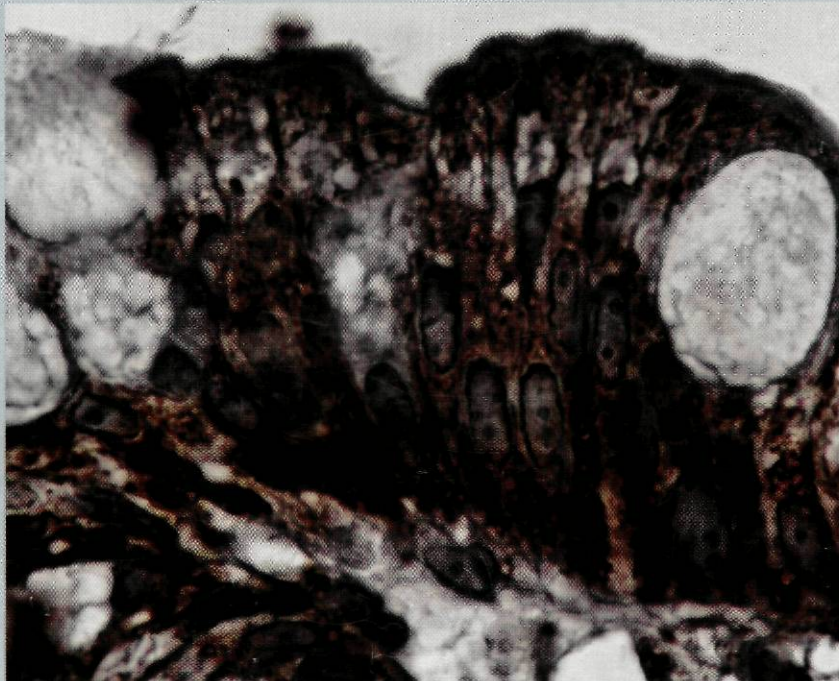


# **PAPÉL DA CICLO-OXIGENASE-2 NA CARCINOGENÉSE GÁSTRICA**



**Pedro Alexandre Lorenz Rodrigues Pereira**

**PORTO  
2004**

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU  
DE MESTRE APRESENTADA À FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Artigo 48º, § 3 – A Faculdade não responde pelas doutrinas  
expendidas na dissertação. (*Regulamento da Faculdade de  
Medicina do Porto – Decreto nº 19337, 29 de Janeiro de 1931*)

## **O meu agradecimento**

À Professora Doutora Fátima Carneiro, orientadora científica desta tese de mestrado, expresso a minha profunda gratidão e admiração. Ao longo deste tempo, tive a oportunidade e o privilégio de beneficiar das suas extraordinárias qualidades humanas, científicas e pedagógicas. A amizade com que me honra e a energia que sabe transmitir contribuíram de forma decisiva para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Manuel Sobrinho-Simões, coordenador do Curso de Pós-graduação e Mestrado em Medicina Molecular, muito agradeço todas as sugestões e estímulos para esta dissertação e a forma amiga com que o fez.

Sem a colaboração da Professora Doutora Raquel Seruca não teria sido possível a realização de uma parte importante deste trabalho. Muito agradeço a orientação concedida, os valiosos conselhos que me ofereceu e a simpatia com a qual me sempre tem atendido .

À Dra. Dina Leitão, técnica de Anatomia Patológica da FMUP no IPATIMUP, pela excelente assistência técnica. As suas sugestões e críticas contribuíram para o enriquecimento desta dissertação.

À Professora Doutora Clara Sambade, pelo apoio e pelos valiosos conselhos recebidos.

Ao Senhor Abílio Ferreira, pelo excelente apoio técnico e pela sua cordial amizade.

À Margarida Tavares, minha amiga e colega de curso, agradeço o auxílio recebido para a análise estatística dos resultados.

Aos meus amigos, colegas do internato complementar, em especial ao João Cruz, João Magalhães e Ana Filipa Capelinha.

À Sra. D. Ana Teresa Ribeiro, pela valiosa ajuda concedida e pela simpatia com que o fez.

Ao Joel Paiva e aos técnicos de Anatomia Patológica do Hospital de S. João Armando Castro, Armindo Pereira e Manuel Moutinho, pela disponibilidade sempre demonstrada.

Aos meus Pais, cuja gratidão dificilmente poderei traduzir por palavras.

## ÍNDICE

1. Introdução: inflamação e carcinogénese	
1.1 Aspectos gerais	6
1.2 O papel de alguns mediadores inflamatórios	7
1.3 O caso particular do cancro gástrico	11
1.4 Ciclo-oxigenase (COX)-2	18
2. Objectivos	41
3. Material e métodos	42
4. Resultados	
4.1 Estudo imuno-histoquímico da expressão de COX-2 em mucosa gástrica normal, pólipos hiperplásicos, gastrite crónica metaplasia intestinal, displasia e carcinomas gástricos	46
4.2 Estudo da relação entre o estado de metilação do promotor do gene <i>PTGS2</i> e a expressão de COX-2 em linhas celulares e tecidos de carcinoma gástrico	55
5. Discussão e conclusões	58
6. Bibliografia	64
7. Resumo	79
8. Summary and conclusions	81

# 1. Introdução: inflamação e carcinogénese

## 1.1 Aspectos gerais

A relação entre algumas condições inflamatórias crónicas e o desenvolvimento de cancro é conhecida desde longa data. Na segunda metade do século XIX, Rudolf Virchow (1863), ao observar a presença de infiltrado leucocitário em tecidos neoplásicos, sugeriu que o processo inflamatório estaria na origem da transformação neoplásica. Com base na história natural de determinadas doenças e em estudos epidemiológicos, foi de facto possível estabelecer uma associação forte entre determinadas condições inflamatórias crónicas e a ocorrência de cancro em diversos órgãos. Estas condições incluem infecções crónicas, lesões tecidulares crónicas causadas por agentes químicos ou físicos e doenças de etiologia incerta, geradoras de inflamação crónica (Tabela 1). Embora se tenham verificado grandes avanços no estudo dos processos de transformação e desenvolvimento neoplásicos, os mecanismos moleculares subjacentes à transição entre processo inflamatório crónico e cancro, estão por esclarecer.

**Tabela 1-** Condições inflamatórias e neoplasias associadas

<b>Condição</b>	<b>Neoplasia</b>
Doença Inflamatória Crónica Intestinal	Carcinoma colo-rectal
Infecção por <i>H.pylori</i>	Carcinoma gástrico
Hepatite vírica crónica	Carcinoma hepatocelular
Schistosomíase	Carcinoma da bexiga
Tireoidite de Hashimoto	Linfoma/carcinoma papilar da tireóide
Infecção pelo vírus do papiloma humano	Carcinoma do colo uterino
Doença inflamatória pélvica	Carcinoma do ovário
Esofagite de refluxo	Carcinoma esofágico
Asbestose	Mesotelioma
Alterações do epitélio respiratório associadas ao tabagismo	Carcinoma broncogénico

Em alguns dos processos inflamatórios referidos pode observar-se uma sequência de alterações histopatológicas (Cordon-Cardo *et al.*, 1999). O processo de transformação maligna da mucosa gástrica no decurso da infecção por *H. pylori* é disso um exemplo (Correa, 1992, 1995). Neste modelo, a primeira alteração é a atrofia glandular, consequência da destruição continuada, devido à cronicidade do processo e mediada por auto-anticorpos contra as células parietais (Faller *et al.*, 1997). A atrofia é

seguida de um aumento da actividade proliferativa do epitélio, podendo ocorrer a substituição de um tipo de diferenciação celular por outro tipo – metaplasia. A metaplasia pode, por sua vez, evoluir para displasia e, por último, pode surgir o carcinoma. Subjacentes a estas alterações morfológicas estão alterações moleculares, que condicionam um desequilíbrio entre apoptose e proliferação celular. Recentemente, mediadores da inflamação como o monóxido de azoto, o factor inibidor da migração de macrófagos (*macrophage migration inhibitory factor* – MIF) e a ciclo-oxigenase (descrita adiante), entre outros, têm sido identificados como “cúmplices” na carcinogénese.

## 1.2 O papel de alguns mediadores inflamatórios

### Óxido nítrico

O óxido nítrico (*nitric oxide* – NO) é um gás solúvel, sintetizado em células endoteliais, macrófagos e determinados neurónios do sistema nervoso central (Ignarro, 2000). Dada a sua semi-vida muito reduzida, de apenas alguns segundos, este gás só pode actuar em células próximas daquelas que o produzem. O NO é sintetizado a partir de L-arginina e oxigénio molecular (O<sub>2</sub>) pela sintetase do óxido nítrico (NOS) (Nathan *et al.*, 1997). Existem três tipos de NOS: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível por citocinas (iNOS). Enquanto os dois primeiros tipos são expressos constitucionalmente, o iNOS pode ser induzido por citocinas, como por exemplo o factor de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e o interferão (IFN)- $\gamma$  (Nathan *et al.*, 1997).

Para além de desempenhar uma função importante como vasodilatador (por efeito de relaxamento do músculo liso da parede vascular) (Palmer *et al.*, 1987), o NO tem um papel importante na inflamação (Grisham *et al.*, 1999) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Papel do NO na inflamação

#### **NO e inflamação**

- Regulação do recrutamento de leucócitos
- Inibição da actividade dos mastócitos
- Redução da agregação e adesão plaquetárias
- Actividade anti-microbiana

Entre as diversas funções do NO, é-lhe atribuído um papel crucial na eliminação de agentes infecciosos (Fang *et al.*, 1997). O NO pode reagir com moléculas de oxigénio, formando várias substâncias com actividade anti-microbiana, como por exemplo o peroxinitrito, nitrosotióis e dióxido de nitrogénio (Grisham *et al.*, 1999). Em concentrações elevadas, estas moléculas podem oxidar o ADN, originar mutações e, inclusivamente, danificar enzimas reparadoras do ADN (Jaiswal *et al.*, 2000). No seu conjunto, estes efeitos podem originar alterações iniciadoras do processo de carcinogénese e estabelecer um elo entre inflamação crónica e cancro. Todavia, dada a fisiopatologia complexa do cancro e as amplas funções fisiológicas do NO, não é surpreendente que se verifiquem acções pró- e anti-carcinogénicas do NO. De uma forma geral, as células do sistema imunológico tendem a produzir concentrações elevadas de NO, que são citostáticas ou citotóxicas; em contrapartida, as células neoplásicas sintetizam NO em concentrações baixas, o que favorece o crescimento e progressão tumorais (Brennan, 2000).

**Tabela 3** – As acções do NO podem favorecer a progressão tumoral em concentrações baixas, ou exercer um efeito anti-neoplásico em concentrações elevadas (adaptado de Lane e Gross, 2002).

#### **Acções pró-carcinogénicas – NO de origem tumoral**

- |                  |                                  |
|------------------|----------------------------------|
| • ↑ Nitrosaminas | • ↑ Angiogénese                  |
| • ↑ Lesão do ADN | • ↑ Imunossupressão              |
| • ↑ Mutagénese   | • ↓ Apoptose (exposição crónica) |

#### **Acções anti-carcinogénicas – NO de origem imunológica**

- |                                  |                                |
|----------------------------------|--------------------------------|
| • ↓ Agregação plaquetária        | • ↓ Angiogénese                |
| • ↓ Metastização                 | • ↑ Activação macrofágica      |
| • ↓ Proliferação celular tumoral | • ↑ Apoptose (exposição aguda) |

O NO pode mediar acções citostáticas através de efeitos directos sobre vários alvos moleculares, essenciais para a proliferação celular, e pode induzir a apoptose mediada pela p53 (Wang *et al.*, 2002). Por outro lado, o NO pode originar uma reacção de nitrosilação com um grupo tiol crítico no *locus* activo das caspases e inibir a apoptose (Lane *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2000). O NO também pode inibir a formação do apoptossoma Apaf-1/caspase-9 (Zech *et al.*, 2003).

Em resumo, os efeitos do NO podem contribuir para estabelecer uma relação entre inflamação crónica e cancro. Os efeitos do NO no cancro são variáveis e dependentes da concentração e da fonte de NO.

## MIF

Outro elo entre citocinas inflamatórias e lesão do ADN provém de estudos recentes relativos à regulação da proteína supressora tumoral p53. Verifica-se que, em diversos tumores, a p53 está funcionalmente inactivada, embora o gene permaneça inalterado (Moll *et al.*, 1992, 1995; Maestro *et al.*, 1995). A procura de substâncias inibidoras da actividade da p53 permitiu identificar uma citoquina inflamatória, conhecida como factor inibidor da migração de macrófagos (MIF) (Hudson *et al.*, 1999). O MIF é produzido por linfócitos T e macrófagos activados no decurso do processo inflamatório. Concentrações elevadas deste factor contribuem para a activação de células T e aumentam a actividade microbicida dos macrófagos.

A p53 exerce os seus efeitos principalmente através da activação da transcrição de "genes alvo" (Levine, 1997). O MIF possui a capacidade de antagonizar a paragem do ciclo celular mediada pela p53 e inibir a apoptose, ao suprimir a actividade de transcrição da p53 (Hudson *et al.*, 1999).

A inactivação funcional da p53 poderia ser benéfica durante a resposta inflamatória aguda, permitindo a proliferação celular local e reparação tecidual (Cordon-Cardo e Prives, 1999). Todavia, a persistência crónica deste processo pode eventualmente gerar instabilidade genómica e, por último, conduzir à transformação maligna. De facto, há evidência de que o MIF possa ter um papel para além da inflamação: é disso exemplo a sobre-expressão de ARN mensageiro deste factor em tumores prostáticos (Takahashi *et al.*, 1998).

## gp130

A gp130 é um receptor transmembranar para as citocinas inflamatórias da família da IL-6 (Hibi *et al.*, 1990; Hirano *et al.*, 1997). Estas citocinas são consideradas pró-inflamatórias, embora contribuam também para a reparação epitelial. A gp130 está na génese de duas vias de sinalização, a via *signal transducer and activator of transcription 1 and 3* (STAT 1/3) e a via *Src-homology tyrosine phosphatase-Ras-Erk* (SHP2-Ras-Erk), através de resíduos distintos de tirosina (Luticken *et al.*, 1994; Yamanaka *et al.*, 1996).

Tebbutt *et al.* (2002) evidenciaram recentemente o papel destas vias de sinalização na regulação da homeostasia gastro-intestinal. A indução de uma mutação do receptor gp130 capaz de bloquear selectivamente a via SHP2-Ras-Erk conduziu ao desenvolvimento de adenomas gástricos. Em contrapartida, estes autores verificaram que as mutações que bloqueavam a via STAT1/3 aumentaram a susceptibilidade para o desenvolvimento de colite induzida experimentalmente. A diferença de comportamento entre o estômago e o intestino em resposta a um estímulo inflamatório pode, segundo Tebbutt *et al.* (2002), ser explicada por alterações organo-específicas na expressão de uma família de genes denominada *trefoil factor family* (TFF), cuja expressão é regulada directamente pela gp 130.

A família TFF é constituída por três peptídeos de pequenas dimensões que são expressos predominantemente em células muco-secretoras do aparelho digestivo (Wong *et al.*, 1999). A sua função exacta não é conhecida, mas acredita-se que estes peptídeos estão envolvidos na reparação e manutenção da integridade epitelial (Wong *et al.* 1999). Experiências realizadas em ratinhos forneceram resultados muito interessantes relativamente ao papel dos *trefoil peptides*:

- knockout do gene TFF1: aumento da proliferação celular epitelial, formação de adenomas e carcinomas no antro gástrico (Lefebvre *et al.*, 1996)
- knockout do gene TFF2: diminuição da proliferação celular epitelial, aumento da secreção de ácido e aumento do grau de ulceração após administração de indometacina (Farrell *et al.*, 2002)
- knockout do gene TFF3: aumento da susceptibilidade a colite induzida por agente químico (Mashimo *et al.*, 1996)

Através de uma série de estudos de transfecções transitórias, Tebutt *et al.* (2002) demonstraram que a gp130 regula directamente os genes TFF. A regulação de TFF1 necessita da via SHP2-Ras-Erk, enquanto que o TFF3 depende da via STAT 1/3.

Os resultados obtidos por Tebutt *et al.* (2002) dão forte suporte à existência de uma relação entre inflamação crónica e cancro no estômago. A infecção crónica por *Helicobacter pylori* pode gerar uma resposta imune intensa do tipo Th1, estimulando a produção de IL-6, entre outras citocinas (Yamaoka *et al.*, 1997). De acordo com Wang *et al.* (2002), as citocinas inflamatórias podem alterar o equilíbrio das vias de sinalização dependentes de gp 130, eventualmente com aumento da via STAT 1/3 em detrimento da via SHP2-Ras-Erk, com conseqüente redução da expressão de TFF1 e predisposição para o desenvolvimento de cancro gástrico.

### Citocinas pró-inflamatórias – polimorfismos

Alguns dos genes que codificam citocinas pró-inflamatórias são extremamente polimórficos (Balkwill e Mantovani, 2001). Estes polimorfismos localizam-se frequentemente em sequências de ADN que regulam a transcrição e, deste modo, podem ser funcionalmente importantes. Estudos recentes demonstraram que determinados polimorfismos se associam a um aumento do risco de cancro e da sua severidade: Warzocha *et al.* (1997) demonstraram que a libertação sistémica de TNF- $\alpha$  contribui para a gravidade de linfomas não-Hodgkin. Posteriormente, os mesmos investigadores verificaram que o polimorfismo TNF-308 se associa a elevados níveis plasmáticos desta citocina (Warzocha *et al.*, 1998). O mesmo polimorfismo também se associa a um aumento do risco de carcinoma da próstata (Oh *et al.*, 2000) e de carcinoma do estômago (El-Omar *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2003).

No carcinoma gástrico, para além do polimorfismo referido, vários outros polimorfismos estão associados a esta doença (El-Omar *et al.*, 2000, 2001, 2003; Machado *et al.*, 2003). Estes polimorfismos serão descritos adiante.

### 1.3 O caso particular do cancro gástrico

#### Epidemiologia

O adenocarcinoma gástrico constitui a segunda causa de morte por cancro no mundo (Fenoglio-Preiser *et al.*, 2000). No entanto, a sua incidência é bastante variável, sendo particularmente elevada em países como o Japão, China, Chile, Portugal e Rússia (Fenoglio-Preiser *et al.*, 2000). As populações em risco estão concentradas em estratos sócio-económicos mais baixos, de países em desenvolvimento. O carcinoma gástrico é geralmente assintomático nas fases iniciais, facto que determina um diagnóstico tardio nos países em que não está implementada uma política de rastreio.

De acordo com Laurén (1965), há dois tipos principais de carcinoma gástrico:

- tipo intestinal: estrutura glandular (tubular e/ou papilar);
- tipo difuso: constituído por células isoladas, com ou sem fenótipo de células em anel de sinete.

O terceiro grupo da classificação de Laurén (carcinoma indeterminado) corresponde, noutras classificações, a carcinomas sólidos ou carcinomas de estrutura mista, os últimos com mais do que um componente, geralmente glandular e de células isoladas (Carneiro *et al.*, 1995).

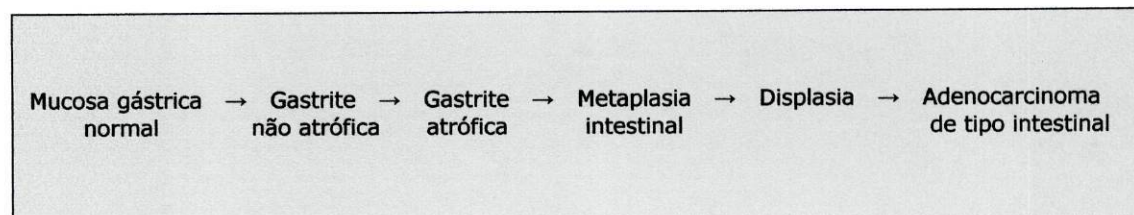
O adenocarcinoma de tipo intestinal predomina nas regiões geográficas de alto risco, surge numa idade tardia (pela sexta década de vida) e é mais frequente no sexo masculino do que no sexo feminino (Crawford, 1999). O carcinoma de tipo difuso ocorre em doentes ligeiramente mais novos (idade média de 48 anos) e tende a afectar mais as mulheres do que os homens (Crawford, 1999). O carcinoma de tipo difuso é o tipo histológico mais frequente em formas hereditárias de cancro do estômago (Guilford *et al.*, 1998; Gayther *et al.*, 1998; Keller *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 1999; Huntsman *et al.*, 2001).

Os carcinomas de tipo intestinal e difuso são os mais frequentes no estômago distal (Stemmermann *et al.*, 2002). A incidência do adenocarcinoma de tipo intestinal tem vindo a diminuir, enquanto que a incidência do tipo difuso tem permanecido relativamente estável (Munoz, 1996).

#### Patogénese

A etiopatogénese do cancro gástrico (esporádico) é complexa e não está completamente esclarecida. No entanto, sabe-se que estão envolvidos factores ambientais e genéticos. O adenocarcinoma gástrico tem como ponto de partida a gastrite. A infecção por *Helicobacter pylori* e determinados padrões dietéticos constituem os factores ambientais mais importantes na génese da gastrite e associam-se às condições e lesões precursoras que lhe podem suceder e conduzir ao adenocarcinoma gástrico

de tipo intestinal (Figura 1) (Correa, 1992, 1995). A via de cancerização do carcinoma difuso não está ainda bem esclarecida . No entanto, sabe-se que este tipo também se associa a gastrite por *H. pylori* (Solcia *et al.*, 1996).



**Figura 1** – Modelo de desenvolvimento do carcinoma gástrico de tipo glandular/intestinal (adaptado de Correa, 1995)

Existem dois tipos principais de metaplasia intestinal (Jass e Filipe, 1980):

- metaplasia intestinal completa (tipo I, ou de tipo intestino delgado)
- metaplasia intestinal incompleta (tipos II e III).

O diferente padrão de expressão de mucinas caracteriza os tipos de metaplasia. A metaplasia intestinal completa apresenta uma expressão reduzida de mucinas próprias do estômago (MUC1, MUC5AC e MUC6) e exprime *de novo* uma mucina intestinal (MUC2) em células caliciformes. Por seu lado, na metaplasia intestinal incompleta há expressão concomitante de mucinas gástricas em células colunares e de MUC2 em células caliciformes, o que denota um programa de diferenciação aberrante, não expresso em nenhum fenótipo epitelial gastro-intestinal normal no adulto (Reis *et al.*, 1999).

As lesões de displasia classificam-se em baixo e alto grau, consoante as alterações cito-arquiteturais (Fenoglio-Preiser *et al.*, 2000). Até 80% das lesões de displasia de alto grau podem progredir para carcinoma. A extensão da metaplasia intestinal, na presença de metaplasia intestinal incompleta, associada a displasia, no seu conjunto, correlaciona-se com um aumento marcado de risco de desenvolvimento de cancro do estômago (Fenoglio-Preiser *et al.*, 2000).

Os principais factores de risco envolvidos na génese do cancro gástrico estão resumidos na Tabela 4. Estes factores associam-se principalmente ao adenocarcinoma de tipo intestinal, uma vez que eles não estão bem definidos para o carcinoma de tipo difuso.

**Tabela 4** – Factores de risco para o desenvolvimento de cancro gástrico (adaptado de Crawford, 1999)

### **Factores associados a aumento da incidência do cancro gástrico**

- Dieta
  - Nitritos
  - Alimentos fumados e salgados
- Gastrite por *Helicobacter pylori*
- Coto gástrico
- Nível sócio-económico baixo
- Grupo sanguíneo do tipo A
- Outros

#### *Helicobacter pylori*

A infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) tem um papel central na carcinogénese gástrica. *Helicobacter pylori* é uma bactéria identificada por Warren e Marshall (1984) que coloniza electivamente a mucosa gástrica. São bem conhecidos os quadros lesionais associados a infecção por *H. pylori*: úlcera péptica (Peterson, 1991), gastrite crónica atrófica (Karnes *et al.*, 1991), adenocarcinoma distal ao cárdia (Forman *et al.*, 1991; Nomura *et al.*, 1991; Parsonnet *et al.*, 1991; Sipponen *et al.*, 1992; Hansson *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1997) e linfoma não-Hodgkin do estômago (Parsonnet *et al.*, 1994).

O papel de *H. pylori* na carcinogénese gástrica é realçado por diversos tipos de estudos. Entre eles destacam-se vários estudos epidemiológicos (Howson *et al.*, 1986; Nomura *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1994; Parsonnet, 1995; Barreto-Zuniga *et al.*, 1997; Miehke *et al.*, 1997), que estabeleceram uma correlação entre infecção por *H. pylori* e risco de desenvolvimento de cancro do estômago. Em estudos de intervenção foi possível demonstrar a regressão de gastrite atrófica e metaplasia intestinal (precursores do carcinoma gástrico) após erradicação da infecção por *H. pylori* (Uemura *et al.*, 1997; Nardone *et al.*, 1999; Correa *et al.*, 2000). Em modelos experimentais foi possível provocar infecção por *H. pylori* e verificar o desenvolvimento ulterior de carcinoma gástrico (Hirayama *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 1998). Com base na evidência acumulada, a Organização Mundial de Saúde e a *International Association for Research against Cancer* (IARC) consideraram *H. pylori* como um carcinógeno de tipo I (IARC-WHO, 1994).

Epidemiologia Cerca de metade da população mundial está infectada por *H. pylori*. A prevalência da infecção é mais elevada nos países em desenvolvimento, do que nos países desenvolvidos (Everhart, 2000; Ernst e Gold, 2000). No Norte de Portugal, a prevalência da infecção na população adulta é superior a 80% (Quina, 1994). A infecção é adquirida, quase sempre na infância, por via oral e, uma vez estabelecida, a infecção não tratada persiste cronicamente, contribuindo para o desenvolvimento de lesões no estômago (Tindberg *et al.*, 1999).

Constituem factores de risco para a aquisição da bactéria o baixo nível sócio-económico, uma densidade habitacional elevada, país de origem e etnia (Everhart, 2000; Tindberg *et al.*, 2001).

Patogénese *H. pylori* é dotado de características únicas, que lhe permitem (sobre)viver no estômago. Estas características (como por exemplo a presença de um flagelo) conferem à bactéria a capacidade de penetrar no muco gástrico, orientar-se e deslocar-se no meio ácido, aderir através de adesinas às células epiteliais e evadir-se da resposta imunológica. A consequência é a infecção crónica. Durante a colonização, o genoma da bactéria pode ser modificado através da incorporação de fragmentos de ADN provenientes de outras estirpes de *H. pylori*, que possam estar presentes no hospedeiro (Falush *et al.*, 2001).

A pesquisa de factores bacterianos associados ao risco de desenvolvimento de cancro gástrico conduziu à identificação de vários *loci* genéticos, nomeadamente os genes *babA2* e *vacA* e ainda a "ilha de patogenicidade" *cag* (van Doorn *et al.*, 1998; Gerhard *et al.*, 1999; Suerbaum *et al.*, 2002):

- *babA2*: codifica a proteína *BabA*, uma adesina que se localiza na vertente externa da membrana celular da bactéria, capaz de se ligar ao antigénio do grupo sanguíneo Lewis b; este antigénio está ancorado no epitélio foveolar do estômago (Gerhard *et al.*, 1999);

- *vacA*: codifica uma citotoxina vacuolizante, capaz de se inserir na membrana das células epiteliais e formar um "canal" hexamérico, que permite a libertação de bicarbonato e aniões orgânicos; ao atingir a membrana mitocondrial, esta toxina promove a libertação do citocromo c e induz a apoptose (Peek *et al.*, 1999; Galmiche *et al.*, 2000; Kuck *et al.*, 2001). No gene *vacA* há duas regiões distintas (*s* e *m*), cada uma delas com variantes (*s1* e *s2*; *m1* e *m2*). As combinações destas variantes determinam quatro génotipos (*s1m1*; *s1m2*; *s2m1*; *s2m2*). Sabe-se que o génotipo *s1m1* é o mais virulento, associando-se a maior risco de desenvolvimento de carcinoma gástrico (Ghiara *et al.*, 1995; Atherton *et al.*, 1997; van Doorn *et al.*, 1999; Figueiredo *et al.*, 2001);

- *ilha de patogenicidade cag*: fragmento genómico compreendendo 31 genes, vários dos quais codificam componentes de um aparelho secretor, capaz de translocar a proteína *cagA* da bactéria para a célula epitelial (Tomb *et al.*, 1997; Odenbreit *et al.*, 2000); depois de fosforilada, a proteína *cagA* liga-se à fosfatase da tirosina SHP2, acarretando uma resposta celular idêntica à de um estímulo por um factor de crescimento, associado a produção de citocinas (Segal *et al.*, 1999; Asahi *et al.*, 2000).

