

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS PASSO FUNDO, RS  
CURSO DE MEDICINA**

**LUIGI WOLKMER SPAGNOL**

**PAPEL DA METILAÇÃO DO GENE P16 NA ONCOGÊNESE E PROGRESSÃO DE  
CARCINOMAS GÁSTRICOS: REVISÃO SISTEMÁTICA**

**PASSO FUNDO, RS**

**2022**

**LUIGI WOLKMER SPAGNOL**

**PAPEL DA METILAÇÃO DO GENE P16 NA ONCOGÊNESE E PROGRESSÃO DE  
CARCINOMAS GÁSTRICOS: REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho do Curso de graduação apresentado como  
requisito parcial para obtenção do título de Médico pela  
Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo  
Fundo/RS

Orientadora: Profa. Dra. Jossimara Poletini

Coorientadora: Profa. Ma. Daniela Augustin Silveira

**PASSO FUNDO, RS**

**2022**

## FICHA CATOLOGRÁFICA

### Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Spagnol, Luigi Wolkmer

Papel da metilação do gene p16 na oncogênese e progressão de carcinomas gástricos: revisão sistemática / Luigi Wolkmer Spagnol. -- 2022.

51 f.:il.

Orientadora: Profa. Dra. Jossimara Polettini

Co-orientadora: Profa. Me. Daniela Augustin Silveira  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Bacharelado em Medicina, Passo Fundo,RS, 2022.

1. Oncogênese. 2. Câncer Gástrico. I. Polettini, Jossimara, orient. II. Silveira, Daniela Augustin, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**LUIGI WOLKMER SPAGNOL**

**PAPEL DA METILAÇÃO DO GENE P16 NA ONCOGÊNESE E PROGRESSÃO DE  
CARCINOMAS GÁSTRICOS: REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho do Curso de graduação apresentado como  
requisito parcial para obtenção do título de Médico pela  
Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo  
Fundo/RS

Este Trabalho de Curso foi deferido e aprovado pela banca em:

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Jossimara Poletini, PhD - UFFS

Orientadora

---

Jorge Marcante Carlotto, MD, PhD – UFFS

Avaliador

---

Fernando Fornari, MD, PhD – UFFS

Avaliador

## APRESENTAÇÃO

O presente estudo, intitulado “PAPEL DA METILAÇÃO DO GENE P16 NA ONCOGÊNESE E PROGRESSÃO DE CARCINOMAS GÁSTRICOS: REVISÃO SISTEMÁTICA” foi realizado pelo acadêmico Luigi Wolkmer Spagnol, estudante do curso de medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – campus Passo Fundo, sob a orientação da Professora Doutora Jossimara Poletini e coorientação da Professora Mestra Daniela Augustin Silveira. É requisito parcial para a obtenção de título de médico pela UFFS e está de acordo com as normas do Manual de Trabalhos Acadêmicos da UFFS, 3ª edição, revisado e atualizado em 2020 e com o Regulamento de TC do Curso. Este volume é composto por três capítulos: Projeto de pesquisa, Relatório de pesquisa e Artigo científico. O primeiro consiste no projeto de pesquisa, desenvolvido no Componente Curricular Trabalho de Curso I, no primeiro semestre letivo de 2021. O Relatório da pesquisa encontra-se no segundo capítulo, tendo sido desenvolvido durante o Componente Curricular Trabalho de Curso II, no segundo semestre letivo de 2021. O terceiro capítulo, formulado no primeiro semestre letivo de 2022, traz o Artigo Científico, elaborado a partir da análise dos dados obtidos. O propósito deste estudo foi investigar a potencial correlação da metilação do gene p16 com a carcinogênese gástrica, de modo a apreciar a frequência dessa alteração epigenética em espécimes gástricas neoplásicas, comparativamente à homóloga em tecidos não tumorais, e ponderar as características fenotípicas das malignidades às quais se associa.

## RESUMO

O carcinoma gástrico é a quarta maior causa de mortalidade relacionada a malignidades e o quinto câncer mais comum no mundo. Sua carcinogênese é engendrada através de múltiplos passos, incluindo infecção por *H. pylori*, carcinógenos exógenos, ativação de oncogenes, inibição de genes supressores, apoptose epitelial gástrica e irrupção da regulação do ciclo celular. Apesar de mutações serem o enfoque da maioria dos estudos oncológicos biomoleculares relacionados, a epigenômica também é fundamental para que a expressão gênica ocorra de modo ordenado, tornando valioso o estudo de sua atuação na carcinogênese. Assim, a presente revisão sistemática objetivou investigar a potencial correlação da metilação do gene p16 com a carcinogênese gástrica, de modo a apreciar a frequência dessa alteração epigenética em espécimes gástricas neoplásicas, comparativamente à homóloga em tecidos não tumorais, e ponderar as características fenotípicas das malignidades às quais se associa. Sob essa óptica, buscou-se por estudos subsidiários pertinentes nas bases de dados MEDLINE e Scopus, com publicação até julho de 2021 e sem restrição de linguagem. O protocolo integral do estudo foi registrado na plataforma PROSPERO, sob a identificação 308218. Utilizou-se a escala Newcastle-Ottawa (NOS) para avaliação da qualidade metodológica dos manuscritos incluídos. Por sua vez, a metanálise foi conduzida através do software RevMan 5.4 ®; recorreu-se ao modelo de efeitos randômicos, calculou-se Odds Ratio (OR) com intervalos de confiança de 95% (95% CI), mensurou-se heterogeneidade e relevância inferencial. Como amostra derivada, agregou-se 48 artigos na síntese qualitativa e 47 na metanálise, totalizando 6599 espécimes gástricas avaliadas. Dentre os resultados obtidos, observou-se correlação da metilação de p16 com os seguintes desfechos: oncogênese gástrica ( $p < 0,00001$ ); metaplasia intestinal ( $p = 0,002$ ); pobre diferenciação histológica ( $p = 0,03$ ); invasão local ( $p = 0,001$ ); disseminação linfonodal ( $p = 0,03$ ); estadiamentos TNM mais avançados ( $p = 0,01$ ); e infecção pelo vírus Epstein Barr ( $p < 0,00001$ ). Em contrapartida, não se encontrou associação da metilação de p16 com classificação histológica de Lauren ( $p = 0,62$ ); metástase à distância ( $p = 0,71$ ); ou infecção por *Helicobacter pylori* ( $p = 0,79$ ). Destarte, os achados descritos providenciam evidência empírica para a categorização da metilação de p16 como um passo biomolecular substancial na carcinogênese gástrica, além de revelarem papel crucial do vírus Epstein Barr na deflagração dessa alteração epigenética.

Palavras chave: Neoplasias Gástricas. Genes p16. Metilação do DNA. Epigenômica. Carcinogênese.

## ABSTRACT

Gastric carcinoma is the fourth leading cause of malignancy-related mortality and the fifth most common cancer in the world. Its carcinogenesis is engendered through multiple steps, including *H. pylori* infection, exogenous carcinogens, oncogene activation, suppressor gene inhibition, gastric epithelial apoptosis, and disruption of cell cycle regulation. Although mutations are the focus of most related biomolecular oncological studies, epigenomics is also essential for gene expression to occur in an orderly way, making the study of its role in carcinogenesis valuable. Thus, the present systematic review aimed to investigate the potential correlation of p16 gene methylation with gastric carcinogenesis, in order to appreciate the frequency of this epigenetic alteration in neoplastic gastric specimens, compared to the homolog in non-tumor tissues, and to elucidate the phenotypic characteristics of the malignancies to which it is associated. From this perspective, relevant subsidiary studies were searched in the MEDLINE and Scopus databases, with publication until July 2021 and without language restriction. The entire study protocol was registered on the PROSPERO platform, under identification 308218. The Newcastle-Ottawa (NOS) scale was used to assess the methodological quality of the included manuscripts. In turn, the meta-analysis was conducted using RevMan 5.4 © software; a random effects model was used, odds ratio (OR) was calculated with 95% confidence intervals (95% CI), heterogeneity and inferential relevance were measured. As a derived sample, 48 articles were added in the qualitative synthesis and 47 in the meta-analysis, totaling 6599 evaluated gastric specimens. Among the results obtained, there was a correlation between p16 methylation and the following outcomes: gastric oncogenesis ( $p < 0.00001$ ); intestinal metaplasia ( $p = 0.002$ ); poor histological differentiation ( $p = 0.03$ ); local invasion ( $p = 0.001$ ); lymph node spread ( $p = 0.03$ ); more advanced TNM staging ( $p = 0.01$ ); and Epstein Barr virus infection ( $p < 0.00001$ ). In contrast, no association was found between p16 methylation and Lauren's histological classification ( $p = 0.62$ ); distant metastasis ( $p = 0.71$ ); or *Helicobacter pylori* infection ( $p = 0.79$ ). Thus, the findings described provide empirical evidence for the categorization of p16 methylation as a substantial biomolecular step in gastric carcinogenesis, in addition to revealing a crucial role of the Epstein Barr virus in triggering this epigenetic alteration.

Keywords: Stomach Neoplasms. p16, Genes. DNA Methylation. Epigenomics. Carcinogenesis.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>10</b>
2.1 PROJETO DE PESQUISA.....	10
2.1.1 Tema.....	10
2.1.2 Problemas .....	11
2.1.3 Hipóteses .....	11
2.1.4 Objetivos .....	11
2.1.4.1 Objetivo geral .....	11
2.1.4.2 Objetivos específicos.....	11
2.1.5 Justificativa.....	11
2.1.6 Referencial teórico .....	12
2.1.6.1 Neoplasia e oncogênese.....	12
2.1.6.2 Epigenética .....	13
2.1.6.3 Metilação de DNA.....	13
2.1.6.4 Gene p16.....	14
2.1.6.5 Câncer gástrico .....	14
2.1.6.5.1 Epidemiologia.....	14
2.1.6.5.2 Manifestações clínicas .....	15
2.1.6.5.3 Fatores de risco .....	15
2.1.6.5.4 Classificação histológica.....	16
2.1.6.5.5 Estadiamento.....	17
2.1.6.5.6 Carcinogênese gástrica .....	19
2.1.6.6 Métodos atuais para análise de metilação.....	19
2.1.7 Metodologia .....	20
2.1.7.1 Tipo de estudo .....	20
2.1.7.2 Estratégia de busca .....	20
2.1.7.3 Seleção de artigos .....	21
2.1.7.4 Coleta de dados.....	21
2.1.7.5 Controle de qualidade .....	21
2.1.7.6 Análise estatística .....	21
2.1.7.7 Aspectos éticos .....	21
2.1.8 Recursos .....	22



2.1.9 Cronograma.....	22
2.1.10 Referências .....	23
2.1.11 Apêndices .....	25
2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA .....	27
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>29</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma gástrico é a quarta maior causa de mortalidade relacionada a malignidades e o quinto câncer mais comum no mundo, apesar de sua incidência apresentar significativa variância geográfica (GLOBOCAN, 2020). O mais notável sistema de classificação histológica foi elaborado por Lauren, categorizando os tumores em intestinal, mais relacionado à infecção por *Helicobacter pylori* e outras perturbações ambientais; e difuso, essencialmente associado a polimorfismos genéticos. (ANG; FOCK, 2014).

Em termos de tratamento, ambas as malignidades gástricas são manejadas através de cirurgia, possivelmente conjugada com modalidades de quimiorradioterapia. No entanto, devido à inespecificidade das manifestações clínicas, a maioria dos casos são diagnosticados em estágios avançados, resultando em um pobre prognóstico (DIGKLIA; WAGNER, 2016).

Compreende-se a oncogênese gástrica como processo multifatorial, incluindo infecção por *H. pylori*, carcinógenos exógenos, ativação de oncogenes, inibição de genes supressores, apoptose epitelial gástrica e irrupção da regulação do ciclo celular (WU et al., 2014). Além de alterações gênicas, diversos estudos já assinalaram a substancialidade da epigenética, principalmente supressões por metilação, na deflagração dos supracitados mecanismos (FIGUEIREDO; GONZALEZ; MACHADO, 2013).

Por sua vez, o gene p16, por regular negativamente a via pRb-E2F durante o ciclo celular, coíbe a progressão da fase G1 para S (SPERKA; WANG; RUDOLPH, 2013). Como um importante gene antiproliferativo, sua inativação, seja derivada de metilação ou deleção, reflete-se na tumorigênese de malignidades humanas, nomeadamente na carcinogênese gástrica (PENG; ZHANG; SUN, 2014).

Destarte, a presente pesquisa pode contribuir para a compreensão do papel da metilação do gene p16 na oncogênese e progressão de carcinomas gástricos, possibilitando melhor estratificação biomolecular da patologia e potencializando o desenvolvimento de novas modalidades diagnósticas e terapêuticas.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1 PROJETO DE PESQUISA

#### 2.1.1 Tema

Papel da metilação do gene p16 na oncogênese e progressão de carcinomas gástricos.

### **2.1.2 Problemas**

A metilação do gene p16 apresenta maior ocorrência em carcinomas gástricos, comparativamente a tecidos saudáveis?

A metilação do gene p16 associa-se à progressão de carcinomas gástricos a estadiamentos TNM mais agressivos?

A metilação do gene p16 apresenta maior ocorrência nos carcinomas gástricos com metástase linfonodal ou à distância, comparativamente aos tumores NOM0?

### **2.1.3 Hipóteses**

A metilação do gene p16 apresenta maior ocorrência em carcinomas gástricos, comparativamente a tecidos saudáveis.

A metilação do gene p16 associa-se à progressão de carcinomas gástricos a estadiamentos TNM mais agressivos.

A metilação do gene p16 apresenta maior ocorrência nos carcinomas gástricos com metástase linfonodal ou à distância, comparativamente aos tumores NOM0.

