



Faculdade de Medicina

**Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia**

Dissertação de Mestrado

**MUC1 e MUC4: Potencial Associação com Lesões Pré-
Neoplásicas em Mucosa Gástrica**

Donato Castro Pereira

Orientador: Professor Doutor Luiz Edmundo Mazzoleni

Porto Alegre

2019

Donato Castro Pereira

**MUC1 e MUC4: Potencial Associação com Lesões Pré-Neoplásicas em
Mucosa Gástrica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni

Colaboradores:

Daniel Simon

Tobias CancianMilbradt

TássiaRech

Débora DreherNabinger

Rafael TomoyaMichita

Porto Alegre

2019

Agradecimentos

Agradecimento especial a minha esposa Luciana Zollmann pelo apoio durante esta jornada; aos meus familiares que apesar de estarem distantes sempre torceram por mim; ao meu orientador Professor Luiz Edmundo Mazzoleni pelo conhecimento dividido; ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia pela oportunidade do curso; Daniel Simon e TássiaRech pelo conhecimento na genética; ao Tobias e Sacha pela ajuda e disponibilidade; a banca examinadora pela disponibilidade.

Sumário

1. RESUMO.....	6
2. ABSTRACT.....	7
3. APRESENTAÇÃO	9
4. LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
5. LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	11
6. INTRODUÇÃO	12
7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
7.1 Gastrite Crônica.....	14
7.2 Gastrite Atrófica	14
7.3 Metaplasia Intestinal da mucosa gástrica	15
7.4 Displasia.....	17
7.5 Adenocarcinoma Gástrico	17
7.6 Helicobacter pylori	19
7.7 Dispepsia Funcional.....	20
7.8 Mucinas	21
7.9 MUC1.....	22
7.10 MUC4.....	23
8. JUSTIFICATIVA.....	25
9. QUESTÕES DA PESQUISA.....	26
10. HIPÓTESE	26
11. OBJETIVOS.....	26
11.1 Principal.....	26
11.2 Secundários	26
12. BIBLIOGRAFIA	27
13. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	32

1. Resumo

O adenocarcinoma gástrico é a quarta neoplasia em frequência de diagnóstico e a segunda em mortes, apesar de suas taxas estarem diminuindo mundialmente. O desenvolvimento da maioria dos casos de câncer gástrico está relacionado como a progressão sequencial de gastrite superficial para gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e adenocarcinoma gástrico. Esta sequência da carcinogênese gástrica, também conhecida como a “Casca de Pelayo Correa” usualmente tem início com a infecção gástrica pelo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*).

O *H. pylori* é uma bactéria gram negativa em forma de espiral, que infecta a mucosa gástrica. Em 1994, essa bactéria foi reconhecida pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, como um agente cancerígeno de classe I (definido).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico ainda não estão totalmente esclarecidos, e é possível que fatores genéticos tenham importância no desenvolvimento dessa neoplasia maligna.

Mucinas são glicoproteínas que pertencem a uma família de elevado peso molecular, que têm sido associadas a cânceres de pâncreas, mama, ovário, cólon e próstata. A relação das mucinas com o desenvolvimento de câncer gástrico tem sido estudada, com resultados conflitantes.

Esse estudo tem como objetivo principal a avaliação de uma potencial associação entre MUC 1 e MUC 4 com o desenvolvimento de lesões pré neoplásicas (atrofia, metaplasia intestinal) na mucosa gástrica, em pacientes portadores do *H. pylori*.

2. Abstract

Introdução e objetivos: Adenocarcinoma gástrico é uma neoplasia de alta prevalência e com taxas significativas de mortalidade. Atrofia e metaplasia intestinal gástrica usualmente são etapas evolutivas no câncer gástrico. Fatores genéticos parecem participar na carcinogênese gástrica e foi observado que mucinas estavam expressas em algumas neoplasias, embora os resultados sejam conflitantes no adenocarcinoma gástrico. Vários marcadores têm sido testados para indicar qual paciente portador de atrofia ou metaplasia intestinal deva ser acompanhado com exames periódicos. O objetivo desse estudo foi avaliar a possível relação de polimorfismos das mucinas MUC1 e MUC4 com lesões pré-neoplásicas na mucosa gástrica.

População e métodos: Foram incluídos pacientes dispépticos funcionais com mais de 18 anos, positivos para a infecção pelo *H. pylori*. Os pacientes realizaram endoscopia digestiva alta com biópsias para avaliação histológica e pesquisa do *H. pylori* e foram divididos em pacientes com e sem metaplasia intestinal. Também foi avaliado um grupo de indivíduos sem queixas gastrointestinais (grupo controle). Foram analisados 3 subgrupos de pacientes: dispépticos sem atrofia nem metaplasia intestinal; com atrofia/metaplasia; e controles assintomáticos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foi utilizada para a determinação dos genótipos dos polimorfismos rs4072037 G/A do gene *MUC1* e rs863582 G/A do gene *MUC4* empregando sondas TaqMan alelo-específicas.

Resultado A amostra foi constituída por 197 pacientes com diagnóstico de dispepsia funcional, sendo composto por 162 mulheres, com idade média de $47,8 \pm 11,9$ anos, e 210 controles pareados por idade e sexo. A atrofia gástrica foi detectada em 41 (20,8%) pacientes, enquanto a metaplasia intestinal foi

observada em 39 (19,8%). Não foram observadas diferenças significativas nas frequências genotípicas dos polimorfismos dos genes MUC1 e MUC4 entre pacientes que apresentavam metaplasia intestinal e que não apresentavam. Resultados semelhantes foram observados com relação à atrofia gástrica. Com relação às frequências alélicas do polimorfismo rs4072037 G/A do gene MUC1, o alelo A apresentou frequência de 57,5% nos pacientes e 62,3% nos controles ($p=0,17$). No polimorfismo rs863582 do gene MUC4, o alelo A apresentou frequência significativamente maior nos pacientes (64,5%) do que nos controles (56,0%) ($p= 0,014$).

Conclusão: Polimorfismos dos genes MUC1 e MUC4 não foram associados à presença de atrofia gástrica ou de metaplasia intestinal em pacientes dispépticos funcionais. Estes marcadores, no nosso meio, não seriam úteis para rastreamento de pacientes com metaplasia intestinal gástrica, com o objetivo de prevenção do câncer gástrico. Em análise secundária foi observado que o polimorfismo rs863582 do gene MUC4, o alelo A apresentou frequência significativamente maior nos pacientes com dispepsia que nos controles.

Palavras chaves: *Helicobacter pylori*, dispepsia funcional, MUC1, MUC4, metaplasia intestinal gástrica.

3. Apresentação

A presente dissertação contém uma introdução com os principais tópicos que abordam gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia, adenocarcinoma gástrico, infecção pelo *Helicobacter pylori* e mucinas. Após, estão apresentadas a justificativa para esse estudo, seus objetivos e o artigo científico em inglês para ser submetido para publicação. O artigo contém Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão. Também são apresentadas a conclusão e as referências bibliográficas usadas nesse estudo.

4. Lista de abreviaturas

CG Câncer Gástrico

DF Dispepsia Funcional

FD *Functionaldyspepsia*

HCPA Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HEROES *Helicobacter Eradication Relief Of Dyspeptic Symptoms*

H. pyloriHelicobacterpylori

ICF *Informed Consent Form*

INCA Instituto Nacional de Câncer

MI Metaplasia Intestinal

MUC Mucina

OMS Organização Mundial da Saúde

PADYQ *Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire*

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

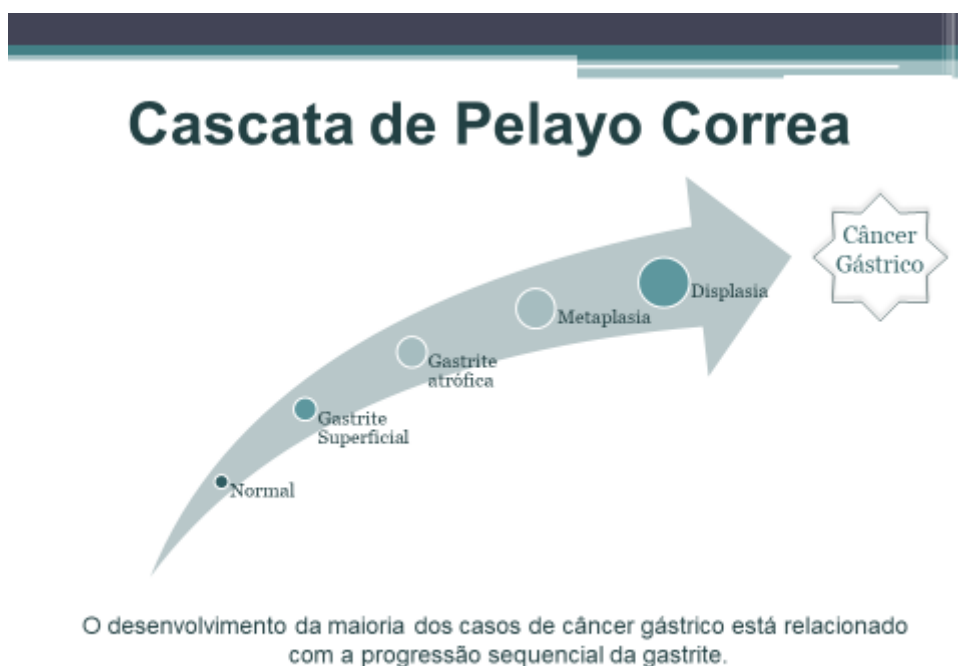
5. Lista de tabelas e figuras

Figura 1. Úlcera e Gastrite.....	15
Figura 2. Endoscopia evidenciando placas esbranquiçadas elevadas de aspecto metaplásico na mucosa gástrica do antro.....	19
Tabela 1. Características demográficas e clínicas de pacientes com dispepsia funcional e controles saudáveis.....	39
Tabela 2. Características demográficas e clínicas de pacientes e controles de acordo com a presença ou ausência de metaplasia intestinal.....	40
Tabela 3. Características demográficas e clínicas de pacientes e controles de acordo com a presença ou ausência de atrofia gástrica.....	41
Tabela 4. Características demográficas e clínicas de pacientes e controles de acordo com a presença ou ausência de atrofia gástrica.....	42
Tabela 5. Características basais de atrofia gástrica e metaplasia intestinal da mucosa gástrica de pacientes com dispepsia funcional positiva para infecção por <i>H. pylori</i> estratificada por genótipos dos polimorfismos MUC1 e MUC4.....	43
Tabela 6. Genótipo e frequências alélicas dos polimorfismos estudados em pacientes com DF e controles.....	44

