



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITOS DO CONSUMO DE ÁGUA DE PH ALCALINO EM PACIENTES COM
GASTRITE E CORRELAÇÃO COM MARCADORES EPIGENÉTICOS
RELACIONADOS COM A INFLAMAÇÃO**

Juliana Ramos Chaves

BELÉM-PA

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITOS DO CONSUMO DE ÁGUA DE PH ALCALINO EM PACIENTES COM
GASTRITE E CORRELAÇÃO COM MARCADORES EPIGENÉTICOS
RELACIONADOS COM A INFLAMAÇÃO**

Juliana Ramos Chaves

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas da UFPA como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Orientador: **Prof. Dr. André Salim Khayat.**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Unidade Hospitalar João de Barros Barreto (UHJBB/UFPA/EBSERH)

Chaves, Juliana Ramos, 1979-

Efeitos do consumo de água de pH alcalino em pacientes com gastrite e correlação com marcadores epigenéticos relacionados com a inflamação.

/ Juliana Ramos Chaves; Orientador, Prof. Dr. André Salim Khayat. — 2018.

65 f. : il. ; color. : 30 cm.

Inclui bibliografias.

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Pará, Núcleo de Pesquisas em Oncologia , Programa de Pós- Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 201 8.

1. Gastrite. 2. Carcinogênese. 3. Neoplasias gástricas. 4. Água alcalina. 5. Epigenética. I. Khayat, André Salim, *orient.* II. Título.

CDD - 23. ed. 616.99433



BELÉM-PA

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

EFEITOS DO CONSUMO DE ÁGUA DE PH ALCALINO EM PACIENTES COM
GASTRITE E CORRELAÇÃO COM MARCADORES EPIGENÉTICOS RELACIONADOS
COM A INFLAMAÇÃO

Banca Examinadora:

Prof. Dr. André Salim Khayat

Professor da Universidade Federal do Pará (UFPA)

Orientador

Membro

Membro

BELÉM-PA

2018

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Núcleo de Pesquisas em Oncologia – (NPO)

Oncológica do Brasil – Ensino e Pesquisa (OBEP)

AGRADECIMENTO

Acima de tudo agradeço a Deus.

A minha Mãe, Lucy Rita Ramos, por todo incentivo, companheirismo, me ajudando em mais essa etapa da minha vida.

À minha doce e amada filha, Betina, por toda paciência e compreensão.

Ao meu irmão, Léo Ramos Chaves, que mesmo longe esteve sempre perto, meu melhor amigo e exemplo de homem digno e correto.

A todos os participantes da pesquisa, que contribuíram voluntariamente para realização desse estudo.

Ao prezado amigo e orientador prof. André Salim, grande exemplo de professor, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto.

A minha querida co-orientadora, prof. Taissa Thomaz, pelo empenho constante em me ajudar na conclusão desse projeto.

Ao todo time da pesquisa, meus amigos queridos, que se dedicaram intensamente a realização desse projeto: prof. Carol Rosal, Antonio Modesto, Eliel Barbosa, Jonathan Sarraf e Thais Allen.

Ao meu amigo, Dr. Otávio Cunha Bembom, por toda dedicação e disponibilidade.

A empresa Acqua-life, por acreditar no projeto e contribuir com financiamento da pesquisa.

As instituições: Marinha do Brasil, NPO e OBEP.

EPÍGRAFE

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém pensou sobre aquilo que todo mundo vê”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Na carcinogênese da neoplasia gástrica, as etapas normalmente se manifestam clinicamente como gastrite, atrofia gástrica, ulcerações, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, como neoplasia maligna. A associação entre câncer gástrico e hábitos alimentares já está bem descrita na literatura e diversos estudos têm demonstrado a influência da ingestão de determinados alimentos com conservantes e com alta concentração de nitratos e sal, com o desenvolvimento dessa neoplasia. Em relação à água consumida temos poucas evidências. O pH da maioria das águas comercializadas na região metropolitana de Belém está fora dos padrões recomendados pelo Ministério da Saúde, apresentando-se mais ácidas. Deste modo, os benefícios tanto da alimentação saudável, quanto do consumo de água alcalina são muito discutidos. Atualmente, vêm sendo estudados diversos potenciais marcadores que podem auxiliar a detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas. Entre eles, encontram-se as alterações epigenéticas. Fatores ambientais como dieta, inflamação e infecção têm sido identificados como contribuintes das alterações epigenéticas. Assim, o presente trabalho pretende buscar evidências de que, apenas a modificação no pH da água seja capaz de levar a variações no padrão de expressão de miRNAs, associados a primeira etapa da carcinogênese gástrica, a gastrite. Para este fim, foi realizada a expressão dos microRNAs miR-7, miR-155, miR-29c e miR-135b, em 28 pacientes portadores de gastrite, que foram submetidos à endoscopia digestiva alta, antes e depois de realizarem a troca da ingestão regular de uma água ácida por uma água com pH alcalino. Após as coletas, o RNA das amostras foi extraído e foi obtido o DNA de fita complementar (cDNA). Os cDNAs foram então submetidos à reação de amplificação por qPCR para análise da expressão dos miRNAs. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Biostat e Stata 11.0, sendo considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$. Ao comparar os níveis de expressão e avaliação clínica da gastrite por EDA, antes e após o consumo da água alcalina, os resultados demonstraram que houve aumento, porém não significativo dos microRNAs alvo, de miR-7 ($p=0,09$), miR-155 ($p=0,13$), miR-29c ($p=0,21$) e miR-135b ($p=0,19$). Em contrapartida, foi possível observar uma melhora significativa endoscópica da gastrite ($p=0,024$), demonstrando um benefício clínico da ingestão da água alcalina.

Palavras-chave: gastrite, carcinogênese, neoplasias gástricas, água alcalina, epigenética.