### **2.1.4 Objetivos**

#### **2.1.4.1 Objetivo geral**

Investigar sistematicamente o papel da metilação do gene p16 na oncogênese e progressão de carcinomas gástricos.

#### **2.1.4.2 Objetivos específicos**

Avaliar a ocorrência de metilação do gene p16 em carcinomas gástricos, comparativamente à sua ocorrência em tecidos saudáveis.

Verificar se a metilação do gene p16 em malignidades gástricas associa-se a estadiamentos tumorais implicativos de pior prognóstico.

Verificar se a metilação do gene p16 em malignidades gástricas associa-se à deflagração de metástases linfonodais ou à distância.

### **2.1.5 Justificativa**

O carcinoma gástrico é a quarta maior causa de mortalidade relacionada a malignidades e o quinto câncer mais comum no mundo, com mais de um milhão de novos casos anuais (GLOBOCAN, 2020).

Para pacientes com doença ressecável, a intervenção cirúrgica precoce, usualmente combinada com quimioterapia neoadjuvante ou quimiorradioterapia, oferece as melhores chances de remissão. Todavia, mais de 50% dos pacientes acometidos são diagnosticados no estágio IV da patologia, inviabilizando quaisquer terapêuticas curativas (SAH et al., 2018).

Tais fatos, agregados com a elevada mortalidade específica, refletem o ominoso prognóstico desses agravos. Assim, explicita-se a necessidade de aprimorar a estratificação dos pacientes acometidos, elaborando um sistema de classificação molecular.

Nesse contexto, mediante o estudo de associações da metilação do gene p16 aos desfechos de carcinomas gástricos, pode-se robustecer os conhecimentos biomoleculares acerca dessa patologia e, em última análise, fecundar o desenvolvimento de novas modalidades diagnósticas ou terapêuticas, redutoras de letalidade (BAE et al., 2021).

Por fim, através da estruturação de uma revisão sistemática, constituir-se-á uma pesquisa multicêntrica, com significativa quantia de desfechos analisados, e cujas conclusões apresentarão, portanto, considerável poder estatístico.

## **2.1.6 Referencial teórico**

### **2.1.6.1 Neoplasia e oncogênese**

Define-se neoplasia como um distúrbio da proliferação celular, decorrente de alterações na estrutura ou expressão gênica, acometendo uma única célula e sua progênie clonal. Deriva-se, pois, um processo de multiplicação celular irreversível, monoclonal e não regulado por estímulos fisiológicos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Acerca da oncogênese, sabe-se que todo tumor principia através de modificações no DNA de sua célula genitora. Tais alterações refletem em desregulações da expressão gênica, que eventualmente medeiam a irrupção de sistemas regulatórios substanciais ao ordenamento da proliferação celular, promovendo oncogênese e progressão tumoral (PATTERSON et al., 2018).

Dentre esses sistemas, constam proto-oncogenes, supressores de tumor e reguladores de apoptose. Os proto-oncogenes, quando afetados, transfiguram-se em oncogenes, passando a

mediar exacerbações na proliferação celular. Alternativamente, quando o dano acomete os supressores de tumor ou reguladores de apoptose, ocorre subversão de mecanismos que antes inibiam a multiplicação celular não estimulada, precipitando, pois, um ambiente intracelular hiperproliferativo (PATTERSON et al., 2018).

As neoplasias malignas apresentam comportamento mais agressivo que suas homólogas benignas, na medida em que podem invadir tecidos adjacentes e disseminar-se a sítios distantes, em processo metastático. As nomenclaturas tumorais fundamentam-se na linhagem histológica de diferenciação; particularmente, malignidades que se originam de epitélios glandulares são denominadas adenocarcinomas, como é o caso do câncer gástrico (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

#### 2.1.6.2 Epigenética

O dogma central da biologia molecular é a doutrina de que a unidade informacional celular flui apenas em uma direção - do DNA ao RNA e às proteínas. Tal dogma, outrora tido como absoluto, foi refutado frente ao reconhecimento do papel do meio ambiente na modulação da expressão dos genes. Nesse contexto, o termo “epigenética” foi cunhado para designar alterações da expressão gênica que ocorrem de modo exógeno à estrutura genômica (GAYON, 2016).

Os três principais mecanismos da epigenética são metilação do DNA, modificação das histonas e microRNAs. Esses sistemas são responsáveis pela iniciação e manutenção do silenciamento epigenético, com conseqüente regulação do perfil de expressão gênica. Atuam, pois, em uma série de processos celulares, incluindo diferenciação celular, expressão gênica, inativação do cromossomo X, embriogênese e impressão genômica (ZHANG; LU; CHANG, 2020).

#### 2.1.6.3 Metilação de DNA

Aberrâncias na metilação do DNA são a manifestação mais comum de processos epigenéticos, caracteristicamente ocorrendo na posição 5' de um resíduo de citosina. O mesmo resíduo de citosina pode ser metilado por inúmeras DNA metiltransferases (DNMTs), que desempenham um papel importante no silenciamento de fatores de transcrição, bem como na defesa contra a expressão de genes de retrovírus endógenos e na repressão de elementos transponíveis. Por extensão do fenômeno, aglomerados de dinucleotídeos de citosina e guanina,

chamados Ilhas CpG, ocorrem frequentemente nas áreas promotoras de genes com terminação 5' (ZHANG; LU; CHANG, 2020).

Em termos de resultado líquido, a metilação na região promotora de um gene desencadeia a supressão de sua expressão. Isso deriva, em suma, de efeitos químicos alostéricos mediados pelos grupamentos adicionados, coibindo a interação com o aparato de transcrição gênica (QU; DANG; HOU, 2013).

#### 2.1.6.4 Gene p16

O gene p16 é o segundo gene supressor de tumor mais significativo, atrás somente do TP53. Recebe vários sinônimos, como MTS-1 (supressor de tumor principal 1) ou INK4A (inibidor da quinases dependentes de ciclina 4A).

Pertence à família de genes INK4, que é composta por quatro membros: p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C e p19INK4D, todos os quais compartilham propriedades biológicas, a saber, a inibição do crescimento celular e supressão tumoral. No genoma humano, localiza-se no cromossomo 9p21, consistindo de três éxons e dois íntrons e medindo aproximadamente 8,5 kb de comprimento (SERRA; CHETTY, 2018).

Pormenorizando-se em mecanismos funcionais, a expressão de p16 atua coibindo interações da pRb com os fatores de transcrição E2F durante o ciclo celular; isso ocorre, especificamente, através da ligação de p16 às proteínas CDK4 e CDK6, impedindo que estas intermediem a fosforilação de pRb. Nesse contexto, como a amplificação da fosforilação de pRb é condição necessária à evolução da fase G1 do ciclo celular à S, a proteína p16, em última análise, trava a célula em G1 (RAYESS; WANG; SRIVATSAN, 2012).

Possíveis desarranjos que induzem à inativação de p16, produzindo condições celulares hiperproliferativas e potencialmente oncogênicas, incluem mutações pontuais, deleções homozigóticas, hipermetilação e perda de heterozigosidade. Apesar de cada neoplasia específica apresentar predileção por certo tipo de alteração no gene, hipermetilação representa a maioria das disfunções de p16 em adenocarcinomas gástricos (34%), enquanto mutações ou deleções são raras nessa malignidade (0% –2%) (LI; POI; TZAI, 2011).

#### 2.1.6.5 Câncer gástrico

##### 2.1.6.5.1 Epidemiologia

Anualmente, cerca de um milhão de pessoas são diagnosticados com câncer gástrico. Configura-se, pois, como a quarta maior causa de mortalidade relacionada a malignidades e o quinto câncer mais comum no mundo (GLOBOCAN, 2020).

A incidência de carcinomas gástricos é distinta no que concerne a variabilidades de gênero e nacionalidade. Homens são duas vezes mais susceptíveis que mulheres. Ademais, mais de 50% das ocorrências são contabilizadas em países em desenvolvimento, de modo que pacientes advindos da América do Sul, América Central, leste da Europa e leste da Ásia apresentam maior probabilidade para esta patogênese (MACHLOWSKA et al., 2020).

#### 2.1.6.5.2 Manifestações clínicas

O câncer gástrico apresenta-se com estágios precoces assintomáticos, associados ou não com sintomas gastrintestinais inespecíficos, como dispepsia. Estágios mais tardios, alternativamente, podem cursar com dor abdominal, anorexia, perda de peso. Especificamente, tumores ulcerados podem ocasionar hematemese, e tumores distais, vômitos intensos, decorrentes de estenose pilórica (CORREA, 2013).

No exame físico, deve-se atender especialmente a possíveis evidências de doença avançada, incluindo: doença nodal metastática, seja supraclavicular (nódulo de Virchow) ou periumbilical (nódulo Irmã Mary Joseph); e sinais indicativos de metástase intra-abdominal, como hepatomegalia, icterícia ou ascite (TOWSEND et al., 2021).

#### 2.1.6.5.3 Fatores de risco

Englobando elementos infecciosos, epidemiológicos, ambientais e polimorfismos genéticos, a oncogênese estomacal é multifatorial, apesar da infecção por *H. pylori* ser considerada o fator de risco hegemônico. O mesmo agente é reconhecido como causa primária de linfomas do tecido linfoide associado à mucosa (LEE et al., 2016).

*H. pylori* é uma bactéria capaz de colonizar a mucosa gástrica, sendo geralmente adquirida na infância e progressivamente elicitando graus variados de resposta imune no hospedeiro. A prevalência da bactéria é extensiva, tendo seus valores globalmente estimados acima de 50%, embora o carcinoma gástrico incida em menos de 1% dos casos. Uma categoria de gastrite derivada da infecção, denominada gastrite atrófica multifocal, potencialmente associa-se à condição pré-oncogênica (BURUCOA, 2017).

Cepas de *H. pylori* variam significativamente no que tange a patogenicidade e carcinogenicidade. As linhagens mais virulentas caracterizam-se pelo gene *cagA*, codificante

da proteína oncogênica CagA, a qual pode ser injetada diretamente no interior de células epiteliais gástricas, por intermédio de sistema de secreção tipo IV. Após o influxo citoplasmático, CagA é fosforilada em sítios incutidos das sequências EPIYA, dando início a uma cadeia de eventos moleculares ligados à tumorigênese. Estudos *in vitro* e *in vivo* associaram a cascata bioquímica induzida pela proteína CagA à irrupção de junções intercelulares, depleção de apoptose e maior ocorrência de atrofia gástrica, metaplasia intestinal e câncer gástrico (TOHIDPOUR, 2016).

Outro gene bacteriano associado à virulência é *vacA*, cuja proteína codificante relaciona-se à indução de vacúolos intracelulares, poros na membrana celular e apoptose. Apesar de todas as cepas de *H. pylori* apresentarem essa sequência genômica, variações genéticas na porção *s* (*signal*) determinam o grau de atividade oncogênica. Conjugado a isso, algumas proteínas de membrana também amplificam a virulência, com destaque à BabA, codificada pelo gene *babA* e relacionada à adesão celular (ANSARI e YAMAOKA, 2019).

Cotejando a influência de fatores ambientais na carcinogênese, observa-se risco aumentado em associação com tabagismo, alcoolismo, elevado teor de sal na dieta e consumo de alimentos processados ou defumados. Histórico familiar também é fator etiológico crucial: apesar da maioria dos casos serem esporádicos, 10% vinculam-se com agregação familiar (MACHLOWSKA et al., 2020).

Vários estudos relataram uma associação entre o risco de câncer e polimorfismos genéticos de genes ligados à resposta inflamatória, como as interleucinas IL-1B, IL-1RN, IL-10 e TNF- $\alpha$  (PERSSON et al., 2011). Adicionalmente, o vírus Epstein-Barr (EBV), da família Herpesviridae, é encontrado em cerca de 10% dos carcinomas gástricos, potencialmente desempenhando mecanismo oncogênico, mediado principalmente por metilação de genes supressores de tumor (NASEEM et al., 2018).

#### 2.1.6.5.4 Classificação histológica

Os cânceres gástricos são majoritariamente adenocarcinomas, mas apresentam-se de modo heterogêneo no que diz respeito à arquitetura, crescimento, diferenciação celular, histogênese e patogênese molecular. Em virtude disso, desenvolveram-se uma miríade de sistemas de classificação histológica, sendo o de Lauren o mais amplamente utilizado, por sua simplicidade e robustez (LAUREN, 1965).



Nesse sentido, os carcinomas gástricos são categorizados em dois subtipos principais – difusos e intestinais – excetuando-se as formas mistas e indeterminadas. Os tumores difusos são pobremente diferenciados, constituindo-se de células sem coesão. Em contrapartida, os tumores intestinais, de apresentação mais comum, são usualmente bem diferenciados, compondo glândulas semelhantes àsquelas presentes nos adenocarcinomas colorretais (CUTSEM et al., 2016).

#### 2.1.6.5.5 Estadiamento

Performa-se o estadiamento tumoral de carcinomas gástricos utilizando o sistema TNM, fundamentando-se na profundidade de invasão tumoral (T), no número de linfonodos acometidos (N) e na presença ou ausência de metástase à distância (M). As informações subsidiárias à classificação são acessadas através de ultrassonografia endoscópica e análise histopatológica por biópsia, sendo essenciais para a eleição da modalidade terapêutica e estimativa prognóstica (TOWSEND et al. 2021).

