz de induzir a formação de canais seletivos de ânions nas células epiteliais, levando a exudação da urease e dessa forma pode contribuir para indução de danos ao DNA celular (Salama *et al.*, 2001; Tombola *et al.*, 2001). Este gene possui 2 porções variáveis: *s* e *m*. A combinação em mosaico dos alelos das regiões *s* e *m* determinam a produção de citotoxinas, responsáveis pelo grau de virulência da bactéria. As cepas portadoras do genótipo *vacA s1/m1* produzem grande quantidade de toxina, enquanto as cepas *s1/m2* produzem quantidade moderada, e as cepas *s2/m2* e *s2/m1* pouca ou nenhuma toxina (van Doorn *et al.*, 1998).

Além do *H. pylori* acredita-se que o vírus de *Epstein-Barr* (EBV) também possa estar envolvido na patogênese do câncer gástrico em até 16% dos casos de CG (Geradts, *et al.*,

2002). Neste mesmo trabalho Geradts e colaboradores (2002) observaram ausência de expressão da proteína P16 por imunohistoquímica em 90% dos casos de câncer gástrico associados ao EBV. Verificaram que esta alteração estava relacionada à inativação do gene *CDKN2A*, devido a metilação da região promotora desse gene.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Casuística**

Para a realização deste estudo, foram analisados 42 pacientes com câncer gástrico. Amostras pareadas em tumor e respectivo tecido normal foram obtidas a partir de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. Tais amostras foram obtidas dos arquivos do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp. As informações clínicas foram pesquisadas nos prontuários dos pacientes. O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp (Parecer no 1039 / 2004-CONEP-MS).

### **Exame histopatológico**

Cortes histológicos corados pela Hematoxilina-eosina foram analisados à microscopia óptica (MAMR). Os tumores foram classificados como intestinal ou difuso, de acordo com a classificação de Lauren (Lauren, 1965). Tumores com expressão morfológica combinada, intestinal e difusa, foram designados como mistos. A pesquisa de *Helicobacter pylori* foi feita pelo exame histológico, na mucosa gástrica adjacente à neoplasia, em cortes histológicos corados pelo método de Giemsa.

### **Preparação da amostra**

Foram selecionados blocos contendo amostras de tumor livres da contaminação por células normais e amostras de mucosa gástrica normal com ausência de células neoplásicas. Para a Hibridação *in situ* foram feitos cortes histológicos de 5µm para cada amostra de tumor e respectivo tecido normal.

### **Extração do DNA**

Para a extração do DNA das amostras foram utilizados os *kits* para extração: *Nucleon Hard Tissue for DNA extraction from paraffin section* Amersham Biosciences\* (cat# RPN 8509)

e *Genomic DNA Purification Kit (promega)* utilizados de acordo com os procedimentos recomendados pelos fabricantes (maiores detalhes no apêndice).

Todas as amostras foram previamente avaliadas com relação a sua qualidade através da amplificação de seqüência específica para o gene do *GAPDH (Gliceraldeido 3 – fosfato)*. A ciclagem utilizada está descrita na Tabela 2 e os reagentes para amplificação do *GAPDH* podem ser observados no apêndice. A seqüência a ser amplificada e o seu tamanho encontram-se na Tabela 1.

#### **Detecção do *Helicobacter pylori* e seus principais gene de virulência: *ureaseC*, *vacA (s1/s2, m1/m2)* e *cagA* através da amplificação por PCR**

Para a detecção da bactéria foi utilizada a técnica de PCR, amplificando-se as regiões do gene *ureaseC*, *cagA*, *vacA* (região *s* e *m*). A referência, seqüência dos oligonucleotídeos, tamanho dos produtos a serem amplificados encontram-se na Tabela 1, a ciclagem na Tabela 2. A concentração final dos reagentes utilizados nas reações dos genes descritos acima estão detalhados no apêndice .

Como controles positivos e negativos para *vacA (s1/s2 e m1/m2)*, *cagA* e *ureaseC* foram utilizadas amostras previamente genotipadas como positivas ou negativas e submetidas ao seqüenciamento em seqüenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems) e comparadas às seqüências depositadas nos bancos de dados genômicos públicos.

#### **Análise do Padrão de Metilação das ilhas CpG do promotor do gene *caderina-E* e *hMLH-1* por MSP- PCR**

A análise do padrão de metilação da região promotora dos genes *caderina-E* e *hMLH-1* foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Herman e colaboradores (1996), onde o DNA extraído de cada amostra de câncer gástrico e respectivo tecido normal foram tratadas com bissulfito de sódio (Sigma-Aldrich), seguido de purificação do Kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega USA.), utilizado conforme recomendação do fabricante. Maiores detalhes ver apêndice.

Para análise do padrão de metilação dos promotores dos genes da *caderina-E* e *hMLH-1*, foram realizadas duas reações de PCR com diferentes pares de oligonucleotídeos

iniciadores: um par que reconheceu as seqüências de DNA metiladas e outro par que reconheceu as não metiladas listados na Tabela 01 e ciclagem na Tabela 02.

#### **Reação de Seqüenciamento dos DNAs**

Os fragmentos de DNAs amplificados foram seqüenciados através do Seqüenciamento Direto em seqüenciador automático tipo ABI 377-Applied Biosystem®, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados *sense* e *anti-sense* estão descritos nas Tabela 01 . Todo o procedimento está descrito no apêndice.

#### **Análise da Presença do Vírus de Epstein Barr (EBV)**

A presença do EBV foi analisada pelo método de PCR, através da pesquisa do gene *EBNA-1* e de Hibridação *in situ*.

Para a PCR todos os reagentes utilizados, a composição de bases dos oligonucleotídeos iniciadores e referencias estão descritas na Tabela 01 e ciclagem na Tabela 02.

Como controle positivo da reação de detecção do gene *EBNA1* de EBV foi utilizado o plasmídeo (p205MTCAT) carregando seqüências do gene clonado e DNA da linhagem Daudi (James, 1999).

A Técnica de Hibridação *in situ* (HIS) utilizado foi o descrito por Weiss, 1987. A sonda utilizada foi uma seqüência de 30 pares de bases, complementar a seqüência do gene *EBER1* (5'AGA CAC CGT CCT CAC CAC CCG GGA CTT GTA -3') (Chang *et al.*,1992) que é ativamente transcrita em células latentes infectadas. Detalhamento da metodologia no apêndice.

#### **Detecção de Instabilidade de Microsatélites, utilizando como marcador BAT-26**

A Instabilidade de Microsatélites (MSI) foi detectada por PCR para a repetição de mononucleotídeo BAT-26 localizada dentro do íntron 5 do gene *hMSH2*. A técnica a ser usada foi a descrita no artigo publicado por Iacopeta e Hamelin, 1998.

As condições de PCR empregadas foram as mesmas utilizadas por Iacopetta e Hamelin, 1998 (Tabela 2). A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores, o tamanho das seqüências e referências estão descritas na Tabela 1. Todo o detalhamento do experimento está no apêndice.

### Análise Estatística

Para verificar a significância de associação entre os dados obtidos foi utilizado o teste do Qui-Quadrado. As diferenças foram consideradas significativas quando o  $p$  for menor que 0,05 (CURI, 1978).

PCR p/	Oligonucleotídeos iniciadores (5' – 3')	Tamanho (pb)	Referências
<i>GAPDH</i>	TGGTATCGTGCAAGGACTCATGAC ATGCCAGTCAGCTTCCCGTTCAGC	197	Desenhados no laboratório
<i>UreaseC</i>	AAG-CTT-TTA-GGG-GTG-TTA-GGG-GTT-T GCA-ATG-CTT-CAA-TTC-CAA-ATC-TT	294	Lage <i>et al.</i> , 1995
<i>vacA s1/s2</i>	ATG-GAA-ATA-CAA-CAA-ACA-CAC CTG-CTT-GAA-TGC-GCC-AAA-C	259 286	Van Doorn <i>et al.</i> , 1999
<i>vacA m1</i>	GGT-CAA-AAT-GCG-GTC-ATG-G CCA-TTG-GTA-CCT-GTA-GAA-AC	290	Atherton JC. <i>et al.</i> , 1999
<i>vacA m2</i>	ATG CTT TAA TAT CGT TGA GA GAA CAT GTT TTA GTG AAA GC	198	Desenhados no laboratório
<i>CagA</i>	ATA-ATG-CTA-AAT-TAG-ACA-ACT-TGA-GCG-A TTA-GAA-TAA-TCA-ACA-AAC-ATC-ACG-CCA-T	297	Covacci & Rappuoli, 1996
<i>BAT-26</i>	TGA-CTA-CTT-TTG-ACT-TCA-GCC AAC-CAT-TCA-ACA-TTT-TTA-ACC	122	Mukherjee <i>et al.</i> , 2002
<i>EBN1</i>	GTC-ATC-ATC-ATC-CGG-GTC-TC TTC-GGG-TTG-GAA-CCT-CCT-TG	270	Baldanti <i>et al.</i> 2000.
<i>Caderina-E (Metilada)</i>	TTA-GGT-TAG-AGG-GTT-ATC-GCG-T TAA-CTA-AAA-ATT-CAC-CTA-CCG-AC	115	Chan <i>et al.</i> , 2003
<i>Caderina-E (Não Metilada)</i>	TAA-TTT-TAG-GTT-AGA-GGG-TTA-TTG-T CAC-AAC-CAA-TCA-ACA-ACA-CA	97	Chan <i>et al.</i> , 2003
<i>hMLH-1 (Metilada)</i>	TAT-ATC-GTT-CGT-AGT-ATT-CGT-GT TCC-GAC-CCG-AAT-AAA-CCC-AA	153	Kang <i>et al.</i> , 2003b
<i>hMLH-1 (Não Metilada)</i>	TTT-TGA-TGT-AGA-TGT-TTT-ATT-AGG-GTT-GT CC-ACC-TCA-TCA-TAA-CTA-CCC-ACA	124	Kang <i>et al.</i> , 2003b

**Tabela 1.** oligonucleotídeos iniciadores, tamanho em pares de base (pb) e referências para as diferentes regiões estudadas.

Gene	Condições de amplificação					Nº de ciclos
	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	
<i>GAPDH</i>	94°C 3'	94°C 30"	59°C 1'	72°C 2'	72°C 7'	40
<i>UreaseC</i>	94°C 3'	94°C 30"	55°C 30"	72°C 2'	72°C 5'	40
<i>vacA s1/s2</i>	94°C 5'	95°C 30"	* 69/58/56°C 1'	72°C 1'	72°C 7'	*(1/4/35) 40
<i>vacA m1</i>	95°C 5'	94°C 30"	52°C 1'	68°C 2'	68°C 5'	40
<i>vacA m2</i>	95°C 5'	94°C 30"	51°C 1'	68°C 2'	68°C 5'	40
<i>CagA</i>	95°C 3'	95°C 30"	54°C 45"	72°C 2'	72°C 5'	40
<i>BAT-26</i>	95°C 3'	95°C 1'	55°C 2'	72°C 3'	72°C 8'	30
<i>EBN1</i>	94°C 3'	94°C 30"	55°C 1'	72°C 2'	72°C 7'	40
<i>Caderina-E (Metilada)</i>	94°C 5'	94°C 30"	* 68/63/61°C 1'	72°C 1'	72°C 7'	*(10/10/15) 35
<i>Caderina-E (Não Metilada)</i>	94°C 5'	94°C 30"	* 65/63/59°C 1'	72°C 1'	72°C 7'	*(10/10/15) 35
<i>hMLH-1 (Metilada)</i>	95°C 5'	94°C 1'30"	65°C 1'	72°C 2'	72°C 7'	40
<i>hMLH-1 (Não Metilada)</i>	95°C 5'	94°C 1'30"	63°C 1'	72°C 2'	72°C 7'	40

**Tabela 2.** Condições de amplificação para os genes estudados. \*Três temperaturas de anelamento foram utilizadas (*Touch Down*) com respectivas quantidade de ciclos.

## RESULTADOS

### Dados Demográficos

A idade dos pacientes variou de 27 a 78 anos, sendo em média 62,2 anos. Vinte e três pacientes (57,8%) apresentaram idade superior a 65 anos, 18 pacientes (42,9%) tinham entre 43-64 anos, somente um paciente apresentou idade inferior a 30 anos (**Gráfico 01**).

Com relação ao sexo vinte e quatro (24) pacientes eram do sexo masculino (58%) e 18 do sexo feminino (42%). Não foram identificadas diferenças entre os pacientes quanto ao gênero.

#### Dados Anatomopatológicos

O exame anatomopatológico demonstrou que 30 casos (71,4%) encontravam-se nos estádios III e IV. Doze casos (28,6%) estavam nos estádios I e II (**Gráfico 02**).

A histologia feita segundo a classificação de Lauren demonstrou que o tipo histológico mais freqüente foi o adenocarcinoma intestinal, identificado em 34 casos (80,9%). O tipo difuso foi diagnosticado em 6 casos (14,2%) (**Figura 01**). Adenocarcinomas com características morfológicas mistas, constituídas por áreas de padrão intestinal e áreas de padrão difuso foram identificadas em 2 casos (4,7%) (**Gráfico 03**).

As características macroscópicas das lesões, segundo a classificação de Borrmann revelaram lesões úlcero-infiltrativas (tipos III e IV) em 34 casos (80,9%). Lesões exofíticas ou polipóides (tipos I e II) foram identificadas em 8 casos (10,1%). (**Gráfico 04**) (**Figura 02**).

O exame anatomopatológico demonstrou que o tumor estava localizado no antro em 26 casos (61,9%). Tumores em localização proximal, situados no corpo gástrico ou na cárdia, foram observados em 16 casos (38,1%) (**Gráfico 05**).