6. Introdução

Adenocarcinoma gástrico é o quarto câncer mais diagnosticado e a segunda em causa de mortes por neoplasias malignas no mundo.¹ A infecção pelo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é um importante fator de risco para essa neoplasia.² Fatores ambientais e genéticos também podem ter participação no desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico.¹

O desenvolvimento da maioria dos casos de câncer gástrico está relacionado como a progressão sequencial de gastrite superficial para gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e adenocarcinoma gástrico. Esta sequência da carcinogênese gástrica, também conhecida como a “Casca de Pelayo Correa” usualmente tem início com a infecção gástrica pelo *H. pylori*.³



A gastrite atrófica é caracterizada pela perda de glândulas na mucosa gástrica⁴ e a metaplasia intestinal representa a substituição da mucosa gástrica normal por um epitélio semelhante a mucosa do intestino delgado com células absortivas, caliciformes e de Paneth. Esses processos usualmente são desencadeados pelo processo inflamatório crônico e persistente, causado pela infecção gástrica do *H. pylori*.⁵ Estudos têm avaliado potenciais marcadores para o rastreamento de pacientes com lesões pré-neoplásicas, com o objetivo de prevenção do câncer gástrico.

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) foi descoberto em 1983 e, em 1994, foi reconhecido pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, como agente cancerígeno de classe I (definido).^{6,7}

As mucinas (MUC) são glicoproteínas que pertencem a uma família de elevado peso molecular e são conhecidos 22 membros da família de proteínas da mucina. Alguns estudos descreveram a expressão da família das mucinas em câncer gástrico, mas com resultados conflitantes.⁸

O objetivo desse estudo foi avaliar a possível relação de polimorfismos das mucinas MUC1 e MUC4 com atrofia e metaplasia da mucosa gástrica, que são lesões precursoras do adenocarcinoma gástrico.

7. Revisão Bibliográfica

7.1 Gastrite Crônica

É uma condição inflamatória crônica da mucosa gástrica, sendo o *H. pylori* seu principal fator etiológico. As gastrites crônicas também podem estar associadas com dieta inadequada, tabagismo, alcoolismo, consumo de medicamentos, ingestão de substâncias corrosivas, estresse por traumas, procedimentos cirúrgicos, septicemia e insuficiência hepática.^{9,10}

A inflamação crônica pode danificar as células e desencadear um processo de carcinogênese através de múltiplas etapas evolutivas. Leucócitos de vários tipos, como neutrófilos, macrófagos, monócitos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos podem estar presentes em tecidos pré-malignos associados à inflamação crônica. Essas células inflamatórias contribuem para o início, promoção e até nas metástases das lesões malignas. O dano em componentes celulares resulta em aumento de mutações e alterações nas funções de importantes enzimas e proteínas de tecidos pré-malignos, contribuindo assim para o processo de carcinogênese.¹¹

A prevalência da infecção pelo *H. pylori*, que é o principal agente etiológico das gastrites crônicas, varia entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo significativamente menor nos primeiros. Diversos estudos sugerem que fatores genéticos têm menor influência nas taxas de infecção, do que fatores relacionados às condições de habitação e sócio econômicas.⁹

7.2 Gastrite Atrófica

Define-se a atrofia da mucosa gástrica pela perda de glândulas que leva a um adelgaçamento da mucosa. A perda glandular por morte celular pode seguir a erosões ou úlceras que destroem a camada glandular, ou resultante de um processo inflamatório crônico. A adição de metaplasia intestinal, especialmente na região antral, é um indicador da presença de atrofia. Atrofia e metaplasia intestinal estão associadas a um risco maior de câncer gástrico. Nem sempre a atrofia leva à metaplasia intestinal, pois no caso de atrofia da

gastrite autoimune a metaplasia existente no corpo é a metaplasia pseudopilórica.^{5,12}

Gastrite atrófica é mais prevalente em idosos, também está associada com a infecção do *H. pylori* e é caracterizada pela perda de glândulas na mucosa gástrica. Pode estar associada com hipo ou acloridria, e consequente comprometimento da absorção de minerais e vitaminas.¹³ Outra causa de atrofia da mucosa gástrica, não associada com a infecção do *H. pylori*, é a anemia perniciosa, uma doença autoimune que provoca atrofia severa do corpo gástrico (mucosa oxíntica). Deficiência de cobalamina (vitamina B12) costuma ser uma das manifestações em ambas as formas de gastrite atrófica, embora elas possam ser assintomáticas.⁴

Figura 1: Úlcera e Gastrite. Portal da Nutrição e Saúde



7.3 Metaplasia Intestinal da mucosa gástrica

É uma lesão pré-neoplásica associada ao risco de desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico. É caracterizada pela transformação de células epiteliais do estômago em um tipo de célula intestinal que está acompanhada pela expressão de genes específicos do intestino.¹⁴

As classificações usadas em metaplasia intestinal são quanto à morfologia, ao conteúdo de mucinas ou ao conteúdo de enzimas.¹⁵⁻¹⁶

Pela classificação morfológica da metaplasia intestinal na mucosa gástrica no início do processo metaplásico as células lembram células do intestino delgado com células colunares maduras, os enterócitos eosinofílicos, absorptivos e com a borda em escova bem desenvolvida. Alternando com estas células, em intervalos regulares, existem células caliciformes repletas de mucina. As criptas são retas e a arquitetura glandular está preservada, podendo ter a presença de células de Paneth, descritas na base das criptas de Lieberkühndo intestino delgado. Essa é a metaplasia do tipo completo. Com a evolução do processo, aparece a metaplasia tipo incompleta. As glândulas metaplásicas perdem o fenótipo de delgado e adquirem o quadro morfológico de estrutura enterocolônica e, posteriormente, de estrutura colônica sendo revestidas por células caliciformes de variados tamanhos e formas.⁵

A classificação de metaplasia intestinal pelo conteúdo em mucina divide as metaplasias em três tipos: tipo I, em que as células caliciformes secretam sialomucinas e que corresponde ao tipo completo; tipo II, em que algumas células caliciformes secretam sulfomucinas; e o tipo III, em que as células colunares secretam sulfomucinas.⁵

A classificação da metaplasia intestinal pelo conteúdo enzimático considera o tipo completo (tipo I), em que as células colunares secretam enzimas digestivas como sacarase, trealase e fosfatase alcalina, isto é, todo ou quase todo o conjunto de enzimas dos enterócitos. Com a evolução do processo, as células metaplásicas vão perdendo o fenótipo de delgado com alteração da produção enzimática, caracterizando os tipos incompletos, com redução (tipo IIa) ou ausência (tipo IIc) da secreção enzimática.⁵

Existe uma inter-relação entre essas classificações. Por exemplo, o tipo que lembra a glândula de intestino delgado é morfológicamente do tipo completo, enzimaticamente do tipo I e quanto ao conteúdo de mucinas também do tipo I. A importância dessas classificações se deve ao fato que os tipos incompletos, especialmente o tipo III, serem mais relacionados com o desenvolvimento do câncer gástrico.⁵

7.4 Displasia

A displasia gástrica é lesão pré-cancerosa e a penúltima etapa na carcinogênese gástrica, particularmente no adenocarcinoma tipo intestinal. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define displasia no sistema gastrointestinal como a presença de epitélio neoplásico histologicamente inequívoco, sem evidência de invasão tecidual. A displasia pode ser classificada como de baixo ou de alto grau.^{17,18} De acordo com o perfil histomorfológico, pode também ser classificada como adenomatoso tipo I (fenótipo intestinal) e foveolar ou pilórico tipo II (fenótipo gástrico).¹⁷

7.5 Adenocarcinoma Gástrico

É o quarto câncer mais diagnosticado e a segunda causa de mortes por neoplasias malignas no mundo.¹ Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) no Brasil ele aparece como terceiro lugar em incidência nos homens e o quinto nas mulheres, com maior prevalência em torno dos 70 anos. A estimativa de novos casos no Brasil, para 2018, é de 21.290, sendo 13.540 em homens e 7.750 em mulheres. No Rio Grande do Sul a taxa dessa neoplasia para homens é de 10,13/100.000 e para mulheres é de 4,05/100.000. Em 2016, no Brasil, essa doença causou 9.424 óbitos em homens e 5.226 em mulheres.¹⁹

O adenocarcinoma gástrico ocorre mais em países em desenvolvimento, sendo duas vezes mais frequente em homens do que em mulheres. Entre os homens, sua maior prevalência é em negros. Regiões com maior *status* socioeconômico, principalmente no mundo ocidental, têm menor prevalência de câncer gástrico (CG) e a incidência de novos casos vem diminuindo progressivamente.¹ É provável que a diminuição em países desenvolvidos se deva a menor prevalência do *H. pylori*, além da mudança do estilo de vida e da redução dos fatores de risco ambientais. Apesar disso, foram previstos para o ano de 2017, 28.000 novos casos com 10.960 mortes, nos Estados Unidos. Em lugares com menor nível de desenvolvimento socioeconômico a sua incidência continua alta.¹

A classificação histopatológica de Lauren divide o câncer gástrico no tipo intestinal, pela semelhança morfológica com os adenocarcinomas do trato intestinal, e no tipo difuso que é caracterizado pela falta de adesões intercelulares.³