ABSTRACT

In the carcinogenesis of gastric cancer, the stages usually manifest clinically as gastritis, gastric atrophy, ulcerations, intestinal metaplasia, dysplasia and finally, as malignant neoplasia. The association between gastric cancer and diet is already widely described in the literature and several studies have demonstrated the influence of food intake with preservatives and with high concentration of nitrates and salt, with the development of this neoplasia. Regarding water consumption, there's no relevant evidences. The pH of most of the water sold in the metropolitan área of Belem does not match the standarts recommended by the government Health department, being more acidic. Thus, the benefits of both healthy eating and alkaline water consumption are object of several discussions. Nowadays the other types of markers that can aid the detection of pre-neoplastic and neoplastic lesions will be hosted. Among them, find themselves as epigenetic proteins. Environmental factors such as diet, inflammation and infection have been excluded as contributors to epigenetic changes. Hence, the present work intends to provide evidence that only the water pH modification is able to lead the variations the expressions pattern of miRNAs, associated with a first stage of gastric carcinogenesis, a gastritis. For this it was applied the microRNAs miR-7, mir-155, mir-29c and mir-135b, in 28 patients porters of gastritis that were burned to digestive endoscopy alkaline PH. After collection, the RNA from the samples was extracted, and the complementary tape DNA (cDNA) was obtained. The cDNAs were submitted to qPCR amplification analysis for analysis of miRNA expression. They assessment were using the Biostat and Stata 11.0 programs, being statistically superior to values of $p < 0.05$. Comparing the levels of expression and clinical evaluation of gastritis by EDA before and after alkaline water consumption, the results demonstrated that there was a increasing of the target microRNAs, of miR-7 ($p = 0.09$), miR-155 ($p = 0.13$), miR-29c ($p = 0.21$) and miR-135b ($p = 0.19$). On the other hand, it was possible to observe a significant endoscopic improvement of the gastritis ($p = 0.024$), demonstrating the clinical benefit of alkaline water intake.

Keywords: gastritis, carcinogenesis, stomach neoplasms, alkaline water, epigenetics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BIC – Celulas B integração

CCNE1e – Ciclina E1

CEP – Comitê de ética em pesquisa

CG – Câncer Gástrico

COX2 – Ciclooxygenase 2

CTHRC1 – Colageno tripla helicecontendo 1

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDA – Endoscopia digestiva alta

EGFR – Fator de crescimento epidermal

GAPDH – Gliceraldeído Fosfato Desidrogenase

H2RAs - antagonistas do receptor de histamina 2

HCC – Hepatocarcinoma

HIF-1 – Fator de hipóxia induzido 1

H. pylori – Helicobacterpylori

IBP – Inibidores da bomba de prótons

IL8 – Interleucina 8

ILF2 – Fator de interleucina 2

IRS2 – Substrato do receptor da insulina 2

MDSCs – Células derivadas-mieloide supressoras

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

miR – microRNA

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PG – Prostaglandina

RAF1 – Fator de murina leucemia viral oncogene homologo 1

RNA – Ácido ribonucleico

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TGI – Trato gastro-intestinal

TLRs – Receptores semelhantes a toll

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência global de câncer gástrico.	11
Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes na região norte estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.	12
Figura 3: Influências ambientais no processo de carcinogênese gástrica.	13
Figura 4: Ilustração esquemática de mecanismos multifatoriais envolvidos na carcinogênese gástrica induzida por <i>H. pylori</i> .	16
Figura 5: Representação esquemática dos fatores que influenciam a secreção ácida gástrica pela célula parietal.	19
Figura 6: O microRNA-7 (miR-7) é significativamente regulado negativamente nos tecidos e células do câncer gástrico (CG).	23
Figura 7: Via do microRNA-7 no câncer gástrico.	24
Figura 8: miR-155 inibe a proliferação de células AGS-1 e SGC-790, e promove a apoptose.	25
Figura 9: Esquema ilustrando as vias de atuação dos microRNAs 146a e 155 com seus genes alvos.	26
Figura 10: Valores de expressão para miR-135b e miR-29c em amostras de gastrite crônica não-atrófica de mucosa normal, metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal.	27
Figura 11: A expressão de miR-29c no cancer de pulmão.	29
Figura 12: O miR-29c suprime o câncer de mama pela via TIMP3/STAT1/FOXO1.	29
Figura 13: Comparação entre níveis de expressão do miR-155; miR135; miR29c e miR7 antes (primeira EDA) e depois (segunda EDA) do consumo da água alcalina.	38
Figura 14: FoldChange dos micro-RNA alvo do estudo, antes e depois do consumo da água alcalina por 4 meses	38
Figura 15: A cascata de Correa da carcinogênese gástrica.	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Correlação das condições inflamatórias com o tipo de câncer envolvido	17
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Considerações gerais	11
1.2 Gastrite	15
1.3 Balanço ácido-básico	19
1.3.1 Câncer e acidez	19
1.3.2 Dieta	20
1.4 Epigenética e câncer	21
1.4.1 microRNA-7	22
1.4.2 miRNA-155	24
1.4.3 miRNA-135b	26
1.4.4 miRNA-29c	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Critérios de inclusão	31
3.2 Critérios de exclusão	31
3.3 Amostra e amostragem	31
3.4 Intervenção avaliada	33
3.5 Desfechos avaliados	33
3.6 Coleta de dados	34
3.6.1 Técnica de endoscopia para coleta do material	34
3.7 Aspectos éticos	34
3.8 Extração de RNA	35
3.9 PCR em tempo real para avaliação da expressão de miRNAs	35
3.10 Padronização e Ajuste dos miRNAs	35
3.11 Análise de dados	36
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO	Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A incidência do câncer gástrico varia nas diferentes regiões geográficas, com taxas mais altas na Ásia Oriental, Europa Oriental e América do Sul, enquanto as taxas mais baixas estão na América do Norte e partes da África (Figura 1). Mais de 70% dos casos de câncer gástrico ocorrem em países em desenvolvimento (Ferlay, J *et al.*, 2012).