Dos 42 casos analisados, 27 (64,3%) apresentavam metástases em linfonodos. Não foram identificadas metástases em 15 casos (35,7%) (**Gráfico 06**).

O exame anatomopatológico demonstrou que em 29 casos (69%) havia invasão de toda a parede gástrica pelo tumor, caracterizando as lesões como em fase avançada de evolução. Lesões superficiais, restritas à mucosa ou com infiltração da submucosa foram identificadas em 13 casos (31%) (**Gráfico 07**).

#### Pesquisa de *Helicobacter pylori*

A presença de *H. pylori* foi avaliada por dois métodos: análise histológica através de visualização direta ao microscópio e por PCR (reação em cadeia da polimerase) para o gene *ureaseC* (**Figura 03**). A pesquisa de *Helicobacter pylori* feita em cortes histológicos corados pelo método de Giemsa foi positiva em 36 (85,7%) dos 42 casos analisados. Para a análise por

PCR com oligonucleotídeos específicos obtivemos positividade para 40 (95%) dos 42 casos analisados (**Gráfico 08**).

Das 42 amostras analisadas 23 (54,7%) foram positivas para a presença do gene *cagA* (**Figura 05**). O gene *vacA* foi identificado em 28 amostras (66,6 %). A correlação entre a presença de *cagA* e a frequência dos alelos do gene *vacA*, demonstrou que das 23 amostras positivas para o gene *cagA*, 15 apresentaram positividade para o alelo *s1*(62,5%). Em contrapartida, o alelo *s2* foi detectado em apenas 1 amostras (25%). Alelos múltiplos foram identificados em 2 amostras tanto para *s1/s2* quanto para *m1* e *m2*. Para a região *m*, *m1* foi encontrado em 16 amostras (61,5%) e o alelo *m2* não foi encontrado (**Tabela 03**).

Em todas as amostras analisadas, a combinação alélica mais frequente foi *m1/s1* identificada em 24 amostras (85,7%), seguido de *s2/m2* com 3 amostras (10,7%) e *s2/m1* em uma amostra (3,5%) (**Figura 06**). Onze amostras (26,2%) foram negativas para a presença do gene *vacA*. Quatro amostras negativas para *vacA* foram positivas para *cagA*, enquanto que 7 amostras foram negativas para ambos os genes (**Tabela 04**).

A correlação entre a presença de *cagA* e os tipos histológicos de câncer gástrico, demonstrou que das 23 amostras positivas para *CagA*, 18 ( 78,2%) pertenciam a casos de adenocarcinoma do tipo intestinal e 3 (13%) a casos do tipo difuso. Entretanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas (**Tabela 05**).

Com relação a presença de *cagA* e o estadiamento dos casos de câncer gástrico, verificamos que das 23 amostras positivas para *CagA*, 18 (78,2%) foram identificadas em casos em fase avançada de evolução, nos estadios III e IV. Cinco casos positivos para *CagA* (21,7%) pertenciam aos estadios I e II. (**Tabela 06**).

A correlação entre a presença de *cagA* e a localização dos casos de câncer gástrico, demonstrou que das 23 amostras positivas para *CagA*, 18 (78,2%) estavam localizados no antro gástrico. Cinco casos positivos para *CagA* (21,7%) estavam situados no corpo gástrico ou na cárdia. (**Tabela 07**).

Entre a presença de *cagA* e as formas macroscópicas dos casos de câncer gástrico, demonstrou que das 23 amostras positivas para *CagA*, 19 (82,6%) pertenciam a casos do tipo ulcerado, enquanto 4 amostras (17,4%) foram positivas em casos do tipo elevado (**Tabela 08**).

Para a presença de *cagA* e a invasão do tumor na parede gástrica, demonstrou que das 23 amostras positivas para *CagA*, 20 (87%) estavam presentes em casos que invadiam toda a parede gástrica, ou seja em fase avançada de evolução da doença. Três amostras (13%) foram positivas em lesões em fase inicial de evolução, do tipo precoce (**Tabela 09**).

#### Vírus de *Epstein Barr*

A presença do EBV foi avaliada por reação de PCR, amplificando o gene *EBNA-1* e por Hibridação *in situ* (HIS). Pela PCR (**Figura 07**), foi obtida uma positividade para 17 amostras das 42 estudadas (40,5%). Pela técnica de HIS (**Figura 08**) para detecção de EBV no tecido gástrico, apenas uma amostra foi confirmada ser positiva (2,3%) (**Gráfico 09**).

Padrão de Metilação para os promotores dos genes da caderina-E e *hMLH-1* no câncer gástrico

Para o gene da caderina-E 30 (71,4%) das 42 amostras analisadas mostraram padrão de hipermetilação, enquanto que 12 (28,5%) amostras não foram metiladas para este gene (**Figura 09**) (**Gráfico 10**).

Para o gene *hMLH-1* 14 amostras (33,3%) foram hipermetiladas e 28 amostras (66,6%) foram não metiladas (**Figura 10**) (**Gráfico 10**).

A correlação entre metilação do gene da caderina-E e do gene *hMLH-1*, demonstrou que das 14 amostras positivas para *hMLH-1*, 13 (93%) apresentaram metilação para o gene da caderina-E ( $p \leq 0,02$ ) (**Tabela 10**).

#### **Caderina-E**

A correlação entre a presença de metilação do gene da caderina-E e a presença de cepas *cagA* do *Helicobacter pylori*, demonstrou que das 30 amostras com metilação do gene da caderina-E, 18 (60%) foram positivas para o gene *cagA* do *Helicobacter pylori*. Cinco amostras (41,6%) que apresentaram padrão não metilado para o gene da caderina-E foram positivas para o gene *cagA* (**Tabela 11**).

Das 16 amostras positivas para *cagA vacA s1/m1*, 12 (75%) foram positivas para metilação do gene da caderina-E (**Tabela 12**).

O tipo histológico de câncer gástrico que teve correlação com a presença de metilação do gene da caderina-E foram adenocarcinomas do tipo intestinal (76,6%) e 5 amostras (16,6%) foram carcinomas do tipo difuso (**Tabela 13**).

A correlação entre a presença de metilação do gene da caderina-E e o estadiamento dos casos de câncer gástrico demonstrou que das 30 amostras com metilação do gene da caderina-E, 21 (70%) casos estavam em fase avançada de evolução, nos estádios III e IV. (**Tabela 14**).

Dos trinta casos de câncer gástrico vinte e cinco casos (73,5%) estavam situados no antro gástrico (**Tabela 15**).

Entre os 32 casos com metástases em linfonodos, 23 (71,8%) apresentaram metilação do gene da caderina-E. Por outro lado, dos 10 casos com ausência de metástases em linfonodos, 7 (70%) apresentaram metilação do gene da caderina-E (**Tabela 16**).

#### ***hMLH-1***

A correlação entre metilação do gene *hMLH-1* e a presença de cepas *cagA* do *Helicobacter pylori*, demonstrou que das 14 amostras positivas para *hMLH-1*, 9 (64%) amostras eram positivas para *cagA* (**Tabela 17**).

A correlação entre metilação do gene *hMLH-1* e os genótipos do *Helicobacter pylori*, demonstrou que das 14 amostras positivas para *hMLH-1*, 5 amostras (31,2%) apresentavam genótipo *cagA vacA s1/m1*. Das 16 amostras de *Helicobacter pylori* com genótipo *cagA vacA s1/m1*, 11 amostras (68,7%) não apresentaram metilação para o gene *hMLH-1* (**Tabela 18**).

Não houve correlação entre os tipos histológicos de câncer gástrico e a metilação de *hMLH-1* (**Tabela 19**).

A correlação entre a presença de metilação do gene *hMLH-1* e o estadiamento dos casos de câncer gástrico demonstrou que 9 (30%) dos 30 casos em estágio III e IV apresentavam metilação do gene *hMLH-1* (**Tabela 20**).

A maioria das amostra estudadas que foram metiladas para o gene *hMLH-1* ao lesão estava situada no antro (92,8%) (**Tabela 21**).

A correlação entre metilação do gene *hMLH-1* e a presença de metástases em linfonodos nos casos de câncer gástrico demonstrou que dos 32 casos com metástases, 10 (31,2%) casos apresentaram metilação do gene *hMLH-1* (**Tabela 22**).

### **Instabilidade de Microsatélites (MSI)**

As amostras foram consideradas positivas para o marcador de MSI, BAT-26, quando apresentaram mais de 4 bases alteradas. Dessa forma, das 42 amostras de câncer gástrico analisadas, 7 (16,6%) foram positivas para MSI por BAT-26.

Das 7 amostras positivas para MSI, 6 (85,7%), foram positivas para o gene *cagA* do *Helicobacter pylori* (**Tabela 23**).

Com relação aos tipos histológicos de câncer gástrico e a presença de instabilidade de microsatélites, observa-se que todas as mostras positivas para MSI (n=7) são do tipo histológico intestinal (**Tabela 24**).

Quatro amostras (57,1%) foram identificadas em casos em fase avançada de evolução, nos estadios III e IV (**Tabela 25**).

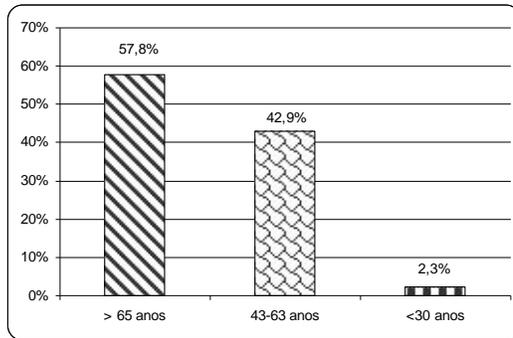
Todas as amostras positivas para MSI (n=7), estavam situadas no antro gástrico (**Tabela 26**).

A correlação entre a presença de MSI e metástases em linfonodos nos casos de câncer gástrico, demonstrou que das 7 amostras positivas para MSI, 5 (71,4%) apresentavam ausência de metástases em nódulos linfáticos (**Tabela 27**).

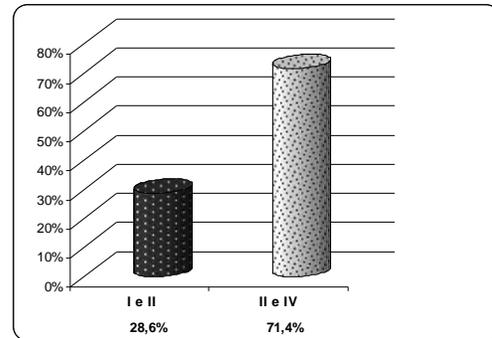
Entre a presença de MSI e o padrão de metilação do gene da caderina-E, demonstrou que das 7 amostras positivas para MSI, 5 (71,4%) apresentavam presença de metilação do gene da caderina-E (**Tabela 28**).

Apenas 4 amostras das 7 amostras positivas para MSI, apresentaram metilação do gene *hMLH-1* (**Tabela 29**).

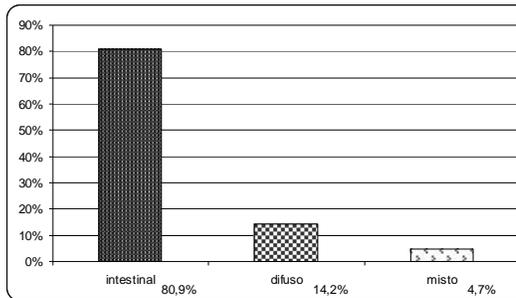
Resultado geral das análises das 42 amostras na **Tabela 30** na página 64.



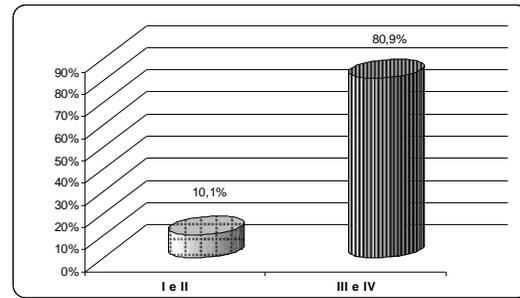
**Gráfico 01.** Distribuição dos casos de câncer gástrico de acordo com a idade.



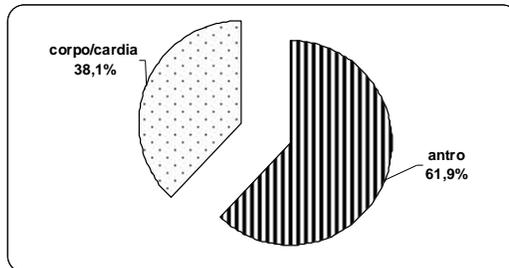
**Gráfico 02.** Estadiamento dos pacientes com câncer gástrico.



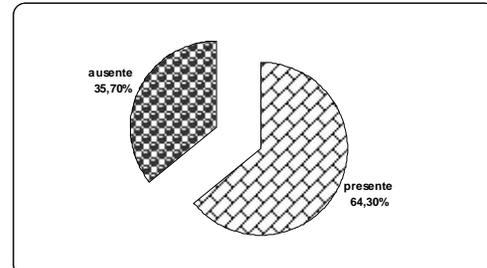
**Gráfico 03.** Frequência da distribuição dos tipos histológicos de câncer gástrico.