Os fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico incluem o alto consumo de sal, dietas pobres em vitamina A e C, tabagismo, alimentos industrializados (salames, embutidos, presunto), falta de refrigeração dos alimentos e água potável contaminada. A infecção pelo *H. pylori* é um importante fator de risco para essa neoplasia e a sua prevalência mundial é de 20% - 80%.⁶ Indivíduos do grupo sanguíneo tipo "A" tem 20% mais chances de apresentarem câncer gástrico tipo difuso do que indivíduos dos grupos AB, B ou O. Anemia perniciosa é uma doença crônica autoimune que provoca severa gastrite atrófica e que aumenta em até seis vezes de risco de adenocarcinoma gástrico tipo intestinal. Fatores genéticos também podem ter participação no desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico.¹

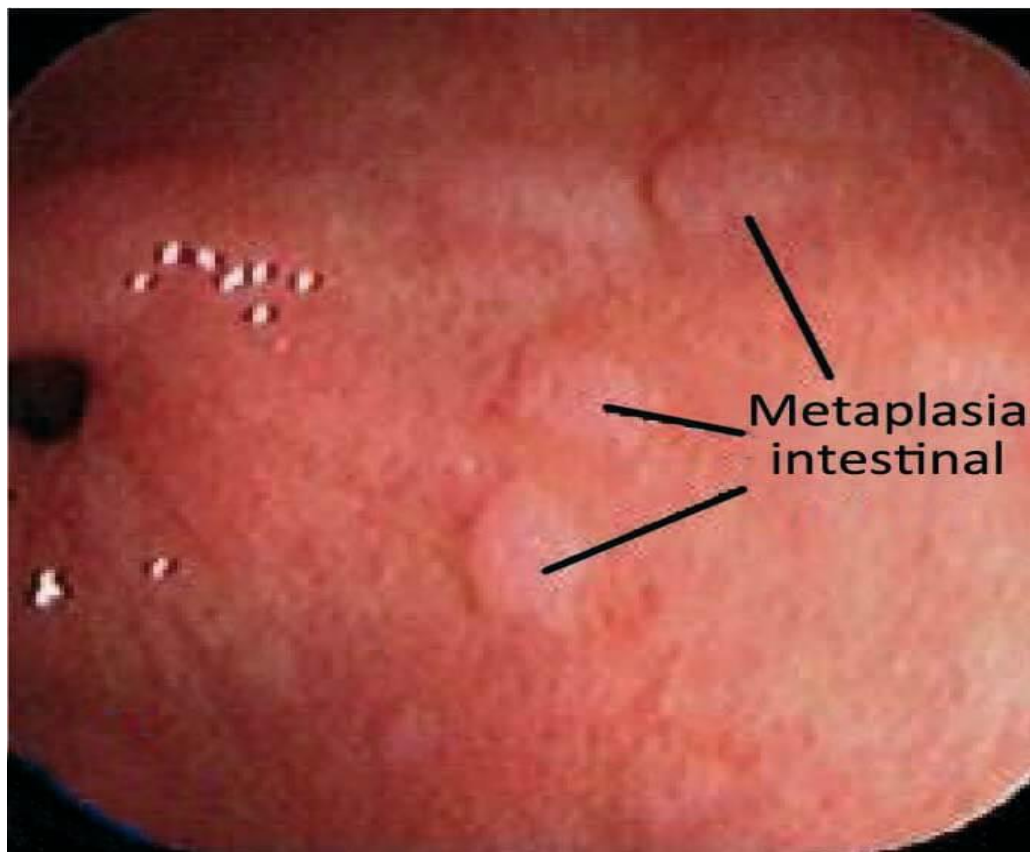
Alguns fatores são considerados como protetores contra o risco do câncer gástrico, como observado em indivíduos que tem alto consumo de frutas, fibras e vegetais. Apesar de poucos estudos, o consumo diário de vinho poderia ser um fator de proteção ao câncer gástrico, bem como o uso de aspirina e anti-inflamatórios não esteróides, que têm sido associados com menor risco de câncer da junção gastroesofágica e de outros tumores gastrointestinais.¹

O surgimento do adenocarcinoma gástrico geralmente está relacionado como a progressão sequencial de gastrite crônica superficial para gastrite atrófica, metaplasia intestinal (MI), displasia e adenocarcinoma. Esta sequência da carcinogênese gástrica, também chamada de "Cascata de Pelayo Correa" pode ser iniciada pela infecção do *H. pylori*. Portanto, gastrite atrófica e metaplasia intestinal são consideradas lesões precursoras do câncer gástrico, especialmente para o tipo intestinal. Ainda não foi definido porque apenas uma parcela dos indivíduos infectados pelo *H. pylori* irá evoluir para metaplasia intestinal, enquanto a maioria dos infectados apenas apresenta processo inflamatório crônico na mucosa gástrica, ao longo da vida. Além disso, somente

a minoria dos pacientes com metaplasia intestinal progredirá para neoplasia. Como já citado, a MI representa a substituição da mucosa gástrica normal por um epitélio semelhante a mucosa do intestino delgado com células absortivas, caliciformes e de Paneth e, este processo, é usualmente desencadeado pelo processo inflamatório crônico da infecção pelo *H. pylori*.³

O carcinoma gástrico também pode ser subdividido em carcinoma gástrico distal e carcinoma gástrico proximal, e segundo alguns estudos eles têm características epidemiológicas, biológicas e clínicas distintas.²⁰

Figura 2: Endoscopia evidenciando placas esbranquiçadas elevadas de aspecto metaplásico na mucosa gástrica do antro. Fonte: Gastrocentro



7.6 *Helicobacter pylori*

O *H. pylori* foi identificado em 1983 por Marshall e Warren. Em 2005 esses pesquisadores receberam o Prêmio Nobel de Medicina pela descoberta dessa bactéria. A infecção gástrica por essa bactéria afeta indivíduos de todas as idades e sua prevalência varia entre 20% - 80%.⁶ Se acredita que cerca de

50% da população mundial esteja contaminada com esse patógeno. A infecção pelo *H. pylori* é mais prevalente em países em desenvolvimento do que nos desenvolvidos, provavelmente pelas precárias condições sanitárias, culturais e socioeconômicas. Apesar da sua alta prevalência, produz doenças significativas apenas numa pequena parte da população infectada.⁶

O *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa em forma de espiral, resistente ao pH ácido do estômago e que provoca inflamação crônica no estômago (gastrite). Está associada a várias doenças tais como úlceras pépticas, adenocarcinoma gástrico e ao linfoma associado a mucosa gástrica (MALT).^{7,21}

Em 1994 o *H. pylori* foi reconhecido, pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, como um agente cancerígeno de classe I.⁷

7.7 Dispepsia Funcional

Essa pesquisa avaliou os polimorfismos de mucinas em população de indivíduos doadores de sangue assintomáticos e em população de pacientes portadores de dispepsia funcional.

O Consenso Roma III para distúrbios funcionais gastrointestinais²² define dispepsia funcional (DF) como a presença de sintomas que se presumem serem originados da região gastroduodenal na ausência de doença orgânica, sistêmica ou metabólica que os justifiquem. Para o diagnóstico dessa entidade, pelo menos um dos seguintes sintomas deverá estar presente: dor ou queimação epigástrica, plenitude pós-prandial e saciedade precoce. Os sintomas devem estar ativos nos últimos 3 meses, com início dos sintomas (primeira manifestação) pelo menos 6 meses antes do diagnóstico. Recentemente, o Consenso Roma IV reavaliou os critérios para definição de dispepsia funcional, e manteve praticamente inalterados os critérios estabelecidos pelo Consenso Roma III.²³

A etiologia da dispepsia funcional ainda é pouco compreendida. Alguns potenciais mecanismos fisiopatogênicos são: alterações na motilidade gástrica e duodenal (capacidade reduzida de acomodação gástrica, hipomotilidade antral), hipersensibilidade gástrica e duodenal, alterações no funcionamento do eixo “cérebro-intestino”, fatores genéticos e a infecção gástrica pelo *H. pylori*.²⁴

7.8 Mucinas

As mucinas (MUC) são glicoproteínas que pertencem a uma família de elevado peso molecular. São conhecidos 22 membros da família de proteínas da mucina, as quais são divididas em dois grupos: as secretadas em forma de gel para o meio extracelular (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC9 e MUC19) e as mucinas de membrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 e MUC21). Graças ao desenvolvimento da tecnologia de anticorpos monoclonais, entre os anos de 1970 e 1980, foi descoberto que as mucinas atuam como antígenos associados a tumores. Estas glicoproteínas oferecem proteção a agressões externas e lubrificam os órgãos onde se situam, conferindo propriedades visco elásticas à camada de muco secretado pelas glândulas submucosas.⁸

As mucinas que estão associadas à membrana são responsáveis pela manutenção da polaridade das células epiteliais e pela transdução de sinal por meio da interação de sua cauda sistólica com proteínas intracelulares. Já as mucinas secretadas tem como função principal a formação do muco que vai proteger os epitélios contra lesões relacionadas à inflamação e infecção.²⁵

O que define as propriedades bioquímicas das mucinas e as suas funções é a grande quantidade de prolina, treonina e serina, que fazem com que ocorra extensa glicosilação. Entre suas funções estão a de mediar a interação com agentes patogênicos, modular localmente a resposta inflamatória e atuar como receptores de superfícies para a ligação de várias moléculas de adesão.²⁵

Alguns estudos descreveram a expressão da família das mucinas em câncer gástrico, mas com resultados conflitantes.