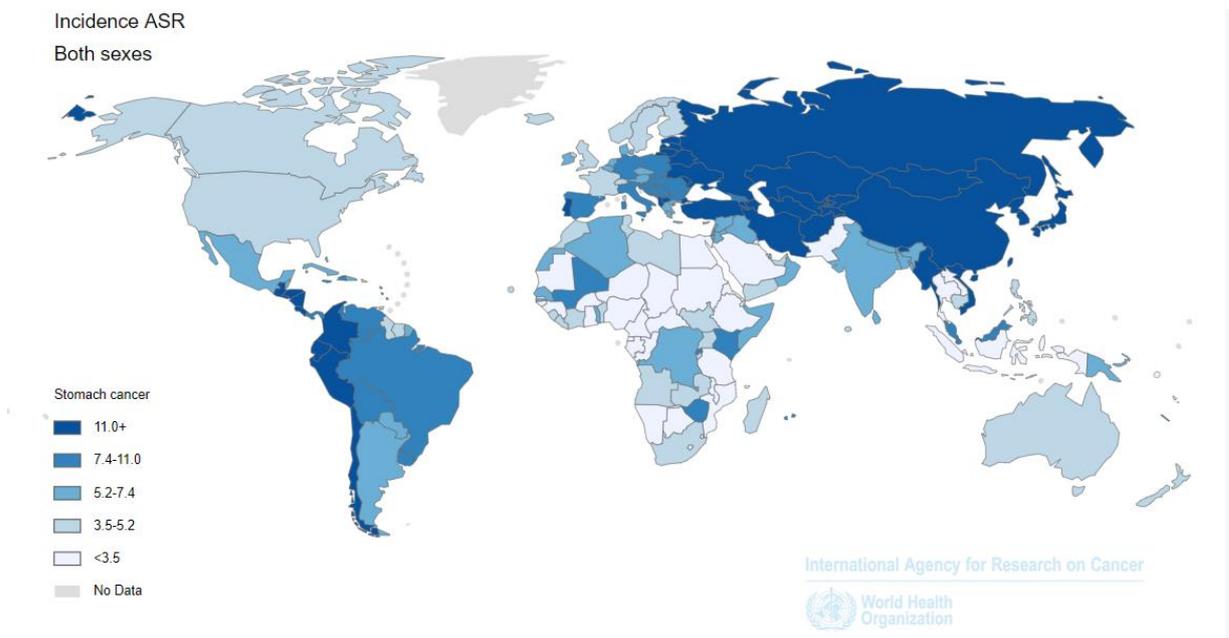


Figura 1: Incidência global de câncer gástrico (Who, 2012).

O câncer gástrico (CG) é a terceira neoplasia maligna com maior grau de mortalidade no mundo, ocasionando 723 mil mortes apenas em 2012 (Ferlay, Jacques *et al.*, 2012). No Brasil, a incidência estimada desta neoplasia em 2018 foi de 21.290 casos novos, sendo 13.540 homens e 7.750 mulheres (Inca, 2018). A mortalidade no Brasil é de 7,42 mortes/100 mil habitantes, obtendo também a terceira posição no quesito mortalidade por neoplasia no país (Inca, 2018). No Pará, estimou-se a incidência para o ano de 2018 de 11,50 novos casos/100 mil homens e 4,80 novos casos/100 mil mulheres, sendo um problema de saúde pública no Estado. Na região Norte representa o segundo tumor mais incidente em homens e o quinto em mulheres (Figura 2) (Inca, 2018).

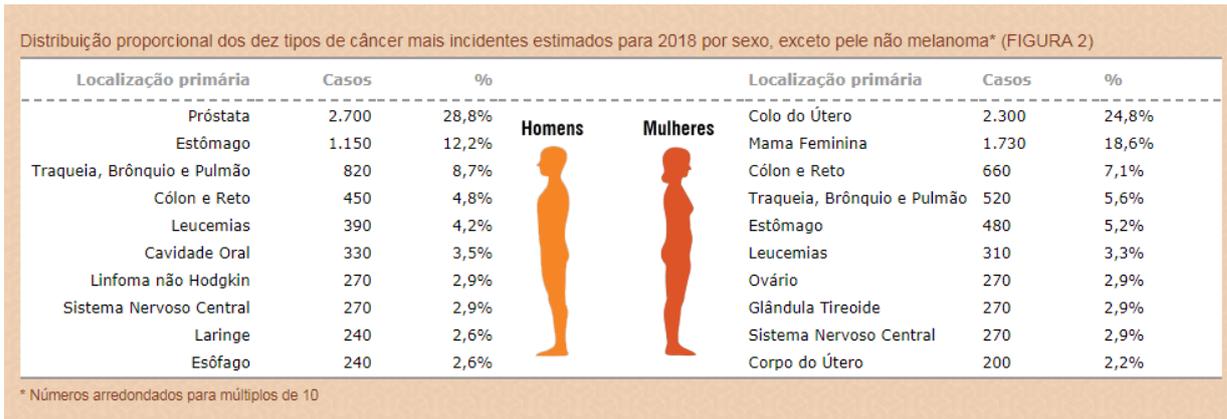


Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes na Região Norte estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma (Inca, 2018).

O prognóstico do CG está correlacionado com estágio que ele se apresenta. Pacientes no estágio I tem uma taxa de sobrevida estimada em 5 anos de 90%, enquanto no estágio IV a sobrevida é de 5%, sendo a única terapêutica curativa a ressecção cirúrgica para os estádios iniciais (Woo e Kim, 2012). Portanto, existe uma necessidade de métodos diagnósticos mais precoces, ou marcadores que selecionem quais pacientes seriam candidatos a um seguimento regular, por possuírem um maior risco de desenvolver o CG. No Japão e Coreia do Sul, onde o CG possui incidência e mortalidade elevadas, existe programa de *screening* do governo desde 1983, com exames radiológicos, e posteriormente com Endoscopia Digestiva Alta (EDA). Os dados deste programa foram relacionados com a diminuição da mortalidade do CG (Oshima, 1994).

O câncer gástrico é subdividido em dois grupos histológicos variantes do adenocarcinoma, o mais frequente é o tipo intestinal e assim chamado devido sua morfologia se assemelhar a trato intestinal. O outro tipo com menor incidência é o tipo difuso caracterizado pela falta de adesão intercelular, o que os torna incapazes de formar estruturas glandulares. Em pacientes com a forma hereditária de câncer gástrico de tipo difuso, a ausência de aderência intercelular é causada por uma mutação germinativa na proteína de adesão celular E-caderina (CDH1) (Correa, 1992).

Na carcinogênese da neoplasia gástrica, o adenocarcinoma tipo intestinal se desenvolve seguindo etapas que se manifestam clinicamente como: gastrite, atrofia gástrica, ulcerações, metaplasia intestinal, displasia e neoplasia maligna. Essas condições costumam ser sequenciais e ocorrem num período de muitos anos, como resultado da exposição a uma variedade de fatores endógenos e exógenos (Cotran *et al.*, 1999).

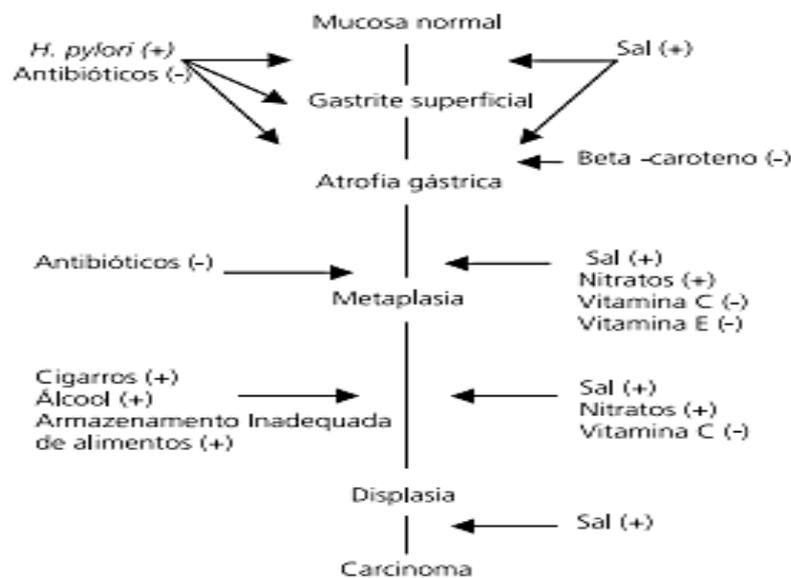


Figura 3: Influências ambientais no processo de carcinogênese gástrica (Adaptado de Hwang *et al.* (1994))(Resende *et al.*, 2006).

