

**FREQUÊNCIA DE DANO NO DNA EM PACIENTES
PORTADORES DE METAPLASIA INTESTINAL OU
ADENOCARCINOMA DE ESTÔMAGO E ESÔFAGO E
SUA CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO
DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE
GLICEROLIPÍDEOS**

LETICIA KOCH LERNER

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Luiz Fernando Lima Reis

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Lerner, Leticia Koch

Freqüência de dano no DNA em pacientes portadores de metaplasia intestinal ou adenocarcinoma do estômago e esôfago e sua correlação com os níveis de expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicerolídeos / Leticia Koch Lerner – São Paulo, 2009.

115p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Luiz Fernando Lima Reis

Descritores: 1. METAPLASIA. 2. ADENOCARCINOMA. 3. ESÔFAGO. 4. ESTÔMAGO. 5. EXPRESSÃO GÊNICA. 6. DANO AO DNA. 7. PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS. 8. METABOLISMO DOS LÍPIDEOS.

Voyez-vous dans la vie, il n'y a pas de solutions. Il y a des forces en marche: il faut les créer, et les solutions les suivent.

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Luiz Fernando Lima Reis, pela oportunidade de realizar meus projetos de Iniciação Científica e de Mestrado em seu laboratório. Por todos os ensinamentos científicos, e também pelos conselhos que ele sempre adiciona no final das conversas. Por ser uma das pessoas mais inteligentes que eu conheço, e um exemplo de pesquisador para todas nós. E por sempre dar um jeito de resolver nossos problemas, no final.

Ao CNPq e CEPID/Fapesp, pelo apoio financeiro.

À Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente, por todo o auxílio prestado, em especial à Luciana (sempre pronta para resolver nossos “probleminhas”!). Às funcionárias da Biblioteca, em especial à Suely.

À direção do Hospital AC Camargo, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À todos os membros do laboratório pela amizade, pelos ensinamentos e pela ajuda durante todo esse tempo que passamos juntos; pelas discussões e ensinamentos científicos, pela ajuda nos momentos difíceis, e pelos ótimos momentos que passamos juntos.

Aos meus “babies” Nair, Ana Helena, Barbara e Camila. À Barbarella, que mesmo tendo ido para outro laboratório, sempre volta com a desculpa de fazer os experimentos no nosso lab. À Camis, que chegou depois e já foi “englobada” no nosso cantinho. À Honey, que desde sempre nos diverte com as melhores histórias do mundo. Muito obrigada por tudo que vocês fizeram por mim: por estarem sempre prontas para ajudar nos momentos difíceis, e principalmente por tornarem meus dias no lab divertidíssimos. Aliás, não só no lab como em todos os nossos eventos gastronômicos e sociais. Acho que se não fosse por vocês não teria chegado até aqui. Afinal, quem tem amigos nunca está sozinho, né?!

À Nair, minha co-orientadora na prática, merece um parágrafo à parte. Muito obrigada por ter me ajudado e me ensinado um monte de coisas desde o meu primeiro dia no laboratório; por todos os conselhos, discussões científicas (e não científicas), ajuda nos experimentos (mesmo quando ela tinha as coisas dela pra fazer) e tudo mais. Se não fosse pelas suas orientações, em todos os sentidos, eu não teria conseguido terminar!

À Graziela, Juliana, Marina (nosso bebê), Bianca e Vladmir, pela ajuda e pelas histórias engraçadíssimas.

Ao Alex, meu orientador da Iniciação, e a Dri, pelos ensinamentos, ajuda e paciência.

À minha “mãe” Aline, à Regininha e à Evania, que mesmo não estando mais tão perto fisicamente, sempre estiveram perto pras conversas, conselhos, favores e muitas risadas.

À Suely Nonogaki, pela realização das reações de imunoistoquímica, e pela paciência pra me explicar e responder todas as minhas dúvidas. Ao Carlinhos e ao Severino pela confecção das lâminas de TMA e HE. Ao André, pela paciência em “garimpar” todas as minhas amostras no Banco de Tumores (e por agüentar minhas lamentações!).

Aos ex-membros do lab Ana Paula Lepique, Lara Termini e Patricia Possik, por toda a ajuda em relação a experimentos e reagentes.

Às meninas da Patologia, que além de me ensinar a mexer no ACIS, tornaram minhas tardes de leitura de lâminas muito mais divertidas: Luciane, Edaíse, Yukie, Claudia e Marcilei.

À Dra. Maria Dirlei, por ter me ensinado o que eu pensava ser impossível, como saber a diferença entre as mucosas normais, metaplásicas e tumorais, das lâminas de HE e TMA. Ao Dr. Fernando Soares, pela ajuda com o ACIS, e pelos ensinamentos de patologia.

Aos meus amigos da Bio: Ng, Mauro “Zero” e Fabio “Japão”, que mesmo não sendo grandes entusiastas de pipetas e polimerases, sempre agüentam meus papos de bióloga de laboratório.

Ao Ricardo, meu Menino, por estar sempre comigo; por me ouvir quando meus experimentos davam certo, e também quando eles davam errado. Pelo apoio e companhia em todos os momentos; por ser, antes de tudo, meu melhor amigo, desde que o começo.

À minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, desde antes de começar na Biologia. Principalmente aos meus pais, sempre preocupados com o andamento dos experimentos, com as apresentações (que os dois assistiam em primeira mão enquanto eu treinava, mesmo sem entender muita coisa), com os prazos... obrigada por me ajudarem em tudo que eu precisei, e muito obrigada pelo apoio, sempre.

Aos pacientes, que mesmo sem saber ao certo o futuro das amostras por eles cedidas contribuem para o avanço da ciência.

RESUMO

Lerner LK. **Frequência de dano no DNA em pacientes portadores de metaplasia intestinal ou adenocarcinoma do estômago e esôfago e sua correlação com os níveis de expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicerolípídeos.** São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Os adenocarcinomas do estômago e do esôfago estão frequentemente associados a processos inflamatórios da mucosa normal. Esse processo inflamatório crônico leva à substituição da mucosa normal por um tecido colunar do tipo intestinal, denominado metaplasia intestinal do estômago e que, no esôfago, recebe a denominação de mucosa de Barrett. Essas duas patologias não devem ser consideradas doenças pré-malignas, uma vez que a taxa de transformação em adenocarcinomas é reduzida, mas representam um fator de risco importante para os adenocarcinomas dos dois órgãos. Usando a metodologia de microarranjos de DNA, nosso grupo estudou as características moleculares de amostras de tecido representando mucosa normal, metaplasia intestinal e adenocarcinomas desses dois órgãos, e definiu um conjunto de alterações em vias metabólicas relacionadas aos processos inflamatórios e de metabolismo de glicerolípídeos; estas vias poderiam participar dos processos moleculares envolvidos na transformação maligna. Neste trabalho definimos a frequência de dano ao DNA nos pacientes com metaplasia intestinal ou adenocarcinomas do estômago ou do esôfago e correlacionamos a frequência de dano com o nível de expressão dos genes anteriormente identificados. A expressão dos quatro genes relacionados ao metabolismo de glicerolípídeos (ADH1B, AKR1B10, ALDH3A2 e CDS1) foi avaliada através de PCR Quantitativo em Tempo Real, em 110 amostras de tecidos normais, inflamados, metaplásicos e tumorais de estômago e esôfago. Os resultados corroboram os dados obtidos por cDNA microarray e mostram que as amostras com metaplasia

intestinal tem maior expressão desses genes, quando comparados com as amostras de adenocarcinomas dos dois órgãos. Os marcadores de danos 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), malondialdeído (MDA) e γ -H2AX foram estudados em 580 amostras de tecidos normais, inflamados, metaplásicos e tumorais de estômago e esôfago, presentes em lâminas de Tissue Microarray. As marcações de 8-OHdG, MDA e γ -H2AX foram significativamente maiores nas amostras metaplásicas e tumorais em comparação às amostras normais. Estes resultados indicam que a diminuição da expressão está relacionada a maiores quantidades de danos ao DNA. Assim, o processo inflamatório crônico com produção de espécies reativas de oxigênio, associado à menor capacidade de detoxificação de peroxilipídios, poderia contribuir para o processo de transformação das metaplasias intestinais e, por consequência, a modulação da expressão destas enzimas poderia ser alvo de novas formas de terapia visando à diminuição do risco para adenocarcinomas do estômago e esôfago. Suporte financeiro: CNPq.

SUMMARY

Lerner LK. **[DNA damage frequency in gastroesophagic metaplasia or adenocarcinoma correlated with expression of glycerolipid metabolism genes]**. São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Adenocarcinomas of the esophagus and stomach are associated with chronic inflammation, leading to the replacement of normal mucosa by a columnar tissue, known as intestinal metaplasia, which represents an important risk factor for developing adenocarcinomas in both organs. Our group demonstrated, by cDNA microarray, alterations in metabolic pathways related to cytokines (over-expressed in tumors and metaplasias) and glycerolipid metabolism (under-expressed in adenocarcinomas). We studied the presence of three markers of DNA and protein damage (8-OHdG, malondyaldehyde and γ -H2AX) in tissue microarray experiments with 580 esophagic and gastric samples. All markers showed a similar profile, being all significantly more present in inflammatory, metaplastic and malignant tissues compared to normal tissues. The expression profile of the genes involved in peroxylipids detoxication (AKR1B10, ALDH3A2, ADH1B and CDS1) was assessed by Real Time PCR in 110 samples of normal, inflammatory, metaplastic and tumor tissues of esophagus and stomach. The four genes showed lower expression in adenocarcinomas of both organs, compared to metaplastic tissues. These results corroborate our previous studies, and show the importance of the aldehyde-detoxifying enzymes in the transformation process of esophagogastric adenocarcinomas, given that their lower expression correlates with higher presence of cellular damage. It is possible that the modulation of the expression of those enzymes could be a potential therapeutic target for decreasing the risk of gastroesophagic adenocarcinomas. Financial support: CNPq.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mortalidade por câncer no mundo.....	2
Figura 2	Distribuição dos casos de câncer no mundo.....	3
Figura 3	Distribuição dos casos de câncer de esôfago no mundo.....	3
Figura 4	Mortalidade por câncer de esôfago no mundo.....	4
Figura 5	Incidência de câncer no mundo.....	16
Figura 6	Distribuição dos casos de câncer de estômago no mundo.....	17
Figura 7	Mortalidade por câncer de estômago no mundo.....	17
Figura 8	Perfil de expressão dos genes relacionados ao metabolismo de glicerolípídeos, em amostras agrupadas de tecidos inflamados, metaplásicos e tumorais de esôfago e estômago	33
Figura 9	Gráficos de absorbância obtidos pelo Nanodrop exemplificando os perfis das amostras de DNA extraídas pelos dois protocolos testados.....	49
Figura 10	Géis de agarose 1% corados com brometo de etídio. Em ambos os géis foram aplicados 1µg de material genético.....	50
Figura 11	Géis de acrilamida 8% corados com prata, onde foram fracionados os produtos da reação de PCR para o gene p53.	52
Figura 12	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio onde foram fracionados os produtos da reação de PCR para o gene p53.....	52
Figura 13	Gel de agarose 1% mostrando os produtos da reação de síntese do cDNA a partir do RNA total extraído de duas amostras.....	53
Figura 14	Perfis de expressão dos genes do metabolismo de glicerolípídeos obtidos por Q-RT-PCR: ADH1B.....	54

Figura 15	Perfis de expressão dos genes do metabolismo de glicerolípides obtidos por Q-RT-PCR: AKR1B10.....	55
Figura 16	Perfis de expressão dos genes do metabolismo de glicerolípides obtidos por Q-RT-PCR: ALDH3A2.....	56
Figura 17	Perfis de expressão dos genes do metabolismo de glicerolípides obtidos por Q-RT-PCR: CDS1.....	57
Figura 18	Diferenças entre as marcações de amostras de estômago (tumoriais, metaplásicas e normais) e esôfago (tumoriais), para o anticorpo anti-8-OHdG.....	59
Figura 19	Perfil da marcação de anti-8-OHdG nas amostras de estômago.....	60
Figura 20	Perfil da marcação de anti-8-OHdG nas amostras de esôfago	61
Figura 21	Diferenças entre as marcações de amostras de esôfago normais e metaplásicas (Esôfago de Barrett), para o anticorpo anti-MDA.....	62
Figura 22	Perfil da intensidade da marcação de anti-MDA nas amostras de estômago.....	62
Figura 23	Perfil da intensidade da marcação de anti-MDA nas amostras de esôfago.....	63
Figura 24	Exemplos de marcações de imunoistoquímica para o anticorpo anti- γ -H2AX.....	64
Figura 25	Perfil da marcação de γ -H2AX nas amostras de estômago.....	65
Figura 26	Perfil da marcação de γ -H2AX nas amostras de esôfago.....	65
Figura 27	Titulação do anticorpo anti- γ -H2AX em experimento de Western Blotting.....	67
Figura 28	Experimento de WB para o anticorpo anti-ACTB.....	68

Figura 29	Experimento de WB para o anticorpo anti- γ -H2AX.....	68
Figura 30	Interface entre os metabolismos de citocinas e glicerolípídeos.....	93

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Características dos primers e amplicons referentes aos genes ADH1B, AKR1B10, ALDH3A2 e CDS1.....	40
Tabela 2	Quantidade e classificação das amostras utilizadas.....	48
Tabela 3	Quantidade e classificação das amostras que foram utilizadas nas reações de PCR Real-Time.....	51
Quadro 1	Genes responsáveis pelas alterações nas vias de metabolismo de glicerolípides e citocinas.....	31
Quadro 2	Seqüência de nucleotídeos do par de primers para o gene p53.....	39
Quadro 3	Concentrações de cDNA e de primers e valores da eficiência para cada gene.....	40
Quadro 4	Características dos iniciadores e amplicons dos genes normalizadores.....	42
Quadro 5	Blocos de TMAs utilizados neste projeto.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

γ	Gama
γ -H2AX	Histona H2AX fosforilada
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desiguanosina
AA	Ácido Ascórbico
APS	Persulfato de amônia
BEB	Back Extraction Buffer
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CGH	Hibridização Genômica Comparativa
$\text{CO}_3^{\cdot -}$	Radical carbonato
C_T	Threshold Cycle
DAB	3,3'-Diaminobenzindine Tetrahydrochloride
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Deoxyribonucleotides triphosphate
DRGE	Doença do Refluxo Gastro-esofágico
DSB	Quebra na fita dupla (Double Strand Break)
EB	Esôfago de Barrett
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
HNPCC	Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanesulfônico
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
kDa	QuiloDalton
LPO	Peroxidação de Lipídeos
M_1G	Pirimido[1,2- α]purina-10(3H)-1
MDA	Malondialdeído

MgCl₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
mRNA	RNA mensageiro
MSI	Instabilidade de MicroSatélites
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OH[•]	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PET-CT	Tomografia Computadorizada com Emissão de Pósitrons
pH	Potencial de hidrogênio iônico
PHA	Hidrocarboneto aromático policíclico
PPI	Inibidor da Bomba de Prótons (Proton Pump Inhibitor)
PUFA	Ácido Graxo Poliinsaturado
Pvalor	Valor de Probabilidade
Q-RT-PCR	PCR Quantitativo em Tempo Real
RO[•]	Radical alcóxil
RO₂[•]	Radical peróxil
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
RT	Transcriptase Reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TBS	Tris-Buffered Saline
TBS-T	Tris-Buffered Saline com Tween 20
TE	Tris-EDTA
TM	Temperatura de Dissociação
TMA	Tissue Micro Array
WB	Western Blotting

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer de Esôfago.....	1
1.1.1	Adenocarcinomas do Esôfago.....	5
1.1.2	Epidemiologia.....	5
1.1.3	Etiologia.....	5
1.1.4	Histopatologia.....	9
1.1.5	Sintomatologia e Diagnóstico.....	10
1.1.6	Tratamento e Prognóstico.....	11
1.1.7	Fatores genéticos.....	12
1.2	Câncer de Estômago.....	14
1.2.1	Adenocarcinomas do Estômago.....	18
1.2.2	Epidemiologia.....	18
1.2.3	Etiologia.....	19
1.2.4	Sintomatologia e Diagnóstico.....	23
1.2.5	Tratamento e Prognóstico.....	24
1.2.6	Histopatologia.....	26
1.2.7	Fatores genéticos.....	27
1.3	Inflamação crônica e Transformação.....	29
2	OBJETIVOS.....	35
2.1	Objetivo geral.....	35
2.2	Objetivos Específicos.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	Amostras.....	36
3.2	Extração de RNA e DNA.....	37
3.3	Quantificação da expressão de mRNA (Q-RT-PCR).....	38
3.4	Imunoistoquímica.....	43
3.5	Western Blotting.....	44
3.6	Dot Blot.....	47

4	RESULTADOS.....	48
4.1	Amostras.....	48
4.2	Extração de material genético.....	48
4.3	Quantificação da expressão de mRNA (Q-RT-PCR).....	51
4.4	Imunoistoquímica.....	58
4.4.1	8-OHdG.....	58
4.4.2	Malondialdeído.....	62
4.4.3	γ -H2AX.....	63
4.5	Western Blotting.....	66
4.6	Dot Blot.....	69
5	DISCUSSÃO.....	70
5.1	O processo inflamatório e o dano ao DNA.....	70
5.2	Enzimas relacionadas ao metabolismo de glicerolípídeos.....	75
5.2.1	ADH1B.....	76
5.2.2	ALDH3A2.....	77
5.2.3	AKR1B10.....	80
5.3	Danos oxidativos ao DNA.....	81
5.3.1	Malondialdeído.....	81
5.3.2	8-OHdG.....	85
5.3.3	γ -H2AX.....	89
5.4	Correlação entre os níveis de dano celular e a expressão dos genes relacionados ao metabolismo de glicerolípídeos.....	92
6	RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES.....	94
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

ANEXOS

Anexo 1 Protocolos

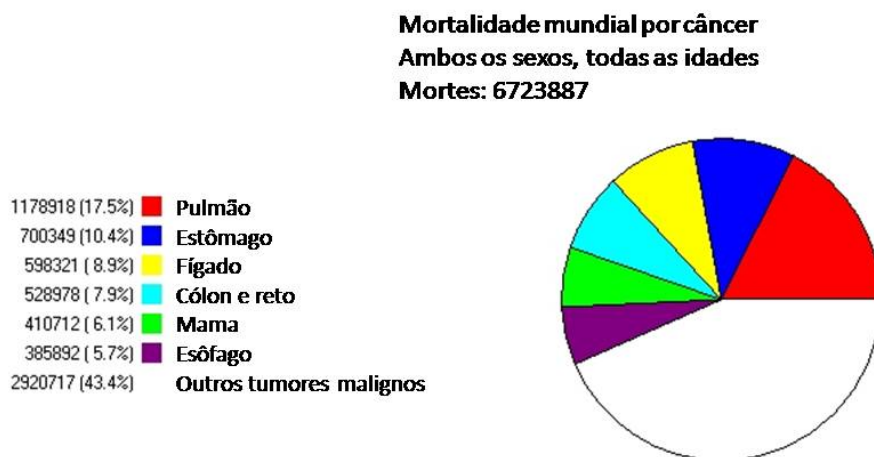
Anexo 2 Quantidade de material genético e proteína extraídos das amostras

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE ESÔFAGO

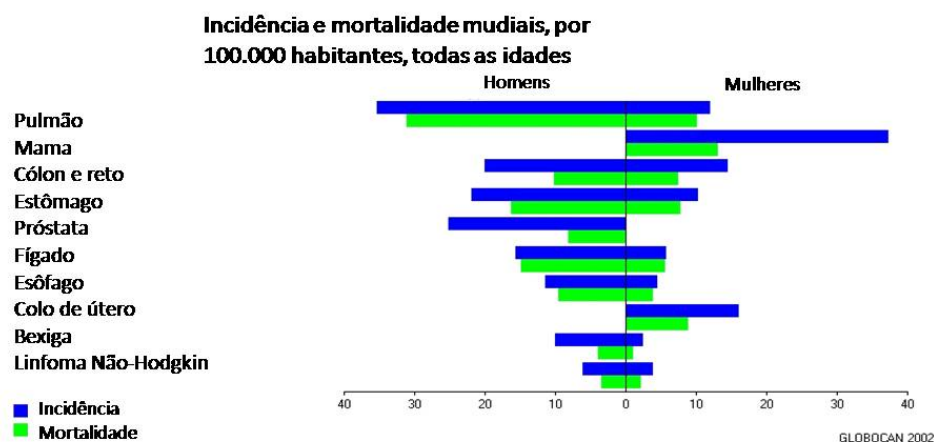
Os carcinomas do esôfago representam um considerável problema de saúde pública em diversas partes do mundo. Em 2002, a estimativa de novos casos no mundo foi de 462.117, aumentando para aproximadamente 500.000 em 2005 (GLOBOCAN 2002). O câncer de esôfago é o 7º tipo mais incidente de câncer no mundo, mas o 6º em número de mortes representando 5,7% das mortes por câncer no mundo para ambos os sexos (Figuras 1 e 2). A incidência em homens é aproximadamente três vezes maior do que em mulheres: segundo a GLOBOCAN (2002), a incidência mundial dos tumores de esôfago foi de 12 para cada 100.000 habitantes do sexo masculino, e de 4 para cada 100.000 habitantes do sexo feminino. A incidência é maior em países em desenvolvimento em comparação com países desenvolvidos, tanto em homens quanto em mulheres (Figura 3). A mortalidade por esse tipo de câncer mostrou aumento no mundo todo, sendo maior em homens do que em mulheres, assim como em países em desenvolvimento quando comparado com países desenvolvidos (Figura 4). No Brasil, o INCA estimou aproximadamente 11.000 novos casos de tumores de esôfago no ano de 2008, sendo 7.900 em homens (6º mais incidente) e 2.650 em mulheres (9º mais incidente) (Ministério da Saúde 2007).

A detecção precoce dos tumores de esôfago é muito difícil por causa dos sintomas inespecíficos, como dificuldade ou dor ao engolir, dor torácica, náuseas, vômitos e perda do apetite; a disfagia, na maioria das vezes, só se apresenta quando a doença já está em estágio avançado. Dentre as formas de tratamento, estão a cirurgia, a radioterapia, quimioterapia ou combinações desses 3 tipos; a ressecção endoscópica é utilizada raramente para tumores iniciais. As formas de prevenção geralmente citadas são a adoção de uma dieta rica em frutas e legumes, e a diminuição da ingestão de bebidas muito quentes, alimentos defumados, bebidas alcoólicas e do fumo (Ministério da Saúde 2007).



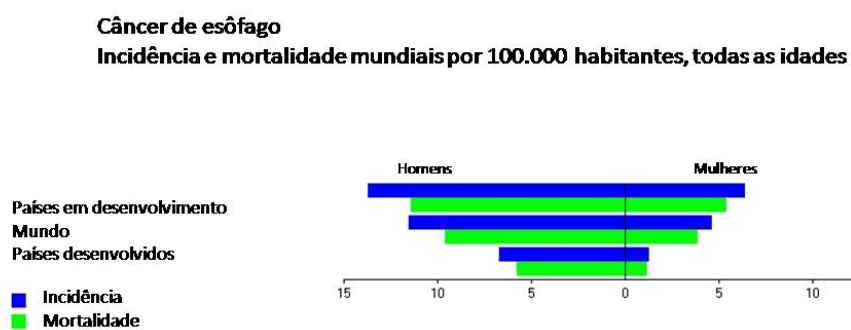
Fonte: GLOBOCAN (2002)

Figura 1 - Mortalidade por câncer no mundo.



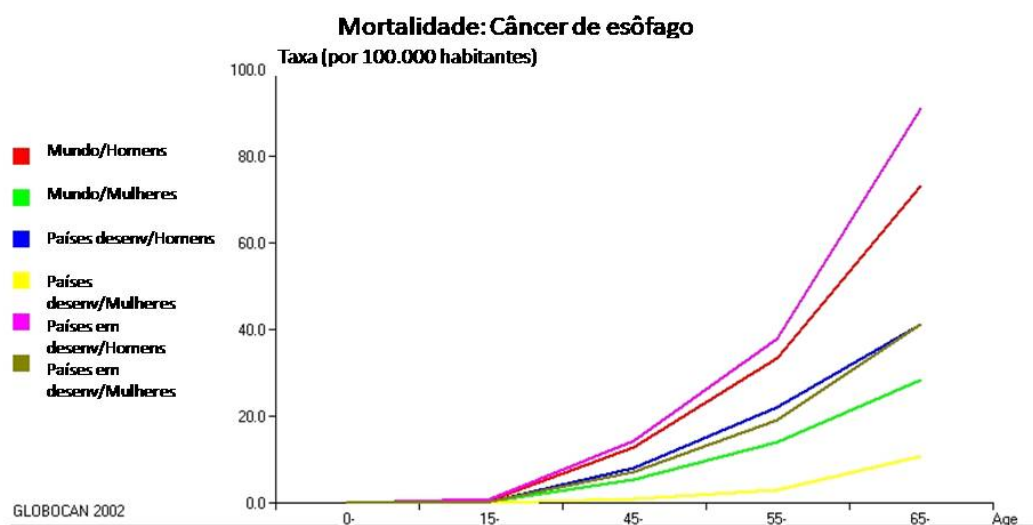
Fonte: GLOBOCAN (2002)

Figura 2 - Distribuição dos casos de câncer no mundo.



Fonte: GLOBOCAN (2002)

Figura 3 - Distribuição dos casos de câncer de esôfago no mundo.



Fonte: GLOBOCAN (2002)

Figura 4 - Mortalidade por câncer de esôfago no mundo.

Os tumores de esôfago podem ser divididos em dois tipos, de acordo com sua etiologia e histologia: o carcinoma de células escamosas e o adenocarcinoma. Nos países do ocidente, os carcinomas epidermóides do esôfago aparecem tipicamente após muitos anos de exposição ao álcool e ao tabaco; nesses países aproximadamente 90% dos carcinomas epidermóides podem ser atribuídos ao tabaco e ao álcool. Regiões com altas taxas de incidência foram identificadas no Irã, no sul da África, na região central da China e no sul do Brasil (GABBERTH et al. 2000). Os adenocarcinomas de esôfago são tumores com diferenciação glandular, tipicamente localizados na região distal do órgão. Ocorrem

predominantemente em homens brancos de países industrializados, e apresentam taxas crescentes de incidência. O fator etiológico mais importante deste tumor é a Doença do Refluxo Gastro-Esofágico, levando à formação da metaplasia intestinal (Esôfago de Barrett), que é uma lesão com alto risco de malignização para adenocarcinoma de esôfago.

1.1.1 Adenocarcinomas do Esôfago

O adenocarcinoma do esôfago é definido como um tumor epitelial com diferenciação glandular, que pode surgir de uma mucosa de Barrett; menos freqüentemente, também pode se originar de uma mucosa gástrica ectópica no esôfago proximal ou a partir de glândulas da mucosa e submucosa (WERNER et al. 2000).

1.1.2 Epidemiologia

Nos países industrializados a incidência desse tumor vem crescendo (STEIN e SIEWERT 1993), principalmente nos Estados Unidos e na Europa (WILD e HARDIE 2003; CREW e NEUGUT 2004), a uma taxa de 5 a 10% ao ano (BLOT et al. 1993). Na década de 90 a incidência dos adenocarcinomas ultrapassou a dos carcinomas de células escamosas nos EUA e na Europa; na África e na Ásia, apesar de ser menos comum, também apresenta taxas crescentes de incidência. Há uma preponderância no sexo masculino (7 vezes mais incidente em homens do que em mulheres) e de raça branca (WERNER et al. 2000). A idade média ao diagnóstico é de 65 anos (SIEWERT e STEIN 1998).

1.1.3 Etiologia

O Esôfago de Barret (EB), ou metaplasia intestinal do esôfago, é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago. É amplamente aceito pela comunidade científica que o adenocarcinoma de esôfago é usualmente, se não sempre, uma consequência do EB com progressão para displasia de baixo grau, displasia de alto grau e finalmente para o carcinoma. Segundo estimativas, portadores de EB têm de 30 a 150 vezes mais chance de desenvolver adenocarcinoma de esôfago quando comparados com a população em geral (CREW e NEUGUT 2004). Apesar de apenas uma fração dos portadores de EB desenvolver adenocarcinomas esofágicos, o risco de malignização é similar ao de desenvolvimento de câncer de pulmão em fumantes, ou de câncer de fígado em portadores do vírus da hepatite B (WILD e HARDIE 2003).

Atualmente, a definição de Esôfago de Barrett é a presença de metaplasia intestinal (diferenciada) em qualquer parte do esôfago, a qual consiste em um epitélio colunar simples que se dobra para formar invaginações glandulares na mucosa (JANKOWSKI et al. 2000), durante um processo de regeneração após repetidas injúrias à mucosa esofágica. O EB é encontrado em aproximadamente 80% dos casos de adenocarcinoma esofágico (STEIN et al. 1993), e está tipicamente associado à Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE). A DRGE é a causa mais comum dos danos crônicos à mucosa esofágica, além de levar à formação um ambiente anormal durante o processo de regeneração que predispõe à formação da

metaplasia intestinal (SPECHLER e GOYAL 1996). Dados obtidos na Suécia mostraram que portadores de DRGE com sintomas recorrentes têm um risco de desenvolver adenocarcinomas do esôfago 7,7 vezes maior do que a população em geral (LAGERGREN et al. 1999). O risco aumenta com a severidade, a frequência e a duração dos sintomas do refluxo: pacientes que apresentam sintomas graves por períodos longos apresentam risco de desenvolver adenocarcinomas 43,5 vezes maior. Com base nesses dados, foi postulada a relação causal da DRGE (uma das doenças benignas mais comuns do trato digestivo) com os adenocarcinomas do esôfago.