Duarte et al. informa que estudos antigos mostraram resultados controversos mas nos seu estudo ele descreve que as mucinas tem um papel importante em vários aspectos das doenças gástricas sendo o principal a adesão ao *H. pylori* e na infecção crônica da mucosa gástrica.²⁵ Girdali et al. estudou alguns genes da família das mucinas mas também informou que existem estudos de associação de mucinas como o risco de infecção com *H pylori* e com CG mas com resultados conflitantes.²⁶ *MUC1* é expressa na

maioria dos adenocarcinomas, mas em tumores gástricos a sua expressão é pouco compreendida. *MUC4* já foi estudada em vários adenocarcinomas, principalmente de pulmão, mas em tumores gástricos também existem poucos estudos.²⁷⁻²⁸

7.9 MUC1

MUC1 é uma grande glicoproteína com peso molecular que varia de 120 a 225 kDa. O gene *MUC1* está localizado no cromossoma 1q21 e possui 8 éxons. As principais funções de *MUC1* são de lubrificação, hidratação das superfícies celulares, proteção contra microrganismos e enzimas degradativas, além de ser um inibidor eficaz das interações célula-célula e célula-matriz extracelular por impedimento estérico.^{8,29,30}

O gene *MUC1* é expresso na superfície apical dos epitélios mais simples, os quais incluem glândula mamária, pulmão, trato reprodutivo feminino, rim, pâncreas, vesícula biliar, estômago e algumas células não epiteliais.³⁰

A proteína *MUC1* está normalmente presente em abundância na superfície luminal de várias células epiteliais secretoras e está associada ao receptor do fator de crescimento epidérmico, a tirosina quinase, que está envolvida na sinalização celular. A expressão aumentada de *MUC1* é relatada em carcinoma mamário, pancreático, colorretal e pulmonar.^{8,31}

O polimorfismo *rs4072037*, do gene *MUC1*, está localizado no início do segundo éxon e consiste em uma transição de A para G. Esse polimorfismo está localizado em uma região de *splicing* alternativo, estando relacionado com diferenças na expressão *MUC1* em diferentes tecidos.³²

O risco de câncer gástrico (CG) associado a polimorfismos genéticos do gene codificador de mucinas foi investigado com resultados contraditórios. Uma meta análise de 10 estudos, retirados do MEDLINE, do *ISI Web of Science*, dos bancos bibliográficos *Scopus* e do banco de dados *HuGE Navigator*, sobre o polimorfismo *rs4072037* do gene *MUC1* e o risco de CG resultou num OR de 0,66 (IC 95%: 0,57-0,78) para o modelo dominante (AG/GG vs. AA). Ao ser separado por população um OR de 0,73 (IC 95%: 0,62-0,86) foi relacionado a

população asiática e a população branca ficou com um OR de 0,48(95% CI: 0,38-0,61) e eles confirmam que o polimorfismo *rs4072037* do *MUC1* protege o modelo dominante do risco de CG.²⁶

O estudo feito por Miao Li. et al, relatou que o polimorfismo *rs4072037* pode interagir com a infecção pelo *H. pylori*, aumentando o risco para desenvolvimento do câncer gástrico em pacientes chineses. Eles pesquisaram 355 pacientes com adenocarcinoma e 334 controles e o resultado foi de um risco mais elevado de CG foi para indivíduos de genótipos AA com polimorfismo *rs4072037* com OR de 3,95 (IC 95%: 2,29-6,79).³³

Hun Nanet *al* concluiu que o *rs4072037* do gene *MUC1* pode ser usado para identificar indivíduos em risco para câncer gástrico e que o alelo G predomina em populações de descendência europeia, enquanto o alelo A predomina em populações de descendência asiática oriental e informou que o alelo A eleva o risco comparado ao alelo G. Eles incluíram 3146 casos e relataram que o polimorfismo *rs4072037* estava associado ao câncer gástrico do tipo difuso, OR de 1,66 (IC 95%: 1,44-1,93) e ao tipo gástrico, OR 1,23 (IC 95%: 1,02-1,48).

7.10 MUC4

O gene *MUC4*, localizado no cromossomo 3q29, possui 25 éxons e codifica uma mucina de membrana com peso de 930 kDa.⁸ A proteína *MUC4* é composta por duas subunidades *MUC4α*, com peso molecular que varia de 500 à 850 kDa e *MUC4β*, com peso molecular de 80 a 90 kDa.^{34,35} A proteína *MUC4* é detectada em vários epitélios de tecidos em adultos e também em células no embrião e feto. Portanto, *MUC4* é expressa antes que células epiteliais respiratórias e digestivas tenham adquirido seu tecido e especificidade celular.³⁶

MUC4 está presente em tecidos epiteliais normais, incluindo estômago, cólon, colo do útero e pulmão, e também em várias neoplasias humanas. Ela está relacionada ao comportamento agressivo de tumores ou a uma má evolução do colangiocarcinoma, do carcinoma ductal invasivo do pâncreas, do carcinoma do ducto biliar extra-hepático e do adenocarcinoma pulmonar. Por

outro lado, a perda da expressão de *MUC4* está relacionada à baixa sobrevida no carcinoma mucoepidermóide da glândula salivar, no carcinoma espinocelular do sistema aero digestivo superior e no adenocarcinoma de pulmão.³⁶

O estudo feito por Hwang I *et al* avaliou a *MUC4* em câncer gástrico e chegou à conclusão que o nível da expressão de *MUC4* foi maior no tipo intestinal do que no difuso, mas não alcançou significância estatística, sugerindo que mais pesquisas são necessárias para avaliação desta expressão no CG. Neste estudo eles pesquisaram 365 indivíduos dos quais 34% estavam com o CG em estágio inicial e 66% em estágio avançado.³¹

MUC4 foi observado em lesão intravascular em animais infectados por *H. pylori* e também em metástase linfonodal no CG humano segundo estudo feito por Pinzon-Guzman *et al*.³⁷

Segundo Tamura *et al* não foi possível avaliar o *MUC4* no estágio inicial do CG, mas ele foi relacionado com fatores de pior prognóstico, como invasão linfática, invasão venosa e metástase linfonodal por meio de diferentes mecanismos. Neste estudo foram utilizados 104 pacientes com idade entre 39 a 92 anos sendo 60 homens e 40 mulheres.³⁸

A super expressão de *MUC4* interfere no tratamento do câncer porque ele diminui a ação do *Trastuzumab* que é utilizado no tratamento do câncer de mama também.⁵¹

O polimorfismo *rs863582*, do gene *MUC4*, consiste da transcrição T→C no *ítron* 21.²⁸ Esse polimorfismo foi estudado e associado ao câncer de pulmão segundo estudo caso-controle feito em 2013 em população chinesa. Neste estudo, 1.048 indivíduos com câncer de pulmão foram comparados com 1.048 indivíduos sem câncer e foi observada uma interação significativa associada ao risco de câncer de pulmão.²⁸

Pelos nossos conhecimentos, o polimorfismo *rs863582* ainda não foi estudado no câncer gástrico.

8. Justificativa

A importância do CG para a saúde pública e para a saúde individual é inquestionável. É uma neoplasia de alta prevalência, com taxas significativas de mortalidade. A única forma de tratar eficientemente essa doença é através do diagnóstico precoce, que raramente é obtido. Não está definido porque apenas uma parcela da população com fatores de risco, como a infecção pelo *H. pylori*, irá evoluir para atrofia e metaplasia intestinal, enquanto a maioria dos infectados apenas apresenta inflamação crônica da mucosa gástrica ao longo da vida. Ainda não existem esquemas adequados de vigilância que possam ser aplicados a todas as populações de risco. Atrofia e metaplasia intestinal da mucosa gástrica são reconhecidas como lesões precursoras (pré-neoplásicas) para o câncer gástrico e identificam um grupo de pacientes com risco aumentado de evoluírem para essa neoplasia. A detecção dessas lesões, no entanto, não tem conduzido a um cuidado maior, e não existem condutas bem estabelecidas para o acompanhamento de vigilância desses pacientes. Essa discrepância se deve ao fato de a metaplasia intestinal gástrica ser um achado frequente, da ordem de 20% em adultos dispépticos crônicos^{40,41} e o câncer gástrico ser um evento raro, sendo difícil recomendar o exame endoscópico de controle em todos estes pacientes com o objetivo de detectar neoplasia precoce.

Não está definido se características genéticas individuais têm participação nessa evolução pré neoplásica. A identificação de polimorfismos genéticos associados com o desenvolvimento de metaplasia intestinal poderá ser uma maneira de indicar um grupo de maior risco para o adenocarcinoma gástrico. Portanto, se polimorfismos da *MUC1* e *MUC4* forem associados com metaplasia intestinal da mucosa gástrica, assim como já foram associados com neoplasias de outros órgãos, a medicina poderá contar com esses marcadores genéticos, como preditores de maior risco para o câncer gástrico em pacientes com lesões pré neoplásicas na mucosa gástrica.

9. Questões da pesquisa

A atrofia e a metaplasia intestinal da mucosa gástrica, que são lesões precursoras do adenocarcinoma gástrico, estão associadas com polimorfismos das mucinas?

10. Hipótese

Pacientes infectados pelo *H. pylori* e portadores de atrofia e/ou metaplasia intestinal na mucosa gástrica apresentam frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos *MUC1* e *MUC4* diferentes de pacientes com infecção pela bactéria, mas sem atrofia/metaplasia intestinal.

11. Objetivos

11.1 Principal

Analisar as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos *MUC1 rs4072037* e *MUC4 rs863582* em indivíduos infectados pelo *H. pylori* sem metaplasia intestinal e comparar esses polimorfismos com pacientes também infectados pelo *H. pylori*, mas com metaplasia intestinal da mucosa gástrica.

11.2 Secundários

Comparar as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos *MUC1 rs4072037* e *MUC4 rs863582* de pacientes dispépticos funcionais com inflamação gástrica ou atrofia/metaplasia da mucosa gástrica, com a frequência desses marcadores em controles assintomáticos;

Avaliar se existe alguma correlação dos genótipos destes polimorfismos com dados clínicos e demográficos dos pacientes dispépticos funcionais.