Vários fatores de risco vêm sendo associados na patogênese do câncer gástrico. Um dos mais reconhecidos é a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Acredita-se que a infecção por *H. pylori* desencadeie uma inflamação na mucosa do corpo, que resulta em atrofia e metaplasia intestinal, estando relacionado com a carcinogênese gástrica (Humans, 1994). Outros fatores também associados são: álcool, tabagismo, baixo nível sócio econômico, obesidade, histórico de cirurgia gástrica prévia e fatores genéticos (Barstad *et al.*, 2005; Ladeiras-Lopes *et al.*, 2008; Lauby-Secretan *et al.*, 2016). (Figura 3).

A associação entre câncer gástrico e hábitos alimentares já está bem descrita na literatura e diversos estudos têm demonstrado a influência da ingestão de determinados alimentos com conservantes e com alta concentração de nitratos e sal, com o desenvolvimento desta neoplasia (Tsugane e Sasazuki, 2007). Deste modo, os benefícios, tanto da alimentação saudável, quanto do consumo de água alcalina são frequentemente discutidos.

O padrão alimentar característico do Pará, com alimentos salgados (charque, peixe, camarão), baixa ingestão de verduras e hortaliças e de alto consumo de glicídios (farinhas), tem contribuído para a alta incidência de câncer gástrico na região (Resende *et al.*, 2006).

Em relação à água alcalina, o consumo prolongado em camundongos saudáveis, que consumiram água com pH 8,5 por 24 meses, não levou ao desenvolvimento de patologias, nem de modificações histológicas em órgãos como rins, intestino, coração, fígado e cérebro, além

de sugerir ganho de sobrevivência quando comparados aos camundongos controle que ingeriram água da torneira (Magro *et al.*, 2016).

Outro estudo realizado *in vitro*, analisou a capacidade de inativação da pepsina com pH de 8,8 e foi possível observar a inativação irreversível da pepsina nesse meio alcalino, sugerindo assim, um possível benefício em alcalinização da dieta como uma abordagem na doença do refluxo, uma vez que esta enzima está relacionada com a lise de proteínas e é ativada quando o pepsinogênio encontra-se em meio ácido (Koufman e Johnston, 2012).

Mousa (2016) descreveu melhoras em diversas condições e doenças, como a densidade mineral óssea com redução da osteoporose, redução da incidência de doenças coronarianas e cardiovasculares, redução da inflamação crônica e proteção das células beta-pancreáticas pelos efeitos antioxidantes do consumo de alimentos e água alcalinos. Ainda, ocorrem efeitos positivos na redução da invasão tumoral e metástase. Naito *et al.* (2002) observaram que a água alcalina eletrolizada tem propriedade antiinflamatória pela capacidade de reduzir a expressão de TNF- α na mucosa gástrica.

Wynn *et al.* (2009) descreveram um efeito ósseo benéfico com consumo da água alcalina enriquecida com cálcio e bicarbonato, diminuindo a reabsorção óssea em mulheres pré-menopausadas. Esse efeito já havia sido previamente observado em mulheres pós-menopausadas com deficiência de cálcio, definindo desta forma, um efeito positivo da reabsorção óssea com a ingestão da água alcalina em mulheres pré e pós-menopausadas. (Meunier *et al.*, 2005; Wynn *et al.*, 2009).

No melanoma, os efeitos da água alcalina no crescimento tumoral, induzido em camundongos e em cultura *in vitro* de células tumorais, gerou diminuição do crescimento das células tumorais (Azzarito *et al.*, 2016).

É importante destacar que o Ministério da Saúde, por meio da portaria nº 2.194 de dezembro de 2011, especificamente no artigo 9 e § 1º, recomenda que no sistema de distribuição de água o pH seja mantido na faixa de 6,0 a 9,5, faixa considerada dentro dos padrões de potabilidade, de acordo com a resolução nº 375/2005 do CONAMA (Brasil, 2011). No entanto, se observa frequentemente a prática de comercialização de águas abaixo da faixa de pH estipulada (Brasil, 2011).

Atualmente existe uma ampla discussão acerca dos efeitos do pH da água de consumo e suas consequências à saúde humana, como sua relação com inflamação e câncer (Fenton e Huang, 2016). Entretanto, poucas são as evidências científicas que comprovem esta associação.

Na região Norte do Brasil, as águas comercializadas apresentam um baixo pH, variando de 3,0-5,0 (Rodrigues, 2012). Associado a isso, existe uma alta incidência de gastrite e câncer gástrico, acima da média nacional (Inca, 2018). Dessa forma, o pH da água pode ser um fator contribuinte para a ocorrência dessas alterações gástricas.

Como as modificações epigenéticas geralmente são as primeiras a ocorrerem e são facilmente induzidas por fatores ambientais, o presente trabalho pretende buscar evidências de que apenas a modificação no pH da água seja capaz de levar a variações no padrão expressão de miRNAs associados a carcinogênese gástrica.

1.2 Gastrite

A dispepsia funcional é um distúrbio da digestão de alta prevalência, que pode ser classificado em agudo ou crônico, podendo apresentar-se de forma assintomática ou sintomático. Os sintomas dispépticos mais associados são epigastralgia, pirose, desconforto na região superior do abdômen, saciedade precoce, plenitude pós-prandial, sensação de distensão abdominal, cujo aparecimento ou piora pode ou não estar relacionado à alimentação ou ao estresse (Silva, 2008; Matsudai *et al.*, 2010).

Caracteriza-se pela inflamação da mucosa do estômago, que é causada por um desequilíbrio entre a defesa da mucosa (bicarbonato, mucina, prostaglandina, óxido nítrico, outros peptídeos e fatores de crescimento) e fatores agressivos (ácido e pepsina) (Hardman e Limbird, 2003). Dentre as diversas causas, a infecção bacteriana da mucosa gástrica pelo *H. pylori* é uma das principais causas de gastrites e em 95% dos casos de gastrites crônicas o principal agente etiológico é o *H. pylori* (Pinto, 2007; Silva, 2008; Matsudai *et al.*, 2010).