Quadro 1: Estadiamento TNM para carcinomas gástricos

<b>Tumor primário (T)</b>	
<b>Categoria T</b>	<b>Crítérios</b>
TX	Tumor primário não pode ser acessado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ, tumor intraepitelial sem invasão de lâmina própria
T1	Tumor invade lâmina própria, muscular da mucosa ou submucosa
T1a	Tumor invade lâmina própria ou muscular da mucosa
T1b	Tumor invade submucosa
T2	Tumor invade muscular própria
T3	Tumor penetra a serosa, sem invadir o peritônio visceral ou estruturas adjacentes
T4	Tumor invade o peritônio visceral ou estruturas adjacentes
T4a	Tumor invade o peritônio visceral
T4b	Tumor invade estruturas adjacentes
<b>Linfonodos regionais (N)</b>	
<b>Categoria N</b>	<b>Crítérios</b>
NX	Linfonodos regionais não podem ser acessados
N0	Sem evidência de metástase linfonodal

N1	Metástase em 1-2 linfonodos regionais
N2	Metástase em 3-6 linfonodos regionais
N3	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais
N3a	Metástase em 7-15 linfonodos regionais
N3b	Metástase em 16 ou mais linfonodos regionais
<b>Metástase à distância (M)</b>	
<b>Categoria M</b>	<b>Critérios</b>
M0	Sem evidência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Fonte: adaptado de TOWNSEND et al. (2021).

Quadro 2: Estágios de carcinomas gástricos

<b>Estágio</b>	<b>Possíveis TNM</b>
0	TisN0M0
IA	T1N0M0
IB	T2N0M0
	T1N1M0
IIA	T3N0M0
	T2N1M0
	T1N2M0
IIB	T4aN0M0
	T3N1M0
	T2N2M0
	T1N3M0
IIIA	T4aN1M0
	T3N2M0
	T2N3M0
IIIB	T4bN0M0
	T4bN1M0
	T4aN2M0
	T3N3M0
IIIC	T4bN2M0
	T4bN3M0

	T4aN3M0
IV	M1, quaisquer T e N

Fonte: adaptado de TOWNSEND et al. (2021).

#### 2.1.6.5.6 Carcinogênese gástrica

A carcinogênese gástrica envolve o acúmulo gradual de desordens biomoleculares, levando a ganho de função em oncogenes e perda de função em genes supressores de tumor ou pró-apoptóticos. Alterações genéticas, como p53, KRAS, PIK3CA, ARID1A, mutações MLL3 e MLL, bem como amplificação PIK3CA, C-MET, ERBB4 e CD44, são frequentemente encontrados no câncer gástrico, sugerindo que podem ser marcadores tumorigênicos importantes na etiopatogenia (QU; DANG; HOU, 2013).

Outrossim, um crescente corpo de evidências também aponta para o papel de alterações epigenéticas na oncogênese, adicionalmente às disfunções genéticas supracitadas. Notabiliza-se, portanto, a relevância dos mecanismos de hipermetilação das Ilhas CpG, modificações pós traducionais de histonas, microRNAs, RNAs não codificantes e posicionamento de nucleossomos (ZIOGAS; ROUKOS, 2009).

Com efeito, dentre tais modificações epigenéticas, conjectura-se que a metilação na área do gene promotor de p16 apresente pertinência sobressalente, elicitando a importância de quantificar seu papel na carcinogênese e vislumbrar potenciais aplicações diagnósticas ou terapêuticas (PENG; ZHANG; SUN, 2014).

#### 2.1.6.6 Métodos atuais para análise de metilação

Recentemente, com a exacerbação do interesse científico nos processos epigenéticos, nomeadamente na metilação do DNA, desenvolveram-se uma miríade de técnicas para a análise dessas modificações genômicas.

Sequenciamento de bissulfito (BS) é o método mais direto para a detecção do estado de metilação de cada resíduo de citosina em uma sequência alvo. Geralmente, após a desnaturação e modificação com bissulfito, o fragmento genético de interesse é amplificado através da reação de cadeia da polimerase (PCR). Dessa forma, torna-se um método acurado, porém que falha em prover informações acerca dos padrões epigenéticos de alelos individuais (QU; DANG; HOU, 2013).

PCR metilação-específica (MSP) é uma maneira simples e eficaz para a análise de pequenas amostras de DNA, incluindo aquelas de tecidos dissecados congelados ou embebidos em parafina. Assim, as diferenças entre alelos metilados e não metilados, derivadas do tratamento com bissulfito, constituem a base do MSP (QU; DANG; HOU, 2013).

Outrossim, técnicas de Western blot, imunoprecipitação, sequenciamento genômico, pirosequenciamento de bisulfito e detecção eletroquímica também podem ser empregadas em pesquisas epigenéticas (CHATTERJEE et al., 2017)

## 2.1.7 Metodologia

### 2.1.7.1 Tipo de estudo

Revisão sistemática de literatura, elaborada consoante às diretrizes do PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses).

A questão norteadora da pesquisa será fundamentada no acrônimo PICO: população (P), intervenção (I), controle (C) e “outcome”/desfecho (O), cujos componentes constam no quadro a seguir.

População (P)	Espécimes gástricos humanas, obtidas através de exames histopatológicos de pacientes com diagnóstico confirmado de carcinoma gástrico.
Intervenção (I)	Os espécimes serão estudados quanto ao seu status de metilação do gene p16.
Controle (C)	Espécimes histológicas humanas de tecidos não neoplásicos
Desfecho (O)	Correlação da metilação do gene p16 com oncogênese de carcinomas gástricos, progressão para estadiamentos mais avançados e ocorrência de disseminação linfonodal ou metastática.

Fonte: elaborado pelo autor.

### 2.1.7.2 Estratégia de busca

Por intermédio das bases de dados PubMed e Scopus, identificar-se-á os estudos relevantes à presente revisão sistemática, sem nenhuma restrição quanto a data ou linguagem de publicação. Os seguintes termos MeSH serão empregados na busca: (“DNA Methylation” ou “Methylation”) e (“Stomach Neoplasm” ou “Gastric Neoplasm” ou “Stomach Cancer” ou

“Gastric Cancer”) e (“Genes, p16” ou “p16 Gene” ou “p16INK4 Gene” ou “Genes, CDKN2” ou “CDKN2 Gene” ou “MTS1 Gene”).

#### 2.1.7.3 Seleção de artigos

Postula-se, como critérios de inclusão: (1) utilização exclusiva de tecidos humanos; (2) modelagem experimental comparativa do status de metilação do gene p16 entre carcinomas gástricos e espécimes gástricas não neoplásicas, ou entre subgrupos fenotípicos distintos de carcinomas gástricos; (3) confirmação histopatológica dos diagnósticos de carcinoma gástrico; (4) utilização de DNA gástrico como substrato para aferição de metilação genômica e especificação do método molecular utilizado. Quaisquer estudos que não se adequarem aos critérios de inclusão ou potencialmente contiverem dados redundantes serão descartados.

A seleção dos artigos será realizada em duplicata pela equipe de pesquisa, e casos discrepantes serão ponderados por um terceiro avaliador independente. Nesse processo, para fins de gerenciamento bibliográfico, os documentos incluídos serão salvos no software Mendeley 1.19.8 ®.

#### 2.1.7.4 Coleta de dados

Utilizando como subsídio os artigos previamente selecionados, os dados pertinentes serão sistematicamente extraídos através de formulário padronizado (Apêndice A) e transferidos ao software Excel ®.

#### 2.1.7.5 Controle de qualidade

Os estudos selecionados serão avaliados formalmente por meio dos critérios da escala Newcastle-Ottawa (NOS), ferramenta de avaliação de risco de viés para ensaios clínicos observacionais (STANG, 2010). Os parâmetros da NOS consideram três facetas dos artigos, a saber, seleção, exposição e comparabilidade; sua pontuação resultante varia de 0 a 9, de modo que valores acima de 7 assinalam boa qualidade metodológica.

#### 2.1.7.6 Análise estatística

A meta-análise, se aplicável considerando-se o nível de homogeneidade dos dados extraídos, será conduzida através do software Cochrane RevMan 5.4 ®, utilizando os modelos estatísticos apropriados às variáveis dicotômicas obtidas. Relevância inferencial e heterogeneidade também serão quantitativamente cotejadas.

#### 2.1.7.7 Aspectos éticos

O presente estudo encontra-se adequado à Resolução 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde e, tratando-se de uma revisão sistemática de literatura, não será submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos da UFFS.

### 2.1.8 Recursos

Os gastos orçamentários serão integralmente custeados pela equipe de pesquisa.

ITEM	QUANTIDADE	CUSTO UNITÁRIO (R\$)	CUSTO TOTAL (R\$)
HD externo	1	200,00	200,00
Acesso aos artigos	1	Indefinido	Indefinido
<b>TOTAL</b>			Indefinido

Fonte: elaborado pelo autor.

### 2.1.9 Cronograma

Mediante aprovação do projeto de pesquisa, este estudo será encaminhado para registro na base de dados internacional de revisões sistemáticas PROSPERO. A partir de então, o seguinte cronograma será contemplado.

ETAPA	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
REALIZADA	21	21	21	21	21	22	22	22	22	22	22	22
Consulta de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Orientação	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Seleção de artigos	X	X	X	X								
Extração de dados					X	X	X					
Elaboração do artigo								X	X			
Correções										X	X	
Divulgação resultados												X

Fonte: elaborado pelo autor.

### 2.1.10 Referências

- ANG, TI; FOCK, Km. Clinical epidemiology of gastric cancer. **Singapore Medical Journal**, v. 55, n. 12, p. 621-628, dez. 2014.
- ANSARI, Shamshul; YAMAOKA, Yoshio. Helicobacter pylori Virulence Factors Exploiting Gastric Colonization and its Pathogenicity. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 677, 19 nov. 2019.
- BAE, Hyun Joo; KANG, Sun Kyoung; KWON, Woo Sun; JEONG, Inhye; PARK, Sejung; KIM, Tae Soo; KIM, Kyoo Hyun; KIM, Hyunki; JEONG, Hei-Cheul; CHUNG, Hyun Cheol. P16 methylation is a potential predictive marker for abemaciclib sensitivity in gastric cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 183, p. 114320, jan. 2021.
- BURUCOA, Christophe; AXON, Anthony. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter**, v. 22, set. 2017.
- CHATTERJEE, Aniruddha; RODGER, Euan J.; MORISON, Ian M.; ECCLES, Michael R.; STOCKWELL, Peter A.. Tools and Strategies for Analysis of Genome-Wide and Gene-Specific DNA Methylation Patterns. **Methods in Molecular Biology**, p. 249-277, 7 dez. 2016.
- CORREA, Pelayo. Gastric Cancer. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 42, n. 2, p. 211-217, jun. 2013.
- DIGKLIA, Antonia. Advanced gastric cancer: current treatment landscape and future perspectives. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 22, n. 8, p. 2403, 2016.
- FIGUEIREDO, Ceu; GARCIA-GONZALEZ, Maria A.; MACHADO, Jose C. Molecular Pathogenesis of Gastric Cancer. **Helicobacter**, v. 18, p. 28-33, set. 2013.
- GAYON, Jean. From Mendel to epigenetics: history of genetics. **Comptes Rendus Biologies**, v. 339, n. 7-8, p. 225-230, jul. 2016.
- KUMAR, Vinay; ABBAS Abul; ASTER Jon. **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease**. 10 ed. Elsevier, 2020.
- LAURÉN, Pekka. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 64, n. 1, p. 31-49, set. 1965.

LEE, Yi-Chia; CHIANG, Tsung-Hsien; CHOU, Chu-Kuang; TU, Yu-Kang; LIAO, Wei-Chih; WU, Ming-Shiang; GRAHAM, David Y.. Association Between Helicobacter pylori Eradication and Gastric Cancer Incidence: a systematic review and meta-analysis. **Gastroenterology**, v. 150, n. 5, p. 1113-1124, maio 2016.

LI, Junan; POI, Ming Jye; TSAI, Ming-Daw. Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor P16INK4A and Their Relevance to Cancer. **Biochemistry**, v. 50, n. 25, p. 5566-5582, 28 jun. 2011.

MACHLOWSKA, Julita; BAJ, Jacek; SITARZ, Monika; MACIEJEWSKI, Ryszard; SITARZ, Robert. Gastric Cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4012, 4 jun. 2020.

NASEEM, Madiha; BARZI, Afsaneh; BREZDEN-MASLEY, Christine; PUCCINI, Alberto; BERGER, Martin D.; TOKUNAGA, Ryuma; BATTAGLIN, Francesca; SONI, Shivani; MCSKANE, Michelle; ZHANG, Wu. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 66, p. 15-22, mai. 2018.

PATTERSON, Andrew D; GONZALEZ, Frank J; PERDEW, Gary H; PETERS, Jeffrey M. Molecular Regulation of Carcinogenesis: friend and foe. **Toxicological Sciences**, v. 165, n. 2, p. 277-283, jul. 2018.

PERSSON, C.; CANEDO, P.; MACHADO, J. C.; EL-OMAR, E. M.; FORMAN, D.. Polymorphisms in Inflammatory Response Genes and Their Association With Gastric Cancer: a huge systematic review and meta-analyses. **American Journal of Epidemiology**, v. 173, n. 3, p. 259-270, 22 dez. 2010.

QU, Yiping; DANG, Siwen; HOU, Peng. Gene methylation in gastric cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 424, p. 53-65, set. 2013.

RAYESS, Hani; WANG, Marilene B.; SRIVATSAN, Eri S.. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 8, p. 1715-1725, 5 dez. 2011.

SAH, Bert-Ram; OWCZARCZYK, Kasia; SIDDIQUE, Musib; COOK, Gary J. R.; GOH, Vicky. Radiomics in esophageal and gastric cancer. **Abdominal Radiology**, v. 44, n. 6, p. 2048-2058, 16 ago. 2018.



SERRA, Stefano; CHETTY, Runjan. P16. **Journal of Clinical Pathology**, v. 71, n. 10, p. 853-858, 3 ago. 2018.