12. Bibliografia

1. Recio-Boiles A, Babiker HM. Cancer, Gastric. In Treasure Island (FL); 2018.
2. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol*. United States; 2014 Sep;20(36):12847–59.
3. Correa P. Gastric cancer: overview. *Gastroenterol Clin North Am*. United States; 2013 Jun;42(2):211–7.
4. Kapadia CR. Gastricatrophy, metaplasia, and dysplasia: a clinical perspective. *J Clin Gastroenterol*. United States; 2003;36(5 Suppl):S29-36; discussion S61-2.
5. Gonzalez CA, Sanz-Anquela JM, Gisbert JP, Correa P. Utility of subtyping intestinal metaplasia as marker of gastric cancer risk. A review of the evidence. *Int J cancer*. United States; 2013 Sep;133(5):1023–32.
6. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol*. United States; 2014 Sep;20(36):12847–59.
7. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett*. Ireland; 2014 Apr;345(2):196–202.
8. Albrecht H, Carraway KL 3rd. MUC1 and MUC4: switching the emphasis from large to small. *Cancer Biother Radiopharm*. United States; 2011 Jun;26(3):261–71.
9. Ddine LC, Ddine CC, Rodrigues CCR, Kirsten VR, Colpo E. Factors associated with chronic gastritis in patients with presence and absence of *Helicobacter pylori*. *Arq Bras Cir Dig*. Brazil; 2012;25(2):96–100.
10. Du Y, Bai Y, Xie P, Fang J, Wang X, Hou X, et al. Chronic gastritis in China: a national multi-center survey. *BMC Gastroenterol*. England; 2014 Feb;14:21.
11. Park YH, Kim N. Review of atrophic gastritis and intestinal metaplasia as a premalignant lesion of gastric cancer. *J cancer Prev*. Korea (South); 2015 Mar;20(1):25–40.

12. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, et al. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney System. *Am J SurgPathol* 1996;20:1161-1181.
13. Kim HW, Kim Y-H, Han K, Nam GE, Kim GS, Han B-D, et al. Atrophic gastritis: a related factor for osteoporosis in elderly women. *PLoS One*. United States; 2014;9(7):e101852.
14. Fagoonee S, Li H, Zhang H, Altruda F, Pellicano R. Gastric cancer as a stem-cell disease: data and hypotheses. *Panminerva Med*. Italy; 2014;56(4):289–300
15. Jass JR, Filipe MI. The mucin profiles of normal gastric mucosa, intestinal metaplasia and its variants and gastric carcinoma. *Histochem J*. Netherlands; 1981 Nov;13(6):931–9.
16. Matsukura N, Suzuki K, Kawachi T, Aoyagi M, Sugimura T, Kitaoka H, et al. Distribution of marker enzymes and mucin in intestinal metaplasia in human stomach and relation to complete and incomplete types of intestinal metaplasia to minute gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. United States; 1980 Aug;65(2):231–40.
17. Valente P, Garrido M, Gullo I, Baldaia H, Marques M, Baldaque-Silva F, et al. Epithelial dysplasia of the stomach with gastric immunophenotype shows features of biological aggressiveness. *Gastric Cancer*. Japan; 2015 Oct;18(4):720–8
18. Sung JK. Diagnosis and management of gastric dysplasia. *Korean J Intern Med*. Korea (South); 2016 Mar;31(2):201–9.
19. Instituto Nacional de Câncer. Tipos de câncer.
20. Wu D-L, Yi H-X, Sui F-Y, Jiang X-H, Jiang X-M, Zhao Y-Y. Expression of ATP7B in human gastric cardiac carcinomas in comparison with distal gastric carcinomas. *World J Gastroenterol*. United States; 2006 Dec;12(47):7695–8.
21. Radic M. Role of *Helicobacter pylori* infection in autoimmune systemic rheumatic diseases. *World J Gastroenterol*. United States; 2014 Sep;20(36):12839–46.

22. Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, et al. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterology*. 2006 Apr;130(5):1466-79.
23. Stanghellini V, Talley NJ, Chan F, et al. Rome IV - Gastroduodenal Disorders. *Gastroenterology*. 2016;150(6):1380-1392. doi:10.1053/j.gastro.2016.02.011
24. Mimidis K, Tack J. Pathogenesis of dyspepsia. *DigDis*. 2008;26(3):194-202.
25. Duarte HO, Freitas D, Gomes C, Gomes J, Magalhaes A, Reis CA. Mucin-Type O-Glycosylation in Gastric Carcinogenesis. *Biomolecules*. Switzerland; 2016 Jul;6(3).
26. Girdali L, Michelazzo MB, Arzani D, Persiani R, Pastorino R, Boccia S. MUC1, MUC5AC, and MUC6 polymorphisms, *Helicobacter pylori* infection, and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. 2018 Jul;27(4):323-330
27. Saeki N, Sakamoto H, Yoshida T. Mucin 1 gene (MUC1) and gastric-cancer susceptibility. *Int J Mol Sci*. Switzerland; 2014 May;15(5):7958–73.
28. Zhang Z, Wang J, He J, Zheng Z, Zeng X, Zhang C, et al. Genetic variants in MUC4 gene are associated with lung cancer risk in a Chinese population. *PLoS One*. United States; 2013;8(10):e77723.
29. Wen R, Gao F, Zhou C-J, Jia Y-B. Polymorphisms in mucin genes in the development of gastric cancer. *World J Gastrointest Oncol*. China; 2015 Nov;7(11):328–37.
30. Brayman M, Thathiah A, Carson DD. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol*. England; 2004 Jan;2:4.
31. Hwang I, Kang YN, Kim JY, DO YR, Song HS, Park KU. Prognostic significance of membrane-associated mucins 1 and 4 in gastric adenocarcinoma. *Exp Ther Med*. Greece; 2012 Aug;4(2):311–6.
32. Ng W, Loh AXW, Teixeira AS, Pereira SP, Swallow DM. Genetic regulation of MUC1 alternative splicing in human tissues. *Br J Cancer*. England; 2008 Sep;99(6):978–85.

33. Li M, Huang L, Qiu H, Fu Q, Li W, Yu Q, et al. Helicobacter pylori infection synergizes with three inflammation-related genetic variants in the GWASs to increase risk of gastric cancer in a Chinese population. PLoS One. United States; 2013;8(9):e74976.
34. Workman HC, Miller JK, Ingalla EQ, Kaur RP, Yamamoto DI, Beckett LA, et al. The membrane mucin MUC4 is elevated in breast tumor lymph node metastases relative to matched primary tumors and confers aggressive properties to breast cancer cells. Breast Cancer Res. England; 2009;11(5):R70.
35. Xia P, Choi AH, Deng Z, Yang Y, Zhao J, Wang Y, et al. Cell membrane-anchored MUC4 promotes tumorigenicity in epithelial carcinomas. Oncotarget. United States; 2017 Feb;8(8):14147–57.
36. Moniaux N, Nollet S, Porchet N, Degand P, Laine A, Aubert JP. Complete sequence of the human mucin MUC4: a putative cell membrane-associated mucin. Biochem J. England; 1999 Mar;338 (Pt 2):325–33.
37. Pinzon-Guzman C, Meyer AR, Wise R, Choi E, Muthupalani S, Wang TC, Fox JG, Goldenring JR Evaluation of Lineage Changes in the Gastric Mucosa Following Infection With Helicobacter pylori and Specified Intestinal Flora in INS-GAS Mice. 2018 Jul 1:22155418785621.
38. Tamura Y, Higashi M, Kitamoto S, Yokoyama S, Osako M, Horinouchi M, Shimizu T, Tabata M, Batra SK, Goto M, Yonezawa S. MUC4 and MUC1 expression in adenocarcinoma of the stomach correlates with vessel invasion and lymph node metastasis: an immunohistochemical study of early gastric cancer. 2012;7(11):e49251.
39. Shi M, Yang Z, Hu M, Liu D, Hu Y, Qian L, Zhang W, Chen H, Guo L, Yu M, Song L, Ma Y, Guo N. Catecholamine-Induced β 2-adrenergic receptor activation mediates desensitization of gastric cancer cells to trastuzumab by upregulating MUC4 expression. 2013 Jun 1;190(11):5600-8.
40. Eriksson NK, Kärkkäinen PA, Färkkilä MA, Arkkila PE. Prevalence and distribution of gastric intestinal metaplasia and its subtypes. Dig Liv Dis 2008; 40:355-360.

41. Petersson F, Borch K, Franzén LE. Prevalence of subtypes of intestinal metaplasia in the general population and in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:262-266,

13. Artigo para publicação

MUC1 and MUC4: Potential Association with Pre-Neoplastic Lesions in Gastric Mucosa

Autores

Donato Castro Pereira; Luiz Edmundo Mazzoleni; Felipe Mazzoleni; Tobias CancianMilbradt; Sacha Allebrandt da Silva Ries; Camila Ferraz; Débora DreherNabinger; Rafael TomoyaMichita; Tássia Flores Rech; Daniel Simon

ABSTRACT

Introduction and Objectives: Gastric adenocarcinoma is a high-prevalence cancer with significant mortality rates. Gastric atrophy and intestinal metaplasia are usually evolutionary stages in gastric cancer. Genetic factors seem to participate in gastric carcinogenesis and it was observed that mucins were expressed in some neoplasms, although the results are conflicting in gastric adenocarcinoma. Several markers have been tested to indicate which patient with intestinal atrophy or metaplasia should be followed with periodic examinations. The aim of this study was to evaluate the possible relationship of mucin gene polymorphisms (*MUC1* and *MUC4* genes) with pre-neoplastic lesions in the gastric mucosa.

Population and methods: Functional dyspeptic patients older than 18 years, positive for *H. pylori* infection, were included. The patients underwent upper digestive endoscopy with biopsies for histological evaluation and *H. pylori* detection and were divided into patients with and without intestinal metaplasia. A control group without gastrointestinal complaints was also evaluated. Three subgroups of patients were analyzed: dyspeptics without atrophy or intestinal metaplasia, dyspeptics with atrophy or metaplasia, and asymptomatic controls. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to determine the *MUC1* rs4072037 G/A gene and *MUC4* rs863582 G/A gene genotypes using TaqMan allele-specific probes.