Fatores que predispõe ao desenvolvimento do EB e subsequente transformação do epitélio em pacientes com DRGE incluem um aumento crônico do tempo de exposição da mucosa do esôfago ao líquido gastroduodenal. Esse refluxo ocorre quando o esfíncter presente na junção esofagogástrica (que é uma barreira anti-refluxo entre o esôfago e o estômago) está prejudicado, seja por alterações funcionais (como o relaxamento do esfíncter distal do esôfago) ou anatômicas (mais frequentemente a hérnia de hiato). A interação do epitélio com o ácido e a pepsina do suco gástrico são grandes causadores do desenvolvimento do EB, mas o refluxo biliar (ácidos biliares e enzimas pancreáticas) também contribui para o agravamento da inflamação e conseqüente formação do adenocarcinoma (BUTTAR e FALK 2001; FENNERTY 2003; WILD e HARDIE 2003). O refluxo aumenta o risco de transformação pois, além de promover a proliferação celular, expõe o epitélio do esôfago a agentes

potencialmente genotóxicos presentes no estômago e intestino (STEIN et al. 1998).

Além do EB, outros fatores de risco para os adenocarcinomas de esôfago são a obesidade, dietas pobres em frutas e verduras e o fumo. As ligações entre a obesidade e o adenocarcinoma de esôfago ainda não estão totalmente definidas, mas acredita-se que ela esteja relacionada ao maior risco de desenvolvimento de hérnia de hiato, desencadeando a DRGE. Essa relação parece ser verdadeira uma vez que a diminuição de peso em indivíduos obesos levou à diminuição dos sintomas de refluxo (TYTGAT et al. 2008). O consumo de cigarro é reportado como fator de risco, embora a magnitude de seu efeito seja inferior ao observado para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas do esôfago (WILD e HARDIE 2003).

O papel das frutas e verduras foi bastante estudado, porém com resultados controversos. Há indícios que seus antioxidantes, como os carotenóides e flavonóides, possam ter um efeito protetor (POTTER 1997). Os vegetais contêm uma grande variedade de substâncias com propriedades anticarcinogênicas, como fenóis, isotiocianatos e indóis (WATTENBERG 1985), fibras fermentáveis, vitaminas e micronutrientes. Os compostos vegetais podem reduzir os riscos de formação de neoplasias por diversos mecanismos: inibição da formação de carcinógenos, como o ascorbato (MIRVISH 1981); prevenção da interação dos carcinógenos com as moléculas do organismo, como os fenóis, que reagem com diversas substâncias carcinogênicas (WOOD et al. 1982); indução de enzimas que

agem na detoxicação de compostos carcinogênicos; redução ou prevenção de hiperplasias em diversos tecidos, entre outros.

Entretanto, apesar dos resultados favoráveis em alguns estudos *in vitro* ou mesmo *in vivo* (SERAFINI et al. 2002), ainda não há comprovação que a suplementação com antioxidantes tenha um efeito protetor em humanos. BJELAKOVIC et al. (2004) publicaram uma meta-análise de 14 estudos randomizados nos quais foram realizadas suplementações de β -caroteno, vitaminas A, C, E e selênio (sozinhos ou em combinações), com o intuito de verificar um efeito preventivo relacionado a tumores gastrointestinais. Não houve nenhuma evidência que estas substâncias pudessem prevenir os tumores gastrointestinais; além disso, nos casos de suplementação com β -caroteno e vitamina A ou β -caroteno e vitamina E houve um aumento na mortalidade.

1.1.4 Histopatologia

O epitélio de Barrett é caracterizado por dois tipos diferentes de células: as células colunares e as *goblet cells*. O epitélio metaplásico apresenta uma superfície plana ou viliforme, e é idêntico à metaplasia intestinal do estômago. Ainda não há consenso sobre a célula que origina o epitélio de Barrett; acredita-se que a origem se deva à proliferação de células precursoras (*stem cells*) localizadas em glândulas do epitélio esofágico ou recrutadas da medula óssea, que sofrem diferenciações alteradas como resultado de danos crônicos ao epitélio (ZHANG et al. 2009). As células precursoras estão localizadas no fundo das criptas das glândulas

e podem dar origem aos diferentes tipos de células diferenciadas do epitélio durante o processo de auto-renovação; processo semelhante ocorre nos epitélios glandulares do estômago e do intestino (PERRYMAN e SYLVESTER 2006). Diversos estudos mostraram que vias de sinalização altamente conservadas envolvidas na morfogênese, como Wnt/ β -catenina, Hedgehog, Jagged/Notch e BMP/TGF- β encontram-se alteradas em diversos tumores (BEACHY et al. 2004). Esta desregulação pode estar associada ao estado de proliferação constante causado pela inflamação crônica, que aumentaria as chances de eventos transformantes, principalmente em situações de stress oxidativo.

A maioria dos adenocarcinomas do esôfago são do tipo papilar e/ou tubular (diferenciados). A minoria é do tipo difuso, podendo apresentar células de anel de sinete (PARAF et al. 1995).

1.1.5 Sintomatologia e Diagnóstico

Os sintomas iniciais dos adenocarcinomas esofágicos são inespecíficos, como dificuldade ou dor ao engolir, dor torácica, náuseas, vômitos e perda do apetite. A disfagia é, na maioria dos casos, o primeiro sintoma dos adenocarcinomas avançados do esôfago; ela pode estar associada à dores no peito ou na parte superior do abdômen e à caquexia.

O Esôfago de Barrett, assim como os adenocarcinomas, podem ser diagnosticados através de estudos endoscópicos e histológicos, que possibilitam a verificação da extensão, diferenciação e localização precisa do epitélio metaplásico. As radiografias podem ser utilizadas nos casos em

que o acesso da sonda endoscópica está prejudicado. Ultrasonografias endoscópicas são usadas no estadiamento de tumores previamente detectados por endoscopia; essa técnica também permite a visualização dos linfonodos adjacentes à parede do esôfago.

Os adenocarcinomas podem se disseminar localmente, infiltrando a parede do esôfago; pode ocorrer disseminação para o estômago. Regiões comumente atingidos pela disseminação local do tumor são o mediastino, a traquéia e os brônquios, pulmão, aorta, pericárdio, coração e a coluna vertebral (WERNER et al. 2000). Metástases à distância ocorrem tardiamente. A classificação TNM é importante e fornece dados significativos para o prognóstico (TORRES et al. 1999).

1.1.6 Tratamento e Prognóstico

Com relação aos tratamentos, o controle do refluxo é uma estratégia de prevenção para o desenvolvimento dos tumores tanto esofágicos quanto esofagogástricos, devido ao envolvimento da DRGE na patogênese do Esôfago de Barrett. O uso de medicamentos, como antagonistas do receptor de H_2 e inibidores da bomba de prótons (PPIs), têm efeitos positivos sobre o controle da proliferação celular nas células metaplásicas, porém, não surtindo efeito no controle do refluxo biliar, mais associado à progressão maligna (JANKOWSKI et al. 2000). O uso de PPIs deve ser acompanhado cuidadosamente uma vez que seus efeitos biológicos são altamente dependentes do pH, e as condições mais básicas (pH entre 3 e 5) promovidas pela supressão do ácido pode ser deletéria: as principais razões

são o aumento da solubilidade dos sais biliares, que podem se acumular no interior das células e causar dano ao DNA e às mitocôndrias, além do efeito proliferativo que os sais biliares mostraram sobre células de EB provenientes de biópsia, em pH neutro (o que não ocorre em pH ácido). Entretanto, os PPIs reduzem a DRGE, provavelmente através da diminuição do volume do refluxo, e esse efeito é desejável para a diminuição dos riscos de desenvolvimento de EB e tumores malignos (MENGES et al. 2001). Procedimentos cirúrgicos também contribuem para a diminuição dos refluxos, assim como a perda de peso (WILD e HARDIE 2003).

Os fatores prognósticos mais importantes são a profundidade da invasão da parede e a presença de metástases linfonodais ou à distância (HOLSCHER et al. 1995); a taxa de sobrevida é maior nos tumores superficiais. A morfologia ou diferenças histológicas não influenciam o prognóstico. A taxa de sobrevida global em 5 anos após cirurgia é menor que 20%. Uma vez que o estadio do tumor ao diagnóstico é o fator mais importante afetando o prognóstico, o acompanhamento endoscópico dos pacientes com EB para detecção precoce do tumor leva à melhora do prognóstico na maioria dos casos (VAN-SANDICK et al. 1998).

1.1.7 Fatores Genéticos

Alterações na sequência dos genes, nos níveis de expressão e/ou na estrutura e função das proteínas, que ocorrem preferencialmente nas células cancerosas quando comparadas com células normais do mesmo tecido, podem ser usadas como marcadores moleculares para detecção precoce do

câncer (antes das manifestações clínicas), permitindo assim a determinação do prognóstico, o monitoramento da progressão da doença ou a escolha da terapia a ser utilizada (SIDRANSKY 2002). A progressão do tumor é dirigida por alterações genéticas somáticas, que se refletem em alterações fenotípicas causadas por alterações nos perfis de expressão gênica (POLYAK 2001). Durante o progresso da formação das neoplasias, o perfil de expressão gênica pode fornecer informações para a compreensão dos processos de desenvolvimento tumoral. Além disso, genes com nível elevado ou diminuído de expressão em relação ao seu correspondente normal, ou exclusivamente expressos nos tecidos neoplásicos, também podem ser utilizados como marcadores diagnósticos ou prognósticos.

No EB uma grande variedade de mudanças genéticas tem sido correlacionada com a seqüência de transformação do epitélio esofágico normal, passando pela formação da metaplasia, da displasia até o surgimento do adenocarcinoma. Estudos de lesões biopsiadas por endoscopia mostraram que alterações em p53 e p16 (CDKN2A) ocorrem precocemente (NESHAT et al. 1994; BARRETT et al. 1999).

Há estudos que indicam a presença de alguns marcadores moleculares dos tumores esofágicos e esofagogástricos - provavelmente associados à maior probabilidade de malignização das metaplasias. Entre eles estão alterações nas mucinas (GUILLEN et al. 2000), em genes supressores de tumor como p53, p16, Rb, p27 (CDKN1B), FHIT e APC (LIN e BEER 2004); aumento na expressão das ciclinas D1 e E, e em enzimas como COX2, iNOS e telomerasas; decréscimo na expressão de E-caderina e

cateninas; aumento da expressão de fatores de crescimento como EGF e TGF- α , dos receptores EGFR e ERBB2 e dos genes anti-apoptóticos BCL2 e Bax; e alterações na distribuição de moléculas como CD95 e Ki-67.

1.2 CÂNCER DE ESTÔMAGO

Em 2002, a estimativa de novos casos de tumores de estômago no mundo foi de aproximadamente 935.000, número que aumentou para mais de 1 milhão em 2005, sendo que grande parte dos novos casos estão em países em desenvolvimento (GLOBOCAN 2002). O câncer de esôfago é o 4º tipo mais incidente de câncer no mundo, perfazendo 8,6% do total de casos de câncer do mundo em 2002 (Figura 5), e o 2º em número de mortes (atrás apenas dos tumores malignos de pulmão), representando 10,4% das mortes por câncer no mundo para a população em geral (Figura 1). Assim como os tumores de estômago, o câncer de estômago também é mais incidente em homens: de acordo com a GLOBOCAN (2002), a incidência mundial dos tumores gástricos foi de 22 para cada 100.000 habitantes do sexo masculino, e de 10 para cada 100.000 habitantes do sexo feminino. Apesar da incidência ser maior em países desenvolvidos em comparação com os países em desenvolvimento, a mortalidade é maior nos países em desenvolvimento, tanto na população masculina quanto na feminina (Figuras 5 e 6).

No Brasil, as estimativas do INCA indicaram o surgimento de aproximadamente 21.800 novos casos de tumores de estômago em 2008,

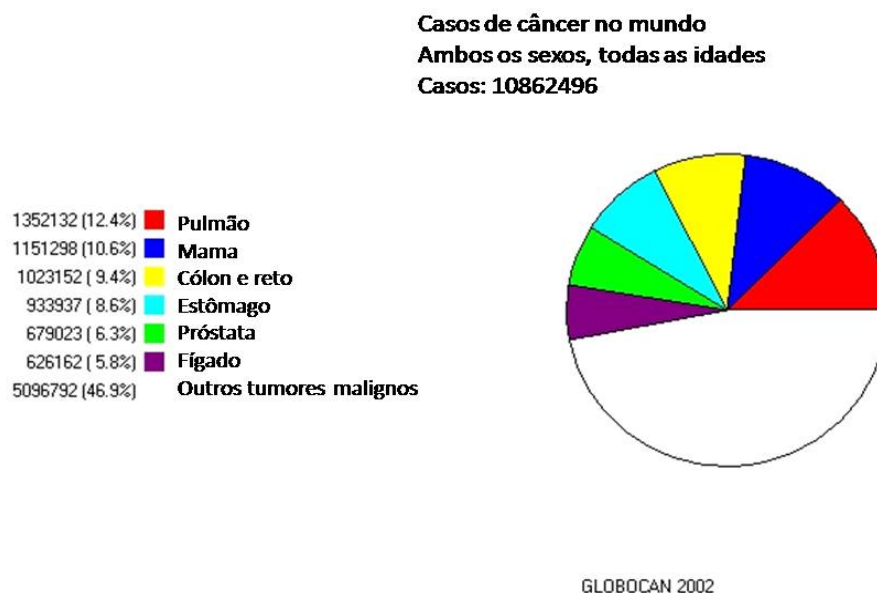
sendo 14.080 em homens (3º mais incidente) e 7.720 em mulheres (5º mais incidente). Apesar da maior parte dos casos ser encontrada na região sudeste, o câncer gástrico é o segundo mais freqüente em homens nas regiões norte e nordeste, atrás apenas dos tumores de pele não melanoma; a frequência entre as mulheres também é mais alta nas regiões norte e nordeste, quando comparadas com o restante do país (Ministério da Saúde 2007).

Atualmente, a incidência dos adenocarcinomas de estômago está diminuindo no mundo todo. Em alguns países ocidentais, as taxas de incidência foram reduzidas para menos de um terço em apenas uma geração; em países com incidência tradicionalmente alta (como Japão e Coréia) a redução também foi significativa, mas levará mais tempo até que o volume da doença diminua de modo suficiente. As razões principais para essa redução são mudanças nos hábitos alimentares, principalmente: a diminuição do uso do sal na conservação de carnes e peixes, assim como a redução do consumo de sal em geral; e a disponibilidade de frutas e outros vegetais frescos ao longo do ano em vários países (RODER 2002). A mortalidade tem diminuído principalmente por causa dos avanços significativos na detecção precoce dos tumores gástricos.

A infecção por *Helicobacter pylori* tem um papel importante na etiologia dos tumores do estômago pois leva à gastrite atrófica crônica, com o desenvolvimento de metaplasia intestinal, que é uma lesão precursora importante. O estômago é o principal órgão gastrointestinal para o surgimento de linfomas, os quais a maioria também está ligada à infecção

por *Helicobacter pylori*. A regressão desses tumores está geralmente ligada à erradicação da infecção pela bactéria.

O principal linfoma associado à infecção por *Helicobacter pylori* é o linfoma de MALT. Os linfomas de MALT são malignidades de células B que podem surgir em diversos sítios, e perfazem de 7 a 8% dos linfomas não-Hodgkin em adultos; o sítio mais comum para desenvolvimento dos linfomas de MALT é o estômago (50% dos casos). Os linfomas de MALT estão geralmente ligados a doenças infecciosas como a gastrite associada à infecção por *Helicobacter pylori* ou à doenças autoimunes como a tireoidite de Hashimoto. Pacientes portadores de linfoma de MALT apresentam uma taxa de 75% de regressão da doença após o tratamento da infecção pela bactéria, que é feito através de antibióticos e PPIs (FERRERI et al. 2009).

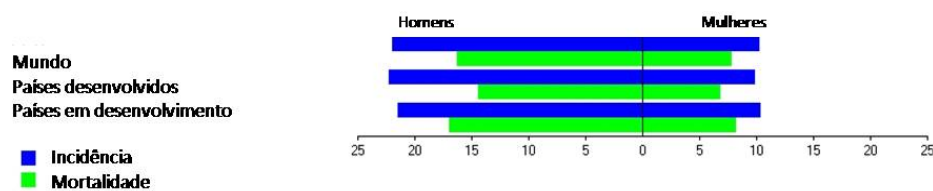


Fonte: GLOBOCAN (2002)

Figura 5 - Incidência de câncer no mundo.

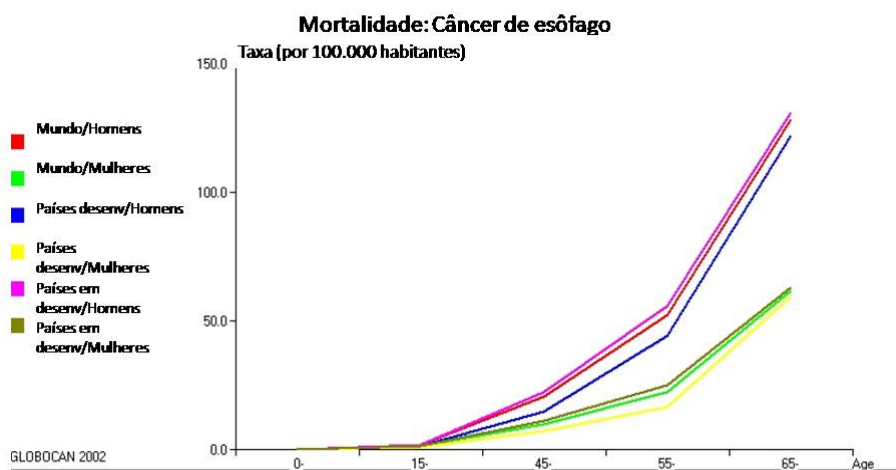
Câncer de estômago

Incidência e mortalidade mundiais por 100.000 habitantes, todas as idades



Fonte: GLOBOCAN (2002)

Figura 6 - Distribuição dos casos de câncer de estômago no mundo.



Fonte: GLOBOCAN (2002)

Figura 7 - Mortalidade por câncer de estômago no mundo.

1.2.1 Adenocarcinomas de Estômago

Os adenocarcinomas gástricos são tumores epiteliais malignos com diferenciação glandular. Sua etiologia é multifatorial, mas normalmente seu surgimento ocorre após longos períodos de gastrite atrófica.

1.2.2 Epidemiologia

As áreas com maior incidência de tumores gástricos (mais de 40/100.000 homens) são o leste asiático, países andinos e do leste europeu (PARKIN et al. 1999). Baixas taxas de incidência são encontradas na América do Norte, no norte da Europa e na maioria dos países da África e do sudeste da Ásia. O país com as maiores taxas de incidência, entretanto, é o Japão, com 780 por 100.000 habitantes (Ministério da Saúde 2007). Há uma predominância do tipo intestinal em áreas de alto risco, enquanto o tipo difuso é mais comum nas áreas consideradas de baixo risco (FENOGLIO-PREISER et al. 2000). A América do Norte e o oeste europeu têm apresentado diminuição nas taxas de mortalidade, apesar do aumento no número de casos por ano por causa do envelhecimento da população (STEWART e KLEIHUES 2003). As taxas de mortalidade variam geograficamente, sendo as mais altas em países da América Latina como a Costa Rica, o Chile e a Colômbia.

Os carcinomas gástricos são raros em indivíduos abaixo de 30 anos, sendo que após essa idade as taxas de incidência aumentam até as faixas etárias mais avançadas. O tipo intestinal aumenta mais rapidamente com a idade, e é mais freqüente em homens na faixa dos 50 anos. Os carcinomas difusos afetam indivíduos mais novos, principalmente mulheres; este tipo de

tumor gástrico está freqüentemente associado a fatores hereditários, provavelmente modulados por influências do ambiente (SHIAO et al. 1999).

1.2.3 Etiologia

Estudos epidemiológicos em diferentes populações mostram uma associação consistente entre a dieta e os carcinomas gástricos, principalmente entre os do tipo intestinal (FENOGLIO-PREISER et al. 2000). Um consumo adequado de frutas e vegetais frescos diminui o risco de desenvolvimento de tumores malignos do estômago, por causa dos efeitos antioxidantes do ácido ascórbico, carotenóides, folatos e tocoferóis. O consumo elevado de sal está fortemente associado ao risco de carcinomas gástricos, assim como de suas lesões precursoras (JOSSENS e GEBOERS 1981). Outros alimentos associados ao aumento do risco são os produtos ricos em nitrato ou corantes, enlatados, defumados ou conservados no sal. Uma vez que uma dieta de boa qualidade está associada à diminuição dos riscos de desenvolvimento de câncer de estômago, uma parte da diferença entre a incidência e a mortalidade por esse tipo de neoplasia entre os países desenvolvidos em comparação com os países em desenvolvimento, assim como entre as populações de baixa e alta renda dentro do mesmo país: alguns estudos mostraram que as populações mais pobres consomem menos alimentos frescos do que as populações de alta renda, por diversas razões (POTTER 1997).

Alguns estudos sugerem um risco maior (cerca de duas vezes) para a população masculina fumante, e, até agora, não há um risco maior

associado ao uso do álcool (STEWART e KLEIHUES 2003; PLUMMER et al. 2004). Há indícios de aumento do risco após determinadas cirurgias no estômago, que aumentam o refluxo biliar (FENOGLIO-PREISER et al. 2000).

A descoberta mais importante na epidemiologia do adenocarcinoma gástrico foi a sua associação com a infecção por *Helicobacter pylori*. Vários estudos mostraram que *H. pylori* pode induzir as mudanças fenotípicas que levam ao desenvolvimento do adenocarcinoma, tanto em humanos quanto em modelos animais (RUGGE et al. 1996; WATANABE et al. 1998). *H. pylori* é um bastonete gram-negativo que coloniza a mucosa gástrica, identificado primeiramente em 1983 (MARSHALL e WARREN 1984). A infecção pela bactéria é mais prevalente nos países em desenvolvimento (aproximadamente 80% da população adulta) do que nos industrializados (20 a 50%), e é adquirida durante a infância, por via oral. Há estudos que mostraram uma associação entre renda e prevalência de infecção por *H. pylori* entre populações do mesmo país: a infecção é mais prevalente entre indivíduos de baixa renda e/ou escolaridade do que em indivíduos de alta renda (BOFFETTA 1997). Em 1994, o *H. pylori* foi classificado como carcinógeno do tipo I para o homem; vários estudos epidemiológicos têm associado a infecção pelo *H. pylori* com o desenvolvimento de úlceras pépticas, linfoma não-Hodgkin do estômago, gastrite atrófica e adenocarcinoma. Entretanto, poucos indivíduos infectados desenvolvem neoplasias (menos de 3%), indicando o envolvimento de outros fatores no processo (PEEK e BLASER 2003).

CORREA et al. em 1975, foram os primeiros a propor os eventos que ocorrem no desenvolvimento no adenocarcinoma diferenciado ligado à infecção pelo *H. pylori*: transição de mucosa normal para gastrite superficial crônica, que progride para gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e adenocarcinoma; esse processo pré-canceroso pode durar décadas. A gastrite e a atrofia alteram a secreção de ácido gástrico, o que leva ao aumento do pH do estômago e à uma mudança da flora que permite que bactérias anaeróbias colonizem o estômago. Essas bactérias produzem redutases que transformam nitratos presentes nos alimentos em nitrito, que é uma molécula biologicamente ativa e reage com aminas, amidas e uréia produzindo compostos N-nitrosos carcinogênicos (YANG et al. 1984).

A bactéria *Helicobacter pylori* é geneticamente heterogênea, e nem todas as cepas estão ligadas ao processo de malignização da mesma forma. As cepas que contêm um grupo de genes denominado ilha de patogenicidade *cag* induzem um processo inflamatório mais intenso comparadas às cepas *cag*-negativas (CENSINI et al. 1996); de fato, existem estudos que mostram uma associação entre a infecção por uma cepa *cag*-positiva e o desenvolvimento de carcinoma gástrico (QUEIROZ et al. 1998). *H. pylori* também produz uma citotoxina vacuolizante denominada VacA, que é responsável por causar danos em células epiteliais e está ligada à malignização (SOARES et al. 1998). O papel etiológico de *H. pylori* na tumorigênese gástrica foi confirmado por um estudo que mostrou que a inoculação de uma cepa positiva para *cag* e VacA é capaz de induzir a formação de metaplasia intestinal de carcinoma gástrico em animais

(WATANABE et al 1998). Além disso, *H. pylori* interfere com o equilíbrio oxidativo pois diminui as concentrações de ácido ascórbico (AA); o AA é um antioxidante que exerce atividades anti-carcinogênicas impedindo danos oxidativos ao DNA. Indivíduos infectados pela bactéria apresentam níveis intragástricos de AA mais baixos do que os não-infectados; os níveis voltam ao normal após o tratamento da infecção (ROOD et al. 1994).

O risco de desenvolvimento do carcinoma após a infecção está ligado, além do genoma da bactéria, a diferenças na resposta inflamatória desencadeada pelo hospedeiro. EL-OMAR et al. (2000) identificaram polimorfismos no gene IL1-B (que codifica para IL-1 β) e no gene IL-1RN (que codifica para IL1-RI), e relataram a associação desses com o aumento de risco para o desenvolvimento de hipocloridria, gastrite atrófica e adenocarcinoma. Polimorfismos no gene TNF e determinados genótipos do MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) também influenciam na carcinogênese gástrica induzida pela infecção por *H. pylori* (EL-OMAR 2001). A resposta do hospedeiro à infecção induz a proliferação de células epiteliais da mucosa gástrica, além de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias que acabam por ativar a produção de diversas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (PEEK e BLASER 2003). Além da carcinogênese ligada à resposta inflamatória, estudos mostraram que a infecção por *H. pylori* leva a um acúmulo de mutações, em parte pela metilação do promotor de hMLH1, um gene ligado ao reparo de DNA (YAO et al. 2006). Foram descritas mutações em genes como CDH1, K-ras e metaloproteases 1 e 7 (MAEDA e MENTIS 2007).

1.2.4 Sintomatologia e Diagnóstico

Os carcinomas gástricos iniciais geralmente não apresentam sintomas, embora aproximadamente metade dos pacientes relate problemas gastrointestinais como dispepsia; pacientes portadores de carcinomas em estágios avançados apresentam fortes dores abdominais. Tumores ulcerados podem causar sangramentos e hematêmese, e os tumores que obstruem o estômago podem causar vômitos. Sintomas sistêmicos como anorexia e perda de peso indicam doença disseminada.

A falta de sintomas nas fases iniciais normalmente leva a um grande atraso no diagnóstico dos tumores gástricos. Assim, 80-90% dos pacientes em países ocidentais são diagnosticados com tumores avançados, que apresentam baixas taxas de cura. No Japão, onde o câncer gástrico é muito comum, programas de screening da população oferecidos pelo governo conseguem detectar 80% das lesões malignas em estágios iniciais, o que aumenta as chances de cura dos pacientes.

A endoscopia é um método sensível e específico para o diagnóstico dos tumores de estômago; a detecção pode ser melhorada com o uso de corantes. Os exames podem ser complementados com o uso de ultrasonografia endoscópica e radiografia, nos casos em que foram detectadas anormalidades, ou para avaliar o grau de invasão da parede do estômago. O estadiamento feito antes da escolha do tratamento envolve ultrasonografia percutânea, tomografia computadorizada ou tomografia computadorizada com emissão de pósitrons (PET-CT) para detectar metástases hepáticas ou linfonodais à distância (MOEHLER et al. 2007). A

laparoscopia pode ser utilizada para avaliação de disseminação peritoneal quando não há ascite.

1.2.5 Tratamento e Prognóstico

Os carcinomas gástricos se disseminam para órgãos adjacentes, linfonodos, peritônio ou através de metástases à distância. Os tumores do tipo difuso apresentam metástases para o duodeno e linfonodais, além de invasão da serosa e vascular, com maior frequência do que os do tipo intestinal. Os carcinomas intestinais metastatizam preferencialmente para o fígado, enquanto os difusos metastatizam mais frequentemente para o peritônio (MORI et al. 1995). A análise dos linfonodos é importante para a remoção da doença metastática e para o estadiamento correto do tumor; a acurácia do estadiamento patológico é proporcional ao número e à localização de linfonodos dissecados.

Os tumores em estágios iniciais com lesões pequenas e superficiais geralmente apresentam baixas taxas de invasão vascular e linfonodal. Consequentemente, esses tumores apresentam bom prognóstico após cirurgia: aproximadamente 90% dos pacientes sobrevivem após 10 anos. Entretanto, as lesões infiltrativas apresentam altas taxas de invasão vascular e metástases linfonodais, o que leva a um prognóstico pior: a sobrevida após 5 anos de cirurgia cai para 64,8%.

Assim como para os tumores de esôfago, o estadiamento TNM é muito utilizado para os tumores de estômago, e proporciona informações úteis para o prognóstico. Invasões vasculares e linfonodais, assim como

grau de infiltração da parede gástrica, estão associadas a um prognóstico ruim e são geralmente vistas em casos avançados: pacientes com mais de 15 linfonodos positivos têm uma taxa de sobrevida em 5 anos de somente 11%, quando comparada com a sobrevida dos pacientes com menos de 6 linfonodos positivos, que é de 64%. Infelizmente, a maioria dos pacientes apresenta metástases linfonodais ao diagnóstico. O valor da classificação histológica para predição do prognóstico é controversa: há estudos que mostram que o tipo difuso de Lauren está ligado a prognóstico pior, mas outros estudos não encontraram essa associação (FENOGLIO-PREISER et al. 2000). O tipo histológico parece não estar ligado a diferenças na resposta clínica à quimioterapia ou radioterapia sistêmicas (MANSOUR et al. 2007).