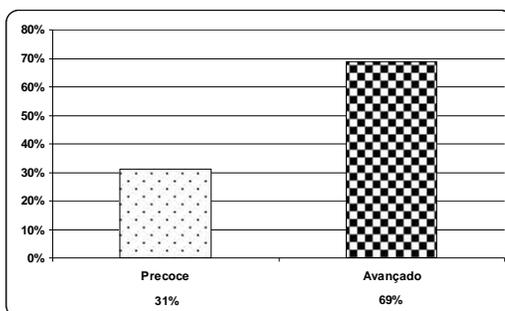
**Gráfico 04.** Representação da frequência dos tipos macroscópicos de câncer gástrico.



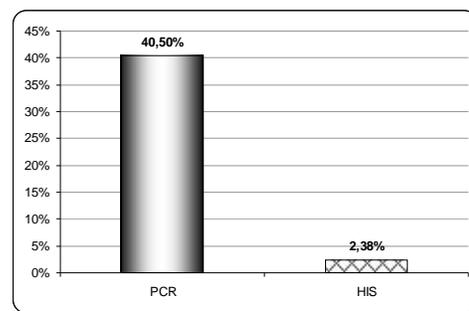
**Gráfico 05.** Localização dos casos de câncer gástrico.



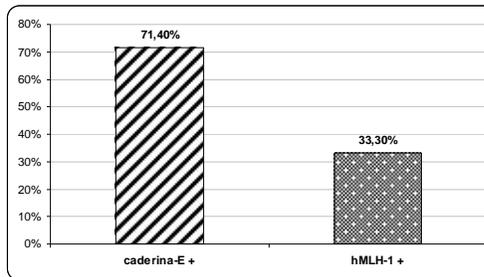
**Gráfico 06.** Frequência de metástases em linfonodos nos casos de câncer gástrico.



**Gráfico 07.** Frequência dos tipos precoce e avançado de câncer gástrico.



**Gráfico 08.** Frequência de detecção do EBV pelo PCR e por hibridização *in situ* (HIS) em casos de câncer gástrico.



**Gráfico 9.** Relação entre o padrão de metilação dos promotores dos genes da caderina-E e *hMLH-1* em casos de câncer gástrico.

		<i>cagA</i> (%)		Total
		Positivo	Negativo	
<i>vacA</i>	<i>s1</i>	15 (62,5)	9 (37,5)	24
	<i>s2</i>	1 (25)	3 (75)	4
	<i>m1</i>	16 (61,5)	10 (38,4)	26
	<i>m2</i>	0	3 (100)	3
	<i>s1/s2</i>	2 (75)	1 (25)	3
	<i>m1/m2</i>	2 (100)	0	2
	<b>negativo</b>	4 (36,3)	7 (63,6)	11

**Tabela 03.** Freqüência dos alelos *vacA* relacionada com a presença ou não do gene *cagA* em amostras de câncer gástrico.

		<i>cagA</i> (%)		Total
		Positivo	Negativo	
<i>vacA</i>	<i>s1/m1</i>	15 (62,5)	9 (37,5)	24
	<i>s1/m2</i>	0	0	0
	<i>s2/m1</i>	1 (100)	0	1
	<i>s2/m2</i>	0	3 (100)	3
	<b>Múltiplos</b>	2 (66,6)	1 (33,3)	3
	<b>Negativo</b>	4 (9,5)	7 (16,6)	11

**Tabela 04.** Freqüência dos genótipos do *H. pylori* em casos de câncer gástrico.

		<i>cagA</i> (%)	
		Positivo	Negativo
Histologia	Intestinal	18 (78,2)	16 (69,5)
	Difuso	3 (13)	3 (15,7)
	Misto	2 (8,6)	-
	<b>Total</b>	23	19

**Tabela 05.** Correlação entre a presença de *cagA* e os tipos histológicos de câncer gástrico.

		<i>cagA</i> (%)	
		Positivo	Negativo
Estadio	I e II	5 (21,7)	7 (36,8)
	III e IV	18 (78,2)	12 (63,1)
<b>Total</b>		23	19

**Tabela 06.** Correlação entre a presença de *cagA* e o estadio do tumor.

		<b>CagA (%)</b>	
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
Localização	Antro	18 (78,2)	16 (84,2)
	Corpo/ Cárdia	5 (21,7)	3 (15,7)
Total		23	19

**Tabela 07.** Correlação entre a presença do gene *cagA* e a localização do tumor.

		<b>cagA* (%)</b>	
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
Macroscopia	Ulcerado	19 (82,6)	19 (100)
	Elevado	4 (17,3)	0
Total		23	19

**Tabela 08.** Correlação entre a presença de *cagA* e as formas macroscópicas do tumor.

		<b>cagA (%)</b>	
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
Invasão	Avançado	20 (87)	15 (79)
	Precoce	3 (13)	4 (21)
Total		23	19

**Tabela 09.** Correlação entre a presença de *cagA* e a invasão do tumor na parede gástrica.

		<b>hMLH-1*(%)</b>	
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
Caderina-E	Positivo	13 (93)	17 (60,7)
	Negativo	1 (7,1)	11 (40)
Total		14	28

**Tabela 10.** Correlação entre metilação dos gene da caderina-E e do gene *hMLH-1* em casos de câncer gástrico ( $p \leq 0,02$ ).

		<b>Caderina-E (%)</b>	
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
<i>cagA</i>	Positivo	18 (60)	5 (41,6)
	Negativo	12 (40)	7 (58,3)
Total		30	12

**Tabela 11.** Correlação entre metilação do gene da caderina-E e a presença do gene *cagA* do *Helicobacter pylori*.

		<b>Caderina-E (%)</b>		<b>Total</b>
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
<i>cagA+</i> e <i>vacA</i>	<i>s1/m1</i>	12 (75)	4 (25)	16
	<i>s1/m2</i>	0	0	0
	<i>s2/m1</i>	1	0	1
	<i>s2/m2</i>	0	0	0
	Múltiplos	2	0	2
	Negativo	3	1	4

**Tabela 12.** Correlação entre metilação do gene da caderina-E e os genótipos do *Helicobacter pylori* em casos de câncer gástrico.

		Caderina-E (%)	
		Positivo	Negativo
Histologia	Intestinal	23 (76,6)	11 (91,6)
	Difuso	5 (16,6)	1 (8,3)
	Misto	2 (6,6)	0
	Total	30	12

**Tabela 13.** Correlação entre metilação do gene da caderina-E e os tipos histológicos do câncer gástrico.

		Caderina-E (%)	
		Positivo	Negativo
Estadio	I e II	9 (75)	3 (25)
	III e IV	21(70)	9 (30)
	Total	30	12

**Tabela 14.** Correlação entre metilação do gene da caderina-E e o estadiamento do tumor em casos de câncer gástrico.

		Caderina-E (%)	
		Positivo	Negativo
Localização	Antro	25 (73,5)	9 (26,4)
	Corpo/cardia	5 (62,5)	3 (37,5)
	Total	30	12

**Tabela 15.** Correlação entre metilação do gene da caderina-E e a localização do tumor em casos de câncer gástrico.

		Caderina-E (%)		Total
		Positivo	Negativo	
Metástase em linfonodos	Ausente	7 (70)	3 (30)	10
	Presente	23 (71,8)	9 (28,2)	32
	Total	30	12	42

**Tabela 16.** Correlação entre metilação do gene da caderina-E e a presença de metástases em linfonodos regionais em casos de câncer gástrico.

		hMLH-1 (%)	
		Positivo	Negativo
cagA	Presente	9 (64)	14 (50)
	Negativo	5 (35)	14 (50)
	Total	14	28

**Tabela 17.** Correlação entre metilação do gene *hMLH-1* e a presença do gene *cagA* do *Helicobacter pylori* em casos de câncer gástrico.

		hMLH-1 (%)		Total
		Positivo	Negativo	
cagA+ e vacA	s1/m1	5 (31,2)	11 (68,7)	16
	s1/m2	0	0	0
	s2/m1	1 (100)	0	1
	s2/m2	0	0	0
	Múltiplos	2 (100)	0	2
	Negativo	1 (25)	3 (75)	4

**Tabela 18.** Correlação entre metilação do gene *hMLH-1* e genótipos do *Helicobacter pylori* em casos de câncer gástrico.

		<i>hMLH-1</i> (%)	
		Positivo	Negativo
Histologia	Intestinal	10 (71,4)	24 (85,7)
	Difuso	2 (14,2)	4 (14,2)
	Misto	2 (14,2)	0
	Total	14	28

**Tabela 19.** Correlação entre metilação do gene *hMLH-1* e os tipos histológicos de câncer gástrico.

		<i>hMLH-1</i> (%)	
		Positivo	Negativo
Estádio	I e II	5 (41,6)	7 (58,3)
	III e IV	9 (30)	21 (70)
	Total	14	28

**Tabela 20.** Correlação entre o padrão de metilação de *hMLH-1* e o estadiamento dos tumores em amostras de câncer gástrico.

		<i>hMLH-1</i> (%)	
		Positivo	Negativo
Localização	Antro	13 (92,8)	21 (75)
	Corpo/cardia	1 (7,1)	7 (25)
	Total	14	28

**Tabela 21.** Correlação entre o padrão de metilação de *hMLH-1* e a localização do tumor em amostras de câncer gástrico.

		<i>hMLH-1</i> (%)		Total
		Positivo	Negativo	
Metástase em linfonodos	Ausente	4 (40)	6 (60)	10
	Presente	10 (31,2)	22 (68,7)	32
	Total	14	28	42

**Tabela 22.** Correlação entre o padrão de metilação de *hMLH-1* e metástase em linfonodos regionais nos casos de câncer gástrico.

		MSI (%)	
		Positivo	Negativo
cagA	Presente	6 (85,7)	17 (48,5)
	Ausente	1 (14,2)	18 (51,4)
	Total	7	35

**Tabela 23.** Correlação entre a presença de MSI e de *cagA* em casos de câncer gástrico.

		MSI (%)	
		Positivo	Negativo
Histologia	Intestinal	7 (100)	27 (77,1)
	Difuso	0	6 (17,1)
	Misto	0	2 (5,7)
	Total	7	35

**Tabela 24.** Correlação entre a presença de MSI e os tipos histológicos de câncer gástrico.

		MSI (%)	
		Positivo	Negativo
Estádio	I e II	3 (42,8)	9 (25,7)
	III e IV	4 (57,1)	26 (74,2)
	Total	7	35

**Tabela 25.** Correlação entre a presença de MSI e o estágio de casos de câncer gástrico.

		MSI (%)	
		Positivo	Negativo
Localização	Antro	7 (100)	27 (77,1)
	Corpo/cardia	0	8 (22,8)
	Total	7	35

**Tabela 26.** Correlação entre a presença de MSI e a localização do tumor em casos de câncer gástrico.

		MSI (%)	
		Positivo	Negativo
<b>Metástase em linfonodos</b>	<b>Ausente</b>	5 (71,4)	27 (77,1)
	<b>Presente</b>	2 (28,5)	8 (22,8)
	<b>Total</b>	7	35

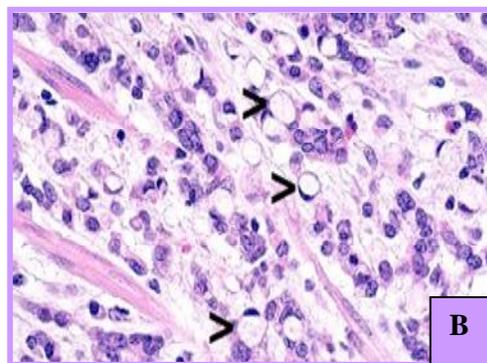
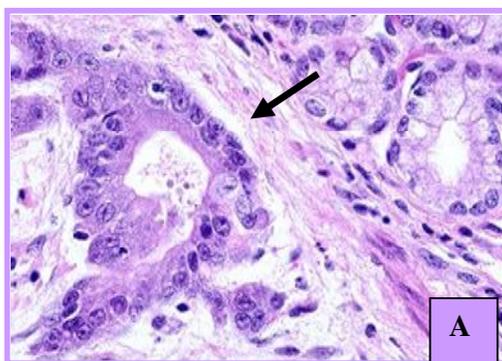
**Tabela 27.** Correlação entre a presença de MSI e metástases em linfonodos nos casos de câncer gástrico.

		MSI (%)	
		Positivo	Negativo
<b>Caderina-E</b>	<b>Metilado</b>	5 (71,4)	25 (71,4)
	<b>Não metilado</b>	2 (28,5)	10 (28,5)
	<b>Total</b>	7	35

**Tabela 28.** Correlação entre a presença de MSI e metilação do gene da caderina-E em casos de câncer gástrico.

		MSI (%)	
		Positivo	Negativo
<b>hMLH-1</b>	<b>Metilado</b>	4 (75)	10(28,5)
	<b>Não metilado</b>	3 (25)	25 (71,4)
	<b>Total</b>	7	35

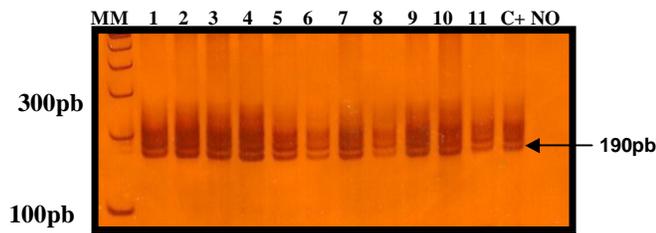
**Tabela 29.** Correlação entre a presença de MSI e metilação do gene *hMLH-1* em casos de câncer gástrico



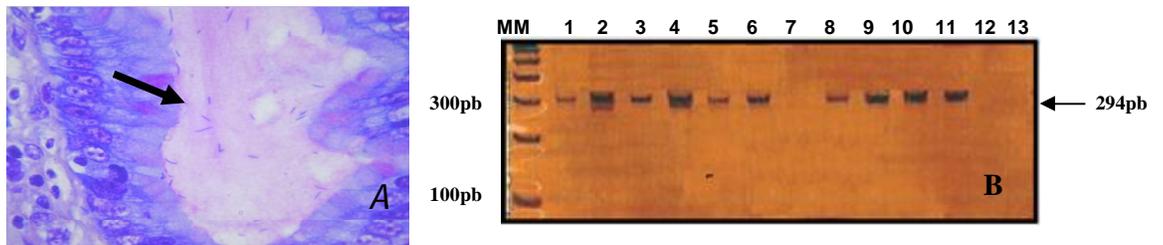
**Figura 01.** **A:** Adenocarcinoma gástrico tipo intestinal mostrando uma glândula maligna (à esquerda) com células colunares com núcleos atípicos. **B:** Adenocarcinoma gástrico tipo difuso com células em anel de sinete mostrando o deslocamento do núcleo provocado pela produção de mucina em excesso.