SPERKA, Tobias; WANG, Jianwei; RUDOLPH, K. Lenhard. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 9, p. 579-590, 23 ago. 2012.

STANG, Andreas. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. **European Journal of Epidemiology**, v. 25, n. 9, p. 603-605, 22 jul. 2010. Springer Science and Business Media LLC.

SUN, Guoping; PENG, Defeng; ZHANG, Heng. The relationship between P16 gene promoter methylation and gastric cancer: a meta-analysis based on chinese patients. **Journal Of Cancer Research And Therapeutics**, v. 10, n. 8, p. 292, 2014.

THOWSEND, Courtney M. **Sabiston Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice**. 21 ed. Elsevier, 2021.

TOHIDPOUR, Abolghasem. CagA-mediated pathogenesis of Helicobacter pylori. **Microbial Pathogenesis**, v. 93, p. 44-55, abr. 2016.

VAN CUTSEM, Eric; SAGAERT, Xavier; TOPAL, Baki; HAUSTERMANS, Karin; PRENEN, Hans. Gastric cancer. **The Lancet**, v. 388, n. 10060, p. 2654-2664, nov. 2016.

World Health Organization. **Global Cancer Observatory**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 10 maio 2021.

WU, Yi-Chen. Enhanced serum methylated p16 DNAs is associated with the progression of gastric cancer. **Internal Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 4, p. 1553-1562, mar. 2014.

ZHANG, Lian; LU, Qianjin; CHANG, Christopher. Epigenetics in Health and Disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 3-55, 2020.

ZIOGAS, D.; ROUKOS, D.. Epigenetics in Gastric Cancer: challenges for clinical implications. **Annals of Surgical Oncology**, v. 16, n. 7, p. 2077-2078, 2 maio 2009.

### **2.1.11 Apêndices**

Apêndice A – Formulário de Extração de Dados

---

**IDENTIFICAÇÃO**

---

Pesquisador responsável:

Data:

---

**ASPECTOS QUALITATIVOS**

---

Autoria:

Data de publicação:

Local de publicação:

Método de detecção de metilação genômica:

---

**ASPECTOS QUANTITATIVOS**

---

Grupo experimental:

Grupo controle:

n grupo experimental:

n grupo controle:

n grupo experimental com desfecho:

n grupo controle com desfecho:

---

## 2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA

Conforme preconizado no Componente Curricular Trabalho de Curso I, o projeto de pesquisa “Papel da metilação do gene p16 na oncogênese e progressão de carcinomas gástricos: revisão sistemática” foi desenvolvido ao longo do 2º semestre letivo de 2021. O projeto teve como objetivo comparar o status de metilação do gene promotor de p16 em tecidos neoplásicos gástricos humanos com seu homólogo em tecidos saudáveis, avaliando o papel dessa modificação epigenética na oncogênese e progressão tumoral.

A eleição de uma revisão sistemática como a metodologia para o êxito do objetivo descrito se deve à notória robustez estatística que este tipo de estudo confere, bem como sua importância singular dentro do escopo da Medicina Baseada em Evidências. Nesse sentido, o presente estudo foi conduzido consoante às diretrizes metodológicas do *Cochrane Handbook* e revisada de modo a atender os critérios sugeridos pelo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA). O estudo foi protocolizado na plataforma PROSPERO, com o ID 308218.

Por intermédio das bases de dados MEDLINE e Scopus, identificou-se os estudos relevantes, com publicação até julho de 2021 e sem restrições de linguagem. Utilizando os termos MeSH pertinentes e os operadores booleanos “OR” e “AND”, estruturou-se a seguinte estratégia de busca: (“DNA Methylation” OR “Methylation”) AND (“Stomach Neoplasm” OR “Gastric Neoplasm” ou “Stomach Cancer” OR “Gastric Cancer”) AND (“Genes, p16” OR “p16 Gene” OR “p16INK4 Gene” OR “Genes, CDKN2” OR “CDKN2 Gene” OR “MTS1 Gene”).

A seleção dos artigos foi realizada em duplicata pela equipe de pesquisa (LWS, GMW), e casos discrepantes foram ponderados por um terceiro avaliador independente (JP); nesse processo, para fins de gerenciamento bibliográfico, os manuscritos incluídos foram armazenados no *software* Mendeley 1.19.8 ®. Balizando-se nos critérios de elegibilidade elaborados, incluiu-se 48 manuscritos na síntese qualitativa e pôde-se dispor de 47 artigos para a consecução de metanálise. Extraíu-se os dados pertinentes para o Calc ®.

O *software* Cochrane RevMan 5.4 ® foi utilizado para a consecução da metanálise e, em virtude da relativa heterogeneidade entre os estudos, recorreu-se ao modelo de efeitos randômicos. Calculou-se Odds Ratio (OR) com intervalos de confiança de 95% (95% CI) para a quantificação das associações. Performou-se os testes I<sup>2</sup>, Chi<sup>2</sup>, Tau<sup>2</sup> e df para mensuração de heterogeneidade, além dos cálculos de Z e p para aferir a relevância inferencial dos resultados agregados.

Ademais, para avaliação da qualidade metodológica dos manuscritos incluídos, recorreu-se à escala Newcastle-Ottawa (NOS), tratando-se de uma ferramenta de mensuração de risco de viés para ensaios clínicos observacionais.

Durante o 1º semestre letivo de 2022, tendo em mãos os resultados da pesquisa, elaborou-se o artigo científico. A redação foi direcionada à publicação na revista *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (ISSN: 0304419X), em virtude de seu elevado fator de impacto, agregado ao enfoque em mecanismos biomoleculares mediadores de carcinogênese. O protocolo registrado na plataforma PROSPERO (308218) foi cumprido integralmente, tal como os objetivos do projeto foram atingidos.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

#### **Papel da metilação do gene p16 na oncogênese e progressão de carcinomas gástricos: revisão sistemática e metanálise**

Luigi Wolkmer Spagnol, ACAD

Daniela Augustin Silveira, MD, MSC

Jossimara Poletti, PHD

#### **Resumo**

**Introdução:** O câncer gástrico é a quarta principal causa de morbidade neoplásica no mundo, e sua patogênese tem sido relacionada a alterações genéticas e epigenéticas em genes reguladores do ciclo celular, como o p16. **Objetivos:** a presente revisão sistemática foi desenvolvida para investigar a associação da metilação de p16 com oncogênese e progressão de carcinomas gástricos. **Metodologia:** buscou-se por estudos subsidiários pertinentes nas bases de dados MEDLINE e Scopus, com publicação até julho de 2021 e sem restrição de linguagem. O protocolo completo foi registrado na plataforma PROSPERO, sob a identificação 308218. Utilizou-se a escala Newcastle-Ottawa (NOS) para avaliação da qualidade metodológica dos manuscritos incluídos. A metanálise foi conduzida através do software RevMan 5.4 ®. Recorreu-se ao modelo de efeitos randômicos, calculou-se Odds Ratio (OR) com intervalos de confiança de 95% (95% CI), mensurou-se heterogeneidade e relevância inferencial. **Resultados:** agregou-se 48 artigos na síntese qualitativa e 47 na metanálise, totalizando 6599 espécimes gástricas avaliadas. Observou-se correlação da metilação de p16 com os seguintes desfechos: oncogênese gástrica ( $p < 0,00001$ ); metaplasia intestinal ( $p = 0,002$ ); pobre diferenciação histológica ( $p = 0,03$ ); invasão local ( $p = 0,001$ ); disseminação linfonodal ( $p = 0,03$ ); estadiamentos TNM mais avançados ( $p = 0,01$ ); e infecção pelo vírus Epstein Barr ( $p < 0,00001$ ). Em contrapartida, não se encontrou associação da metilação de p16 com classificação histológica de Lauren ( $p = 0,62$ ); metástase à distância ( $p = 0,71$ ); ou infecção por *Helicobacter pylori* ( $p = 0,79$ ). **Conclusões:** os achados descritos providenciam evidência empírica para a categorização da metilação de p16 como uma etapa biomolecular substancial na carcinogênese gástrica, além de revelarem papel crucial do vírus Epstein Barr na deflagração dessa alteração epigenética.

**Palavras chave** Câncer Gástrico. Genes, p16. Metilação do DNA. Epigenômica. Carcinogênese.

## Introdução

O carcinoma gástrico é a quarta maior causa de mortalidade relacionada a malignidades e o quinto câncer mais comum no mundo, com mais de um milhão de novos casos anuais (1-2). Em termos de tratamento, é manejado através de cirurgia, possivelmente conjugada com modalidades de quimiorradioterapia; no entanto, devido à inespecificidade das manifestações clínicas, a maioria dos casos são diagnosticados em estágios avançados, resultando em um mau prognóstico (3-4).

Compreende-se a oncogênese gástrica como um processo multifatorial, envolvendo infecção por *Helicobacter pylori* e Epstein Barr, carcinógenos exógenos, ativação de oncogenes, inibição de genes supressores, apoptose epitelial gástrica e irrupção da regulação do ciclo celular (5-7). Além de alterações gênicas, diversos estudos já assinalaram a relevância da epigenética, principalmente supressões por metilação, na deflagração dos supracitados mecanismos (8-10).

Por sua vez, o gene p16 caracteriza-se como o segundo gene supressor de tumor mais significativo, atrás somente do TP53. Pertence à família de genes INK4, que é composta por quatro membros: p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C e p19INK4D, todos os quais compartilham propriedades biológicas relacionadas à inibição de ciclinas, com consequente atividade antiproliferativa e supressora tumoral (11-13).

Possíveis desarranjos que induzem à inativação de p16, produzindo condições celulares hiperproliferativas e potencialmente oncogênicas, incluem mutações pontuais, deleções homozigóticas, hipermetilação e perda de heterozigosidade. Apesar de cada neoplasia específica apresentar predileção por certo tipo de alteração no gene, a hipermetilação representa a maioria das disfunções de p16 em adenocarcinomas gástricos (34%), enquanto mutações ou deleções são raras nessa malignidade (0% –2%) (14-16).

Nesse contexto, mediante o estudo de associações da metilação do gene p16 aos desfechos relacionados à carcinogênese gástrica, pode-se robustecer os conhecimentos biomoleculares acerca dessa neoplasia e, em última análise, fecundar o desenvolvimento de novas modalidades diagnósticas ou terapêuticas, redutoras de letalidade (17-21).

O presente ensaio objetiva, pois, investigar a potencial correlação da metilação do gene p16 com a carcinogênese gástrica, de modo a apreciar a frequência dessa alteração epigenética

em espécimes gástricas neoplásicas, comparativamente à homóloga em tecidos não tumorais, e ponderar as características fenotípicas das malignidades às quais se associa.

## **Metodologia**

### Desenho do estudo

A presente revisão sistemática e metanálise foi elaborada consoante às diretrizes metodológicas do Cochrane Handbook (22) e revisada de modo a atender os critérios sugeridos pelo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA). O estudo foi protocolizado na plataforma PROSPERO, com o ID 308218.

### Estratégia de busca

Por intermédio das bases de dados MEDLINE e Scopus, identificou-se os estudos relevantes, com publicação até julho de 2021 e sem restrições de linguagem. Utilizando os termos MeSH pertinentes e os operadores booleanos “OR” e “AND”, estruturou-se a seguinte estratégia de busca: (“DNA Methylation” OR “Methylation”) AND (“Stomach Neoplasm” OR “Gastric Neoplasm” ou “Stomach Cancer” OR “Gastric Cancer”) AND (“Genes, p16” OR “p16 Gene” OR “p16INK4 Gene” OR “Genes, CDKN2” OR “CDKN2 Gene” OR “MTS1 Gene”).

### Seleção de artigos

Determinou-se, como critérios de elegibilidade: (1) utilização exclusiva de tecidos humanos; (2) modelagem experimental comparativa do status de metilação do gene p16 entre carcinomas gástricos e espécimes gástricas não neoplásicas, ou entre subgrupos fenotípicos distintos de carcinomas gástricos; (3) confirmação histopatológica dos diagnósticos de carcinoma gástrico; (4) utilização de DNA gástrico como substrato para aferição de metilação genômica; e (5) especificação do método molecular utilizado. Quaisquer estudos inadequados aos critérios ou potencialmente redundantes em sua base de amostra foram descartados.

A seleção dos artigos foi realizada em duplicata pela equipe de pesquisa (LWS, GMW), e casos discrepantes foram ponderados por um terceiro avaliador independente (JP). Nesse processo, para fins de gerenciamento bibliográfico, os manuscritos incluídos foram armazenados no software Mendeley 1.19.8 ®.

### Extração de dados

Utilizando como subsídio os artigos previamente selecionados, os dados pertinentes foram sistematicamente extraídos através de formulário padronizado e transferidos ao software

Calc<sup>®</sup>. As variáveis coletadas incluíram: autoria, ano de publicação, desfecho avaliado, método para aferição de metilação, grupo controle, amostra total do grupo controle, amostra do grupo controle com desfecho, grupo experimental, amostra total do grupo experimental, amostra do grupo experimental com desfecho.

#### Controle de qualidade

Os estudos selecionados foram avaliados formalmente por meio dos critérios da escala Newcastle-Ottawa (NOS), ferramenta de avaliação de risco de viés para ensaios clínicos observacionais. Os parâmetros da NOS consideram três facetas dos artigos, a saber, seleção, exposição e comparabilidade; a pontuação resultante varia de 0 a 9, de modo que valores  $\geq 7$  assinalam boa qualidade metodológica (23).