A ressecção cirúrgica completa com linfadenectomia é o principal tratamento curativo para pacientes com adenocarcinomas gástricos em estágios iniciais (HOUSE e BRENNAN 2008); em pacientes com doença metastática o tratamento é paliativo. Infelizmente, apenas 40% dos pacientes submetidos à cirurgia curativa apresentam tumores em estádios iniciais (T2N0M0); assim, o restante apresenta alto risco de recorrência. O estadiamento pré-cirúrgico deve ser feito com cuidado para detectar os pacientes de alto-risco que podem se beneficiar de quimioterapia neoadjuvante, que tem as vantagens de diminuir o tamanho do tumor assim como eliminar possíveis micrometástases (MOEHLER et al. 2007). Pacientes de alto-risco de recorrência pós-operatória podem ser beneficiados por quimioradioterapia adjuvante sistêmica, que reduz as chances de recorrência locorregional assim como de metástases locais ou à

distância. Diversos ensaios clínicos estão sendo feitos com a inclusão de pacientes de tumores esofagogástricos para a avaliação do benefício de terapias-alvo, com o uso de anticorpos específicos ou inibidores de receptores tirosina-quinase com o objetivo de inibir vias de fatores de crescimento, angiogênese, ciclo celular, metaloproteases e promover apoptose (TABERNERO et al. 2005).

1.2.6 Histopatologia

Os adenocarcinomas gástricos são lesões malignas que formam glândulas compostas por estruturas tubulares, papilares ou acinares, ou por misturas complexas entre esses padrões. Foram propostos diversos sistemas de classificação, mas os mais utilizados são os da Organização Mundial de Saúde (OMS) e de Lauren (FENOGLIO-PREISER et al. 2000). Pela classificação da OMS, os adenocarcinomas gástricos podem ser divididos em quatro tipos histológicos principais: papilíferos, tubulares, mucinosos e de células de anel de sinete. A classificação de Lauren (LAUREN 1965) separa os tumores em apenas dois tipos principais: intestinal ou difuso. Os tumores que apresentam porções iguais de ambos os tipos são considerados mistos, enquanto as lesões que não apresentam diferenciação e portanto não podem ser classificados em nenhuma das duas categorias são denominados inclassificáveis. A classificação de Lauren foi utilizada neste trabalho pois pode ser associada à história natural da doença, especialmente em relação ao envolvimento de fatores ambientais e das

lesões precursoras. Existem tumores raros que não são classificados por nenhum dos sistemas de classificação.

Os carcinomas intestinais são formados por glândulas que podem ser facilmente reconhecidas, e variam de lesões bem diferenciadas à moderadamente diferenciadas; na maior parte das vezes surgem em regiões de metaplasia intestinal. Os carcinomas difusos consistem em lesões pouco coesivas, difusas e infiltrantes, com pouca ou nenhuma formação glandular; correspondem ao padrão de células de anel de sinete da classificação de OMS. Esses tumores apresentam taxas mitóticas menores que os intestinais, além de menos infiltrados inflamatórios.

Gastrite atrófica crônica e metaplasia intestinal geralmente precedem e/ou acompanham os adenocarcinomas intestinais, principalmente em áreas de alto incidência (IMAI et al. 1971). A gastrite associada à infecção por *H. pylori* é a lesão precursora mais comum, mas a gastrite auto-imune também pode dar origem à gastrite atrófica, metaplasia intestinal e neoplasia, especialmente nos tumores intestinais. Os carcinomas do tipo difuso se originam geralmente sem associação com gastrite atrófica ou metaplasia intestinal.

1.2.7 Fatores Genéticos

A maioria dos tumores gástricos é esporádica; somente 8-10% estão associados a fatores hereditários (LA-VECCHIA et al. 1992). Os carcinomas gástricos podem se desenvolver em famílias com mutações germinativas em ATM5, p53 (Síndrome de Li-Fraumeni) e BRCA2 (VARLEY et al. 1995;

THORLACIUS et al. 1996). Mutações no gene CDH1, que codifica a proteína E-caderina, relacionada com o processo de adesão celular, estão associadas ao desenvolvimento do carcinoma gástrico difuso familiar (PLUMMER et al. 2004); essas mutações resultam em proteínas truncadas e podem ocorrer em diversas regiões do gene (RICHARDS et al. 1999).

Os carcinomas gástricos também podem estar associados à Síndrome de câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC); esses tumores são geralmente do tipo intestinal, e não estão associados à infecção por *H. pylori*. A maioria dessas famílias apresenta instabilidade de micro-satélites (MSI), e os tumores se apresentam muitas vezes em pacientes jovens. Além da HNPCC, alguns carcinomas do estômago também podem estar associados a síndromes de poliposes familiares como a Síndrome de polipose adenomatosa familiar (FAP) e Peutz-Jeghers.

Indivíduos do grupo sanguíneo A apresentam um risco de desenvolver o câncer gástrico do tipo difuso 20% maior do que indivíduos dos outros grupos sanguíneos. Essa associação ocorre pois a bactéria *H. pylori* se liga ao antígeno sanguíneo Lewis_b, um fator importante no hospedeiro que facilita a infecção crônica e conseqüentemente aumenta o risco de desenvolvimento tumoral (CARNEIRO et al. 1996). Entretanto existem estudos que não conseguiram provar a associação entre os grupos ABO e a infecção por *H. pylori* (NGUYEN et al. 1999).

Diversas alterações cromossômicas já foram descritas para os tumores esporádicos, através de estudos de *Comparative Genomic Hybridization* (CGH). Regiões preferenciais de ganho ou perda

cromossômica incluem os genes APC, FHIT e p53, entre outros. Genes frequentemente mutados estão o p53, receptor tipo 2 de TGF- β , BAX, IGFR2, e E2F4. MSI também pode ser encontrada em 13-44% dos adenocarcinomas gástricos (SERUCA et al. 1995). Estudos de imunohistoquímica mostraram que diversas moléculas de adesão encontram-se alteradas nesses tumores, como E-caderina, α - e β -catenina. Vários receptores de fatores de crescimento podem estar amplificados ou superexpressos, como o c-met, c-erbB-2, e os receptores de EGF, TGF- α , IL1- α e PDGF. A atividade de telomerase também já foi descrita em estágios avançados da doença. Algumas dessas alterações podem ser correlacionadas com grau de invasão (α -catenina) ou piora no prognóstico (E-caderina, c-erbB-2 e telomerase).

1.3 INFLAMAÇÃO CRÔNICA E TRANSFORMAÇÃO

Desse modo, existem vários mecanismos pelos quais as inflamações crônicas podem aumentar as chances do desenvolvimento de metaplasias diferenciadas e de alterações neoplásicas nas células epiteliais (EKSTEEN et al. 2001). Foram identificadas altas concentrações de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em mucosas gastroesofágicas ulceradas (PEEK e BLASER 2003; WILD e HARDIE 2003), e, no esôfago, a bile e o ácido presentes no refluxo induzem a produção de radicais livres e aumentam a expressão de genes relacionados ao stress oxidativo (WILD e HARDIE 2003; JOLLY et al. 2004). Assim como os componentes dos refluxos, a

resposta inflamatória induzida pelo *H. pylori*, ao liberar metabólitos resultantes da ação da enzima óxido-nítrico sintetase induzida (iNOS), também produz espécies reativas que causam danos ao DNA (PEEK e BLASER 2003).

Essas espécies reativas de oxigênio são normalmente geradas *in vivo* durante o metabolismo celular normal, como a respiração celular ou eventos extracelulares (fagocitose de células danificadas, patógenos, etc.), e exercem diversas funções no equilíbrio da célula, como a regulação das vias de sinalização. Entretanto, sua produção em excesso pode danificar várias macromoléculas (DNA, lipídeos, proteínas). A peroxidação de lipídeos é particularmente danosa, pois causa a desestabilização da membrana, com alterações na cadeia respiratória e a propagação das reações oxidativas, através da sua decomposição em produtos tóxicos (aldeídos bifuncionais); essa propagação tem sido associada à carcinogênese e a outros processos degenerativos, incluindo doenças neurodegenerativas, arterioesclerose e doenças inflamatórias (CEJAS et al. 2004; BARTSCH e NAIR 2004).

Durante os últimos cinco anos, nosso grupo vem utilizando a metodologia de cDNA Microarray para investigar o perfil de expressão gênica dos adenocarcinomas do estômago e do esôfago. Esses dados permitiram avanços no entendimento dos processos de transformação maligna bem como no desenvolvimento de possíveis métodos moleculares para o diagnóstico precoce desses tumores (GOMES et al. 2005; MEIRELES et al. 2003, 2004). Nas análises funcionais, foram identificados módulos ou vias metabólicas alteradas nos pacientes portadores de doenças malignas

ou não malignas, como os módulos funcionais referentes à via das citocinas e ao metabolismo de glicerolípides (GOMES et al. 2005). Relatos da literatura mostram a importância do processo inflamatório na geração de radicais livres, peroxidação de lipídios com consequente aumento da produção de aldeídos e danos ao DNA e outras macromoléculas (FARINATI et al. 1998; BAEK et al. 2004). Dentre os vários genes que compõem estes módulos, os genes destacados no Quadro 1 se mostraram alterados de forma estatisticamente significativa.

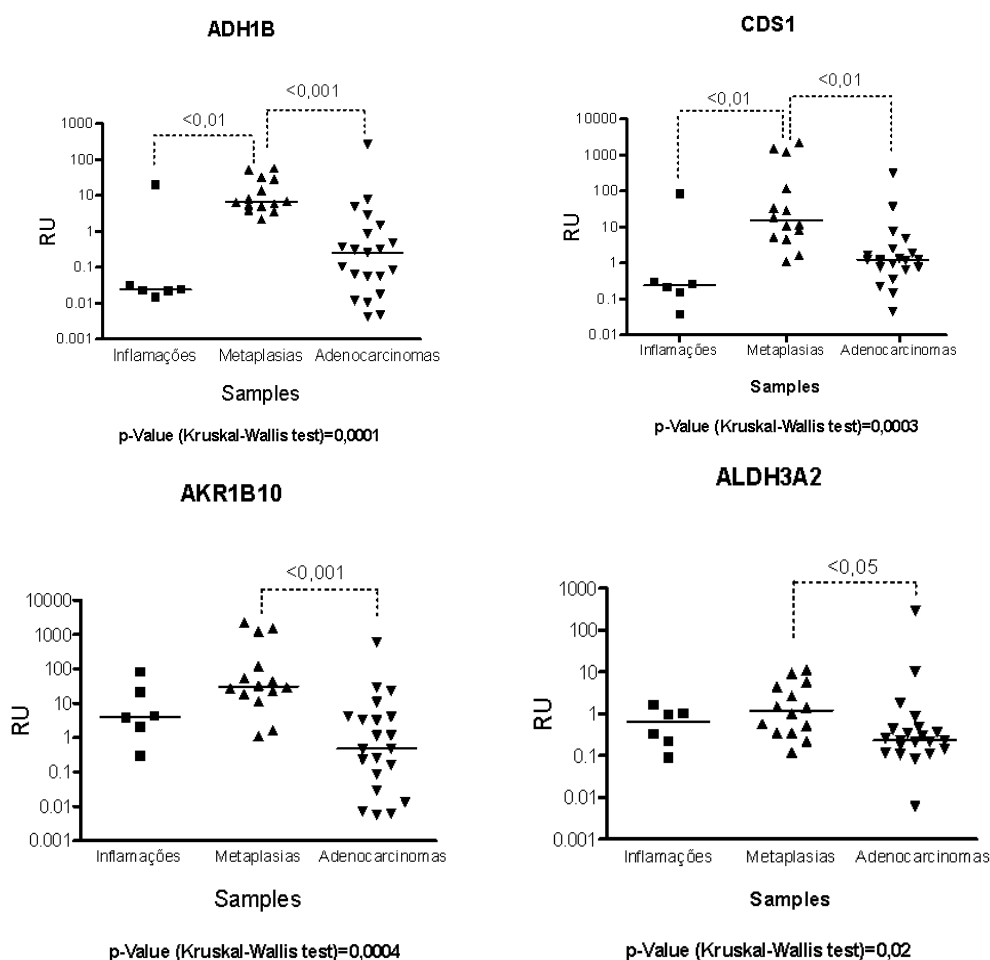
Quadro 1 - Genes responsáveis pelas alterações nas vias de metabolismo de glicerolípides e citocinas.

Nome		Função
METABOLISMO DE GLICEROLÍPIDES		
AKR1B10 (HIS; HSI; ARL1; ARL-1; ALDRLn; AKR1B11; AKR1B12; MGC14103)	<i>Aldo-ceto redutase família 1, membro B10 (aldose redutase)</i>	<i>Redução de aldeídos aromáticos e alifáticos. Altamente expresso em glândulas adrenais, intestino delgado e cólon. Importante na carcinogênese hepática</i>
ALDH3A2 (SLS; FALDH; ALDH10; FLJ20851; DKFZp686E23276)	<i>Aldeído-desidrogenase família 3, membro A2</i>	<i>Importante na desintoxicação por aldeídos gerados pelo metabolismo do álcool e peroxidação de lipídeos. O produto desse gene catalisa a oxidação dos aldeídos de cadeias alifáticas longas e forma ácidos graxos</i>
ADH1B (ADH2)	<i>Álcool desidrogenase IB (classe I), polipeptídeo β</i>	<i>Membros dessa família metabolizam grande variedade de substratos, incluindo etanol, retinol, outros álcoois alifáticos, hidroxisteróides e produtos da oxidação de lipídeos. A proteína codificada por esse gene, formada por homo- e heterodímeros de várias subunidades (α, β e χ) exibe alta atividade na oxidação e catabolismo do etanol</i>
CDS1 (CDS)	<i>CDP-diacylglicerol sintase (fosfatidato citidililtransferase) 1</i>	<i>Codifica uma enzima que regula a quantidade de fosfatidilinositol disponível para sinalização catalisando a conversão do ácido fosfatídico para CDP-diacylglicerol. Envolvida na síntese do fosfatidilglicerol e da cardiolipina na mitocôndria, e do fosfatidilinositol no retículo endoplasmático</i>

Cont/ Quadro 1

CITOCINAS		
IL1R2 (CD121b, IL1RB, MGC47725)	<i>Receptor tipo II de Interleucina 1</i>	<i>A proteína codificada por esse gene é um receptor de citocinas que pertence à família de receptores de IL1. Esse receptor se liga à IL1-α, IL1-β e IL1-R1, agindo como receptor decoy pois impede a atividade dos seus ligantes. Foram descritas duas variantes para essa proteína, originadas por splicing alternativo</i>
CCL20 (CKb4, LARC, MIP-3a, MIP3A, SCYA20, ST38)	<i>Chemokine (C-C) motif Ligand 20</i>	<i>As citocinas são uma família de proteínas secretadas envolvidas em processos inflamatórios e imunoregulatórios. As citocinas C-C são caracterizadas por duas cisteínas adjacentes. CCL20 apresenta atividades mitogênicas, quimiotáticas e pró-inflamatórias</i>
CCL18 (AMAC-1, AMAC1, CKb7, DC-CK1, DCCK1, MIP-4, PARC, SCYA18)	<i>Chemokine (C-C) motif Ligand 18</i>	<i>Esse gene é um dos vários genes codificantes para citocinas C-C do braço q do cromossomo 17. CCL18 apresenta atividade quimiotática para linfócitos T naive, células T CD4+ e CD8+ e linfócitos não ativados. Essa quimiocina atrai linfócitos T naive para células dendríticas e macrófagos ativados em linfonodos. Está ligada tanto à resposta imune humoral quanto à celular.</i>
INHBA (EDF, FRP)	<i>Inibina, sub-unidade βA</i>	<i>A sub-unidade βA se liga à sub-unidade α para formar um inibidor de secreção de FSH. A inibina apresenta atividade de regulação de células do estroma gonadal, inibindo sua proliferação, além de apresentar atividade anti-tumoral.</i>
IL4R (CD124, IL4RA)	<i>Receptor de Interleucina 4</i>	<i>Esse gene codifica para a cadeia α de IL4-R, uma proteína transmembrânica tipo I que liga IL4 e IL13, regulando a produção de IgE e a diferenciação de linfócitos Th2. Duas isoformas são formadas por splicing alternativo: uma ligada à membrana e outra solúvel.</i>
IFNAR2 (IFN-R, IFN-alpha-REC, IFNABR, IFNARB)	<i>Receptor tipo II de Interferon α, β e ω</i>	<i>Esta proteína forma uma das duas cadeias dos receptores de IFN-α e β. A ligação e ativação desses receptores estimula a via de JAK/STAT, levando à fosforilação de STAT 1 e 2. Foram descritos múltiplos transcritos que originam ao menos duas isoformas desse gene.</i>

A expressão alterada destes genes em amostras independentes foi comprovada pela técnica de Q-RT-PCR (Letícia Koch Lerner, Trabalho de Iniciação Científica – PIBIC FAP), como demonstrado na Figura 8.



Legenda: A diferença entre os grupos se mostrou estatisticamente significativa (nas comparações indicadas na figura), e os perfis obtidos pela técnica de PCR Real-Time foram semelhantes aos obtidos pela técnica de microarranjos de cDNA, validando os dados de expressão desses genes.

Figura 8 - Perfil de expressão dos genes relacionados ao metabolismo de glicerolípídeos, em amostras agrupadas de tecidos inflamados, metaplásicos e tumorais de esôfago e estômago.

Esses dados nos levaram a sugerir que a interação entre os genes das duas vias metabólicas poderiam estar envolvidos no processo de transformação maligna observado nos pacientes com metaplasia intestinal, que apresenta um processo inflamatório crônico associado a um aumento na frequência de dano ao DNA. A inflamação crônica causada pela DRGE e pela infecção por *H. pylori* leva a um processo contínuo de reparo tecidual e proliferação celular, assim como a um grande aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, o que leva a uma situação constante de stress oxidativo nas células. Esse stress leva à peroxidação de lipídios e ao desencadeamento da cascata do ácido araquidônico. Os produtos finais desses processos levam à formação de substâncias que estimulam a proliferação celular, assim como a produtos finais da peroxidação de lipídios que causam danos no DNA (aldeídos e cetonas, entre outros). Além de danos no DNA, esses produtos podem danificar proteínas celulares, o que também contribui para a carcinogênese. Os genes envolvidos no metabolismo de glicerolípides poderiam levar à diminuição destes danos, uma vez que são responsáveis pela metabolização de aldeídos tóxicos. Assim, formulamos a hipótese de que uma expressão diminuída destas enzimas poderia estar correlacionada com maior risco de malignização.

Neste projeto, pretendemos avaliar a frequência de danos ao DNA nos pacientes com metaplasia intestinal ou adenocarcinomas do estômago ou do esôfago e estudar sua correlação com os níveis de expressão das enzimas envolvidas no metabolismo de glicerolípides.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a extensão dos danos no DNA (danos oxidativos e adutos químicos) em pacientes com mucosa normal, metaplasia intestinal ou adenocarcinoma de estômago ou esôfago e correlacionar a frequência de alterações com os níveis de mRNA referentes a genes envolvidos no metabolismo de glicerolípides.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a expressão de mRNA referente aos genes ADH1B, AKR1B10, ALDH3A2 e CDS1, através da técnica de Q-RT-PCR.
- 2) Estudar, através de ensaios quantitativos, a presença de danos no DNA (imunoistoquímica) e em proteínas (imunoistoquímica e Western-Blotting) em pacientes com mucosa normal, metaplasia intestinal e adenocarcinoma de estomago e esôfago.
- 3) Correlacionar a frequência de dano com os níveis de mRNA das enzimas relacionadas ao metabolismo de glicerolípides

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras utilizadas nesse projeto foram obtidas no Hospital AC Camargo / Fundação Antonio Prudente. O projeto foi cadastrado no Comitê de Ética da Instituição sob o número 1023/07 e aprovado na reunião de 11/12/2007. Todas as amostras provenientes do Banco de Tumores possuem assinados os termos de consentimento livre e informado pelos pacientes. As amostras provenientes de cirurgia foram colhidas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas em freezers -80°C; as amostras provenientes de biópsias foram armazenadas em RNA Later® (Ambion).

Oitenta e quatro amostras, compreendendo tecidos normais, inflamações, metaplasias e tumores (adenocarcinoma intestinal ou diferenciado) de esôfago e estômago foram obtidas do banco de tumores especificamente para este projeto. As amostras normais correspondem, em sua maioria, a tecidos normais provenientes de biópsias ou bordas livres de tumor provenientes de cirurgias.

Antes das extrações, todas as amostras foram revisadas por um patologista através da confecção de lâminas HE; quando necessário, as amostras foram dissecadas manualmente para garantir um mínimo de 70% de células de mucosa gástrica e ausência de infiltrado inflamatório. O

restante das amostras utilizadas pertencia ao projeto de doutorado de Luciana Gomes (GOMES 2005). Estas amostras, provenientes de biópsia, encontravam-se congeladas em freezers -80°C e, após a confecção de lâminas, quarenta delas foram utilizadas.

As amostras utilizadas nos experimentos de imunohistoquímica (IHQ) foram amostras pertencentes a 5 Tissue Microarrays (TMAs) diferentes, que já haviam sido confeccionados pelo departamento de Anatomia Patológica da instituição. As amostras provenientes de tecidos congelados utilizadas nos experimentos de Q-RT-PCR e blottings e as utilizadas nos experimentos de IHQ foram amostras independentes.

3.2 EXTRAÇÃO DE RNA E DNA

As 6 primeiras amostras foram escolhidas para testar dois protocolos de extração simultânea de RNA e DNA, ambos modificados a partir do protocolo fornecido pela Invitrogen com o reagente TRIzol® (Protocolos 1 e 2, em anexo). Como essas amostras eram grandes (em média 150mg), foi possível dividi-las em dois e extrair cada metade com um protocolo, após a homogeneização dos tecidos com o Polytron (Kinematica). O protocolo utilizado para todo o restante das amostras (Protocolo 3, em anexo) consistiu em uma junção dos dois, levando em conta que a qualidade do RNA do primeiro protocolo foi superior, enquanto a qualidade do DNA do segundo foi melhor (qualidade avaliada através do perfil das amostras no Nanodrop e em géis de agarose 1%).

3.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE mRNA (Q-RT-PCR)

A análise da expressão de mRNA foi efetuada a partir do RNA total extraído das amostras, através da técnica de Q-RT-PCR. Após a extração e a quantificação, a síntese do cDNA a partir do RNA total foi realizada de acordo com o protocolo fornecido juntamente com a enzima ImPromII™ Reverse Transcription System (Promega, Technical Manual nº 236), com primer Oligo(dT) 15 Primer; a síntese de cDNA foi realizada para todas as amostras na mesma reação. Os controles negativos da RT foram feitos 1: sem template e 2: sem enzima.

A qualidade do cDNA, assim como a presença ou não de contaminação por DNA genômico, foi determinada através da análise, em gel de agarose 1% e acrilamida 30%, da presença da banda correspondente ao amplicon resultante da reação de PCR feita com primers para o gene p53. Esse par de primers foi desenhado em dois éxons diferentes (2 e 4), podendo indicar a presença de DNA genômico contaminante (o amplicon dos cDNAs contém 340pb, enquanto o de DNA genômico contém 548pb). O Quadro 2 contém a sequência do par de primers de p53. O DNA genômico utilizado como controle positivo de contaminação foi extraído a partir de 3ml de sangue periférico de um doador voluntário, seguindo as instruções do kit Wizard® Genomic DNA Purification System (Promega). As reações de PCR foram feitas em um volume final de 25µl, com 2.5µl Buffer 10X (Easy Taq), 0.8µl MgCl₂ 50nM ([final]=1,6 mM), 0.5µl dNTP Mix 10mM, 0.375µl Primer

p53 Fw 10 μ M, 0.375 μ l Primer p53 Rev 10 μ M, 0.3 μ l Taq Pol (5U/100 μ l), 1 μ l RNA (100ng) e 19 μ l água. A ciclagem utilizada foi de 95°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Quadro 2 - Sequência de nucleotídeos do par de primers para o gene p53.

Gene	Forward Sequence	Reverse Sequence
p53	5' GGA GGA GCC GCA GTC AGA 3'	5' CAA GAA GCC CAG ACG GAA AC 3'

As condições de reação para cada um dos quatro genes em estudo haviam sido estabelecidas durante o projeto de Iniciação Científica. As sequências dos primers e amplicons são mostradas na Tabela 1; as concentrações utilizadas de primers e cDNA, assim como os valores de eficiência, são mostrados no Quadro 3.

Tabela 1 - Características dos primers e amplicons desenhados para os 4 genes a serem estudados, através do programa Primer Express 3.0.

Gene	Forward Sequence	Forward Length	Forward TM	Forward % GC
ADH1B	CGGTCGGCTTGACACCAT	18	59	61
AKR1B10	TGGAGGGCCTGTAACGTGTT	20	59	55
ALDH3A2	AAAACCCAGCCCTGTCTGTAA	22	59	45
CDS1	TGATGGCAACTTTTGTACATGTGTA	25	58	36
Gene	Reverse Sequence	Reverse Length	Reverse TM	Reverse % GC
ADH1B	TGTGCCACATGCCTCATGA	19	59	53
AKR1B10	CGATTCAACCTCAATATTCTGCATTG	26	59	35
ALDH3A2	AGGTTGAACAGGATCATTCTTCAGT	25	58	40
CDS1	CAGGTTGAAGCACCAACAACCTG	22	59	50
Gene	Amplicon TM	Amplicon %GC	Amplicon TA	Amplicon Length
ADH1B		81	53	60
AKR1B10		77	43	57
ALDH3A2		77	42	56
CDS1		78	44	57

Quadro 3 - Concentrações de cDNA e de primers e valores da eficiência para cada gene.

Gene	Quantidade cDNA	[Primer]	Eficiência
CDS1	10 ng	50 nM	2.03
ALDH3A2	10 ng	50 nM	1.85
ADH1B	10 ng	50 nM	2.02
AKR1B10	10 ng	200 nM	2.12

As reações foram realizadas no aparelho ABI Prism[®] 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems), em placas transparentes de 96 wells (Applied Biosystems), cobertas com adesivo transparente (Applied Biosystems). O volume final de cada reação foi de 20µl, sendo 10µl de SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 5µl de cDNA e 5µl de primers; as reações foram feitas em duplicatas, e a cada uma correspondia um controle negativo sem template. A ciclagem utilizada foi a ciclagem padrão da ABI Prism[®] 7900: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C (ativação

da AmpliTaq Gold DNA Polymerase), seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e extensão de 1 minuto a 60°C. Foi adicionada, ao final da reação, uma etapa extra de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 15 segundos a 95°C, para a análise da curva de dissociação das amostras.

Nesse projeto foram utilizados quatro pares de genes normalizadores (Quadro 4), para que os resultados pudessem ser aplicados no programa GeNorm (VANDESOMPELE et al. 2002), gerando um fator de normalização que levasse em conta a expressão desses quatro genes, resultando em uma normalização mais robusta e portanto a dados mais confiáveis (PFAFFL 2001). Os genes normalizadores utilizados foram CETN2, BCR2, HMBS e HPRT. Além disso, a amostra Referência (pool de três amostras normais de esôfago provenientes do mesmo paciente. A mesma utilizada nos projetos anteriores) foi corrida em todas as placas, para minimizar as diferenças de amplificação entre as reações.

Quadro 4 - Características dos primers e amplicons dos genes normalizadores.

Gene	Forward Sequence	Forward Lenght	Forward TM
CETN2	GCCAAGGAGTTGGGTGAGAA	20	59
BCR2	CCTTCGACGTCAATAACAAGGA	22	58
HMBS	GGCAATGCGGCTGCAA	16	58
HPRT	CCCACGAAGTGTTGGATATAAGC	23	59
Gene	Reverse Sequence	Reverse Lenght	Reverse TM
CETN2	TCGATCAGCTTCATCAATCATTTTC	24	59
BCR2	CCTGCGATGGCGTTCAC	17	57
HMBS	GGGTACCCACGCGAATCAC	19	58
HPRT	GGGCATATCCTACAACAACTTGTC	25	58
Gene	Amplicon TM	Amplicon Lenght	Amplicon genômico
CETN2	80	66	672
BCR2	81	67	1293
HMBS	79	64	3352
HPRT	81	68	242

A determinação da diferença de expressão também foi realizada segundo PFAFFL (2001), utilizando a fórmula:

$$\text{Ratio} = \frac{(\text{Gene alvo})^{\Delta C_T \text{ Ref} - \Delta C_T \text{ amostra}}}{(\text{Gene normalizador})^{\Delta C_T \text{ Ref} - \Delta C_T \text{ amostra}}}$$

Ratio = Diferença de expressão entre a amostra e a referência (fold)

E = Valor da Eficiência de amplificação

Gene alvo = cada um dos genes a serem normalizados

Gene normalizador = fator de normalização (GeNorm)

Referência = pool de amostras de esôfago normal

$$\Delta C_T = C_{T \text{ Ref}} - C_{T \text{ amostra}}$$

$$C_T = \text{Média dos } C_T$$

Sendo no denominador o **gene normalizador** é substituído pelo fator de normalização gerado pelo GeNorm. A partir dos resultados mostrados

foram gerados gráficos com o auxílio do programa Prism Graph 4 (Graph Pad Softwares).