Sabe-se que o gene *cagA* só está presente em cerca de 60% das estirpes de *H. pylori* (Go *et al.*, 1996), associando-se a risco aumentado de desenvolvimento de carcinoma gástrico (Kuipers *et al.*, 1995; Blaser *et al.*, 1995; Parsonnet *et al.*, 1997; Figueiredo *et al.*, 2001).

Resposta do hospedeiro A adesão da bactéria ao epitélio gástrico desencadeia uma resposta inflamatória, cuja intensidade depende do genótipo bacteriano e do genótipo do hospedeiro (ver adiante). Inicialmente, esta resposta consiste no recrutamento de neutrófilos, seguidos de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Blaser, 1990). Posteriormente, a resposta imune adquire um carácter específico, do tipo Th1, com produção de múltiplas citocinas inflamatórias, nomeadamente as interleucinas (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, interferão (IFN)- $\gamma$  e factor de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  (Yamaoka *et al.*, 1997). Por sua vez, a expressão de ciclo-oxigenase (COX)-2 é induzida pela IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Williams *et al.*, 1997). A expressão de iNOS também se encontra aumentada. No entanto, o *H. pylori* é capaz de induzir a produção de argininas metiladas (inibidores competitivos da iNOS), escapando à acção microbicida do NO (von Bothmer *et al.*, 2002).

A IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  inibem a produção de ácido clorídrico pelas células parietais (Beales *et al.*, 1998; Takashima *et al.*, 2001). A hipocloridria que daí resulta aumenta o risco de gastrite atrófica (uma condição precursora do cancro gástrico) e permite a colonização do estômago por outras bactérias.

No decurso do processo inflamatório surgem diversos estímulos que interferem com a proliferação celular e a apoptose. Estes estímulos estão directamente relacionados com a intensidade da inflamação. Por um lado, *H. pylori* pode diminuir a expressão de p27, uma proteína reguladora do ciclo celular, que inibe o ciclo celular na fase G<sub>1</sub> (Shirin *et al.*, 1999). A hipergastrinemia induzida pela infecção constitui outro estímulo para a proliferação celular (Levi *et al.*, 1989). Por outro lado, *H. pylori* pode induzir a apoptose quer através da síntese da proteína *vacA* referida anteriormente, ou pela indução da expressão do receptor FAS e seu ligando, ou ainda pela activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B (Rudi *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2001). Como consequência do processo inflamatório, a produção de radicais livres pode lesar proteínas e induzir mutações no ADN, que podem favorecer a oncogénese. No seu conjunto, todos estes mecanismos podem contribuir para um desequilíbrio entre apoptose e proliferação celular, criando condições próprias para o desenvolvimento de cancro.

Susceptibilidade genética do hospedeiro à infecção por *H. pylori* A maior parte dos indivíduos infectados por *H. pylori* permanece assintomática. De entre os que desenvolvem quadros lesionais sintomáticos (cerca de 20%), as expressões clínico-patológicas são variadas. Para além do linfoma (que não será abordado neste trabalho), pode dizer-se que há duas expressões lesionais mais importantes da infecção por *H. pylori* (Suerbaum e Michetti, 2002):

- gastrite não atrófica do antro, acompanhada de hipercloridria e que se associa a lesões duodenais com metaplasia de tipo foveolar e úlcera duodenal;

- pangastrite com evolução para gastrite atrófica e metaplasia intestinal, acompanhada de hipocloridria e que se associa a úlcera gástrica ou carcinoma do estômago.

Para explicar a diversidade da expressão clínico-patológica da infecção por *H. pylori*, foi sugerida a interação entre factores ambientais (dieta), factores de virulência de *H. pylori* e factores do hospedeiro (secreção ácida e resposta inflamatória/imunológica). A resposta inflamatória/imunológica é modulada pela expressão de citocinas codificadas por genes que frequentemente apresentam polimorfismos, com consequências funcionais relativamente à intensidade da resposta inflamatória. Algumas citocinas regulam também a secreção de ácido no estômago. O protótipo é a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), que é um potente inibidor da secreção de HCl (Beales *et al.*, 1998; Takashima *et al.*, 2001). Foram identificados vários polimorfismos na região do promotor do respectivo gene, que se correlacionam com os níveis de produção (baixos ou elevados) de IL-1 $\beta$  (El-Omar *et al.*, 2000, 2001, 2003). El-Omar *et al.* (2001) demonstraram que indivíduos (de uma população polaca) infectados por *H. pylori* e detentores de polimorfismos associados a níveis elevados de produção de IL-1 $\beta$ , têm maior risco de desenvolver hipocloridria, gastrite atrófica e cancro gástrico, do que os indivíduos que possuem polimorfismos associados a níveis baixos de síntese desta interleucina. Os mesmos investigadores também identificaram um polimorfismo relevante no gene *IL-1RN*. Este gene codifica a IL-1ra, uma citoquina anti-inflamatória, antagonista natural do receptor da IL-1. Verifica-se também que os polimorfismos que se acompanham da diminuição da expressão de IL-10 (uma citoquina anti-inflamatória) se associam igualmente a risco de desenvolvimento de cancro gástrico (El-Omar *et al.*, 2003).

Um estudo semelhante, realizado por Machado *et al.* (2001) numa população portuguesa, confirmou os resultados do grupo referido anteriormente.

Em resumo, a localização e a intensidade da gastrite por *H. pylori*, a história natural da infecção e, conseqüentemente, o risco de desenvolvimento de cancro gástrico, resultam da inter-acção de três factores *major*: virulência de *H. pylori*, susceptibilidade genética do hospedeiro e dieta.

### Biologia molecular

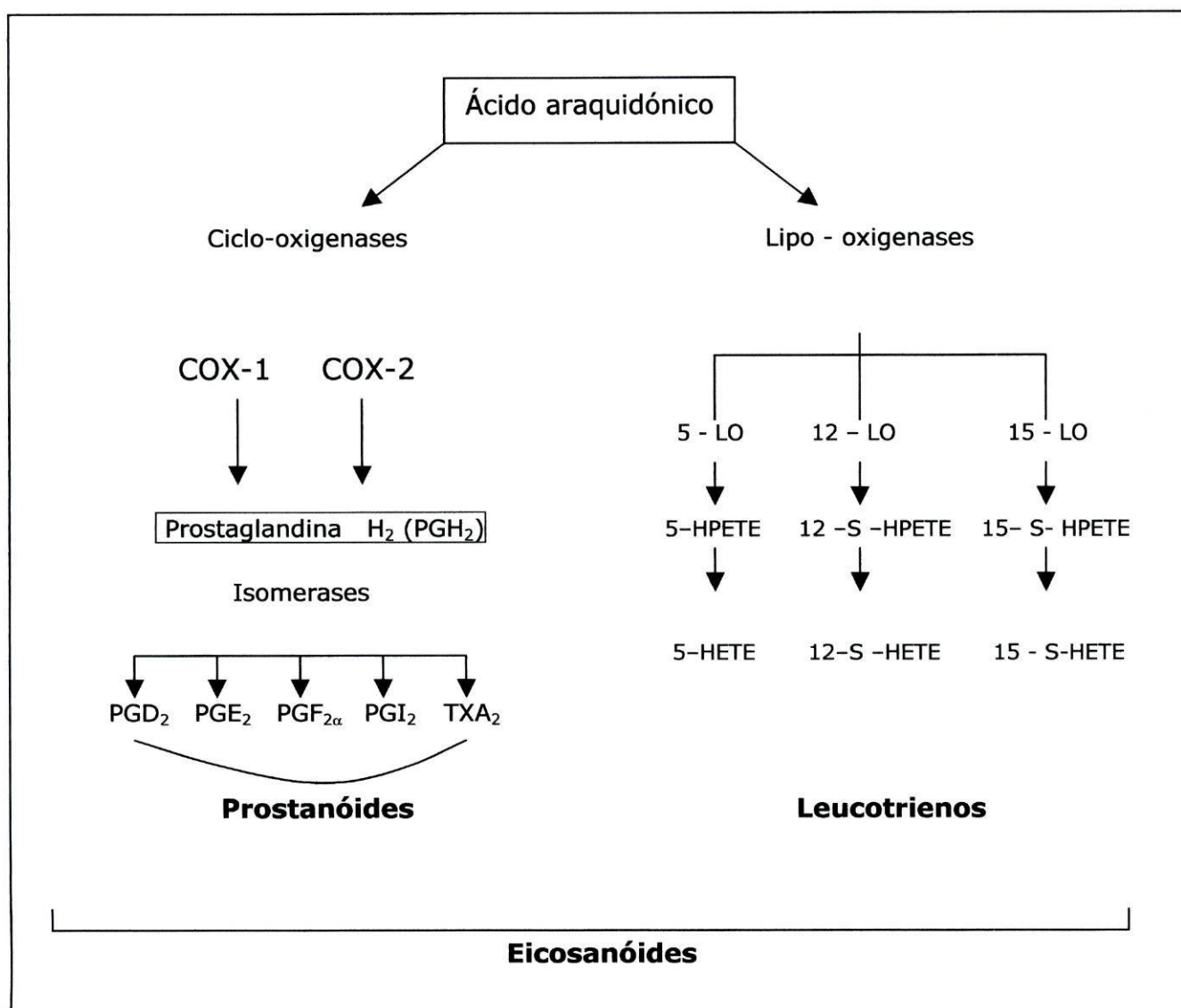
Múltiplas alterações genéticas e epigenéticas foram identificadas no carcinoma gástrico e suas lesões precursoras. Estas alterações envolvem genes supressores tumorais, oncogenes e genes que regulam a reparação do ADN, entre outros. Na Tabela 5 apresenta-se um resumo das principais alterações genético-moleculares de acordo com os dois tipos principais de carcinoma gástrico (glandular/intestinal e células isoladas/difuso).

**Tabela 5** – Alterações genéticas e cromossômicas e sub-tipos histológicos de carcinoma gástrico (adaptado de Nardone, 2003 e Fenoglio-Preiser *et al.*, 2000)

	<b>Carcinoma intestinal / glandular (%)</b>	<b>Carcinoma Difuso / células isoladas (%)</b>
<b>Alteração genética</b>		
<i>K-RAS</i> (mutação/"sobre-expressão")	10	0
<i>c-MET</i> (amplificação)	19	39
<i>K-SAM</i> (amplificação)	0	33
<i>c-erbB-2</i> (amplificação)	20	0
<i>EGFR</i> ("sobre-expressão")	50	25
<i>EGF</i> ("sobre-expressão")	40	20
<i>TGF-<math>\alpha</math></i> ("sobre-expressão")	60	55
<i>TP 53</i> (LOH/mutação)	50	50
<i>APC</i> (LOH/mutação)	60	30
<i>BCL-2</i> (LOH)	43	0
<i>DCC</i> (LOH)	50	0
<i>caderina-E</i> (mutação)	10	50
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	27	0
<i>Telomerase</i> (reactivação)	100	90
<b>Alterações cromossômicas</b>		
	Aneuploidia # 3p, 6q, 7q, 13q (LOH) #1q, 5q, 17p (LOH)	Diploidia #3p, 6q, 7q, 13q (LOH) #17q ( <i>BRCA1 locus</i> )

## 1.4 Ciclo-oxigenase (COX)-2

As ciclo-oxigenases são enzimas que convertem o ácido araquidónico em prostaglandina (PG)H<sub>2</sub> - o primeiro passo para a síntese de prostanóides (Smith *et al.*, 1996). Existem duas isoformas de ciclo-oxigenase: 1) COX-1, expressa constitucionalmente em vários tecidos; 2) COX-2, a isoforma induzida (Kargman *et al.*, 1996). Ambas as isoformas catalizam as seguintes reacções: 1) reacção de bi-oxigenação, que transforma o ácido araquidónico em 15-hidroperóxido-9,11-endoperóxido (PGG<sub>2</sub>); 2) peroxidação de PGG<sub>2</sub>, originando o metabolito 15-hidróxido (PGH<sub>2</sub>) (Needleman *et al.*, 1986). A COX também é conhecida por sintetase da prostaglandina H (PGHS). Dependendo de isomerases específicas de cada tecido, a PGH<sub>2</sub> é convertida em PGD<sub>2</sub> (sistema nervoso central), PGE<sub>2</sub> (endotélio, estômago), PGF<sub>2α</sub> (músculo liso), PGI<sub>2</sub> (endotélio, estômago) ou tromboxano (TX) A<sub>2</sub> (plaquetas) (Herschman, 1996) (ver Figura 2).



**Figura 2** – Esquema geral do metabolismo do ácido araquidónico.

As prostaglandinas desempenham funções importantes em quase todos os órgãos e estão envolvidas na regulação de diversos processos fisiológicos como a imunidade, reprodução, manutenção da integridade e tono vasculares e metabolismo ósseo (ver revisão de Dubois *et al.*, 1998). As prostaglandinas actuam de modo metácrino, autócrino e parácrino, ligando-se a receptores próprios (ver adiante).

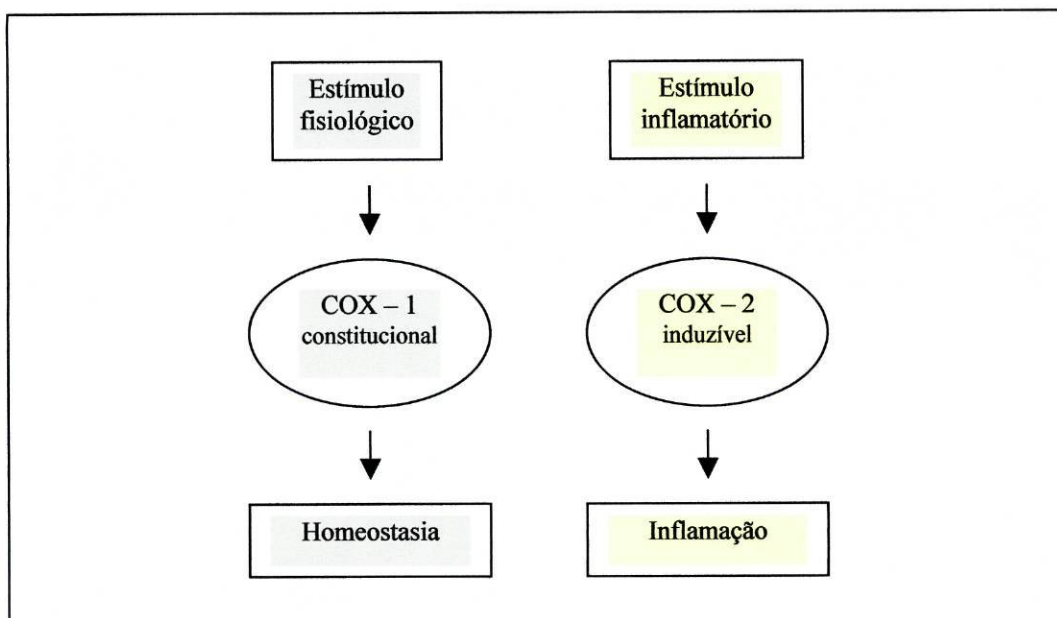
A regulação dos processos fisiológicos referidos está essencialmente a cargo da primeira de duas isoformas da ciclo-oxigenase, a COX-1. Esta enzima é expressa de forma constitucional e desempenha um papel na homeostasia tecidual normal. O rim e o estômago são dois dos órgãos cuja homeostasia depende marcadamente da COX-1. Nestes órgãos, a produção de prostaglandinas vasodilatadoras (e. g. PGE<sub>2</sub>) assegura o funcionamento normal dos sistemas fisiológicos. No rim, as prostaglandinas mantêm o fluxo sanguíneo e a filtração glomerular em situações de vasoconstrição sistémica (Zambraski, 1995). No estômago, as prostaglandinas regulam o fluxo sanguíneo da microcirculação da mucosa gástrica e exercem uma acção cito-protectora (Trevethick *et al.*, 1995).

Na presença de inibidores da COX-1, como por exemplo os fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), este efeito protector pode atenuar-se, acarretando isquemia renal e gástrica, com risco de ulceração da mucosa do estômago (Zambraski, 1995; Trevethick *et al.*, 1995).

A COX-2, a segunda isoforma, é expressa após indução da transcrição do gene respectivo. A expressão é estimulada por factores de natureza diversa, incluindo várias citocinas inflamatórias (IL-1, TNF- $\alpha$ ), factores de crescimento (EGF, TGF- $\beta$ , PDGF), hormonas (LH, FSH) e carcinogénicos (e. g. ésteres do forbol) (Smith *et al.*, 1996).

Os genes da COX-1 e da COX-2 localizam-se nos cromossomas 9 (Yokoyama e Tanabe, 1989) e 1 (Hla *et al.*, 1992), respectivamente. No entanto, a semelhança estrutural entre as duas isoformas é grande. Ambas catalizam as mesmas reacções enzimáticas e ambas estão ancoradas no retículo endoplasmático e membranas do invólucro nuclear (Spencer *et al.*, 1998). Contudo, a síntese de prostaglandinas pela COX-1 e COX-2 é desencadada por estímulos extra-celulares diferentes (Tanabe e Tohno, 2002).

A COX-2 desempenha um papel central na inflamação. As prostaglandinas contribuem directamente para a génese dos quatro sinais cardinais de Celsus (rubor, tumor, calor e dor). A PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, em conjunto com a PGD<sub>2</sub> (o metabolito principal da via da ciclo-oxigenase nos mastócitos), causam vasodilatação e potenciam a formação de edema (Collins, 1999). Além de ser induzida no local onde se desenvolve o processo inflamatório, a COX-2 também é induzida na medula espinal, onde participa na nocicepção (Beiche *et al.*, 1996). Por seu lado, a PGE<sub>2</sub> induz hiperalgesia, tornando a pele hipersensível à estimulação dolorosa (Dray, 1995).



**Figura 3** – Regulação e função da COX-1 e COX-2.

Várias neoplasias exprimem níveis elevados de COX-2 e prostaglandinas (ver adiante), tendo sido sugerido que a COX-2 desempenha um papel em alguns processos de transformação maligna (Dubois *et al.*, 1998). Importa salientar, no entanto, que um número crescente de estudos têm vindo a demonstrar a existência de determinado tipo de prostaglandinas, nomeadamente do tipo ciclopentenona (e. g. 15d-PGJ<sub>2</sub>, um metabolito da PGJ<sub>2</sub>), que exercem acções anti-oncogénicas (Clay *et al.*, 1999, 2000; Callejas *et al.*, 1999).

### Receptores das prostaglandinas

Os receptores das prostaglandinas localizam-se na membrana citoplasmática e no núcleo, permitindo a algumas prostaglandinas a possibilidade de estimular duas vias de sinalização distintas, *i.e.* vias associadas a receptores de membrana citoplasmática e vias ligadas a receptores nucleares (Hyunjung *et al.*, 2002; Gobeil *et al.*, 2003).

Ambas as ciclo-oxigenases estão ancoradas na membrana do retículo endoplasmático e nas duas membranas (externa e interna) do invólucro nuclear. De acordo com a topografia das enzimas, as prostaglandinas podem ser facilmente exportadas para o meio extra-celular, para a região peri-nuclear e para o núcleo. Existem dois tipos de receptores para as prostaglandinas (Breyer *et al.*, 2001):

- 1) receptores transmembranares hepta-helicoidais acoplados a uma proteína G;
- 2) receptores nucleares do tipo dos activados por agentes de proliferação dos peroxissomas (*peroxisome proliferator-activated receptors* – PPARs).

Receptores transmembranares ligados a proteína G Estes receptores localizam-se na membrana citoplasmática e são denominados de acordo com a prostaglandina para a qual apresentam maior afinidade. Deste modo, existem cinco tipos de receptor (DP, EP, FP, IP e TP). O receptor EP tem quatro sub-tipos (EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>) (Tabela 6). Os sub-tipos EP<sub>1</sub> e EP<sub>3</sub> também se localizam na membrana nuclear: a estimulação destes receptores modula a concentração de cálcio nuclear e a transcrição genética (Gobeil *et al.*, 2003). Todos estes receptores estão emparelhados com uma proteína G e um de dois sistemas de segundos mensageiros. O primeiro sistema regula os níveis de monofosfato de adenosina (AMP cíclico) pela estimulação ou inibição da enzima adenil-ciclase. O segundo sistema activa a fosfolípase C, que metaboliza o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> promove a libertação de cálcio armazenado no retículo endoplasmático. Por sua vez, o DAG e o cálcio activam a proteína cínase C, que fosforila várias proteínas importantes para o metabolismo e crescimento celulares (Berridge, 1993).

**Tabela 6** – Prostanóides e seus receptores ligados a proteína G

<b>Prostanóide</b>	<b>Receptor</b>	<b>Segundo mensageiro</b>
PGD <sub>2</sub>	DP	↑ AMPc
PGE <sub>2</sub>	EP <sub>1</sub>	↑ Ca <sup>2+</sup>
	EP <sub>2</sub>	↑ AMPc
	EP <sub>3</sub>	↓/↑ AMPc
		↑ Ca <sup>2+</sup>
EP <sub>4</sub>	↑ AMPc	
PGF <sub>2α</sub>	FP	↑ Ca <sup>2+</sup>
PGI <sub>2</sub>	IP	↑ AMPc
		↑ Ca <sup>2+</sup>
TXA <sub>2</sub>	TP	↑ AMPc
		↑ Ca <sup>2+</sup>

PPARs Estes receptores são membros de uma família de receptores nucleares, à qual pertencem os receptores para as hormonas esteróides e tireoideia. Os PPARs são factores de transcrição dependentes de ligando e existem três isoformas: PPAR<sub>α</sub>, PPAR<sub>δ</sub> e PPAR<sub>γ</sub> (Gelman *et al.*, 1999). O PPAR<sub>α</sub> foi descrito por Issemann e Green (1990) como uma molécula que medeia a transcrição de genes induzida por determinados fármacos (e. g. fibratos) que são indutores da proliferação dos peroxissomas em roedores. Os PPARs possuem um domínio central capaz de reconhecer determinadas sequências de ADN nos promotores de "genes alvo". Estas sequências são

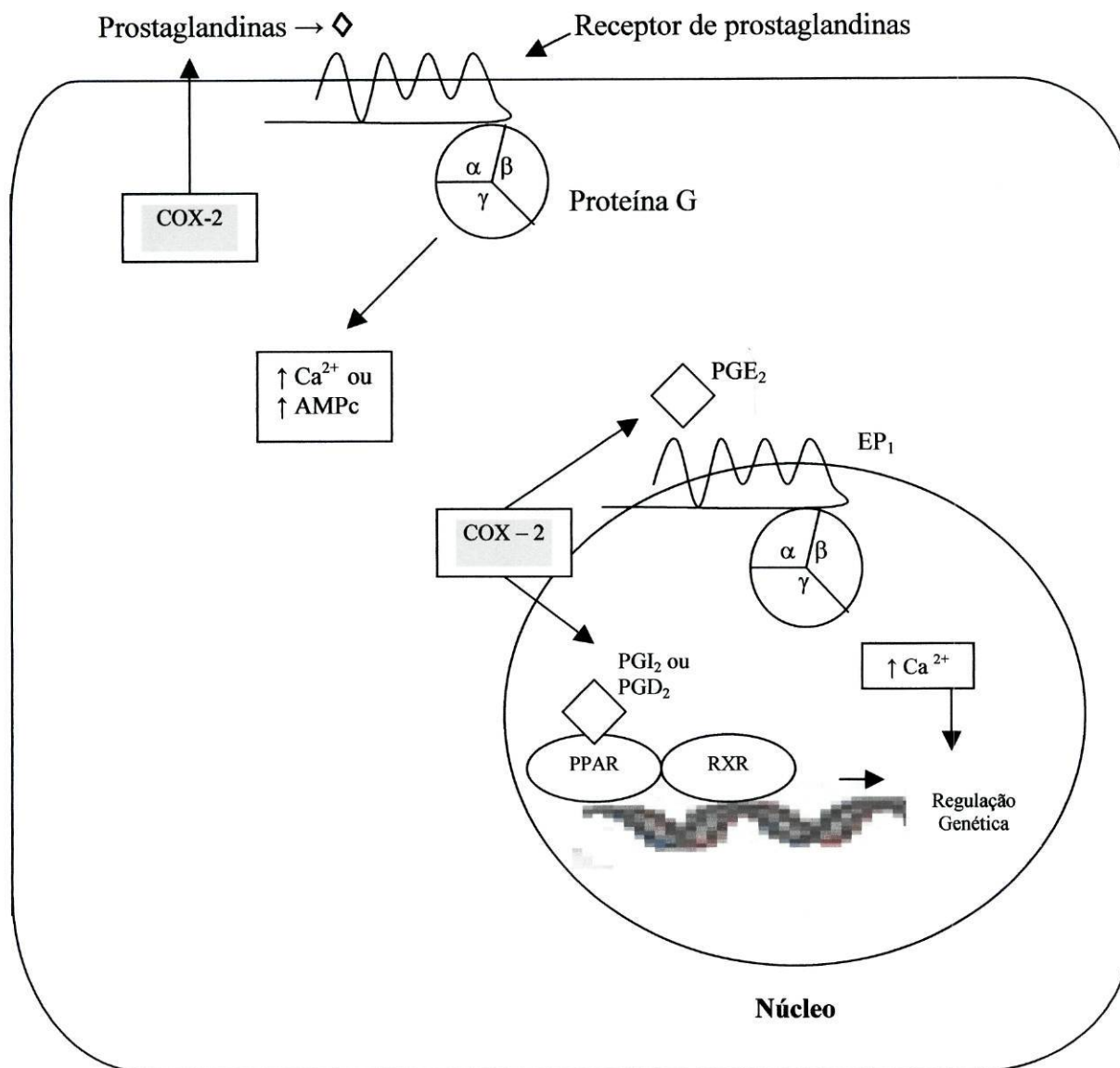
denominadas *PPAR response elements* (PPREs). Os PPARs ligam-se a um PPRE após terem formado um heterodímero com o receptor do ácido retinóico (RXR). A grande maioria dos "genes alvo" codifica proteínas envolvidas no transporte e metabolismo lipídico (Kersten *et al.*, 2000). Os ácidos gordos poli-insaturados e oxidados são ligandos orgânicos dos três sub-tipos de PPARs (Desvergne e Wahli, 1999).

As prostaglandinas PGI<sub>2</sub> e 15d-PGJ<sub>2</sub> são ligandos endógenos do PPAR $\delta$  e PPAR $\gamma$ , respectivamente. A PGI<sub>2</sub> (ou prostaciclina) é das prostaglandinas mais abundantes no tecido vascular (Moncada, 1982). Nos vasos, a prostaciclina exibe uma actividade anticoagulante e vasodilatadora, efeitos que são mediados pelo receptor IP. Por outro lado, a PGI<sub>2</sub> e a COX-2 desempenham um papel crucial na decidualização e na implantação do embrião, aumentando a permeabilidade vascular e promovendo a angiogénese no endométrio. Estes efeitos são mediados pelo PPAR $\delta$ , o que confere a este receptor, à COX-2 e à PGI<sub>2</sub> importância na biologia da reprodução (Hyunjung *et al.*, 2002).

A PGI<sub>2</sub> também pode modular a apoptose através da via de sinalização metácrina (*i.e.*, ligando-se ao PPAR $\delta$ ). Hatae *et al.* (2001) demonstraram que a produção endógena de PGI<sub>2</sub> activa o PPAR $\delta$  expresso numa linha de células renais, induzindo apoptose. Contudo, a administração exógena de PGI<sub>2</sub> às mesmas células originou um efeito oposto. Esta experiência corrobora o paradigma de que um único ligando (PGI<sub>2</sub>) pode provocar respostas celulares distintas, dependendo da via de sinalização activada (Figura 4).

Ao PPAR $\delta$  foi imputada uma acção carcinogénica, após ter sido identificado como um alvo de transcrição pela  $\beta$ -catenina (He *et al.*, 1999). Shao *et al.* (2002) demonstraram que a expressão de PPAR $\delta$  também é aumentada após activação de Ras. Um estudo realizado por Barak *et al.* (2002) permitiu clarificar o papel do PPAR $\delta$  na carcinogénese colo-rectal, concluindo que o PPAR $\delta$  não é essencial para a formação de pólipos intestinais em ratinhos *knockout* para o gene *PPARD* e com mutação do *APC* (*APC<sup>min</sup>*). Neste modelo animal, Barak verificou que os ratinhos apresentavam numerosos pólipos intestinais, mostrando de forma inequívoca que a presença de PPAR $\delta$  não é necessária para a formação de pólipos intestinais.