O *H. pylori* é capaz de causar gastrite aguda, que está associada ao desenvolvimento de hipocloridria e infiltração neutrofílica na biópsia gástrica (Watari *et al.*, 2014). Após uma infecção aguda por *H. pylori*, a maioria das gastrites agudas evolui para gastrite ativa crônica, caracterizada histologicamente por células mononucleares, predominantemente linfócitos, plasmócitos e macrófagos; folículos linfóides com centros germinativos são frequentemente vistos e são característicos de uma infecção por *H. pylori* (Watari *et al.*, 2014).

A infecção pelo *H. pylori* afeta mais de 50% da população adulta mundial, e aproximadamente dois terços dos casos de câncer gástrico são atribuídos a ela, mas nem todos os infectados irão desenvolver câncer (Peleteiro, 2006; Wang *et al.*, 2014; Watari *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016). A infecção por *H. pylori* na mucosa gástrica pode levar ao desenvolvimento de gastrite atrófica (GA), com hipocloridria ou acloridria e metaplasia intestinal (IM), ambos considerados fatores de risco para o desenvolvimento de GC (Peleteiro, 2006; Kupcinskas *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Watari *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2015; Kishino *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016).

Essas condições da carcinogênese costumam ser sequenciais e ocorrem num período de muitos anos, como resultado da exposição a uma variedade de fatores do hospedeiro, ambientais, nutricionais (acidificação da dieta, alimentos salgados e baixa ingestão de verduras e hortaliças) e bacterianos, que perpetuam a inflamação e levam à instabilidade genômica promovendo dano no DNA, respostas adaptativas, ativação de oncogenes, redução da ativação de supressores tumorais e resistência à apoptose (Figura 4) (Cotran *et al.*, 1999; Pinto, 2007; Kupcinskas *et al.*, 2014; Saito *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Fenton e Huang, 2016).

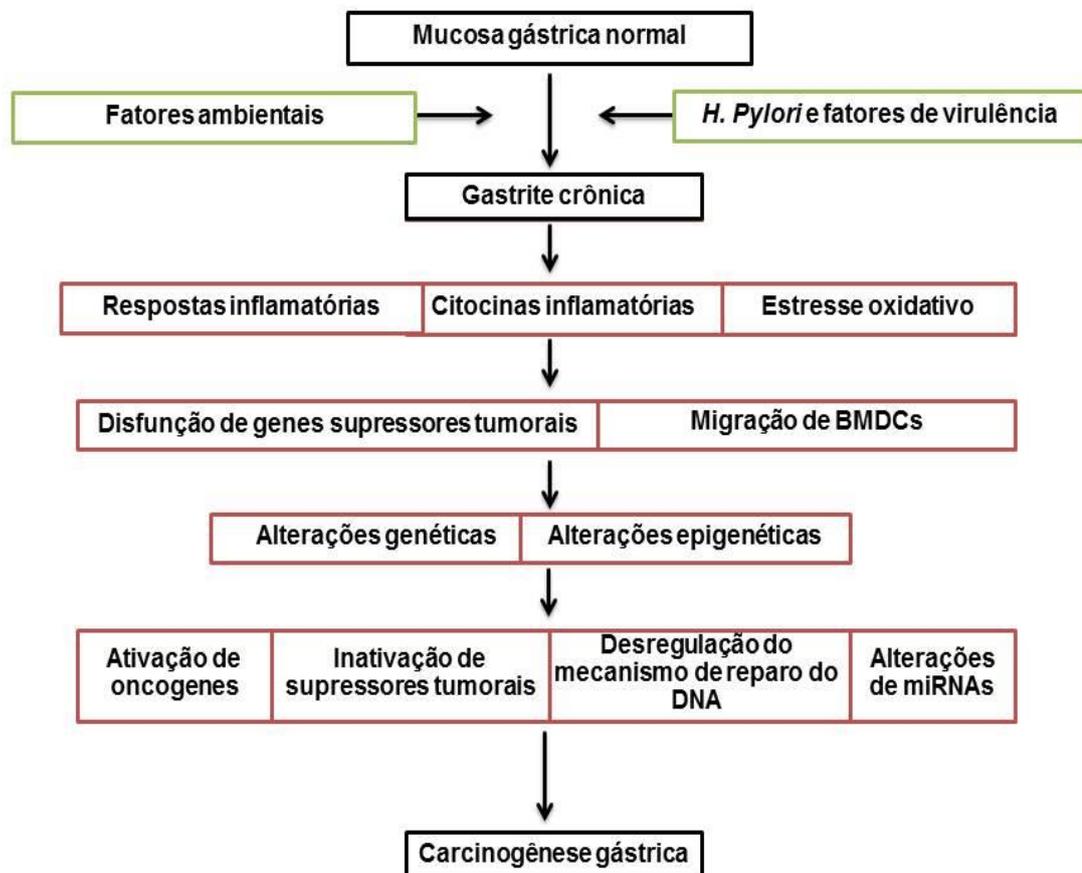


Figura 4: Ilustração esquemática de mecanismos multifatoriais envolvidos na carcinogênese gástrica induzida por *H. pylori*. A interação entre os fatores bacterianos, resposta do hospedeiro e fatores ambientais leva a um acúmulo gradual de alterações genéticas e epigenéticas de vários proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Além disso, a inflamação também modula as expressões de miRNAs que influenciam a produção de vários RNAs ou proteínas mensageiras relacionadas ao tumor. Todos esses eventos induzidos pela inflamação crônica funcionam em conjunto para influenciar múltiplas vias envolvidas na função celular e, portanto, acelerar a carcinogênese gástrica (Wang *et al.*, 2014).

Isso ocorre porque a inflamação não controlada ou persistente pode contribuir para a carcinogênese e progressão tumoral, por fornecer moléculas bioativas ao microambiente tumoral, incluindo fatores de crescimento que sustentam a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, fatores pro-angiogênicos e enzimas modificadoras da matriz extracelular que facilitam a angiogênese, invasão e metástase (Lee *et al.*, 2016).

É bem relatada a associação de condições inflamatórias e câncer (Quadro 1). O processo inflamatório é uma resposta de defesa a agressões ao tecido, que tem como objetivo, restaurar a integridade do mesmo (Schäfer e Werner, 2008). Nesse processo existe a ativação de leucócitos, proliferação de fibroblastos e células endoteliais e depósito de matriz extracelular, porém na neoplasia ocorre a perpetuação da inflamação, não sendo um processo auto-limitado, o que pode contribuir para carcinogênese e progressão tumoral, pela formação de um micro ambiente favorável (Hanahan e Weinberg, 2011). Quanto maior o período de persistência da inflamação, maior o risco de carcinogênese.