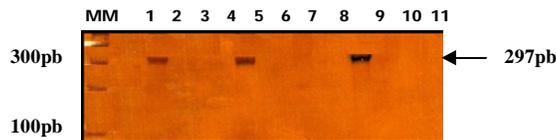
**Figura 02.** Câncer gástrico: lesão ulcerada de bordas elevadas e infiltradas ( Borrmann III).



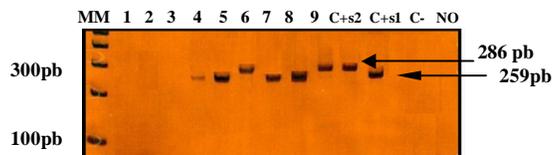
**Figura 03.** Amplificação do gene constitutivo *GAPDH* (190pb). Por reação de PCR resolvida em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante corado pela prata. No- reação sem DNA; C+ controle positivo da reação; M marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen).



**Figura 04 A.** Foto ilustrativa da pesquisa de *Helicobacter pylori* feita em cortes histológicos da mucosa gástrica corados pelo método de Giemsa na ponta da seta temos os bacilos curvos no muco junto à superfície epitelial. Giemsa 400X.. **B.** Amplificação de seqüências do gene *ureaseC* (produto de 294 pb). Foto de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corado por nitrato de prata. 1-6 e 8-10, amostras positivas para *ureaseC*. 7, amostra negativa para *ureaseC*. 11, controle positivo para *ureaseC*. 12, controle negativo. 13, amostra sem DNA. MM, marcador de peso molecular de 100pb. (Invitrogen).



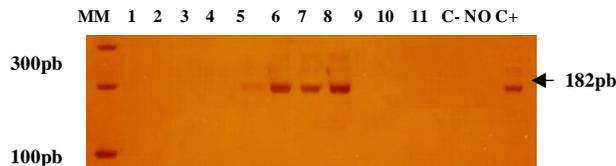
**Figura 05. Amplificação de *cagA* (produto de 297pb).** Foto de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corado por nitrato de prata. 2 e 5, amostras positivas para *cagA*. 1; 3; 4; 6-8, amostras negativas para *cagA*. 9, controle positivo para *cagA*. 10, controle negativo. 11, amostra sem DNA. MM, marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).



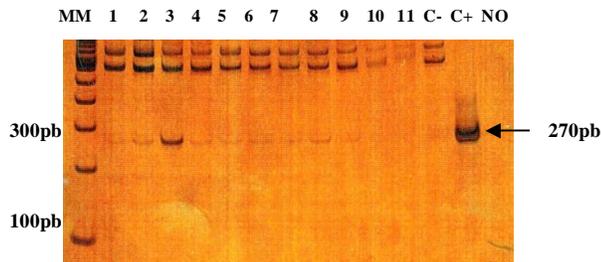
**Figura 06 A. Amplificação do gene de *vacA* s1/s2 (produtos de 259pb e 286pb).** Foto de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corado por nitrato de prata. 1; 2 e 3, amostras que não amplificaram e foram repetidas. 4; 5; 7 e 8, amostras positivas para *vacA* s1. 6 e 9, amostras positivas para *vacA* s2. C+s2, controle positivo para *vacA* s2. C+ s1, controle positivo para *vacA* s1. C-, controle negativo. No, amostra sem DNA. MM, marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).



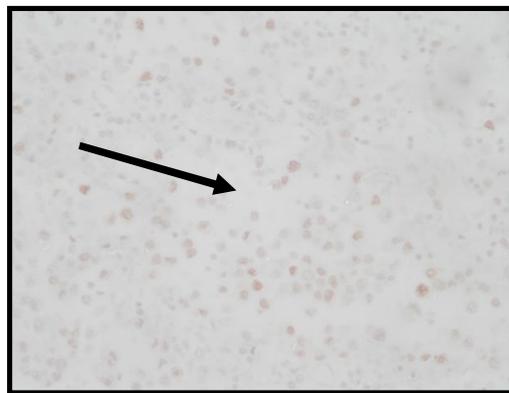
**Figura 06 B. Amplificação do gene de *vacA m1* (produto de 290pb).** Foto de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corado por nitrato de prata. 1; 2; 4; 6 e 8, amostras negativas para *vacA m1*. 3; 5; 7 e 9, amostras positivas para *vacA m1*. C+, controle positivo para *vacA m1*. C-, controle negativo. No, amostra sem DNA. MM, marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).



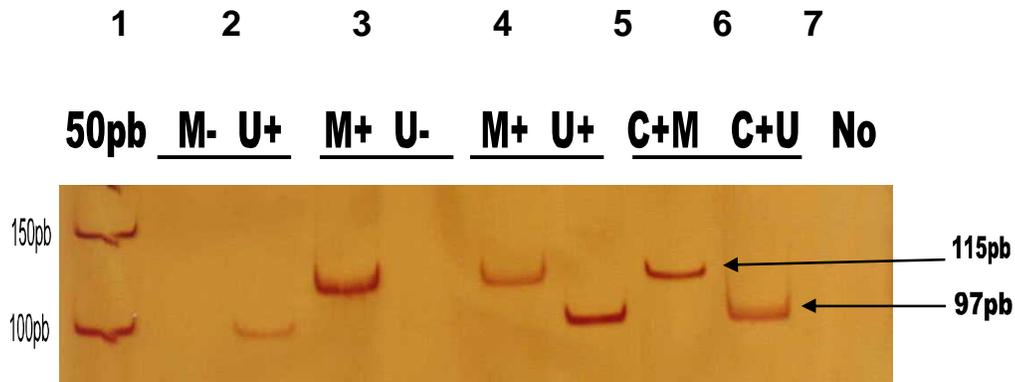
**Figura 06 C. Amplificação do gene de *vacA m2* (produto de 182pb).** Foto de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corado por nitrato de prata. 1,2,3,4,9,10 e 11, amostras negativas para *vacA m2*. 5-8, amostras positivas para *vacA m2*. C+, controle positivo para *vacA m2*. C-, controle negativo. No, amostra sem DNA. MM, marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).



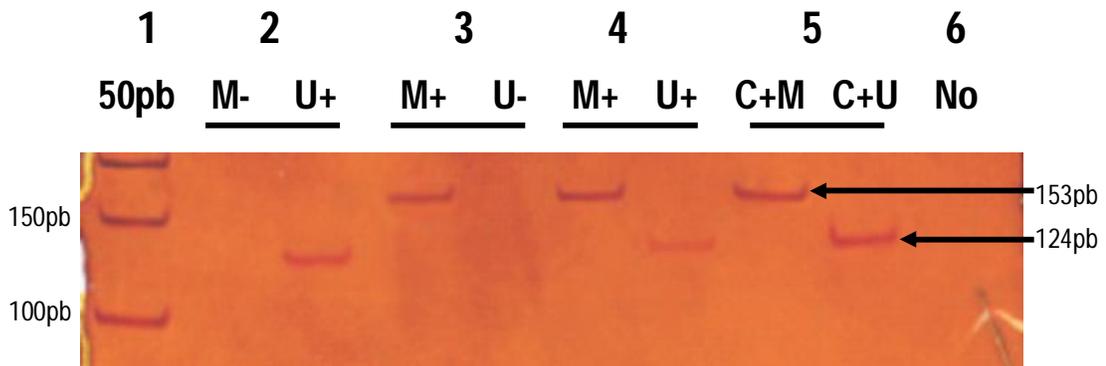
**Figura 07. Amplificação de EBV (produto de 270pb).** Foto de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corado por nitrato de prata. 10,11 amostras negativas para EBV; 1-9 amostras positivas para EBV. C+, controle positivo plasmídeo (p205MTCAT) carregando seqüências do gene clonado e DNA da linhagem Daudi (James, 1999). C-, controle negativo. No, amostra sem DNA. MM, marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).



**Figura 08.** Figura ilustrativa da Hibridização *in situ* em amostra de câncer gástrico mostrando o padrão positivo demonstrando marcação nuclear da proteína do EBV. Os núcleos que estão corados em marrom (seta) revelam a presença desta proteína no genoma da célula.



**Figura 09.** Foto ilustrativa das análises do padrão de metilação para o gene da caderina-E no câncer gástrico. Gel de poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata. Ilustra a PCR-MSP para o gene CDH1. São realizadas duas PCRs distintas com pares de oligonucleotídeos para o *status* metilado (M) e não metilado (U). Em 1, marcador de peso molecular 50pb (Invitrogen). Os possíveis resultados para as duas PCRs são apresentados em 2-4: Amostra não metilada (2), amostra metilada (3) e amostra hemi-metilada (4). Em 5, C+ para metilação e em 6 controle positivo para amostra não metilada. Em 7, água + Mistura de PCR.



**Figura 10.** Foto ilustrativa das análises do padrão de metilação para o gene *hMLH-1* no câncer gástrico. Gel de poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata. São realizadas duas PCRs distintas com pares de oligonucleotídeos para o *status* metilado (M) e não metilado (U). Em 1, marcador de peso molecular 50pb (Invitrogen). Os possíveis resultados para as duas PCRs são apresentados em 2-4: Amostra não metilada (2), amostra metilada (3) e amostra hemi-metilada (4). Em 5, C+ para metilação e em 6 controle positivo para amostra não metilada. Em 7, água + Mistura de PCR.

## DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a freqüência de infecção por *Helicobacter pylori* e pelo vírus de *Epstein-Barr* em 42 pacientes com câncer gástrico. A análise foi retrospectiva, em amostras de tecido fixado em formalina e incluído em parafina. Tal abordagem foi oportuna porque permitiu detectar *in situ* a presença de DNA destes agentes infecciosos em amostras do tumor e da mucosa gástrica adjacente. Avaliou-se ainda a freqüência de hipermetilação de regiões promotoras dos genes da caderina-E e *hMLH-1* e suas correlações com dados clínico-patológicos dos pacientes.

Em nossa casuística a maioria dos pacientes foi do sexo masculino, com média de idade de 62, 2 anos (**Gráfico 01**). Esse valor foi similar aos encontrados por outros autores em nosso país (Hassan *et al.*, 2001).

Não consideramos na presente análise a cor dos pacientes, devido à heterogeneidade étnica da população brasileira e à falta de critérios para delimitar cada etnia.

A localização mais freqüente do tumor em nosso estudo foi no antro gástrico (61,9%), conforme demonstrado no **Gráfico 05**, de modo similar ao relatado por autores (Seoane *et al.*, 2005; Harikumar *et al.*, 2005 ). Na maioria dos casos havia invasão de toda a parede do estômago pelo tumor (**Gráfico 07**), evidenciando lesões em fase avançada de evolução. De fato, nossos resultados demonstraram que 71,4% dos casos encontravam-se nos estádios III e IV de evolução (**Gráfico 02**), tal como descrito por outros autores (Isguder *et al.*, 2005; Lo *et al.*, 1999). Esse fato pode ser reflexo do diagnóstico tardio que em geral é feito para este tipo de tumor, fazendo com que esses pacientes tenham um prognóstico muito ruim.

O tipo histológico mais freqüente na presente casuística foi o adenocarcinoma intestinal (**Gráfico 03**), de modo similar ao demonstrado por outros estudos em nosso país e de outras regiões de alto risco para este tipo de neoplasia ( Seoane *et al.*, 2005 ). O tipo intestinal ocorre principalmente em indivíduos com idade mais avançada, é predominante entre os homens localiza-se principalmente no estômago distal e apresenta associação com a infecção por *Helicobacter pylori*.

No presente estudo a detecção do *H. pylori* foi avaliada por dois métodos: pela análise histológica, que permitiu a visualização direta da bactéria em 85,7% dos casos e pelo PCR, para o gene *ureaseC*, que demonstrou a presença de DNA da bactéria em 95% dos casos (**Gráfico 08**).

O método de visualização direta ao microscópio é eficiente e de baixo custo, entretanto, requer habilidade diagnóstica do analista para identificar a bactéria (Fallone *et al.* 1995). Já o método de PCR, apesar do custo, é uma técnica que apresenta maior sensibilidade, como pode ser documentado por nossos resultados, visto que foi capaz de identificar o genótipo do *H. pylori* em 5 amostras que haviam sido negativas ao exame histológico (**Gráfico 08**).