Embora o PPAR $\gamma$  tenha sido inicialmente identificado como um factor de transcrição essencial para o processo de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, existe actualmente evidência de que este receptor também participa na regulação de diversos mecanismos celulares em macrófagos, linfócitos e células epiteliais (Tontonoz *et al.*, 1994). O PPAR $\gamma$  pode inibir a expressão de factores de transcrição como o NF- $\kappa$ B, STATs, proteína activante 1 (AP-1) e, conseqüentemente, exercer uma acção anti-inflamatória, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (*e. g.* TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) (Jiang *et al.*, 1998; Ricote *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2001).



**Figura 4** – Vias de sinalização das prostaglandinas

O PPAR $\gamma$  não só controla a expressão de genes envolvidos na diferenciação celular e inflamação, como também está envolvido na regulação do ciclo celular e apoptose (Kersten, 2000). A activação deste receptor nuclear exerce uma acção inibitória na progressão do ciclo celular, nomeadamente na transição da fase G $_1$  para a fase S, através de vários mecanismos. Um dos primeiros mecanismos a ser identificado foi o da inibição da actividade dos factores de transcrição E2F/DP (que regulam a expressão de genes importantes para a síntese de ADN), via inibição directa da proteína fosfatásica PP2A, ou ainda pela activação da proteína do retinoblastoma (RB) (Altiok *et al.*, 1997; Fajas *et al.*, 2003). Outros mecanismos activados pelo PPAR $\gamma$  para frenar o ciclo celular são a estimulação dos inibidores das cínases dependentes de ciclinas p18 e p21, a redução da expressão de ciclina D $_1$  e ainda a inibição da Akt/ PKB (Morrison *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2002).

A estimulação do PPAR $\gamma$  pode ter um efeito supressor tumoral. Vários estudos demonstraram que as tiazolidinedionas, agonistas sintéticos do PPAR $\gamma$ , inibem o crescimento de diversas linhas celulares tumorais, incluindo carcinomas da mama, próstata, cólon e estômago (Elstner *et al.*, 1998; Kubota *et al.*, 1998; Sarraf *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000). Por outro lado, o PPAR $\gamma$  regula os níveis citoplasmáticos de  $\beta$ -catenina, e a inactivação do gene *PPARG* tem um efeito promotor da carcinogénese no cólon e recto (Girnun *et al.*, 2002). Em ratinhos que transcrevem normalmente gene *APC*, a inactivação mono-alélica do *PPARG* é suficiente para aumentar os níveis de  $\beta$ -catenina e promover o processo de carcinogénese. Contudo, o papel do PPAR $\gamma$  na carcinogénese colo-rectal parece ser relativamente limitado, uma vez que ratinhos com mutação prévia do *APC* desenvolvem tumores independentemente do estado do PPAR $\gamma$  (Girnun *et al.*, 2002).

Badawi *et al.* (2003) determinaram a expressão de ARN mensageiro de COX-2 e PPAR $\gamma$  e concentrações de PGE $_2$  e 15d-PGJ $_2$  em tecido mamário não neoplásico e em carcinomas da mama. Estes investigadores observaram, por um lado, um aumento de expressão de COX-2 e níveis de PGE $_2$  e, por outro lado, uma diminuição de PPAR $\gamma$  e 15d-PGJ $_2$  nos carcinomas, quando comparado com tecido mamário não neoplásico. Os autores sugeriram que a COX-2 e o PPAR $\gamma$  poderão actuar de forma coordenada e complementar no processo de cancerização mamária.

As células endoteliais exprimem PPAR $\gamma$  e os ligandos para este receptor podem inibir a proliferação induzida por factores de crescimento nestas células e até promover a apoptose *in vitro* (Xin *et al.*, 1999; Bishop-Bailey *et al.*, 1999). Panigrahy *et al.* (2002) demonstraram que o PPAR $\gamma$  é expresso fortemente no endotélio de vasos tumorais. Estes investigadores descobriram que a estimulação do PPAR $\gamma$  pela rosiglitazona (uma tiazolidinediona) suprime o crescimento tumoral e inibe a metastização por efeitos anti-angiogénicos directos (inibição da proliferação celular endotelial estimulada pelo factor de crescimento fibroblástico – bFGF) e indirectos (inibição da produção do factor de crescimento vascular endotelial – VEGF – pelas células neoplásicas).

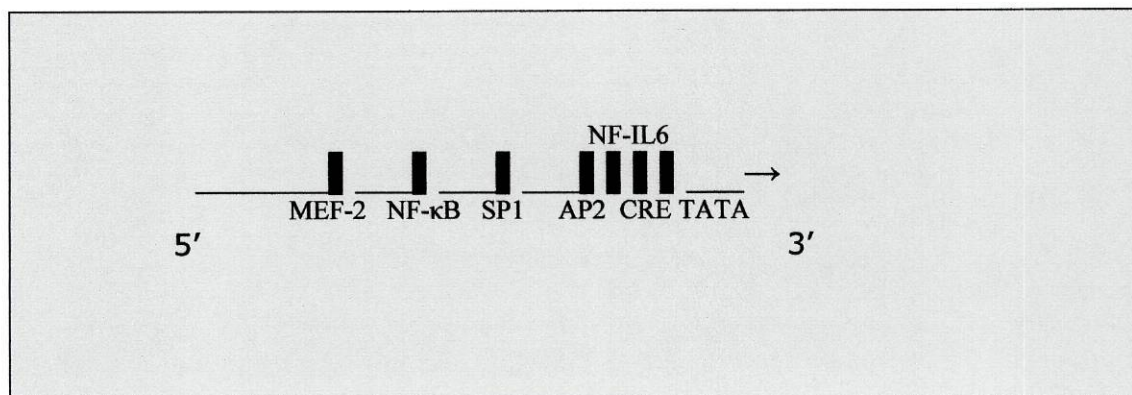
Em resumo, a estimulação do PPAR $\gamma$  resulta na inibição do crescimento de várias linhas celulares neoplásicas *in vitro* e em modelos animais. No modelo de cancerização colo-rectal, o PPAR $\gamma$  comporta-se como um gene supressor tumoral. A acção onco-supressora do PPAR $\gamma$  reflecte-se directamente nas células neoplásicas, bem como indirectamente, pela capacidade de suprimir a angiogénese.

### O gene *prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2)*

O gene que codifica a COX-2 é designado por *PTGS2* e localiza-se no cromossoma 1q25.2-25.3 (Tay *et al.*, 1994). A estrutura deste gene foi caracterizada por Appleby *et al.* (1994).

Na extremidade 5' do gene encontra-se uma sequência de nucleotídeos TATAA denominada *TATA box*, que é importante para a regulação da

transcrição do gene. Esta sequência localiza-se 25 bases a montante do local de início da transcrição. Ao longo da região referida existem várias sequências de consenso (ou sequências *cis*, reguladoras da transcrição no promotor do gene) para os seguintes factores *trans* (factores, quase sempre proteínas, que interactivam com os elementos *cis*): três para o SP1, duas para o NF-κB, duas para a AP-2, uma para o AMPc (*cyclic AMP response element* – CRE), uma para o factor nuclear para a expressão de IL-6 (NF-IL6) e uma para o Ets-1 (Appleby *et al.*, 1994; Kosaka *et al.*, 1994). Meade *et al.* (1999) encontraram uma sequência PPRE localizada aproximadamente a 3900 pares de base a montante do local de início da transcrição. Recentemente, uma sequência para o *Tcf-4-binding element* (TBE) foi identificada no promotor do gene *PTGS2* por Araki *et al.* (2003) (Figura 5).



**Fig. 5** – Região de flanco 5' do gene *PTGS2* e factores *cis*

A região codificante do gene *PTGS2* engloba dez exões e nove intrões. O exão 10 é particularmente longo, incluindo os últimos 410 pares de base da região codificante e ainda os 2550 pares de base da extremidade 3' não traduzida (*3' untranslated region* – *3' UTR*) (Appleby *et al.*, 1994).

### Regulação da expressão do gene *PTGS2*

Em situações fisiológicas, a COX-2 não é expressa na maioria dos tecidos, mas a sua expressão pode ser induzida em resposta a vários agentes, referidos anteriormente. A indução da transcrição é rápida, semelhante à que se observa para o gene *c-fos*, o que permite classificar o gene *PTGS2* como um *intermediate-early response gene* (Maier *et al.*, 1990).

A COX-2 é referida como a isoforma induzível, em oposição à COX-1, a isoforma constitucional. No entanto, a COX-2 também é expressa de forma constitucional nalguns órgãos em condições fisiológicas, como por exemplo no encéfalo, testículos, epitélio da traqueia e mácula densa do rim, desempenhando um papel homeostático (Yamagata *et al.*, 1993; Walenga

*et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1994). Por outro lado, a COX-2 é expressa de forma constitucional em vários tipos de neoplasia (ver adiante).

A expressão do gene *PTGS2* é regulada na transcrição do ADN e na estabilização do ARNm, que é pouco estável, degradando-se rapidamente (Chen *et al.*, 1995). Deste modo, a eficiência da síntese proteica de COX-2 depende dos níveis de transcrição do respectivo gene, assim como do grau de estabilidade do ARNm. Na regulação da expressão do gene participam os elementos *cis* e *trans* mencionados anteriormente. O gene *PTGS2* é regulado por múltiplos agentes, como seguidamente se descreve. Raramente, o mesmo agente pode activar ou inibir a transcrição do gene, dependendo do tipo de linha celular.

### Agentes indutores da expressão do gene *PTGS2*

***IL-1*** A isoforma  $IL-1\alpha$  regula a expressão de COX-2 em miofibroblastos (Mifflin *et al.*, 2002). Para induzir a transcrição do gene *PTGS2* é necessária a activação prévia das vias de transdução de sinal  $NF-\kappa B$ , ERK e p38 MAPK. A PKC aumenta a estabilidade do ARNm nestas células.

Nas células do estroma endometrial, a isoforma  $\beta$  desta interleucina eleva os níveis de COX-2 essencialmente por conferir estabilidade do ARNm (Tamura *et al.*, 2002). A via de transdução de sinal ERK é essencial para mediar este efeito. Nas células do estroma endometrial, ao contrário do que se verifica nos miofibroblastos, a inibição da p38 MAPK ou da PKC não altera os níveis de COX-2 (Tamura *et al.*, 2002).

Numa linha de carcinoma gástrico (AGS), a  $IL-1\beta$  induz igualmente a expressão de COX-2 (Fan *et al.*, 2001). Nestas células, a  $IL-1\beta$  aumenta a actividade da ERK e p38 MAPK.

Em condrócitos do revestimento articular, a  $IL-1\beta$  estimula a transcrição do *PTGS2*, desempenhando os factores *trans* CCAAT enhancer binding protein (C/EBP)  $\delta$  e  $\beta$  (estes factores reconhecem os elementos *cis*  $NF-IL6$  e CRE no promotor do gene ) um papel essencial (Thomas *et al.*, 2000).

Resumindo, a  $IL-1$  induz a expressão de COX-2 recorrendo a várias vias de transdução de sinal, que regulam a transcrição do gene e a estabilidade do ARNm.

***TNF- $\alpha$***  Numa linha de células osteoblásticas murinas (MC3T3-E1), o  $TNF-\alpha$  estimula a expressão de COX-2 de uma forma dependente da dose e tempo (Yamamoto *et al.*, 1995). Neste sistema, o  $NF-\kappa B$  e o  $NF-IL6$  estão envolvidos na indução da transcrição do gene *PTGS2*.

Outro estudo, utilizando células epiteliais do cólon (HT-29), demonstrou que o  $NF-\kappa B$  medeia a transcrição deste gene induzida pelo  $TNF-\alpha$  (Jobin *et al.*, 1998). Nas células HT-29, o bloqueio específico do  $NF-\kappa B$  inibe a expressão do gene *PTGS2*.

EGF-R e ligandos A administração de TGF- $\alpha$ , um ligando do EGF-R, ao compartimento baso-lateral de uma linha de células neoplásicas do cólon (HLA-7), induz um aumento marcado da imunorreactividade de COX-2 no pólo basal das células (Coffey *et al.*, 1997). O aumento da expressão de COX-2 traduz-se num incremento dos níveis de prostaglandinas, que é dependente da dose e duração da administração de TGF- $\alpha$ . O bloqueio do EGF-R acarreta uma redução da expressão de COX-2.

O interferão  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) desempenha um papel importante na regulação do processo inflamatório e na proliferação e diferenciação celular epidérmica. Matsuura *et al.* (1999) demonstraram que o IFN- $\gamma$  induz a expressão de COX-2 em queratinócitos humanos normais. Esta indução é parcialmente mediada pela activação do EGF-R e está relacionada com o aumento de expressão de TGF- $\alpha$ . A sequência *cis* CRE é importante para a regulação da transcrição do gene *PTGS2* induzida pelos ligandos do EGF-R (Matsuura *et al.*, 1999). As vias de transdução de sinal activadas são a ERK e p38 MAPK. A primeira actua a nível da transcrição do ADN e, a segunda, promove a estabilização do ARNm.

Paradoxalmente, o IFN- $\gamma$  suprime a actividade do promotor do gene *PTGS2* na linha celular DLD-1 (uma linha de carcinoma do cólon) e em células da micróglia (Minghetti *et al.*, 1996; Mutoh *et al.*, 2000). Os efeitos do IFN- $\gamma$  sobre o gene *PTGS2* não são uniformes e dependem do tipo de células sobre as quais actua.

c-erb-B2 Este receptor tem a capacidade de regular a expressão de COX-2. Vadlamudi *et al.* (1999) estudaram a expressão e activação de membros da família HER e investigaram a regulação da expressão de COX-2 pela via do c-erb-B2. Este grupo concluiu que a inibição do heterodímero c-erb-B2/c-erb-B3 por um anticorpo monoclonal anti-c-erb-B3 acarreta uma diminuição da expressão de COX-2. Por seu lado, a activação deste heterodímero induz a expressão de COX-2.

Ras A indução da expressão de COX-2 pela Ras é regulada a nível da transcrição e da estabilização do ARNm (Sheng *et al.*, 2001A). As vias de transdução de sinal efectoras da Ras Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt/PKB são ambas necessárias para a indução da transcrição do gene *PTGS2*, sendo a primeira mais importante do que a segunda: a activação da ERK é essencial para aumentar a transcrição do ADN (desempenhando um papel secundário na estabilização do RNAm), enquanto que a actividade da Akt/PKB é a responsável pela estabilização do ARNm (Sheng *et al.*, 2001A). A via Raf/MEK/ERK requer a presença de C/EBP $\beta$  para induzir a transcrição do *PTGS2* (Reddy *et al.*, 2000).

APC A inactivação de APC tem como consequência o aumento de transcrição de vários genes. O gene que codifica a COX-2 possui uma sequência *cis* TBE, o que o qualifica de "gene alvo" da via do APC (Araki *et al.*, 2003). Na linha celular HuH7 (linha de carcinoma hepatocelular), o aumento da transcrição do gene *PTGS2* pelo complexo  $\beta$ -catenina/Tcf-4, por si só, não se traduz num aumento dos níveis de proteína COX-2. A

$\beta$ -catenina necessita da cooperação do Ras para estabilizar o ARNm e assim aumentar os níveis de COX-2 (Araki *et al.*, 2003).

TGF- $\beta$  O TGF- $\beta$  aumenta a expressão de COX-2 de forma sinérgica com a Ras (Sheng *et al.*, 2000). O TGF- $\beta$  não regula a transcrição do gene, mas aumenta a estabilidade do ARNm, prolongando a sua semi-vida (Sheng *et al.*, 2000).

PDGF Este factor de crescimento derivado das plaquetas induz a expressão de COX-2, activando as vias de transdução de sinal Ras/JNK e Ras/Raf/ERK (Xie *et al.*, 1996). O CRE é essencial para a transcrição do gene induzida pelo PDGF (Xie *et al.*, 1996).

Gastrina Esta hormona gastro-intestinal é produzida pelas células G do antro gástrico (Rozenfurt *et al.*, 2001). Ligando-se ao receptor colecistocinina B (CCK-BR), a gastrina induz a expressão de COX-2 (Guo *et al.*, 2002). Esta acção requer a activação independente de ligando do EGF-R (transactivação) e estimulação de vias de transdução de sinal dependentes da MAPK, incluindo a via ERK5/*myocyte enhancer factor-2* (MEF2) (Guo *et al.*, 2002).

H. pylori Esta bactéria é geradora de uma resposta inflamatória, em que há produção e libertação de radicais de oxigénio por neutrófilos activados (Tsuji *et al.*, 1996). O factor de transcrição NF- $\kappa$ B é activado por radicais de oxigénio e inibido por agentes anti-oxidantes (Meyer *et al.*, 1993). Kim *et al.* (2001) demonstraram que *H. pylori* induz a expressão de COX-2 mediada pela activação do NF- $\kappa$ B.

As estirpes de *H. pylori cag A*(+) associam-se a níveis mais elevados de COX-2, quando comparadas com estirpes *cag A*(-) (Guo *et al.*, 2003). As estirpes *cag A* (+) são aquelas que provocam os níveis mais elevados de radicais de oxigénio, o que provavelmente se traduz numa estimulação mais intensa do NF- $\kappa$ B (Papa *et al.*, 2002).

A infecção crónica por *H. pylori* induz hipergastrinemia, pelo que esta bactéria também pode estimular a expressão de COX-2 indirectamente (Konturek *et al.*, 2001; Levi *et al.*, 1989).

Lipopolissacarídeo (LPS) Esta molécula é parte integrante da parede celular das bactérias Gram-negativas (*e. g. H.pylori*). O LPS induz a expressão de COX-2 activando o promotor do gene através do factor C/EBP $\delta$ , que apresenta afinidade para o NF-IL6 e CRE (Inoue *et al.*, 1995).

Ácidos biliares e ésteres do forbol Os ácidos quenodeoxicólico e deoxicólico podem actuar como promotores tumorais (Hill *et al.*, 1991). Ao estimularem a PKC, estes ácidos aumentam a transcrição do gene *PTGS2* (Zhang *et al.*, 1998). A PKC modula a expressão genética através da AP-1, que pode activar o promotor do *PTGS2* ligando-se ao CRE (Xie *et al.*, 1995).

Os ésteres do forbol também activam a PKC (de forma irreversível) (Angel *et al.*, 1991). A indução de COX-2 mediada por estes agentes permite explicar, em parte, o seu efeito promotor tumoral.

**PPARs** Os ligandos para estes receptores nucleares podem induzir ou aumentar a expressão de COX-2, dado que existe uma sequência PPRE no promotor do gene *PTGS2* (Meade *et al.*, 1999). Entre os ligandos dos PPARs encontram-se ácidos gordos, prostaglandinas e AINEs, ou seja substractos, produtos e inibidores de COX-2 (Meade *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 1997; Forman *et al.*, 1997). Vários trabalhos caracterizaram o efeito destes ligandos na regulação do gene da COX-2. Por um lado, alguns estudos demonstram uma acção estimuladora na transcrição deste gene e, por outro lado, também há trabalhos que provam a existência de uma acção supressora da transcrição do *PTGS2*. Subbaramaiah *et al.* (2001) verificaram que ligandos do PPAR $\gamma$  (tiazolidinedionas e 15d-PGJ<sub>2</sub>) inibem a expressão de COX-2 induzida por um éster do forbol em células epiteliais. De forma semelhante, Staels *et al.* (1998) mostraram que activadores do PPAR $\alpha$  podem inibir a expressão de vários genes envolvidos na resposta inflamatória, incluindo o *PTGS2*, em células musculares lisas. Meade *et al.* (1999) observaram um aumento da transcrição do gene *PTGS2* induzido por ácidos gordos, prostaglandinas A<sub>2</sub> e J<sub>2</sub> (mas não pela PGE<sub>2</sub>) e vários AINEs (meclofenamato, ácido mefenâmico, ibuprofeno e sulindac) em células epiteliais mamárias e do cólon. Por seu lado, Glinghammar *et al.* (2003) concluíram que a activação do PPAR $\delta$  por um agonista selectivo (GW 501516) induz a expressão do gene da COX-2 e aumenta a proliferação celular numa linha de carcinoma hepatocelular (Hep G2).

É provável que a regulação do gene *PTGS2* por ligandos dos PPARs envolva vários mecanismos, e que a resposta predominante seja específica do tipo de tecido.

**PGE<sub>2</sub>** Esta prostaglandina, um dos principais produtos provenientes da actividade catalítica de COX-2, pode induzir e amplificar a expressão de COX-2 por autocrinia e paracrinia. Diversos trabalhos demonstraram este mecanismo de *feed-back* positivo em diferentes tipos de células: monócitos sanguíneos, micróglia (no rato), macrófagos e queratinócitos murinos (Minghetti *et al.*, 1997; Hinz *et al.*, 2000A e B; Maldve *et al.*, 2000). Este efeito é mediado pelo receptor EP<sub>2</sub>, que eleva os níveis citoplasmáticos de AMPc (Maldve *et al.*, 2000).

Recentemente, Pai *et al.* (2002) demonstraram que a PGE<sub>2</sub> pode transactivar o EGF-R. Esta transactivação envolve a libertação de TGF- $\alpha$  (um ligando do EGF-R), provavelmente mediada por metaloproteínases activadas pela cínase da tirosina c-Src.

Em resumo, a PGE<sub>2</sub> pode induzir a expressão de COX-2 pela activação do EP<sub>2</sub> e pela transactivação do EGF-R. Por acção autócrina, a PGE<sub>2</sub> pode amplificar a expressão de COX-2 e, por via parácrina, esta prostaglandina pode induzir *de novo* a expressão de COX-2 em células vizinhas.

**HuR** O ARNm da COX-2 é instável devido à presença de AREs, tendo consequentemente uma semi-vida curta (Dixon *et al.*, 2000). A proteína

HuR, expressa ubiquitariamente, é membro da família de proteínas que são codificadas pelos genes *embryonic lethal abnormal vision* (ELAV), que são proteínas capazes de se ligar a AREs e estabilizar o ARNm de vários genes, incluindo o da COX-2 (Dixon *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 1997). Deste modo, os níveis celulares do factor HuR controlam directamente a expressão da proteína COX-2. Níveis elevados deste factor são responsáveis pela estabilização do ARNm da COX-2, aumentando a semi-vida do ARNm e, deste modo, permitindo uma maior síntese proteica.

Utilizando duas linhas celulares de carcinoma do cólon – HT29 e LoVo – Dixon *et al.* (2001) verificaram que a regulação da expressão de COX-2 reside na eficácia translaccional e no grau de estabilidade do ARNm. Ambas as linhas celulares estudadas por estes investigadores apresentam activação constitucional da transcrição do gene *PTGS2*, embora o nível de transcrição fosse superior nas células LoVo, quando comparado com o das células HT29. Contudo, as células HT29 exprimem seis a sete vezes mais proteína do que as células LoVo. A semi-vida do ARNm das células LoVo é de 44 minutos, mas o das células HT29 é de 210 minutos. Dixon *et al.* demonstraram que a diferença entre as duas semi-vidas observadas é devida à diferença de concentração e ligação do factor HuR ao ARNm. Nas células HT29, a ligação deste factor ao ARNm é quase quatro vezes superior à das células LoVo, que apresentam uma expressão reduzida deste factor de estabilidade.

Os resultados obtidos por Dixon *et al.* (2001) são importantes para explicar a variabilidade de expressão de COX-2 observada em diversas neoplasias e linhas celulares que exprimem COX-2 de forma constitucional (Kargman *et al.*, 1995; Dubois *et al.*, 1996; Sheng *et al.*, 1997; Dimberg *et al.*, 1999).

### Agentes inibidores da expressão do gene *PTGS2*

*p53* Recorrendo a linhas celulares de fibroblastos murinos, Subbaramaiah *et al.* (1999) observaram que a proteína p53 normal inibe a transcrição do gene da COX-2. Por outro lado, os níveis de COX-2 não sofrem alterações significativas nas linhas celulares com p53 mutada.

A p53 é capaz de suprimir a expressão de genes em cujos promotores existe uma sequência TATA, através da inibição da ligação da TBP ao promotor do gene (Mack *et al.*, 1993). No estudo referido, os autores verificaram que a p53 compete com a TBP para a ligação à sequência TATA nos promotores murino e humano do gene *PTGS2*.

Numa série de 39 adenocarcinomas gástricos, Leung *et al.* (2001) estudaram a associação entre expressão imuno-histoquímica de COX-2 e a presença de mutações de p53. Estes investigadores observaram uma "sobre-expressão" de COX-2 em 49% dos casos e detectaram a presença de mutações de p53 em 51% dos casos, tendo constatado que os tumores com mutação da p53 apresentavam uma intensidade de expressão de COX-2 significativamente superior à dos tumores sem mutações da p53.

A supressão de expressão de COX-2 por uma p53 normal pode explicar, por um lado, o facto da COX-2 não ser detectada em células epiteliais normais e, por outro lado, permite compreender porque razão as mutações

da p53 contribuem para um reforço da expressão de COX-2 observada em células malignas (Kargman *et al.*, 1995; Sano *et al.*, 1995; Ristimaki *et al.*, 1997; Muller-Decker *et al.*, 1995).

IL-4, IL-10 e IL-13 Estas citocinas são produzidas por linfócitos T<sub>H</sub>2, que desempenham um papel importante na resposta imune mediada por anticorpos e na activação de mastócitos e eosinófilos (Carter *et al.*, 1996). Alguns trabalhos mostraram que estas citocinas inibem a expressão de COX-2 e a produção de prostaglandinas em células normais e neoplásicas (Molina-Holgado *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2001; Pomini *et al.*, 1999). Curiosamente, a PGE<sub>2</sub> induz a produção de IL-10 em monócitos, linfócitos e no carcinoma de células não pequenas do pulmão (Huang *et al.*, 1998). Este mecanismo de regulação autócrina/parácrina em células normais é considerado uma forma importante da PGE<sub>2</sub> mediar a homeostasia entre as respostas imunes de tipo T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2 (Vancheri *et al.*, 2001).

Recentemente, Heuze-Vourc'h *et al.* (2003) investigaram o efeito da IL-10 em relação à expressão de COX-2 em três linhas de carcinoma de células não pequenas do pulmão (que exprimem COX-2) e constataram que esta citocina não modificou a expressão de COX-2. Os investigadores verificaram que a ausência de efeito se deveu à ausência de expressão do receptor para a IL-10 na membrana celular das células neoplásicas. A ausência de expressão deste receptor pode, deste modo, contribuir para a manutenção de níveis elevados de expressão de COX-2.

Glucocorticóides A dexametasona, um glucocorticóide sintético, inibe a actividade da p38 MAPK (que promove a estabilização do ARNm), suprimindo a expressão de COX-2 (Lasa *et al.*, 2001). Outros mecanismos descritos para a inibição de expressão de genes pelos corticóides são a indução da expressão de I $\kappa$ B, um inibidor do NF- $\kappa$ B, e a inibição de JNK (Auphan *et al.*, 1995; Caelles *et al.*, 1997).

#### Expressão de COX-2 e instabilidade de microssatélites

A expressão de COX-2 é menos frequente nos carcinomas gástricos e colo-rectais com instabilidade de microssatélites (Karnes *et al.*, 1998; Sinicrope *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001). Lee *et al.* (2001) analisaram a expressão de COX-2 e a presença de instabilidade de microssatélites numa série de 109 carcinomas gástricos. Estes investigadores observaram uma "sobre-expressão" de COX-2 em 64% dos casos e a presença de instabilidade de microssatélites elevada (MSI-H) em 22% dos carcinomas. No grupo dos carcinomas com MSI-H, a frequência de expressão de COX-2 e a intensidade da imunoreactividade foram significativamente inferiores, quando comparados com os tumores sem instabilidade de microssatélites.

Os mecanismos moleculares subjacentes à associação entre redução de expressão de COX-2 e MSI-H permanecem por esclarecer. O facto de que a inactivação do TGF- $\beta$  RII ser muito mais frequente nos carcinomas MSI-H pode contribuir para uma menor estimulação da expressão de COX-2. Por outro lado, Toyota *et al.* (2000) demonstraram a existência de metilação aberrante do promotor do gene *PTGS2* em carcinomas colo-rectais. Contudo, estes investigadores não encontraram uma associação estatisticamente significativa entre metilação do promotor do gene *PTGS2* e do gene *hMLH1*, a causa mais frequente de MSI-H nos carcinomas esporádicos do cólon-recto e estômago (Markowitz *et al.*, 1995; Ahuja *et al.*, 1997). No entanto, no estudo de Toyota *et al.* verificou-se a existência de uma associação entre metilação do promotor do gene da COX-2 e o fenótipo CIMP.