Condição Inflamatória	Neoplasia
Doença inflamatória intestinal	Câncer colo-retal (Johnson <i>et al.</i> , 2013)
Infecção por <i>H. Pilory</i>	Câncer gástrico (Humans, 1994)
Hepatite viral crônica	Câncer hepatocelular(Beasley <i>et al.</i> , 1981)
Infecção por HPV(vírus papiloma humano)	Câncer de colo de útero (Castle <i>et al.</i> , 2002)
Esofagite de refluxo	Câncer de esôfago (Lagergren <i>et al.</i> , 1999)
Abestose	Mesotelioma(Abós-Herràndiz <i>et al.</i> , 2017)

Quadro 1: Correlação das condições inflamatórias com o tipo de câncer envolvido.

Há propostas de evitar o estresse à mucosa gástrica, pela alcalinização do conteúdo gástrico (Wolfe e Sachs, 2000). Os inibidores da bomba de prótons (IBPs) são medicamentos que inibem a enzima H^+/K^+ ATPase (ou bomba de prótons) nas células parietais com consequente inibição da secreção ácida gástrica, e elevação do pH intra-gástrico (Hunt, 1999; Lee *et al.*, 2016). Estas medicações são consideradas tratamento padrão para gastrite desde

1989, dessa forma, o controle da acidez (pH) do estômago está diretamente relacionado com o tratamento das condições inflamatórias da mucosa gástrica (Hunt, 1999; Lee *et al.*, 2016).

A inibição seletiva do receptor H₂ da histamina (figura 5), através dos antagonistas dos receptores H₂, como a ranitidina e a cimetidina, similarmente suprimem a secreção ácida basal, embora em menor grau do que os IBPs (Wolfe e Sachs, 2000). Há também a possibilidade de diminuir a secreção gástrica com o antagonismo de receptores muscarínicos M1, visto que as células parietais do estômago têm receptores muscarínicos M3, que respondem à drogas como atropina. Entretanto, essa classe de medicamento raramente é utilizada hoje, sendo inclusive não autorizada nos Estados Unidos, principalmente por causar muitos efeitos adversos, como sonolência, boca seca, visão embaçada e retenção urinária (Wolfe e Sachs, 2000).

Outra opção de tratamento para sintomas dispépticos são os antiácidos, como o hidróxido de magnésio e o hidróxido de alumínio (Konturek, 1993). Ambos medicamentos tem como mecanismo de ação, uma reação de neutralização do ácido gástrico, com aumento transitório do pH intra-gástrico, porém apresentam com uma dificuldade a posologia, devido ao alto número de vezes que devem ser ingeridos para manutenção do seu efeito, não sendo usados rotineiramente na prática clínica como tratamento definitivo e sim como alívio imediato dos sintomas (Konturek, 1993).

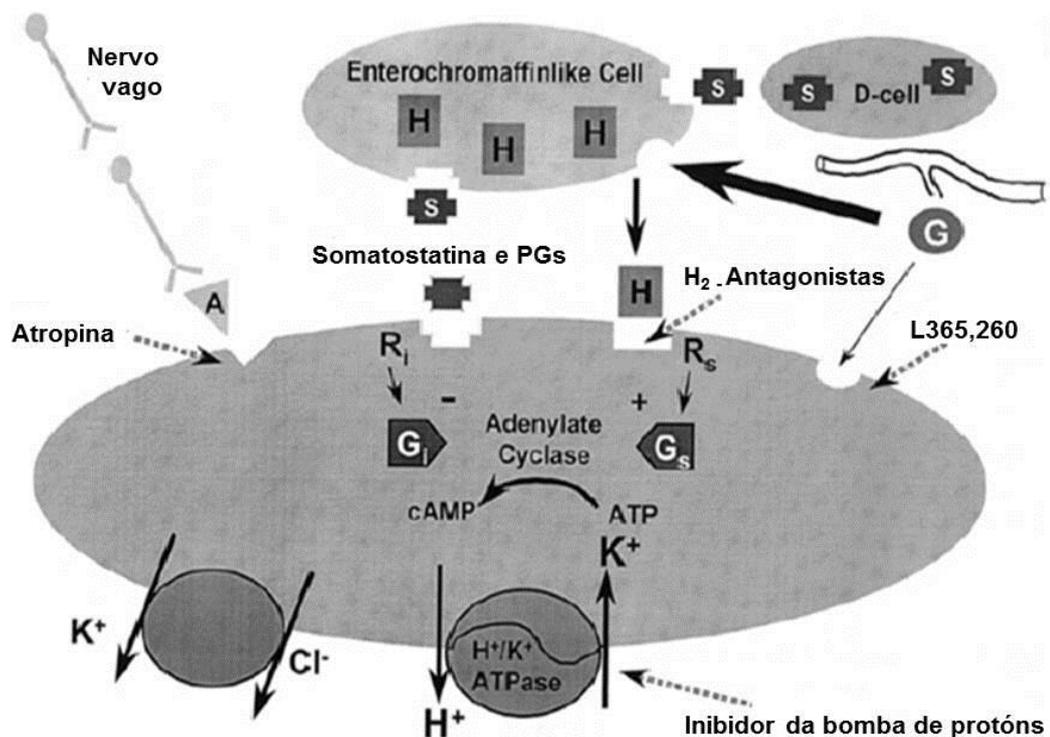


Figura 5: Representação esquemática dos fatores que influenciam a secreção ácida gástrica pela célula parietal, mostrando fatores: neurócrina (acetilcolina e outros neurotransmissores de neurônios vagais eferentes), parácrina (somatostatina de células D e histamina de células ECL gástricas) e fatores endócrinos (gastrina circulante). As setas tracejadas indicam locais potenciais de inibição farmacológica da secreção ácida, seja via antagonismo do receptor ou via inibição da H1, K1-ATPase. A, acetilcolina e outros neurotransmissores; H, histamina; G, gastrina; L365260, antagonista sintético do receptor da gastrina; PG, prostaglandina; S, somatostatina; ECL, enterochromaffin-like (Wolfe e Sachs, 2000).

Alguns estudos relataram que as lesões pré-cancerosas, incluindo GA e IM, melhoraram após a erradicação da *H.pylori* com administração de antibiótico e, além disso, foi possível reduzir, em uma metanálise, a prevalência do GC clínico em aproximadamente um terço; fato confirmado em estudos japoneses (Watari *et al.*, 2014).