No presente estudo o gene *cagA* foi detectado em 23 casos (54,7%) de câncer gástrico. Este gene faz parte da ilha de patogenicidade *cag*, cujos genes expressam proteínas do sistema de secreção tipo IV, capazes de transferir produtos bacterianos, incluindo a proteína *cagA* para dentro das células do hospedeiro (Naumann, 2005). A presença desse gene está relacionada a maior resposta inflamatória do hospedeiro quando comparada à infecção por cepas que não expressam esse gene (Lee, 2005). Nossos resultados estão de acordo com investigações prévias, que demonstraram que pacientes infectados por cepas de *H. pylori* que expressam o gene *cagA* tem maior probabilidade de desenvolver câncer gástrico do que aqueles infectados por cepas que não expressam *cagA* (Parsonnet *et al*, 1997; Blaser *et al.*,1995). No Brasil, Queiroz e colaboradores (1998) demonstraram em estudo de casos controle desenvolvido em Belo Horizonte, Minas Gerais, que o status *cagA* tem alto impacto no risco para desenvolvimento de câncer gástrico.

O alelo *s1* do gene *vacA* foi detectado em 24 amostras, sendo que 15 amostras (62,5%) foram positivas para *CagA* (**Tabela 03**). Portanto, nossos resultados inferem que o alelo *vacA s1* apresentou maior correlação com as cepas positivas para *cagA*. Nossos dados referendam informações da literatura de que o alelo *vacA s1* é o que mais predomina em amostras de *H. pylori* (Saribasak *et al.*,2004) (**Tabela 03**). Identificamos cepas *vacA s2* somente em 4 amostras, sendo que 3 amostras foram *cagA*-. Esta associação foi relatada em estudo anterior (Ashour *et al.* 2002).

O alelo *m1* do gene *vacA* foi detectado em 26 amostras, sendo mais prevalente que o alelo *m2*, identificado somente em 3 amostras (**Tabela 03**). Deve-se destacar que *m2* só foi detectado em amostras *cagA*-. Nossos resultados estão de acordo com informações epidemiológicas de que *m1* é mais prevalente (86.2%) do que *m2* (13.8%) na península Ibérica, América Central e América do Sul (Van Doorn *et al.*, 1999). Identificamos alelos múltiplos *s1/s2* ou *m1/m2* em poucas amostras, que foram atribuídas à infecção por mais de uma cepa de *H. pylori*.

Com relação à combinação dos diferentes alelos do *Helicobacter pylori*, verificamos que cepas *cagA+s1m1* foram encontradas em maior número de casos de câncer gástrico (**Tabela 04**). Na literatura observamos que cepas *cagA+ s1/m1* são mais virulentas (Atherton JC, 1997). Bactérias com o genótipo *m1* estão relacionadas com maior liberação de citotoxinas

(Ashour *et al.*, 2002). Dessa forma, a presença de cepas *cagA+* *s1/m1* pode estar relacionada a maior agressão e inflamação na mucosa, contribuindo para a gênese do câncer gástrico.

Não encontramos diferenças quanto à distribuição dos genótipos *cagA* e *vacA* do *H. pylori* em relação ao sexo e à idade dos pacientes. Apesar da presente casuística ser pequena, nossos resultados estão de acordo com os relatados pelos estudos de Queiros e colaboradores (1998), que também não observaram correlação dos genótipos da bactéria com atributos demográficos em pacientes com câncer gástrico.

Relacionando *cagA* com os parâmetros anatomopatológicos observamos que não houve diferenças significativas da prevalência de infecção pela bactéria, portadora ou não do gene *cagA*, com o tipo histológico (**Tabela 05**). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, que demonstraram a presença de infecção por *Helicobacter pylori* tanto no câncer gástrico do tipo intestinal quanto no difuso (Seoane *et al.*, 2005). Além disso, quando correlacionamos a presença da bactéria com o estadiamento do tumor, verificamos maior prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* nos estádios III e IV (**Tabela 06**).

Quanto à localização do tumor no estômago, nossos resultados demonstraram maior prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* para as lesões situadas no antro gástrico do que para as lesões situadas no corpo ou na cárdia (**Tabela 07**), independentemente da cepa possuir ou não o gene *cagA*.

Em síntese, a presença de infecção por *Helicobacter pylori* avaliada em nosso estudo pela análise histológica, permitiu a visualização direta da bactéria em 85,7% dos casos e pela PCR, para o gene *ureaseC*, demonstrou a presença de DNA da bactéria foi detectada em 95% dos casos, sendo a combinação alélica mais freqüente *cagA+* *vacA* *s1/m1*. Estes resultados destacam a alta prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* no estômago de pacientes com câncer gástrico desta região estudada.

No presente estudo a pesquisa do vírus de *Epstein Barr* (EBV) foi investigada por dois métodos: PCR e hibridização *in situ* (HIS), conforme demonstrado no **Gráfico 09**. A pesquisa de infecção pelo vírus de *Epstein Barr* por PCR demonstrou que esse método não é específico para identificar a presença do EBV nas células epiteliais da mucosa gástrica, visto que não permite discriminar a célula, epitelial ou linfóide, que alberga o genoma do vírus. Em contrapartida, a maioria dos estudos utiliza atualmente a técnica de HIS, visto que permite

visualizar o genoma do EBV, por imunohistoquímica, nas células do tumor e da mucosa gástrica adjacente (Vo *et al.*, 2002).

Em nosso estudo somente uma amostra foi positiva para a presença de EBV (2,3%). Ela pertencia à classe de paciente masculino, com lesão deprimida no antro gástrico, do tipo histológico intestinal, em estadió III. Estes atributos estão de acordo com as informações da literatura, que referem predomínio de carcinomas associados ao EBV em homens (Koriyama *et al.* 2001; Shibata & Weiss, 1992; Gulley *et al.*, 1996), situados predominantemente no antro gástrico (Koriyama *et al.*, 2001; Herrera-Goepfert *et al.*, 1999).

Em síntese, a presença de infecção pelo EBV avaliada em nosso estudo por HIS com análise imunohistoquímica e pela PCR, demonstrou apenas uma amostra positiva para este agente etiológico. Estes resultados sugerem que o EBV, para essas amostras estudadas, não deve ter papel relevante na gênese do câncer gástrico.

A análise do padrão de metilação dos genes da caderina-E e *hMLH-1* foi realizada pela técnica *MSP-PCR*. Essa técnica, introduzida por Herman e colaboradores em 1996, é atualmente umas das mais utilizadas, devido à facilidade e especificidade (Galm & Herman, 2005).

Verificamos que 30 (71,4%) das 42 amostras analisadas apresentaram padrão metilado para o gene da caderina-E (**Gráfico 10**). Tamura e colaboradores (2004) relataram hipermetilação do gene da *caderina-E* em 51% dos casos de câncer gástrico. Chan e colaboradores (2003) demonstraram hipermetilação do gene da *caderina-E* em 57% dos casos de metaplasia intestinal, em 58% dos casos de câncer gástrico primário e em 65% dos casos de câncer gástrico metastático.

Das 30 amostras com hipermetilação do gene da caderina-E identificadas em nosso estudo, 7 apresentaram padrão parcialmente metilado. Este resultado pode estar relacionado ao fato de apenas algumas células apresentarem o promotor de *caderina-E* metilado enquanto que outras células apresentaram o padrão parcialmente metilado. Ou ainda, como em cada célula existem dois cromossomos homólogos, apenas um alelo poderia estar metilado e no outro alelo o promotor poderia estar preservado.

A inativação do gene da *caderina-E* parece estar relacionada a estágios mais avançados do processo de carcinogênese, como por exemplo, com as etapas de invasão e

metástase (Chan *et al.*, 2003). Nossos resultados confirmam essa correlação, visto que a maioria dos casos (23 amostras) que apresentavam padrão hipermetilado (metilação nos 2 alelos) pertenciam a casos em estádios III e IV. Por outro lado, 7 casos nos estádios I e II, apresentaram padrão parcialmente metilado para o gene da caderina-E.

Outro resultado que deve ser destacado é a correlação entre metilação do gene da caderina-E e a presença de metástases em linfonodos. As 23 amostras com metilação para o gene da caderina-E identificadas em nosso estudo apresentaram metástases em linfonodos. Alguns autores relataram que a caderina-E está envolvida com profundidade de invasão do tumor (Chan *et al.*, 2003). Entretanto, essa correlação não foi significativa em nossos dados, provavelmente devido à pequena dimensão da casuística. Outros autores mostraram que a metilação em *caderina-E* é observada em >50% em estágios iniciais de carcinomas gástricos do tipo difuso. Por outro lado, metilação do gene da caderina-E pode ser observada em condições não neoplásicas (Tamura, 2002), isso explica o achado em nossa casuística de amostras não neoplásicas que apresentaram metilação para caderina-E. Estes dados sugerem que outros fatores tais como idade ou inflamação da mucosa podem contribuir para metilação do gene da caderina-E. Por outro lado, dados de estudo com gastrites crônicas realizados por Kang e colaboradores (2003a) demonstram 85,1% de metilação em *caderina-E*. Tais dados sugerem a presença de alteração de metilação neste gene em fases iniciais do processo de tumorigênese do câncer gástrico, o que pode nos sugerir o mesmo como um potencial marcador para a detecção precoce no processo tumorigênico da lesão gástrica.

Os resultados do presente estudo demonstraram hipermetilação do promotor do gene da *caderina-E* em 71,4% dos casos de câncer gástrico. Entretanto, não podemos inferir sobre a perda de expressão do gene *caderina-E*, já que um estudo quantitativo não foi realizado.

Analisando o padrão de metilação do gene da *caderina-E* e sua correlação com a metilação do gene *hMLH-1* observamos que a maioria das amostras (93%) com hipermetilação do gene da *caderina-E* também apresentaram hipermetilação para *hMLH-1* (**Tabela 10**). Isso pode ser importante, pois há a possibilidade de ocorrência de diferentes eventos biológicos ocorrerem a nível tecidual, ocasionando a metilação desses genes e provavelmente à sua inativação funcional. E desta forma corroborando para uma possível maior agressividade deste tipo tumoral.

Deve ser destacado que dos 40 casos de câncer gástrico positivos para *H. pylori* 30 (75%) apresentaram padrão metilado do gene da *caderina-E*. Além disso, verificamos que 60% das amostras com metilação do gene da *caderina-E* foram positivas para a presença do gene *cagA* (**Tabela 11**).

Relacionando os genótipos do *H. pylori* com a metilação do gene da *caderina-E* verificamos que 12 (75%) das 16 amostras que apresentaram genótipo *cagA+ s1/m1*, foram metiladas para *caderina-E* (**Tabela 12**). Apenas 1 amostra não metilada para *caderina-E* foi negativa para *H. pylori*. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo permitem inferir que possivelmente a cepa mais virulenta *cagA+ vacA s1/m1* do *Helicobacter pylori* possa estar envolvida no processo de metilação do gene da *caderina-E*.

O padrão metilado verificado nas amostras de câncer gástrico talvez possa estar relacionado à inflamação ou ainda uma forma de proteção das células à exposição a mediadores inflamatórios que são liberados em resposta à infecção pelo *Helicobacter pylori* (Chan *et al.*, 2003), visto que, a metilação está significativamente associada à presença de infecção pelo *H. pylori*.

O *Helicobacter pylori*, detectado em 95% das amostras de câncer gástrico, está associado com aumento de mediadores inflamatórios assim como na gastrite crônica, como a interleucina-8 (IL8), GRO- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , ENA-78 e MCP-1, na mucosa gástrica (Aguiiar, *et al.*, 2001). A IL8 é uma potente ativadora de neutrófilos. A ativação de neutrófilos pode ajudar na mobilização do patógeno, porém também pode levar a danos na superfície epitelial aumentando o *turnover* celular, além de produzir espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio que podem induzir danos oxidativos no DNA (Aguiiar, *et al.*, 2001). Dessa forma, a infecção crônica pelo *H. pylori* pode levar a danos no DNA e o processo de metilação do gene da *caderina-E* pode ser desencadeado em função dos mediadores ou como proteção contra posteriores danos genéticos nesse gene.

Podemos concluir que existe relação entre metilação do gene da *caderina-E* e infecção pelo *H. pylori* em amostras de câncer gástrico. Além disso, podemos inferir que as cepas *cagA+ vacAs1/m1* conhecidas por serem as mais patogênicas possam estar contribuindo para o padrão de metilação no gene da *caderina-E*.

Verificamos que 14 (33,3%) das 42 amostras analisadas apresentaram metilação para o gene *hMLH-1*. Hong *et al.* em 2005 observou uma frequência em amostras de câncer gástrico de 26% dos 100 casos estudados para metilação de *hMLH-1*. Já Kang e colaboradores em 2003a, observou uma frequência de 20% entre os 80 casos de câncer gástrico estudado. Talvez pelo pequeno número de amostras que foram analisadas neste estudo, os nossos dados não nos permitiram reafirmar o que diz a literatura.

Correlacionando a frequência de metilação do *hMLH-1* com a presença de cepas *cagA* do *Helicobacter pylori* (**Tabela 17**) em nossas amostras de câncer gástrico, verificamos que 64% das amostras que estavam metiladas para *hMLH-1* também foram positivas para a presença da cepa *cagA+*. Não observamos correlação entre os genótipos do *H. pylori* e metilação do gene *hMLH-1* em nossas amostras de câncer gástrico.

Verificamos que 7 (16,6%) das 42 amostras analisadas foram positivas para Instabilidade de Microsatélites (MSI) pelo BAT-26. Esses dados não diferem dos relatados na literatura, que refere que cerca de 13 a 44% dos casos de câncer gástrico apresentam MSI (Halling *et al.*, 1999). Observamos positividade para o tecido normal adjacente ao tumor em uma das 7 amostras positivas para MSI. Entretanto, esse tecido era constituído por metaplasia intestinal, que pode apresentar instabilidade de microsatélites (Liu *et al.*, 2005).