### Metilação do promotor do gene *PTGS2*

A metilação aberrante do ADN ocorre frequentemente nos tumores malignos humanos, sob a forma de hipometilação difusa do genoma e hipermetilação focal (Feniberg *et al.*, 1983; Baylin *et al.*, 1998). A metilação é efectuada em resíduos de citosina, quando estes precedem um resíduo de guanosina (abreviado CpG) e ocorre em "ilhas CpG" (definidas como 776 fragmentos de pares de base com um conteúdo de G+C superior a 0,57 e uma presença observada/esperada de CpG > 0,8) (Bird *et al.*, 1986; Gardiner-Garden *et al.*, 1987). A hipermetilação de uma ilha CpG em regiões normalmente não metiladas do promotor de um gene correlaciona-se com supressão da transcrição desse gene (Nguyen *et al.*, 2001).

A hipermetilação de vários promotores de genes foi descrita em carcinomas gástricos esporádicos, incluindo os genes *hMLH1*, *p16* e *PTGS2* (Fleisher *et al.*, 1999; Shim *et al.*, 2000; Kikuchi *et al.*, 2003). O grau de metilação e o número dos promotores génicos metilados aumentam ao longo da via que conduz ao adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal (Kang *et al.*, 2003).

Toyota *et al.* (2000) estudaram o estado de metilação do *PTGS2* numa série de linhas celulares e tumores colo-rectais. Neste estudo, os autores caracterizaram a ilha CpG na região 5' do *PTGS2*. Esta ilha CpG engloba 350 pares de bases, tem uma taxa de CpG:CpC de 0,8 e um conteúdo de G+C de 0,64. Segundo estes autores, a localização da ilha CpG é algo atípica, na medida em que está situada logo após o local de início de transcrição. Estes investigadores observaram metilação aberrante em 13% de carcinomas colo-rectais esporádicos e em 14% de adenomas colo-rectais seleccionados ao acaso. A metilação aberrante do *PTGS2* associou-se, neste estudo, ao fenótipo CIMP, mas não a MSI. Toyota *et al.* também caracterizaram a relação entre metilação do promotor do *PTGS2* e expressão imuno-histoquímica de COX-2 em 18 adenocarcinomas, encontrando os seguintes resultados:

<i>Metilação do PTGS2</i>	<i>Imunoreactividade da COX-2</i>		Total
	<i>positivo</i>	<i>negativo</i>	
positivo (H)	0	2	2
positivo (L)	3	3	6
negativo	8	2	10
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>18</b>

positivo (H) – nível elevado de metilação (> 20%)

positivo (L) – nível baixo de metilação (5-20%)

Os investigadores não encontraram nenhuma região crítica ou *hot spot* de metilação para suprimir a transcrição do *PTGS2*. Por seu lado, o grau de densidade de metilação contribui para a perda de expressão do gene através do recrutamento de proteínas que se ligam a grupos metilo e de desacetilases das histonas (Jones *et al.*, 1999).

Posteriormente, Song *et al.* (2001) estudaram a regulação (epigenética) da transcrição do *PTGS2*, com o objectivo de determinar uma região crítica de metilação que suprima a expressão de COX-2. Os investigadores utilizaram seis linhas celulares de carcinoma gástrico. Três destas linhas (SNU-484, -638 e -668) exprimem COX-2 e as três restantes (SNU-601, -620 e -719) não exprimem. Para analisar o padrão fino de metilação do gene *PTGS2* em três das linhas referidas (SNU-484, -601 e -638), os autores recorreram à técnica de modificação pelo bi-sulfito. A ilha CpG do *PTGS2* foi dividida em quatro regiões (A a D), utilizando quatro conjuntos de *primers* de PCR. Após amplificação de cada uma das regiões, os produtos de PCR foram sequenciados. A linha celular SNU-484 apresentou metilação ligeira na extremidade proximal 5' da ilha CpG (regiões A e B), mas não nas restantes regiões (C e D). Nesta linha celular, a intensidade de imunoreactividade da COX-2 foi classificada de (++). Na linha SNU-601, todos os locais de metilação possíveis encontravam-se metilados, e nestas células não se observou imunoreactividade. O tratamento desta linha celular com um agente desmetilante permitiu observar a expressão *de novo* de COX-2. Finalmente, a linha SNU-638 estava densamente metilada nas regiões C e D (de forma idêntica à linha SNU-601), mas a região B apresentava uma densidade de metilação ligeira. Nesta linha observou-se uma imuno-expressão discreta de COX-2 (+).

Estes resultados sugerem que o silenciamento da expressão do gene *PTGS2* depende da localização e intensidade de metilação do respectivo promotor.

Em conformidade com os resultados obtidos por Toyota *et al.* (2000), Song *et al.* (2001) não encontraram uma correlação significativa entre metilação do promotor do *PTGS2* e fenótipo MSI.

A frequência de metilação do promotor do gene *PTGS2* no adenocarcinoma gástrico oscila entre 12 e 46% (Kikuchi *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003). Kang *et al.* (2003) determinaram a frequência de metilação do promotor deste gene (entre outros) ao longo da via que conduz ao adenocarcinoma de tipo intestinal, demonstrando que

a metilação aberrante do promotor do *PTGS2* tende a acumular-se ao longo desta via :

	Gastrite crónica (n=74)	Metaplasia intestinal (n=57)	Adenoma (n=79)	Adenocarcinoma (n=80)
<i>PTGS2</i>	1 (2,2%)	5 (8,8%)	3 (3,8%)	37 (46,3%)

A frequência de metilação do promotor do gene *PTGS2* é baixa nas lesões que precedem o adenocarcinoma, o que levou Kang *et al.* (2003) a considerar *PTGS2* como "gene metilado em relação com cancro".

### COX-2 e carcinogénese

Em meados dos anos 70, Bennett e Del Tacca (1975) e Jaffe (1974) verificaram que a concentração de  $PGE_2$  era mais elevada em carcinomas do cólon e recto, do que na mucosa normal na vizinhança do tumor. Esta descoberta conduziu à hipótese de que fármacos inibidores da síntese de prostaglandinas, nomeadamente os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), poderiam inibir a ocorrência ou o crescimento de cancro colo-rectal.

A primeira observação clínica de que os AINEs poderiam causar a regressão de pólipos do intestino grosso foi feita por Waddell e Loughry (1983). Eles relataram o caso de um doente, cujos pólipos rectais tinham desaparecido com a ingestão de indometacina e sulindac, que o doente utilizava para efeitos de analgesia.

Estas descobertas levaram a numerosos estudos e várias linhas de investigação mostraram que a inibição da via da COX-2 pode ter repercussões significativas na prevenção e tratamento do cancro.

### Evidência epidemiológica

Numerosos estudos epidemiológicos verificaram que indivíduos que ingerem regularmente aspirina ou outros AINEs têm menor risco de desenvolvimento de pólipos adenomatosos ou de morte por cancro colo-rectal, quando comparados com indivíduos que não tomam AINEs (ver revisão de Thun *et al.*, 2002). O uso sustentado de AINEs (por um período de 10 a 15 anos) associa-se a uma redução de 40 a 50% do risco relativo de desenvolver cancro colo-rectal (Giovannucci *et al.*, 1994, 1995; Thun *et al.*, 1991).

O efeito protector dos AINEs foi também observado para o cancro do estômago. Num estudo prospectivo envolvendo 635031 participantes, seguidos durante 6 anos, concluiu-se que os doentes que ingeriam aspirina

(16 ou mais vezes por mês), beneficiavam de uma redução aproximada de 50% do risco relativo de desenvolver carcinoma gástrico, quando comparados com doentes não utilizadores de aspirina (Thun *et al.*, 1993). Um estudo de tipo caso-controlo mostrou que o uso regular de AINEs (pelo menos 4 vezes por semana, durante mais de 3 meses), reduzia o risco de desenvolvimento de cancro gástrico em 30% (Coogan *et al.*, 2000).

Outros estudos epidemiológicos verificaram o mesmo efeito protector dos AINEs em tumores de outros órgãos (esófago, mama, pulmão, próstata, bexiga e ovário) (ver revisão de Thun *et al.*, 2002), mas os estudos respeitantes aos órgãos referidos são relativamente escassos e os resultados nem sempre são consistentes.

### Estudos genéticos

Estudos genéticos realizados em animais mostram claramente a existência de uma relação causa-efeito entre COX-2 e tumorigénese. O estudo realizado por Liu *et al.* (2001) foi o primeiro a demonstrar que a "sobre-expressão" de COX-2 é suficiente para induzir transformação maligna. Neste estudo foram utilizados ratinhos transgénicos que exprimiam o gene humano da COX-2 nas glândulas mamárias durante a gravidez e lactação (induzido pelo promotor do vírus tumoral mamário murino). As fêmeas múltiparas desenvolveram hiperplasia glandular mamária focal, displasia e tumores metastáticos. Um estudo semelhante demonstrou que a expressão de COX-2 nos queratinócitos basais de ratinhos transgénicos originou hiperplasia e displasia da epiderme, estabelecendo uma associação causal entre expressão aumentada de COX-2 e o desenvolvimento de lesão pré-maligna da pele (Neufang *et al.*, 2001).

A evidência mais directa implicando a COX-2 na carcinogénese colo-rectal também provém de estudos genéticos em ratinhos. O papel desta enzima foi evidenciado por Oshima *et al.* (1996), em ratinhos  $Apc^{\Delta 716}$  (modelo murino da PAF humana) com *knockout* para o gene da COX-2 ( $Cox2^{-/-}$ ). Os animais apresentavam uma redução do tamanho e número (86%) de pólipos, quando comparados com ratinhos *wild-type*.

O papel da COX-2 do hospedeiro foi salientado por Williams *et al.* (2000A). Estes investigadores introduziram uma linha celular de carcinoma do pulmão (designada Lewis) na hipoderme do flanco de ratinhos  $Cox2^{-/-}$  e verificaram que o crescimento destas células era mais lento do que nos ratinhos *wild-type*. Esta experiência demonstra que a presença de COX-2 no estroma do tumor pode promover o crescimento tumoral.

Estudos farmacológicos, por seu lado, mostram que a COX-2 constitui um alvo terapêutico. Vários modelos animais foram utilizados para estudar os efeitos da inibição de COX-2 por AINEs em várias neoplasias (cólon e recto, esófago, língua, mama, pele, pulmão e bexiga) (ver revisões de Gupta *et al.*, 2001 e Subbaramaiah *et al.*, 2003). Estes estudos evidenciaram que inibidores selectivos e não selectivos de COX-2 podem ser potentes supressores da carcinogénese. No entanto, os AINEs possuem outros efeitos farmacológicos anti-tumorais, que são independentes da inibição de COX-2: em doses elevadas, os AINEs podem induzir apoptose em linhas celulares

de cancro colo-rectal sem actividade mensurável de COX-1 e COX-2 (Hanif *et al.*, 1996 e Williams *et al.*, 2000B).

### Ensaio clínico

Ensaio clínico randomizado realizado em doentes com polipose adenomatosa familiar (PAF) demonstraram que o sulindac (Labayle *et al.*, 1991; Giardiello *et al.*, 1993) e o celecoxib (Steinbach *et al.*, 2000) inibem o aparecimento de pólipos adenomatosos e induzem a regressão de pólipos pré-existentes. No estudo realizado por Giardiello *et al.* (1993), o grupo de doentes tratado com sulindac (300 mg/dia) beneficiou de um decréscimo de 44% no número e de 35% no maior tamanho dos pólipos. Contudo, não se observou em qualquer dos doentes uma regressão completa dos pólipos e o número e o tamanho destes aumentou após 3 meses de suspensão do sulindac.

Steinbach *et al.* (2000) estudaram o efeito do celecoxib em 77 doentes com PAF. Após 6 meses de tratamento com este medicamento (800 mg/dia), foi observada uma redução de 28% no número e uma redução de 30% no tamanho dos pólipos. Com base nestes resultados, o celecoxib foi aprovado formalmente pela *Food and Drug Administration* (EUA) como suplemento ao tratamento cirúrgico em doentes com PAF.

Recentemente, dois ensaios clínicos randomizados, com o objectivo de determinar o efeito do ácido acetilsalicílico (aspirina) sobre a incidência de adenomas colo-rectais, foram concluídos (Sandler *et al.*, 2003; Baron *et al.*, 2003). Ambos os estudos demonstraram que a aspirina reduz moderadamente a incidência de adenomas em doentes com antecedentes de adenomas e cancro colo-rectal.

### Produção de mutagénicos

A "sobre-expressão" de COX-2 pode resultar num aumento da produção de mutagénicos. O malondialdeído (MDA) pode ser sintetizado por isomerização da PGH<sub>2</sub> (Plastaras *et al.*, 2000). O MDA forma *adducts* com deoxinucleotídeos, induz mutações de tipo *frame-shift* e substituições de pares de bases (Marnett, 1992). Carcinogénicos adicionais podem ser formados pela COX-2 a partir da oxidação de amins aromáticas, amins heterocíclicas e derivados dihidrodiol de hidrocarbonetos policíclicos (Wiese *et al.*, 2001).

### Proliferação celular

Reinhart *et al.* (1983) demonstraram que a administração crónica de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> provoca um aumento da espessura da mucosa no cólon proximal, duodeno e em todo o estômago (sobretudo no antro) de ratos. Estes autores observaram aumento do índice mitótico e hiperplasia foveolar no estômago. Recentemente, o mecanismo molecular subjacente a estas

acções tróficas foi esclarecido por Pai *et al.* (2002). Este grupo demonstrou que a PGE<sub>2</sub> pode transactivar o receptor para o EGF através do TGF- $\alpha$ , um ligando para o EGFR. Os autores fornecem evidência de que o TGF- $\alpha$  seja libertado por metaloproteinasas que, por sua vez, seriam activadas pelo c-Src.

Sheng *et al.* (2001B), utilizando uma linha celular humana de carcinoma colo-rectal (LS-174), documentaram a capacidade da PGE<sub>2</sub> em aumentar a proliferação e motilidade celulares. Estes efeitos são mediados pelo receptor EP<sub>4</sub> e resultam na activação da via da cínase do fosfatidilinositol-3 (PI3K/Akt).

No seu conjunto, estes resultados mostram que a via da COX-2, nomeadamente através da síntese de PGE<sub>2</sub>, pode estar envolvida na regulação da proliferação celular.

### Apoptose

A apoptose é controlada por duas vias principais: a via mitocondrial (ou via dependente do citocromo c) (Green e Reed, 1998) e a via dos receptores de morte (*death receptor-DR*) da membrana celular (Ashkenazi e Dixit, 1999). A COX-2 inibe a apoptose por mecanismos que interferem com ambas as vias.

Sun *et al.* (2002) utilizaram uma linha celular de carcinoma colo-rectal que não exprime COX-2 (HCT-15) e transfectaram as células com ADNc de COX-2, tendo obtido 2 clones produtores de COX-2. Nestes clones, a apoptose induzida por AINEs e por 5-fluouracilo (5-FU) estava marcadamente atenuada, quando comparada com as células HCT-15. Nas células transfectadas, os níveis de ARNm e proteína Bcl-2 estavam elevados em relação aos níveis das células parentais, o que demonstra a capacidade da COX-2 em modular os níveis desta proteína anti-apoptótica.

Um estudo semelhante encontrou níveis elevados de Mcl-1, um potente inibidor da via mitocondrial, numa linha celular humana de adenocarcinoma do pulmão (Lin *et al.*, 2001). A inibição da via PI3K/Akt ou o tratamento das células com inibidores específicos de COX-2 teve como efeito uma redução dos níveis de Mcl-1. Um estudo realizado por Nzeako *et al.* (2002) concluiu que a produção de prostanóides pela COX-2 inibe especificamente a apoptose mediada pelo Fas numa linha de células de colangiocarcinoma. Nesta linha celular, os autores pesquisaram a presença de várias proteínas anti-apoptóticas, tendo encontrado apenas níveis aumentados de Mcl-1.

Por outro lado, a "sobre-expressão" de COX-2 associa-se à inibição da expressão de DR-5 e confere resistência à apoptose induzida pelo ligando relacionado com o factor de necrose tumoral (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand - TRAIL*) numa linha de células de carcinoma colo-rectal (Tang *et al.*, 2002). Neste estudo, o tratamento das células com sulindac restaurou a expressão de DR-5.

A inibição de COX leva a um aumento dos níveis celulares de ácido araquidónico. Um nível elevado deste ácido pode estimular a esfingomielinase, que sintetisa ceramida (indutor de apoptose) a partir de esfingomielina (Chan *et al.*, 1998) e, deste modo, induzir a apoptose. No entanto, Cao e Prescott (2000), numa tentativa de elucidar a importância deste mecanismo, verificaram apenas um aumento moderado de ceramida

em células epiteliais expostas a ácido araquidónico, pelo que o papel desempenhado pela ceramida na indução de apoptose necessita de ser melhor esclarecido.

### Angiogénese

A "sobre-expressão" de COX-2 está associada a um aumento da secreção de factores pró-angiogénicos (Tsuji *et al.*, 1998), nomeadamente o factor de crescimento vascular endotelial (VEGF), factor de crescimento fibroblástico básico (bFGF), TGF-1, PDGF e endotelina-1. O tratamento de uma linha celular de carcinoma colo-rectal que exprime marcadamente COX-2 com NS-398 (um inibidor específico de COX-2) diminui a secreção destes factores (Tsuji *et al.*, 1998).

Um exemplo que documenta claramente o efeito pró-angiogénico da COX-2 é o modelo de angiogénese desenvolvido por Masferrer *et al.* (2000). Neste modelo, a angiogénese induzida pelo factor de crescimento básico na córnea de rato é revertida em grande parte pelo celecoxib, um inibidor selectivo de COX-2. Os mecanismos moleculares que estão subjacentes a este efeito foram clarificados por Dormond *et al.* (2001). Estes investigadores mostraram que a PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub> derivadas da COX-2 desempenham um papel essencial na migração de células endoteliais mediada pela integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

### Imunossupressão

A PGE<sub>2</sub>, proveniente da COX-2, pode inibir a produção de TNF- $\alpha$  e estimular a síntese de IL-10, que tem uma acção imunossupressora (Huang *et al.*, 1996). Em ratinhos enxertados com uma linha celular de carcinoma do pulmão, a inibição de COX-2 resultou num aumento marcado de infiltrado linfocítico no tumor e numa redução do crescimento tumoral (Stolina *et al.*, 2000). No seu conjunto, estes resultados documentam claramente que a COX-2 pode ter uma acção imunossupressora.

### Expressão tecidual de COX-2 avaliada por imuno-histoquímica

A imuno-expressão de COX-2 em várias neoplasias malignas encontra-se documentada por numerosos estudos. A Tabela 5 refere alguns estudos que demonstraram "sobre-expressão" de COX-2 nas respectivas neoplasias.

**Tabela 5** - Tumores malignos humanos que se associam a expressão aumentada de COX-2

<b><u>Carcinomas associados a expressão de COX-2</u></b>
<b>Esófago</b> (Wilson <i>et al.</i> , 1998)
<b>Estômago</b> (Ristimaki <i>et al.</i> , 1997)
<b>Cólon e recto</b> (Eberhart <i>et al.</i> , 1994)
<b>Fígado</b> (Koga <i>et al.</i> , 1999)
<b>Pâncreas</b> (Molina <i>et al.</i> , 1999)
<b>Pulmão</b> (Hida <i>et al.</i> , 1998)
<b>Mama</b> (Hwang <i>et al.</i> , 1998)
<b>Colo uterino</b> (Kulkarni <i>et al.</i> , 2001)
<b>Póstata</b> (Gupta <i>et al.</i> , 2000)
<b>Bexiga</b> (Mohammed <i>et al.</i> , 1999)
<b>Pele</b> (Buckman <i>et al.</i> , 1998)

A Tabela 6 resume os principais trabalhos que analisaram a imuno-expressão de COX-2 no estômago.

É de salientar que vários autores verificaram a existência de uma associação entre expressão de COX-2 e o adenocarcinoma de tipo intestinal (Saukkonen *et al.*, 2001; Yamagata *et al.*, 2002; van Rees *et al.*, 2002; Joo *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2003). No entanto, outros autores não encontraram uma associação entre expressão de COX-2 e tipo histológico do tumor (Uefuji *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2003), pelo que permanece por esclarecer a relação entre expressão de COX-2 e o sub-tipo histológico de carcinoma do estômago.

**Tabela 6 – Imuno-expressão de COX-2 em carcinomas gástricos e mucosa não neoplásica**

Autor (ano)	anticorpo	nº de casos	mucosa normal	atrofia gland.	meta. intest.	displasia	carcinoma	estroma
Ristimaki <i>et al.</i> , (1997)	policlonal Cayman Chemical Co. 1:40; temp. ambiente, 30 min.	11	negativo	-	"esporádica"	-	100%	negativo
Uefuji <i>et al.</i> , (1998)	policlonal Immunobiological Lab. diluição ?; 4°C <i>overnight</i>	23	focal	-	"esporádica"	-	83%	negativo
Lim <i>et al.</i> , (2000)	policlonal Santa Cruz Biotech. 1:50; 4°C <i>overnight</i>	104	negativo	-	positivo	positivo	100%	positivo (*)
Sung <i>et al.</i> , (2000)	policlonal Santa Cruz Biotech. 1:100; temp.?.; 2horas	20;51;25 (x)	negativo	100%	100%	-	100%	positivo
Chen <i>et al.</i> , (2001)	policlonal Cayman Chemical Co. 1:40; temp. ambiente, 30 min.	71	negativo	-	-	-	68%	NA
Saukkonen <i>et al.</i> , (2001)	monoclonal Cayman Chemical Co.160112 1:50; 4°C <i>overnight</i>	9;67 (§)	NA	-	-	44%	42%	negativo
Van Rees <i>et al.</i> , (2002)	monoclonal Cayman Chemical Co. 160112 1:100; 4°C <i>overnight</i>	10;10;9;53(#)	NA	-	100%	100% (baixo e alto grau)	62%	positivo (:)
Joo <i>et al.</i> , (2002)	monoclonal Cayman Chemical Co. 1:250; 45°C, 25 min.	140	negativo	-	-	-	61%	NA
Han <i>et al.</i> , (2002)	policlonal Santa Cruz Biotech. 1:50; 4°C <i>overnight</i>	55	NA				71%	NA

(\*) – células musculares lisas, fibroblastos e células inflamatórias mononucleadas

(x) – atrofia glandular: n=20  
metaplasia intestinal: n=51  
carcinomas: n=25

(§) – lesões displásicas (não especificadas): n=9  
carcinomas: n=67

(#) – metaplasia intestinal: n=10  
displasia de baixo grau: n=10  
displasia de alto grau: n=9  
carcinomas: n=53

(:) – células com imunoreactividade "para" CD 68, actina muscular lisa  $\alpha$ , HLA-DR; negativas para o CD 31

NA – não avaliado

## 2. Objectivos

O objectivo geral deste trabalho foi o de determinar o papel de COX-2 na carcinogénese gástrica.

Os objectivos específicos foram os seguintes:

- Definir o padrão de expressão de COX-2 no carcinoma gástrico e nas lesões que o precedem, para assim elucidar o *timing* de expressão aumentada de COX-2 ao longo da carcinogénese gástrica;

- Analisar a relação entre expressão de COX-2 em carcinomas gástricos e as características clínicas e anátomo-patológicas dos doentes e das neoplasias, respectivamente;

- Determinar a frequência de metilação do promotor do gene *PTGS2* em carcinomas do estômago e em linhas celulares de carcinomas gástricos e verificar a sua repercussão na expressão imuno-histoquímica de COX-2.

### 3. Material e métodos

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Casos utilizados para o estudo imuno-histoquímico

A série estudada incluiu:

- 15 casos de mucosa gástrica normal
- 10 casos de gastrite crónica sem infecção por *H. pylori*
- 10 casos de gastrite crónica com infecção por *H. pylori*
- 5 pólipos hiperplásicos
- 48 casos de metaplasia intestinal
- 24 casos de displasia em mucosa plana
- 8 adenomas
- 50 casos de carcinoma

Todos os casos foram seleccionados do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de S. João e correspondem a doentes submetidos a endoscopia gástrica com biopsia e a doentes gastrectomizados nesta unidade de saúde.

Os casos de biopsia foram obtidos após consulta do sistema informático do Serviço de Anatomia Patológica. Os casos de carcinoma foram seleccionados a partir do arquivo oncológico de lâminas histológicas, tendo sido seleccionado um bloco de parafina por caso com representação da neoplasia e mucosa não neoplásica adjacente ao tumor.

Quinze casos de metaplasia intestinal provenientes de biopsias endoscópicas foram seleccionados a partir do sistema informático. O critério de selecção foi o de representação extensa desta lesão nos fragmentos de biopsia, para posterior classificação do tipo de metaplasia por estudo histoquímico. Os restantes casos de metaplasia intestinal são provenientes dos casos de biopsia seleccionados como representativos de lesões de displasia em mucosa plana e casos de carcinoma, cujo bloco de parafina respectivo continha também mucosa gástrica com metaplasia intestinal.

##### 3.1.2 Material utilizado para o estudo da metilação do promotor do gene *PTGS2*

###### 3.1.2.1 Linhas celulares

Foram utilizadas três linhas celulares de carcinoma do estômago (GP 220, Kato III, MKN 45), gentilmente cedidas pelas Profs. Doutoras Leonor David e Raquel Seruca (IPATIMUP), para avaliação da relação entre expressão de COX-2 e metilação do promotor do gene *PTGS2*. A linha celular GP 220 é constituída por células sem metilação do promotor referido, enquanto que na linha celular Kato III, as células têm ambos os alelos metilados. Por último, a linha celular MKN 45 é composta por células com metilação mono-alélica.

### 3.1.2.2 Carcinomas gástricos

No estudo de metilação do promotor do gene *PTGS2* foi estudado um sub-grupo de 31 carcinomas gástricos, extraído da série total de 50 casos de carcinoma do estômago indicados no estudo imuno-histoquímico.

O estudo de metilação do promotor do gene referido precedeu o estudo imuno-histoquímico.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Estudo morfológico

De todos os blocos de parafina realizaram-se cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espessura, que foram montados em lâminas e corados pelo método da hematoxilina e eosina.

A pesquisa de *H. pylori* foi realizada pelo método de Giemsa modificado (Gray *et al.*, 1986).

As lesões de gastrite crónica foram classificadas de acordo com o sistema actualizado de Sydney (Dixon *et al.*, 1996). A metaplasia intestinal foi classificada nos seguintes sub-tipos (I, II e III), de acordo com a classificação de Filipe e Jass (1986). As displasias foram categorizadas segundo a classificação da OMS (2000). Os carcinomas gástricos foram classificados de acordo com a classificação de Laurén (1965) e Carneiro (1995). Em todos os casos de carcinoma foi avaliada a presença de permeação linfática e invasão vascular venosa (através do método de orceína azótica). O estadiamento dos carcinomas foi efectuado pelo sistema de TNM (Sobin e Wittekind, 1997).

### 3.2.2 Histoquímica

Em 15 casos de metaplasia intestinal realizaram-se, para além dos cortes para hematoxilina e eosina, 2 cortes suplementares, que foram corados pela diamina férrica e azul de Alcian/PAS, com o objectivo de sub-classificar a metaplasia intestinal, conforme descrito por Filipe e Jass (1986). A metaplasia intestinal de tipo I foi identificada pela ausência de mucinas nas células colunares (*i.e.*, células não caliciformes). A metaplasia intestinal de tipo II foi diagnosticada pela presença de sialo-mucinas e a metaplasia intestinal de tipo III foi reconhecida pela detecção de sulfo-mucinas nas células colunares, respectivamente.

### 3.2.3 Imuno-citoquímica

Duas linhas celulares de carcinoma do estômago incluídas em parafina foram utilizadas para controle da expressão de COX-2. A linha celular GP

220 exprime proteína COX-2, enquanto que na linha celular Kato III há ausência de imuno-expressão.

Realizou-se um corte de 4  $\mu\text{m}$  de espessura de cada bloco e procedeu-se à detecção de COX-2, conforme se descreve em seguida.

#### 3.2.4 Imuno-histoquímica

Dos blocos de parafina seleccionados realizaram-se cortes (3  $\mu\text{m}$  de espessura), que foram desparafinados e hidratados. Procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogénio a 3% em metanol. Após lavagem com *phosphatase buffer saline* (PBS), as lâminas foram colocadas em câmara húmida. Procedeu-se ao estudo imuno-histoquímico de acordo com o sistema imuno-enzimático do conjugado estreptavidina-biotina (Ultravision Detection Kit, Neomarkers, Fremont, CA, EUA). Foi utilizado um anticorpo monoclonal de rato anti-COX-2 humana (160112, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, EUA), numa diluição de 1:100, durante 16 a 18 horas (*overnight*), à temperatura de 4<sup>o</sup> C. A visualização da reacção imuno-histoquímica foi feita com a utilização do cromogénio diaminobenzidina e o contraste nuclear foi obtido pela coloração de Mayer.