#### Análise estatística

Obteve-se subsídios quantitativos satisfatórios para avaliar a potencial correlação da metilação p16 com os seguintes desfechos: oncogênese gástrica, metaplasia intestinal, invasão neoplásica local, disseminação neoplásica linfonodal, metástase à distância, estadiamentos TNM mais avançados, classificação histológica de Lauren, diferenciação celular, infecção pelo vírus Epstein Barr, infecção por *Helicobacter pylori*.

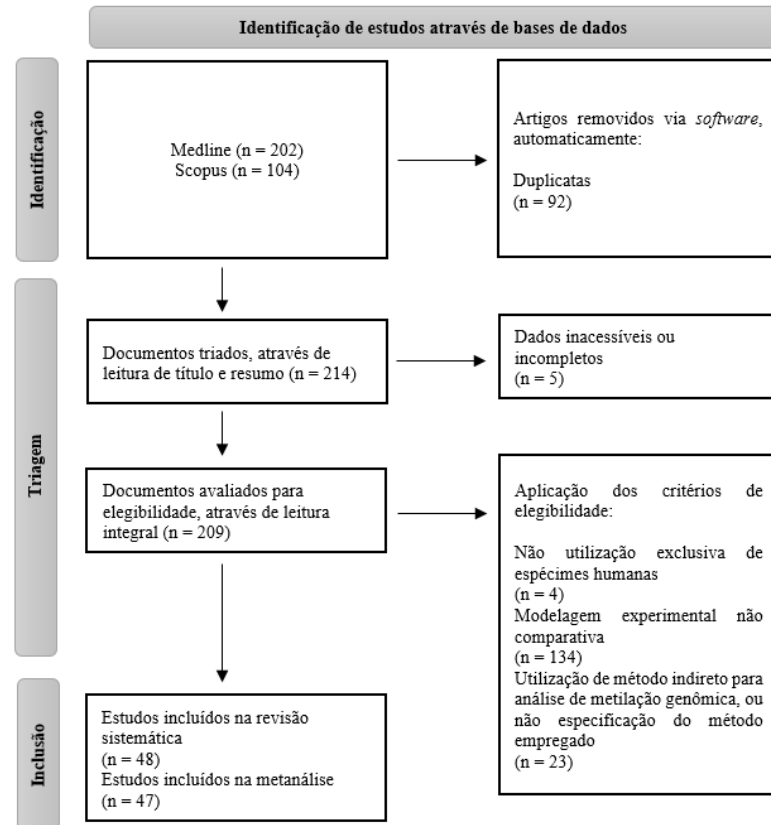
O software Cochrane RevMan 5.4<sup>®</sup> foi utilizado para a consecução da metanálise e, em virtude da relativa heterogeneidade entre os estudos, recorreu-se ao modelo de efeitos randômicos. Calculou-se Odds Ratio (OR) com intervalos de confiança de 95% (95% CI) para a quantificação das associações. Performou-se os testes  $I^2$ ,  $Chi^2$ ,  $Tau^2$  e  $df$  para mensuração de heterogeneidade, além dos cálculos de  $Z$  e  $p$  para aferir a relevância inferencial dos resultados agregados.

## **Resultados**

#### Característica dos estudos incluídos

A estratégia de busca identificou, inicialmente, 306 artigos. Após a remoção de duplicatas e a aplicação dos critérios de elegibilidade, dispôs-se de 48 estudos para a síntese qualitativa e 47 para a metanálise (Figura 1).



**Figura 1.** Aplicação do fluxograma PRISMA para a seleção dos estudos elegíveis

Conforme evidenciado na Tabela 1, os estudos incluídos foram publicados de 2001 a 2021. Agregou-se um total de 6599 espécimes gástricas como amostra e a reação de cadeia da polimerase metilação-específica (MSP) foi o método biomolecular aplicado em todos os ensaios.

**Tabela 1.** Caracterização dos estudos incluídos na revisão sistemática.

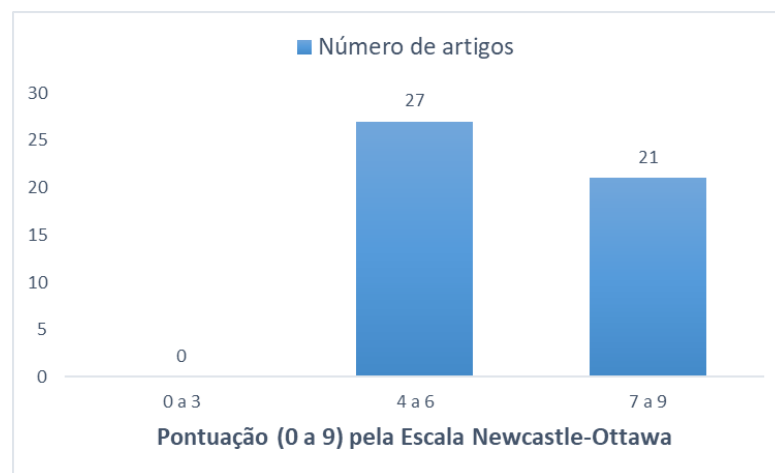
<b>Autores</b>	<b>Ano de publicação</b>	<b>Método de aferição de metilação</b>	<b>Escala Newcastle-Ottawa</b>	<b>Amostra de espécimes gástricas (n)</b>
Leung et al. (24)	2001	MSP	5	61
Jang et al. (25)	2001	MSP	7	100
Oue et al. (26)	2002	MSP	6	45
Vo et al. (27)	2002	MSP	5	107
Waki et al. (28)	2002	MSP	7	188
Kang et al. (29)	2002	MSP	5	77
To et al. (30)	2002	MSP	7	98
Osawa et al. (31)	2002	MSP	7	55

Vo et al. (32)	2002	MSP	7	111
Tsujimoto et al. (33)	2002	MSP	7	59
Kang et al. (34)	2003	MSP	6	290
Ding et al. (35)	2003	MSP	5	40
Tang et al. (36)	2003	MSP	6	96
Chong et al. (37)	2003	MSP	5	62
Zhao et al. (38)	2003	MSP	7	81
Sakuma et al. (39)	2004	MSP	5	240
Lee et al. (40)	2004	MSP	4	173
Etoh et al. (41)	2004	MSP	5	207
Mino et al. (42)	2006	MSP	4	96
Chang et al. (43)	2006	MSP	7	106
Oue et al. (44)	2006	MSP	6	110
Luo et al. (45)	2006	MSP	5	82
Zavala et al. (46)	2007	MSP	4	77
Zhao et al. (47)	2007	MSP	7	101
Arisawa et al. (48)	2008	MSP	5	85
Lima et al. (49)	2008	MSP	6	66
Zhang et al. (50)	2008	MSP	4	84
Zou et al. (51)	2009	MSP	7	77
Ksiaa et al. (52)	2009	MSP	5	121
Silva et al. (53)	2010	MSP	6	55
Goto et al. (54)	2010	MSP	7	49
Geddert et al. (55)	2010	MSP	6	92
Alves et al. (56)	2010	MSP	7	77
Sugai et al. (57)	2010	MSP	6	148
Ferrasi et al. (58)	2010	MSP	7	87
Tahara et al. (59)	2010	MSP	7	146
Shin et al. (60)	2010	MSP	6	430
Hu et al. (61)	2010	MSP	8	170
Mikata et al. (62)	2010	MSP	5	42
Alves et al. (63)	2011	MSP	4	76
Ben et al. (64)	2011	MSP	7	79

Lu et al. (65)	2012	MSP	6	98
Song et al. (66)	2013	MSP	7	644
Saito et al. (67)	2013	MSP	7	71
Xiong et al. (68)	2013	MSP	7	826
Xue et al. (69)	2014	MSP	7	106
He et al. (70)	2015	MSP	5	94
Bae et al. (71)	2021	MSP	7	214

Ademais, a Figura 2 caracteriza os artigos quanto a sua qualidade metodológica, avaliada consoante à escala New-Castle Ottawa (NOS).

**Figura 2.** Avaliação de qualidade metodológica dos estudos elegíveis, consoante à escala Newcastle-Ottawa (NOS).



#### Síntese de resultados quantitativos

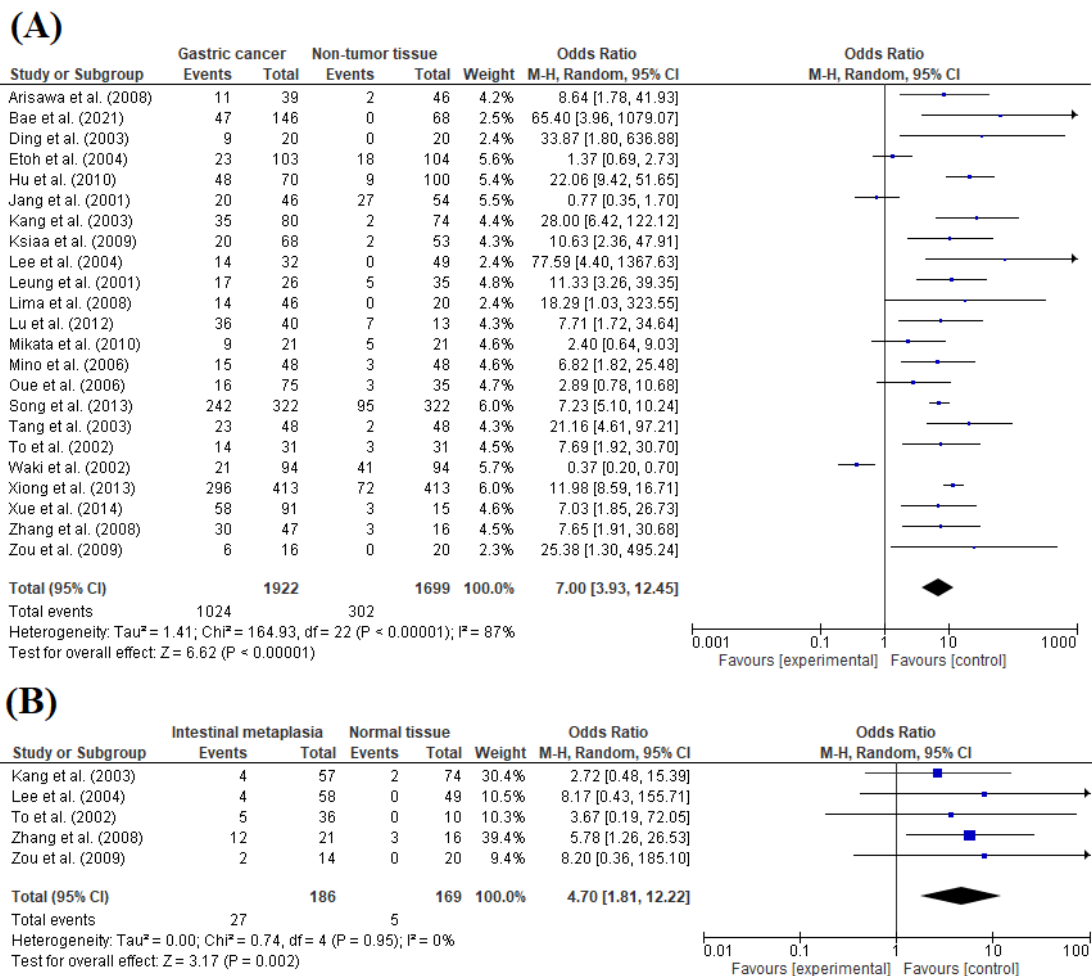
Obteve-se resultados estatisticamente significativos quando comparando-se as frequências de metilação do gene p16 em: carcinomas gástricos, *versus* tecidos não neoplásicos (OR = 7,00; CI = 3,93 – 12,45); espécimes gástricas com metaplasia intestinal, *versus* espécimes gástricas normais (OR = 4,7; CI = 1,81 – 12,22); carcinomas gástricos T1 ou T2, *versus* carcinomas gástricos T3 ou T4 (OR = 0,56; CI = 0,39 – 0,80 ); carcinomas gástricos N0, *versus* carcinomas gástricos com invasão linfonodal (OR = 0,68; CI = 0,49 – 0,96); carcinomas gástricos em estágios TNM 1 ou 2, *versus* carcinomas gástricos em estágios TNM 3 ou 4 (OR = 0,67; CI = 0,49 – 0,92); carcinomas gástricos EBV positivos, *versus* carcinomas gástricos EBV negativos (OR = 9,99; CI = 5,59 – 17,22); e carcinomas gástricos bem diferenciados, *versus* carcinomas gástricos pobremente diferenciados (OR = 0,72; CI = 0,53 – 0,96).

Por outro lado, não foi possível associar a metilação do gene p16 a: carcinomas gástricos M0, *versus* carcinomas gástricos com metástase à distância (OR = 0,88; CI = 0,46 – 1,69); carcinomas gástricos positivos para *H. pylori*, *versus* carcinomas gástricos negativos para *H. pylori* (OR = 1,05; CI = 0,74 – 1,48); e categorização histológica intestinal, *versus* difusa (OR = 0,9; CI = 0,61 – 1,35).

Os resultados supracitados, conjugados com mensurações de heterogeneidade e relevância inferencial, constam nos diagramas Forest Plot das Figuras 3, 4, 5 e 6.

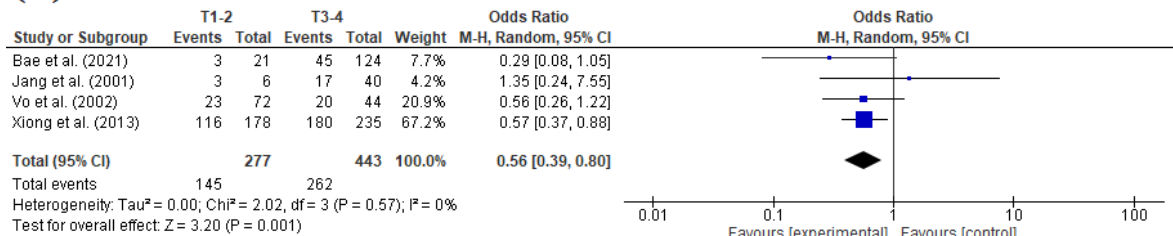
Ressalta-se que dentre os 48 estudos incluídos na revisão sistemática, somente um deles não integrou a metanálise (57). A não incorporação do estudo de Sugai et al. decorreu da modelagem comparativa entre carcinomas intramucosos e submucosos, não replicada por nenhum outro manuscrito.