Observando a **Tabela 23**, verificamos correlação entre a presença de cepas de *cagA+* do *Helicobacter pylori* e positividade para instabilidade de microsatélites, verificada em 85,7% das amostras. Este parece ser o primeiro relato que correlaciona a frequência de *cagA* e MSI em casos de câncer gástrico. Desta forma, podemos inferir sobre a importância das cepas *cagA+* do *Helicobacter pylori* na indução da instabilidade de microsatélites, observada em casos de câncer gástrico.

Outro dado interessante de nosso estudo foi à detecção da presença de MSI somente em casos de adenocarcinoma do tipo intestinal (**Tabela 24**). Nossos resultados foram confirmados por estudo recente, que relatou alta frequência de instabilidade de microsatélites em carcinomas do tipo intestinal (Choe *et al.*, 2005).

Sabe-se que a instabilidade de microsatélites constitui fator de bom prognóstico para pacientes portadores de câncer gástrico (Wu *et al.*, 2001). Dessa forma, a MSI deve estar relacionada ao tipo histológico de melhor prognóstico que é o intestinal (Wu *et al.*, 2000). Por

outro lado, não observamos correlação entre MSI e metástases em linfonodos (Wu *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2000), nem com o estadió do tumor. Entretanto foi observada uma correlação com a localização antral do tumor (**Tabela 26**) e isso também foi verificado em alguns artigos (Wu *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2000).

Postula-se que a alta freqüência de erros de reparo do DNA pode levar ao silenciamento de genes críticos cuja inativação pode levar ao desenvolvimento neoplásico. A alta freqüência de MSI no câncer gástrico esporádico pode estar relacionada à inativação epigenética de *hMLH1* em associação com a metilação do promotor e a perda da proteína *hMLH1* (Ishiguro *et al.*, 2003). Leung e colaboradores em 1999 demonstraram que a hipermetilação do gene *hMLH-1* está exclusivamente presente em alta freqüência nos casos de câncer gástrico do tipo esporádico, que conseqüentemente apresentam alta freqüência de MSI. Entretanto, não observamos em nosso estudo correlação entre o padrão de metilação de *hMLH-1* e a freqüência de instabilidade de microsátélites (**Tabela 29**). Isto pode ser explicado principalmente pela região em que os oligonucleotídeos flanqueiam, sendo que apenas regiões mais próximas da região codificadora estão diretamente relacionadas à presença de instabilidade de microsátélites (Ishiguro *et al.*, 2003).

Em câncer gástrico estudamos apenas MSI em BAT26, sendo assim, estamos detectando apenas altas instabilidades e provavelmente estamos perdendo algumas, dessa forma, acreditamos que seja necessário o estudo de outros marcadores moleculares além de BAT26, como foi sugerido em 1997 em Bethesda para HNPCC. Montando-se um painel de referência com vários marcadores moleculares talvez possamos obter resultados mais significativos e assim possamos nos dar base para discutir o papel da instabilidade de microsátélites no câncer gástrico correlacionando com os parâmetros anatomopatológicos.

A instabilidade de microsátélites é considerada marcador de bom prognóstico para câncer. Alguns estudos sugerem que a infiltração de linfócitos e/ou altos índices de apoptose sejam os mecanismos de melhor prognóstico relacionados nos casos de câncer com MSI. Nakata e colaboradores (2002) demonstraram intensa infiltração de leucócitos no tumor em amostras de câncer do cólon com MSI. Enquanto que no mesmo ano Michael-Robinson e colaboradores (2002) observaram altos índices de apoptose nas células neoplásicas em casos de câncer do cólon positivos para MSI .

Portanto, a detecção de MSI é relevante, visto que constitui marcador de bom prognóstico. Em nosso estudo, a frequência de MSI está de acordo com as informações da literatura. As características anatomopatológicas de nossos casos positivos para MSI, tais como, tipo histológico intestinal e ausência de metástase em linfonodos, são preditivas de bom prognóstico. Desta forma, podemos concluir que os casos de câncer gástrico com MSI identificados no presente estudo são menos agressivos do que os negativos para MSI.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar GR, Ayala G, Fierros-Zarate G. *Helicobacter pylori*: recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. *Salud Publica Mex.* 2001;43:237-47.

Ashour AA, Magalhaes PP, Mendes EN, Collares GB, de Gusmao VR, Queiroz DM, et al. Distribution of *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;33:173-8.

Atherton JC, Sharp PM, Cover TL, Gonzalez-Valencia G, Peek RM Jr, Thompson SA, et al. Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. *Curr Microbiol.* 1999;39:211-8.

Atherton JC. *H. pylori* virulence factors. *Br Med Bull.* 1998;54:105-20.

Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut.* 1997;40:701-3.

Becker KF, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol.* 2000;9:5-11.

Björkholm B, Falk P, Engstrand L, Nyren O. *Helicobacter pylori*: resurrection of the cancer link. *J Intern Med.* 2003;253:102-19.

Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 1995;55:2111-5

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58:5248-57.

Boletim do Inca. Ministério da Saúde. Registro Nacional Tumoral. Diagnósticos de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, 2005

- Butler AE, Colby TV, Weiss L, Lombard C. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. *American Journal of Surgical Pathology*. 1989;13:632-9.
- Chan AO, Lam SK, Wong BC, Wong WM, Yuen MF, Yeung YH, et al. Promoter methylation of *E-cadherin* gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. *Gut*. 2003;52:502-6.
- Chapelle A. Review Testing tumors for microsatellite instability. *European Journal of Human Genetics*. 1999;7: 407-8.
- Chen-Wun W, Chin-Wen C, Wen-chang L. Gastric cancer: prognostic and diagnostic advance. *Exp Rev Mol Med*. 2002;21:110-115.
- Choe WH, Lee SY, Lee JH, Shim SG, Kim YH, Rhee PL, et al. High frequency of microsatellite instability in intestinal-type gastric cancer in Korean patients. *Korean J Intern Med*. 2005;20:116-22.
- Correa P. Human Gastric Carcinogenesis: a multistep and multifactorial Process - First American cancer Society Award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Research*. 1992;52:6735-40.
- Corvalan A, Ding S, Koriyama C, Carrascal E, Carrasquilla G, Backhouse C, et al. Association of a distinctive strain of *Epstein-Barr* virus with gastric cancer. *Int J Cancer*. 2005; [Epub ahead of print].
- Covacci A, Rappuoli R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J Exp Med*. 2000;191:587-92.
- Covacci A, Rappuoli. PCR amplification of *Helicobacter pylori* sequences. In: Lee A and Meigraud F, editors. *Helicobacter pylori: techniques of clinical diagnosis*. London; Saunders; 1996. p. 94-111.
- Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*. 1999;284:1328-33.
- Craanen ME, Dekker W, Blok P, Ferwerda J, Tytgat GN. Time trends in gastric carcinoma: changing patterns of type and location. *Am J Gastroenterol*. 1992;87:572-9.
- Curi PR. Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas. 2nd ed. Tipomic: Botucatu, 1978.
- Czopek J, Bialas M, Rudzki Z, Zazula M, Pituch-Noworolska A, Zembala M, et al. The relationship between gastric cancer cells circulating in the blood and microsatellite instability positive gastric carcinomas. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16:128-136.
- Delgado S, Gomez M, Bird A, Antequera F. Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *The EMBO Journal*. 1998;17:2426-35.
- Fallone CA, Mitchell A, Paterson WG. Determination of the test performance of less costly methods of *Helicobacter pylori* detection. *Clin Invest Med*. 1995;18:177-85.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0 Lyon: IARC Press, IARC. Cancer Base, No.5., 2001.

Forman D, Sitas F, Newell DG, Stacey AR, Boreham J, Peto R, Campbell TC, et al. Geographic association of *Helicobacter pylori* antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China. International Journal of Cancer. 1990;46:608-11.

Forman D. The etiology of gastric cancer. IARC Sci Publ. 1991;(105):22-32.

Galm O, Herman JG. Methylation-specific polymerase chain reaction. Methods Mol Med. 2005;113:279-91.

Geradts J, Gulley ML, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. *Epstein-Barr Virus* in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. J Clin Pathol. 2002;55:669-75.

Go MF. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther. 2002;16:3-15.

Gulley ML, Pulitzer DR, Eagan PA, Schneider BG. *Epstein-Barr virus* infection is an early event in gastric carcinogenesis and is independent of bcl-2 expression and p53 accumulation. Hum Pathol. 1996;27:20-7.

Gulley ML. Review Molecular Diagnosis of *Epstein-Barr Virus*-Related Diseases. Journal of Molecular Diseases. 2001;3:300-5.

Halling KC, Harper J, Moskaluk CA, Thibodeau SN, Petroni GR, Yustein AS, et al. Origin of microsatellite instability in gastric cancer. Am J Pathol. 1999;155:205-11.

Handschuh G, Candidus S, Luber B, Reich U, Schott C, Oswald S, et al. Tumour-associated *E-cadherin* mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. Oncogene. 1999;18:4301-12.

Harikumar R, Chettupuzha AP, Harish K, Kumar KS, Thomas V. Sub-site specific time trends of carcinoma stomach in North Kerala--a retrospective analysis. Trop Gastroenterol. 2005;26:76-9.

Hassan HA, Sharma VK, Raufman JP. Changing trends in gastric carcinoma at a university medical center: a twelve-year retrospective. J Clin Gastroenterol. 2001;32:37-40.

Hermanek P, Wittekind C. News of TNM and its use for classification of gastric cancer. World J Surg. 1995;19:491-5.

Herrera-Goepfert R, Reyes E, Hernandez-Avila M, Mohar A, Shinkura R, Fujiyama C, et al. *Epstein-Barr virus*-associated gastric carcinoma in Mexico: analysis of 135 consecutive gastrectomies in two hospitals. Mod Pathol. 1999;12:873-8.

Hong SH, Kim HG, Chung WB, Kim EY, Lee JY, Yoon SM, et al. DNA hypermethylation of tumor-related genes in gastric carcinoma. J Korean Med Sci. 2005;20:236-41.

Iacopetta B, Hamelin R. Rapid and nonisotopic SSCP-based analysis of the *BAT-26* mononucleotide repeat for identification of the replication error phenotype in human cancers. *Hum Mutat.* 1998;12:355-60.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994;61:1-241.

Isguder AS, Nazli O, Tansug T, Bozdog AD, Onal MA. Total gastrectomy for gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2005;52:302-4.

Ishiguro K, Kawakami K, Maeda K, Ishida Y, Omura K, Watanabe G. Microsatellite instability in gastric cancer is closely associated with *hMLH1* hypermethylation at the proximal region of the promoter. *Int J Mol Med.* 2003;12:603-8.

Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, Tubbs RR, Sciotto CG, Wahl R, et al. T-cell lymphomas containing *Epstein-Barr* viral DNA in patients with chronic *Epstein-Barr* virus infections. *New England Journal of Medicine.* 1988;318:733-41.

Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* 1999;15:34-7.

Jones PL, Wolffe AP. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol.* 1999;9:339-47.

Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest.* 2003a;83:635-41.

Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along multistep gastric carcinogenesis. *Lab Invest.* 2003b;83:519-26.

Kang GH, Lee S, Shim YH, Kim JC, Ro JY. Profile of methylated CpG sites of *hMLH1* promoter in primary gastric carcinoma with microsatellite instability. *Pathol Int.* 2002;52:764-8.

Karim N, Pallesen G. *Epstein-Barr* virus (EBV) and gastric carcinoma in Malaysian patients. *Malays J Pathol.* 2003;25:45-7.

Kim HS, Lee BL, Woo KD, Bae SI, Kim HW. Assessment of markers for the identification of microsatellite instability phenotype in gastric neoplasms. *Cancer Letters.* 2001;164:61-68.

Kim TY, Jong HS, Jung Y, Kim TY, Kang GH, Bang YJ. DNA hypermethylation in gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20:131-42.

Koriyama C, Akiba S, Iriya K, Yamaguti T, Hamada GS, Itoh T, Eizuru Y, et al. *Epstein-Barr* virus-associated gastric carcinoma in Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians in Sao Paulo. *Jpn J Cancer Res.* 2001;92:911-7.

Krishnamurthy S, Lanier AP, Dohan P, Lanier JF, Henle W. Salivary gland cancer in Alaskan natives, 1966-1980. *Human Pathology.* 1987;18:986-96.

Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2752-6.

Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt at histoclinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;64:31-49.

Lee HS, Choi IS, Lee HK, Kim SH, Yang HK, Kang GH, et al. Distinct Clinical Features and Outcomes of Gastric Cancers with Microsatellite Instability. *Mod Pathol.* 2002;15:632-40.

Lee YC. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Korean J Gastroenterol.* 2005;46:159-65.

Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. *hMLH1* promoter methylation and lack of *hMLH1* expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res.* 1999;59:159-64.

Leung WK, Yu J, Ng EK, To KF, Ma PK, Lee TL, et al. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer.* 2001;91:2294-301.

Leyvraz S, Henle W, Chahinian AP, Perlmann C, Klein G, Gordon RE, et al. Association of *Epstein-Barr* virus with thymic carcinoma. *New England Journal of Medicine.* 1985;312:1296-9.

Lindahl T, Tooze J. *Cancer Surveys.* vol 28 ed. Cold Spring Harbor Lab Press: New York, 1996.

Liu P, Zhang XY, Shao Y, Zhang DF. Microsatellite instability in gastric cancer and pre-cancerous lesions. *World J Gastroenterol.* 2005;11:4904-7.

Lo SS, Kuo HS, Wu CW, Hsieh MC, Shyr YM, Wang HC, et al. Poorer prognosis in young patients with gastric cancer? *Hepatogastroenterology.* 1999;46:2690-3.

Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer.* 1996;78:1149-67.