Van Rees *et al.* (2002) analisaram vários anticorpos disponíveis para estudo imuno-histoquímico da expressão de COX-2 e concluíram que o anticorpo mencionado anteriormente foi o que apresentou a imunorreactividade mais específica, pelo que seleccionámos este anticorpo para o estudo.

#### Avaliação da imuno-expressão de COX-2

Os casos em que não foi observada qualquer imunorreactividade nas células epiteliais "para" a COX-2 foram classificados como negativos (-). Os casos que apresentaram imunorreactividade foram classificados como positivos. A intensidade da reacção foi graduada em acentuada (+++), moderada (++) e ligeira (+). A extensão da expressão de COX-2 nas células epiteliais foi estimada nos seguintes intervalos de percentagem: 0-25%; >25-50%; >50-75%; >75-100%.

#### 3.2.5 Estudo da metilação do promotor do gene *PTGS2*

##### *Methylation-specific PCR (MSP)*

O estudo da metilação do promotor do gene *PTGS2* foi efectuado da seguinte forma: o ADN foi modificado pelo bissulfito de sódio, que converte todas as citosinas não metiladas em uracilo (mas não as citosinas metiladas), seguido de amplificação com *primers* específicos, quer para o ADN metilado, quer para o ADN não metilado. ADN genómico (1  $\mu\text{g}$ ) foi modificado pelo bissulfito de sódio. Em seguida, as amostras de ADN foram purificadas, utilizando o *kit* de purificação do ADN Wizard (Promega), desnaturadas com hidróxido de sódio (NaOH) e eluídas em água. Iniciou-se o *methylation-specific PCR* para analisar o estado de metilação do

promotor, utilizando *primers* que são descritos adiante. A amplificação do ADN foi realizada numa solução (*mix*) de 30  $\mu$ l, contendo 1x tampão de PCR, trifosfatos de deoxinucleotídeos, *primers* (*sense* e *antisense*), ADN modificado pelo bissulfito de sódio e *Taq* ADN polimerase. Para amplificar o ADN efectuaram-se 35 ciclos, com desnaturação a 94<sup>o</sup> C durante 30 segundos, *annealing* a 61<sup>o</sup> C e extensão a 72<sup>o</sup> C durante 30 segundos. As fases inicial e final de extensão realizaram-se a 94 e 72<sup>o</sup> C, respectivamente, durante 5 minutos. Os produtos da reacção de amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose a 2,5%, corados com brometo de etídio e visualizados com luz ultra-violeta. O ADN de amostras sanguíneas foi usado como controlo negativo. As sequências dos *primers* para o gene *PTGS2* foram concebidas segundo a sequência do promotor do gene, determinada previamente (Appleby *et al.*, 1994): reacção com ADN não metilado, 5' - ATAGATTAGATATGGTGGTGGTGGT- 3' (*sense*) e 5' - CACAATCTTTACCCAAACACTTCGA- 3' (*antisense*); e reacção com ADN metilado, 5' - TTAGATACGGCGGCGGCGGC- 3' (*sense*) e 5' - TCTTTACCCGAACGCTTCCG- 3' (*antisense*).

### 3.2.6 Análise estatística

Na análise estatística da associação entre expressão de COX-2 nos carcinomas e os parâmetros clínico-patológicos foram utilizados o teste de Qui-quadrado e o teste exacto de Fisher; a idade foi comparada por teste *t* de Student. Foi considerado como estatisticamente significativo um valor de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1 Estudo imuno-histoquímico da expressão de COX-2 na mucosa gástrica normal, pólipos hiperplásicos, gastrite crónica, metaplasia intestinal, displasia e carcinomas gástricos

#### Expressão de COX-2 na mucosa gástrica normal

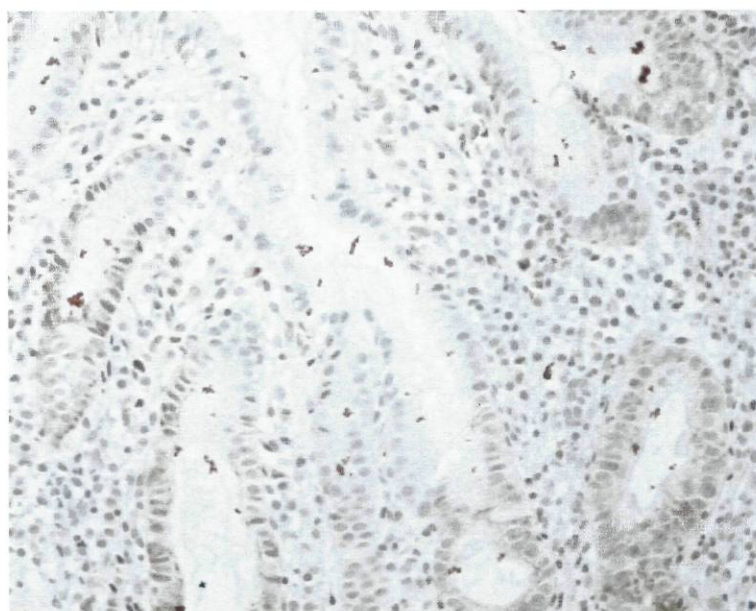
Todos os casos de mucosa gástrica normal mostraram ausência de imunoreactividade “para” a COX-2 no epitélio glandular e córion. No entanto, identificou-se imunoreactividade de intensidade ++ nas células parietais, nomeadamente na membrana da cisterna canalicular destas células.

#### Expressão de COX-2 em pólipos hiperplásicos

Não se identificou qualquer imunoreactividade “para” a COX-2 nestas lesões (epitélio glandular e córion).

#### Expressão de COX-2 nas lesões de gastrite crónica

Observou-se imunoreactividade de intensidade ligeira na região do colo do epitélio glandular em todos os casos de gastrite crónica sem infecção por *H. pylori* e em 9/10 casos de gastrite crónica com infecção por *H. pylori*. No caso restante, a intensidade da imuno-expressão foi graduada como moderada. No córion identificou-se a presença de imunoreactividade de intensidade ligeira em células mononucleadas dispersas e em folículos linfóides com centros germinativos.



**Figura 1** – Imuno-expressão de COX-2 na gastrite crónica com infecção por *H. pylori*. Observa-se imunoreactividade na zona proliferativa do epitélio glandular e em células mononucleadas no córion, x 200.

## Expressão de COX-2 nas lesões de metaplasia intestinal

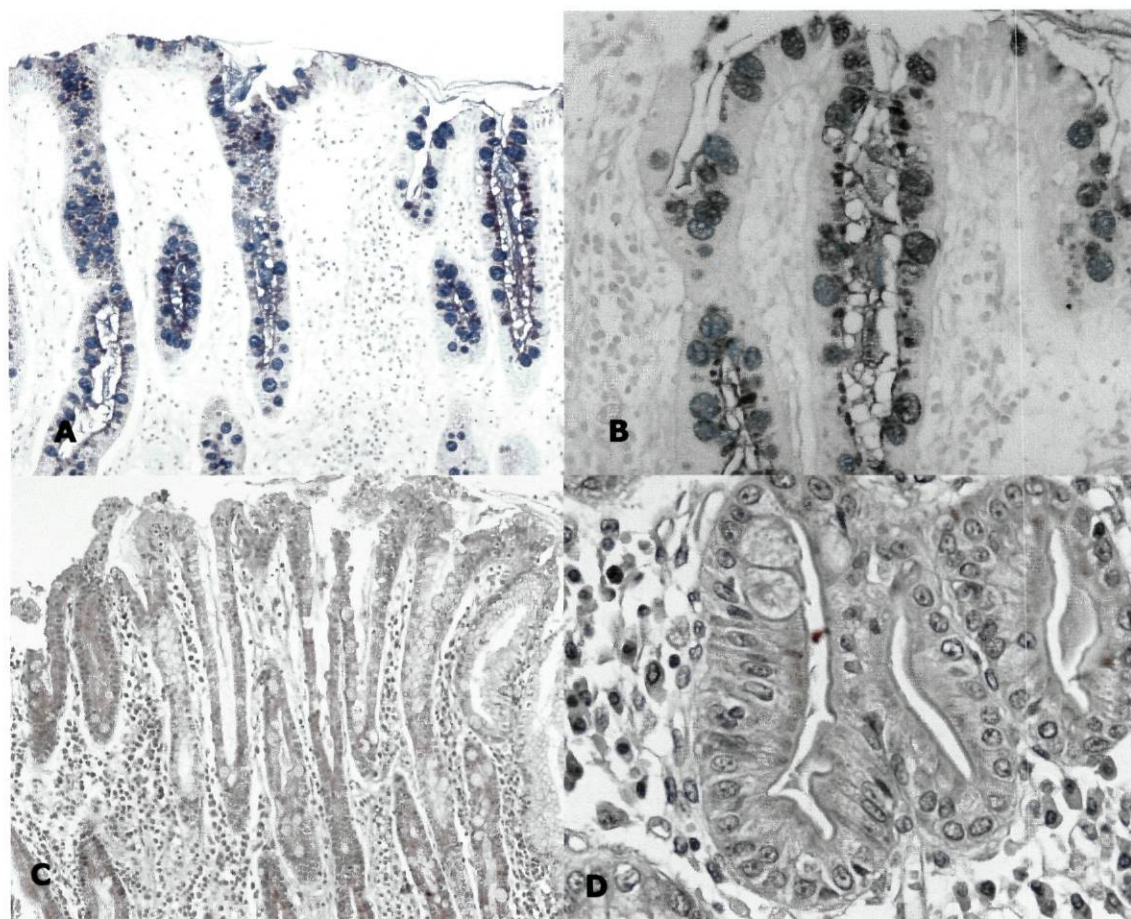
Identificou-se imunoreactividade em 100% dos casos de metaplasia intestinal. Em 30 casos (63%) observou-se imunoreactividade de intensidade moderada; em 16 casos (33%), a intensidade foi acentuada (+++) e, em 2 casos (4%), foi ligeira.

Nos 15 casos em que se realizou estudo histoquímico para classificação do tipo de metaplasia intestinal foram identificadas 15 focos ou áreas de metaplasia intestinal de tipo I, 3 de tipo II e 13 de tipo III.

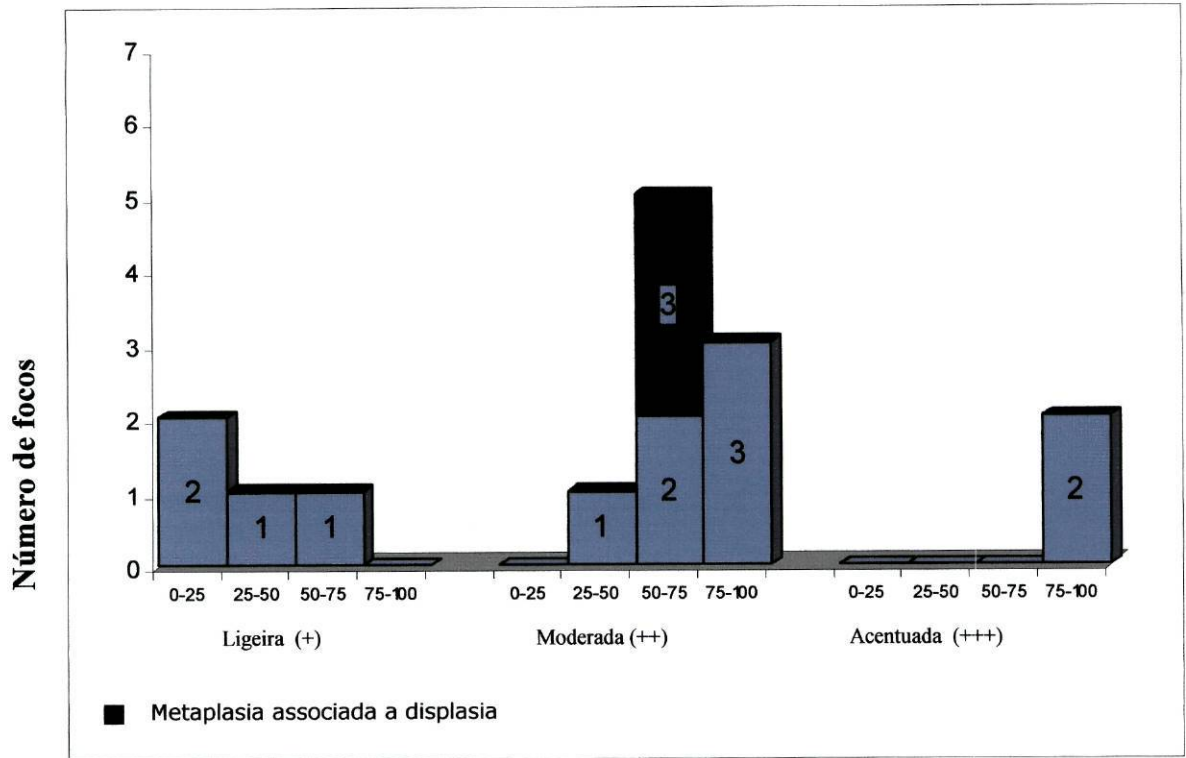
Na metaplasia intestinal de tipo I observou-se uma expressão heterogénea de COX-2; o padrão predominante (observado em 9 dos 15 casos) correspondeu a uma intensidade moderada (++) e extensão de imunoreactividade compreendida entre 50 e 75% das células metaplásicas.

Na metaplasia intestinal de tipo II observou-se uma intensidade ligeira de expressão de COX-2 e a extensão de expressão foi inferior a 25%.

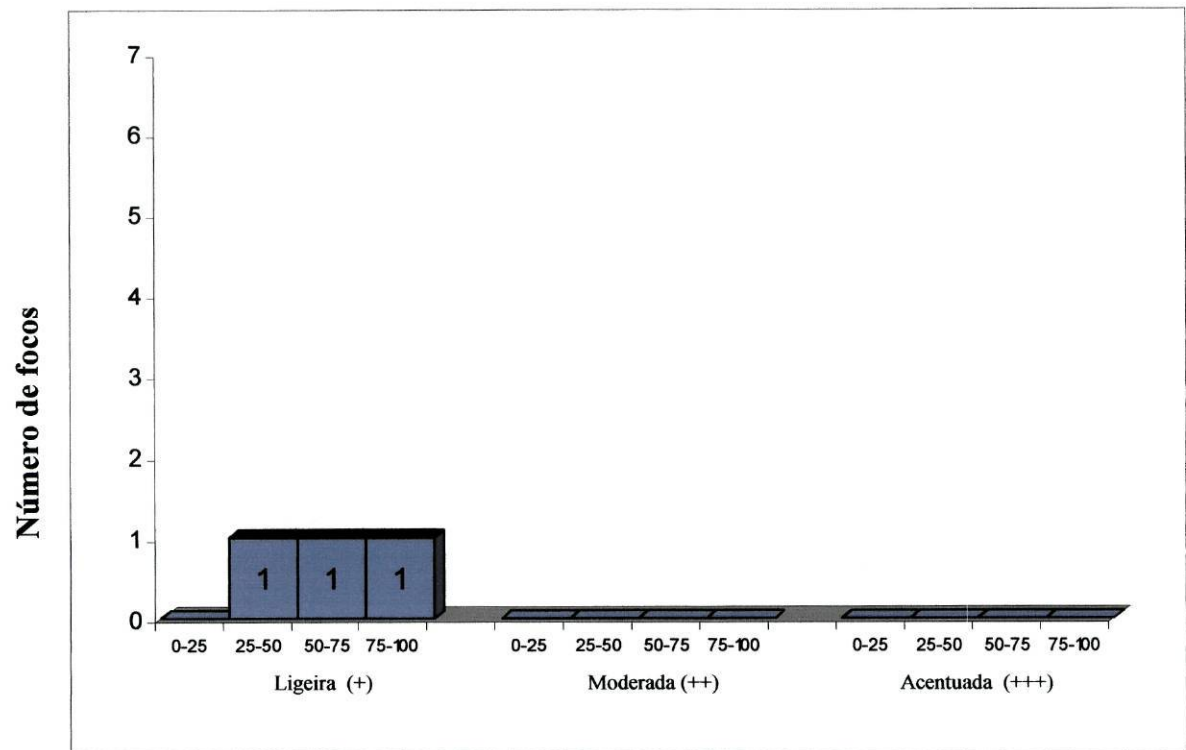
Na metaplasia intestinal de tipo III observou-se um padrão de intensidade e extensão de expressão semelhante à detectada na metaplasia intestinal de tipo I (Figuras 3 a 5).



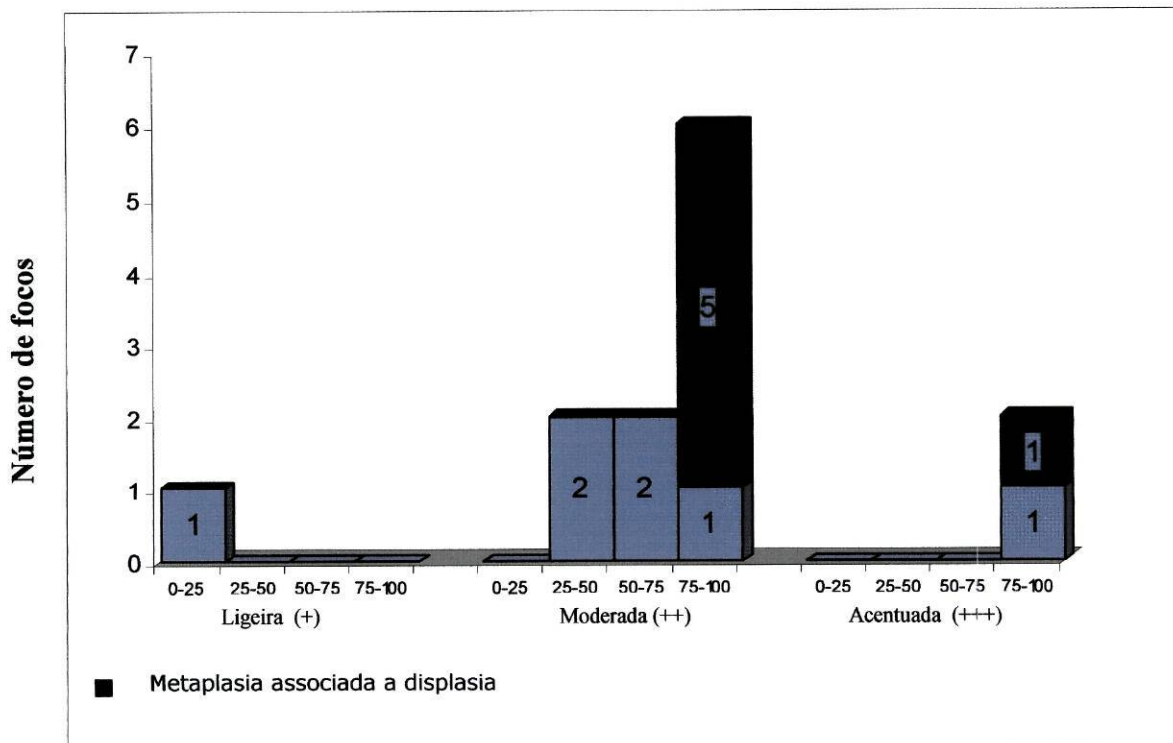
**Figura 2** – Em (A) observa-se área de metaplasia intestinal de tipo incompleto (presença de mucinas neutras e ácidas em células colunares); azul Alcian/PAS, x 100. Em (B) identifica-se foco de metaplasia intestinal de tipo III (presença de sulfo-mucinas em células colunares); diamina férrica, x 200. Em (C) observa-se imuno-expressão heterogénea de COX-2, em metaplasia intestinal, x 100. Em (D) observa-se imunoreactividade “para” a COX-2 em epitélio metaplásico e em células do córion, x 400.



**Figura 3** - Expressão de COX-2 na metaplasia intestinal de tipo I



**Figura 4** - Expressão de COX-2 na metaplasia intestinal de tipo II



**Figura 5** – Expressão de COX-2 na metaplasia intestinal de tipo III

### Expressão de COX-2 nas lesões de displasia

Em todas as lesões de displasia (de baixo e alto grau) foi observada imunorreactividade das células displásicas, com intensidade acentuada (+++). Nas lesões de displasia em mucosa plana, 19 casos (79%) apresentaram uma extensão de imunorreactividade de 75 a 100% e, nos 5 casos restantes (21%), observou-se uma extensão de 50 a 75%. A imunorreactividade foi observada no citoplasma das células displásicas, com reforço apical (Figura 6).

Nos adenomas verificámos uma extensão de imunorreactividade de 25 a 50% em 3 (38%) e de 50 a 75% em 5 (63%) casos. Em todos os adenomas, a intensidade de imuno-expressão foi acentuada (+++).

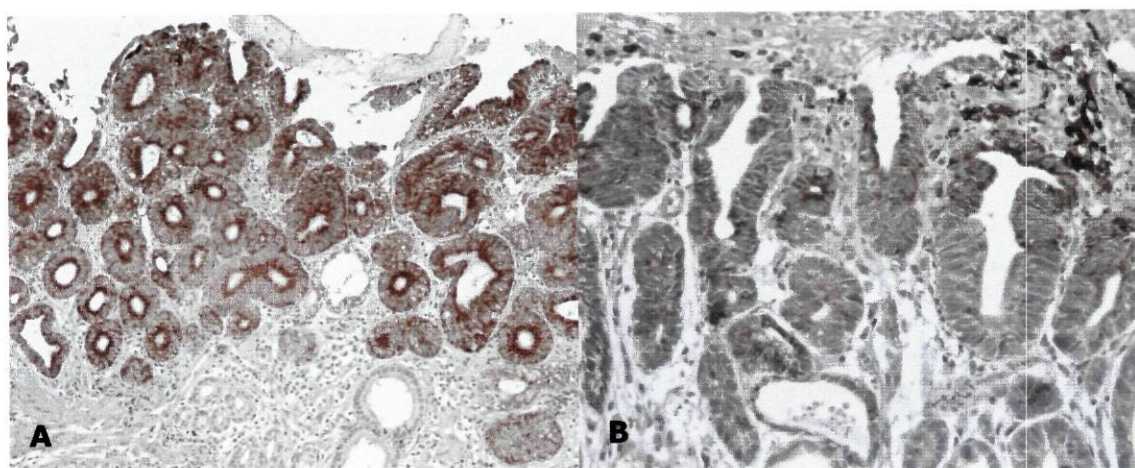
As Tabelas 1 e 2 resumem os aspectos descritos.

**Tabela 1** - Expressão de COX-2 na mucosa gástrica normal, pólipos hiperplásicos, gastrite, displasia em mucosa plana e adenomas

	<i>n</i>	<i>negativo</i>		<i>positivo</i>		
		-	+	++	+++	
Epitélio normal	15	15	0	0	0	
Pólipos hiperplásicos	5	5	0	0	0	
Gastrite crónica (sem <i>H. pylori</i> )	10	0	10	0	0	
Gastrite crónica (com <i>H. pylori</i> )	10	0	9	1	0	
Metaplasia intestinal	48	0	2	30	16	
Displasia em mucosa plana	24					
• baixo grau		0	0	0	14	
• alto grau		0	0	0	10	
Adenomas	8					
• baixo grau		0	0	0	6	
• alto grau		0	0	0	2	

**Tabela 2** - Extensão da expressão (%) de COX-2 em lesões de displasia

	<i>n</i>	<i>negativo</i>		<i>positivo</i>			
		-	0-25	25-50	50-75	75-100	
• mucosa plana	24	0	0	0	5	19	
• adenomas	8	0	0	3	5	0	



**Figura 6** – Imuno-expressão de COX-2 em lesões de displasia de baixo grau em mucosa plana; (A), x 100; (B), x 200.

### Expressão de COX-2 em carcinomas gástricos

Observou-se expressão de COX-2 em 47 dos 50 (94%) carcinomas gástricos. Nas Tabelas 3, 4 e 5 apresentam-se os resultados obtidos.

**Tabela 3** – Resultados globais da expressão de COX-2 em carcinomas gástricos

Carcinomas de tipo intestinal/glandular	28/28	100%
Carcinomas atípicos	14/16	88%
Carcinomas difusos/células isoladas	5/6	83%
Total	47/50	94%

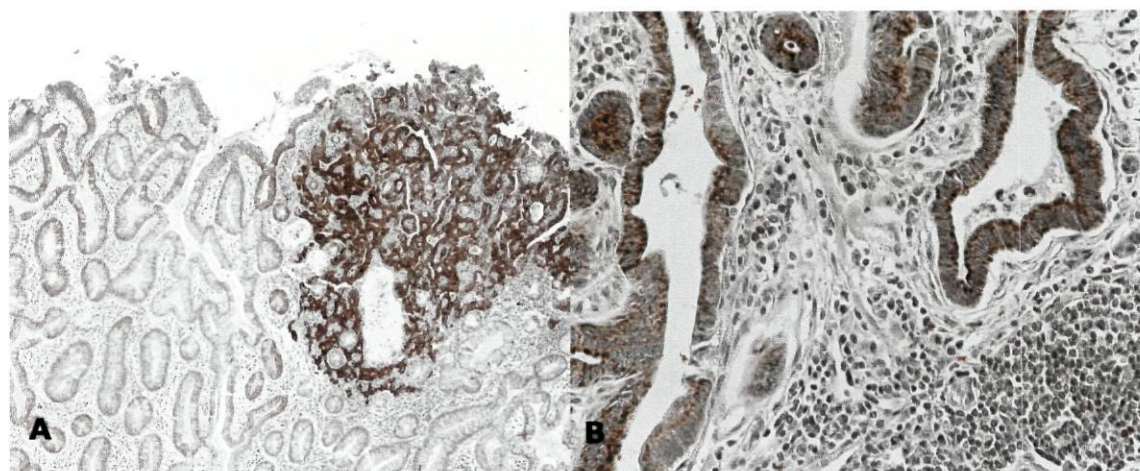
**Tabela 4** – Expressão de COX-2 em carcinomas gástricos

	<i>n</i>	<i>negativo</i>		<i>positivo</i>		
		-	+	++	+++	
Carcinomas de tipo intestinal/glandular	28	0	2	3	23	
Carcinomas atípicos	16	2	1	2	11	
Carcinomas difusos/células isoladas	6	1	0	1	4	

**Tabela 5** – Extensão da expressão (%) de COX-2 em carcinomas

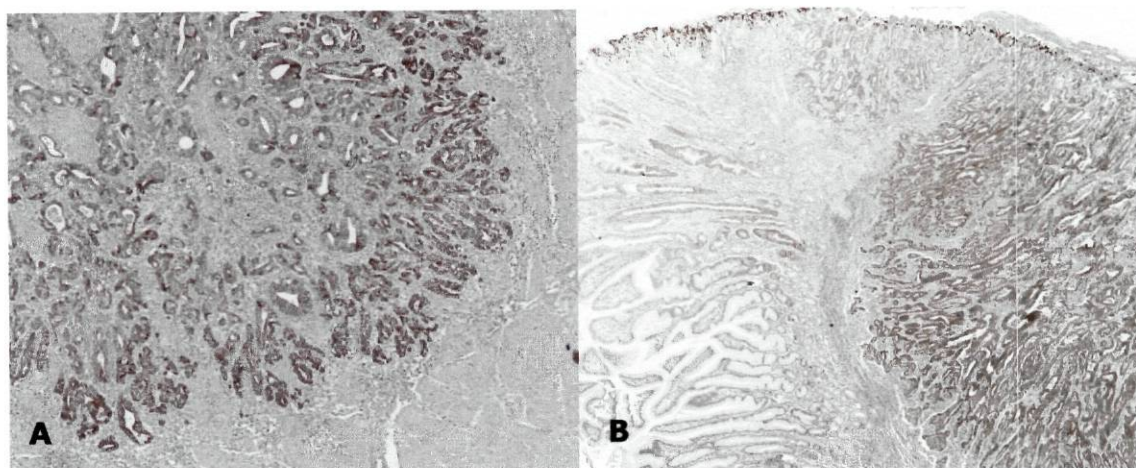
	<i>n</i>	<i>negativo</i>		<i>positivo</i>			
		-	0-25	25-50	50-75	75-100	
Carcinomas de tipo intestinal/glandular	28	0	1	0	4	23	
Carcinomas atípicos	16	2	0	1	2	11	
Carcinomas difusos/células isoladas	6	1	0	0	3	2	

Nos carcinomas observou-se expressão de COX-2 no citoplasma das células neoplásicas em todos os sub-tipos histológicos. Não se observou expressão de COX-2 no produto de secreção. É de salientar, no entanto, que se observou imuno-expressão de tipo granular em carcinomas de padrão sólido (Figuras 10 e 11).