3.4 IMUNOISTOQUÍMICA

As reações de imunoistoquímica foram realizadas de acordo com protocolo já padronizado, segundo o Protocolo 4, em anexo. Para a padronização da diluição dos anticorpos foram utilizadas lâminas convencionais de estômago e esôfago. Para cada anticorpo foram realizadas reações com BSA no lugar dos anticorpos primários como controles negativos. A diluição padronizada para cada anticorpo foi utilizada nas reações com as lâminas de Tissue MicroArray (TMA); estas lâminas de TMA foram preparadas durante a tese da doutora Maria Dirlei Begnani, do departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo. Foram selecionadas lâminas de 5 blocos de TMA diferentes: A1, B1, C1, D1 e Esôfago (a nomenclatura dos blocos é dada pelo patologista que solicitou sua confecção). As reações de imunoistoquímica foram realizadas pela técnica Suely Nonogaki.

Para a análise foi utilizado o equipamento de leitura automatizada ACIS III (Dako). Foram circuladas seis áreas de cada core dos arrays, contendo exclusivamente células glandulares. Assim, não fizeram parte da quantificação regiões com necrose, infiltrados inflamatórios, estroma ou outros tecidos como adiposo ou muscular. Além disso, as amostras de

adenocarcinoma difuso, misto ou carcinoma epidermóide não foram considerados.

3.5 WESTERN BLOTTING

Para a extração de proteínas das amostras, foram testados dois protocolos: o protocolo de extração de proteínas para Western Blotting da Frilabo com o tampão RIPA (50mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% desoxicolato de sódio de 0.1% SDS), que é um tampão utilizado para extração de proteínas nucleares, contendo inibidores de proteases e fosfatases e quelantes de metais (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche – EDTA 0,5M e EGTA 0,1M), e o protocolo de extração de proteínas a partir da segunda fase orgânica do TRIzol® (Protocolo 5, em anexo).

Para o teste do primeiro protocolo testou-se também o melhor modo de homogeneização dos tecidos (Polytron ou sonicador), com a ajuda da doutora Ana Paula Lepique, do Laboratório de Virologia do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. Para o teste foram utilizadas 3 amostras congeladas de carcinoma epidermóide de esôfago, de aproximadamente 60mg cada, que foram divididas em dois. Após a homogeneização dos tecidos através dos 2 métodos com o tampão (complementado na hora da extração com o coquetel e os quelantes. 3ml tampão por grama de tecido), o protocolo foi o mesmo para cada uma das metades. As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos a 4°C; após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para novos tubos e centrifugado novamente. O

sobrenadante da segunda centrifugação foi coletado e quantificado através do método colorimétrico de Bradford, no Nanodrop.

Para o teste do segundo protocolo foram utilizadas as fases orgânicas provenientes da extração do material genético de 10 amostras. Uma vez que a extração com o primeiro protocolo resultou em quantidade e qualidade superiores de extrato protéico total, todas as amostras foram extraídas seguindo este protocolo, após serem homogeneizadas no Polytron.

As reações de Western Blotting foram realizadas em géis de SDS-PAGE, em condições desnaturantes. Os aparatos de corrida e transferência utilizados eram da BioRad. As concentrações dos géis foram de 4% Empacotamento (625µl Tris 1M pH 6.8, 665µl Acrilamida/Bisacrilamida 30%, 25µl SDS 20%, 100 µl APS 10%, 1.5 µl Temed e 3.6ml água dd) e 12% Separação (2.5ml Tris 1.5M pH 8.8, 4ml Acrilamida/Bisacrilamida 30%, 50µl SDS 20%, 200µl APS 10%, 3µl Temed e 3.3ml água dd). Foram aplicados 30µg de proteína de cada amostra, desnaturados a 85°C por 10 minutos juntamente com o Tampão de Amostra 4X (0.065M Tris pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 2% β-mercaptoetanol, 0.002% azul de bromofenol). O marcador de peso molecular utilizado foi o Rainbow (GE Healthcare). Como controle positivo foi utilizado um extrato protéico total de células HEK293, extraído com o tampão RIPA. Os géis foram corridos em uma voltagem de 100V, com Tampão de Corrida 1X (14.4g Glicina, 3.03g Tris, 1g SDS, Água dd QSP 1l).

A transferência foi realizada em membrana de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare), que deve ser rapidamente umedecida com água e depois equilibrada por 10 minutos em Tampão de Transferência (14.4g

Glicina, 3.03g Tris, Água dd QSP 1l) antes da transferência. Os géis também foram equilibrados por no mínimo 10 minutos. As transferências foram realizadas por duas horas a 65V.

Após a transferência as membranas foram coradas por aproximadamente 1 minuto com Ponceau S (0.1g Ponceau em 100ml Ácido acético 10%), e lavadas com água dd. Os bloqueios foram feitos com TBS-T (100ml TBS 10X, 90ml Água dd e 1ml Tween 20. TBS 10X: 100ml Tris-HCl 1M pH 7.4, 375ml NaCl 4M e 525ml Água dd) 5% leite por uma hora. Para a titulação o anticorpo primário anti- λ -H2AX (NB100-2280), da Novus Biologicals (policlonal, feito em coelho), foi diluído em TBS-T 5% leite para concentrações finais de 1:100 a 1:5000, para determinação da concentração mais apropriada. As incubações com o anticorpo primário foram realizadas OV a 4°C e por uma hora sob agitação à temperatura ambiente no dia seguinte. Foram feitas 3 lavagens de 10 minutos cada com TBS-T 5% leite sob agitação. O anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com peroxidase (NA934, GE Healthcare) foi diluído em TBS-T 5% leite e incubado por uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram lavadas rapidamente com TBS-T e reveladas por 1 minuto com ECL (GE Healthcare). Foram feitas exposições de 2 horas em Hyperfilm ECL (GE Healthcare), e os filmes foram revelados no aparelho MIN-R Processor (Kodak).

Como normalizador foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-ACTB (Clone AC-40, Sigma) feito em camundongo. Após a primeira revelação as membranas foram novamente bloqueadas e incubadas com o anticorpo

primário anti-ACTB OV a 4°C e por uma hora sob agitação à temperatura ambiente no dia seguinte. Foram feitas 3 lavagens de 10 minutos cada com TBS-T sob agitação, e as membranas foram incubadas por uma hora com o anticorpo secundário anti-mouse conjugado com peroxidase (NA931, GE Healthcare). As membranas foram lavadas com TBS-T 3 vezes por 10 minutos sob agitação e reveladas novamente, após exposição de 5 minutos.

3.6 DOT BLOT

A extração de DNA para os experimentos de Dot Blot foi feita através do Protocolo 3 em anexo, conforme mencionado anteriormente. Os experimentos foram realizados no aparato BIO RAD 170-6545/47, de acordo com o protocolo cedido pelo professor doutor Carlos Menck, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (Protocolo 7, em Anexo).

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS

A Tabela 2 mostra as quantidades e a classificação das amostras de tecidos congelados utilizadas neste projeto, para os experimentos de Q- RT-PCR e blottings.

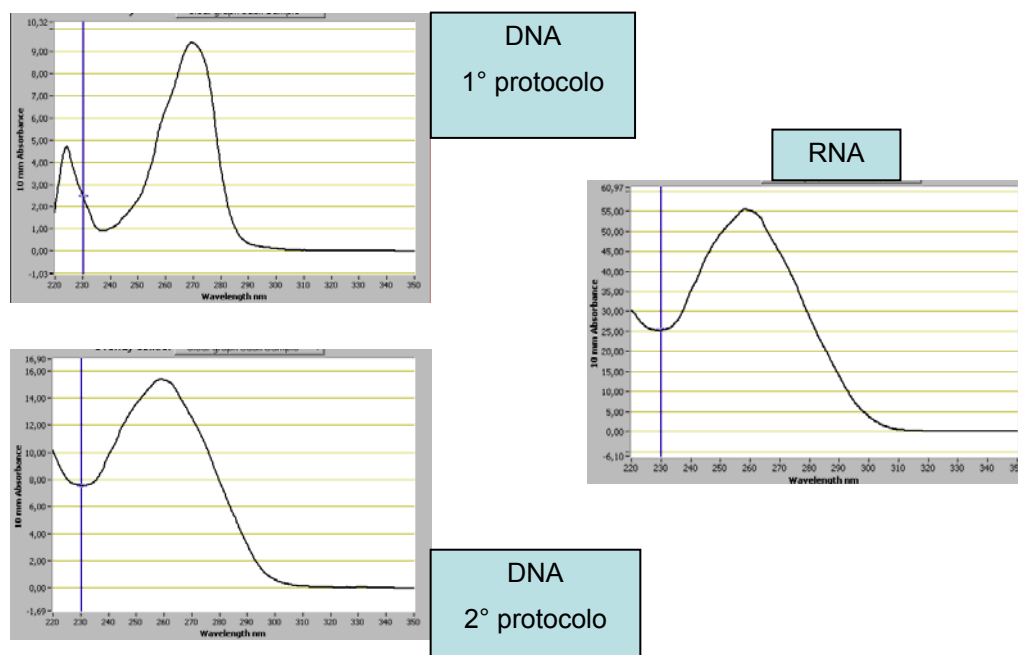
Tabela 2 - Quantidade e classificação das amostras utilizadas provenientes de tecidos congelados.

	Normal	Inflamação	Metaplasia	Tumor	Total
Estômago	29	17	9	38	94
Esôfago+Junção	12	3	3	13	31
Total	41	20	12	51	124

4.2 EXTRAÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO

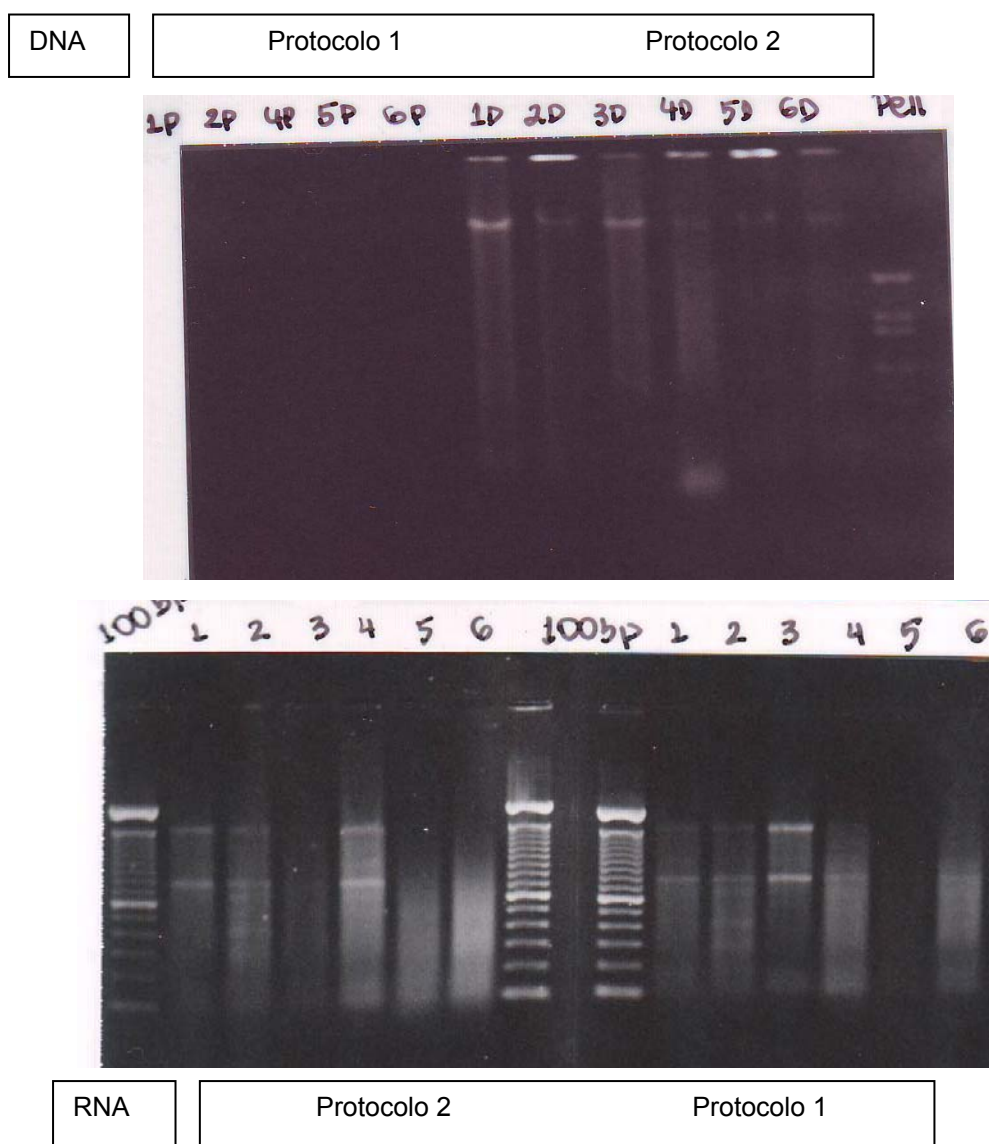
A determinação do melhor protocolo para extração simultânea do material genético das amostras levou em conta a quantidade e qualidade dos materiais extraídos, avaliados através do perfil das amostras no Nanodrop e em géis de agarose 1%. Apesar da quantidade de DNA extraída por ambos os protocolos ser semelhante e satisfatória (as razões 260/230 próximas de 2 também mostram uma boa pureza dos materiais), as amostras de DNA extraídos pelo protocolo do TRIzol® apresentaram o maior pico da absorbância em 270nm, enquanto as extraídas pelo protocolo do LGEA apresentaram o pico em 260nm, como esperado (Figura 9). Os RNAs

mostraram quantidade, pureza e absorbâncias semelhantes e satisfatórias através dos 2 protocolos. Para avaliar a qualidade dos materiais extraídos foram feitos géis de agarose 1% em tampão TAE, mostrados na Figura 10.



Legenda: O perfil dos RNAs extraídos com ambos os protocolos foi semelhante, portanto apenas um gráfico foi exemplificado.

Figura 9 - Gráficos de absorbância obtidos pelo Nanodrop exemplificando os perfis das amostras de DNA extraídas pelos dois protocolos testados.



Legenda: As amostras de RNA foram desnaturadas com adição de tampão de amostra com uréia e incubação a 70°C por 10 minutos.

Figura 10 - Géis de agarose 1% corados com brometo de etídio. Em ambos os géis foram aplicados 1µg de material genético.

As figuras mostram que de fato a extração de DNA pelo primeiro protocolo não é satisfatória; assim, escolhemos segundo protocolo para extração de DNA. Em relação ao RNA, apesar de ambos os protocolos mostrarem degradação, escolhemos primeiro protocolo pois a qualidade do RNA é um pouco superior. Assim, protocolo utilizado para todo o restante

das amostras consistiu em uma junção dos dois. A tabela em anexo mostra as quantidades de RNA, DNA e proteínas extraídas de todas as amostras.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE mRNA (Q-RT-PCR)

Apenas as amostras que apresentaram a amplificação do fragmento desejado através das reações de PCR com o primer de p53 foram utilizadas nas reações de PCR Real-Time (Tabela 3). As Figuras 11 e 12 mostram exemplos de géis de acrilamida 8% e agarose 1%, utilizados para verificar a presença do amplicon esperado; as amostras que não apresentaram bandas não foram utilizadas nos experimentos de PCR Real-Time. A Figura 13 mostra que não houve amplificação da banda correspondente ao DNA genômico, o que indica que o cDNA não apresentou níveis de DNA genômico contaminante detectáveis pela técnica.

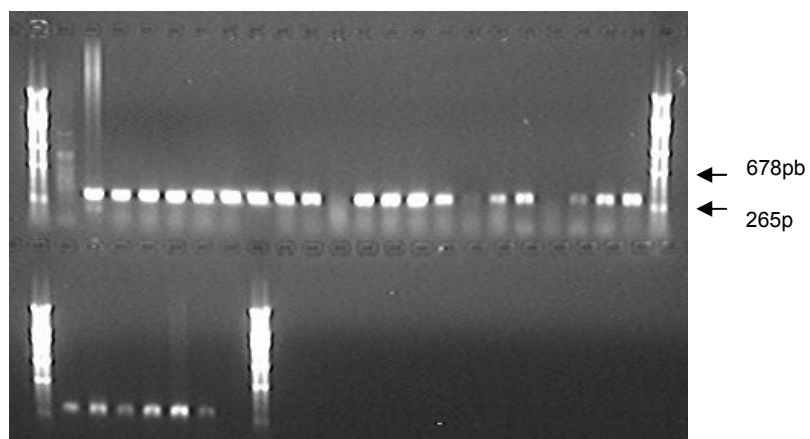
Tabela 3 - Quantidade e classificação das amostras que foram utilizadas nas reações de Q-RT-PCR.

	Normal	Inflamação	Metaplasia	Tumor	Total
Estômago	22	13	9	37	81
Esôfago+Junção	12	2	2	13	29
Total	34	15	11	50	110



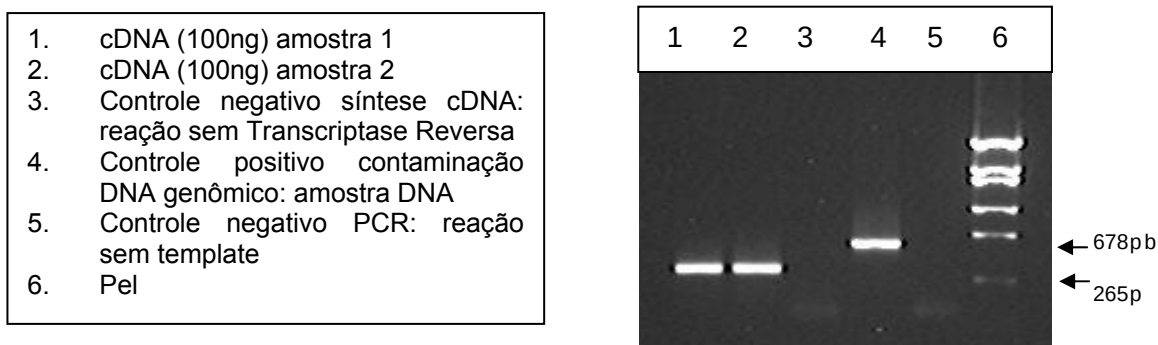
Legenda: A banda de 340pb corresponde ao amplicon esperado de cDNA, indicando a qualidade do cDNA sintetizadas a partir do RNA total extraído das amostras. Marcador molecular: 100bp DNA Ladder (Invitrogen). (amostras 1-27)

Figura 11 - Géis de acrilamida 8% corados com prata, onde foram fracionados os produtos da reação de PCR para o gene p53.



Legenda: Marcador de peso molecular: Pel. Canaleta 8 do segundo gel: Controle negativo PCR (sem template) (amostras 1-28).

Figura 12 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio onde foram fracionados os produtos da reação de PCR para o gene p53

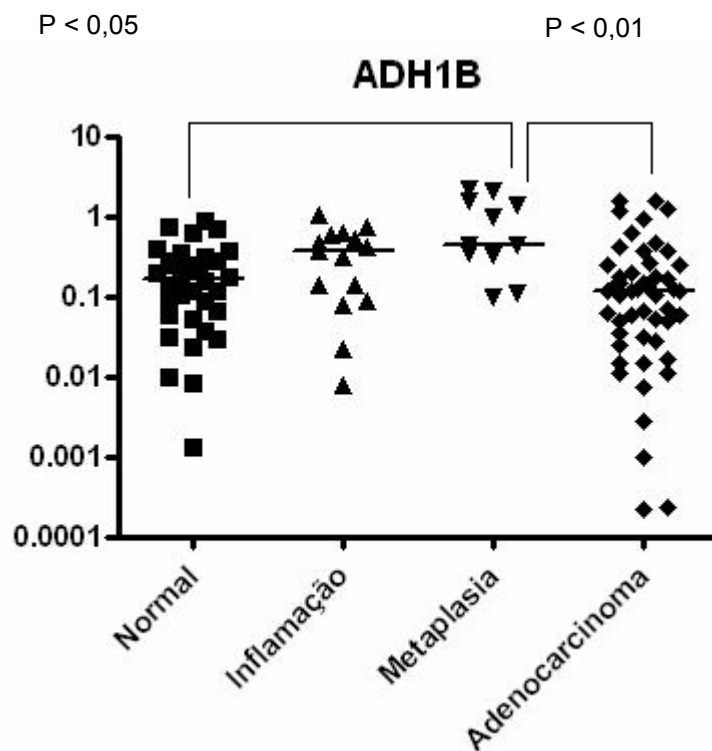


Legenda: As bandas de menor peso molecular dos cDNAs (340pb), quando comparadas com o DNA genômico (548pb) mostram que houve somente amplificação de região exônica pela reação da PCR p53 exons 2-4 e que, portanto, o cDNA não apresenta níveis de DNA genômico contaminante detectáveis pela técnica.

Figura 13 - Gel de agarose 1% mostrando os produtos da reação de síntese do cDNA a partir do RNA total extraído de duas amostras.

Após todas as reações os valores de C_T calculados através da fórmula já citada foram plotados em tabelas do software GeNorm, que determina quais os melhores genes normalizadores (genes que apresentam menor variação de expressão entre as amostras) e calcula um Fator de Normalização para cada amostra, com base na expressão dos genes normalizadores mais apropriados para cada grupo de amostras (VANDESOMPELE et al. 2002). Os genes normalizadores selecionados pelo programa ($M < 1.5$) foram BCR2, HMBS e HPRT; todos os cálculos de diferença de expressão foram realizados com base nos fatores de normalização gerados a partir desses três normalizadores.

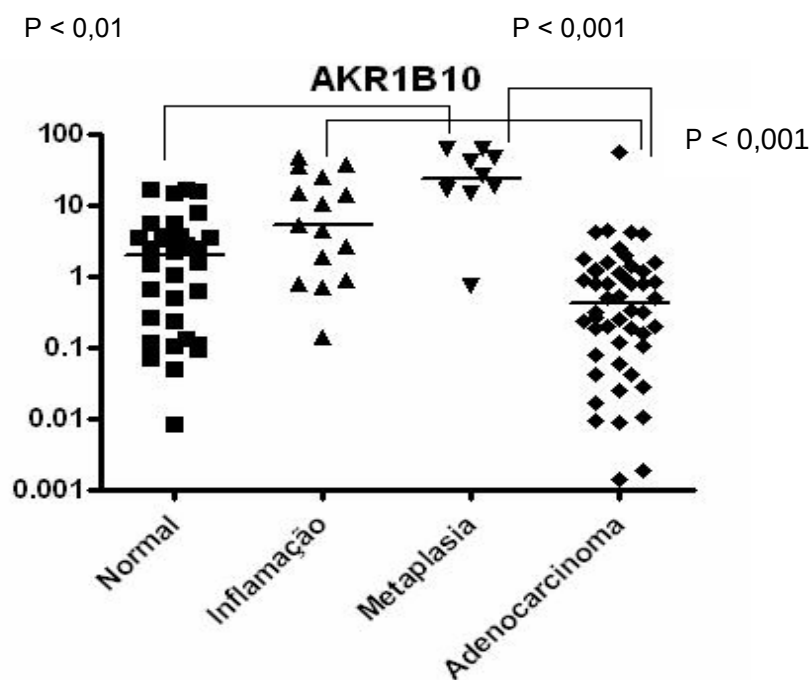
As Figuras 14 a 17 mostram os perfis de expressão gênica dos quatro genes pertencentes ao metabolismo de glicerolípides, quantificados através de Q-RT-PCR.



Legenda: Os grupos de amostras que tiveram diferenças estatisticamente significativas através dos testes de Kruskal-Wallis e Dunn aparecem destacados no gráfico. P valor teste Kruskal-Wallis: 0,0011.

Figura 14 - Perfis de expressão dos genes do metabolismo de glicerolípides obtidos por Q-RT-PCR: ADH1B.

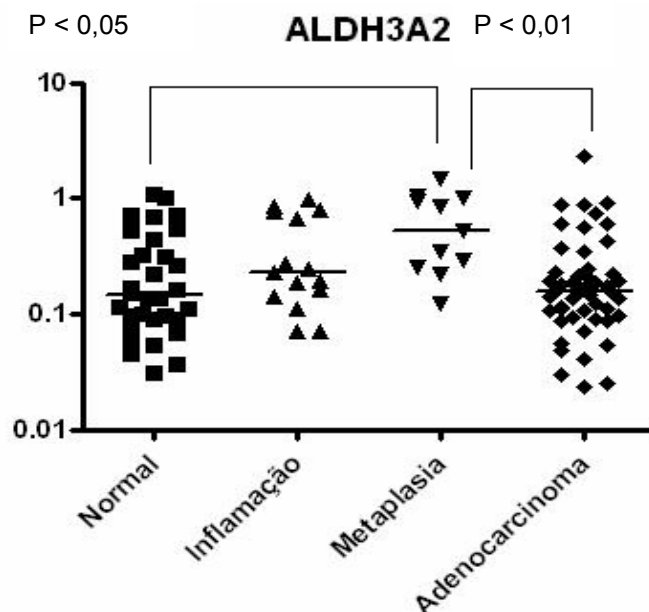
A Figura 14 mostra um aumento significativo na expressão do gene ADH1B nas amostras metaplásicas quando comparadas com as amostras normais, assim como uma significativa diminuição da expressão nas amostras de adenocarcinomas do esôfago e estômago, comparando com as amostras normais.



Legenda: Os grupos de amostras que tiveram diferenças estatisticamente significativas através dos testes de Kruskal-Wallis e Dunn aparecem destacados no gráfico. P valor teste Kruskal-Wallis: $< 0,0001$.

Figura 15 - Perfis de expressão dos genes do metabolismo de glicerolípides obtidos por Q-RT-PCR: AKR1B10.

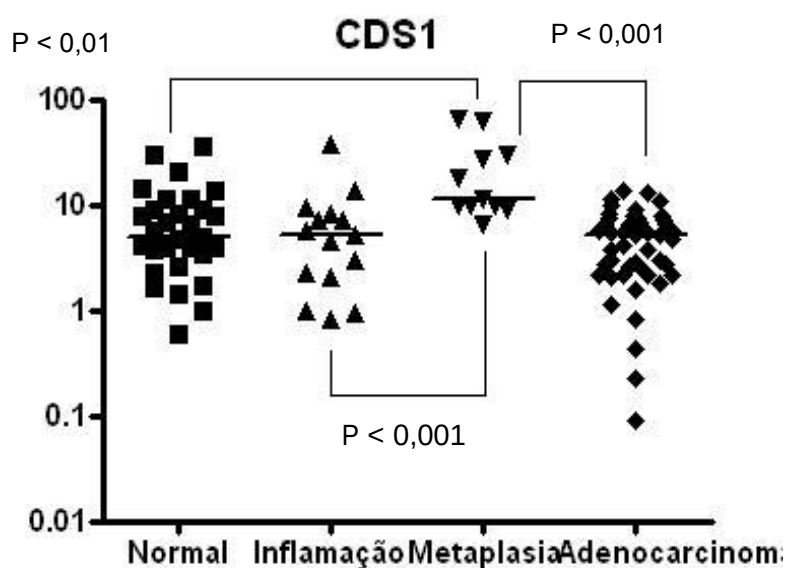
A Figura 15 mostra um aumento significativo na expressão de AKR1B10 nas amostras metaplásicas quando comparadas com as amostras normais, além de uma significativa diminuição da expressão nas amostras de adenocarcinomas do esôfago e estômago, quando comparadas com as amostras de inflamações e metaplasias.



Legenda: Os grupos de amostras que tiveram diferenças estatisticamente significativas através dos testes de Kruskal-Wallis e Dunn aparecem destacados no gráfico. P valor teste Kruskal-Wallis: 0,0037.

Figura 16 - Perfis de expressão dos genes do metabolismo de glicerolípides obtidos por Q-RT-PCR: ALDH3A2.

A Figura 16 mostra um aumento significativo na expressão do gene ALDH3A2 nas amostras metaplásicas quando comparadas com as amostras normais, assim como uma significativa diminuição da expressão nas amostras de adenocarcinomas do esôfago e estômago, quando comparadas com as amostras metaplásicas.



Legenda: Os grupos de amostras que tiveram diferenças estatisticamente significativas através dos testes de Kruskal-Wallis e Dunn aparecem destacados no gráfico. P valor teste Kruskal-Wallis: 0,0002.

Figura 17 - Perfis de expressão dos genes do metabolismo de glicerolípides obtidos por Q-RT-PCR: CDS1.

A Figura 17 mostra um aumento significativo de CDS1 nas amostras metaplásicas quando comparado às amostras normais e inflamadas de estômago e esôfago, além de uma diminuição significativa da expressão de CDS1 nas amostras de adenocarcinoma em comparação com as amostras metaplásicas.

Em geral, as figuras mostram um aumento significativo na expressão dos genes relacionados ao metabolismo de glicerolípídeos nas amostras metaplásicas quando comparadas com as amostras normais, assim como uma significativa diminuição da expressão nas amostras de adenocarcinomas do esôfago e estômago.

4.4 IMUNOISTOQUÍMICA

O Quadro 5 reúne a quantidade e a classificação das amostras utilizadas nas reações de imunoistoquímica.

Quadro 5 - Blocos de TMAs utilizados neste projeto.