Michael-Robinson JM, Reid LE, Purdie DM, Biemer-Huttmann AE, Walsh MD, Pandeya N, et al. Proliferation, apoptosis, and survival in high-level microsatellite instability sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7:2347-56.

Miller BA, Kolonel LN, Bernstein L, Young Jr. JL, Swanson GM, West D. *Racial/Ethnic Patterns of cancer in the US 1988-1992.* Bethesda: National Cancer Institute; MD; 1996.

Mironov NM, Aguelon MA, Potapova GI, Omori Y, Gorbunov OV, Klimenkov AA, et al. Alterations of (CA)<sub>n</sub> DNA repeats and tumor suppressor genes in human gastric cancer. *Cancer Research.* 1994;54:41-4.

Myung N, Kim MR, Chung IP, Kim H, Jang JJ. Loss of *p16* and *p27* is associated with progression of human gastric cancer. *Cancer Lett.* 2000;153:129-36.

- Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, Nishioka N, Tanaka H, Ohira M, et al. Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8:2536-40.
- Naumann M. Pathogenicity island-dependent effects of *Helicobacter pylori* on intracellular signal transduction in epithelial cells. *Int J Med Microbiol.* 2005;295:335-41.
- O'Connor F, Buckeley, M O'Morain, C. *Helicobacter pylori*: the cancer link. *JR Soc Méd.* 1996;86:674-8.
- Ottini L, Palli D, Falchetti M, D'Amico C, Amorosi A, Saieva C, et al. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with tumor location and family history in a high risk population from Tuscany. *Cancer Res.* 1997;57:4523-29.
- Palli D, Russo A, Ottini L, Masala G, Saieva C, Amorosi A, et al. Red meat, family history, and increase risk of gastric cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 2001;61:5415-19.
- Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk for gastric cancer in people with *CagA* positive or *CagA* negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 1997;40:297-301.
- Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:28-37.
- Pinto M, Oliveira C, Machado JC, Cirnes L, Tavares J, Carneiro F, et al. MSI-L gastric carcinomas share the *hMLH1* methylation status of MSI-H carcinomas but not their clinicopathological profile. *Lab Invest.* 2000;80:1915-23.
- Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Oliveira AM, Oliveira CA, Magalhaes PP, et al. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer.* 1998;78:135-9.
- Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene.* 1994;6:29-32.
- Rivas-Traverso F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: Factores de virulência, patologia y diagnóstico. *Rev Biomed.* 2000;11:187-205.
- Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2002;5:5-11.
- Sakaguchi T, Watanabe A, Sawada H, Yamada Y, Yamashita J, Matsuda M, Nakajima M, Miwa T, Hirao T, Nakano H. Prognostic value of cyclin E and p53 expression in gastric carcinoma. *Cancer.* 1998;82:1238-43.
- Salama NR, Otto G, Tompkins L, Falkow S. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun.* 2001;69:730-6.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001.

- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 1994;17:914-21.
- Saribasak H, Salih BA, Yamaoka Y, Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1648-51.
- Seoane A, Bessa X, Balleste B, O'Callaghan E, Panades A, Alameda F, et al. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: relationship with histological subtype and tumor location. *Gastroenterol Hepatol*. 2005;28:60-4
- Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM. Association of *Epstein-Barr* virus with undifferentiated gastric carcinoma with intense lymphoid infiltration: lymphoepithelioma-like carcinoma. *American Journal of Pathology*. 1991;139:469-74.
- Shibata D, Weiss LM. *Epstein-Barr* virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 1992;140:769-74.
- Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of *p16* hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab Invest*. 2000;80:689-95.
- Shiramizu B, Barriga F, Neequaye J, Jafri A, Dalla-Favera R, Neri A, et al. Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and *Epstein-Barr* virus association. *Blood*. 1991;77:1516-26.
- Shirin H, Hibshoosh H, Kawabata Y, Weinstein IB, Moss SF. p16Ink4a is overexpressed in *H. pylori*-associated gastritis and is correlated with increased epithelial apoptosis. *Helicobacter*. 2003;8:66-71.
- Sipponen P, Marshall BJ. Gastritis and gastric cancer western countries. *Gastroenterol Clin N Am*. 2000;29:579-92.
- Soussi T. Cycle cellulaire et apoptose: le gene suppresuer de tumuer p53. *Med Sci*. 2000;16:496-72.
- Stemmermann GN. Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. *Cancer*. 1994;74:556-64.
- Tahara E. Molecular prognostic factors of gastric cancer. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Internacional G. C. Congress; held in Munich, Germany; Monduzzi. Editore Sp. A. Bologna, Italy 1997: 371-7.
- Tahara R. Genetic alteration in human gastrointestinal cancers. *Cancer*. 1995;75:1410-7.
- Takeuchi K, Ohno Y, Tsuzuki Y, Ando T, Sekihara M, Hara T, et al. *Helicobacter pylori* Infection and Early Gastric Cancer. *J Clin Gastroenterol*. 2003;36:321-4.
- Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, et al. *E-cadherin* gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:569-73.
- Tamura G. Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer *Histol Histopathol*. 2002;17:323-9.

- Tamura G. Promoter methylation status of tumor suppressor and tumore-related genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Histol Histopathol.* 2004;19:221-8.
- Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E. The *Helicobacter pylori* *VacA* toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J Clin Invest.* 2001;108:929-37.
- Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JAN. *Microbiologia* 3rd ed. Atheneu: S. Paul, 1999.
- Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DM, et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1999;116:823-30
- Van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asbroek M, Sousa JC, et al. Typing of *Helicobacter pylori vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. *Clin Microbiol.* 1998;36:1271-6.
- Verma M. Viral Genes and Methylation. *Ann NY Acad Sci.* 2003;983:170-80.
- Vo QN, Geradts J, Gulley ML, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. *Epstein-Barr* virus in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. *J Clin Pathol.* 2002;55:669-75.
- Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer.* 1993; 71:677-85.
- Weeks DL, Sachs G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 2001;40:1249-59.
- Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. Detection of *Epstein-Barr* viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *New England Journal of Medicine.* 1989;320:502-6.
- Weiss LM, Strickler JG, Warnke RA, Purtilo DT, Sklar J. *Epstein-Barr* viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *American Journal of Pathology.* 1987;129:86-91.
- White D, Fenner F. *Medical Virology.* 4th ed. Academic Press: San Diego, California 1994.
- Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1993;342:575-7.
- Wu CW, Chen GD, Jiang KC, Li AF, Chi CW, Lo SS, et al. A genome-wide study of microsatellite instability in advanced gastric carcinoma. *Cancer.* 2001;92:92-101
- Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Chang MC, et al. Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;27:403-11.

Yanai H, Murakami T, Yoshiyama H, Takeuchi H, Nishikawa J, Nakamura H, et al. *Epstein-Barr* virus-associated gastric carcinoma and atrophic gastritis. *J Clin Gastroenterol*. 1999;29:39-43.

Zambon, CF, Novaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M. *Helicobacter pylori* *babA2*, *cagA*, and *s1 vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol*. 2003;56:287-91.

Zelada-Hedman M, Iselius L, Gunven P, Weger A, Nordenskjold M, Skoog L, et al. Genetic rearrangements in sporadic and familial gastric carcinomas detected with microsatellite markers. *European Journal of Surgical Oncology*. 1994;20:667-673.

Zivny J, Wang TC, Yantiss R, Kim KH, Houghton J. Role of therapy or monitoring in preventing progression to gastric cancer. *J Clin Gastroenterol*. 2003;36:S50-60.

zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*. 1970;228:1056-8.

## **Considerações Finais**

Amostras arquivadas a partir de 1998 foram utilizadas neste trabalho e aquelas mais recentes mostraram-se melhores e mais adequadas as análises, contudo o trabalho pode ser realizado com sucesso desde a extração do material nucléico até as análises moleculares propostas.

Os resultados encontrados por este trabalho nos permitem concluir que a presença do agente *Helicobacter pylori* e principalmente das cepas *cagA+* *m1/s1* na tumorigênese gástrica é de alta relevância para a progressão da mesma. Bem como o método de detecção molecular pela amplificação de genes específicos é o método de escolha mais eficaz. A baixa detecção do agente EBV nesta casuística quando comparada à literatura nos sugere um papel pouco ou não relevante deste agente na carcinogênese gástrica, porém ainda deve ser tema de novos estudos, principalmente com a técnica de HIS que se mostrou bem mais adequada para a análise.

Foi possível estabelecer uma relação entre a hipermetilação do promotor do gene da *caderina-E* e infecção pelo *H. pylori*, nesta casuística estudada. Tal metilação correlaciona-se com casos metastáticos, assim é de vital importância um maior aprofundamento nesses estudos com a análise a nível protéico para assim se comprovar o real impacto desta metilação na biologia do tumor.

É possível ainda inferir a relação entre infecção por cepas de *cagA+* do *Helicobacter pylori* e instabilidade de microsatélites nessas amostras tumorais. O trabalho com material de arquivo é de grande valia no sentido em que as amostras estão presentes na Instituição e dados relacionados à sobrevivência do paciente podem ser acessados com maior facilidade, por ser um estudo retrospectivo, infelizmente não foi possível o acesso aos dados clínicos relevantes à ampliação da discussão dos achados devido a falhas no sistema de documentação dos mesmos.

## **Apêndice**

## Extração do DNA

### a) Desparafinização das amostras

Os cortes histológicos foram colocados em três tubos separados e submetidas à extração do DNA. A desparafinização foi feita adicionando-se 1,5 ml de xilol e incubação a 37°C por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado, seguido de novas trocas de xilol até completa remoção da parafina. Após a centrifugação e remoção de todo o xilol, o precipitado foi reidratado com sucessivas trocas em: etanol 100%, 75%, 25% e finalmente água, sendo cada troca precedida de homogeneização e centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos e remoção completa do sobrenadante.

b) Após a remoção da parafina, foi testado e utilizado o *kit* para extração *Nucleon Hard Tissue for DNA extraction from paraffin section* Amersham Biosciences\* (cat# RPN 8509), utilizado conforme especificação abaixo:

Na amostras foram adicionados 350 µl do reagente B\* e 20 µl da solução de proteinase K\* (10 mg/ml) (ou mais se a amostra não estivesse bem digerida), e deixadas incubar a 55 °C por uma noite. Posteriormente, para a desproteinização foram adicionados 110 µl da solução de perclorato de sódio\* (5M), misturados por inversão. Para a extração do DNA foram adicionados 600 µl de clorofórmio e misturados por inversão. A esta mistura foram adicionados 150 µl da resina nucleon\* e sem misturar as fases, foram centrifugadas a velocidade máxima por 1 minuto. A precipitação do DNA se deu pela transferência da fase superior (sem perturbar a camada de resina nucleon - de cor marrom) para um tubo limpo de polipropileno tipo eppendorf de 2,0 ml, devidamente identificado. À mistura foram adicionados 2 volumes de etanol 100% gelado, e após ser misturado por inversão foi deixado em repouso à -20 °C por 1-2 horas para a precipitação do DNA (nesta fase quando necessário foi adicionado 1 µl da solução de glicogênio 20 µg/ml). A mistura foi submetida a uma centrifugação a velocidade máxima por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foram adicionados 1ml de etanol 70% gelado, misturado por inversão, e novamente centrifugado a velocidade máxima

por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e após secagem do precipitado a temperatura ambiente, o DNA foi re-hidratado em 40µl de água estéril e posteriormente incubado a 65°C por 1 hora. Após a extração as amostras foram divididas em alíquotas e armazenadas em freezer -70°C até o momento do experimento.

c) Além do kit *Nucleon Hard Tissue for DNA extraction from paraffin section* a técnica de extração do DNA de material parafinado foi padronizada utilizando o *Genomic DNA Purification Kit ( promega) \** para extração de material fresco. Para utilização deste *kit* o material foi primeiramente desparafinado, logo após foi adicionado 300 µl da solução de lise nuclear\* na amostra e em seguida 20 µl da solução de proteinase K\* (10mg/ml). A amostra foi incubada a 55°C por uma noite, ou até completa digestão do tecido. Posteriormente foi adicionado 3 µl da solução de RNase\* e novamente a amostra foi incubada por 30 minutos a 37 °C e a esta mistura foi adicionada 300µl da solução de precipitação de proteína\* e após agitar em aparelho tipo vórtex, as amostra foram resfriadas em gelo por 5 minutos, seguidas de uma centrifugação a velocidade máxima por 4 minutos. Para a precipitação do DNA o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente e após mistura por inversão a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi removido e ao precipitado foi adicionado etanol 70% e lavado por centrifugação. O DNA depois de seco foi re-hidratado em 40 µl em água estéril e incubado a 65°C antes do uso. Após a extração as amostras foram alicotadas e armazenadas em freezer -70°C até o momento dos experimentos.

\*Material fornecido pelos Kits.

### **Análise da qualidade do DNA extraído através da amplificação do gene *GAPDH***

Após a extração do DNA genômico dos tecidos coletados, a presença e a qualidade do mesmo foi monitorada através da amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de 1µl de DNA para o gene constitutivo *GAPDH (Gliceraldeido 3 – fosfato)*. Esse gene foi selecionado para amplificação, pois o produto de seus oligonucleotídeos apresenta tamanho semelhante aos produtos dos genes que desejávamos amplificar, além de ser um bom gene constitutivo. Como controles positivos para a reação, foram utilizadas amostras de doadores de

sangue cuja reação de PCR já tivesse sido positiva para o gene *GAPDH* e submetidas ao seqüenciamento de seu DNA em seqüenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems) e comparadas às seqüências dos bancos de dados genômicos públicos para verificação de suas especificidades (*GenBank*) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

O produto amplificado foi observado em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante (devido sua maior sensibilidade e melhor visualização do produto de amplificação), segundo manipulações descritas em Sambrook e colaboradores (2001), corado por nitrato de prata. 7 µl do produto de amplificação foram utilizados, 2 µl de 10X Blue Juice (Invitrogen, cat# 10816-015) diluído 1/1 em água deionizada. Foram utilizados 4 µl do marcador de peso molecular de DNA de 100pb diluído para 100 ng (Invitrogen, cat #15628-050). Para a corrida de eletroforese utilizamos tampão TBE 1X sob 100Volts durante 40 minutos.