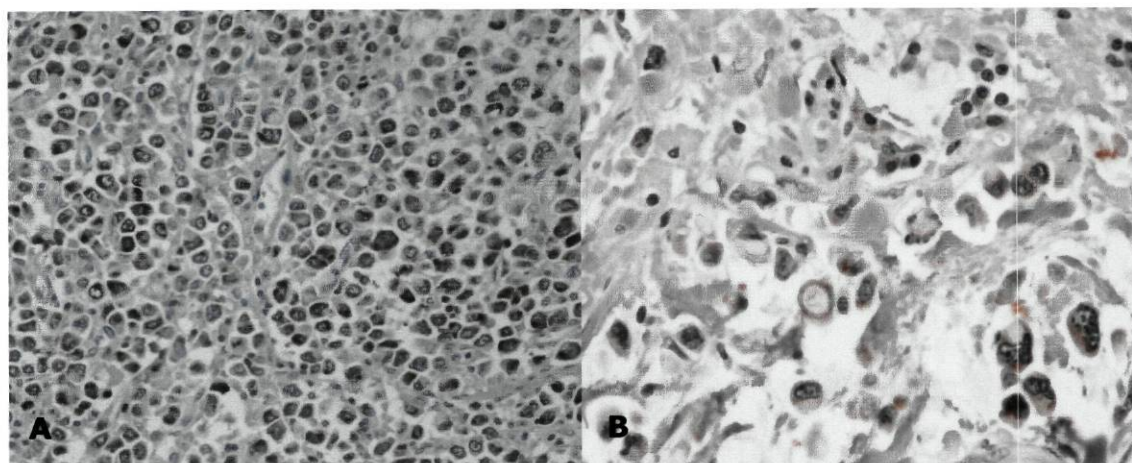


**Figura 7** – Imuno-expressão de COX-2 em adenocarcinomas de tipo intestinal/glandular. Em (A) observa-se imunorreatividade em adenocarcinoma intra-mucoso, x 40. Em (B) identifica-se adenocarcinoma com imunorreatividade difusa, de intensidade acentuada, x 200.

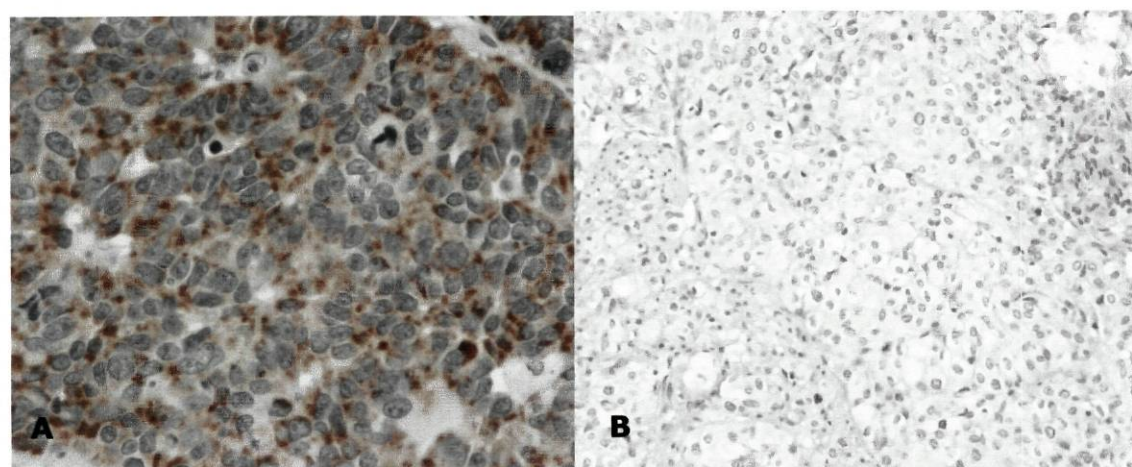
Observou-se imunorreatividade ligeira nas células estromais e inflamatórias peri-neoplásicas em 15 dos 50 casos (30%). Não se identificou imunorreatividade em células endoteliais.



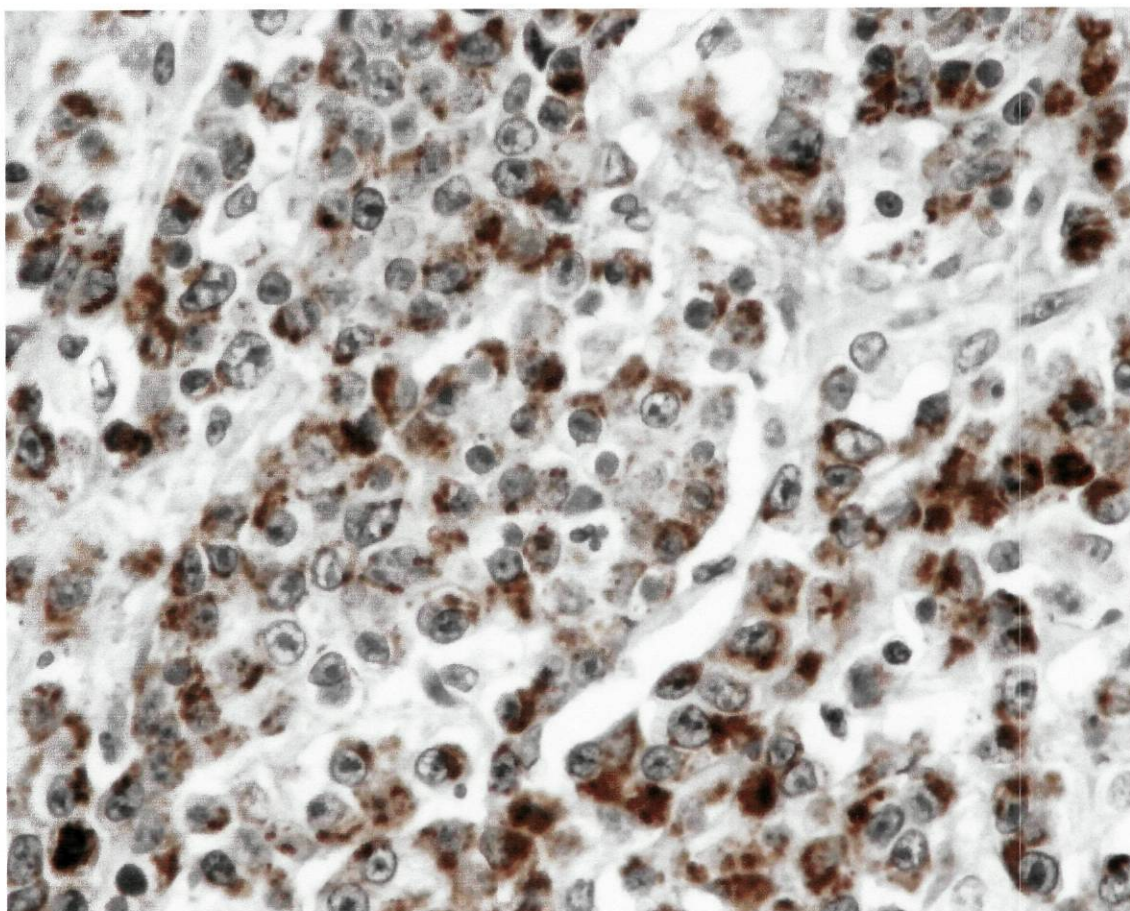
**Figura 8** – Imuno-expressão de COX-2 em adenocarcinomas de tipo intestinal/glandular. Em (A) observa-se imunoreactividade particularmente marcada na interface epitélio-estroma, x 40. Em (B) observa-se mucosa não neoplásica com ausência de imunoreactividade, metaplasia intestinal com imunoreactividade de intensidade ligeira a moderada e adenocarcinoma com imunoreactividade de intensidade acentuada, x 100.



**Figura 9** – Imuno-expressão de COX-2 em carcinomas difusos/células isoladas. (A), x 200. Em (B) observa-se imunoreactividade na periferia do vacúolo de mucina em células de tipo anel de sinete, x 400.



**Figura 10** – Imuno-expressão de COX-2 em carcinomas de padrão sólido. Em (A) observa-se imunoreactividade de intensidade acentuada, de aspecto granular, x 400. Em (B) não se identifica imunoreactividade das células neoplásicas, x 200.



**Figura 11** – Imuno-expressão de COX-2 em carcinoma de padrão sólido, x 400. Nesta imagem salienta-se o aspecto granular (citoplasmático e, por vezes peri-nuclear) da imunorreactividade, de intensidade acentuada.

#### Correlação entre expressão de COX-2 e parâmetros clínico-patológicos

A correlação entre expressão de COX-2 e parâmetros clínico-patológicos está resumida na Tabela 6. Verificámos uma associação significativa entre expressão de COX-2 e tumores com dimensão superior a 5 cm. Em contrapartida, a expressão de COX-2 não se associou com a idade dos doentes, género, classificações de Laurén e de Carneiro, estadio, invasão vascular (linfática e venosa) ou infecção por *Helicobacter pylori* na mucosa não neoplásica.

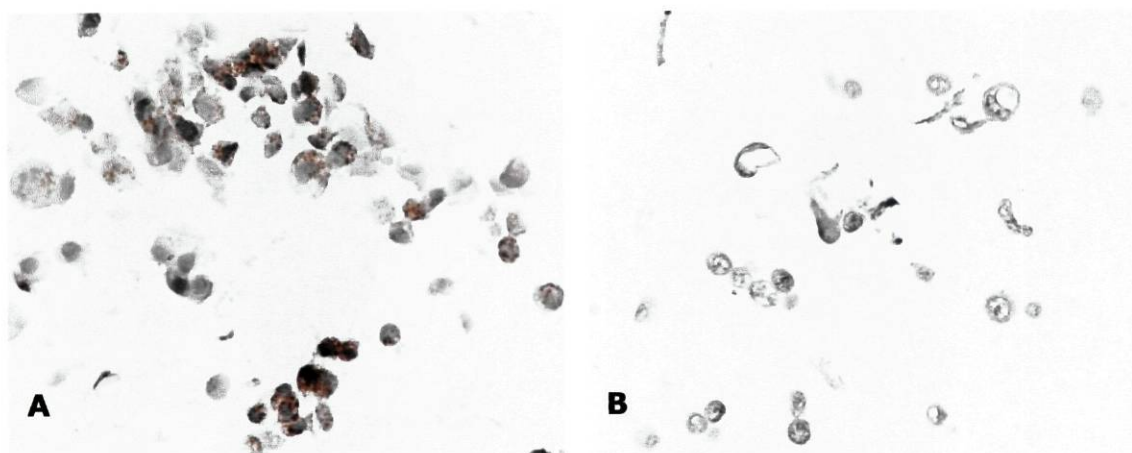
**Tabela 6** – Associação entre imuno-expressão de COX-2 e características clínico-patológicas

<b>Características clínico-patológicas</b>	<b>n</b>	<b>Imuno-expressão de COX-2</b>		<b>p</b>
		<b>negativa</b>	<b>positiva</b>	
<b>Gênero</b>				
Masculino	28	2	26	0,591
Feminino	22	1	21	
<b>Idade</b>				
Média	63	67	63	0,513
Intervalo	37-84	42-83	37-84	
<b>Dimensão do tumor</b>				
≤ 5 cm	19	3	16	0,049
> 5 cm	31	0	31	
<b>Classificação de Laurén</b>				
Intestinal	28	0	28	0,123
Difuso	6	1	5	
Atípico	16	2	14	
<b>Classificação de Carneiro</b>				
Glandular	28	0	28	0,185
Células isoladas	6	1	5	
Sólido	14	2	12	
Misto	2	0	2	
<b>Grau de invasão (T)</b>				
T <sub>1</sub>	4	0	4	0,221
T <sub>2</sub>	22	0	22	
T <sub>3</sub>	21	3	18	
T <sub>4</sub>	3	0	3	
<b>Metástases ganglionares</b>				
N <sub>0</sub>	12	2	10	0,334
N <sub>1</sub>	26	1	25	
N <sub>2</sub>	9	0	9	
N <sub>3</sub>	3	0	3	
<b>Permeação linfática</b>				
Ausente	3	0	3	0,827
Presente	47	3	44	
<b>Invasão venosa</b>				
Ausente	24	1	23	0,531
Presente	26	2	24	
<b>Infecção por <i>Helicobacter pylori</i></b>				
Ausente	27	2	25	0,561
Presente	23	1	22	
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>3</b>	<b>47</b>	

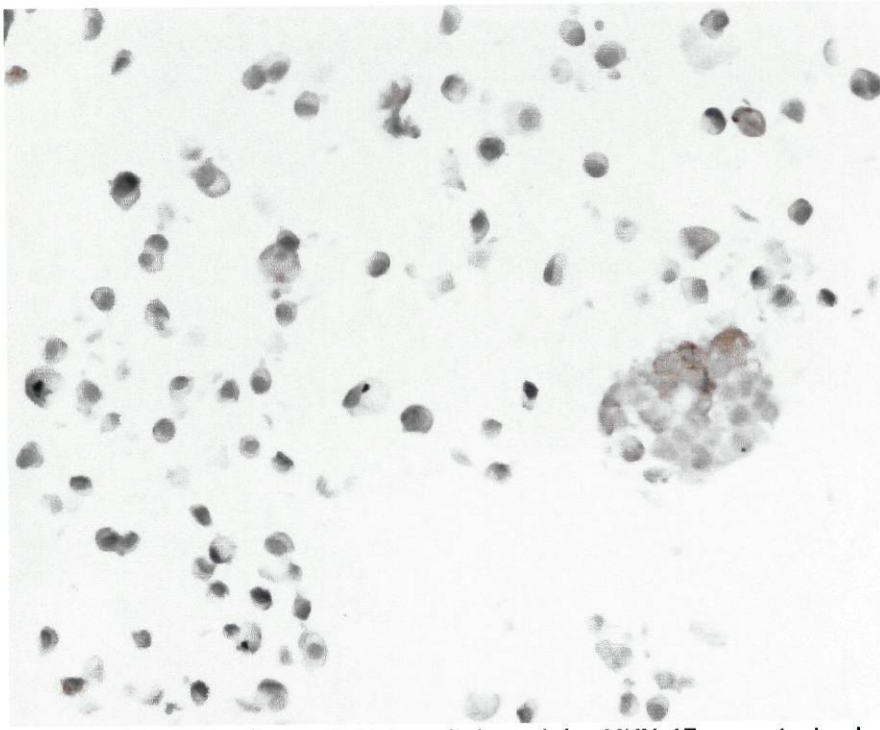
## 4.2 Estudo da relação do estado de metilação do promotor do gene *PTGS2* e expressão de COX-2 em linhas celulares e tecidos de carcinoma gástrico

### Metilação do promotor do gene *PTGS2* e expressão de COX-2 em linhas celulares de carcinoma gástrico

Na linha celular GP 220, em que não há metilação do promotor do gene *PTGS2*, observou-se imunorreactividade acentuada no citoplasma das células. A imuno-expressão das células da linha celular MKN 45 (metilação mono-alélica) foi inferior à da linha GP 220. Na linha celular Kato III, em que há metilação bi-alélica do promotor do gene *PTGS2*, observou-se ausência de imuno-expressão (Figuras 11 e 12).



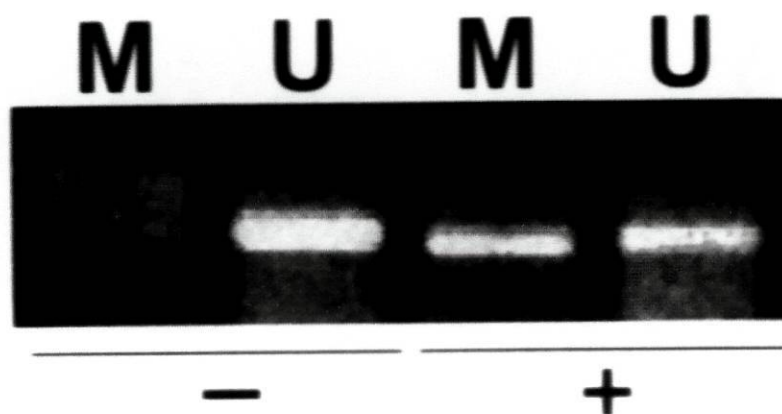
**Figura 11** – Expressão de COX-2 em linhas celulares. Em (A) observa-se a linha celular GP 220 com imunorreactividade difusa e intensidade acentuada. Em (B), as células da linha celular Kato III mostram ausência de imunorreactividade.



**Figura 12-** Expressão de COX-2 na linha celular MKN 45, caracterizada por imunoreatividade focal e de intensidade variável.

#### Metilação do promotor do gene *PTGS2* e expressão de COX-2 em carcinomas gástricos

A metilação do promotor do gene *PTGS2* foi detectada em 6 de 31 (19%) dos carcinomas gástricos (4 carcinomas de tipo intestinal/glandular e 2 carcinomas atípicos). Os resultados do estudo imuno-histoquímico mostraram expressão de COX-2 nos 6 tumores com metilação e em 24 tumores sem metilação do promotor do gene *PTGS2*. Em um caso verificamos ausência de imunoreatividade e de metilação do promotor. Não observamos uma associação significativa entre expressão imuno-histoquímica e o estado de metilação do promotor do gene *PTGS2* ( $p=0,806$ , prova exacta de Fisher). A Tabela 7 resume os dados obtidos.



**Figura 13** – Exemplo de um caso sem metilação (-) e um caso com metilação (+) do promotor do gene *PTGS2* (M – metilado; U – não metilado).

**Tabela 7** –Imuno-expressão de COX-2 e metilação do promotor do gene *PTGS2*

<b>Metilação do gene <i>PTGS2</i></b>	<b>Imuno-expressão de COX-2</b>		Total
	<b>negativa</b>	<b>positiva</b>	
negativa	1	24	25
positiva	0	6	6
Total	1	30	31

## 5. Discussão e conclusões

No presente estudo avaliámos a expressão imuno-histoquímica de COX-2 na mucosa gástrica normal, em pólipos hiperplásicos, lesões de gastrite crónica (com e sem infecção por *H. pylori*), metaplasia intestinal (completa e incompleta), displasia (em mucosa plana e adenomas) e carcinomas gástricos.

Os nossos resultados mostraram ausência de imunoreactividade "para" COX-2 na mucosa gástrica normal, excepto nas células parietais, que apresentaram imunoreactividade "inespecífica" no sistema canalicular. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores (Ristimaki *et al.*, 1997; Tatsuguchi *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2000) e com as características de regulação da expressão do gene *PTGS2* (Smith *et al.*, 1996).

Os pólipos hiperplásicos constituem cerca de 90% das lesões polipóides do estômago (Morson *et al.*, 1990). A ocorrência de transformação maligna nestas lesões é extremamente rara (Daibo *et al.*, 1987). Nenhum dos pólipos hiperplásicos incluídos na presente série apresentou imunoreactividade "para" a COX-2. Em consonância com estes resultados estão os achados de Uefuji *et al.* (2001). Estes autores não observaram expressão de RNAm de COX-2 neste tipo de lesões.

Por outro lado, Kawada *et al.* (2002) estudaram a expressão de COX-2 numa série de 58 pólipos hiperplásicos e observaram imunoreactividade "para" a COX-2 em células estromais em 43 (74%) dos 58 pólipos estudados. Estes autores também verificaram uma associação entre expressão de COX-2, factor de crescimento endotelial vascular, densidade de micro-vasos e dimensão dos pólipos. Os autores sugeriram que a COX-2 pode participar no crescimento destas lesões através da indução de angiogénese.

Os pólipos estudados na presente série poderão ter tido expressão de COX-2 nas células estromais durante a fase de crescimento, encontrando-se agora numa fase quiescente, com ausência de expressão de COX-2.

Embora estudos prévios tenham demonstrado a presença de expressão de COX-2 em gastrite com infecção por *H. pylori* (Sawaoka *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 1999; McCarthy *et al.*, 1999; Tatsuguchi *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 2000), a localização da expressão na mucosa gástrica varia entre os diferentes trabalhos publicados. No nosso estudo, a imunoreactividade foi observada na zona proliferativa do epitélio glandular e em células mononucleadas do estroma. Estes resultados são idênticos aos obtidos por Jackson *et al.* (2000). Fu *et al.* (1999) observaram imunoreactividade de COX-2 apenas em células do estroma; em contapartida, outros autores (Sawaoka *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 2000) identificaram imunoreactividade predominantemente localizada no epitélio foveolar e glandular. A disparidade destes resultados pode ser explicada pela diversidade de anticorpos anti-COX-2 utilizada nestes estudos. Não é possível avaliar se o tipo de estirpes de *H. pylori* e as características do

hospedeiro podem ter contribuído para a variabilidade de expressão de COX-2 nas situações de gastrite. Uma análise destes factores está claramente fora do âmbito deste estudo. No entanto, é de salientar que todos estes estudos demonstram expressão de COX-2 na gastrite com infecção por *H. pylori*. O papel desta enzima neste quadro lesional, considerado ponto de partida do carcinoma gástrico, foi recentemente clarificado. Meyer *et al.* (2003) demonstraram que a expressão crónica de COX-2, com produção de PGE<sub>2</sub>, exerce um efeito imunossupressor. Este efeito, embora proteja a mucosa gástrica de lesões graves, pode ter como consequência a persistência da infecção bacteriana e contribuir para o risco de desenvolvimento de lesões que podem progredir para o carcinoma gástrico.

No presente estudo constatámos que todos os casos de metaplasia intestinal exprimem COX-2. Outros autores (Sung *et al.*, 2000; van Rees *et al.*, 2002) obtiveram resultados idênticos. Contudo, os trabalhos referidos são omissos em relação à expressão de COX-2 nos diferentes sub-tipos de metaplasia intestinal. Segundo Fenoglio-Preiser *et al.* (2000), a extensão da metaplasia intestinal e a presença de metaplasia intestinal incompleta, associada a displasia, associam-se a um aumento marcado de risco para desenvolvimento de cancro do estômago. Por outro lado, dos três sub-tipos de metaplasia intestinal da classificação de Filipe *et al.* (1986), a de tipo III é aquela a que alguns autores têm atribuído a maior especificidade de associação ao carcinoma gástrico, nomeadamente de tipo intestinal (Filipe *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1998). Neste sentido, procurámos avaliar o padrão de expressão de COX-2 nos diferentes sub-tipos de metaplasia intestinal. Os resultados obtidos mostram que a expressão de COX-2 na metaplasia intestinal de tipo III não se distingue da observada nos outros dois sub-tipos (I e II). Deste modo, a intensidade da expressão de COX-2 não parece associar-se à metaplasia intestinal de tipo III. Em todo o caso, os nossos resultados reforçam a noção de que a COX-2, ao ser expressa na metaplasia intestinal, está provavelmente envolvida numa fase precoce da carcinogénese gástrica (van Rees *et al.*, 2002).

Com base na seguinte evidência, propomos que a COX-2 desempenha um papel na substituição do epitélio glandular próprio do estômago por um epitélio de tipo intestinal (*i.e.* metaplasia intestinal). Verificámos que, na gastrite crónica, a COX-2 é expressa em células no estroma e na zona do colo das glândulas do estômago. É nesta zona de proliferação celular que se localizam as células progenitoras multipotenciais (células *stem*) (Karan e Leblond, 1993). Referimos anteriormente que a COX-2 está ancorada no retículo endoplasmático e na membrana nuclear (Spencer *et al.*, 1998) e que as prostaglandinas sintetizadas pela COX-2 podem estimular receptores peri-nucleares da PGE<sub>2</sub> (nomeadamente os sub-tipos EP<sub>1</sub> e EP<sub>3</sub>) (Bhattacharya *et al.*, 1998; Gobeil *et al.*, 2002) e os receptores nucleares PPAR $\delta$  (Gupta *et al.*, 2000) e PPAR $\gamma$  (Forman *et al.*, 1995). Os receptores peri-nucleares podem estimular a transcrição de genes de expressão induzível (*e.g.* genes que codificam o factor de transcrição c-fos e a enzima iNOS) (Bhattacharya *et al.*, 1998, 1999). Verificou-se que estes receptores também podem regular genes de expressão constitucional, nomeadamente o gene que codifica a eNOS (Gobeil *et al.*, 2002).

Por outro lado, demonstrou-se recentemente numa linha celular de carcinoma colo-rectal (HCT-15) que a estimulação de PPAR $\gamma$  induz a

expressão de vilina e MUC2, marcadores de diferenciação da mucosa colo-rectal (Kato *et al.*, 2003). Neste contexto, é de salientar que o PPAR $\gamma$  é expresso marcadamente ao longo do desenvolvimento fetal de todo o tubo digestivo, excepto no estômago, onde a sua expressão é ligeira (Huin *et al.*, 2000), sugerindo um papel fundamental deste receptor no desenvolvimento e/ou fisiologia do aparelho digestivo.

No contexto de gastrite crónica, a expressão continuada de COX-2 e estimulação crónica de PPAR $\gamma$  nas células *stem* poderá, deste modo, induzir a expressão *de novo* de MUC2 no estômago, contribuindo para o aparecimento de metaplasia intestinal.

A via de sinalização peri-nuclear de COX-2 poderá, de forma semelhante, induzir a transcrição de genes de expressão constitucional, que contribuam para o aparecimento de um fenótipo glandular intestinal no estômago.

Seria interessante verificar se, para além da erradicação da infecção por *H. pylori*, a inibição farmacológica de COX-2 na metaplasia intestinal, ao inibir a síntese de prostaglandinas e, conseqüentemente, a estimulação de receptores nucleares, poderá suprimir a expressão de "genes intestinais", reverter o fenótipo intestinal, criando condições próprias para que as células *stem* se diferenciem de acordo com o fenótipo próprio do estômago.

As lesões de displasia incluídas nesta série apresentaram uma imunorreactividade de intensidade forte, o que denota um aumento de intensidade da expressão de COX-2 em relação às lesões de metaplasia intestinal, reforçando os resultados de van Rees *et al.* (2001). Este aumento de intensidade sugere que a produção de prostaglandinas pela COX-2 é importante para o epitélio displásico e pode favorecer a progressão destas lesões para o adenocarcinoma de tipo intestinal.

No presente estudo verificámos a expressão de COX-2 numa percentagem elevada de carcinomas gástricos, o que está de acordo com os resultados obtidos por outros autores (Ristimaki *et al.*, 1997; Uefuji *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2002).

Alguns autores afirmam que a expressão de COX-2 em carcinomas gástricos se associa ao grau de invasão da parede do estômago (Joo *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2002). Os nossos resultados, bem como os de outros autores (Xue *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2001), não corroboram esta associação. Também não encontramos relação entre expressão de COX-2 e metastização ganglionar ou invasão vascular (venosa e linfática).

Os resultados da literatura são discordantes em relação à expressão de COX-2 nos diferentes tipos histológicos de carcinomas gástricos (Saukkonen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Joo *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2002). Saukkonen *et al.*, (2001), Joo *et al.* (2002) e Han *et al.* (2002) defendem a existência de uma associação entre expressão de COX-2 com o adenocarcinoma de tipo intestinal. Os nossos resultados mostraram a presença de imunorreactividade "para" a COX-2 em 100% dos adenocarcinomas de tipo glandular/intestinal, 83% dos carcinomas de tipo difuso/células isoladas e em 87% dos carcinomas atípicos. Embora estes valores demonstrem um predomínio da expressão de COX-2 nos adenocarcinomas de tipo glandular/intestinal, esta associação não foi estatisticamente significativa, reforçando os resultados obtidos por outros autores (Uefuji *et al.*, 1998, 2001; Chen *et al.*, 2001). Por outro lado, quer o adenocarcinoma de tipo glandular/intestinal, quer o carcinoma

difuso/células isoladas apresentam uma prevalência elevada de alterações genéticas (e.g. "sobre-expressão" de EGF, EGF-R e TGF- $\alpha$ ; ver revisão de Nardone, 2003) que podem induzir a expressão de COX-2, o que retira especificidade à referida associação.

Ao contrário de Chen *et al.* (2001), não encontramos uma relação entre expressão de COX-2 e infecção por *H. pylori* na mucosa não neoplásica adjacente às neoplasias. Neste contexto, Saukkonen *et al.* propõem que a expressão elevada de COX-2 observada em células neoplásicas está, muito provavelmente, na dependência de alterações genéticas das próprias células (e.g. activação de oncogenes e inactivação de genes supressores tumorais). Esta proposta é corroborada pela presença de expressão de COX-2 em células neoplásicas afastadas da zona de superfície da mucosa gástrica, onde não há "contacto" com *H. pylori*.