Results: The sample consisted of 197 patients diagnosed with functional dyspepsia, 162 women, mean age 47.8 ± 11.9 years, and 210 controls matched by age and sex. Gastric atrophy was detected in 41 (20.8%) patients, while intestinal metaplasia was observed in 39 (19.8%). No significant differences were observed in the genotype frequencies of the *MUC1* and *MUC4* gene polymorphisms among patients who had intestinal metaplasia and who did not. Similar results were observed in relation to gastric atrophy. Regarding the allele frequencies of the *rs4072037* G/A polymorphism of the *MUC1* gene, the A allele had a frequency of 57.5% in the patients and 62.3% in the controls ($p = 0.170$). In the polymorphism *rs863582* of the *MUC4* gene, the allele A presented significantly higher frequency in the patients (64.5%) than in the controls (56.0%) ($p = 0.014$).

Conclusions: Polymorphisms of the *MUC1* and *MUC4* genes were not associated with the presence of gastric atrophy or intestinal metaplasia in functional dyspeptic patients. These markers, in our country, would not be useful for screening patients with gastric intestinal metaplasia for the purpose of preventing gastric cancer. In a secondary analysis, it was observed that the *rs863582* polymorphism of the *MUC4* gene, the allele A presented significantly higher frequency in patients than in controls.

Key words: *Helicobacter pylori*, functional dyspepsia, *MUC1*, *MUC4*, intestinal metaplasia.

INTRODUCTION

Gastric adenocarcinoma is the fourth most diagnosed cancer and the second leading cause of malignant cancer deaths in the world. *Helicobacter pylori* infection is an important risk factor for this neoplasm. Environmental and genetic factors may also play a role in the development of gastric adenocarcinoma.¹ Gastric adenocarcinoma is usually related to a sequential progression of superficial gastritis to atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia and adenocarcinoma. This sequence of gastric carcinogenesis, also known as the “Pelayo Correa Waterfall” usually begins with gastric infection by *H. pylori*.²

Atrophic gastritis is characterized by loss of glands in the gastric mucosa³ and intestinal metaplasia represents the replacement of the normal gastric mucosa with a small intestinal mucosa-like epithelium with absorptive, goblet and Paneth cells. These processes are usually triggered by the chronic and persistent inflammatory process caused by *H. pylori* gastric infection.⁴ Studies have evaluated potential markers for the screening of patients with preneoplastic lesions with the aim of preventing gastric cancer.

H. pylori was discovered in 1983 and, in 1994, was recognized by the International Agency for Research on Cancer as a Class I (defined) carcinogen.^{5,6}

Functional dyspepsia (FD) is defined as the presence of symptoms that are presumed to originate from the gastroduodenal region in the absence of justifiable organic, systemic or metabolic disease.⁷

Mucins (MUC) are glycoproteins belonging to a high molecular weight family and 22 members of the mucin protein family are known. Some studies have described mucin family expression in gastric cancer, but with conflicting results.^{8,9}

The aim of this study was to evaluate the possible relationship of mucin gene polymorphisms (*MUC1* and *MUC4* genes) with gastric mucosa atrophy and metaplasia, which are precursor lesions of gastric adenocarcinoma.

Methods

Study Design

Genetic association study conducted at the Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil, with molecular analyzes performed at the Laboratory of Human Molecular Genetics at the Lutheran University of Brazil (ULBRA), Canoas, Brazil.

Population

The study population consisted of three groups: Group 1 - functional dyspeptic *H. pylori* positive patients without gastric atrophy or intestinal metaplasia; Group 2 - functional dyspeptic *H. pylori* positive patients with gastric

atrophy or intestinal metaplasia; and Group 3 - asymptomatic blood donors (controls).

Group 1 and Group 2 patients were diagnosed with functional dyspepsia according to the Rome III⁷ Consensus criteria, and were included subjects of both sexes, older than 18 years and *H. pylori* positive. This study was nested in the "HEROES Trial" (Helicobacter Eradication Relief Of Dyspeptic Symptoms) database, registered in the HCPA Research and Graduate Group (GPPG / HCPA) under number 05-422 and registered at ClinicalTrials.gov (<http://clinicaltrials.gov/>) under the number 00404534. The HEROES trial was a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial aimed at analyzing the effects of *H. pylori* eradication in patients with FD. All patients participating in the present study signed an informed consent form (GPPG / HCPA: 05-422), authorizing the collection of blood samples for DNA extraction. Individuals in the control group signed the study's Informed Consent Form (ICF), approved by GPPG / HCPA (project 10-0473).

Exclusion criteria were: patients with symptoms suggestive of gastroesophageal reflux disease, who presented with heartburn or regurgitation as the only or major symptoms; exclusive symptoms of irritable bowel syndrome; previous history of peptic ulcer disease; clinical manifestations of organic diseases ("warning signs"): anorexia, anemia, dysphagia, digestive bleeding, weight loss greater than 10% of body weight and abnormal physical examination suggestive of organic diseases; a clinical picture suggestive of symptomatic biliary lithiasis; previous high endoscopic investigation with organic alterations; past gastrointestinal surgery; previous treatment for *H. pylori*; presence of significant comorbidities (hepatopathies, heart diseases, nephropathies and neuropathies); prior diagnosis of systemic diseases or use of medications that are known to interfere with the motility or sensitivity of the upper gastrointestinal tract; gestation or women of child-bearing age who do not use safe contraceptive methods; reduced intellectual level that would not allow adequate understanding of the objectives of the study, not acceptance in participating in the study and / or signing the Informed Consent Form.

The inclusion criteria for individuals in Group 3 (controls) were: individuals of both sexes, over 18 years old, blood donors at HCPA blood bank

and who did not present digestive complaints. All the patients in the control group signed the ICF, authorizing their participation in the study. We evaluated 210 individuals in the control group, who signed the ICF from another study approved by GPPG / HCPA (project 10-0473).

Study procedures in Groups 1 and 2

Patients who met the inclusion criteria and did not present exclusion criteria were referred for laboratory tests and endoscopic examination.

Endoscopies were performed at the HCPA. Endoscopic findings were classified according to the Sydney System.¹⁰ Gastric biopsies were obtained and evaluated (Giemsa and hematoxylin-eosin) by two pathologists who were unaware of patient data. The severity of histologic gastritis were graded according to the Houston System updated by Houston.¹¹ The status of *H. pylori* was defined when and rapid urease test and the histological results were either negative or both positive. In case of disagreement, a third pathologist was consulted.

Blood samples were collected for DNA extraction. The Institutional Review Board approved this procedure and all patients signed the Informed Consent Form. Molecular analyzes of 197 patients with functional dyspepsia were performed.

The severity of the dyspeptic symptoms was evaluated by the PADYQ questionnaire (Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire).¹² This 11-item validated instrument evaluates the three most important symptoms of functional dyspepsia (upper abdominal pain, abdominal distension and early satiety) and also nausea and vomiting in the previous 30 days. This procedure allows assessing the severity of each symptom through its frequency, intensity and duration. In this questionnaire, the severity of symptoms varies from 0 (absence of symptoms) to 44 (severe symptoms) points, and subjects with more than 7 points are considered dyspeptic.

DNA extraction

DNA was removed from peripheral whole blood samples by the method described by Lahiri and Numberger (1991), and stored at -20 ° C.

Molecular Analyzes

The real-time polymerase chain reaction (PCR) was used for the determination of genotypes of the *MUC1* gene *rs4072037* G/A and *rs863582* G/A gene of the *MUC4* gene using TaqMan allele-specific probes.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean and standard deviation or median and interquartile deviation, and comparison between groups was analyzed by Student's t-test or Mann-Whitney U-test for independent samples. Qualitative variables were expressed as frequencies and percentages and comparisons between groups were performed using Fisher's exact test or chi-square test as indicated. The observed genotype frequencies were compared with those expected by Hardy-Weinberg equilibrium using the chi-square test. All tests were two-tailed. $P < 0.05$ will be considered statistically significant. Multivariate analyzes were obtained with logistic regression.

Ethical Considerations

The present study is nested in the HEROES study approved at the GPPG of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (no. 05-422), for which all the patients signed the ICF, in which patients authorized the use of data in future research.

The project was developed in accordance with Resolution 466/12 of the National Health Council that guides the ethical aspects of human research in Brazil. It will be initiated after the approval of the Research Ethics Committee of the HCPA.

We use the term of data confidentiality, where the researchers guarantee to analyze and present the data in aggregate form, in order to guarantee the confidentiality of the individual information, guaranteeing the privacy and the anonymity of the linked information of the research participants.

Resource Sources

The project costs were covered by research funding from the Research and Events Incentive Fund (FIPE).

Results

The sample consisted of 197 patients with functional dyspepsia (82.2% women, 47.8 ± 11.9 years) and 210 matched controls by age and sex (83.3% women, 47.1 ± 11.1 years) (Table 1). There was no significant difference in race between the group of patients vs controls.

In the group of dyspeptic patients, 65.5% (129/197) presented neither atrophy nor gastric metaplasia. Gastric atrophy was detected in 20.8% (41/197), while intestinal metaplasia was observed in 19.8% (39/197). A total of 34.5% (68/197) of the patients had intestinal atrophy and / or metaplasia.

Table 2 presents the clinical characteristics of patients and controls according to the presence or absence of intestinal metaplasia. Patients who consumed coffee had a significantly higher prevalence of intestinal metaplasia in the gastric mucosa. Table 3 shows the characteristics of the sample according to atrophy of the gastric mucosa and no differences were observed between the groups with and without atrophy. Table 4 shows that coffee use and smoking were risk factors for atrophy and / or metaplasia.

No significant differences were observed in the genotypic frequencies of the *MUC1* and *MUC4* gene polymorphisms among patients who did not present intestinal metaplasia. Similar results were observed in relation to gastric atrophy (Table 5).

Regarding the allelic frequencies of the *rs4072037* G/A polymorphism of the *MUC1* gene, the A allele had a frequency of 57.5% in the patients and 62.3% in the controls ($p = 0.170$). In the *rs863582* polymorphism of the *MUC4* gene, the A allele had a significantly higher frequency in the patients (64.5%) than in the controls (56.0%) ($p = 0.014$) (Table 6).

Table 1. Demographic and clinical features of functional dyspepsia patients and healthy controls.