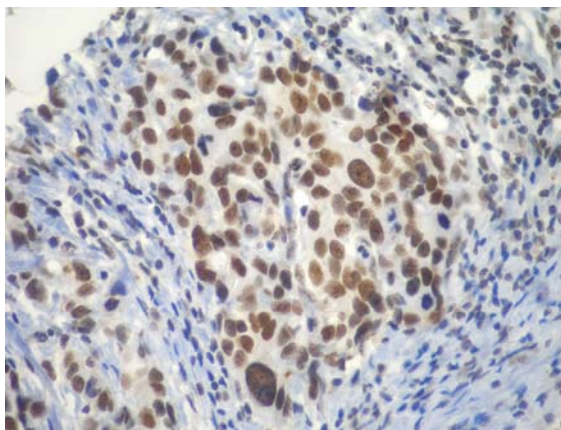
TMA	Amostras	Tipo
Bloco A1	161 em duplicatas	Tumor estômago
Bloco B1	105 em duplicatas	Tumor estômago
Bloco C1	204 em duplicatas	Tumor estômago
Bloco D1	60 em duplicatas	Tumor (30) + Normal (30) estômago
Bloco Esôfago	29 em duplicatas	Adeno (15) + Normal (14)
Bloco Estômago Normal	23 amostras	Estômago normal

4.4.1 8-OHdG

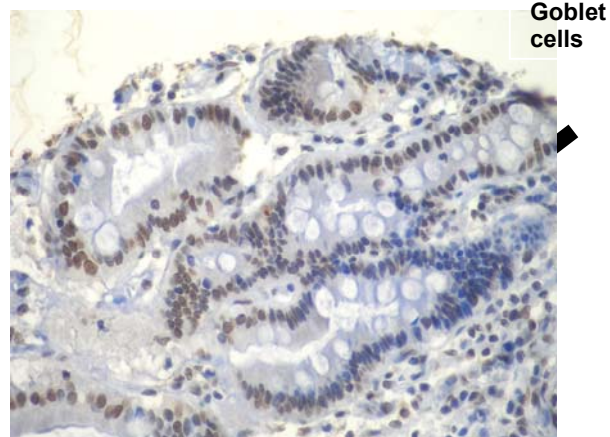
A análise dos danos oxidativos no DNA foi avaliada através da medida de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). O anticorpo utilizado foi o N45.1, da JalCA, escolhido com base na literatura (TOYOKUNI et al. 1997; TANAKA et al. 1997), na concentração de 1:1500. Foram selecionadas duas lâminas de 5 blocos de TMA diferentes: A1, B1, C1, D1 e Esôfago. Para os marcadores nucleares o parâmetro considerado nas análises foi a porcentagem de células marcadas (FAITH et al. 2004).

A Figura 18 mostra lâminas representativas da coloração para o marcador 8-OHdG, em amostras normais, metaplásicas e tumorais de esôfago e estômago. As Figuras 19 e 20 mostram o perfil das amostras quantificadas para este marcador. As lâminas de imunoistoquímica foram escaneadas com a objetiva de aumento 10X.

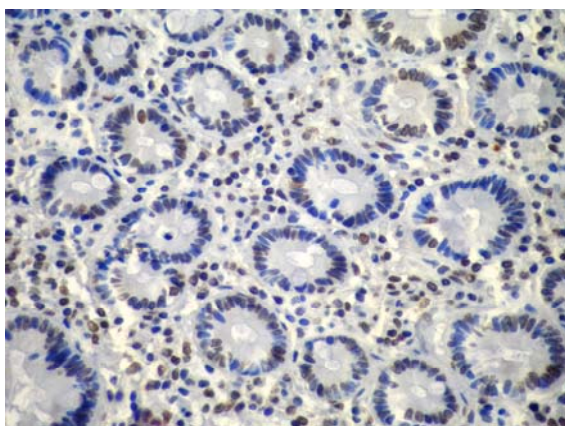
Adenocarcinoma estômago



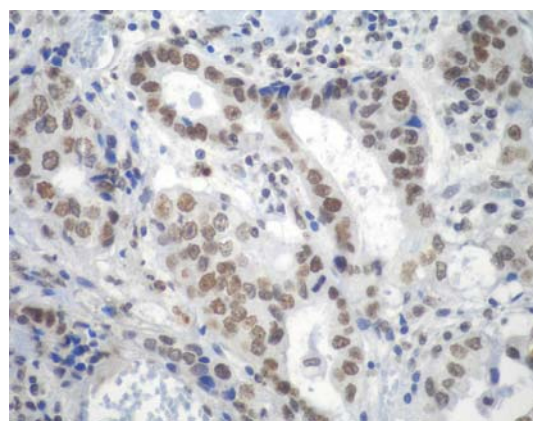
Metaplasia estômago



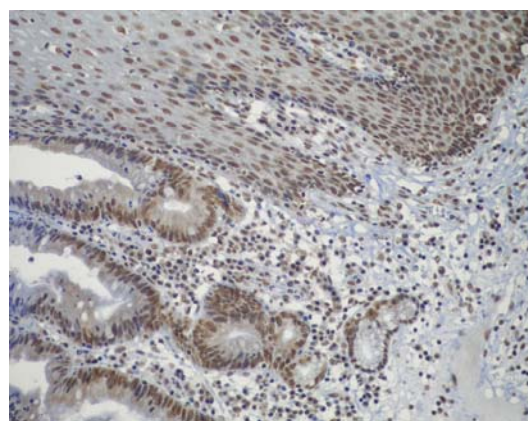
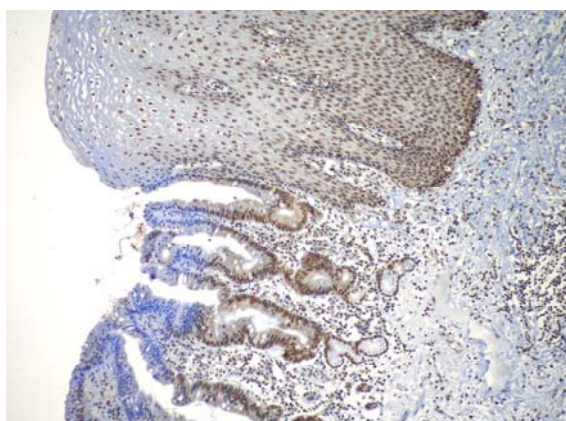
Estômago normal



Adenocarcinoma esôfago

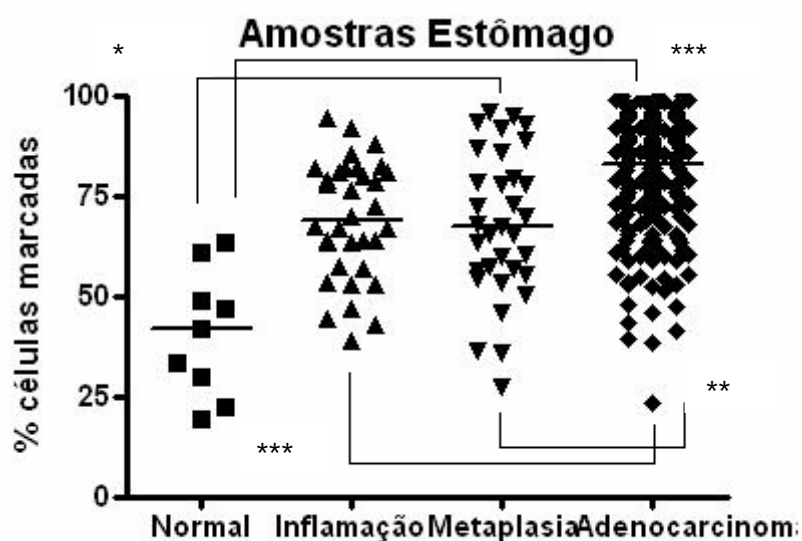


Transição epitélio normal → Esôfago de Barrett



Legenda: As amostras tumorais mostram características típicas como desorganização da arquitetura da glândula e núcleos polimórficos. Os tecidos metaplásicos apresentam células produtoras de muco (goblet cells), típicas das metaplasias intestinais.

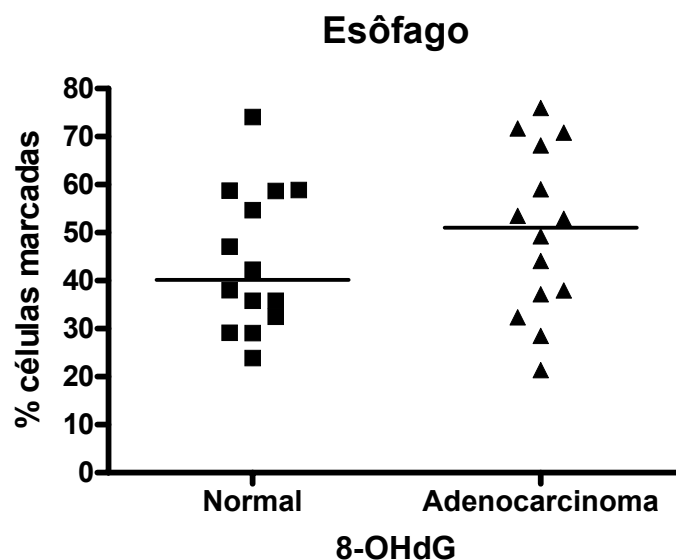
Figura 18 - Diferenças entre as marcações de amostras de estômago (tumorais, metaplásicas e normais) e esôfago (tumorais, metaplásicas e normais), para o anticorpo anti-8-OHdG.



Legenda: Os grupos de amostras que tiveram diferenças estatisticamente significativas através dos testes de Kruskal-Wallis e Dunn aparecem destacados nos gráficos. P valor teste Kruskal-Wallis: < 0,0001. * : P < 0,05. ** : P < 0,01 e *** : P < 0,001.

Figura 19 - Perfil da marcação de anti-8-OHdG nas amostras de estômago.

A Figura 19 mostra um significativo aumento da marcação de 8-OHdG nas amostras metaplásicas e tumorais, quando comparadas às amostras normais. Além disso, há um aumento significativo da marcação nas amostras tumorais em comparação com as amostras de tecidos inflamados e metaplásicos.



Legenda: P valor teste Kruskal-Wallis: 0,3953.

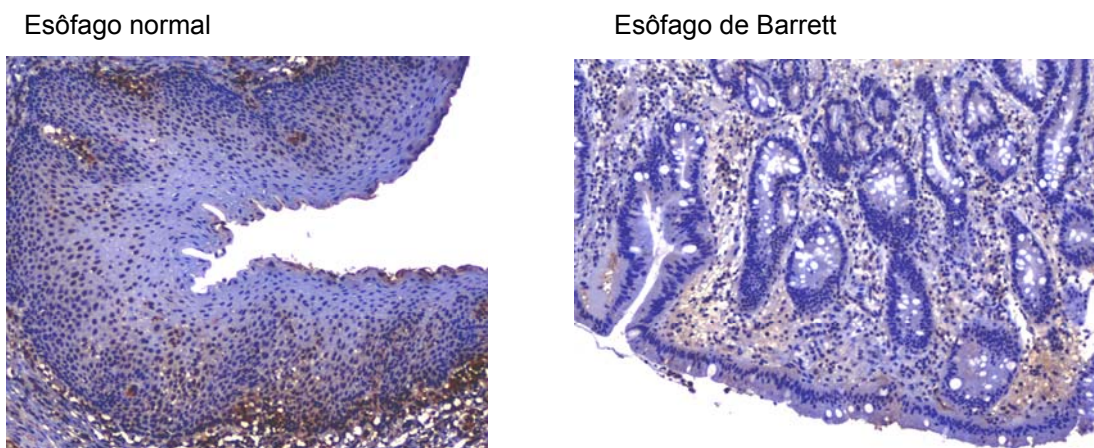
Figura 20 - Perfil da marcação de anti-8-OHdG nas amostras de esôfago.

Assim como ocorre com as amostras de estômago, as amostras de tecido esofágico também apresentaram maior marcação de 8-OHdG nas amostras de adenocarcinomas quando comparadas com as normais; essa diferença, entretanto, não foi estatisticamente significativa.

4.4.2 MDA

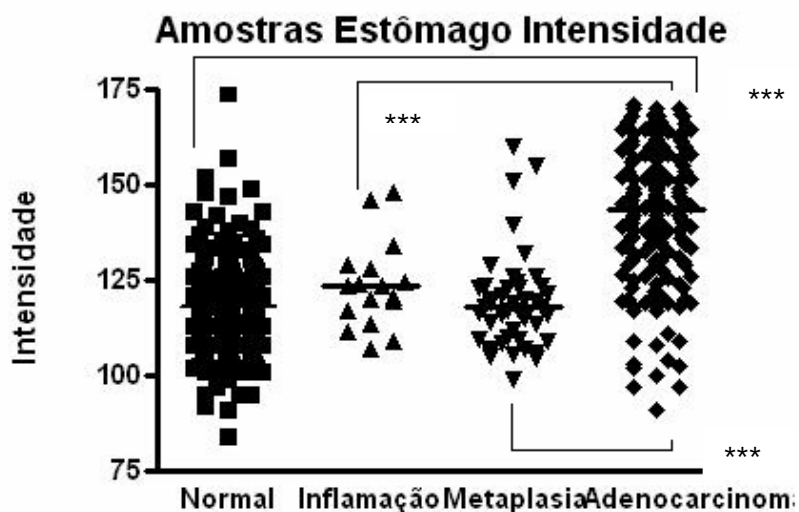
Para a identificação da presença de adutos no DNA e em proteínas, utilizamos o anticorpo anti-malondialdeído (MDA) ab27644, da Abcam, na concentração 1:600. Para este marcador foram utilizados duas lâminas dos blocos A1, B1, C1, Estômago Normal e Esôfago. Na análise de marcadores citoplasmáticos o parâmetro utilizado foi a intensidade da coloração (WATWE et al. 2005). A Figura 21 mostra exemplos da coloração em amostras normais e metaplásicas de esôfago, e as Figuras 21 e 23 mostram

a distribuição das amostras quantificadas segundo a intensidade das marcações.



Legenda: A amostra metaplásica apresenta formas típicas de epitélios glandulares, assim como as células produtoras de muco, ao contrário do epitélio escamoso das amostras normais.

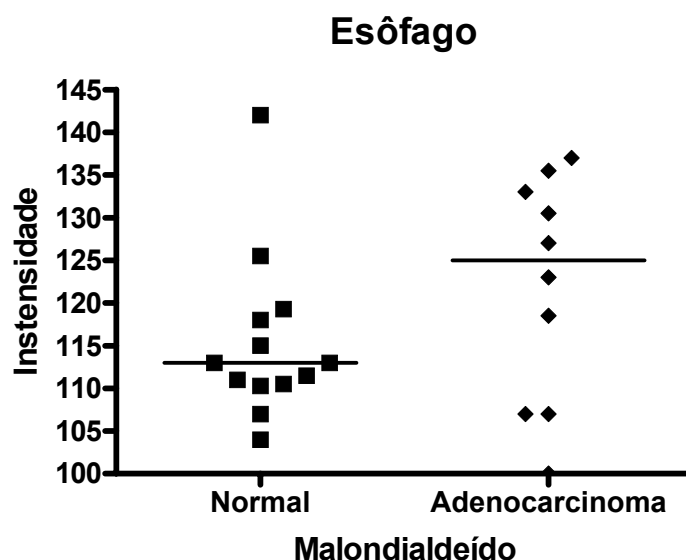
Figura 21 - Diferenças entre as marcações de amostras de esôfago normais e metaplásicas (Esôfago de Barrett), para o anticorpo anti-MDA.



Legenda: Os grupos de amostras que tiveram diferenças estatisticamente significativas através dos testes de Kruskal-Wallis e Dunn aparecem destacados nos gráficos. P valor teste Kruskal-Wallis: < 0,0001. *** : P < 0,001.

Figura 22 - Perfil da intensidade da marcação de anti-MDA nas amostras de estômago.

A Figura 22 mostra um aumento significativo da marcação de MDA nas amostras tumorais, quando comparadas com os grupos restantes de amostras.



Legenda: P valor teste Kruskal-Wallis: 0,2511.

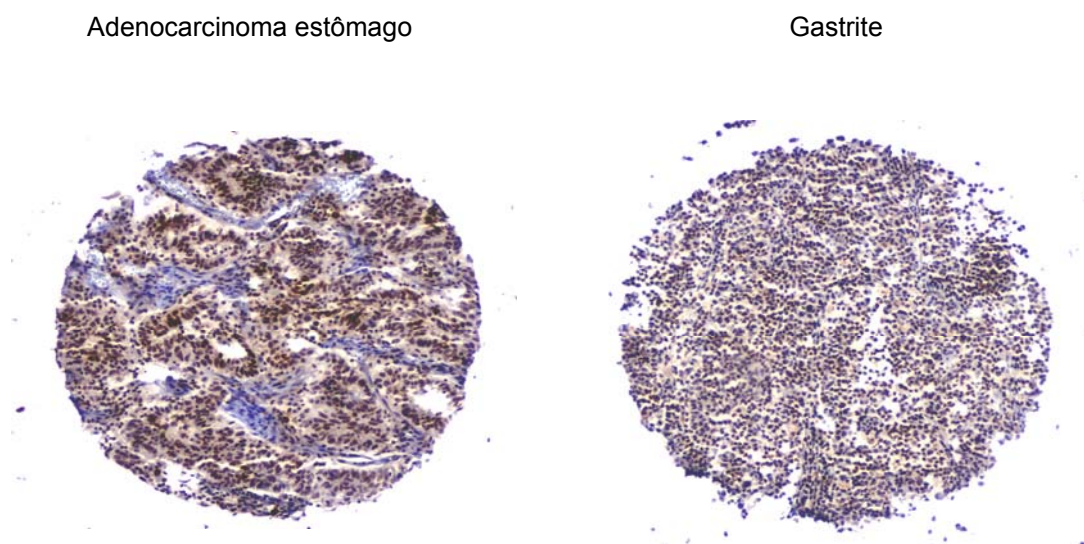
Figura 23 - Perfil da intensidade da marcação de anti-MDA nas amostras de esôfago.

A Figura 23 mostra um aumento da marcação de MDA nas amostras de adenocarcinoma de esôfago, quando comparadas com as amostras de tecido esofágico normal. Este aumento, entretanto, não foi estatisticamente significativo.

4.4.3 γ -H2AX

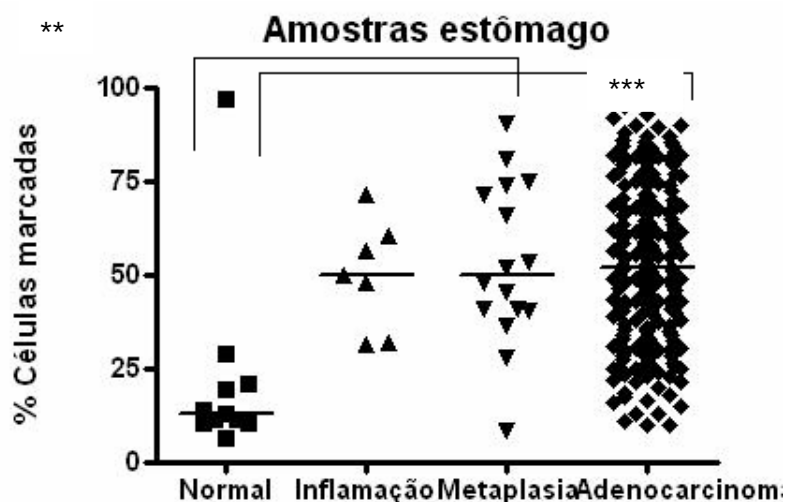
A determinação indireta de danos no DNA foi feita através do estudo da histona H2AX fosforilada (γ -H2AX). O anticorpo utilizado foi o NB100-2280, da Novus Biologicals, na concentração 1:100. Para este marcador

foram utilizadas duas lâminas dos blocos A1, B1, C1, Estômago Normal e Esôfago. Assim como o 8-OH-dG, a γ -H2AX também é um marcador nuclear e o parâmetro utilizado nas análises é a porcentagem de células marcadas positivamente. A Figura 24 mostra exemplos da marcação em amostras tumorais e em tecidos inflamados de mucosa gástrica, e as Figuras 25 e 26 mostram a distribuição das amostras quantificadas segundo a porcentagem de células marcadas positivamente.



Legenda: A amostra tumoral mostra marcação intensa de praticamente todas as células glandulares, enquanto a amostra de gastrite tem uma marcação mais fraca e apresenta grande quantidade de células inflamatórias.

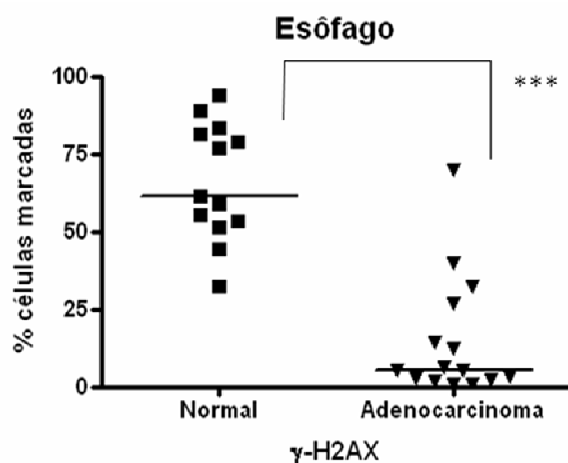
Figura 24 - Exemplos de marcações de imunoistoquímica para o anticorpo anti- γ -H2AX.



Legenda: Os grupos de amostras que tiveram diferenças estatisticamente significativas através dos testes de Kruskal-Wallis e Dunn aparecem destacados nos gráficos. P valor teste Kruskal-Wallis: 0,0004. ** : $P < 0,01$ e *** : $P < 0,001$.

Figura 25 - Perfil da marcação de anti- γ -H2AX nas amostras de estômago.

A Figura 25 mostra um aumento significativo na marcação de γ -H2AX nas amostras inflamadas, metaplásicas e de adenocarcinomas de estômago, quando comparadas com as amostras normais.



Legenda: Os grupos de amostras que tiveram diferenças estatisticamente significativas através dos testes de Kruskal-Wallis e Dunn aparecem destacados nos gráficos. P valor teste Kruskal-Wallis: 0,0001. *** : $P < 0,001$.

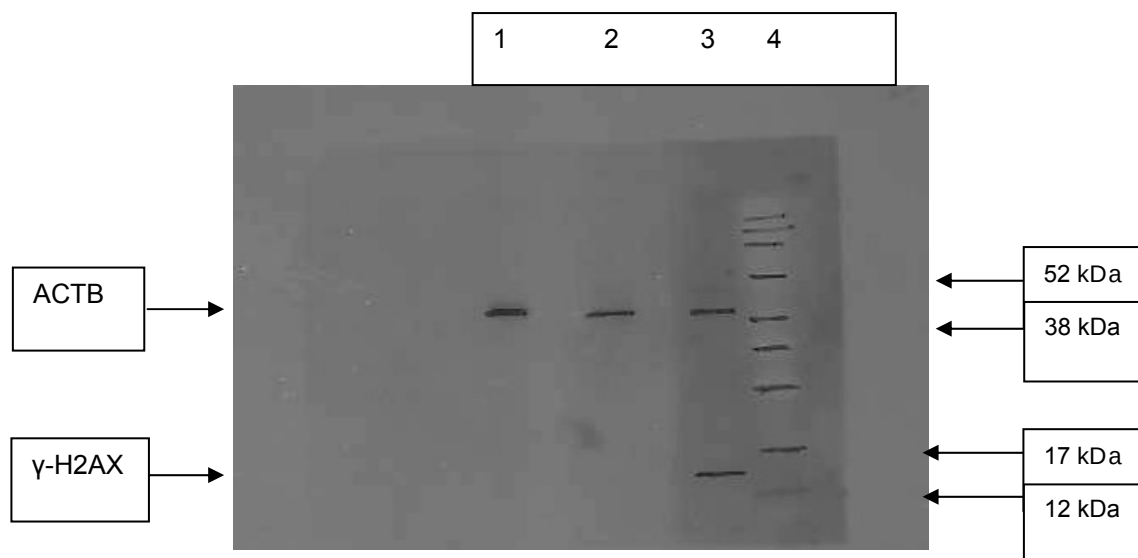
Figura 26 - Perfil da marcação de anti- γ -H2AX nas amostras de esôfago.

A Figura 26 mostra uma significativa diminuição na marcação de γ -H2AX nas amostras de adenocarcinoma de esôfago, quando comparadas com as amostras de esôfago normal.

Em resumo, as figuras acima mostram um aumento significativo da marcação de 8-OHdG e MDA nas amostras tumorais quando comparadas com as amostras metaplásicas. A marcação de γ -H2AX é significativamente maior nas metaplasias e tumores gástricos, quando comparada à marcação das amostras normais. Já os tumores de esôfago apresentaram menor marcação de γ -H2AX, quando comparados às amostras normais.

4.5 WESTERN BLOTTING

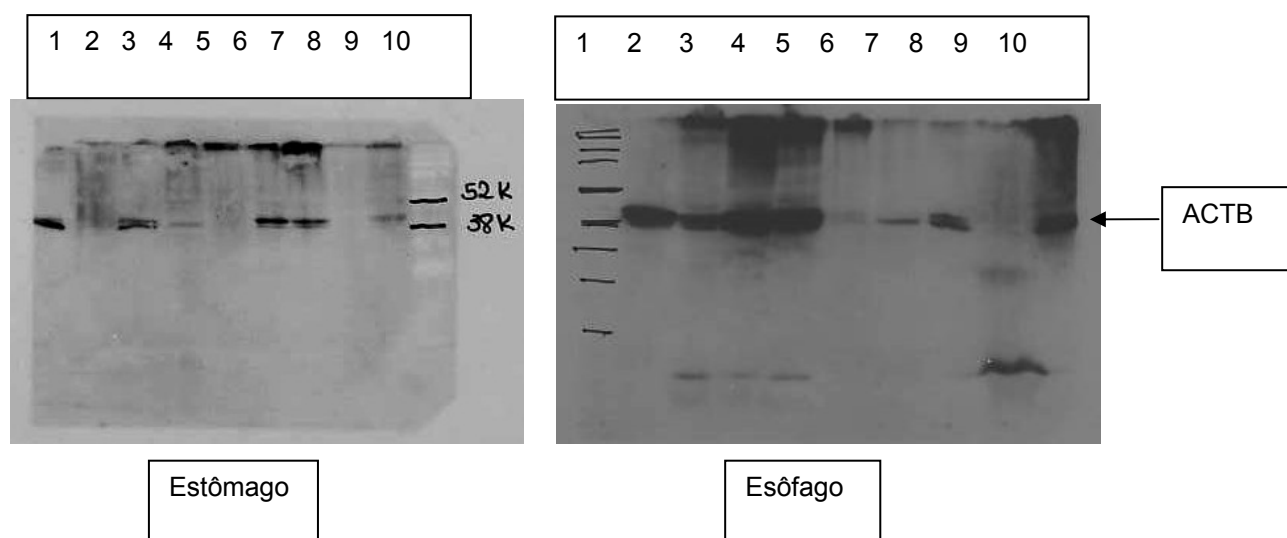
Para os experimentos de Western Blotting, foi utilizado o anticorpo anti- γ -H2AX NB100-384, da Novus Biologicals (MARTI et al. 2006). A Figura 27 mostra o resultado dos experimentos de titulação; uma vez que a banda referente à γ -H2AX (15kDa) foi detectada apenas na maior concentração de anticorpo, a concentração utilizada foi de 1:500.



Legenda: Foram fracionados 30µg de extrato protéico total de células HEK293 em gel SDS-PAGE nas concentrações 4-12%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e posteriormente incubadas com anticorpos anti-ACTB e anti- γ -H2AX. Após a revelação com ECL o filme foi exposto por duas horas. Canaletas 1-3: Anticorpo anti- γ -H2AX diluído 1:1500 (1), 1:1000 (2) e 1:500 (3). Canaleta 4: Marcador de peso molecular (Rainbow). Banda ACTB: 42kDa. Banda γ -H2AX: 15kDa.

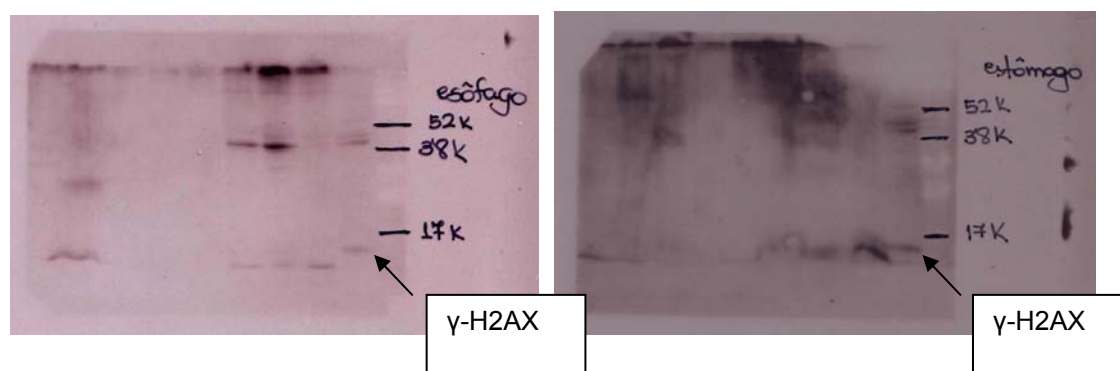
Figura 27 - Titulação do anticorpo anti- γ -H2AX em experimento de Western Blotting.

Após a determinação da melhor concentração do anticorpo, foram realizados os experimentos de WB com amostras de esôfago e estômago. Foram selecionadas três amostras normais, duas amostras de metaplasia e duas amostras de adenocarcinoma de cada órgão. A Figura 28 mostra a presença de ACTB, e a Figura 29 a de γ -H2AX.