De acordo com os resultados de Han *et al.* (2002), constatámos que a expressão de COX-2 é significativamente mais prevalente em tumores com dimensão superior a 5 cm, quando comparada com tumores de dimensões iguais ou inferiores a esta. Estes resultados sugerem que a COX-2 desempenha um papel no crescimento tumoral. Stolina *et al.* (2000), utilizando um modelo murino de carcinoma do pulmão, observaram uma infiltração peri-tumoral marcada de linfócitos e uma redução do crescimento tumoral após inibição de COX-2. Os mesmos efeitos foram reproduzidos quando trataram os ratinhos com um anticorpo anti-PGE<sub>2</sub>. Os autores também verificaram que a inibição de COX-2 se associou a uma redução significativa de IL-10 e a um aumento concomitante de IL-12. Stolina *et al.* (2000) concluíram que a inibição de COX-2 desempenha um papel importante na modulação da resposta imunológica, que se repercute no crescimento tumoral.

A angiogénese é um processo biológico fundamental para o crescimento tumoral. A "sobre-expressão" de COX-2 associa-se a um aumento da secreção de factores pró-angiogénicos e a inibição farmacológica desta enzima suprime a formação de novos vasos (Tsuji *et al.*, 1998). A ausência de expressão de COX-2 em neoplasias pode, deste modo, comprometer a proliferação de células neoplásicas e, conseqüentemente, o crescimento tumoral. Por outro lado, Tsuji e DuBois (1995) mostraram que a expressão aumentada de COX-2 se associa a resistência à apoptose, sendo este efeito revertido e mesmo induzido pelos inibidores de COX-2. A acção anti-apoptótica de COX-2 pode contribuir para a viabilidade das células neoplásicas e, deste modo, aumentar o volume tumoral.

A aquisição de um aumento da capacidade de invasão do estroma é outro dos mecanismos que pode contribuir para o aumento das dimensões tumorais. Tsuji *et al.* (1995, 1997) verificaram que células programadas para exprimir COX-2 de forma constitucional mostraram uma redução de expressão de caderina E, activação da metaloproteinase-2 de membrana e aumento dos níveis de ARNm da metaloproteinase-1 de tipo membranar. Estes efeitos foram revertidos por um inibidor de COX-2, sugerindo uma relação directa entre expressão de COX-2, redução da adesão inter-celular e activação de metaloproteinases. No presente estudo observámos imunorreactividade das células neoplásicas "para" COX-2 particularmente marcada na interface neoplasia-estroma. Este aspecto pode ser o reflexo histológico dos achados de Tsuji *et al.* (1995, 1997).

Em resumo, a COX-2 pode contribuir para o aumento do crescimento tumoral pela indução de um efeito imunossupressor, estimulação da angiogénese, inibição da apoptose e activação de metaloproteinasas.

É tentador especular sobre o papel que os inibidores da COX-2 poderão ter na proliferação celular e crescimento de carcinomas gástricos. Se, à semelhança do que se passa em lesões neoplásicas do cólon e recto, esse efeito "inibidor" se verificar, é possível que a intervenção farmacológica (com inibidores específicos de COX-2) possa vir a ter um lugar na prevenção e terapêutica do cancro gástrico.

Com base nos dados existentes na literatura e nos resultados obtidos por nós, podemos tirar as seguintes conclusões:

1) A maioria dos carcinomas gástricos exprime COX-2; 2) A expressão de COX-2 surge precocemente no processo de cancerização gástrica; 3) Há um aumento progressivo na intensidade da expressão de COX-2 ao longo da via que conduz ao adenocarcinoma de tipo glandular/intestinal; 4) Existe uma associação entre expressão de COX-2 e tumores com dimensão superior a 5 cm.

No presente estudo analisámos também os efeitos da metilação do promotor do gene *PTGS2* na expressão de COX-2. Para tal utilizámos linhas celulares e um sub-grupo de carcinomas gástricos, seleccionados de entre os casos incluídos na presente série. Verificámos que a metilação do promotor do gene *PTGS2* regula a expressão de COX-2 em linhas celulares de carcinoma gástrico, de acordo com os resultados obtidos por Song *et al.* (2001, 2003). Em tecidos de carcinoma gástrico, a frequência de metilação do promotor do gene *PTGS2* oscila entre 12 e 46% (Kikuchi *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003). A frequência obtida no presente estudo foi de 19% e enquadra-se nos valores referidos na literatura.

Curiosamente, não encontramos uma associação entre expressão de COX-2 e metilação do promotor de gene *PTGS2* nos carcinomas gástricos. No nosso estudo, os 6 casos com metilação do promotor apresentaram imunorreactividade "para" a COX-2. As explicações possíveis para esta verificação são as seguintes:

1) o método utilizado para estudar a metilação do promotor (MSP) é extremamente sensível, podendo detectar uma célula com metilação do promotor entre 1000 células sem metilação (Herman *et al.*, 1996). Uma amostra com estas características (metilação do promotor numa única célula) seria classificada como tendo um padrão positivo para metilação. No entanto, no estudo imuno-histoquímico desta amostra observar-se-ia imunorreactividade "para" a COX-2 em 99,9% das células neoplásicas;

2) podemos estar na presença de uma população de células neoplásicas com metilação parcial do promotor do gene *PTGS2*. Os trabalhos de Toyota *et al.* (2000) e Song *et al.* (2001) mostram claramente que o silenciamento da expressão do gene *PTGS2* depende da localização e intensidade de metilação do respectivo promotor. Song *et al.* (2001) não encontraram uma região de tipo *hot spot*, ou seja uma região crítica do promotor, onde a metilação de um pequeno número de bases CpG é suficiente para inibir a transcrição do gene. Pelo contrário, a inibição da transcrição deste gene requer uma metilação densa ao longo de toda a extremidade 3' e grande

parte da extremidade 5' do promotor (Song *et al.*, 2001). Para esclarecer a relação entre metilação do promotor do gene *PTGS2* e a expressão do seu produto na presente série, seria necessário sequenciar o promotor, o que iria permitir quantificar a densidade e extensão de metilação. Por outro lado, é de salientar que um gene incompletamente metilado, condicionando níveis reduzidos de ARNm, pode originar níveis suficientes de proteína COX-2, desde que o ARNm seja estável. Este efeito de estabilização do ARNm pode ser mediado por proteínas específicas, como o factor HuR (Dixon *et al.*, 2001);

3) de acordo com os nossos resultados obtidos em linhas celulares, não podemos excluir a presença de casos com metilação mono-alélica. A verificar-se esta situação, o alelo não metilado seria responsável pela presença de imunorreactividade.

Em um dos casos observou-se ausência de metilação e de imunorreactividade, o que sugere que a ausência de expressão de COX-2 se deva a outras alterações moleculares, como instabilidade do ARNm, que dificulte uma transdução eficaz. Saliente-se, neste contexto, que na literatura não há evidência de deleções ou mutações genéticas do gene *PTGS2*.

Fica por esclarecer se polimorfismos do gene *PTGS2* podem ter consequências funcionais na expressão de COX-2. Estudos preliminares do nosso grupo (resultados não publicados) não permitiram identificar polimorfismos do gene *PTGS2* que se associem a risco aumentado de desenvolvimento de carcinoma gástrico.

Os resultados deste estudo permitiram verificar que, em linhas celulares, a metilação do promotor do gene *PTGS2* tem consequências funcionais na expressão de COX-2. Nos carcinomas gástricos não se verificou uma associação entre a metilação do promotor génico e a expressão da enzima. Este resultado permite concluir que a metilação não pode ser analisada como um fenómeno de "tudo ou nada". Para o esclarecimento das consequências funcionais da metilação do promotor do gene *PTGS2* torna-se necessário verificar se a metilação é mono-alélica ou bi-alélica e analisar a localização e extensão dos locais metilados no promotor do gene *PTGS2* (objectivos estes que ultrapassam os do presente estudo).

## 6. Bibliografia

- Ahuja N, Mohan AL, Li Q, Stolker JM, Herman JG, Hamilton SR, Baylin SB, Issa JP. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 3370-4.
- Altiok S, Xu M, Spiegelman BM. PPAR $\gamma$  induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Prev* 1997; 11: 1987-98.
- Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072: 129-57.
- Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* 1994; 302: 723-7.
- Araki Y, Okamura S, Hussain SP, Nagashima M, He P, Shiseki M, Miura K, Harris CC. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and Ras pathways. *Cancer Res* 2003; 63: 728-34.
- Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, Tsubokawa M, Tohyama Y, Omata M, Suzuki T, Sasakawa C. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med* 2000; 191: 593-602.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 255-60.
- Atherton JC, Peek RM Jr, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112: 92-99.
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmsberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995; 270: 286-90.
- Badawi AF, Badr MZ. Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and levels of prostaglandin E<sub>2</sub> and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> in human breast cancer and metastasis. *Int J Cancer* 2003; 103: 84-90.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-45.
- Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 303-8.
- Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JI, Beach M, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Greenberg ER, Mandel JS, Marcon N, Mott LA, Pearson L, Phil M, Saibil F, van Stolk RU. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2003; 348: 891-9.
- Barreto-Zuniga R, Maruyama M, Kato Y, Aizu K, Ohta H, Takekoshi T, Bernal SF. Significance of *Helicobacter pylori* infection as a risk factor in gastric cancer. *J Gastroenterol* 1997; 32: 289-94.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998; 72: 141-96.
- Beales IL, Calam J. Interleukin -1 $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut* 1998; 42: 227-234.
- Beiche F, Scheuerer S, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Struebe M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett* 1996; 390: 165-9.
- Bennett A, Del Tacca M. Proceedings: Prostaglandins in human colonic carcinoma. *Gut* 1975; 16: 409.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361: 315-25.
- Bhattacharya M, Peri KB, Almazan G, Ribeiro-da-Silva A, Shichi H, Durocher Y, Abramovitz M, Hou X, Varma DR, Chemtob S. Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15792-7.
- Bhattacharya M, Peri KB, Ribeiro-da-Silva A, Almazan G, Shichi H, Hou X, Varma DR, Chemtob S. Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J Biol Chem* 1999; 274: 15719-24.
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321: 209-13.
- Bishop-Bailey D, Hla T. Endothelial cell apoptosis induced by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 1999; 274: 17042-8.
- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Klebanoff H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-5.
- Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis* 1990; 161: 626-633.
- Brennan PA. The actions and interactions of nitric oxide in solid tumours. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26: 434-7.

Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 661-90.

Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland AP. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications of the development of skin cancer. *Carcinogenesis* 1998; 19: 723-9

Caelles C, Gonzalez-Sancho JM, Munoz A. Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev* 1997; 11: 3351-64.

Callejas NA, Castrillo A, Bosca L, Martin-Sanz P. Inhibition of prostaglandin synthesis up-regulates cyclooxygenase-2 induced by lipopolysaccharide and peroxisomal proliferators. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 1235-41.

Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11280-5

Carneiro F, Seixas M, Sobrinho-Simões M. New elements for an updated classification of the carcinomas of the stomach. *Pathol Res Pract* 1995; 191: 571-84.

Carter LL, Dutton RW. Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 336-42.

Carvalho B, Pinto M, Cirnes L, Oliveira C, Machado JC, Suriano G, Hamelin R, Carneiro F, Seruca R. Concurrent hypermethylation of gene promoters is associated with a MSI-H phenotype and diploidy in gastric carcinomas. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1222-7.

Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 20; 95: 681-6.

Chen CN, Sung CT, Lin MT, Lee PH, Chang KJ. Clinicopathologic association of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 expression in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233: 183-8.

Chen CY, Shyu AB. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 465-70.

Clay CE, Namen AM, Atsumi G, Willingham MC, High KP, Kute TE, Trimboli AJ, Fonteh AN, Dawson PA, Chilton FH. Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1905-11.

Clay CE, Namen AM, Fonteh AN, Atsumi G, High KP, Chilton FH. 15-deoxy-Delta (12,14) PGJ (2) induces diverse biological responses via PPARgamma activation in cancer cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2000; 62: 23-32.

Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L, Graves-Deal R, Daniel VC, Dempsey PJ, Chinery R, Kirkland SC, DuBois RN, Jetton TL, Morrow JD. Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; 94: 657-62.

Collins T. Acute and chronic inflammation. In Cotran RS, Kumar V, Collins T (eds): *Pathologic Basis of Disease*, 6<sup>th</sup> ed. Saunders, 1999: 50-88.

Coogan PF, Rosenberg L, Palmer JR, Strom BL, Zauber AG, Stolley PD, Shapiro S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of digestive cancers at sites other than the large bowel. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 119-23.

Cordon-Cardo C, Prives C. At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *J Exp Med* 1999; 190: 1367-70.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process – First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 15: 6735-40.

Correa P, Fontham ET, Bravo JC, Bravo LE, Ruiz B, Zarama G, Realpe JL, Malcom GT, Li D, Johnson WD, Mera R. Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1881-1888.

Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995; 19 Suppl 1: S37-47.

Crawford JM. The gastrointestinal tract. In Cotran RS, Kumar V, Collins T (eds): *Pathologic Basis of Disease*, 6<sup>th</sup> ed. Saunders, 1999: 775-844.

Daibo M, Itabashi M, Hirota T. Malignant transformation of gastric hyperplastic polyps. *Am J Gastroenterol* 1987; 82: 1016-25.

Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20: 649-88.

Dimberg J, Samuelsson A, Hugander A, Soderkvist P. Differential expression of cyclo-oxygenase 2 in human colorectal cancer. *Gut* 1999; 45: 730-2.

Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Post-transcriptional control of cyclo-oxygenase-2 gene expression. The role of the 3-untranslated region. *J Biol Chem* 2000; 275: 11750-7.

Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors TM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclo-oxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 1657-65.

Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis. Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-81.

Dormond O, Foletti A, Paroz C, Ruegg C. NSAIDs inhibit alpha V beta 3 integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nat Med* 2001; 7: 1041-7.

Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 1995; 75: 125-31.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12: 1063-73.

Dubois RN, Radhika A, Reddy BS, Entingh AJ. Increased cyclo-oxygenase-2 levels in carcinoma-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* 1996; 110: 1259-62.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183-8

El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402.

El-Omar EM, Chow WH, Rabkin CS. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: Host genetics open the way. *Gastroenterology* 2001; 121: 1002-4.

El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, Stanford JL, Mayne ST, Goedert J, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2003; 124: 1193-201.

Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXH mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8806-11.

Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 615-40.

Everhart JE. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin N Am* 2000; 29: 559-578.

Fajas L, Egler V, Reiter R, Miard S, Lefebvre AM, Auwerx J. PPARgamma controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner. *Oncogene* 2003; 22: 4186-93.

Fan XM, Wong BC, Lin MC, Cho CH, Wang WP, Kung HF, Lam SK. Interleukin-1 beta induces cyclo-oxygenase-2 expression in gastric cancer cells by the p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1098-104.

Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 1997; 99: 2818-25.

Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, Chen D, Zhao CM, Podolski DK, Wang TC. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. *J Clin Invest* 2002; 109: 193-204.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301: 89-92.

Fenoglio-Preiser C, Carneiro F, Correa P, Guilford P, Lambert R, Megraud F, Munoz N, Powell SM, Rugge M, Sasako M, Stolte M, Watanabe H. Gastric carcinoma. In Hamilton SR, Aaltonen LA (eds): *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System*. IARC Press, Lyon 2000: 39-52.

Filipe MI, Jass JR. Intestinal metaplasia subtypes and cancer risk. In Filipe MI, Jass JR (eds): *Gastric carcinoma*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1986: 87-115.

Filipe MI, Munoz N, Matko I, Kato I, Pompe-Kirn V, Jutersek A, Teuchmann S, Benz M, Prijon T. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. *Int J Cancer* 1994; 57: 324-9.

Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, Jmaes SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 1090-5.

Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4312-7.

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995; 83: 803-12.

Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Br Med J* 1991; 302: 1302-5.

Fu S, Ramanujam KS, Wong A, Fantry GT, Drachenberg CB, James SP, Meltzer SJ, Wilson KT. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology* 1999; 116: 1319-29.

Galmiche A, Rasso J, Doyce A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, de Thillot V, Just I, Ricci V, Solcia E, Van Obberghen E, Boquet P. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* 2000; 19: 6361-6370.

- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG Islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987; 196: 261-82.
- Gayther SA, Goringe KL, Ramus SJ, Huntsman D, Roviello F, Grehan N, Machado JC, Pinto E, Seruca R, Halling K, MacLeod P, Powell SM, Jackson CE, Ponder BA, Caldas C. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res* 1998; 58: 4086-9.
- Gelman L, Fruchart JC, Auwerx J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 932-43.
- Ghiara P, Marchetti M, Blaser MJ, Tummuru MK, Cover TL, Segal ED, Tompkins LS, Rappuoli R. Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin CagA, and urease in a mouse model of disease. *Infect Immun* 1995; 63: 4154-4160.
- Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hyland LM, Celano P, Booker SV, Robinson CR, Offerhaus GJ. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 6; 328: 1313-6
- Giardiello FM, Yang VW, Hyland LM, Krush AJ, Petersen GM, Trimbath JD, Piantadosi S, Garrett E, Geiman DE, Hubbard W, Offerhaus JA, Hamilton S. Primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac. *N Engl J Med* 2002; 346: 1054-85.
- Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE. Aspirin and risk for colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 1995; 333: 609-14.
- Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. Aspirin use and risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 1994; 121: 241-6.
- Girnun GD, Smith WM, Drori S, Sarraf P, Mueller E, Eng C, Nambiar P, Rosenberg DW, Bronson RT, Edelman W, Kuchelapati R, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPAR $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13771-6.
- Glinghammar B, Skogsberg J, Hamsten A, Ehrenborg E. PPAR $\delta$  activation induces COX-2 expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 361-8.
- Go MF, Kapur V, Graham DY, Musse JM. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol* 1996; 178: 3934-3938.
- Gobeil F Jr, Dumont I, Marrache AM, Vazquez-Tello A, Bernier SG, Abran D, Hou X, Beauchamp MH, Quiniou C, Bouayad A, Choufani S, Bhattacharya M, Molotchnikoff S, Ribeiro-da-Silva A, Varma DR, Bkaily G, Chemtob S. Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors. *Circ Res* 2002; 90: 682-9.
- Gobeil F Jr, Vazquez-Tello A, Marrache AM, Bhattacharya M, Checchin D, Bkaily G, Lachapelle P, Ribeiro-da-Silva A, Chemtob S. Nuclear prostaglandin signaling system: biogenesis and actions via heptahelical receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81: 196-204.
- Gray SF, Wyatt JI, Rathbone BJ. Simplified techniques for identifying *Campylobacter pyloridis*. *J Clin Pathol* 1986; 39: 1279-80.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 28; 281: 1309-12.
- Grisham MB, Jourd'Heuil D, Wink DA. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999; 99: 315-21.
- Guilford P, Hopkins J, Harraway J, Mcleod M, Mcleod N, Harawira P, Taite H, Scouler R, Miller A, Reeve AE. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998; 392: 402-5.
- Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Association of cyclo-oxygenase-2 expression with Hp-cagA infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 246-9.
- Guo Y-S, Cheng J-Z, Jin G-F, Gutkind JS, Hellmicht MR, Townsend Jr CM. Gastrin stimulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through multiple signaling pathways. Evidence for involvement of ERK5 kinase and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2002; 277: 48755-63.
- Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclo-oxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 11-21.
- Gupta RA, Polk DB, Krishna U, Israel DA, Yan F, Dubois RN, Peek RM Jr. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses nuclear factor kappa B-mediated apoptosis induced by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 31059-66.
- Gupta RA, Tan J, Krause WF, Geraci MW, Willson TM, Dey SK, DuBois RN. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  in colorectal cancer. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000; 97: 13275-80.
- Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 2000; 42: 73-8
- Han SL, Tang HJ, Hua YW, Ji SQ, Lin Dx. Expression of COX-2 in stomach cancers and its relation to their biological features. *Dig Surg* 2003; 20: 107-14.

Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Saitano-Coico L, Shiff SI, Rigas B. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 237-45.

Hansson LE, Engstrand L, Nyren O, Evans DJ Jr, Lindgren A, Bergstrom R, Andersson B, Athlin L, Bendtsen O, Tracz P. *Helicobacter pylori* infection: independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1993; 105: 1098-103.

Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclo-oxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994; 94: 2540-70.

Hatae T, Wada M, Yokoama C, Shimonishi M, Tanabe T. Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. *J Biol Chem* 2001; 276: 46260-7.

He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPAR delta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999; 99: 335-45.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-6.

Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1299(1): 125-40.

Heuze-Vourc'h N, Zhu L, Krysan K, Batra RK, Sharma S, Dubinett SM. Abnormal interleukin 10 expression contributes to the maintenance of elevated cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 766-70.

Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 1990; 63: 1149-57.

Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kosaki K, Nakamura S, Ogawa M, Mitsudomi T, Sugiura T, Takahashi T. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 3761-4.

Hill MJ. Bile acids and colorectal cancer: hypothesis. *Eur J Cancer Prev* 1991; 1: 69-74.

Hinz B, Brune K, Pahl A. Cyclo-oxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E(2), non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 A; 278: 790-6.

Hinz B, Brune K, Pahl A. Prostaglandin E(2) upregulates cyclo-oxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 B; 272: 744-8.

Hirano T, Nakajima K, Hibi M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 241-52.

Hirayama F, Takagi S, Iwao E, Yokoyama Y, Haga K, Hanada S. Development of poorly differentiated adenocarcinoma and carcinoid due to long-term *Helicobacter pylori* colonization in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol* 1999; 34: 450-4.

Hirayama F, Takagi S, Yokoyama Y, Iwao E, Ikeda Y. Establishment of gastric *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol* 1996; 31 (Suppl. 9): 24-28.

Hla T, Nielson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7384-8.

Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res* 1998; 58: 4255-9.

Howson CP, Hiyama T, Wynder EL. The decline in gastric cancer: Epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev* 1986; 8: 1-27.

Hu PJ, Mitchell HM, Li YY, Zhou MH, Hazell SL. Association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and observations on the detection of this bacterium in gastric cancer cases. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1806-1810.

Huang M, Sharma S, Mao JT, Dubinett SM. Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E2 enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production. *J Immunol* 1996; 157: 5512-20.

Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM. Non-small cell lung cancer cyclo-oxygenase-2 dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of Interleukin 10 and down-regulation of Interleukin 12 production. *Cancer Res* 1998; 58: 1208-16.

Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 1999; 190: 1375-82.

Huin C, Corriveau L, Bianchi A, Keller JM, Collet P, Kremarik-Bouillaud P, Domenjoud L, Becuwe P, Schohn H, Menard D, Dauca M. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the developing human fetal digestive tract. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 603-11.

Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, MacLeod PM, Hayashi A, Monaghan KG, Maung R, Seruca R, Jackson CE, Caldas C. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. *N Engl J Med* 2001; 344: 1904-9.

- Hur K, Song SH, Lee HS, Ho Kim W, Bang YJ, Yang HK. Aberrant methylation of the specific CpG island portion regulates cyclo-oxygenase-2 gene expression in human gastric carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 844-51.
- Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 18; 90: 455-60
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61: 1-214.
- Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T. Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 24965-71.
- Isseman I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1999. 347: 645-50.
- Jackson LM, Wu KC, Mahida YR, Jenkins D, Hawkey CJ. Cyclooxygenase (COX) 1 and 2 in normal, inflamed, and ulcerated human gastric mucosa. *Gut* 2000; 47: 762-70.
- Jaffe BM. Prostaglandins and cancer: an update. *Prostaglandins* 1974; 6: 453-61.
- Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res* 2000; 60: 184-90.
- Jass JR, Filipe MI. Sulphomucins and precancerous lesions of the human stomach. *Histopathology* 1980; 4: 271-9.
- Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391: 82-6.
- Jobin C, Morteau O, Han DS, Baulfor Sartor R. Specific NF-kappaB blockade selectively inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced COX-2 but not constitutive COX-1 gene expression in HT-29 cells. *Immunology* 1998; 95: 537-43.
- Jones PL, Wolfe AP. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 339-47.
- Kang GH, Lee S, Kim S, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 635-41.
- Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. V. Behavior of entero-endocrine and caveolated cells: general conclusions on cell kinetics in the oxyntic epithelium. *Anat Rec* 1993; 236: 233-40.
- Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, Evans J, O'Neill G. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 1996; 11: 445-54.
- Kargman S, O'Neill G, Vickers PJ, Evans JF, Mancini J, Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 2556-9.
- Karnes WE Jr, Samloff IM, Siurala M, Kekki M, Sipponen P, Kim SW, Walsh JH. Positive serum antibody and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterology* 1991; 101: 167-74.
- Karnes WE Jr, Shattuck-Brandt R, Burgart LJ, DuBois RN, Tester DJ, Cunningham JM, Kim CY, McDonnell SK, Schaid DJ, Thibodeau SN. Reduced COX-2 protein in colorectal cancer with defective mismatch repair. *Cancer Res* 1998; 58: 5473-7.
- Kato M, Kusumi T, Tsuchida S, Tanaka M, Sasaki M, Kudo H. Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by troglitazone. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003 (Epub ahead of print).
- Kawada M, Seno H, Wada M, Suzuki K, Kanda N, Kayahara T, Fukui H, Sawada M, Kajiyama T, Sakai M, Chiba T. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in gastric hyperplastic polyp-association with polyp size. *Digestion* 2003; 67: 20-4.
- Keller G, Vogelsang H, Becker I, Hutter J, Ott K, Candidus S, Grundei T, Becker KF, Mueller J, Siewert JR, Hofler H. Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol* 1999; 155: 337-42.
- Kersten S, Desvergne B, Wahll W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000; 405: 421-4.
- Kikuchi T, Itoh F, Toyota M, Suzuki H, Yamamoto H, Fujita M, Hsokawa M, Imai K. Aberrant methylation and histone deacetylation of cyclo-oxygenase 2 in gastric cancers. *Int J Cancer* 2002; 97: 272-7.
- Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology* 2000; 32: 770-8.
- Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of Cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-96

Komori M, Tsuji S, Sun W-H, Tsujii M, Kawai N, Yasumaru M, Kakiuchi Y, Kimura A, Sasaki Y, Higashiyama S, Kawano S, Hori M. Gastrin enhances gastric mucosal integrity through cyclooxygenase-2 upregulation in rats. *American Journal Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1368-78.

Konturek OC, Konturek SJ, Pierzchalski P, Bielanski W, Duda A, Marlicz, Starzynska T, Hahn EG. Cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected stomach-role of growth factors, apoptosis and cyclo-oxygenases. *Med Sci Monit* 2001; 7: 1092-107.

Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 1994; 221: 889-97.

Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S, Miyoshi I, Koeffler HP. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1998; 58: 3344-52.

Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis : importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1777-1780.

Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 429-34

Labayle D, Fisher D, Vielh P, Drouhin F, Pariente A, Bories C, Duhamel O, Troussset M, Attali P. Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 1991; 101: 635-9.

Lane P, Gross SS. Nitric oxide: promiscuous and duplicitous. *Science & Medicine* 2002; 8: 96-107.

Lasa M, Brook M, Saklatvala J, Clark AR. Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 771-80.

Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49.

Lee TL, Leung WK, Lau JY, Tong JH, Ng EK, Chan FK, Chung SC, Sung JJ, To KF. Inverse association between cyclooxygenase-2 protein overexpression and microsatellite instability in gastric cancer. *Cancer Lett* 2001; 168: 133-40.

Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambom P, Rio MC. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* 1996; 274: 259-62.

Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1997; 272: 3406-10.

Leung WK, To KF, Ng YP, Lee TL, Lau JY, Chan FK, Ng EK, Chung SC, Sung JJ. Association between cyclo-oxygenase-2 overexpression and missense p53 mutations in gastric cancer. *Br J Cancer* 2001; 84:335-9.

Levi S, Beardshall K, Haddad G, Playford R, Ghosh P, Calam J. *Campylobacter pylori* and duodenal ulcers: the gastrin link. *Lancet* 1989; 1: 1167-8.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997; 88: 323-31.

Lim H, Dey SK. Minireview: A novel pathway of prostacyclin signaling - hanging out with nuclear receptors. *Endocrinology* 2002; 143: 3207-10.

Lin M-T, Lee R-C, Yang P-C, Ho F-M, Kuo M-L. Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1-0 cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 48997-02.

Liu CH, Chang S-H, Narko K, Trifan OC, Wu M-T, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001; 276: 18563-9.

Lutticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T, et al. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the Interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 1994; 263: 89-92.

Ma WJ, Chung S, Furneaux H. The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3564-9.

Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, Castro Alves C, Campos ML, Van Doorn LJ, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 364-71.

Mack DH, Vartikar J, Pipas JM, Laimins LA. Specific repression of TATA-mediated but not initiator-mediated transcription by wild-type p53. *Nature* 1993; 363: 3785-9.

Madve RE, Kim Y, Muga SJ, Fischer SM. Prostaglandin E(2) regulation of cyclo-oxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin receptors. *J Lipid Res* 2000; 41: 873-81.

Maestro R, Gloghini C, Gasparotto D, Vukosavljevic T, De Re V, Laurino L, Carbone A. MDM2 overexpression does not account for stabilization of wild-type p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1995; 85: 3239-46.