Variable	Patients (n=197)	Controls (n=210)
Age, mean \pm SD (years)	47.8 \pm 11.9	47.1 \pm 11.1
Gender		
<i>Female</i>	162 (82.2)	175 (83.3)
<i>Male</i>	35 (17.8)	35 (16.7)
Race (white)	167 (84.8)	159 (77.6)§
Dyspepsia subtypes		
<i>Epigastric syndrome pain</i>	92 (46.7)	N/A*
<i>Postprandial distress syndrome</i>	105 (53.3)	N/A*
Duration of dyspepsia > 5 years	94 (47.7)	N/A*
Coffee drinker	131 (66.5)	N/A*
Smoking status		
<i>Never</i>	112 (56.9)	N/A*
<i>Current/Former</i>	85 (43.1)	N/A*
Alcohol intake		
<i>Never</i>	170 (86.3)	N/A*
<i>Current/Former</i>	37 (13.7)	N/A*

§missing n=5; *N/A Not applicable

Table 2. Demographic and clinical features of patients and controls according to presence or absence of intestinal metaplasia.

Variable	Intestinal metaplasia		P
	Absent (n=158)	Present (n=39)	
Age, mean \pm SD (years)	47.0 \pm 11.9	50.8 \pm 11.6	0.078
Gender			0.333
<i>Female</i>	132 (83.5)	30 (76.0)	
<i>Male</i>	26 (16.5)	9 (23.1)	
Race (white)	135 (85.4)	32 (82.1)	0.598
Dyspepsia subtypes			0.522
<i>Epigastric syndrome pain</i>	72 (45.6)	20 (51.3)	
<i>Postprandial distress syndrome</i>	86 (54.4)	19 (48.7)	
Duration of dyspepsia > 5 years	73 (46.2)	21 (53.8)	0.392
Coffee drinker	99 (62.7)	32 (82.1)	0.022
Smoking status			0.062
<i>Never</i>	95 (60.1)	17 (43.6)	
<i>Current/Former</i>	63 (39.9)	22 (56.4)	
Alcohol intake			0.734
<i>Never</i>	137 (86.7)	33 (84.6)	
<i>Current/Former</i>	21 (13.3)	6 (15.4)	

Table 3. Demographic and clinical features of patients and controls according to presence or absence of gastric atrophy.

Variable	Gastric	Atrophy	P
	Absent (n=156)	Present (n=41)	
Age, mean \pm SD (years)	47.9 \pm 11.9	47.5 \pm 12.3	0.825
Gender			0.555
<i>Female</i>	127 (81.4)	35 (85.4)	
<i>Male</i>	29 (18.6)	6 (14.6)	
Race (white)	129 (82.7)	38 (92.7)	0.113
Dyspepsia subtypes			0.515
<i>Epigastric syndrome pain</i>	71 (45.5)	21 (51.2)	
<i>Postprandial distress syndrome</i>	85 (54.5)	20 (48.8)	
Duration of dyspepsia > 5 years	74 (47.4)	20 (48.8)	0.878
Coffee drinker	101 (64.7)	30 (73.2)	0.309
Smoking status			0.127
<i>Never</i>	93 (59.6)	19 (46.3)	
<i>Current/Former</i>	63 (40.4)	22 (53.7)	
Alcohol intake			0.846
<i>Never</i>	135 (86.5)	35 (85.4)	
<i>Current/Former</i>	21 (13.5)	6 (14.6)	

Table 4. Demographic and clinical features of patients and controls according to presence or absence of histologic alteration in the stomach (gastric atrophy and/or intestinal metaplasia).

	Stomach alteration		P
Variable	Absent (n=129)	Present (n=68)	P
Age, mean \pm SD (years)	47.1 \pm 12.1	49.1 \pm 11.6	0.187
Gender			0.975
<i>Female</i>	106 (82.2)	56 (82.4)	
<i>Male</i>	23 (17.8)	12 (17.6)	
Race (white)	108(83.7)	59 (86.8)	0.572
Dyspepsia subtypes			0.330
<i>Epigastric syndrome pain</i>	57 (44.2)	35 (51.5)	
<i>Postprandial distress syndrome</i>	72 (55.8)	33 (48.5)	
Duration of dyspepsia > 5 years	59 (45.7)	35 (51.5)	0.444
Coffee drinker	77 (59.7)	54 (79.4)	0.005
Smoking status			0.020
<i>Never</i>	81 (62.8)	31 (45.6)	
<i>Current/Former</i>	48 (37.2)	37 (54.4)	
Alcohol intake			0.767
<i>Never</i>	112 (86.8)	58 (85.3)	
<i>Current/Former</i>	17 (13.2)	10 (14.7)	

Table 5. Baseline features of gastric atrophy and intestinal metaplasia of the gastric mucosa of patients with functional dyspepsia and positive for *H. pylori* infection stratified by genotypes of the *MUC1* and *MUC4* polymorphisms.

*Considering presence of gastric atrophy/intestinal metaplasia in the corpus, incisura or antrum of the stomach.

Location	<i>MUC1</i>			P	<i>MUC4</i>			P
	GG	GA	AA		AA	AG	GG	
Corpus								
GastricAtrophy				0.912				0.359
Presence	1 (2.8)	2 (2.2)	1 (1.5)		3 (3.7)	1 (1.1)	-	
Absence	35 (97.2)	90 (7.8)	64 (98.5)		78 (96.3)	91 (98.9)	24 (100)	
Intestinal Metaplasia				0.681				0.642
Presence	1(2.8)	2 (2.2)	3 (4.6)		3 (3.7)	3 (3.3)	-	
Absence	35(97.2)	90 (97.8)	61 (95.4)		78 (96.3)	89 (96.7)	24 (100)	
Incisura								
GastricAtrophy				0.165				0.453
Presence	3 (8.3)	3 (3.3)	7 (10.8)		5 (6.2)	5 (5.4)	3 (12.5)	
Absence	33 (91.7)	89 (96.7)	58 (89.2)		76 (93.8)	87 (94.6)	21 (87.5)	
Intestinal Metaplasia				0.649				0.843
Presence	2 (5.6)	10 (10.9)	6 (9.2)		9 (11.1)	8 (8.7)	2 (8.3)	
Absence	34 (94.4)	82 (89.1)	59 (90.8)		72 (88.9)	84 (91.3)	22 (91.7)	
Antrum								
GastricAtrophy				0.565				0.852
Presence	5 (13.9)	15 (16.3)	14 (21.5)		15 (18.5)	15 (16.3)	5 (20.8)	
Absence	31 (86.1)	77 (83.7)	51 (78.5)		66 (81.5)	77 (83.7)	19 (79.2)	
Intestinal Metaplasia				0.548				0.602
Presence	5 (13.9)	10 (10.9)	11 (16.9)		9 (11.1)	15 (16.3)	3 (12.5)	
Absence	31 (86.1)	82 (89.1)	54 (83.1)		72 (88.9)	77 (83.7)	21 (87.5)	
Stomach								
GastricAtrophy				0.927				0.498
Presence	8 (22.2)	18 (19.6)	14 (21.5)		20 (24.7)	16 (17.4)	5 (20.8)	
Absence	28 (77.8)	74 (80.4)	51 (78.5)		61 (75.3)	76 (82.6)	19 (79.2)	
Intestinal Metaplasia				0,538				0.909
Presence	5 (13.9)	18 (19.6)	15 (23.1)		16 (80.2)	19 (20.7)	4 (16.7)	
Absence	31 (86.1)	74 (80.4)	50 (76.9)		65 (80.2)	73 (79.3)	20 (83.3)	

Table 6. Genotype and allele frequencies of the polymorphisms studied in FD patients and controls.

	Patients	Controls	P
<i>MUC1</i> rs4072037	n=193	n=208	
Genotypes			0.330
GG	36 (18.6)	34 (16.3)	
GA	92 (47.7)	89 (42.8)	
AA	65 (33.7)	85 (40.9)	
Alleles			0.170
G	164 (42.5)	157 (37.7)	
A	222 (57.5)	259 (62.3)	
<i>MUC4</i> rs863582	n=197	n=209	
Genotypes			0.045
AA	81 (41.1)	67 (32.1)	
AG	92 (46.7)	100 (47.8)	
GG	24 (12.2)	42 (20.1)	
Alleles			0.014
A	254 (64.5)	234 (56.0)	
G	140 (35.5)	184 (44.0)	

Discussion

Our results showed a relatively low prevalence, compared to literature data, of gastric atrophy and gastric intestinal metaplasia in this homogeneous population of patients with functional dyspepsia. No significant differences were observed in the genotypic frequencies of *MUC1* and *MUC4* gene polymorphisms between patients presenting with gastric atrophy or intestinal metaplasia and those who did not present these alterations. However, in the *rs863582* polymorphism of the *MUC4* gene, the A allele showed a significantly higher frequency in functional dyspeptic patients than in the asymptomatic controls.

In our study, endoscopy in the entire patient population of our study can confirm the diagnosis of functional dyspepsia, excluding other organic diseases as the cause of dyspeptic symptoms. The definition of atrophy and intestinal metaplasia of the gastric mucosa was established by histological examination of multiple fragments of the gastric mucosa that were evaluated by two trained pathologists and, in case of disagreement among the findings, another pathologist was consulted. The positivity of *H. pylori* was determined by two diagnostic methods, which is the orientation of the literature for the diagnosis of this infection. The extraction and analysis of the genetic material followed all the protocols to check reliability in the results. The group of asymptomatic blood donors was obtained to allow adequate pairing with dyspeptic patients.