Legenda: Foram fracionados 30µg de extrato protéico total de amostras de esôfago e estômago em gel SDS-PAGE nas concentrações 4-12%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e posteriormente incubadas com anticorpo anti-ACTB. Após a revelação com ECL o filme foi exposto por 5 minutos. Marcador de peso molecular: Rainbow. Amostras: 1-3 normais; 4-5: metaplasias; 6-8: adenocarcinomas. 9: controle positivo (HEK293).

Figura 28 - Experimento de WB para o anticorpo anti-ACTB.



Legenda: Foram fracionados 30µg de extrato protéico total de amostras de esôfago e estômago em gel SDS-PAGE nas concentrações 4-12%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas e posteriormente incubadas com anticorpo anti- γ-H2AX (após revelação do anticorpo anti-ACTB). Após a revelação com ECL o filme foi exposto por duas horas. Marcador de peso molecular: Rainbow. Amostras: 1-3 normais; 4-5: metaplasias; 6-8: adenocarcinomas. 9: controle positivo (HEK293).

Figura 29 - Experimento de WB para o anticorpo anti- γ-H2AX.

Como mostram as figuras, a ACTB pôde ser detectada em 5 de 9 amostras de estômago, e em 6 de 9 amostras de esôfago. A presença de γ -H2AX foi detectada somente no controle positivo.

Foram realizados experimentos de WB com o anticorpo anti-MDA; entretanto, como este anticorpo reconhece o aduto de MDA em diversas proteínas, o resultado das reações mostravam bandas de 4 a 5 tamanhos diferentes (dados não mostrados). Assim, não foi possível avaliar com precisão a especificidade dos resultados.

4.6 DOT BLOT

Foram realizados experimentos de Dot Blot com o anticorpo anti-8-OHdG para detecção das lesões diretamente no DNA celular. Entretanto, em nenhum dos experimentos de titulação foi possível detectar a presença de bandas nos slots contendo amostras de DNA (dados não mostrados). Além disso, houve a presença de bandas inespecíficas nos slots sem DNA, mesmo após o aumento do tempo de bloqueio. Assim, não foi possível utilizar os resultados destes experimentos. Vale lembrar que este experimento pode não ter funcionado uma vez que este anticorpo é específico para imunistoquímica, e não havia sido testado em outros tipos de experimentos.

5 DISCUSSÃO

5.1 O PROCESSO INFLAMATÓRIO E O DANO AO DNA

Há tempos existem evidências da correlação entre inflamação crônica e câncer, que seria a responsável pelo desenvolvimento de muitos tumores humanos, incluindo os que afetam o fígado, esôfago, estômago, intestino grosso e bexiga (COUSSENS et al. 2002). Estimativas mostram que 25% dos casos de câncer no mundo estão ligados à inflamação associada às infecções crônicas (COUSSENS e WERB 2002). Inflamações persistentes causam modificações nas células num esforço para restaurar a homeostase do tecido, o que, junto com danos ao DNA causados por carcinógenos ou espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas por leucócitos (como macrófagos ativados), pode eventualmente culminar em transformações celulares. Nesse processo, tanto a produção desregulada quanto a sinalização aberrante de citocinas podem levar a alterações no crescimento celular, diferenciação e apoptose (BALKWILL e COUSSENS 2004).

A ativação de NF- κ B é um evento importante que ocorre nas células em resposta a diversos estímulos, entre eles os processos inflamatórios. A ativação de NF- κ B pode ocorrer através de diversas vias de sinalização em resposta a citocinas, fatores de crescimento e receptores tirosina-quinases, como os receptores da família de EGF, IGF e TNF. Além disso, a ativação das vias de Ras/MAPK e PI3K-Akt também está envolvida na ativação de

NF- κ B. Após o estímulo de citocinas pró-inflamatórias, infecções virais ou sinalização de TNF, NF- κ B é ativado e translocado para o núcleo, onde funciona como fator de transcrição de diversos genes relacionados a proliferação, migração, apoptose, assim como respostas imunes e inflamatórias (DOLCET et al. 2005). A ativação de NF- κ B é um evento controlado por diversos mecanismos; em células normais, ele só é ativado após os estímulos apropriados. Após o término dos estímulos, os mecanismos regulatórios retornam o NF- κ B para o seu estado inativo. Entretanto, em células tumorais, diversas alterações que tornam a ativação de NF- κ B constitutiva já foram descritas.

Estudos demonstraram que a transcrição de NF- κ B está aumentada em mucosas gástricas de pacientes com infecção crônica por *Helicobacter pylori* (ISOMOTO et al. 2000; VAN DEN BRINK et al. 2000). A indução de NF- κ B leva à produção de diversos mediadores da resposta imune como interleucina 8 (IL-8) e MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1). Algumas cepas mais patogênicas de *Helicobacter pylori* (que contêm a ilha de patogenicidade *cagPAI* – *cag* Pathogenicity Island – um segmento de 40kb de DNA genômico, presente apenas em algumas cepas de *H. pylori*) (TERRY et al. 2005) que produzem uma proteína solúvel (*cagA*) capaz de iniciar a cascata de sinalização de NF- κ B se mostraram mais frequentemente associadas a infiltrações severas de polimorfoneutrófilos (PMN) nas mucosas gástricas, o que é consistente com o papel conhecido de IL-8 no recrutamento e ativação de PMN (FERRERO et al. 2008). As espécies reativas liberadas pelos fagócitos em locais de inflamação crônica,

como os radicais superóxido e hidroxil e o peróxido de hidrogênio, são prejudiciais à integridade dos tecidos e estão ligados à patogênese de diversas doenças. Além de causar danos nas membranas e proteínas celulares, o dano ao DNA causado pelas espécies reativas modifica, entre outras funções, o processo de replicação celular. Esses danos podem ser os principais responsáveis pelo desenvolvimento de tumores em locais com inflamação crônica (OLYAEE et al. 1995; WETSCHER et al. 1995). Diversos estudos encontraram níveis elevados de espécies reativas de oxigênio ou adutos (derivados da peroxidação de lipídeos) no DNA em mucosas de Esôfago de Barrett e em adenocarcinomas de esôfago, assim como em outros tumores, como mama, cólon, pâncreas e estômago (SIHVO et al. 2002). Deste modo, conclui-se que as espécies reativas de oxigênio têm um papel importante na carcinogênese por causar danos oxidativos ao DNA.

Apesar do dano no DNA ser uma consequência da produção de espécies reativas, outras moléculas celulares, como RNA, lipídeos e proteínas, também são afetadas pelos radicais livres e o efeito desses danos também é importante para a tumorigênese (KENSLEER e TAFPE 1986). Danos causados por stress oxidativo também foram encontrados em níveis elevados em outras doenças, como diabetes, distrofia muscular, artrite reumatóide, doenças cardiovasculares e doenças degenerativas do sistema nervoso (EVANS et al. 2004).

Mutações em genes relacionados ao câncer, assim como modificações pós-traducionais pelas espécies reativas ou produtos da peroxidação de lipídeos (LPO), como o malondialdeído (MDA) ou o 4-

hidroxinonenal (4-HNE), são alguns dos eventos que podem contribuir para a carcinogênese (BARTSCH e NAIR 2004). Além disso, as espécies reativas podem modular o crescimento celular através da ativação de diversas vias de sinalização que aumentam a transcrição de proto-oncogenes como c-FOS, c-JUN e c-MYC (HUSSAIN et al. 2003).

Diversos estudos encontraram níveis elevados de determinadas enzimas de resposta a stress (iNOS, XO, LOX e COX-2) que levam a uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e adutos de eteno. Estes dados foram obtidos tanto em experimentos com modelos animais (NAIR et al. 1998) como em pólipos de pacientes com polipose adenomatosa familiar (NAIR et al. 2000). O aumento da expressão dessas enzimas está constantemente associado com locais inflamados e em lesões pré-neoplásicas, onde ocorre posterior surgimento de um tumor (como, por exemplo, nos epitélios esofágicos ou gástricos que sofrem de lesões crônicas por causa da DRGE ou da infecção por *Helicobacter pylori*). As conseqüências dessa superexpressão não levam somente a um aumento nos estímulos para o surgimento de malignidades, mas também é um mecanismo de auto-perpetuação da superprodução de danos no DNA causados pela LPO. Ensaios pré-clínicos mostraram que inibidores de COX-2 e LOX causaram diminuição na proliferação celular (DING et al. 1999) e indução de apoptose (ANDERSON et al. 1998), e teriam efeitos protetores contra tumores de cólon, mama, pulmão, boca e esôfago (DANG et al. 2002).

Os primeiros estudos com modelos animais que mostraram o envolvimento da inflamação crônica na carcinogênese foram publicados nos anos 40. Desde então, diversos modelos animais para indução de inflamação crônica foram desenvolvidos, e em muitos deles ocorre o surgimento de tumores após um período de inflamação contínua. Dentre esses modelos, estão o de indução de Esôfago de Barrett e câncer de esôfago em camundongos com anastomose da junção gastroesofágica com o duodeno (que leva ao refluxo constante de conteúdo duodenal para o esôfago) (GOLDSTEIN et al. 1997), e o de infecção crônica de camundongos por *Helicobacter pylori* que leva à gastrite atrófica e ao adenocarcinoma gástrico (LEE 1999). OHNISHI et al. (2007) desenvolveram camundongos transgênicos que expressam CagA tanto na mucosa gástrica como de forma sistêmica; CagA é capaz de induzir a proliferação de células do epitélio gástrico e do sistema hematopoiético, assim como leva ao surgimento de carcinomas gastrointestinais e leucemias/linfomas. Os autores concluíram que CagA é a primeira oncoproteína bacteriana com ação em mamíferos já descrita.

Danos causados pelo stress oxidativo, como a peroxidação de lipídeos e a oxidação de proteínas e DNA, estão associados à inflamação crônica e ao processo de transformação que ocorre tanto nesses modelos animais quanto nos pacientes portadores de metaplasias intestinais (CHEN et al. 2000). LEE et al. (2001) também demonstraram que o tratamento com antioxidantes aumenta os níveis de glutathione reduzida (GSH) e diminui os

de malondialdeído, assim como causa uma diminuição na ativação da via de NF- κ B.

5.2 ENZIMAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DE GLICEROLIPÍDEOS

Os resultados obtidos neste trabalho mostram um aumento significativo na expressão dos genes codificadores de enzimas relacionadas ao metabolismo de glicerolipídeos nas amostras metaplásicas quando comparadas com as amostras normais; estas mesmas enzimas têm sua expressão diminuída nas amostras de adenocarcinomas do esôfago e estômago. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por GOMES (2005) em sua tese de doutorado, que utilizou a metodologia de *cDNA microarray* e foram validados por nós, através de PCR Real-Time, em amostras independentes. Neste trabalho, com o maior número de amostras e de genes normalizadores, os resultados são ainda mais robustos. Além disso, as amostras independentes foram utilizadas para que pudéssemos quantificar os danos celulares (através de Western Blotting) e a expressão do mRNA destas enzimas (através de PCR Real Time) nas mesmas amostras.

É possível que a análise de expressão destas enzimas possa ser capaz de detectar, dentro do grupo de pacientes portadores de metaplasias, aqueles pacientes que apresentem menor expressão destes genes. Estes pacientes fariam parte de um grupo com maior risco de malignização, uma

vez que a menor expressão destas enzimas está associada a maiores níveis de danos ao DNA e outras biomoléculas, por sua vez ligados maiores chances de transformação. Assim, seria possível fazer um acompanhamento mais cuidadoso deste grupo de pacientes.

5.2.1 ADH1B

A holoenzima ADH é um homo ou heterodímero que consiste de uma combinação das subunidades α , β e γ , cada uma codificada por um locus diferente (ADH1, ADH2 e ADH3). O ADH2 (atual ADH1B) é polimórfico e seu alelo mutante ADH2*2 (Arg47His) é o mais prevalente, estando presente em mais de 90% da população asiática e em menos de 20% das populações africanas e caucasianas. Esse alelo codifica para uma enzima com uma V_{max} 40 vezes maior que a forma menos ativa (ADH2*1/2*1) (HASHIBE et al. 2006); alguns estudos encontraram um efeito protetor contra o alcoolismo desse genótipo em certas populações (NEUMARK et al. 1998; WHITFIELD et al. 1998), assim como as formas inativas de ALDH2 (uma vez que os indivíduos portadores destes genótipos experimentam reações desagradáveis mesmo com pequenas quantidades de etanol, o que as leva a consumir menos bebidas alcoólicas). O homodímero ADH3 codificado pelo alelo ADH3*1 produz acetaldeído duas vezes mais rápido que a enzima codificada pelo alelo ADH3*2. Por causa da proximidade entre os loci gênicos de ADH2 e ADH3 no genoma humano, o polimorfismo do gene ADH2 está em desequilíbrio de *linkage* com o polimorfismo do gene ADH3, de modo que os dois alelos menos ativos (ADH2*1 e ADH3*2) segregam

juntos (OSIER et al. 1999). Ambos os alelos foram descritos como fatores de risco para alcoolismo em populações asiáticas (THOMASSON et al. 1991; HIGUCHI 1994), e o genótipo ADH2*1/2*1 independentemente aumenta o risco de tumores esofágicos segundo diversos estudos (YOKOYAMA et al. 1999; CHAO et al. 2000). Outros estudos mostraram a associação entre alguns genótipos de ADH e risco aumentado para desenvolvimento de diferentes tumores de cabeça e pescoço, associados ao consumo de álcool (ASAKAGE et al. 2007; DRUESNE-PECOLLO et al. 2009), enquanto outras variantes parecem ter um efeito protetor (HASHIBE et al. 2008).

Os dados obtidos por estes trabalhos demonstram a importância desta enzima no metabolismo do etanol, uma vez que os genótipos que levam à codificação de enzimas inativas ou com baixa atividade estão diretamente associados ao risco de desenvolvimento de tumores. Nossos dados mostraram uma diminuição significativa na expressão de mRNA do gene ADH1B; esta diminuição pode estar ligada à um maior risco dos pacientes com metaplasias intestinais para desenvolver adenocarcinomas de estômago e esôfago, uma vez que as células destes pacientes estariam por mais tempo em contato com maiores quantidades de etanol e/ou outras substâncias mutagênicas metabolizadas por esta enzima.

5.2.2 ALDH3A2

ALDH é uma família de isoenzimas envolvidas no metabolismo de aldeídos exógenos e/ou endógenos formados, entre outros mecanismos, da peroxidação de lipídeos. A enzima ALDH3A2 catalisa a oxidação de aldeídos

alifáticos de cadeia longa para ácidos graxos. Mutações no gene que codifica essa enzima, levando, na maioria das vezes, à síntese de proteínas com pouca ou nenhuma atividade catalítica, causam a Síndrome de Sjorgren-Larsson. Os pacientes afetados apresentam ictiose, retardo mental e diplegia espástica. Acredita-se que estes sintomas sejam causados por acúmulo anormal de lipídeos nas membranas das células cutâneas e nervosas, formação de adutos entre aldeídos e proteínas e defeitos no metabolismo de eicosanóides (RIZZO 2007).

A associação entre enzimas relacionadas ao metabolismo de glicerolipídeos e câncer já foi sugerida, mas evidências diretas ainda não foram encontradas (BROOKS e THERUVATHU 2005). MATSUDA et al. (2006) estudaram a relação entre o genótipo de ALDH2 (o genótipo ALDH2*1/2*1 codifica a enzima ativa, enquanto o ALDH2*1/2*2 codifica uma enzima inativa) e a formação de adutos no DNA derivados da interação com acetaldeído em pacientes etilistas, e encontraram dois (N^2 -Et-dG e α -Me- γ -OH-PdG) dos três tipos de adutos estudados. O grupo concluiu que o genótipo de ALDH2 pode afetar o risco de surgimento de tumores malignos ligados à exposição ao acetaldeído em humanos: os pacientes portadores do alelo ALDH2*1/2*2 apresentaram maiores níveis de adutos no DNA do que os portadores do alelo ALDH2*1/2*1. YOKOYAMA e OMORI (2003) realizaram diversos estudos em populações japonesas e chinesas e verificaram que o genótipo ALDH2*1/2*2 é um forte fator de risco para o desenvolvimento de tumores de esôfago, além de associações entre outros alelos inativos de ALDH2 com diversos tumores de cabeça e pescoço. Essa

mesma associação foi encontrada em populações europeias (HASHIBE et al. 2006).

Mais recentemente, modelos animais utilizando camundongos deficientes para ALDH2 mostraram um aumento na formação de adutos derivados do etanol (MATSUDA et al. 2007); neste mesmo modelo, OGAWA et al. (2006) encontraram níveis elevados de 8-OHdG na urina e de MDA no plasma de camundongos expostos a acetaldeído. Esses estudos demonstram a importância destas enzimas na proteção celular contra aldeídos tóxicos, uma vez que sua deficiência leva a níveis aumentados de danos celulares; entretanto, os autores não estudaram se estes animais apresentam maior propensão ao surgimento de tumores. BAEK et al. (2002) encontraram níveis aumentados de ALDH2 em mucosas infectadas por *H. pylori*, e concluíram que o stress oxidativo causado pela infecção poderia induzir a expressão de enzimas que detoxificam os aldeídos derivados da LPO, como um mecanismo de defesa da mucosa gástrica.

Os resultados destes trabalhos indicam uma ligação importante entre a enzima ALDH e a tumorigênese, uma vez que seus genótipos que codificam enzimas com pouca ou nenhuma atividade estão associados ao risco elevado de desenvolvimento de tumores. Além disso, os trabalhos que encontraram níveis elevados de danos celulares em camundongos deficientes para ALDH2 corroboram os nossos dados. Desta forma, assim como os outros genes relacionados ao metabolismo de glicerolípídeos, a diminuição do mRNA do gene ALDH3A2 pode estar relacionada à maiores quantidades de danos celulares nas mucosas metaplásicas de alguns

pacientes, que poderiam apresentar risco aumentado para desenvolvimento de adenocarcinomas de estômago e esôfago quando comparados aos pacientes com níveis normais destas enzimas.

5.2.3 AKR1B10

O gene AKR1B10 codifica uma proteína membro da superfamília das aldo/ceto redutases, que contêm mais de 40 enzimas e proteínas já descritas. A enzima AKR1B10 reduz aldeídos alifáticos e aromáticos, e é expressa nas glândulas adrenais, intestino delgado e cólon. AKR1B10 tem expressão aumentada em tumores de fígado e em outros carcinomas associados ao fumo, além de ser um biomarcador de câncer de pulmão de não pequenas células (BALENDIRAN et al. 2009). MARTIN e MASER (2009) comprovaram que a enzima AKR1B10 catalisa a redução do aldeído insaturado 4-HNE e seus derivados, 4-ONE e 4-MP. Assim, esta enzima tem um papel importante na detoxicação de aldeídos biogênicos.

Estudos demonstraram que a diminuição da expressão de AKR1B10 em linhagens celulares afeta a proliferação celular e a susceptibilidade a aldeídos reativos como acroleína e crotonaldeído (YAN et al. 2007). Além disso, esta enzima está ligada ao metabolismo do ácido retinóico, uma molécula sinalizadora que regula a proliferação e diferenciação celulares (LIU et al. 2009).

Assim como os outros genes relacionados ao metabolismo de glicerolípides, nossos resultados mostraram uma diminuição significativa da expressão de mRNA de AKR1B10 em amostras de adenocarcinomas,

quando comparada ao restante das amostras. Uma vez que esta enzima está envolvida na detoxificação de aldeídos reativos, sua diminuição em mucosas metaplásicas pode estar envolvida com o maior risco de tumorigênese por tornar as células mais susceptíveis aos efeitos mutagênicos destes aldeídos, que em células normais seriam metabolizados por esta enzima.

5.3 DANOS OXIDATIVOS NO DNA

5.3.1 MDA

A peroxidação de lipídeos gera uma grande variedade de produtos, muitos deles reativos. Alguns desses produtos podem reagir com DNA e proteínas, e por isso têm atividades tóxicas e mutagênicas (MARNETT 1999). Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) contêm um ou mais grupos metil posicionados entre ligações duplas; esses grupos metil são facilmente atacados por agentes oxidantes, perdendo seus átomos de hidrogênio e levando à formação de radicais centrados no carbono. Esses radicais reagem com o oxigênio formando radicais peroxil, que são o primeiro produto da LPO. Os radicais peroxil, por sua vez, podem ser reduzidos a hidroperóxidos que, na presença de determinados metais, reduzem os hidroperóxidos a radicais alcóxil, que dão origem a diferentes produtos, dependendo da molécula com a qual o $RO^{\bullet}$ interage; entre estes produtos estão os radicais centrados no carbono (formados após a abstração de $H^{\bullet}$ de moléculas como lipídeos das membranas celulares), ou o oxigênio singlete

($^1\text{O}_2$), formado a partir da reação de dois radicais alcóxil (mecanismo de Russell) (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2007a).

Se outra molécula de PUFA reagir com um radical centrado no carbono, tem início uma nova série de reações em cadeia, o que propaga a LPO. Nos sistemas biológicos a vitamina E controla a velocidade e a extensão dessas reações, através da redução dos radicais peróxil. Dentre os muitos produtos destas reações estão compostos carbonílicos como o hexanal, o 4-hidroxinonenal e outros aldeídos e cetonas insaturados. Muitos destes compostos reagem com proteínas e DNA; dentre eles, o MDA parece ser o mais mutagênico, e o 4-HNE o mais tóxico (MARNETT 1999).

Os aldeídos têm grande afinidade por diversas biomoléculas como proteínas, DNA e fosfolípidos, gerando uma variedade de adutos covalentes tóxicos dentro e fora das células (BLAIR 2001), além de afetar e modular, mesmo em concentrações muito baixas, várias funções celulares como transdução de sinais, expressão gênica e proliferação celular (UCHIDA 2003). Os maiores alvos da LPO são as membranas celulares, através do ataque direto das ROS aos ácidos linoléico e araquidônico ou do catabolismo de hidroxiperoxídeos como o malondialdeído (MDA), que também pode formar adutos no DNA (MARNETT 2000).

O MDA é um dialdeído de 3 carbonos altamente reativo, formado a partir da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados e do metabolismo do ácido araquidônico. O primeiro indício que o MDA pode ser carcinogênico foi publicado em 1974 (SHAMBERGER et al. 1974); os camundongos que receberam aplicações tópicas de MDA desenvolveram tumores rapidamente.

O MDA reage com ácidos nucleicos formando diversos adutos; os principais são a pirimido [1,2- α] purina-10 (3H)-1 (M_1G) e N^6 -(3-oxo-propenil)desoxiadenosina (M_1A). O potencial mutagênico do MDA está ligado à indução de transversões (G $\rightarrow$ T), transições (C $\rightarrow$ T e A $\rightarrow$ G), assim como mudanças no quadro de leitura principalmente por adição de bases adjacentes aos adutos. Estudos em *E. coli* mostraram que os adutos de MDA são reparados através do Reparo por Excisão de Nucleotídeos (FINK et al. 1997). As proteínas modificadas pelo MDA também apresentam alterações nas suas interações físico-químicas com outras moléculas, fenômeno que também está implicado na mutagênese e em diversas doenças como nefropatias e Alzheimer (OGAWA et al. 2006).

Os resultados obtidos através de ensaios de imunohistoquímica (IHQ) usando um anticorpo anti-MDA mostraram que as amostras de adenocarcinoma de estômago e esôfago apresentaram maior quantidade de adutos de MDA quando comparadas com as amostras normais e metaplásicas (pValor teste de Kruskal-Wallis: <0,0001). GIJSSEL et al. (2004) encontraram altas taxas de adutos formados por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) através de IHQ em biópsias de esôfago de moradores de Linxian, na China, uma das regiões com as mais altas taxas de incidência e mortalidade por câncer de esôfago no mundo. VEGLIA et al. (2003) publicaram uma meta-análise de 7 artigos que estudaram a presença de adutos de PAHs no DNA de 691 pacientes com tumores de pulmão, boca e bexiga, entre fumantes e não fumantes. Seus resultados indicaram que fumantes apresentaram níveis mais elevados de adutos, assim como um

risco aumentado de desenvolvimento de câncer de pulmão e bexiga. A presença de adutos no DNA também já foi associada a um risco aumentado de desenvolvimento de hepatocarcinoma associado à exposição a aflatoxina, advinda principalmente do consumo de amendoim (ROSS et al. 1992); este foi o primeiro estudo que demonstrou a associação entre a formação de adutos no DNA e risco de câncer (POIRIER 1997). Adutos exocíclicos de eteno foram encontrados em maiores quantidades em pacientes com hemocromatose primária, pancreatite crônica, doença de Crohn, colite ulcerativa e polipose adenomatosa familiar, todas representando condições onde há stress oxidativo persistente e grande risco de malignização (NAIR et al. 2007).

ERBIL et al. (2005), utilizando modelos refluxo em camundongos, detectaram níveis aumentados de danos oxidativos no DNA de linfócitos, assim como maiores quantidades de MDA no soro de camundongos expostos ao conteúdo de refluxos (gástrico, biliar e misto) quando comparados com os animais controle. EVERETT et al. (2001) compararam a presença de MDA e seu principal aduto no DNA (M_1G) em mucosas de pacientes com gastrite associada ao *H. pylori* em comparação com mucosas normais; os níveis de MDA e M_1G foram maiores nas mucosas infectadas por *H. pylori* em comparação com as mucosas normais. Assim, o acúmulo de MDA na mucosa gástrica infectada por *H. pylori* não só é uma evidência de stress oxidativo e LPO, mas também pode ter um papel carcinogênico.

Todos estes resultados indicam que o malondialdeído, assim como outros adutos, têm um papel importante na carcinogênese de diversos

tumores. Sua maior produção durante os processos inflamatórios e/ou situações de stress oxidativo, como os que ocorrem com a infecção por *H. pylori*, assim como às mucosas que estão expostas ao conteúdo de refluxos, indica que as células dos pacientes infectados estão sofrendo stress oxidativo, o que está ligado a um risco aumentado de desenvolvimento de tumores. Estes dados corroboram os nossos resultados que indicam uma maior presença de danos celulares relacionados à peroxidação de lipídeos, como resultado do stress oxidativo, nas mucosas tumorais de estômago e esôfago.

5.3.2 8-OHdG

As espécies reativas estão envolvidas na carcinogênese tanto diretamente, pelos danos causados ao DNA e outras moléculas, como indiretamente, modulando diversas vias de transdução de sinal, proliferação celular, senescência e morte celular. As principais espécies reativas que interagem e danificam o DNA e proteínas são o radical hidroxil ($\text{OH}^{\bullet}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

O stress oxidativo causa diversas conseqüências às células, variando conforme o grau e a duração do stress oxidativo. Os principais danos celulares causados pelo stress oxidativo são os danos à estrutura do DNA (incluindo o mitocondrial), às proteínas e às membranas celulares. A peroxidação de lipídeos leva à diminuição da fluidez da membrana, ao aumento da sua permeabilidade e à danificação de proteínas integrais das membranas, como enzimas, receptores e canais iônicos. Além das

membranas externas, as membranas do retículo endoplasmático e do Complexo de Golgi também podem ser danificadas, alterando a capacidade das células de sintetizar e exportar proteínas. Podem ocorrer danos também nos componentes mitocondriais, como em suas enzimas da matriz e componentes da cadeia de transporte de elétrons (VICTOR et al. 2005), além do DNA mitocondrial.

Dentre as principais reações que podem ocorrer em resposta a uma situação de stress oxidativo estão a proliferação e a adaptação (como aumento das defesas antioxidantes); se o stress for persistente, a injúria celular pode levar à parada na proliferação pela ativação de proteínas como p53, para que os mecanismos de reparo entrem em ação. Dessa forma, se os danos celulares forem muitos, as células normais tendem a entrar em senescência. Como se pode esperar pela alta reatividade do radical hidroxil, sua reação de adição à purinas e pirimidinas resulta em diferentes compostos, dependendo da base atacada e da presença de íons metálicos. Riboses e desoxiriboses também podem ser atacadas pelo $\text{OH}^\bullet$, gerando diversos radicais centrados no carbono que, na presença de O_2 , podem ser rapidamente convertidos em radicais peroxil ($\text{RO}_2^\bullet$). Além das reações com os ácidos nucleicos, o $\text{OH}^\bullet$ também pode reagir com proteínas nucleares; os radicais derivados das proteínas podem formar cross-links com o DNA que interferem no reparo do DNA, na condensação da cromatina, replicação e transcrição (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2007b). A reação de H_2O_2 com o DNA leva à formação de quebras na fita dupla, além de diversas bases modificadas; as moléculas de RNA também podem ser oxidadas. Entretanto,

o H_2O_2 não reage diretamente com os ácidos nucleicos; seu potencial oxidativo se deve à capacidade de produzir radicais altamente reativos (como o $\text{OH}^\bullet$) através da reação de Fenton, quando entra em contato com os íons metálicos próximos ao DNA. Outras espécies reativas, como o oxigênio singlete e os radicais carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), peroxil ($\text{RO}_2^\bullet$) e alcóxil ($\text{RO}^\bullet$), também podem interagir com o DNA, formando principalmente 8-OHdG.