1.3 Balanço ácido-básico

1.3.1 Câncer e acidez

Originalmente descrito por Warburg (1956), a maioria dos tumores são caracterizados por realizarem glicólise anaeróbica, mesmo em presença de oxigênio. Este fato deve-se a uma maior ativação do fator de hipóxia induzido (HIF-1) presente nessas células, com consequente maior conversão de glicose em ácido láctico e criação de um ambiente ácido nas células tumorais (Vaupel *et al.*, 1989). A extensão com que isso ocorre está relacionada com a agressividade tumoral. Estudos têm sido conduzidos para avaliar a manipulação da acidificação tumoral, como potencialização terapêutica no tratamento das neoplasias (Mccarty e Whitaker, 2010).

Neste contexto, oncogenes e supressores tumorais podem regular o metabolismo das células tumorais; como exemplo temos o oncogene c-Myc que pode aumentar a expressão de genes envolvidos na glicólise, como a lactato desidrogenase-A (LDH-A) e transportador de glicose 1 (GLUT1), e estimular o metabolismo glicolítico das células cancerígenas (Shim *et al.*, 1997; Osthus *et al.*, 2000). Enquanto alguns estudos revelam que a proteína p53 (TP53), um conhecido supressor tumoral, que se encontra frequentemente mutado em neoplasias, inibe a glicólise e aumenta a respiração mitocondrial em células tumorais (Matoba *et al.*, 2006).

Além dos fatores genéticos, o “efeito Warburg” também é regulado por fatores ambientais encontrados no tumor. Como resultado de uma vascularização defeituosa e redução da perfusão sanguínea, regiões do microambiente tumoral são geralmente hipóxicos e ácidos. A hipóxia e a acidose têm efeitos complexos no metabolismo celular, assim como na evolução do câncer,

metástases e resposta terapêutica aos quimioterápicos (Gatenby e Gillies, 2004; Cairns *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012; Justus *et al.*, 2013).

O pH ideal dos tecidos humanos é regulado para manter-se próximo de um pH 7.4, enquanto o pH do microambiente tumoral pode variar de pH 5.5 a 7.4 (Vaupel *et al.*, 1989; Van Sluis *et al.*, 1999; Bhujwalla *et al.*, 2002; Schornack e Gillies, 2003). Isso ocorre devido a maior produção de ácido lático pela anarobiose tumoral e por outras fontes de prótons derivadas da hidrólise do ATP assim como hidratação do dióxido de carbônico, por anidrases carbônicas (Helmlinger *et al.*, 2002; Swietach *et al.*, 2010).

O estroma celular adjacente às células tumorais responde a acidose de diversas maneiras (Justus *et al.*, 2013). Em algumas células imunes, como os neutrófilos, a acidose pode estimular sua atividade, enquanto que em outras, como na natural killer e linfócitos TCD8⁺, a acidose pode atuar reprimindo as suas atividades (Fischer *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2006). A acidose também pode modular a angiogênese e a inflamação endotelial (Chen *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2013). Desta forma podemos concluir que a acidose tem papel definido e determina diversos efeitos nas células cancerígenas e em suas células adjacentes.

1.3.2 Dieta

A dieta e seus componentes possuem um claro impacto no balanço ácido-básico corporal (Sherman e Gettler, 1912). Em 1912, foi conduzido estudo em que avaliou a teoria “ácido-cinza”, testando diversos tipos de alimentos *in vitro* para avaliar a quantidade de íons produzidas após aquecidos, como sódio, potássio, fósforo, cloro e enxofre, além de um experimento *in vivo* para avaliar o balanço ácido-básico gerado, após cada subtipo de alimento (Sherman e Gettler, 1912). Por meio de avaliação das alterações do pH urinário e quantidade de excreção de amônia, foi observado que, de acordo com a classe de alimento, o seu produto final após metabolizado seria predominantemente ácido, como no caso das carnes, ovos e doces, ou básico, como no caso das verduras e frutas. Este fato confirma que, de acordo com o alimento ingerido, existe uma alteração na formação de elementos ácidos (Sherman e Gettler, 1912).

Através de uma revisão sistemática da literatura, realizada para avaliar associação entre dieta alcalina e prevenção de câncer, 8278 citações foram identificadas e 252 resumos foram revisados. Não foi encontrado nenhum ensaio randomizado, ressaltando a falta de evidências

robustas acerca do benefício em relação a dieta alcalina e prevenção do câncer (Fenton e Huang, 2016).

1.4 Epigenética e câncer

Estudos anteriores têm evidenciado que a tumorigênese do CG envolve tanto alterações genéticas quanto epigenéticas (Guo *et al.*, 2017). Atualmente, vêm sendo estudados diversos potenciais marcadores que podem auxiliar a detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, e entre eles, encontram-se as alterações epigenéticas (Barchitta *et al.*, 2014; Lyratzopoulos, 2014). Waddington (1942), definiu o termo epigenética como as mudanças no fenótipo sem alterar o genótipo. Hoje sabemos que o estudo da epigenética consiste no estudo das mudanças herdáveis na expressão gênica sem que haja mudança da sequência do DNA (Woo e Kim, 2012; Barchitta *et al.*, 2014).

Os mecanismos de regulação da epigenética incluem: metilação do DNA, modificação em histonas e expressão de microRNAs e RNAs longos não-codificantes (Cravo *et al.*, 1995; Ushijima e Okochi- Takada, 2005).

A modulação epigenética pode ser influenciada por diversos fatores ambientais e de estilo de vida, como: dieta, idade, fumo, exposição solar, inflamação e poluentes (Kanherkar *et al.*, 2014). Sabe-se que alguns componentes da dieta podem influenciar a sinalização epigenética atuando na metilação do DNA, alteração das histonas e mRNAs (Kiec-Wilk *et al.*, 2009). Na neoplasia de cabeça e pescoço foi identificado que o consumo de tabaco promove a desregulação do status de metilação (hipometilação), assim como o consumo de álcool é caracterizado por hipermetilação de oncogenes (Irimie *et al.*, 2018). A idade é outro fator conhecido que interfere na regulação epigenética (Jasiulionis, 2018). No câncer de fígado, o consumo crônico de álcool pode estar relacionado com a superexpressão de alguns microRNAs, a exemplo do miR 34a, do miR 107 e do miR 122, relacionados com a homeostase hepática (Dippold *et al.*, 2013).