**Figura 3.** Metilação aberrante do gene p16 e oncogênese gástrica: **A** - carcinomas gástricos (controle) *versus* espécimes gástricas não neoplásicas (experimental); **B** – metaplasia intestinal (controle) *versus* espécimes gástricas não neoplásicas (experimental)

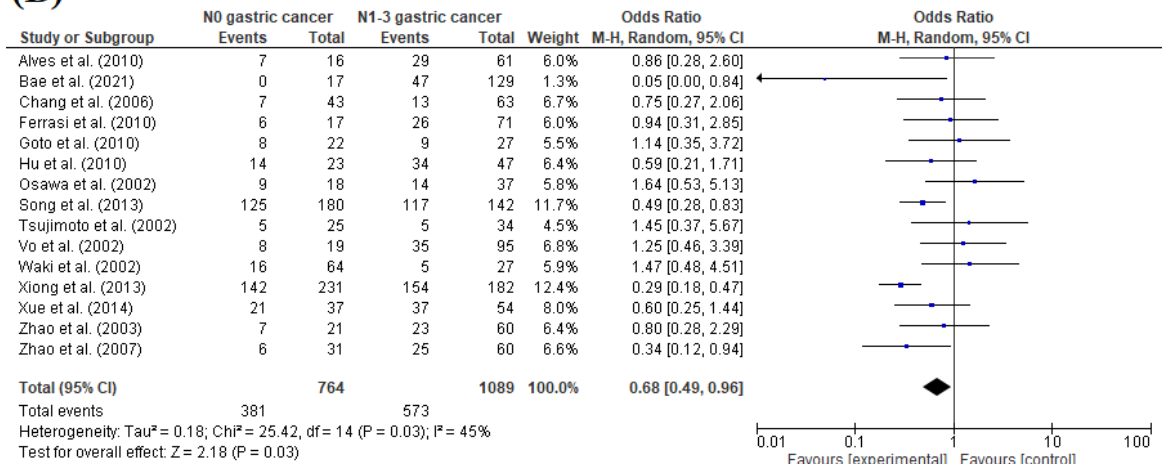


**Figura 4.** Metilação aberrante do gene p16 e estadiamento de carcinomas gástricos: **A** – T1 ou T2 (controle), versus T3 ou T4 (experimental); **B** – N0 (controle), versus N1-N3 (experimental); **C** – M0 (controle), versus M1 (experimental); **D** – estágio 1 ou 2 (controle), versus estágio 3 ou 4 (experimental)

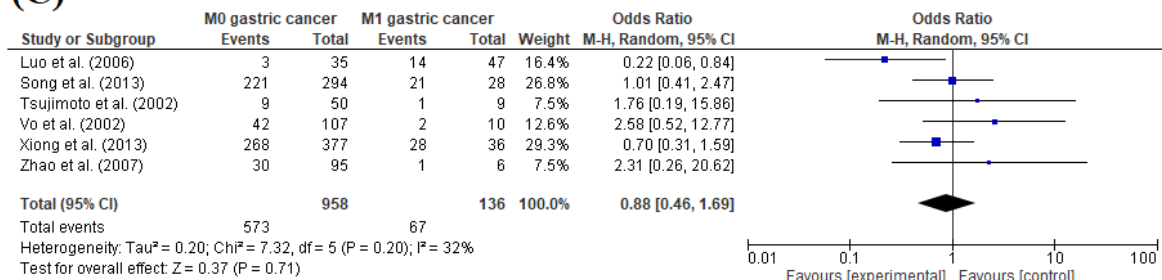
**(A)**



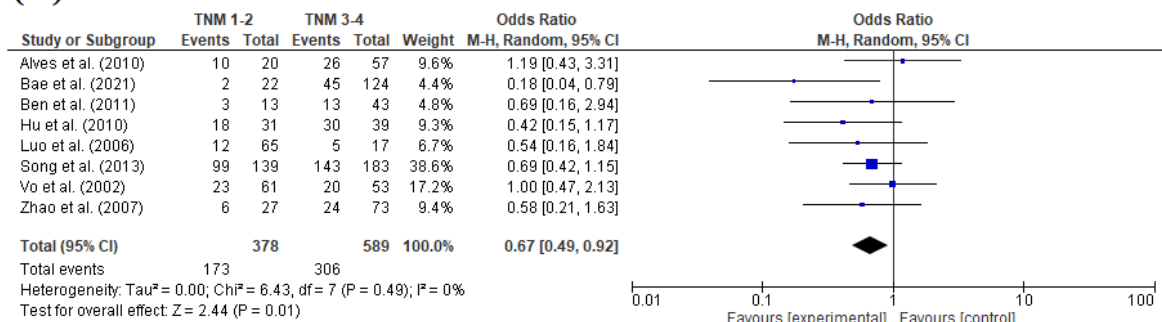
**(B)**



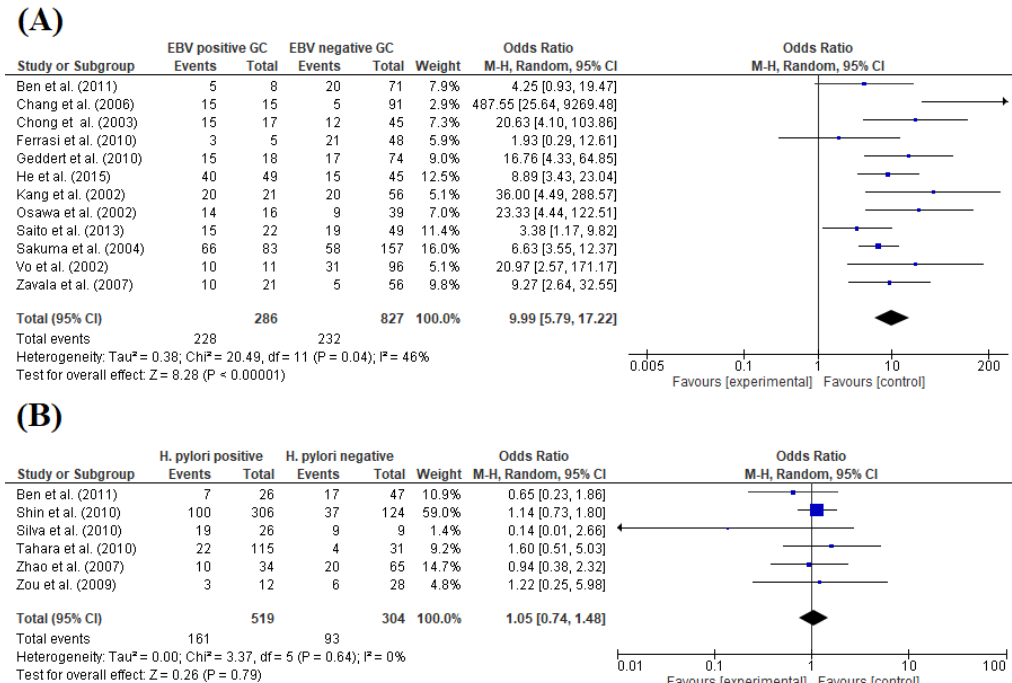
**(C)**



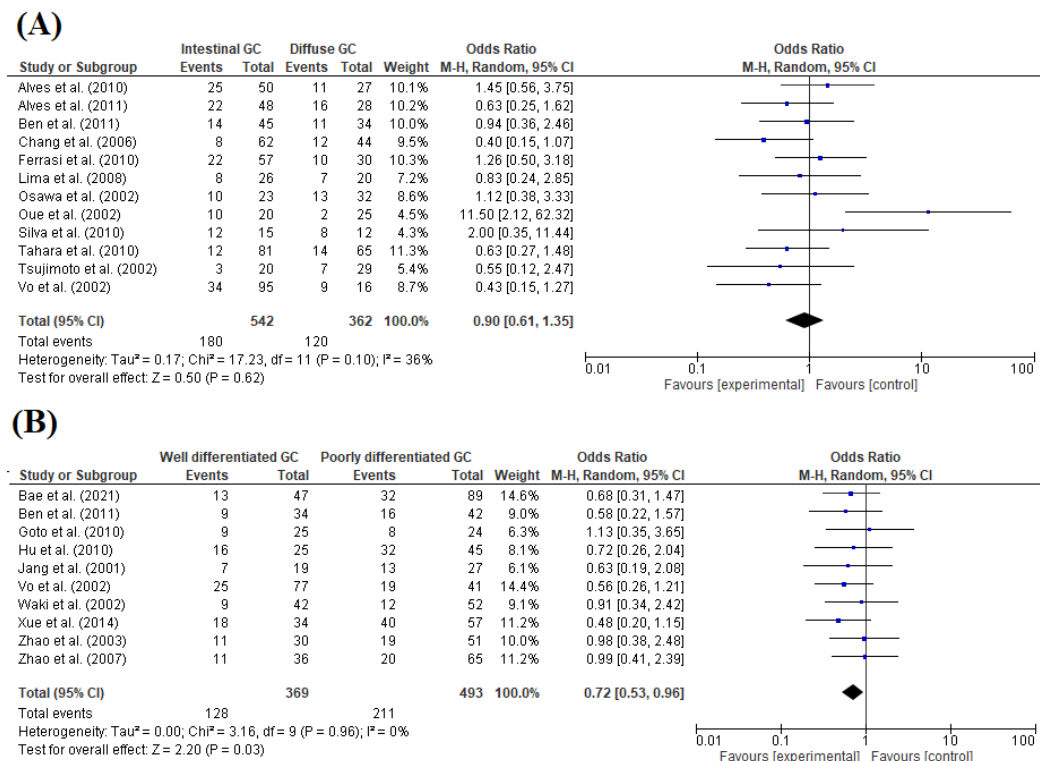
**(D)**



**Figura 5.** Metilação aberrante do gene p16 e patógenos oncogênicos: **A** – carcinoma gástrico EBV positivo (controle), versus EBV negativo (experimental); **B** – carcinoma gástrico *H. pylori* positivo (controle), versus *H. pylori* negativo (experimental)



**Figura 6.** Metilação aberrante do gene p16 e categorização histológica: **A** – carcinoma gástrico intestinal, versus difuso; **B** – carcinoma gástrico bem diferenciado, versus pobremente diferenciado.



## Discussão

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais extensivamente estudada, na qual um grupo metila é adicionado à quinta posição de carbono do resíduo de citosina, em um dinucleotídeo CpG. Via de regra, o aumento da metilação na região promotora de um gene medeia a depleção de sua expressão, enquanto a metilação na região transcrita suscita um efeito variável (72-74).

Por sua vez, o gene p16, um dos mais relevantes genes supressores de tumor do genoma humano, localiza-se no cromossomo 9p21, consistindo de três éxons e dois íntrons e medindo aproximadamente 8,5 kb de comprimento (75-76). Pormenorizando-se em mecanismos funcionais, é um inibidor de quinases dependentes de ciclina (CDK4 e CDK6), enzimas que ligar-se-iam à ciclina D1 e fosforilariam a proteína retinoblastoma (Rb). Dessa forma, o gene p16 categoriza-se como antiproliferativo, na medida em que mantém a disposição química de Rb não fosforilada, obstando, pois, a progressão do ciclo celular de G1 para S (77-79).

Levando em conta a plausibilidade biológica da associação, performou-se uma metanálise para cotejar o papel da metilação do gene p16 na oncogênese e progressão de carcinomas gástricos. Agregou-se 6599 espécimes gástricas como amostra, e inferiu-se correlação da supracitada alteração epigenética com os seguintes desfechos: oncogênese gástrica ( $p < 0,00001$ ); metaplasia intestinal ( $p = 0,002$ ); pobre diferenciação histológica ( $p = 0,03$ ); invasão local ( $p = 0,001$ ); disseminação linfonodal ( $p = 0,03$ ); estadiamentos TNM mais avançados ( $p = 0,01$ ); e infecção por EBV ( $p < 0,00001$ ).

Tal papel carcinogênico relacionado à metilação de p16 é reforçado por outras metanálises análogas, que associam a mesma alteração epigenética a neoplasias de outros sítios, a saber, próstata, pulmão, fígado, esôfago, colo uterino, pâncreas, cólon, reto e tireoide. Em todos esses casos, atribui-se a hiperproliferação celular à inativação transcricional de p16, decorrente da metilação de seu gene promotor (80-87).

Considerando a metilação de p16 um evento molecular precoce na oncogênese gástrica, sua detecção sérica pode ser um biomarcador útil para o diagnóstico de neoplasias em fase inicial (88-89). Sob essa óptica, uma metanálise examinou tal hipótese, obtendo 0,44, 0,97 e 0,44 como valores respectivos de sensibilidade, especificidade e área sob a curva ROC (90).

Alternativamente, como a metilação de p16 associou-se à invasão local, disseminação linfonodal, estadiamentos TNM mais avançados e pobre diferenciação histológica, a apreciação

de seus níveis plasmáticos também apresenta potencial valor prognóstico (91-93). Nesse âmbito, um estudo com 53 pacientes com adenocarcinoma gástrico, submetidos à ressecção cirúrgica, concluiu que desaparecimento sérico pós-operatório de metilação de p16 correlaciona-se com aumento de sobrevida para tumores com acometimento linfonodal (94).