O 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) é um dos marcadores mais utilizados para avaliação de danos oxidativos (TOYOKUNI et al. 1997; MUSARRAT e WANI 1994). Essa base modificada apresenta uma forma tautomérica denominada 8-oxo-7-hidro-2'-desoxiguanosina, ou 8-oxodG. O 8-OHdG pode ser formado por diversas espécies reativas ($\text{OH}^\bullet$, $\text{CO}_3^{\bullet-}$, $\text{RO}_2^\bullet$); uma indicação do seu grande potencial mutagênico é o grande número de mecanismos envolvidos em seu reparo, tanto antes do nucleotídeo ser incorporado como após sua incorporação no DNA. Sua presença pode levar a diversos tipos de mutação, sendo as mais importantes as transversões GC→TA (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2007b).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram um aumento significativo na marcação de 8-OHdG nas amostras tumorais em relação às metaplásicas, assim como uma marcação significativamente menor nas amostras normais, tanto no esôfago quanto no estômago (pValor do teste de Kruskal-Wallis: $< 0,0001$). Estudos usando metodologias diferentes encontraram níveis aumentados de 8-OHdG em mucosas de gastrite atrófica e metaplasia associadas à infecção por *H. pylori* (BAIK et al. 1996; FARINATI et al. 1998), assim como na urina de pacientes infectados por

esta bactéria (WITHERELL et al. 1998), quando comparados com pacientes normais. OLLIVER et al. (2005) encontraram níveis aumentados de 8-OHdG em mucosas de pacientes com Esôfago de Barrett comparados com mucosas normais; além disso, os pacientes do maior percentil de dano apresentaram risco aumentado de desenvolvimento de displasia de alto grau e adenocarcinoma do esôfago, quando comparados com os pacientes do menor percentil de dano. CHANG et al. (2004) encontraram níveis aumentados de 8-OHdG em tecidos tumorais de estômago, comparando com os tecidos normais adjacentes. Os níveis de 8-OHdG, assim como de iNOS e NF- κ B, estavam diretamente relacionados com o grau de infecção por *H. pylori*, assim como ao grau de severidade da doença.

Associada à presença de *H. pylori* foram encontradas expressões alteradas de p53 e c-myc (NARDONE et al. 1999). Um estudo demonstrou mudanças proteômicas induzidas pela infecção por *H. pylori*: aumento em proteínas envolvidas na proteção contra o stress oxidativo como a chaperona GRP78, ALDH2 e LDH, e diminuição de GST, Hsp60 e CK8 (BAEK et al. 2004). OLLIVER et al. (2002) encontraram maior quantidade de quebras no DNA em mucosas de Barrett quando comparadas às mucosas pareadas normais.

Assim, a inflamação crônica associada à infecção por *H. pylori* está diretamente envolvida na carcinogênese gástrica através da produção em excesso de diversas espécies reativas, que podem causar danos mutagênicos e potencialmente carcinogênicos ao DNA, além de alterar a

expressão de proteínas importantes nos processos de proliferação, reparo e defesa celulares.

5.3.3 γ -H2AX

Os resultados deste trabalho mostraram que a marcação de γ -H2AX é significativamente maior em amostras metaplásicas e tumorais do estômago, quando comparadas com as amostras normais (pValor teste de Kruskal-Wallis: $< 0,0004$); as amostras tumorais de esôfago, entretanto, apresentaram significativamente menor marcação do que as amostras normais (pValor teste de Kruskal-Wallis: $< 0,0001$). A histona H2AX é um membro evolutivamente conservado da família de histonas H2A. Em resposta a danos ao DNA (principalmente quebras na fita dupla) ela é rapidamente fosforilada no resíduo Ser139 da porção C-terminal dando origem à forma λ -H2AX, apenas 1 a 3 minutos após a formação dos danos (KINNER et al. 2008). A fosforilação dessa histona, feita pelas quinases ATM, ATR e outras DNA-PKcs é importante para a coordenação das atividades de sinalização e reparo da célula, pois cria sítios de alta afinidade para proteínas sinalizadoras de dano e reparo ao DNA (como o complexo MRN, BRCA1, 53BP1 Chk2), necessárias tanto para impedir a progressão do ciclo celular até que o dano seja reparado quanto na sinalização para o início da apoptose em células muito danificadas (por exemplo, com muitos danos no DNA)(WEST e ATTIKUM 2006).

O gene que codifica a histona H2AX, H2AFX, encontra-se na posição 11q23, uma região que está freqüentemente mutada ou deletada em vários

tumores, como os hematopoiéticos e de cabeça e pescoço (BONNER et al. 2008). Camundongos knock-out para H2AFX sobrevivem bem em condições normais, porém sob stress não conseguem reparar lesões como quebras na fita dupla (DSBs), o que leva a anomalias cromossômicas (BASSING et al. 2002). Estes camundongos não apresentam maiores taxas de desenvolvimento de tumores do que os camundongos selvagens; porém, na ausência de p53, há maior desenvolvimento de câncer (CELESTE et al. 2003). ZHANG et al. (2009) encontraram uma correlação direta entre stress oxidativo (induzido por tratamento com H₂O₂), recrutamento de Chk2 e fosforilação de H2AX (ZHAO et al. 2008). TANAKA et al. (2006) revisaram diversos estudos e concluíram que medidas da ativação de ATM e fosforilação de H2AX podem ser usadas para estimar a extensão do dano oxidativo ao DNA, assim como para medir potenciais efeitos protetores de agentes antioxidantes.

SENTANI et al. (2008) estudaram a expressão de γ -H2AX em ensaios de imunoistoquímica em amostras de pacientes que desenvolveram tumores gástricos após exposição à radiação pela bomba atômica; seu estudo demonstrou que maiores marcações de γ -H2AX estavam correlacionadas com a progressão tumoral nos pacientes expostos à radiação. Um estudo demonstrou a presença de γ -H2AX e DSBs em cultura de células de Esôfago de Barrett e adenocarcinoma de esôfago em resposta a stress induzido por NO e pH ácido (CLEMONS et al. 2007).

Assim, a presença de γ -H2AX pode ser correlacionada com o stress oxidativo ao qual as células das mucosas esofágicas e gástricas estão

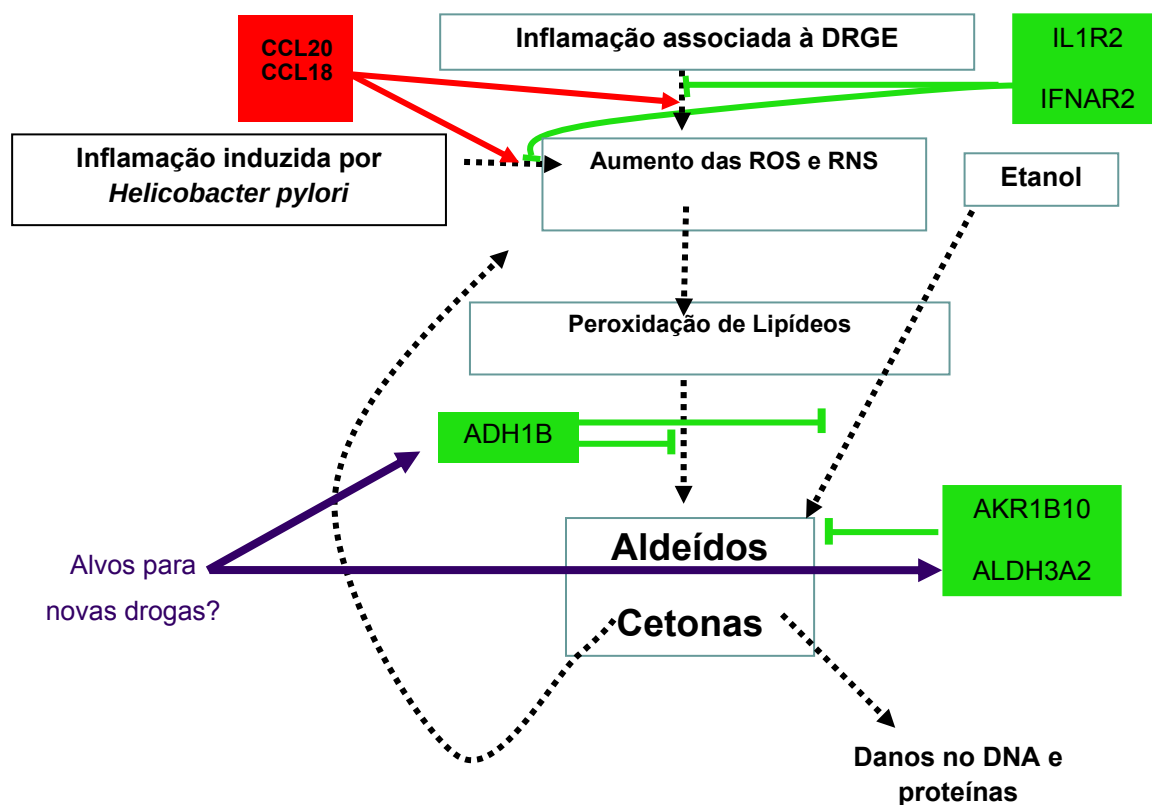
sujeitas, tanto pelo conteúdo do refluxo quanto pela infecção por *H. pylori*. Nossos dados mostram que de fato as células metaplásicas e tumorais de estômago sofrem mais danos do que as células normais, que não estão expostas a condições de stress. Entretanto, não se pode afirmar que as células que percebem o dano, através da fosforilação de H2AX, estejam de fato reparando estes danos; alterações nas proteínas que interagem, direta ou indiretamente com H2AX, como ATM ou p53, podem impedir a sinalização correta da percepção do dano, parada do ciclo celular ou apoptose.

Uma explicação para a significativa diminuição da marcação de γ -H2AX nas amostras de adenocarcinomas de esôfago pode estar correlacionada à diminuição da expressão de ATM em amostras de adenoarcinoma esofágico, quando comparadas com amostras de esôfago normais. Estes dados foram obtidos anteriormente no laboratório através de experimentos de Q-RT-PCR e imunoistoquímica. Assim, a diminuição da expressão de ATM pode estar correlacionada com a diminuição de γ -H2AX, uma vez que ATM é a principal quinase responsável pela fosforilação de H2AX em foci de danos ao DNA.

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE DANO AO DNA E A EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE GLICEROLIPÍDEOS

Avaliando o perfil de expressão dos 4 genes relacionados ao metabolismo de glicerolipídeos com a presença dos marcadores de danos, percebe-se uma associação negativa entre os níveis de expressão das enzimas e a presença de danos. Em geral, nas amostras normais e metaplásicas há maior expressão das enzimas do que nas amostras de adenocarcinomas de estômago e esôfago; o contrário ocorre com os marcadores de dano, que estavam presentes em maior quantidade nas amostras tumorais, quando comparadas com as amostras normais. Assim, podemos supor que estas enzimas tenham um papel importante na carcinogênese dos adenocarcinomas do esôfago e do estômago. Um maior entendimento sobre este processo pode levar a uma melhora no diagnóstico dos pacientes portadores das metaplasias com maior risco de malignização para um acompanhamento mais cuidadoso da doença, uma vez que o diagnóstico precoce pode melhorar as chances de cura destes pacientes. Além disso, estas enzimas podem ser estudadas como possíveis alvos terapêuticos para os tumores gastroesofágicos (Figura 30).

Interface entre os metabolismos de citocinas e glicerolipídeos



Legenda: A inflamação crônica causada pela DRGE e pela infecção por *H. pylori* leva a um processo contínuo de reparo tecidual e proliferação celular, assim como a um grande aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, causando uma situação constante de stress oxidativo nas células. Esse stress leva à peroxidação de lipídios e ao desencadeamento da cascata do ácido araquidônico. Os produtos finais desses processos levam à formação de substâncias que estimulam a proliferação celular, assim como a produtos finais da peroxidação de lipídios que causam danos no DNA (aldeídos e cetonas, entre outros). Além de danos no DNA, esses produtos podem danificar proteínas celulares, o que também contribui para a carcinogênese.

Figura 30 - Interface entre os metabolismos de citocinas e glicerolipídeos.

6 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

- 1 As amostras de adenocarcinomas do estômago e esôfago apresentaram menor expressão dos genes ADH1B, AKR1B10, ALDH3A2 e CDS1, relacionados ao metabolismo de glicerolípídeos, quando comparados às amostras normais, inflamadas e metaplásicas, corroborando os resultados obtidos pelos estudos anteriores.
- 2 O marcador de danos oxidativos no DNA, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), apresentou maior marcação nas amostras de adenocarcinomas do estômago e esôfago, em comparação com as amostras representando tecidos normais, mucosas inflamadas e metaplasias .
- 3 O marcador de danos celulares causados por adutos químicos, malondialdeído (MDA), também apresentou maior marcação nas amostras de adenocarcinomas de estômago e esôfago, quando comparada às amostras normais, inflamadas e metaplasias.
- 4 O marcador indireto de danos no DNA, histona fosforilada (γ -H2AX), se mostrou aumentado nas amostras inflamadas, metaplásicas e tumorais, em comparação com as amostras normais de estômago. Nas amostras de esôfago, a marcação foi menor nas amostras de adenocarcinoma, em comparação com as amostras normais.

- 5 Existe uma associação negativa entre os níveis de mRNA dos genes ADH1B, AKR1B10, ALDH3A2 e CDS1 e a presença de danos celulares indicados pelos marcadores 8-OHdG, MDA e γ -H2AX.

CONCLUSÃO: Os resultados obtidos neste trabalho indicam a importância dos genes relacionados ao metabolismo de glicerolípídeos na carcinogênese dos adenocarcinomas do esôfago e estômago, uma vez que a diminuição da expressão está relacionada a maiores quantidades de danos celulares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson KM, Seed T, Meng J, Ou D, Alrefai WA, Harris JE. Five-lipoxygenase inhibitors reduce Panc-1 survival: the mode of cell death and synergism of MK886 with gamma linoleic acid. **Anticancer Res** 1998; 18:791-800.

Asakage T, Yokoyama A, Haneda T, et al. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases, and drinking, smoking and diet in Japanese men with oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis** 2007; 28:865-74.

Baek HY, Lim JW, Kim H, et al. Oxidative-stress-related proteome changes in *Helicobacter pylori* infected human gastric mucosa. **Biochem J** 2004; 379:291-9.

Baik SC, Youn HS, Chung MH, et al. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. **Cancer Res** 1996; 56:1279-82.

Balendiran GK, Martin HJ, El-Hawari Y, Maser E. Cancer biomarker AKR1B10 and carbonyl metabolism. **Chem Biol Int** 2009; 178:134-7.

Balkwill F, Coussens LM. Cancer: an inflammatory link. **Nature** 2004; 431:405-6.

Barrett MT, Sanchez CA, Prevo LJ, et al. Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. **Nat Genet** 1999; 22:106-9.

Bartsch H, Nair J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. **Cancer Detect Prev** 2004; 28:385-91.

Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, et al. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99:8173-8.

Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. **Nature** 2004; 432:324-31.

Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. **Lancet** 2004; 364:1219-28.

Blair IA. Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. **Exp Gerontol** 2001; 36:1473.

Blot WJ, Dhillon AP, Fraumeni-JF J. Continuing climb in rates of esophageal adenocarcinoma: an update. **JAMA** 1993; 270:1320.

Boffetta P. Infection with *Helicobacter pylori* and parasites, social class and cancer. In: Kogevinas M, Pearce N, Susser M, Boffetta P, editors. **Social inequalities and cancer**. Lyon: IARC Press; 1997. p.325-30.

Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, et al. γ -H2AX and cancer. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:957-67.

Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. **Alcohol** 2005; 35:187-93.

Buttar NS, Falk GW. Pathogenesis of gastroesophageal reflux and Barrett esophagus. **Mayo Clin Proc** 2001; 76: 226-34.

Carneiro F, Amado M, Lago P, et al. Helicobacter pylori infection and blood groups. **Am J Gastroenterol** 1996; 91:2646-7.

Cejas P, Casado E, Belda-Iniesta C. Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer. **Cancer Causes Control** 2004; 15:707-19.

Celeste A, Difilippantonio S, Difilippantonio MJ, et al. H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. **Cell** 2003; 114:371-83.

Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:14648-53.

Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in Helicobacter pylori-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. **World J Gastroenterol** 2004; 10:2232-40.

Chao YC, Wang LS, Hsieh TY, Chu CW, Chang FY, Chu HC. Chinese alcoholic patients with esophageal cancer are genetically different from alcoholics with acute pancreatitis and liver cirrhosis. **Am J Gastroenterol** 2000; 95:2958-64.

Chen X, Ding YW, Yang G, et al. Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. **Carcinogenesis** 2000; 21:257-63.

Clemons NJ, McColl KE, Fitzgerald RC. Nitric oxide and acid induce double-strand DNA breaks in Barrett's esophagus carcinogenesis via distinct mechanisms. **Gastroenterology** 2007; 133:1198-209.

Correa P, Haenszel W, Cuello C, et al. A model for gastric cancer epidemiology. **Lancet** 1975; II:58-60.

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science** 2002; 295:2387-92.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. **Nature** 2002; 420:860-7.

Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of upper gastrointestinal malignancies. **Semin Oncol** 2004; 31:450-64.

Dang CT, Shapiro CL, Hudis CA. Potential role of selective COX-2 inhibitors in cancer management. **Oncology** 2002; 16:30.

Ding XZ, Iversen P, Cluck MW, Knezetic JA, Adrian TE. Lipoxxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun** 1999; 261:218.

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Guix XM. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows Arch** 2005; 446:475-82.

Druesne-Pecollo N, Tehard B, Mallet Y, Gerber M, Norat T, Hercberg S, Latino-Martel P. Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer. **Lancet** 2009; 10:173-80.

Eksteen JA, Scott PA, Perry I, et al. Inflammation promotes Barrett's metaplasia and cancer: a unique role for TNF- α . **Eur J Cancer Prev** 2001; 10:163-6.

El-Omar EM, Carrington M, Chow W-H, et al. The role of interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer. **Nature** 2000; 404:398-402.

El-Omar EM. The importance of interleukin-1 β in *Helicobacter pylori* associated disease. **Gut** 2001; 48:743-7.

Erbil Y, Türkoglu U, Barbaros U, et al. Oxidative damage in an experimentally induced gastric and gastroduodenal reflux model. **Surg Innov** 2005; 12:219-25.

Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutat Res** 2004; 567:1-61.

Everett SM, Singh R, Leuratti C, et al. Levels of malondialdehyde-deoxyguanosine in the gastric mucosa: relationship with lipid peroxidation, ascorbic acid, and *Helicobacter pylori*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10:369-76.

Faith DA, Isaacs WB, Morgan JD. Trefoil factor 3 overexpression in prostatic carcinoma: prognostic importance using tissue microarrays. **Prostate** 2004; 61:215-27.

Farinati F, Cardim R, Degan P, et al. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. **Gut** 1998; 42:351-6.

Fennerty MB. The continuum of GERD complications. **Clev Clin J Med** 2003; 70:33-50.

Fenoglio-Preiser C, Muñoz N, Carneiro F, et al. Gastric carcinoma. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the digestive system**. Lyon: IARC Press; 2000. p.39-52.

Ferreri AJM, Ernberg I, Copie-Bergman C. Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. **J Intern Med** 2009; 265:421-38.

Ferrero RL, Avé P, Ndiaye D, et al. NF- κ B activation during acute *Helicobacter pylori* infection in mice. **Infect Immun** 2008; 76:551-61.

Fink SP, Reddy GR, Marnett LJ. Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:8652-7.

Gabberth HE, Shimoda T, Hainaut P, Nakamura Y, Field JK, Inoue H. Squamous cell carcinoma of the oesophagus. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the digestive system**. Lyon: IARC Press; 2000. p.11-9.

Gijssels HE, Schild LJ, Watt DL, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts determined by semiquantitative immunohistochemistry in human esophageal biopsies taken in 1985. **Mutat Res** 2004; 547:55-62.

Globocan. **The Globocan 2002 Database**. Available from: <URL:<http://www-dep.iarc.fr/globocan/database.htm>> [2009 fev 7].

Goldstein SR, Yang GY, Curtis SK, et al. Development of esophageal metaplasia and adenocarcinoma in a rat surgical model without the use of a carcinogen. **Carcinogenesis** 1997; 18: 2265-2270.

Gomes LI, Esteves GH, Carvalho AF, et al. Expression profile of malignant and non-malignant lesions of esophagus and stomach: differential activity of functional modules related to inflammation and lipid metabolism. **Cancer Res** 2005; 65:7127-36.

Gomes LI. **Análise do perfil de expressão gênica por cDNA microarray em amostras de esôfago e estômago representando mucosa normal, metaplasia intestinal e adenocarcinoma.** São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Guillen P, Billeret V, Buisine MP, et al. Mucin gene expression and cell differentiation in human normal, premalignant and malignant esophagus. **Int J Cancer** 2000; 88:856-61.

Halliwell B, Gutteridge JMC. **Free radicals in biology and medicine.** 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007a. The chemistry of free radicals and related “reactive species”; p.30-78.

Halliwell B, Gutteridge JMC. **Free radicals in biology and medicine.** 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007b. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death; p.187-267.

Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, et al. Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2006; 15:696-703.

Hashibe M, McKay JD, Curado MP, et al. Multiple ADH genes are associated with upper aerodigestive cancers. **Nat Genet** 2008; 40:707-9.

Higuchi S. Polymorphisms of ethanol metabolizing enzyme genes and alcoholism. **Alcohol** 1994; suppl 2: 29-34.

Holscher AH, Bollschweiler E, Bumm R, Bartels H, Hofler H, Siewert JR. Prognostic factors of resected adenocarcinoma of the esophagus. **Surgery** 1995; 118:845-55.

House MG, Brennan MF. Neoadjuvant therapy for gastric cancer. **Adv Surg** 2008; 42:151-68.

Hussain SP, Hofseth L, Harris CC. Radical causes of cancer. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:276-85.

Imai T, Kubo T, Watanabe H. Chronic gastritis in Japanese with reference to high incidence of gastric carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1971; 47:179-95.

Isomoto H, Miyazaki M, Mizuta Y, et al. Expression of nuclear factor- κ B in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa detected with southwestern histochemistry. **Scand J Gastroenterol** 2000; 35:247-54.

Jankowski JA, Harrison RF, Perry I, Balkwill F, Tselepis C. Barrett's metaplasia. **Lancet** 2000; 356:2079-85.

Jolly AJ, Wild CP, Hardie LJ. Acid and bile salts induce DNA damage in human oesophageal cell lines. **Mutagenesis** 2004; 19:319-24.

Jossens JV, Geboers J. Nutrition and gastric cancer. **Nutr Cancer** 1981; 2:250-61.

Kensler TW, Taffe BG. Free radicals in tumour promotion. **Adv Free Radical Biol Med** 1986; 2:347-387.

Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. **Nucl Acid Res** 2008; 36:5678-94.

Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. **N Engl J Med** 1999; 340:825-31.

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

La-Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Gentile A. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. **Cancer** 1992; 70:50-5.

Lee A. Animal models of *Helicobacter* infection. **Mol Med Today** 1999; 5:500-1.

Lee JS, Oh TY, Ahn BO, et al. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and Barrett's esophagus: clue for the chemoprevention of esophageal carcinoma by antioxidants. **Mutation Res** 2001; 480:189-200.

Lin J, Beer D. Molecular biology of upper gastrointestinal malignancies. **Semin Oncol** 2004; 31:476-86.

Liu Z, Zhong L, Krishack PA, et al. Structure and promoter characterization of aldo-keto reductase family 1 B10 gene. **Gene** 2009; epub ahead of print.

Maeda S, Mentis AF. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter** 2007; 12 Suppl 1:10-4.

Mansour JC, Tang L, Shah M, et al. Does graded histologic response after neoadjuvant chemotherapy predict survival for completely resected gastric cancer? **Ann Surg Oncol** 2007; 14:3412-8.

Marnett LJ. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. **Mutat Res** 1999; 424:83-95.

Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis** 2000; 21:361.

Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet** 1984; I:1311-4.

Martin HJ, Maser E. Role of human aldo-keto-reductase AKR1B10 in the protection against toxic aldehydes. **Chem Biol Int** 2009; 178:145-50.

Matsuda T, Yabushita H, Kanaly R, Shibutani S, Yokoyama A. Increased DNA damage in ALDH2-deficient alcoholics. **Chem Res Toxicol** 2006; 19: 1374-8.

Matsuda T, Matsumoto A, Uchida M, et al. Increased formation of hepatic N^2 -ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in *aldehyde dehydrogenase 2* knockout mice treated with ethanol. **Carcinogenesis** 2007; 11:2363-6.

Meireles SI, Carvalho AF, Hirata R, Jr, et al. Differentially expressed genes in gastric tumors identified by cDNA array. **Cancer Lett** 2003; 190:199-211.

Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, et al. Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa. **Cancer Res** 2004; 64:1255-65.

Menges M, Müller M, Zeitz M. Increased acid and bile reflux in Barrett's esophagus compared to reflux esophagitis, and effect of proton pump inhibitor therapy. **Am J Gastroenterol** 2001; 96:331-7.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Mirvish SS. Ascorbic acid inhibition of N-nitroso compound formation in chemical, food and biological systems. In: Zedeck MS, Lipkin M, editors. **Inhibition of tumor induction and development**. New York: Plenum Pu; 1981. p.101-26.

Moehler M, Galle PR, Gockel I, Junginger T, Schmidberger H. The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer: multimodal treatment of gastric cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2007; 21:965-81.

Mori M, Sakaguchi H, Akazawa K, Tsuneyoshi M, Sueishi K, Sugimachi K. Correlation between metastatic site, histological type, and serum tumor markers of gastric carcinoma. **Hum Pathol** 1995; 26:504-8.

Musarrat J, Wani AA. Quantitative immunoanalysis of promutagenic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in oxidized DNA. **Carcinogenesis** 1994; 15:2037-43.

Nair J, Gal A, Tamir S, et al. Etheno adducts in spleen DNA of SJL mice stimulated to overproduce nitric oxide. **Carcinogenesis** 1998; 19:2081-4.

Nair J, Schmid K, Winde G, et al. Miscoding etheno-DNA adducts in colonic epithelium of patients suffering from Crohn's disease, ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis. **Chem Res Toxicol** 2000; 13:703-9.

Nair U, Bartsch H, Nair J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans. **Free Rad Biol Med** 2007; 43:1109-20.

Nardone G, Staibano S, Rocco A, et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. **Gut** 1999; 44:789-99.

Neshat K, Sanchez CA, Galipeau PC, et al. p53 mutations in Barrett's adenocarcinoma and high-grade dysplasia. **Gastroenterology** 1994; 106:1589-95.

Neumark YD, Friedlander Y, Thomasson HR, Li TK. Association of the ADH2*2 allele with reduced ethanol consumption in Jewish men in Israel: a pilot study. **J Stud Alcohol** 1998; 59:133-9.

Nguyen TN, Barkun AN, Fallone CA. Host Determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. **Helicobacter** 1999; 4:185-97.

Ogawa M, Isse T, Oyama T, et al. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and plasma malondialdehyde (MDA) levels in *Alch2* knock-out mice under acetaldehyde exposure. **Industrial Health** 2006; 44:179-83.

Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. **PNAS** 2008; 105:1003-8.

Olliver JR, Hardie LJ, Clark GWB, Dexter S, Chalmers D, Wild CP. The role of DNA damage in the development of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. **Br J Cancer** 2002; 86(Suppl 1), S34-S121.

Olliver JR, Hardie LJ, Gong YY, et al. Risk factors, DNA damage, and disease progression in Barrett's esophagus. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14:620-5.

Olyae M, Sontag S, Salman W. Mucosal reactive oxygen species production in esophagitis and Barrett's esophagus. **Gut** 1995; 37:168-73.

Osier M, Paktis AJ, Kidd JR, et al. Linkage disequilibrium at the ADH2 and ADH3 loci and risk for alcoholism. **Am J Hum Genet** 1999; 64:1147-57.

Paraf F, Flejou JF, Pignon JP, Fekete F, Potet F. Surgical pathology of adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus: analysis of 67 cases. **Am J Surg Pathol** 1995; 19: 183-91.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. **Int J Cancer** 1999; 80:827-41.

Peek RM, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nat Rev Cancer** 2003; 2:28-37.

Perryman SV, Sylvester KG. Repair and regeneration: opportunities for carcinogenesis from tissue stem cells. **J Cell Mol Med** 2006; 10:292-308.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Plummer M, Franceschi S, Muñoz N. Epidemiology of gastric cancer. **IARC Sci Pub** 2004; (157):311-26.

Poirier MC. DNA adducts as exposure biomarkers and indicators of cancer risk. **Environ Health Perspect** 1997; 105(Suppl 4):907-12.

Polyak K. On the birth of breast cancer. **Biochim Biophys Acta** 2001; 1552:1-13.

Potter JD. Diet and cancer: possible explanations for the higher risk of cancer in the poor. In: Kogevinas M, Pearce N, Susser M, Boffetta P, editors. **Social inequalities and cancer**. Lyon: IARC Press; 1997. p.265-84.

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

Richards FM, McKee SA, Rajpar MH, et al. Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. **Hum Mol Genet** 1999; 8:607-10.

Rizzo WB. Sjögren-Larsson syndrome: Molecular genetics and biochemical pathogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. **Mol Gen Metab** 2007; 90:1-9.

Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. **Gastric Cancer** 2002; 5 Suppl 1:5-11.

Rood JC, Ruiz B, Fontham ETH, et al. Helicobacter pylori-associated gastritis and vitamin C concentrations in the gastric juice. **Nutr Cancer** 1994; 22:65-72.

Ross RK, Yuan JM, Yu MC, et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. **Lancet** 1992; 339:943-6.

Rugge M, Cassaro M, Leandro G, et al. Helicobacter pylori in promotion of gastric carcinogenesis. **Dig Dis Sci** 1996; 41:950-5.

Sentani K, Oue K, Sakamoto N, et al. Positive immunohistochemical staining of gamma-H2AX is associated with tumor progression in gastric cancers from radiation-exposed patients. **Oncol Rep** 2008; 20:1131-6.