Our prevalence data for intestinal metaplasia are comparable to the literature, but they are in the lower range, indicating a lower prevalence for metaplasia in our population of patients with functional dyspepsia. Finnish study found a prevalence of intestinal metaplasia of 19% in a population of 505 patients.¹³ Petersson and collaborators found a prevalence of 23% of intestinal metaplasia¹⁴ and in others the prevalence ranged from 15 to 35%, with a higher incidence in *H. pylori* positive patients.^{15,16}

The prevalence of intestinal metaplasia in our study is similar to that in countries with low gastric cancer rates.¹⁷ Our prevalence is lower than the prevalence of intestinal metaplasia (59.6%) in populations at high risk of gastric cancer, as in Nariño in Colombia. However, populations in Colombia with low

risk of gastric cancer, such as those on the Colombian coast, have a prevalence of MIG of only 12.9%.¹⁸

Although many authors agree that atrophy and intestinal metaplasia in the gastric mucosa should be considered pre-neoplastic lesions, these lesions are unlikely to develop into gastric neoplasia, and it is unnecessary to follow all cases of gastric atrophy and metaplasia. It would therefore be important to find a marker to separate cases of metaplasia with higher or lower risk of malignant progression.

Some articles led us to choose MUC1 and MUC4 polymorphisms as potential markers of pre-neoplastic lesions for our study. A meta-analysis of 10 studies, taken from MEDLINE, ISI Web of Science, Scopus bibliographic databases and the HuGE Navigator database, on the *rs4072037* polymorphism of the *MUC1* gene and GC risk resulted in an OR of 0.66 (95 %: 0.57-0.78) for the dominant model (AG / GG vs. AA). When the population was separated by an OR of 0.73 (95% CI: 0.62-0.86) the Asian population was related and the white population had an OR of 0.48 (95% CI: 0.38- 0.61) and they confirm that the polymorphism *rs4072037* of *MUC1* protects the dominant model of the risk of CG.⁹

The study by Miao Li et al. reported that the *rs4072037* polymorphism may interact with *H. pylori* infection, increasing the risk for gastric cancer development in Chinese patients. They investigated 355 patients with adenocarcinoma and 334 controls and observed a higher risk of GC for individuals carrying AA genotypes of the *rs4072037* polymorphism (OR= 3.95; 95% CI: 2.29-6.79).¹⁹

Hun Nan et al. concluded that *rs4072037* of the *MUC1* gene can be used to identify individuals at risk for gastric cancer and that the G allele predominates in populations of European descent, while the A allele predominates in populations of eastern Asian descent and reported that the allele A increases the risk compared to the G allele. They included 3146 cases and reported that polymorphisms *rs4072037* were associated with gastric diffuse-type cancer, OR of 1.66 (95% CI: 1.44-1.93) and type gastric cancer, OR 1.23 (95% CI: 1.02-1.48). Because they did not have diffuse versus gastric

type gastric cancer information they investigated the association by Lauren's classification.²⁰

The study by Hwang I et al concluded that the level of *MUC4* expression was higher in the intestinal than in the diffuse type, but did not reach statistical significance suggesting that more research is needed to evaluate this expression in CG. In this study they investigated 365 individuals, of which 34% were with early-stage CG and 66% were advanced.²¹

MUC4 was observed in intramuscular injury in *H. pylori*-infected animals and also in lymph node metastasis in human gastric cancer according to a study by Pinzon-Guzman et al.²²

According to Tamura et al it was not possible to evaluate *MUC 4* in the initial stage of gastric cancer but it was related to factors of worse prognosis, such as lymphatic invasion, venous invasion and lymph node metastasis through different mechanisms. In this study, 104 patients aged 39 to 92 years were used, 60 men and 40 women.²³

The overexpression of *MUC 4* interferes with the treatment of cancer because it decreases the action of Trastuzumab, which is used in the treatment of breast cancer as well.²⁴

These studies have shown the potential of using *MUC1* and *MUC4* polymorphisms as markers of gastric pre-neoplastic lesions.

The evaluation of the *MUC1* and *MUC4* polymorphisms in our cases of atrophy and intestinal metaplasia were negative. From our results, these markers would not be useful in surveillance of patients with these pre-neoplastic lesions. However, it is possible that the sample of patients with atrophy and metaplasia in our study may have been small to allow establishing this association. In addition, the relatively low prevalence of intestinal atrophy and metaplasia in our sample of patients may reflect low risk of gastric cancer. Another possible explanation would be that only already neoplastic, or more advanced pre-neoplastic lesions such as gastric dysplasia, would be associated with alterations in *MUC1* and *MUC4* polymorphisms.

An interesting finding from our study, from the secondary analysis, showed that in the *rs863582* polymorphism of the *MUC4* gene, the A allele showed a significantly higher frequency in functional dyspeptic patients than in the asymptomatic controls. This unexpected finding has no definite explanation and can not be associated with the pre-neoplastic potential of this population of asymptomatic individuals, because we do not have histological material of this population. This finding suggests that this *MUC4* polymorphism may be associated with some genetic influence on the presence of dyspeptic symptoms and deserves further studies for definitive evaluation.

Our study has some limitations. The majority of the population evaluated was female and the control group does not have endoscopic, histological or *H. pylori* evaluation.

In conclusion, the prevalence of intestinal atrophy and metaplasia was lower than in countries with a high prevalence of gastric cancer, and since no association was found for *MUC1* and *MUC4* polymorphisms, we did not consider these markers as valid for the screening of atrophy and intestinal metaplasia for gastric cancer surveillance. Finally, the association of *MUC4* polymorphisms with the presence of functional dyspepsia justifies new studies to evaluate the role of these genetic characteristics in the etiopathogenesis of functional dyspepsia.

Bibliography

1. Recio-Boiles A, Babiker HM. Cancer, Gastric. In Treasure Island (FL); 2018.
2. Correa P. Gastric cancer: overview. *Gastroenterol Clin North Am. United States*; 2013 Jun;42(2):211–7.
3. Kapadia CR. Gastric atrophy, metaplasia, and dysplasia: a clinical perspective. *J Clin Gastroenterol. United States*; 2003;36(5 Suppl):S29-36; discussion S61-2.
4. Gonzalez CA, Sanz-Anquela JM, Gisbert JP, Correa P. Utility of subtyping intestinal metaplasia as marker of gastric cancer risk. A review of the evidence. *Int J cancer. United States*; 2013 Sep;133(5):1023–32.
5. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol. United States*; 2014 Sep;20(36):12847–59.
6. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett. Ireland*; 2014 Apr;345(2):196–202.
7. Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, et al. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterology. 2006 Apr*;130(5):1466–79.
8. Albrecht H, Carraway KL 3rd. MUC1 and MUC4: switching the emphasis from large to small. *Cancer Biother Radiopharm. United States*; 2011 Jun;26(3):261–71.
9. Giraldi L, Michelazzo MB, Arzani D, Persiani R, Pastorino R, Boccia S. MUC1, MUC5AC, and MUC6 polymorphisms, *Helicobacter pylori* infection, and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. 2018 Jul;27(4):323-330

10. Tytgat GN. The Sydney System: endoscopic division. Endoscopic appearances in gastritis/duodenitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 1991 May-Jun;6(3):223-34.
11. 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 Oct;20(10):1161-81
12. Sander GB, Mazzoleni LE, Francesconi CF, Wortmann AC, Ott EA, Theil A, Da Cruz PV, Da Silva AC, Oliveira L, Beheregaray S, Mاتيotti S, Somm G, Goldim JR. Development and validation of a cross-cultural questionnaire to evaluate nonulcer dyspepsia: the Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire (PADYQ). 2004 Nov-Dec;49(11-12):1822-9.
13. Eriksson NK, Kärkkäinen PA, Färkkilä MA, Arkkila PE. Prevalence and distribution of gastric intestinal metaplasia and its subtypes. *Dig Liv Dis* 2008; 40:355-360.
14. Petersson F, Borch K, Franzén LE. Prevalence of subtypes of intestinal metaplasia in the general population and in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:262-266,
15. Kim N, Park YS, Cho S e col. Prevalence and risk factors of atrophic gastritis and intestinal metaplasia in a Korean population without significant gastroduodenal disease. *Helicobacter* 2008; 13:245-255.
16. Peleteiro B, Bastos J, Barros H, Lunet N. Systematic review of the prevalence of gastric intestinal metaplasia and its area-level association with smoking. *GacSanit* 2008;22:236-47
17. De Vries AC, Meijer GA, Looman CWN e col. Epidemiological trends of pre-malignant gastric lesion: a long-term nationwide study in the Netherlands. *Gut* 2007; 56:1665-70
18. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. Gastric precancerous process in a high risk population: cohort follow-up. *Cancer Res* 1990;50:4737-4740

19. Li M, Huang L, Qiu H, Fu Q, Li W, Yu Q, et al. Helicobacter pylori infection synergizes with three inflammation-related genetic variants in the GWASs to increase risk of gastric cancer in a Chinese population. PLoS One. United States; 2013;8(9):e74976.
20. Hu N, Wang Z, Song X, Wei L, et al. Genome-wide association study of gastric adenocarcinoma in Asia: a comparison of associations between cardia and non-cardia tumours. Gut 2016 Oct; 65(10):1611-8
21. Hwang I, Kang YN, Kim JY, DO YR, Song HS, Park KU. Prognostic significance of membrane-associated mucins 1 and 4 in gastric adenocarcinoma. Exp Ther Med. Greece; 2012 Aug;4(2):311–6.
22. Pinzon-Guzman C, Meyer AR, Wise R, Choi E, Muthupalani S, Wang TC, Fox JG, Goldenring JR Evaluation of Lineage Changes in the Gastric Mucosa Following Infection With Helicobacter pylori and Specified Intestinal Flora in INS-GAS Mice. 2018 Jul 1:22155418785621.
23. Tamura Y, Higashi M, Kitamoto S, Yokoyama S, Osako M, Horinouchi M, Shimizu T, Tabata M, Batra SK, Goto M, Yonezawa S. MUC4 and MUC1 expression in adenocarcinoma of the stomach correlates with vessel invasion and lymph node metastasis: an immunohistochemical study of early gastric cancer. 2012;7(11):e49251.
24. Shi M, Yang Z, Hu M, Liu D, Hu Y, Qian L, Zhang W, Chen H, Guo L, Yu M, Song L, Ma Y, Guo N. Catecholamine-Induced β 2-adrenergic receptor activation mediates desensitization of gastric cancer cells to trastuzumab by upregulating MUC4 expression. 2013 Jun 1;190(11):5600-8