Dentre as aplicações terapêuticas derivadas da estratificação oncológica balizada por status epigenético, o estudo de Bae et al. associou tumores gástricos p16-metilados a um melhor perfil de sensibilidade ao quimioterápico abemaciclib. Em termos farmacodinâmicos, seu mecanismo de ação assenta-se justamente na inibição de CDK4/6, enzimas cuja hiperfunção é uma extensão da inibição transcricional de p16. Assim, como o abemaciclib apresentaria melhor resposta em um subgrupo de carcinomas gástricos de pior prognóstico, evidencia-se a pertinência da consecução de ensaios clínicos randomizados acerca desse fármaco (71, 95-96).

Outrossim, a predominância da metilação do gene p16 em tumores positivos para Epstein-Barr ( $p < 0,00001$ ) sugere que o vírus desempenhe papel crucial na deflagração dessa alteração. Com efeito, outros genes supressores de tumor, como CDH1, p15 e p72, encontram-se comumente metilados em cânceres EBV positivos (72, 97-99). Um possível mecanismo molecular para o fenômeno seria a suprarregulação da proteína de membrana latente 2A (LMP2A) que, através da fosforilação do fator de transcrição STAT3, também amplificaria a expressão de DNA metiltransferases (100).

Em contrapartida, a presente metanálise não associou, com significância estatística, metilação de p16 a: classificação histológica de Lauren ( $p = 0,62$ ); metástase à distância ( $p = 0,71$ ); ou infecção por *H. pylori* ( $p = 0,79$ ). Todavia, contrastando com os resultados encontrados, há estudos observacionais que estabeleçam inter-relação entre *H. pylori* e aberrâncias de metilação no epitélio gástrico. A análise não segregada de sorotipos específico da bactéria, nomeadamente os mais virulentos *cagA* e *vacA*, pode ter influenciado nos resultados (101-102).

### **Limitações**

Apesar de a presente metanálise ter reunido diversas modelagens experimentais robustas acerca do papel da metilação de p16 na carcinogênese gástrica, suas conclusões contam com limitações. Primeiramente, encontrou-se relativa heterogeneidade entre os artigos, derivando valores de  $I^2$  de até 89%, o que impacta a relevância inferencial de seu agregado. Em segundo lugar, o status de metilação de somente um gene foi avaliado, podendo haver outros mecanismos subjacentes ocultos, cuja expressividade só seria explicitada através de uma



análise multivariada. Por fim, enfatiza-se o risco de viés de publicação, inerente às revisões sistemáticas de literatura e não estimado no presente estudo, além da moderada qualidade metodológica dos manuscritos incluídos, ajuizada em consonância com a escala NOS.

## Conclusão

Os achados descritos providenciam evidência empírica para a categorização da metilação do gene p16 como uma etapa biomolecular substancial na fisiopatologia das neoplasias gástricas, refletindo-se em metaplasia intestinal, oncogênese, pobre diferenciação histológica, invasão local, disseminação linfonodal e estadiamentos TNM mais avançados. O vírus Epstein-Barr, por sua vez, parece desempenhar papel fundamental na deflagração dessa alteração epigenética. Evidencia-se, pois, a relevância da consecução estudos adicionais acerca da temática, subsidiando-se nos resultados obtidos para fecundar novas modalidades diagnósticas, prognósticas e terapêuticas.

## Referências

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249.
2. Machlowska J, Baj J, Sitarz M, Maciejewski R, Sitarz R. Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 4;21(11):4012.
3. Digkha A, Wagner AD. Advanced gastric cancer: Current treatment landscape and future perspectives. *World J Gastroenterol.* 2016 Feb 28;22(8):2403-14.
4. Patel TH, Cecchini M. Targeted Therapies in Advanced Gastric Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2020 Jul 28;21(9):70.
5. Wu YC, Lv P, Han J, Yu JL, Zhu X, Hong LL, Zhu WY, Yu QM, Wang XB, Li P, Ling ZQ. Enhanced serum methylated p16 DNAs is associated with the progression of gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Mar 15;7(4):1553-62
6. Shi J, Qu YP, Hou P. Pathogenetic mechanisms in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2014 Oct 14;20(38):13804-19.
7. Molina-Castro S, Pereira-Marques J, Figueiredo C, Machado JC, Varon C. Gastric cancer: Basic aspects. *Helicobacter.* 2017 Sep;22 Suppl 1.

8. Figueiredo C, Garcia-Gonzalez MA, Machado JC. Molecular pathogenesis of gastric cancer. *Helicobacter*. 2013 Sep;18 Suppl 1:28-33.
9. Chamberlain JA, Dugué PA, Bassett JK, Milne RL, Joo JE, Wong EM, Brinkman MT, Stuart GW, Boussioutas A, Southey MC, Giles GG, Mitchell H, English DR, Hodge AM. DNA Methylation in Peripheral Blood and Risk of Gastric Cancer: A Prospective Nested Case-control Study. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2021 Feb;14(2):233-240.
10. Tahara T, Arisawa T. DNA methylation as a molecular biomarker in gastric cancer. *Epigenomics*. 2015;7(3):475-86.
11. Serra S, Chetty R. p16. *J Clin Pathol*. 2018 Oct;71(10):853-858.
12. Chen Z, Guo Y, Zhao D, Zou Q, Yu F, Zhang L, Xu L. Comprehensive Analysis Revealed that CDKN2A is a Biomarker for Immune Infiltrates in Multiple Cancers. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Dec 23;9:808208.
13. Yuan C, Li J, Selby TL, Byeon IJ, Tsai MD. Tumor suppressor INK4: comparisons of conformational properties between p16(INK4A) and p18(INK4C). *J Mol Biol*. 1999 Nov 19;294(1):201-11.
14. Li J, Poi MJ, Tsai MD. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. *Biochemistry*. 2011 Jun 28;50(25):5566-82. doi: 10.1021/bi200642e. Epub 2011 Jun 6
15. Jiao Y, Feng Y, Wang X. Regulation of Tumor Suppressor Gene CDKN2A and Encoded p16-INK4a Protein by Covalent Modifications. *Biochemistry (Mosc)*. 2018 Nov;83(11):1289-1298.
16. McKenzie HA, Fung C, Becker TM, Irvine M, Mann GJ, Kefford RF, Rizos H. Predicting functional significance of cancer-associated p16(INK4a) mutations in CDKN2A. *Hum Mutat*. 2010 Jun;31(6):692-701.
17. Sherr CJ, Beach D, Shapiro GI. Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discov*. 2016 Apr;6(4):353-67.
18. Demaria M. Gene therapy for p16-overexpressing cells. *Aging (Albany NY)*. 2018 Apr 19;10(4):518-519.
19. Kohli J, Campisi J, Demaria M. A novel suicide gene therapy for the treatment of p16Ink4a-overexpressing tumors. *Oncotarget*. 2017 Dec 28;9(7):7274-7281.
20. Zeng D, Li M, Zhou R, Zhang J, Sun H, Shi M, Bin J, Liao Y, Rao J, Liao W. Tumor Microenvironment Characterization in Gastric Cancer Identifies Prognostic and Immunotherapeutically Relevant Gene Signatures. *Cancer Immunol Res*. 2019 May;7(5):737-750.

21. Cai WY, Dong ZN, Fu XT, Lin LY, Wang L, Ye GD, Luo QC, Chen YC. Identification of a Tumor Microenvironment-relevant Gene set-based Prognostic Signature and Related Therapy Targets in Gastric Cancer. *Theranostics*. 2020 Jul 9;10(19):8633-8647.
22. Cumpston M, Li T, Page MJ, Chandler J, Welch VA, Higgins JP, Thomas J. Updated guidance for trusted systematic reviews: a new edition of the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Oct 3;10:ED000142.
23. Islam MM, Iqbal U, Walther B, Atique S, Dubey NK, Nguyen PA, Poly TN, Masud JH, Li YJ, Shabbir SA. Benzodiazepine Use and Risk of Dementia in the Elderly Population: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*. 2016;47(3-4):181-191.
24. Leung WK, Yu J, Ng EK, To KF, Ma PK, Lee TL, Go MY, Chung SC, Sung JJ. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer*. 2001 Jun 15;91(12):2294-301.
25. Jang TJ, Kim DI, Shin YM, Chang HK, Yang CH. p16(INK4a) Promoter hypermethylation of non-tumorous tissue adjacent to gastric cancer is correlated with glandular atrophy and chronic inflammation. *Int J Cancer*. 2001 Sep 1;93(5):629-34.
26. Oue N, Motoshita J, Yokozaki H, Hayashi K, Tahara E, Taniyama K, Matsusaki K, Yasui W. Distinct promoter hypermethylation of p16INK4a, CDH1, and RAR-beta in intestinal, diffuse-adherent, and diffuse-scattered type gastric carcinomas. *J Pathol*. 2002 Sep;198(1):55-9.
27. Vo QN, Geradts J, Gulley ML, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. Epstein-Barr virus in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. *J Clin Pathol*. 2002 Sep;55(9):669-75.
28. Waki T, Tamura G, Tsuchiya T, Sato K, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of E-cadherin, hMLH1, and p16 genes in nonneoplastic gastric epithelia. *Am J Pathol*. 2002 Aug;161(2):399-403.
29. Kang GH, Lee S, Kim WH, Lee HW, Kim JC, Rhyu MG, Ro JY. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma. *Am J Pathol*. 2002 Mar;160(3):787-94.

30. To KF, Leung WK, Lee TL, Yu J, Tong JH, Chan MW, Ng EK, Chung SS, Sung JJ. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in gastric intestinal metaplasia of patients with and without gastric cancer. *Int J Cancer*. 2002;102:623-628.
31. Osawa T, Chong JM, Sudo M, Sakuma K, Uozaki H, Shibahara J, Nagai H, Funata N, Fukayama M. Reduced expression and promoter methylation of p16 gene in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res*. 2002 Nov;93(11):1195-200.
32. Vo QN, Geradts J, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. CDKN2A promoter methylation in gastric adenocarcinomas: clinical variables. *Hum Pathol*. 2002 Dec;33(12):1200-4.
33. Tsujimoto H, Hagiwara A, Sugihara H, Hattori T, Yamagishi H. Promoter methylations of p16INK4a and p14ARF genes in early and advanced gastric cancer. Correlations of the modes of their occurrence with histologic type. *Pathol Res Pract*. 2002;198(12):785-94.
34. Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest*. 2003 May;83(5):635-41.
35. Ding Y, Le XP, Zhang QX, Du P. Methylation and mutation analysis of p16 gene in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2003 Mar;9(3):423-6.
36. Tang SH, Yang DH, Luo HS, Yu JP, Shu JC. [Relationship between alterations of p16INK4a and p14ARF genes of CDKN2A locus and gastric carcinogenesis]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2004 Jun;25(6):517-21.
37. Chong JM, Sakuma K, Sudo M, Ushiku T, Uozaki H, Shibahara J, Nagai H, Funata N, Taniguchi H, Aburatani H, Fukayama M. Global and non-random CpG-island methylation in gastric carcinoma associated with Epstein-Barr virus. *Cancer Sci*. 2003 Jan;94(1):76-80.
38. Zhao Y, Tian X, Du J, Zhang Y, Liu S, Lin J, Zheng J. [Methylation and expression of gene p16INK4a and RB in gastric carcinomas]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2003 Aug;35(4):382-5.
39. Sakuma K, Chong JM, Sudo M, Ushiku T, Inoue Y, Shibahara J, Uozaki H, Nagai H, Fukayama M. High-density methylation of p14ARF and p16INK4A in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer*. 2004 Nov 1;112(2):273-8.
40. Lee JH, Park SJ, Abraham SC, Seo JS, Nam JH, Choi C, Juhng SW, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT. Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas. *Oncogene*. 2004 Jun 3;23(26):4646-54.

41. Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, Kitano S, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol.* 2004 Feb;164(2):689-99.
42. Mino A, Onoda N, Yashiro M, Aya M, Fujiwara I, Kubo N, Sawada T, Ohira M, Kato Y, Hirakawa K. Frequent p16 CpG island hypermethylation in primary remnant gastric cancer suggesting an independent carcinogenic pathway. *Oncol Rep.* 2006 Mar;15(3):615-20.
43. Chang MS, Uozaki H, Chong JM, Ushiku T, Sakuma K, Ishikawa S, Hino R, Barua RR, Iwasaki Y, Arai K, Fujii H, Nagai H, Fukayama M. CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. *Clin Cancer Res.* 2006 May 15;12(10):2995-3002.
44. Oue N, Mitani Y, Motoshita J, Matsumura S, Yoshida K, Kuniyasu H, Nakayama H, Yasui W. Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer.* 2006 Mar 15;106(6):1250-9.
45. Luo D, Zhang B, Lv L, Xiang S, Liu Y, Ji J, Deng D. Methylation of CpG islands of p16 associated with progression of primary gastric carcinomas. *Lab Invest.* 2006 Jun;86(6):591-8.
46. Zavala G L, Luengo J V, Ossandón C F, Riquelme S E, Backhouse E C, Palma V M, Argandoña C J, Cumsille MA, Corvalán R A. Hierarchical clustering analysis to detect associations between clinical and pathological features of gastric tumors and hypermethylation of suppressor genes. *Rev Med Chil.* 2007 Jan;135(1):17-25.
47. Zhao YF, Zhang YG, Tian XX, Juan Du, Jie Zheng. Aberrant methylation of multiple genes in gastric carcinomas. *Int J Surg Pathol.* 2007 Jul;15(3):242-51.
48. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, Fujita H, Yoshioka D, Arima Y, Okubo M, Hirata I, Nakano H. The influence of promoter polymorphism of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 gene on the aberrant DNA methylation in gastric epithelium. *Oncol Rep.* 2008 Jan;19(1):211-6.
49. Lima EM, Leal MF, Burbano RR, Khayat AS, Assumpção PP, Bello MJ, Rey JA, Smith MA, Casartelli C. Methylation status of ANAPC1, CDKN2A and TP53 promoter genes in individuals with gastric cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2008 Jun;41(6):539-43.