Maier JAM, Hla T, Maciag T. Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 10805-8.

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fran RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268: 1336-8.

Marnett LJ. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 5575-89.

Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-5.

Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000; 60: 1306-11.

Mashimo H, Wu DC, Podolski DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 1996; 272: 262-5.

Matsuura H, Sakaue M, Subbaramaiah K, Kamitani H, Eling TE, Dannenberg AJ, Tanabe T, Inoue H, Arat J, Jetten AM. Regulation of cyclooxygenase-2 by interferon  $\gamma$  and transforming growth factor  $\alpha$  in normal human epidermal keratinocytes and squamous carcinoma cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 29138-48.

McCarthy CJ, Crofford LJ, Greenson J, Scheiman JM. Cyclooxygenase-2 expression in gastric antral mucosa before and after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1218-23.

Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 8328-34.

Meyer F, Ramanujam KS, Gobert AP, James SP, Wilson KT. Cutting edge; cyclo-oxygenase-2 activation suppresses Th1 polarization in response to *Helicobacter pylori*. *J Immunol* 2003; 171: 3913-7.

Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* 1993; 12: 2005-15.

Miehlke S, Hackelsberger A, Meining A, von Arnim U, Muller P, Ochsenkuhn T, Lehn N, Malfertheiner P, Stolte M, Bayerdorffer E. Histological diagnosis of *Helicobacter pylori* gastritis is predictive of a high risk of gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 73: 837-9.

Mifflin RC, Saada JI, Di Mari JF, Adegboyega PA, Valentich JD, Powell DW. Regulation of COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts: mechanisms of IL-1-mediated induction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C824-34.

Minghetti L, Polazzi E, Nicolini A, Creminon C, Levi G. Interferon-gamma and nitric oxide down-regulate lipopolysaccharide-induced Prostanoid production in cultured rat microglial cells by inhibiting cyclo-oxygenase-2 expression. *J Neurochem* 1996; 66: 1963-70.

Minghetti L, Polazzi E, Nicolini A, Creminon C, Levi G. Up-regulation of cyclo-oxygenase-2 expression in cultured microglia by prostaglandin E<sub>2</sub>, cyclic AMP and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 934-40.

Mohammed SI, Knapp DW, Bostwick DG, Foster RS, Khan KN, Masferrer JL, Woerner BM, Snyder PW, Koki AT. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder. *Cancer Res* 1999; 59: 5647-50.

Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 1999; 59: 4356-62.

Molina-Holgado E, Arevalo-Martin A, Ortiz S, Vela JM, Guaza C. Theiler's virus infection induces the expression of cyclo-oxygenase-2 in murine astrocytes: inhibition by the anti-inflammatory cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10. *Neurosci Lett* 2000; 324: 237-41.

Moll UM, LaQuaglia M, Benard J, Riou G. Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumours. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4407-11.

Moncada S. Eighth Gaddum Memorial Lecture. University of London of Education, December 1980. Biological importance of prostacyclin. *Br J Pharmacol* 1982; 76: 3-31.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.

Morrison RF, Farmer SR. Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18 (INK4c) and p21 (Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J Biol Chem* 1999; 274: 10788-97.

Morson B, Dawson I, Day D, Jass J, Price A, Williams G, *Gastrointestinal Pathology*, 3rd ed. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne; Blackwell Scientific Publications, 1990: 734-135.

Muller-Decker K, Scholz K, Marks F, Furstenberger G. Differential expression of prostaglandin H synthase isozymes during multistage carcinogenesis in mouse epidermis. *Mol Carcinog* 1995; 12: 31-41.

Munoz N. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*. *Eur J Cancer Prev* 1996; 5: 405-8.

Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with resorcin-type structure. *Carcinogenesis* 2000; 21: 959-63.

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

Nardone G. Review article: molecular basis of gastric carcinogenesis. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17 Suppl 2: 75-81.

Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100: 2417-23.

Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrissson AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 1986; 55: 69-102.

Neufang G, Furstenberger G, Heidt M, Marks F, Muller-Decker K. Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expression of cyclo-oxygenase-2 in skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7629-34.

Nguyen C, Liang G, Nguyen TT, Tsao-Wei D, Groshen S, Lubbert M, Zhou JH, Benedict WF, Jones PA. Susceptibility of nonpromoter CpG islands to de novo methylation in normal and neoplastic cells. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1465-72.

Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; 325: 1132-6.

Nzeako UC, Guiciardi ME, Yoon J-H, Bronk SF, Gores GJ. COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2002; 35: 552-9.

Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; 287: 1497-1500.

Oh BR, Sasaki M, Perinchery G, Ryu SB, Park YI, Carroll P, Dahiya R. Frequent genotype changes at -308, and 488 regions of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene in patients with prostate cancer. *J Urol* 2000; 163: 1584-7.

Joo YE, Oh WT, Rew JS, Park CS, Choi SK, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 expression is associated with well-differentiated and intestinal-type pathways in gastric carcinogenesis. *Digestion* 2002; 66: 222-9.

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclo-oxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996; 87: 803-9.

Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 2002; 8: 289-93.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.

Pang L, Nie M, Corbett L, Knox AJ. Cyclooxygenase-2 expression by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human airway smooth muscle cells: role of peroxisome proliferator-activated receptor. *J Immunol* 2003; 170: 1043-1051.

Panigraphy D, Singer S, Shen LQ, Butterfield CE, Freedman DA, Chan EJ, Moses MA, Kilroy S, Duensing S, Fletcher C, Fletcher J, Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J, Kaipainen A. PPAR $\gamma$  ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest* 2002; 110: 923-32.

Papa A, Danese S, Sgambato A, Ardito R, Zannoni G, Rinelli A, Vecchio FM, Gentiloni-Silveri N, Cittadini A. Role of *Helicobacter pylori* CagA+infection in determining oxidative DNA damage in gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 409-13.

Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelstein H. Risk of gastric cancer in people with cagA+ or cagA- *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; 40: 297-301.

Parsonnet J, Friedman GD, Vanderstee DP, Chang Y, Vogelstein JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-31.

Parsonnet J, Hansen S, Rodrigues L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelstein JH, Friedman GD. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 1994; 330: 1267-71.

Parsonnet J. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol* 1995; 9: 45-51.

Pausawasdi N, Ramamoorthy S, Crofford LJ, Askari FK, Todisco A. Regulation and function of COX-2 gene expression in isolated gastric perietal cells. *American Journal Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G1069-78.

Peek RM Jr, Blaser MJ, Mays DJ, Forsyth MH, Cover TL, Song SY, Krishna U, Pietenpol JA. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res* 1999; 59: 6124-6131.

Peterson WL. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1043-8.

Plastaras JP, Guengerich FP, Nerbert DW, Marnett LJ. Xenobiotic-metabolizing cytochromes P450 convert prostaglandin endoperoxide to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagen, malondialdehyde. *J Biol Chem* 2000; 275: 11784-90.

Pomini F, Caruso A, Challis JR. Interleukin-10 modifies the effects of Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on the activity and expression of prostaglandin H synthase-2 and the NAD+ -dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in cultured term human villous trophoblast and chorion trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4645-51.

Quina MG. *Helicobacter pylori*: the Portuguese scene. Grupo de Estudo Português do *Helicobacter pylori* (GEPHP). Eur J Cancer Prev 1994; 3 Suppl 2: 65-7.

Reddy ST, Wadleigh DJ, Herschman HR. Transcriptional regulation of the cyclo-oxygenase-2 gene in activated mast cells. J Biol Chem 2000; 275: 3107-13.

Reinhart WH, Muller O, Halter F. Influence of long-term 16, 16- dimethyl prostaglandin E2 treatment on the rat gastrointestinal mucosa. Gastroenterology 1983; 85: 1003-10.

Reis CA, David L, Correa P, Carneiro F, de Bolos C, Garcia E, Mandel U, Clausen H, Sobrinho-Simões M. Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) expression. Cancer Res 1999; 59: 1003-7.

Richards FM, McKee SA, Rajpar MH, Cole TR, Evans DG, Jankowski JA, McKeown C, Sanders DS, Maher ER. Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. Hum Mol Genet 1999; 8: 607-10.

Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-gamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. J Leukoc Biol 1999; 66: 733-9.

Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclo-oxygenase-2 in human gastric carcinoma. Cancer Res 1997; 57: 1276-80.

Rozengurt E, Walsh JH. Gastrin, CCK, signaling, and cancer. Annu Rev Physiol 2001; 63: 49-76.

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

Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky T. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. N Engl J Med 2003; 348: 883-90.

Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclo-oxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. Cancer Res 1995; 55: 3785-9.

Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. Nat Med 1998; 4: 1046-52.

Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Moriyama N, Suetsugu H, Kamumori H, Okuyama T, Rumi M, Fukuda R, Nagasue N, Kinoshita Y. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$  in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR $\gamma$  agonists. Br J Cancer 2000; 83: 1394-1400.

Saukkonen K, Nieminen O, van Rees B, Vilkki S, Harkonen M, Juhola M, Mecklin JP, Sipponen P, Ristimaki A. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma. Clin Cancer Res 2001; 7: 1923-31.

Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Sun W, Gunawan ES, Hori M. *Helicobacter pylori* infection induces cyclooxygenase-2 expression in human gastric mucosa. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1998; 59: 313-6.

Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 14559-14564.

Shaheen NJ, Straus WL, Sandler RS. Chemoprevention of gastrointestinal malignancies with nonsteroidal antiinflammatory drugs. A Review. Cancer 2002; 94: 950-63.

Shao J, Sheng H, DuBois RN. Peroxisome proliferator-activated receptors modulate K-Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells. Cancer Res 2002; 62: 3282-8.

Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD, DuBois RN. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. J Biol Chem 2000; 275: 33951-56.

Sheng H, Shao J, Dixon DA, Williams CS, Prescott SM, DuBois RN, Beauchamp RD. Transforming growth factor- $\beta$ 1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA. J Biol Chem 2000; 275: 6628-35.

Sheng H, Shao J, DuBois RN. K-Ras-mediated increase in cyclooxygenase 2 mRNA stability involves activation of the protein kinase B $^1$ . Cancer Res 2001 A; 61: 2670-5.

Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, Dubois RN. Inhibition of human colon cancer growth by selective inhibition of cyclo-oxygenase-2. J Clin Invest 1999; 99: 2254-9.

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E $_2$  in human colon cancer cells. Cancer Res 1998; 58: 362-6.

Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. J Biol Chem 2001 B; 276: 18075-81.

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

Shirin H, Sordillo EM, Oh SH, Yamamoto H, Delohery T, Weinstein IB, Moss SF. *Helicobacter pylori* inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells. *Cancer Res* 1999; 59: 2277-81.

Siman JH, Forsgren A, Berglund G, Floren CH. Association between *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma in the city of Malmo, Sweden. A prospective study. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 1215-1221.

Sinicrope FA, Lemoine M, Xi L, Lynch PM, Cleary KR, Shen Y, Frazier ML. Reduced expression of cyclo-oxygenase 2 proteins in hereditary nonpolyposis colorectal cancers relative to sporadic cancers. *Gastroenterology* 1999; 117: 350-8.

Sipponen P, Kosunen TU, Valle J, Riihela M, Seppala K. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis gastric cancer. *J Clin Pathol* 1992; 45: 319-23.

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996; 271: 33157-60.

Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant tumors, fifth edition (1997). Union International Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997; 80: 1803-4.

Solcia E, Fiocca R, Luinetti O, Villani L, Padovan L, Calistri D, Ranzani GN, Chiaravalli A, Capella C. Intestinal and diffuse gastric cancers arise in a different background of *Helicobacter pylori* gastritis through different gene involvement. *Am J Surg Pathol* 1996; 20 Suppl 1: S8-22.

Song SH, Jong HS, Choi HH, Noue H, Tanabe T, Kim NK, Bang YJ. Transcriptional silencing of cyclo-oxygenase-2 by hypermethylation of the 5' CpG island in human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61:4628-35.

Spender AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 1998; 273: 9886-93.

Stael B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Dierive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cell is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 1998; 393: 790-3.

Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase -2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000; 342: 1946-52.

Stemmermann GN, Fenoglio-Preiser C. Gastric carcinoma distal to the cardia: a review of the epidemiological pathology of the precursors to a preventable cancer. *Pathology* 2002; 34: 494-503.

Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, Lee JC, Dubinett SM. Specific inhibitor of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol* 2000; 164: 361-70.

Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 1999; 274; 16: 10911-5.

Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclo-oxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 52: 237-45.

Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclo-oxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem* 2001; 276: 12440-8.

Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1175-86.

Sun Y, Tang XM, Half E, Kuo MT, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome c-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 6323-8.

Sung JJ, Leung WK, Go MY, To KF, Cheng AS, Ng EK, Chan FK. Cyclo-oxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol* 2000; 157: 729-35.

Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima T, Une Y, Todo S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med* 1998; 4: 707-14.

Takahashi N, Okumura T, Motomura W, Fujimoto Y, Kawabata I, Kohgo Y. Activation of PPARgamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Letter* 1999; 455: 135-9.

Takashima M, Furuta T, Hanai H, Sugimura H, Kaneko E. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Gut* 2001; 48: 765-773.

Tamura M, Sebastian S, Yang S, Gurates B, Fang Z, Bulun SE. Interleucin-1 $\beta$  elevates cyclooxygenase-2- protein level and enzyme activity via increasing its mRNA stability in human endometrial stromal cells: an effect mediated by extracellularly regulated kinases 1 and 2. *J Clin Endoc Metabol* 2002; 87: 3263-73.

Tanabe T, Tonhai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structure and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 95-114.

Tang X, Sun YJ, Half E, Kuo MT, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4903-8.

Tatsuguchi A, Sakamoto C, Wada K, Akamatsu T, Tsukui T, Miyake K, Butagami S, Kishida T, Fukuda Y, Yamanaka N, Kobayashi M. Localisation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* related gastritis and gastric ulcer tissues in humans. *Gut* 2000; 46: 782-9.

Tay A, Squire JA, Goldberg H, Skorecki K. Assignment of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene to 1q25 by fluorescence in situ hybridisation. *Genomics* 1994; 23: 718-9.

Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, Jenkins B, Waring P, Clay FJ, Malki S, Alderman BM, Grail D, Hollande F, Heath JK, Ernst M. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediate trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat Med* 2002; 8: 1089-97.

Thomas B, Berenbaum F, Humbert L, Bian H, Bereziat G, Crofford L, Olivier JL. Critical role of C/EBPdelta and C/EBPbeta factors in the stimulation of the cyclo-oxygenase-2 gene transcription by Interleukin-1beta in articular chondrocytes. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6798-809.

Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 252-66.

Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 1322-7.

Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 1991; 325: 1593-6.

Tindberg Y, Bengtsson C, Granath F, Blennow M, Nyren O, Granstrom M. *Helicobacter pylori* infection in Swedish children: lack of evidence of child-to-child transmission outside the family. *Gastroenterology* 2001; 121: 310-16.

Tindberg Y, Blennow M, Granstrom M. Clinical symptoms and social factors in a cohort of children spontaneously clearing *Helicobacter pylori* infection. *Acta Paediatr* 1999; 88: 631-5.

Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994; 79: 1147-56.

Toyota M, Shen L, Ohe-Toyota M, Hamilton SR, Sinicope FA, Issa JP. Aberrant methylation of the cyclo-oxygenase 2 island in colorectal tumors. *Cancer Res* 2000; 60: 4044-8.

Trevethick MA, Oakley I, Clayton NM, Strong P. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage in experimental animals: underlying pathological mechanisms. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 1455-9.

Tsuji S, Kawano S, Tsuji M, Takei Y, Tanaka M, Nagano K, Fusamoto H, Kamada T. *Helicobacter pylori* extract stimulates inflammatory nitric oxide production. *Cancer Lett* 1996; 108: 195-200.

Tsujii M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83: 493-501.

Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3336-40.

Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclo-oxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-16.

Uefuji K, Ichikura T, Moshizuki H. Expression cyclo-oxygenase-2 in human gastric adenomas and adenocarcinomas. *J Surg Oncol* 2001; 76: 26-30.

Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N. Expression of cyclo-oxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 1998; 69: 168-72.

Uemura N, Mukai T, Okamoto S, Yamaguchi S, Mashiba H, Taniyama K, Sasaki N, Haruma K, Sumi K, Kajiyama G. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 639-642.

Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784-789.

Vadlamudi R, Mandal M, Adam L, Steinbach G, Mendelsohn J, Kuman R. Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. *Oncogene* 1999; 18: 305-14.

Van Doorn LJ. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999; 116: 823-830.

Van Rees BP, Saukkonen K, Ristimaki A, Polkowski W, Tytgat GN, Driltenburg P, Offerhaus GL. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathol* 2002; 196: 171-9.

Vancheri C, Mastruzzo C, Tomaselli V, Sortino MA, D'Amico L, Bellistri G, Pistorio MP, Sallnaro ET, Palermo F, Mistretta A, Crimi N. Normal human lung fibroblasts differently modulate Interleukin-10 and Interleukin-12 production by myocytes: implications for an altered immune response in pulmonary chronic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 592-9.

- Virchow R. Die krankhaften Geschwuelste: 30 Vorlesungen gehalten waehrend des Wintersemesters 1862-1863. Berlin: A. Hirschwald, 1863.
- Von Bothmer C, Edebo A, Lonroth H, Pettersson A, Fandriks L. *Helicobacter pylori* infection inhibits antral mucosal nitric oxide production in humans. Scand J Gastroenterol 2002; 37: 404-8.
- Waddell WR, Loughry RW. Sulindac for polyposis of the colon. J Surg Oncol 1983; 24: 83-7.
- Walenga RW, Kester M, Coroneos E, Butcher S, Dwivedi R, Statt C. Constitutive expression of prostaglandin endoperoxide G/H synthetase (PGHS)-2 but not PGHS-1 in human tracheal epithelial cells in vitro. Prostaglandins 1996; 52: 341-59.
- Wang TC, Goldenring JR. Inflammation intersection: gp130 balances gut irritation and stomach cancer. Nat Med 2002; 8: 1080-2.
- Wang X, Michael D, de Murcia G, Oren M. p53 Activation by nitric oxide involves down-regulation of Mdm2. J Biol Chem 2002; 277: 15697-702.
- Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D, Coiffier, Salles GB. Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. Blood 1998; 91: 3574-81.
- Warzocha K, Salles G, Bienvenu J, Bastion Y, Dumontet C, Renard N, Neidhardt-berard EM, Coiffier B. Tumor necrosis factor ligand-receptor system can predict treatment outcome in lymphoma patients. J Clin Oncol 1997; 15: 499-508.
- Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. Gastroenterology 1998; 115: 642-648.
- Watanabe Y, Kurata JH, Mizuno S, Mukai M, Inokuchi H, Miki K, Ozasa K, Kawai K. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. A nested case-control study in a rural area of Japan Dig Dis Sci 1997; 42: 1383-7.
- Wiese FW, Thompson PA, Kadlubar FF. Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2. Carcinogenesis 2001; 22: 5-10
- Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenase in inflammation, cancer, and development. Oncogene 1999; 18: 7908-16.
- Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. J Clin Invest 2000 A; 105: 1589-94.
- Williams CS, Watson AJ, Sheng H, Helou R, Shao J, DuBois RN. Celcoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models. Cancer Res 2000 B; 60: 6045-51.
- Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxid synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. Cancer Res 1998; 58: 2929-34.
- Wong WM, Poulosom R, Wright NA. Trefoil peptides. Gut 1999; 44: 890-5.
- Wu MS, Shun CT, Lee WC, Chen CJ, Wang HP, Lee WJ, Lin JT. Gastric cancer risk in relation to Helicobacter pylori infection and subtypes of intestinal metaplasia. Br J Cancer 1998; 78: 125-8.
- Xie W, Herschman HR. Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. J Biol Chem 1996; 271: 31742-8.
- Xie W, Herschman HR. v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor. J Biol Chem 1995; 270: 27622-8.
- Xin Y, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. J Biol Chem 1999; 274: 9116-8.
- Xue YW, Zhang QF, Zhu ZB, Wang Q, Fu SB. Expression of cyclo-oxygenase-2 and clinicopathologic features in human gastric adenocarcinoma. World J Gastroenterol 2003; 9: 250-3.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufman WE, Barnes CA, Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclo-oxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. Neuron 1993; 11: 371-86.
- Yamagata R, Shimoyama T, Fukuda S, Yoshimura T, Tanaka M, Munakata A. Cyclooxygenase-2 expression is increased in early intestinal-type gastric cancer and gastric mucosa with intestinal metaplasia. Eur J Gastroenterol Hepatol 2002; 14: 359-63.
- Yamaha Y, Nakajima K, Fukada T, Hibi M, Hirano T. Differentiation and growth arrest signals are generated trough the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation. EMBO J 1996; 15: 1557-65.
- Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H, Hinoda Y, Imai K. Overexpression of cyclo-oxygenase-2 protein is less frequent in gastric cancers with microsatellite instability. Int J Cancer 1999; 84: 400-3.
- Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S. Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclo-oxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. J Biol Chem 1995; 270: 31315-20.
- Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K, Imanishi J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* strains. Gut 1997; 41:442-51.

Yan Z, Subbaramaiah K, Camilli T, Zhang F, Tanabe T, McCaffrey TA, Dannenberg AJ, Weksler BB. Benzo[*a*]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 4949-55.

Yokoyama C, Tanabe T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 888-94.

Zambraski EJ. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function: experimental studies in animals. *Semin Nephrol* 1995; 15: 205-13.

Zech B, Kohl R, von Knethen A, Brune B. Nitric oxide donors inhibit formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome and activation of caspases. *Biochem J* 2003; 371: 1055-64.

Zhang F, Subbaramaiah K, Altorkit N, Dannenberg AJ. Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 1998; 273: 2424-8.

## 7. Resumo

A relação entre algumas condições inflamatórias crónicas e o desenvolvimento de cancro é conhecida desde longa data. O cancro do estômago associa-se à infecção por *Helicobacter pylori* e representa a segunda causa mais frequente de mortalidade por cancro no mundo. *Helicobacter pylori* induz uma série de efeitos directos sobre o epitélio gástrico, nos quais se incluem a indução de proliferação epitelial e resposta inflamatória.

As ciclo-oxigenases são enzimas fundamentais do metabolismo do ácido araquidónico, catalizando um passo intermediário na produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Foram descritas duas isoformas de ciclo-oxigenase (COX). A COX-1 é expressa na maioria dos tecidos, catalizando a síntese de prostaglandinas necessárias para a homeostasia tecidular. Em contrapartida, a COX-2 não é expressa na maior parte dos tecidos no adulto, mas pode ser induzida em resposta a diversos estímulos, que incluem citocinas inflamatórias, factores de crescimento e promotores tumorais. A COX-2 é extensamente expressa em muitas neoplasias e condições pré-malignas, tendo sido implicada na transformação, assim como na progressão neoplásica.

Alguns tumores não exprimem COX-2. Esta ausência de expressão associa-se à metilação do promotor do gene da COX-2, *PTGS2*.

No presente estudo avaliámos a expressão imuno-histoquímica de COX-2 na mucosa gástrica normal, pólipos hiperplásicos, gastrite crónica (com e sem infecção por *H. pylori*), metaplasia intestinal (completa e incompleta), displasia (de baixo e alto grau, em mucosa plana e adenomas) e carcinomas gástricos.

Não se observou imunorreactividade "para" COX-2 na mucosa gástrica normal e em pólipos hiperplásicos. Identificou-se imunorreactividade ligeira na zona do colo das glândulas e em células estromais em todos os casos de gastrite crónica. Observou-se imunorreactividade em todos os casos de metaplasia intestinal e displasia. Verificou-se um aumento progressivo da intensidade de expressão de COX-2 da gastrite crónica às lesões displásicas. Observou-se expressão de COX-2 em 47 dos 50 (94%) carcinomas gástricos: 28 de 28 (100%) dos carcinomas de tipo intestinal/glandular; 14 de 16 (87%) dos carcinomas atípicos e 5 de 6 (83%) dos carcinomas difusos/ células isoladas.

Analisámos a associação de expressão de COX-2 e factores clínicos e patológicos dos doentes com carcinoma gástrico. Encontrou-se uma associação significativa entre expressão de COX-2 e tumores com dimensão superior a 5 cm. Não se verificou associação entre expressão de COX-2 e idade dos doentes, género, classificação de Laurén e de Carneiro, grau de invasão, metástases ganglionares, invasão vascular linfática ou venosa e infecção por *H. pylori* na mucosa não neoplásica.

Avaliámos a relação entre metilação do promotor do gene *PTGS2* (utilizando PCR específico para metilação) e expressão imuno-histoquímica de COX-2 em linhas de carcinoma gástrico e carcinomas gástricos.

Verificou-se que a metilação do promotor regula a transcrição do gene *PTGS2* nas linhas celulares de carcinoma gástrico. A metilação do promotor do gene *PTGS2* foi detectada em 6 de 31 (19%) dos carcinomas gástricos e

não se encontrou uma associação entre metilação do promotor deste gene e perda de expressão do seu produto.

Os resultados deste estudo permitem concluir que a maioria dos carcinomas gástricos exprime COX-2. A expressão desta enzima surge precocemente no processo de cancerização gástrica, nomeadamente na via de cancerização que conduz ao carcinoma de tipo intestinal/glandular, e associa-se a tumores com dimensão superior a 5 cm. O papel da metilação do promotor do gene *PTGS2* deverá ser esclarecido numa série maior de casos.

Permanece por esclarecer o papel da inibição de COX-2 na quimioprevenção e tratamento do carcinoma gástrico.

## 8. Summary and conclusions

The relationship between certain chronic inflammatory conditions and cancer has been known for many years. Gastric cancer is the second leading cause of cancer-related death in the world and has been associated with the presence of *Helicobacter pylori* in the stomach. *H. pylori* microorganisms have a number of direct effects on host epithelial tissues that affect tumorigenesis, including induction of proliferation and inflammatory response.

Cyclooxygenases (COX) are key enzymes in arachidonic acid metabolism, which catalyze an intermediate step in the production of prostaglandins, prostacyclin and thromboxanes. Two isoforms of COX have been identified. COX-1 is expressed in most tissues and directs the constitutive production of prostaglandins required for tissue homeostasis. In contrast, COX-2 is absent from most adult tissues but may be induced in response to a diverse spectrum of stimuli, including inflammatory cytokines, growth factors and tumor promoters. COX-2 is abundantly expressed in many human cancers and premalignant conditions and has been implicated in transformation as well as cancer progression. Some tumors do not express COX-2, which has been related to promoter methylation of the COX-2 gene, *PTGS2*.

We herein evaluated the immunohistochemical expression of COX-2 in normal gastric mucosa, hyperplastic polyps, chronic gastritis (with and without *H. pylori* infection), intestinal metaplasia (encompassing complete and incomplete types), dysplasia (low and high grade dysplasia in flat mucosa and adenomas) and gastric carcinomas.

COX-2 immunoexpression was absent in normal mucosa and hyperplastic polyps. Weak immunoreactivity was observed in the gland neck region and stromal cells of gastric mucosa in all cases of chronic gastritis. Immunoexpression was observed in all cases of intestinal metaplasia as well as in all dysplastic lesions. Immunoreactivity became more intense during progression from chronic gastritis to dysplastic lesions. COX-2 was expressed in 47/50 (94%) carcinomas: 28/28 (100%) of intestinal/glandular type, 14/16 (87%) of atypical carcinomas and 5/6 (83%) of diffuse/isolated cell type carcinomas.

We also aimed to evaluate the association of COX-2 expression and clinicopathologic features gastric cancer cases. The COX-2 positive group was significantly associated with tumor size larger than 5 cm. There was no significant association between COX-2 expression and patient age, gender, Laurén's and Carneiro's classifications, depth of invasion, lymph node metastasis, lymphatic or venous invasion and *H. pylori* infection in non-neoplastic mucosa.

We aimed also to determine the relationship between promoter methylation of *PTGS2* (using methylation specific PCR) and the immunohistochemical expression of COX-2 in gastric cancer cell lines and gastric cancer tissues.

We found that promoter methylation mediates transcriptional silencing or down-regulation of COX-2 expression in gastric cancer cell lines. Promoter methylation was present in 6/31 (19%) gastric cancer tissues, but we did not find an association between *PTGS2* promoter methylation and loss of COX-2 expression.

We conclude that COX-2 is highly expressed in gastric cancers. COX-2 expression is an early event in gastric carcinogenesis, namely in the pathway leading to intestinal/glandular carcinoma, and is associated with tumor dimension larger than 5 cm. To clarify the role of *PTGS2* promoter methylation in COX-2 expression in gastric cancer it would be necessary to study a larger series of cases.

It remains to be elucidated the putative role of COX-2 inhibitors in the chemoprevention and treatment of gastric cancer.