Serafini M, Bellocco R, Wolk A, Ekström AM. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. **Gastroenterology** 2002; 123:985-91.

Seruca R, Santos NR, David L, et al. Sporadic gastric carcinomas with microsatellite instability display a particular clinicopathologic profile. **Int J Cancer** 1995; 64:32-6.

Shamberger RJ, Andreone TL, Willis CE. Antioxidants and cancer: IV. Initiating activity of malonaldehyde as a carcinogen. **J Natl Cancer Inst** 1974; 53:1771-3.

Shiao YH, Bovo D, Guido M, et al. Microsatellite instability and/or loss of heterozygosity in young gastric cancer patients in Italy. **Cancer** 1999; 82:59-62.

Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:210-9.

Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. **Br J Surg** 1998; 85:1457-9.

Sihvo EIT, Salminen JT, Rantanen TK, et al. Oxidative stress has a role in malignant transformation in Barrett's esophagus. **Int J Cancer** 2002; 102:551-5.

Soares TF, Queiroz DM, Mendes EN, et al. The interrelationship between *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin and gastric carcinoma. **Am J Gastroenterol** 1998; 93:1841-7.

Spechler SJ, Goyal RK. The columnar-lined esophagus, intestinal metaplasia and Norman Barrett. **Gastroenterology** 1996; 110:614-21.

Stein HJ, Siewert JR. Barrett's esophagus: pathogenesis, epidemiology, functional abnormalities, malignant degeneration and surgical management. **Dysphagia** 1993; 8:276-88.

Stein HJ, Hoeft S, DeMeester TR. Functional foregut abnormalities in Barrett's esophagus. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1993; 105:107-11.

Stein HJ, Kauer WK, Feussner H, Siewert JR. Bile reflux in benign and malignant Barrett's esophagus: effect of medical acid suppression and nissen fundoplication. **J Gastrointest Surg** 1998; 2:333-41.

Stewart BW, Kleihues P. **World cancer report**. Lyon: IARC Press; 2003. Stomach cancer; p.194-7.

Tabernero J, Macarulla T, Ramos FJ, Baselga J. Novel targeted therapies in the treatment of gastric and esophageal cancer. **Ann Oncol** 2005; 16:1740-8.

Tanaka T, Nishiyama Y, Okada K, et al. Induction and nuclear translocation of thioredoxin by oxidative damage in the mouse kidney: independence of tubular necrosis and sulfhydryl depletion. **Lab Invest** 1997; 77:145-55.

Tanaka T, Halicka HD, Huang X, Tragano F, Darzynkiewicz Z. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. **Cell Cycle** 2006; 5:1940-5.

Terry CE, McGinnis LM, Madigan KC, et al. Genomic comparison of *cag* Pathogenicity Island (PAI)-positive and -negative *Helicobacter pylori* strains: Identification of novel markers for *cag* PAI-positive strains. **Infect Immunity** 2005; 73:3794-8.

Thomasson HR, Edenberg HJ, Crabb DW, et al. Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men. **Am J Hum Genet** 1991; 48:677-81.

Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, et al. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. **Nat Genet** 1996; 13:117-9.

Torres C, Turner JR, Wang HH, et al. Pathologic prognostic factors in Barrett's associated adenocarcinoma: a follow-up study of 96 patients. **Cancer** 1999; 85:520-8.

Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, et al. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: Its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. **Lab Invest** 1997; 76:365-74.

Tytgat GN, McColl K, Tack J, et al. New algorithm for the treatment of gastro-oesophageal reflux disease. **Aliment Pharmacol Ther** 2008; 27:249-56.

Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. **Progr Lipid Res** 2003; 42:318.

van den Brink GR, ten Kate FJ, Ponsioen CY, et al. Expression and activation of NF- κ B in the antrum of the human stomach. **J Immunol** 2000; 164:3353-9.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** 2002; 3:RESEARCH0034.

van-Sandick JW, van-Lanschot JJ, Kuiken BW, Tytgat GN, Offerhaus GJ, Obertop H. Impact of endoscopic biopsy surveillance of Barrett's oesophagus on pathological stage and clinical outcome of Barrett's carcinoma. **Gut** 1998; 43:216-22.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. An extended Li-Fraumeni kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation in TP53. **J Med Genet** 1995; 32:942-5.

Veglia F, Matullo G, Vineis P. Bulky DNA adducts and risk of cancer: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biom Prev** 2003; 12:157-60.

Victor VM, Rocha M, Esplugues JV, De La Fuente M. Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. **Curr Pharm Des** 2005; 11:3141-58.

Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. **Gastroenterology** 1998; 115:642-8.

Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. **Cancer Res** 1985; 45:1-8

Watwe V, Javle M, Lawrence D, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) levels before and after chemotherapy: a study in rectal cancer. **Am J Clin Oncol** 2005; 28:560-4.

Werner M, Lambert R, Fleiou JF, et al. Adenocarcinoma of the oesophagus. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the digestive system**. Lyon: IARC Press; 2000. p.20-6.

West AG, Attikum H. Chromatin at the crossroads. Meeting on signaling to chromatin epigenetics. **EMBO reports** 2006; 7:1206-10.

Wetscher GJ, Hinder RA, Bagchi D. Reflux esophagitis is mediated by oxygen-derived free radicals. **Am J Surg** 1995; 170:552-6.

Whitfield JB, Nightingale BN, Bucholz KK, Madden PA, Heath AC, Martin NG. ADH genotypes and alcohol use and dependence in Europeans. **Alcohol Clin Exp Res** 1998; 22:1463-9.

Wild CP, Hardie LJ. Reflux, Barrett's oesophagus and adenocarcinoma: burning questions. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:676-85.

Witherell HL, Hiatt RA, Replogle M, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* infection and urinary excretion of 8-hydroxy-2deoxyguanosine, an oxidative DNA adduct. **Cancer Epidemiol Biomark Prev** 1998; 7:91-6.

Wood AW, Huang MT, Chang RL, et al. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: exceptional activity of ellagic acid. **Proc Natl Acad Sci USA** 1982; 79:5513-7.

Yan R, Zu X, Ma J, Liu Z, Adeyanju M, Cao D. Aldo-keto reductase family 1 B10 gene silencing results in growth inhibition of colorectal cancer cells: Implication for cancer intervention. **Int J Cancer** 2007; 121:2301-6.

Yang D, Tannenbaum SR, Buchi G, Lee GC. 4-Chloro-6-methoxyindole is the precursor of a potent mutagen (4-chloro-6-methoxy-2-hydroxy-1-nitrosoindolin-3-one oxime) that forms during nitrosation of the fava bean (*Vicia faba*). **Carcinogenesis** 1984; 5:1219-24.

Yao Y, Tao H, Park DI, Sepulveda JL, Sepulveda AR. Demonstration and characterization of mutations induced by *Helicobacter pylori* organisms in gastric epithelial cells. **Helicobacter** 2006; 11:272-86.

Yokoyama A, Muramatsu T, Omori T, et al. Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms influence susceptibility to esophageal cancer in Japanese alcoholics. **Alcohol Clin Exp Res** 1999; 23:1705-10.

Yokoyama A, Omori T. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and risk for esophageal and head and neck cancers. **Jpn J Clin Oncol** 2003; 33:111-21.

Zhang HY, Spechler SJ, Souza RF. Esophageal adenocarcinoma arising in Barrett esophagus. **Cancer Lett** 2009; 275:170-7.

Zhao H, Traganos F, Albino AP, Darzynkiewicz Z. Oxidative stress induces cell cycle-dependent Mre11 recruitment, ATM and Chk2 activation and histone H2AX phosphorylation. **Cell Cycle** 2008; 7:1490-5.

ANEXOS

Anexo 1 – PROTOCOLOS

Protocolo1: Extração Simultânea de DNA e RNA

No primeiro protocolo, após a homogenização dos tecidos (1ml de TRIzol® para cada 50-100mg de amostra) as amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, misturadas a 200µl de clorofórmio, incubadas novamente a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Após a separação das fases, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo para a extração do RNA, e o DNA foi extraído a partir da fase orgânica. À fase aquosa foram adicionados 500µl de isopropanol e as amostras foram precipitadas overnight a -20°C; após a precipitação as amostras foram centrifugadas a 20.000g por 30 minutos a 4°C, e os pellets foram lavados com etanol 70% (preparado com água DEPC) gelado (centrifugações de 7.500g por 5 minutos a 4°C, por 4 vezes). Após as lavagens as amostras foram secas na bancada, ressuspensas em água DEPC e hidratadas por 10 minutos a 55°C antes de serem quantificadas. À fase orgânica foram adicionados 300µl de etanol 100%; em seguida as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugadas a 2.000g por 5 minutos a 4°C. Após a retirada do sobrenadante foi adicionado 1ml de DNA Wash Solution (0,1M citrato de sódio em etanol 10%), e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugadas a 2.000g por 5 minutos a 4°C (3 lavagens). Foi adicionado 1,8ml de etanol, e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugadas a 2.000g por 5 minutos a 4°C. Após a retirada do etanol, as amostras foram secas na bancada e ressuspensas em solução de NaOH 8mM suplementada com 1mM de EDTA; o pH foi ajustado para 8 com adição de tampão HEPES 0,1M. Para retirar os restos celulares as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 10 minutos, e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos tubos e posteriormente quantificado.

Protocolo 2: Extração Simultânea de DNA e RNA

O segundo protocolo apresenta algumas diferenças principalmente da extração do DNA, em relação ao primeiro protocolo. Após a homogeneização com TRIzol®, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugadas a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo para extração do RNA, e ao restante foram adicionados 600µl do Back Extraction Buffer (BEB pH 8: 4Mol/L isotiocianato de guanidina, 50mMol/L citrato de sódio di-hidratado e 10Mol/L Tris/HCl). As amostras foram homogeneizadas manualmente por 1 minuto e incubadas a 25°C sob agitação de 500rpm até terminar o processamento do RNA. Ao sobrenadante da primeira centrifugação foram adicionados 200µl de clorofórmio; as amostras foram homogeneizadas manualmente por 1 minuto, incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos para iniciar a separação de fases e centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novos tubos, misturada à 500µl de isopropanol e precipitada overnight a -20°C. Após a precipitação as amostras foram centrifugadas a 20.000g por 30 minutos a 4°C, e foram feitas 4 lavagens com 1ml de etanol 70% (preparado em água DEPC) gelado e centrifugações de 2 minutos a 20.000g a 4°C. Os pellets foram secos na bancada, ressuspensos em água DEPC e incubados por 10 minutos a 55°C antes da quantificação. A fase orgânica foi centrifugada a 12.000g por 5 minutos a 4°C; a fase aquosa remanescente foi descartada e adicionou-se o lisado com BEB ao pellet. As amostras foram homogeneizadas manualmente por 1 minuto, incubadas por 30 minutos a 25°C sob agitação de 500rpm e centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos tubos contendo 600µl de isopropanol e 2µl de glicogênio (20µg/µl); as amostras foram homogeneizadas manualmente por 1 minuto e precipitadas overnight a -20°C. Após a centrifugação de 20.000g por 30 minutos a 4°C as amostras foram lavadas 4 vezes com 1ml de etanol 70% gelado e centrifugações de

20.000g a 4°C por 2 minutos. Os pellets foram secos na bancada, ressuspensos em TE pH 8, incubados à temperatura ambiente por 30 minutos à 55°C por 15 minutos sob agitação de 500rpm.

Protocolo 3: Extração Simultânea de DNA e RNA

Após a otimização, o protocolo utilizado foi o seguinte:

Após a homogeneização com TRIzol®, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo para extração do RNA, e ao restante foram adicionados 600µl do Back Extraction Buffer; as amostras foram homogeneizadas manualmente e incubadas a 25°C sob agitação de 500rpm até terminar o processamento do RNA. Ao sobrenadante da primeira centrifugação foram adicionados 200µl de clorofórmio; as amostras foram homogeneizadas manualmente, incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos para iniciar a separação de fases e centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novos tubos, misturada à 500µl de isopropanol e incubada por 10 minutos na bancada. Após a precipitação as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 10 minutos a 4°C, e foram feitas 4 lavagens com 1ml de etanol 70% (preparado em água DEPC) gelado e centrifugações de 5 minutos a 7.600g a 4°C. Os pellets foram secos no SpeedVac, ressuspensos em água DEPC e incubados por 10 minutos a 55°C sob agitação leve (300rpm) antes da quantificação. A fase orgânica foi centrifugada a 12.000g por 5 minutos a 4°C; a fase aquosa remanescente foi descartada e adicionou-se o lisado com BEB. As amostras foram homogeneizadas manualmente, incubadas por 30 minutos a 25°C sob agitação de 500rpm e centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos tubos contendo 600µl de isopropanol e 2µl de glicogênio (20µg/µl); as amostras foram homogeneizadas manualmente e precipitadas na bancada por 5 minutos. Após a centrifugação de 12.000g por 15 minutos a 4°C as amostras foram lavadas 4 vezes com 1ml de etanol 70% gelado e centrifugações de 12.000g a 4°C por 5 minutos. Os pellets foram secos no SpeedVac, ressuspensos em TE pH 8, incubados à 65°C por 1 hora e OV na bancada.

Protocolo 4: Reações de Imunoistoquímica

Após 24 horas em estufa 60°C, as lâminas são desparafinizadas com xilol (60°C por 20 minutos e temperatura ambiente por 20 minutos) e etanol (100, 85 e 70%, 30 segundos cada); as lâminas são lavadas e a recuperação antigênica é feita em panela de pressão com tempão citrato 10mM pH 6, até a fervura. Depois das lâminas serem lavadas com água, o bloqueio da peroxidase endógena é feito com peróxido de hidrogênio 3% (água oxigenada 10 vol) com 4 trocas de 5 minutos cada; após o bloqueio as lâminas são lavadas com PBS 10mM pH 7.4 por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em PBS contendo BSA 1% e azida sódica 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após essa incubação, as lâminas são lavadas em PBS (3 trocas de 3 minutos cada) e incubadas por 30 minutos a 37°C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer), lavadas com PBS, incubadas por 30 minutos a 37°C com NovoLink Polymer, novamente lavadas com PBS e incubadas em solução substrato (60mg DAB, 1ml DMSO, 1ml H₂O₂ 6% e 100ml PBS) por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Após a precipitação as lâminas são lavadas em água corrente e contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, novamente lavadas e imergidas em água amoniacal (hidróxido de amônio 0.5%). Após serem lavadas as lâminas são desidratadas em etanol 80, 95 e 100% (30 segundos cada) e xilol (4 vezes, 30 segundos cada), e montadas em Entellan Neu (Merck).

Protocolo 5: Extração de Proteínas A partir da segunda Fase Orgânica do Trizol®

Foi adicionado 1,5ml de isopropanol e as amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, e em seguida centrifugadas a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 2 ml de solução de hidrocloreto de guanidina 0,3M em etanol 95%. Os pellets foram ressuspensos e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente, e em seguida centrifugados a 7.500g por 5 minutos a 4°C; essa etapa foi repetida mais duas vezes. Foram adicionados 2ml de etanol 100% e as amostras foram vortexadas e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida os tubos foram centrifugados a 7.500g por 5 minutos a 4°C; o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100µl SDS 1%. As amostras foram incubadas por 16 horas a 50°C; após a incubação foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e quantificados.

Protocolo 6: Detecção de Lesões de DNA por Imuno-Dot Blot Assay

As amostras contendo 1µg de DNA (sendo 800ng de DNA de esperma de salmão e 200 ng de DNA celular) foram desnaturadas a 100°C por 10 minutos e colocadas imediatamente no gelo. Enquanto as amostras eram desnaturadas, foi feita a lavagem das membranas (BIO-DOT Blotting Media Nitrocellulose Membrane, Bio Rad) e dos papéis de filtro (BIO-DOT SF Filter Paper, Bio Rad) em acetato de amônia 1M. Após a montagem do aparato seguindo as instruções do manual, foram aplicados 200µl de acetato de amônia 1M em cada poço, e o vácuo foi ligado até a passagem de todo o líquido. As amostras desnaturadas foram misturadas a 100µl de acetato de amônia 2M; o volume total foi aplicado nos poços, e o vácuo foi novamente ligado. Novamente foram aplicados 200µl de acetato de amônia 1M em cada poço, e o vácuo foi ligado. A membrana foi lavada em solução SSC 5X (Solução estoque SSC 20X: 3M NaCl + 0,3M Citrato de Sódio) e incubada por 15 minutos a 37°C sob agitação constante. Após a incubação a membrana foi seca na bancada com papel toalha e incubada por 2 horas no forno a 80°C, e overnight a 4°C com reagente de bloqueio (50ml PBS + 5% leite em pó). O anticorpo anti-8-OH foi titulado (concentrações 1:500, 1:1000, 1:1500 e 1:2000) e diluído em reagente de bloqueio. A incubação com o anticorpo primário foi realizada por 3 horas sob agitação constante à temperatura ambiente. A membrana foi lavada com tampão de lavagem (PBS + 0,1% Tween 20) por 5 minutos à temperatura ambiente sob agitação; essa lavagem foi repetida mais 5 vezes. Após as lavagens a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-mouse (Sigma) na diluição 1:5000, sob agitação constante por 2 horas à temperatura ambiente. A lavagem foi realizada do mesmo modo que o citado acima. A revelação foi feita com ECL após 1 minuto de exposição.

Anexo 2 - Quantidade de material genético e proteína extraídos das amostras.

Amostra	Localização	Laudo	Lâmina	ng/µl RNA	µg totais RNA	ng/µl DNA	µg totais DNA	µg/µl Proteína	µg totais Proteína
1	Estômago	Gastrite crônica	Tumor	403,81	8,07	494,88	24,74	X	X
2	Estômago	Gastrite crônica	Tumor	2209,15	44,183	3312,4	165,62	X	X
3	Junção esofago- gástrica	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	472,68	9,45	766,66	38,33	X	X
4	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	1721,79	34,42	689,17	34,45	X	X
5	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	560,6	11,21	1629,35	81,46	X	X
6	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	2220,24	44,4	3318	165,9	X	X
7	Junção esofago- gástrica	Adenocarcinoma intestinal	Normal	722,86	144,57	188,3	9,41	X	X
8	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Normal	256,73	51,346	2834,15	141,7	X	X
9	Junção esofago- gástrica	Epitélio normal	Normal	1028,15	205,63	2847,55	142,37	X	X
10	Estômago	Tumor neuroendócrino	Gastrite	588,06	176,41	3568,22	356,82	X	X
11	Estômago	GIST	Normal	1872,37	374,47	321,26	16,06	X	X
12	Estômago	GIST	Normal	1902,91	190,29	89,85	26,95	X	X
13	Estômago	Carcinoma gástrico difuso	Normal	1842,72	184,27	182,4	54,72	X	X
14	Esôfago	Carcinoma epidermóide	Normal	2446,02	244,6	240,87	72,26	X	X
15	Estômago	Adenocarcinoma difuso	Normal	1605,27	321,05	447,14	134,14	X	X
16	Estômago	Gastrite crônica intensa	Metaplasia	1965,5	393,1	725,33	217,59	X	X
17	Estômago	Adenocarcinoma pouco diferenciado	Gastrite	1540,59	154,05	220,62	66,18	X	X
18	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Normal	2362,2	472,44	256,29	76,88	X	X
19	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	1783,38	178,33	144,05	14,4	X	X
20	Junção esofagogástrica	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Tumor	2649,88	264,98	199,09	19,9	X	X
21	Estômago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Gastrite	1988,91	198,89	49,42	4,94	X	X
22	Junção esofagogástrica	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	1515,76	303,15	171,97	17,19	X	X
23	Estômago	Adenocarcinoma misto	Tumor	2032,24	203,22	144,68	28,93	1,4	357
24	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	436,71	87,34	136,47	27,29	1,2	612

25	Junção esofagogástrica	Adenocarcinoma pouco diferenciado	Normal	568,94	113,78	121,1	24,22	0,7	178,5
26	Estômago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Normal	352,16	70,43	120,7	24,14	2,7	1377
27	Estômago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Tumor	170,76	17,07	165,69	33,13	0,2	102
28	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Normal	1541,95	154,19	679,87	67,98	0,8	408
29	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	2976,25	297,62	851,9	85,19	1,6	408
30	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	241,08	24,1	445,22	44,52	1,8	459
31	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Metaplasia	1743,48	174,34	291,92	29,19	0	0
32	Esôfago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	699,59	69,95	376,11	37,61	0,5	127,5
33	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	1777	177,7	517,01	51,7	2,4	2448
34	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	1550,99	155,09	473,59	47,35	0,6	153
35	Esôfago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	646,41	64,64	429,35	42,93	1	255
36	Estômago	Adenocarcinoma pouco diferenciado	Tumor	645,03	129	416,97	41,69	1,7	433,5
37	Estômago	Adenocarcinoma pouco diferenciado	Tumor	1758,77	351,75	354,98	35,49	0,9	459
38	Estômago	Adenocarcinoma pouco diferenciado	Tumor	1174,9	234,8	308,86	30,88	1,9	969
39	Estômago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Tumor	185,31	37,06	235,52	23,55	4	1020
40	Junção esofago- gástrica	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	1473,25	294,65	1407,91	140,79	2,6	1326
41	Esôfago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Tumor	371,44	74,28	441,56	44,15	2,6	663
42	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	140,91	28,18	255,2	25,52	0,6	153
43	Estômago	Adenocarcinoma pouco diferenciado	Tumor	126,75		253,21	25,32	0,3	76,5
44	Junção esofago- gástrica	Adenocarcinoma pouco diferenciado	Tumor	178,68	35,73	222,49	22,24	1,4	357
45	Esôfago	Carcinoma epidermóide	Normal	37,76		211,68	21,16	2	1020
46	Estômago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Tumor	295,08	29,5	172,93	17,29	1,3	331,5
47	Esôfago	Carcinoma epidermóide	Normal	628,42	62,84	556,46	55,64	2,2	561
48	Estômago	Adenocarcinoma pouco diferenciado	Tumor	608,17	60,81	427,23	42,72	2,3	586,5
49	Estômago	Adenocarcinoma difuso	Gastrite	1557,88	155,78	445,12	44,51	0,5	127,5

50	Estômago	Adenocarcinoma pouco diferenciado	Tumor	1469,63	146,96	568,41	56,84	1,5	382,5
51	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	2811,24	281,12	1512,46	151,24	0,6	306
52	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	2041,54	408,3	2531,51	253,15	2,7	1377
53	Esôfago	Carcinoma epidermóide	Normal	398,9	39,89	448,76	44,87	2,8	714
54	Esôfago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Tumor	790,46	79,04	508,62	50,86	1,8	918
55	Junção esofago- gástrica	Adenocarcinoma difuso	Normal	1246,9	124,69	451,26	45,12	1,5	765
56	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Normal	694,08	69,4	724,93	72,49	1,3	331,5
57	Estômago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Tumor	1035,18	207,03	577,86	57,78	1,8	918
58	Esôfago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Normal	1574,76	157,47	1303,94	130,39	2,2	561
59	Esôfago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Normal	404,14	40,41	193,1	19,31	2,6	663
60	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	1340,38	134,03	419,49	41,94	2,6	1326
61	Estômago	Adenocarcinoma misto	Tumor	1887,73	188,73	2308,46	230,84	0,4	102
62	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Normal	2690,99	269,09	199,05	19,9	2,7	1377
63	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	127,97	12,79	61,01	6,1	3,4	1734
64	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Gastrite	169,92	16,99	675,22	67,52	1	255
65	Junção esofago- gástrica	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Normal	1479,59	295,91	1501,92	150,19	2,7	1377
66	Estômago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Normal	625,7	62,57	305,82	30,58	2,3	586,5
67	Estômago	Adenocarcinoma pouco diferenciado	Normal	1708,3	170,83	768,53	76,85	0,6	306
68	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	1566,79	156,67	1659,34	165,93	0,3	153
69	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	1250,96	125,09	1353,8	135,38	0,3	76,5
70	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	202,15	20,21	284,19	28,41	0,3	76,5
71	Estômago	Adenocarcinoma pouco diferenciado	Tumor	396,06	39,6	264,7	26,47	2,3	586,5
72	Estômago	Metástase de melanoma	Normal	767,87	76,78	333,26	33,32	0,4	102
73	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	2880,56	288,05	1091,17	109,11	2	1020
74	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	510,97	51,09	563,16	56,31	0,4	102
75	Esôfago	Carcinoma epidermóide	Normal	1088,67	108,86	458,21	45,82	2,7	688,5
76	Esôfago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	941,75	94,17	1150,29	115,52	0,7	178,5

77	Junção gastroesofágica	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	200,44	20,04	175,73	17,57	1,6	816
78	Esôfago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	532,95	53,29	757,49	75,74	1,7	433,5
79	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Normal	1331,78	133,17	501,86	50,18	1,3	663
80	Estômago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Tumor	1726,08	172,6	574,12	57,41	0,9	229,5
81	Estômago	Adenocarcinoma intestinal	Tumor	1966,25	196,62	1521,9	152,19	3,8	1938
82	Estômago	Adenocarcinoma pouco diferenciado	Tumor	717,6	71,76	248,53	49,7	0,8	204
83	Estômago	Adenocarcinoma misto	Tumor	2540,24	254,02	572,61	57,26	2,8	1428
84	Esôfago	Adenocarcinoma moderada// diferenciado	Tumor	1079,32	107,93	880,54	88,05	5,4	2754
85	Estômago	Biópsia	Metaplasia	269,12	13,46	422,37	21,1185	0,1	25,5
86	Estômago	Biópsia	Metaplasia	411,3	20,57	287,01	14,3505	0	0
87	Estômago	Biópsia	Metaplasia	201,07	10,1	133,89	6,6945	1,8	918
88	Estômago	Biópsia	Metaplasia	52,46	2,62	179,66	8,983	0,7	178,5
89	Estômago	Biópsia	Metaplasia	363,41	18,2	154,28	7,714	0,3	76,5
90	Estômago	Biópsia	Metaplasia	559,92	27,996	351,89	17,5945	0,4	102
91	Estômago	Biópsia	Metaplasia	363,04	18,152	755,39	37,7695	0,3	153
92	Esôfago	Biópsia	Barret	178,11	8,9055	145,97	7,2985	0	0
93	Esôfago	Biópsia	Barret	86,17	4,3085	585,88	29,294	0,3	76,5
94	Estômago	Biópsia	Gastrite	90	4,5	63,34	3,167	0,2	51
95	Estômago	Biópsia	Gastrite	401,02	20,051	325,55	16,2775	0,3	76,5
96	Estômago	Biópsia	Gastrite	397,13	19,8565	752,87	37,6435	0,4	102
97	Estômago	Biópsia	Gastrite	967,81	48,3905	1496,43	74,8215	0,4	102
98	Estômago	Biópsia	Gastrite	532,26	26,613	471,28	23,564	0,9	229,5
99	Estômago	Biópsia	Gastrite	242,37	12,1185	56,08	2,804	0,4	102
100	Estômago	Biópsia	Gastrite	465,42	23,271	192,72	9,636	0,7	178,5
101	Estômago	Biópsia	Gastrite	375,22	18,761	491,19	24,5595	0,3	76,5
102	Estômago	Biópsia	Gastrite	218,34	10,917	148,17	7,4085	0,3	76,5
103	Estômago	Biópsia	Gastrite	365,08	18,254	104,22	5,211	0,5	127,5
104	Estômago	Biópsia	Gastrite	300,12	15,006	246,59	12,3295	0,3	76,5
105	Estômago	Biópsia	Gastrite	1,93	0,0965	27,35	1,3675	0,5	127,5
106	Estômago	Biópsia	Normal	592,03	29,6015	418,68	20,934	0,3	76,5

107	Estômago	Biópsia	Normal	284,8	14,24	136,32	6,816	0,3	76,5
108	Estômago	Biópsia	Antro						
108	Estômago	Biópsia	normal	242,11	12,1055	32,92	1,646	0,2	51
109	Estômago	Biópsia	Normal	676,48	33,824	429,91	21,4955	0,2	51
110	Estômago	Biópsia	Normal	251,82	12,591	103,22	5,161	0,4	102
111	Estômago	Biópsia	Normal	217,41	10,8705	156,15	7,8075	0,3	76,5
112	Estômago	Biópsia	Normal	280,01	14,0005	228,11	11,4055	0,4	102
113	Esôfago	Biópsia	Esofagite	210,6	10,53	91,95	4,5975	0	0
114	Esôfago	Biópsia	Esofagite	60,98	3,049	23,16	1,158	0,2	51
115	Estômago	Biópsia	Normal	169,22	8,461	103,77	5,1885	0,3	76,5
116	Estômago	Biópsia	Normal	237,61	11,8805	231,35	11,5675	0,2	51
117	Estômago	Gastrite crônica com metaplasia	Normal	333,35	16,6675	383,58	19,179	0,1	25,5
118	Estômago	Biópsia	Normal	163,68	8,184	103,83	5,1915	0,2	51
119	Estômago	Mucosa normal	Normal	121,21	6,0605	77,5	3,875	0,4	102
120	Estômago	Biópsia	Normal	327,58	16,379	213,97	10,6985	0	0
121	Estômago	Biópsia	Normal	357,18	17,859	378,89	18,9445	0	0
122	Estômago	Biópsia	Tumor	236,51	11,8255	155,53	7,7765	0,3	153
123	Esôfago	Metaplasia intestinal	Metaplasia	135,63	6,7815	86,26	4,313	0	0
124	Esôfago	Biópsia	Esofagite	179,93	8,9965	117,93	5,8965	0	0