50. Zhang KL, Sun Y, Li Y, Liu M, Qu B, Cui SH, Kong QY, Chen XY, Li H, Liu J: Increased frequency of CpG island methylator phenotype and CDH1 methylation in a gastric cancer high-risk region of china. *Transl Oncol.* 2008, 1 (1): 28-35.
51. Zou XP, Zhang B, Zhang XQ, Chen M, Cao J, Liu WJ. Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions. *Hum Pathol.* 2009 Nov;40(11):1534-42.
52. Ksiasa F, Ziadi S, Amara K, Korbi S, Trimeche M. Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma. *Clin Chim Acta.* 2009 Jun 27;404(2):128-33.
53. Silva M, Azenha D, Pereira C, Almeida A, Balseiro S, Sampaio AM, Santos P, Carvalho L. Gastric carcinoma and chronic gastritis: epigenetic regulation of CDH1 (E-Cadherin), CDKN2A (p16INK4A), PTGS2 (COX-2) and EGFR genes through methylation. *Acta Med Port.* 2010 Jan-Feb;23(1):5-14.
54. Goto T, Mizukami H, Shirahata A, Yokomizo K, Kitamura YH, Sakuraba K, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y, Hibi K. Methylation of the p16 gene is frequently detected in lymphatic-invasive gastric cancer. *Anticancer Res.* 2010 Jul;30(7):2701-3.
55. Geddert H, Zur Hausen A, Gabbert HE, Sarbia M. EBV-infection in cardiac and non-cardiac gastric adenocarcinomas is associated with promoter methylation of p16, p14 and APC, but not hMLH1. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2010;33(3):143-9.
56. Alves MK, Lima VP, Ferrasi AC, Rodrigues MA, De Moura Campos Pardini MI, Rabenhorst SH. CDKN2A promoter methylation is related to the tumor location and histological subtype and associated with *Helicobacter pylori* flaA(+) strains in gastric adenocarcinomas. *APMIS.* 2010 Apr;118(4):297-307.
57. Sugai T, Habano W, Endoh M, Konishi Y, Akasaka R, Toyota M, Yamano H, Koeda K, Wakabayashi G, Suzuki, K. Molecular analysis of gastric differentiated-type intramucosal and submucosal cancers. *Int. J. Cancer.* 2010;127:2500-2509.
58. Ferrasi AC, Pinheiro NA, Rabenhorst SH, Caballero OL, Rodrigues MA, de Carvalho F, Leite CV, Ferreira MV, Barros MA, Pardini MI. *Helicobacter pylori* and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. *World J Gastroenterol.* 2010 Jan 21;16(3):312-9.
59. Tahara T, Shibata T, Arisawa T, Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I. CpG island promoter methylation (CIHM) status of

- tumor suppressor genes correlates with morphological appearances of gastric cancer. *Anticancer Res.* 2010 Jan;30(1):239-44.
60. Shin CM, Kim N, Jung Y, Park JH, Kang GH, Kim JS, Jung HC, Song IS. Role of *Helicobacter pylori* infection in aberrant DNA methylation along multistep gastric carcinogenesis. *Cancer Sci.* 2010 Jun;101(6):1337-46.
  61. Hu SL, Kong XY, Cheng ZD, Sun YB, Shen G, Xu WP, Wu L, Xu XC, Jiang XD, Huang DB. Promoter methylation of p16, Runx3, DAPK and CHFR genes is frequent in gastric carcinoma. *Tumori.* 2010 Sep-Oct;96(5):726-33.
  62. Mikata R, Fukai K, Imazeki F, Arai M, Fujiwara K, Yonemitsu Y, Zhang K, Nabeya Y, Ochiai T, Yokosuka O. BCL2L10 is frequently silenced by promoter hypermethylation in gastric cancer. *Oncol Rep.* 2010 Jun;23(6):1701-8.
  63. Alves MK, Ferrasi AC, Lima VP, Ferreira MV, de Moura Campos Pardini MI, Rabenhorst SH. Inactivation of COX-2, HMLH1 and CDKN2A gene by promoter methylation in gastric cancer: relationship with histological subtype, tumor location and *Helicobacter pylori* genotype. *Pathobiology.* 2011;78(5):266-76.
  64. Ben Ayed-Guerfali D, Benhaj K, Khabir A, Abid M, Bayroui MI, Sellami-Boudawara T, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Hypermethylation of tumor-related genes in Tunisian patients with gastric carcinoma: clinical and biological significance. *J Surg Oncol.* 2011 Jun 1;103(7):687-94.
  65. Lu ZM, Zhou J, Wang X, Guan Z, Bai H, Liu ZJ, Su N, Pan K, Ji J, Deng D. Nucleosomes correlate with in vivo progression pattern of de novo methylation of p16 CpG islands in human gastric carcinogenesis. *PLoS One.* 2012;7(4):e35928.
  66. Song B, Ai J, Kong X, Liu D, Li J. Aberrant DNA Methylation of P16, MGMT, and hMLH1 Genes in Combination with MTHFR C677T Genetic Polymorphism in gastric cancer. *Pak J Med Sci.* 2013 Nov;29(6):1338-43.
  67. Saito M, Nishikawa J, Okada T, Morishige A, Sakai K, Nakamura M, Kiyotoki S, Hamabe K, Okamoto T, Oga A, Sasaki K, Suehiro Y, Hinoda Y, Sakaida I. Role of DNA methylation in the development of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Med Virol.* 2013 Jan;85(1):121-7.
  68. Xiong HL, Liu XQ, Sun AH, He Y, Li J, Xia Y. Aberrant DNA methylation of P16, MGMT, hMLH1 and hMSH2 genes in combination with the MTHFR C677T genetic polymorphism in gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(5):3139-42.
  69. Xue L, Ouyang Q, Li J, Meng X, Li Y, Xing L, Zhang X. Different roles for p16INK4a-Rb pathway and INK4a/ARF methylation between adenocarcinomas of

- gastric cardia and distal stomach. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2014;29(7):1418–1426.
70. He D, Zhang YW, Zhang NN, Zhou L, Chen JN, Jiang Y, Shao CK. Aberrant gene promoter methylation of p16, FHIT, CRBP1, WWOX, and DLC-1 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Med Oncol*. 2015 Apr;32(4):92.
  71. Bae HJ, Kang SK, Kwon WS, Jeong I, Park S, Kim TS, Kim KH, Kim H, Jeong HC, Chung HC, Rha SY. p16 methylation is a potential predictive marker for abemaciclib sensitivity in gastric cancer. *Biochem Pharmacol*. 2021 Jan;183:114320.
  72. Qu Y, Dang S, Hou P. Gene methylation in gastric cancer. *Clin Chim Acta*. 2013 Sep 23;424:53-65.
  73. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002 Jun;3(6):415-28.
  74. Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res*. 2008 Jul-Aug;659(1-2):40-8.
  75. Yuan C, Li J, Selby TL, Byeon IJ, Tsai MD. Tumor suppressor INK4: comparisons of conformational properties between p16(INK4A) and p18(INK4C). *J Mol Biol*. 1999 Nov 19;294(1):201-11.
  76. Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res*. 1997 Nov 25;237(1):7-13.
  77. Liggett WH Jr, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol*. 1998 Mar;16(3):1197-206.
  78. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*. 2012 Apr 15;130(8):1715-25.
  79. Al-Khalaf HH, Colak D, Al-Saif M, Al-Bakheet A, Hendrayani SF, Al-Yousef N, Kaya N, Khabar KS, Aboussekhra A. p16( INK4a) positively regulates cyclin D1 and E2F1 through negative control of AUF1. *PLoS One*. 2011;6(7):e21111.
  80. Feng W, Han Z, Zhu R, Liu P, Liu S. Association of p16 gene methylation with prostate cancer risk: a meta-analysis. *J BUON*. 2015 Jul-Aug;20(4):1074-80.
  81. Tuo L, Sha S, Huayu Z, Du K. P16INK4a gene promoter methylation as a biomarker for the diagnosis of non-small cell lung cancer: An updated meta-analysis. *Thorac Cancer*. 2018 Aug;9(8):1032-1040.
  82. Zhang C, Li J, Huang T, Duan S, Dai D, Jiang D, Sui X, Li D, Chen Y, Ding F, Huang C, Chen G, Wang K. Meta-analysis of DNA methylation biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Dec 6;7(49):81255-81267.



83. Zhou C, Li J, Li Q. CDKN2A methylation in esophageal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Jul 25;8(30):50071-50083.
84. El Aliani A, El-Abid H, El Mallali Y, Attaleb M, Ennaji MM, El Mzibri M. Association between Gene Promoter Methylation and Cervical Cancer Development: Global Distribution and A Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2021 Mar;30(3):450-459.
85. Tang B, Li Y, Qi G, Yuan S, Wang Z, Yu S, Li B, He S. Clinicopathological Significance of CDKN2A Promoter Hypermethylation Frequency with Pancreatic Cancer. *Sci Rep*. 2015 Sep 4;5:13563.
86. Xing X, Cai W, Shi H, Wang Y, Li M, Jiao J, Chen M. The prognostic value of CDKN2A hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2013 Jun 25;108(12):2542-8.
87. Wu W, Yang SF, Liu FF, Zhang JH. Association between p16 Promoter Methylation and Thyroid Cancer Risk: A Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(16):7111-5.
88. Ichikawa D, Koike H, Ikoma H, Ikoma D, Tani N, Otsuji E, Kitamura K, Yamagishi H. Detection of aberrant methylation as a tumor marker in serum of patients with gastric cancer. *Anticancer Res*. 2004 Jul-Aug;24(4):2477-81.
89. Abbaszadegan MR, Moaven O, Sima HR, Ghafarzadegan K, A'rabi A, Forghani MN, Raziee HR, Mashhadinejad A, Jafarzadeh M, Esmaili-Shandiz E, Dadkhah E. p16 promoter hypermethylation: a useful serum marker for early detection of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2008 Apr 7;14(13):2055-60.
90. Peng D, Zhang H, Sun G. The relationship between P16 gene promoter methylation and gastric cancer: a meta-analysis based on Chinese patients. *J Cancer Res Ther*. 2014 Dec;10 Suppl:292-5.
91. Sapari NS, Loh M, Vaithilingam A, Soong R. Clinical potential of DNA methylation in gastric cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(4):e36275.
92. Shi J, Zhang G, Yao D, Liu W, Wang N, Ji M, He N, Shi B, Hou P. Prognostic significance of aberrant gene methylation in gastric cancer. *Am J Cancer Res*. 2012;2(1):116-29.
93. Ikoma H, Ichikawa D, Koike H, Ikoma D, Tani N, Okamoto K, Ochiai T, Ueda Y, Otsuji E, Yamagishi H. Correlation between serum DNA methylation and prognosis in gastric cancer patients. *Anticancer Res*. 2006 May-Jun;26(3B):2313-6.

94. Lim HK, Park JM, Chi KC, Lee EJ, Jeong EM. Disappearance of Serum Methylated p16 Indicates Longer Survival in Patients with Gastric Cancer. *J Gastric Cancer*. 2013 Sep;13(3):157-63.
95. O'Brien N, Conklin D, Beckmann R, Luo T, Chau K, Thomas J, Mc Nulty A, Marchal C, Kalous O, von Euw E, Hurvitz S, Mockbee C, Slamon DJ. Preclinical Activity of Abemaciclib Alone or in Combination with Antimitotic and Targeted Therapies in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2018 May;17(5):897-907.
96. Kotake T, Toi M. Abemaciclib for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2018 Apr;19(5):517-524.
97. Naseem M, Barzi A, Brezden-Masley C, Puccini A, Berger MD, Tokunaga R, Battaglin F, Soni S, McSkane M, Zhang W, Lenz HJ. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer. *Cancer Treat Rev*. 2018 May;66:15-22.
98. Uozaki H, Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma--viral carcinogenesis through epigenetic mechanisms. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008 Jan 1;1(3):198-216.
99. Yang J, Liu Z, Zeng B, Hu G, Gan R. Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: A distinct subtype. *Cancer Lett*. 2020 Dec 28;495:191-199.
100. Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinozaki A, Ishikawa S, Morikawa T, Nakaya T, Sakatani T, Takada K, Fukayama M. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Res*. 2009 Apr 1;69(7):2766-74.
101. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Arii K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M, Ushijima T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):989-95.
102. Watari J, Ito C, Shimoda T, Tomita T, Oshima T, Fukui H, Das KM, Miwa H. DNA methylation silencing of microRNA gene methylator in the precancerous background mucosa with and without gastric cancer: Analysis of the effects of *H. pylori* eradication and long-term aspirin use. *Sci Rep*. 2019 Aug 29;9(1):12559.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A consecução do presente projeto possibilitou aprendizado extensivo nos âmbitos da epidemiologia, bioestatística e patologia, além de explicitar a importância das revisões sistemáticas de literatura no escopo da Medicina Baseada em Evidências. Depreendeu-se, ademais, a indissociabilidade entre o rigor metodológico e a prática científica.

Por fim, ressalta-se que as competências desenvolvidas pelo acadêmico durante as disciplinas Trabalho de Curso I, II e III categoricamente influenciarão positivamente na prática clínica dos médicos provenientes da Universidade Federal da Fronteira Sul. À parte das tecnicidades, é fundamental que o profissional da saúde assuma seu papel social, atuando como agente defensor e promotor da ciência.