#### **Deteção da presença da bactéria *Helicobacter pylori* através da amplificação por PCR do gene *ureaseC***

Para a deteção da bactéria foi utilizada a técnica de PCR, amplificando-se uma região do gene *ureaseC*. A referência, seqüência dos oligonucleotídeos, tamanho do produto a ser amplificado se encontra na **Tabela 01**. A visualização da amplificação foi realizada em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante (Sambrook *et al.*, 2001) corado pelo nitrato de prata. Foram utilizados 7 µl do produto de amplificação, misturados a 2 µl de 10X Blue Juice (Invitrogen, cat# 10816-015) diluído 1/1 em água e 4 µl do marcador de peso molecular de DNA de 100pb diluído para 100ng (Invitrogen, cat# 15628-050) diluído conforme recomendado pelo fabricante. Para a corrida de eletroforese foi utilizado tampão TBE 1X sob voltagem de 100V durante 40 minutos.

#### **Genotipagem das cepas de *H. pylori*, amplificando seus principais genes de virulência: *vacA* (*s1/s2*, *m1/m2*) e *cagA***

A genotipagem das cepas de HP foi realizada utilizando-se a técnica de PCR. Para a amplificação do gene *cagA* e *vacA* foram utilizados 1 µl de DNA e oligonucleotídeos específicos para cada região descritos na **Tabela 01**, onde também está descrito o tamanho do produto a

ser amplificado e a referência. A visualização do produto da PCR foi realizada através de gel de poliacrilamida 6% não desnaturante e corado com nitrato de prata, como já descrito anteriormente. 7 µl do produto de amplificação, 2 µl de 10X Blue Juice (Invitrogen, cat# 10816-015) diluído 1/1 em água e 4 µl do marcador de peso molecular de DNA de 100pb diluído para 100 ng (Invitrogen, cat# 15628-050) diluído conforme recomendado pelo fabricante. Para a corrida de eletroforese foi utilizado tampão TBE 1X submetido à voltagem de 100V durante 50 minutos. Um tempo maior (80 minutos) foi necessário para a corrida de eletroforese para *vacA s1/s2*, garantindo uma boa separação dos segmentos, que apresentam pouca diferença em comprimento.

### **Análise do Padrão de Metilação das ilhas CpG do promotor do gene *caderina-E* e *hMLH* por MSP- PCR**

Para o tratamento com bissulfito de sódio foram necessários 2 µg de DNA de cada amostra em um volume final de 17 µl (diluído em água estéril). O tratamento foi realizado conforme descrito abaixo:

#### Desnaturação do DNA:

- Foi adicionado 1µl de Esperma de Salmão (Invitrogen, cat# 15623-011);
- A seguir, adicionou 2 µl de NaOH 3M;
- As amostras foram homogeneizadas por agitação em aparelho tipo vórtex e incubadas por 20 minutos a 50°C em banho seco;

#### Tratamento com Bissulfito de Sódio:

- Soluções para cada amostra:

Solução 1	}	Bissulfito de Sódio (Sigma, cat#101K0157).....0,237 g
		Água esterilizada a 80 °C.....0312 ml
		NaOH 2 M.....0,087 g
Solução 2	}	Hidroquinona (Sigma, cat#32K2524).....0,014 g
		Água esterilizada a 80 °C.....5 ml

- Após a dissolução das soluções de Hidroquinona e Bissulfito de sódio com auxílio de um vórtex, nesta última solução foi adicionada NaOH 2M (necessário para certa o pH para 5,0);
- A seguir, adicionamos metade da solução de hidroquinona ao bissulfito e homogeneizamos com auxílio do vórtex.
- Em cada amostra adicionamos 500 µl desta solução e incubamos a 70 °C durante 3 horas. Os tubos com as amostras tratadas foram envolvidos com papel alumínio, pois a hidroquinona é fotossensível.

#### ***Purificação do DNA tratado com Bissulfito de Sódio***

Para a purificação das amostras utilizamos o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, cat# A9281) e procedemos como relatado abaixo:

- Identificamos os tubos do kit e os tubos de polipropileno de 2ml.
- Adicionamos as amostras à solução *Membrane Binding\** na mesma proporção.
- A solução foi homogeneizada por inversão.
- A mistura foi transferida para *SV Minicolumn\** do kit de purificação.
- A minicoluna com a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 1 min.
- Submetida à centrifugação a 10000 g por 1 min. O produto de centrifugação foi descartado e depois retornamos a *SV Minicolumn\** para o mesmo tubo.
- Foram adicionados 700 µl de solução *Membrane Wash\** na minicoluna.
- Submetida à nova centrifugação a 10000 g por 1 min. O produto de centrifugação foi descartado e depois retornamos a *SV Minicolumn\** para o mesmo tubo.
- Depois adicionamos 500 µl de solução *Membrane Wash\** na minicoluna.
- Submetida novamente à centrifugação a 10000 g por 5 min. O produto de centrifugação foi descartado e depois retornamos a *SV Minicolumn\** para o mesmo tubo.
- Centrifugamos novamente a 10000 g por 1min.
- Transferimos a coluna para um novo tubo.
- Adicionamos 45 µl de H<sub>2</sub>O a 80 °C e incubamos por 1 min a temperatura ambiente.
- A minicoluna foi centrifugada a 14000rpm por 3 min.
- A seguir, retiramos e descartamos a coluna.

- Adicionamos 5 µl de NaOH 3M e incubamos a temperatura ambiente por 10 min.

\*material fornecido pelo kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System

#### ***Precipitação do DNA purificado***

- Foram adicionados 75 µl de acetato de amônio 5M na amostra purificada.
- Incubamos a solução por 5 minutos para completar a deaminação.
- Depois adicionamos 350 µl de etanol 100% gelado a solução e 1µl de glicogênio (Invitrogen, cat#10814-010) 20 µg/µl.
- A amostra foi incubada a –20 °C por 12 horas.

#### ***Ressuspensão***

- A amostra foi submetida à centrifugação a 14000rpm por 15 min e a seguir retiramos o sobrenadante.
- Adicionamos 500 µl de etanol 70% gelado.
- Novamente a amostra foi submetida à centrifugação a 14000rpm por 15 min.
- O precipitado foi seco em temperatura ambiente.
- Ressuspendemos o DNA em 20 µl de água estéril e incubamos a 65°C por 15 min.
- O DNA dissolvido foi armazenado em Freezer –70°C, até o momento do uso. O tratamento com bissulfito de sódio converte as citosinas não metiladas em uracilas, enquanto que as citosinas metiladas permaneceram inalteradas. Essas uracilas foram posteriormente convertidas em timinas durante a PCR.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida não desnaturante 6% (Sambrook *et al.*, 2001), corado pelo nitrato de prata (Sanguinetti *et al.*, 1994). Para a eletroforese foi utilizado tampão TBE 1X submetido à voltagem de 100V durante 40 minutos. Como controles positivos foram utilizados DNA genômico de indivíduos sem a doença tratados com a enzima CpG metilase (New England BioLabs, cat # M0226S).

Para análise do padrão de metilação dos promotores dos genes da caderina-E e *hMLH-1* foram realizadas ampliações com DNA concentrado e para alguns casos DNA diluído (1:2 e 1:4), visto que, não foi possível a amplificação de algumas amostras com DNA concentrado.

### Reação de Seqüenciamento dos DNAs

Em microplacas de PCR foram distribuídos 8µl da seguinte solução:

#### Reação de Seqüenciamento

Reagentes	Volumes (µL)
H <sub>2</sub> O esterilizada	3,6
BigDye (Kit <i>ABI Prims™</i> )	4,0
Oligonucleotídeo <i>sense</i> ou <i>anti-sense</i> (1pmol)	0,4
Produto amplificado por MSP-PCR (amostra)	2,0
Volume Final	10

Para cada poço da microplaca, foram transferidos 2,0 µl do produto obtido pela MSP-PCR, homogeneizando bem com micropipeta. A ciclagem utilizada para a reação de PCR de seqüenciamento foi a seguinte:

#### Ciclagem PCR de Seqüenciamento Temperatura (°C) Tempo

Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	95	5 min
Desnaturação	96	10seg
Anelamento	50	5 seg
Extensão	60	4 min
Extensão final	4	∞

N° de ciclos:  
40

#### Precipitação das amostras de DNA em microplaca

A precipitação das amostras foi realizada da seguinte forma:

Em cada poço da microplaca de PCR de seqüenciamento foram adicionados 40µL da solução: 3.300 µl de isopropanol e 1.100 µl de água estéril. A solução contida na microplaca foi homogeneizada em agitador tipo vórtex por 1 minuto.

A seguir, a microplaca foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. Procedeu-se a centrifugação da microplaca a 4.000 rpm por 25 minutos a 18°C. A microplaca foi invertida para o descarte do sobrenadante e colocada invertida sobre papel absorvente.

Em seguida, foram adicionados em cada poço da microplaca 130 µl de etanol 70% (10.010 µl etanol 100% + 4.290 µl de água estéril), preparados no momento do uso.

Novamente a microplaca foi homogeneizada no agitador tipo vórtex por 1 minuto e, a seguir centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o excesso de solução retirado por pulso de centrifugação com a microplaca invertida sobre papel absorvente. A microplaca foi seca em termociclador à temperatura de 90°C por 2 minutos. Depois a placa foi mantida embrulhada com papel alumínio a -20°C até o momento do uso.

#### ***Desnaturação das amostras***

Em cada poço da microplaca foram aplicados 2,0µL de *loading dye* (Applied Biosystem®) contendo formamida, depois a microplaca foi agitada durante 1 minuto no aparelho tipo vórtex.

A seguir, foi realizado um pulso de centrifugação da microplaca por 2 segundos a 1000 rpm, as amostras foram desnaturadas em termociclador a 95°C por 3 minutos. A microplaca foi mantida em gelo úmido embrulhado com papel alumínio até o momento da aplicação das amostras no gel.

#### ***Análise dos resultados gerados por seqüenciamento automático***

O seqüenciador automático ABI 377-Applied Biosystem® foi utilizado para a análise das seqüências produzidas. As seqüências geradas foram analisadas e comparadas às seqüências disponíveis em bancos de dados (*GenBank*) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) dos genes *Caderina-E* e *hMLH-1*. Os resultados obtidos foram analisados individualmente utilizando o

programa de alinhamento de seqüências *BioEdit* ([www.mbio.ncsu.edu/bioedit.htm](http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.htm)) e a análise dos genes estudados foram visualizados através da análise dos cromatogramas.

### **Análise da Presença do Vírus de *Epstein Barr* (EBV)**

#### **PCR para detecção do EBV**

Na reação de PCR para o gene *EBNA-1* foi utilizada uma solução contendo: Tampão de reação 10x [200mM Tris-HCl, 500mM KCl (pH 8.4)], 1,5mM MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,2mM de cada dNTP (10 mM), 1u de Platinum *Taq* DNA polimerase (5u/μl) (Invitrogen Life Technologies), 5pmoles de cada oligonucleotídeo (sense e anti-sense), 1 μl de DNA molde concentrado e água q.s.p. para 25.0 μl.

O produto amplificado foi visualizado em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante (Sambrook *et al.*, 2001) corado pelo nitrato de prata (Sanguinetti *et al.*, 1994). Para a corrida de eletroforese foi utilizado tampão TBE 1X submetido à voltagem de 100V durante 40 minutos.

#### **Hibridação *in situ* (HIS) para detecção do EBV**

A HIS foi realizada no Departamento de patologia na Universidade Federal do Ceará-Fortaleza, em colaboração com a Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst.

Em resumo, cortes histológicos de 5μm foram submetidos aos seguintes procedimentos:

- Desparafinização e desidratação em xilol e gradiente de álcool;
- Incubação das lâminas com proteinase K;
- Desidratação;
- Incubação das laminas com solução de pré-hidratação por 2 horas;
- Incubação das laminas com solução hibridação, contendo a sonda na concentração de 0,25 ng/μl, por 12 horas;
- Lavagens pós-hibridação em solução 2xSSC;
- Incubação com substrato (peróxido de hidrogênio) e solução de diaminobenzidina (DAB) como cromógeno;
- Contra coloração com verde de metila.

### **Análise de MSI em BAT26**

A análise de Instabilidade de Microsatélites em BAT26 foi realizada no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - São Paulo, em colaboração com a Dra. Otávia Luisa Caballero e com o auxílio do técnico Fabrício Carvalho.

Para as análises de MSI em BAT26 na mucosa gástrica foram utilizados oligonucleotídeos que amplificam 26 repetições mononucleotídicas de adenina. O oligonucleotídeo *sense* foi marcado com fluorescência 6-FAM, foi utilizado um marcador de escala alélica ROX. A amplificação do DNA foi realizada para um volume final de 25  $\mu$ l contendo 1X PCR buffer, 6.0 mM de  $MgCl_2$ , 0.2 uM de dNTPs, 0.4  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo, 2 unidades de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, cat # 10966-030) e 1  $\mu$ l de DNA. Foi utilizado o termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software GeneScan.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)