A utilização da expressão de microRNAs (miRNAs) como biomarcadores de prognóstico em câncer tem sido avaliada em vários estudos (González e Agudo, 2012). Os miRNA são RNA pequenos não codificantes, apresentam cerca de 18-25 nucleotídeos, que silenciam a expressão gênica pós transcricional, sendo capaz de degradar RNA mensageiro (mRNA) alvo e/ou reprimir a sua tradução. Cada miRNA pode atuar num grande número de genes alvos (aproximadamente 500 para cada família de miRNA) (Kim e Nam, 2006). Esses microRNAs

fazem parte de uma série de processos biológicos (Bartel e Bartel, 2003), como proliferação, apoptose e diferenciação celular, desta forma podendo ser úteis para determinar mecanismos regulatórios em lesões pré-neoplásicas (Xiao *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010).

Estudo prévios têm mostrado que a expressão alterada de vários miRNAs contribui não somente para carcinogênese e progressão de neoplasias, como também exibir papel de preditor de resistência a drogas, assim como de fator prognóstico (Krützfeldt *et al.*, 2006). No CG, a expressão de vários miRNAs encontra-se alterada, atuando como oncogenes ou supressores tumorais dependendo do alvo e diversos estudos têm demonstrado que a esta alteração pode auxiliar no diagnóstico e no tratamento de tumores (Ricarte Filho e Kimura, 2006; Xiao *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2014; Qu *et al.*, 2015; Ishimoto *et al.*, 2016).

1.4.1 microRNA-7

O miR-7 atua como supressor tumoral em diversos tumores, como no câncer de mama, pulmão e ovário, assim como na doença maligna do trato gastro-intestinal (TGI), em que sua expressão encontra-se diminuída na maioria dos tumores, porém dependendo do alvo e via que ele regule, pode atuar como um oncogene (Chen *et al.*, 2016).

Alguns genes foram identificados como alvo do miR-7, incluindo, *RAF1*, *EGFR*, *CCNE1* e *YY1* (Zhou *et al.*, 2014; Giles *et al.*, 2016). Trata-se de um miRNA mediado pela inflamação, que representa um evento significativo na carcinogênese gástrica. É correlacionado inversamente com muitas citocinas pró-inflamatórias e fatores inflamatórios como a interleucina-1 β e o TNF- α . Três genes, *LPHN2*, *BASPI* e *MAFG*, alvos do miR-7, são induzidos nas vias da ciclooxigenase (COX2)/prostaglandina (PG) E2, o que mostra que o miR-7 desempenha um papel significativo na resposta inflamatória da mucosa gástrica (Kong *et al.*, 2012).

No câncer gástrico, o miR-7 encontra-se com expressão diminuída no tecido tumoral quando comparado com o tecido normal (Figura 6) (Xu *et al.*, 2017).

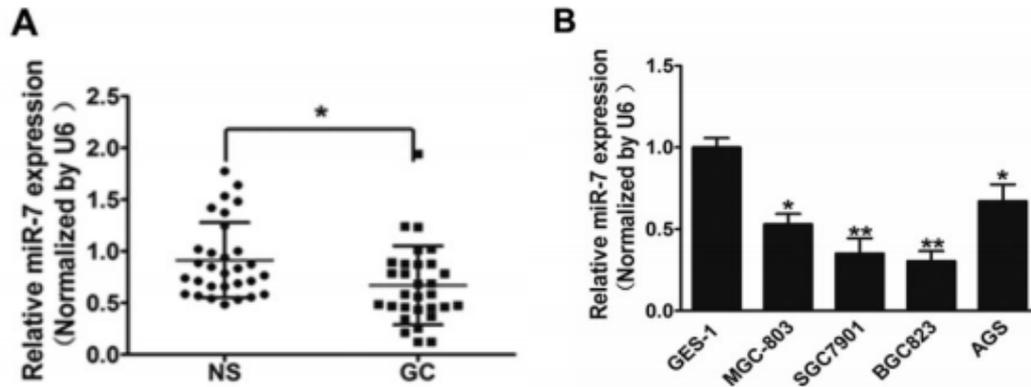


Figura 6: O microRNA-7 (miR-7) é regulado negativamente nos tecidos e células do câncer gástrico (CG). A - Expressão de miR-7 foi analisada por qRT-PCR em 30 pares de tecidos humanos com CG e tecidos normais adjacentes. B - A expressão de miR-7 foi analisada em células GES-1 (uma linhagem celular epitelial gástrica normal escolhida como controle) e 4 linhagens celulares de CG (MGC-803, SGC-7901, BGC-823 e AGS). Os dados representam a média (desvio padrão) de 3 repetições. Diferença significativa quando $p < 0,05$ (Xu *et al.*, 2017).

O estudo de Xie *et al.* (2014) sugere a ação do miR-7 na inibição da invasão e metástase das células do câncer gástrico através da supressão da via do EGFR (*epidermal growth factor*), assim como da via do fator de crescimento de insulina (IGF1R) (Figura 7) (Chen *et al.*, 2016).

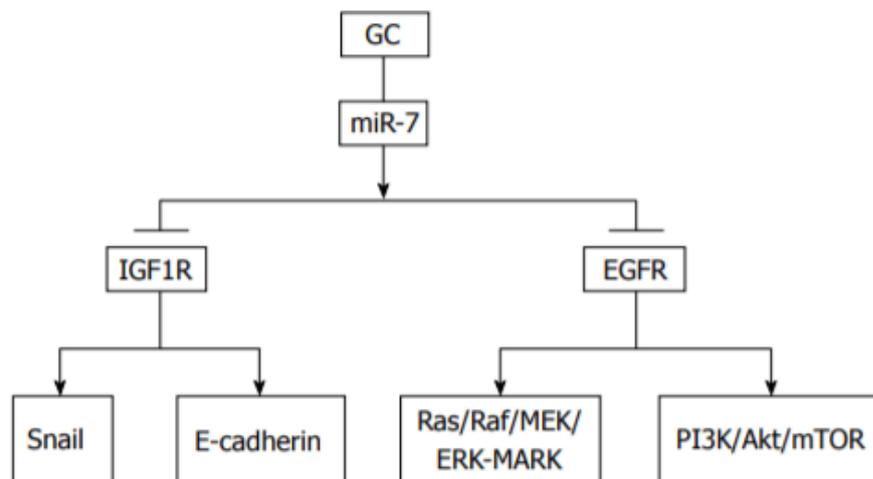


Figura 7: Vias do microRNA-7 no câncer gástrico, atuando nas vias de IGF1R e EGFR. IGF1R: Receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina; EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico; GC: Câncer gástrico; miR-7: MicroRNA-7; PI3K: Fosfoinositido 3-quinase; m-TOR: alvo de rapamicina em mamíferos (Chen *et al.*, 2016).

Na neoplasia de pâncreas foi observado que o miR-7 funciona como um supressor tumoral pois diminui a expressão da proteína oncogênica ILF2 (fator de interleucina-2), que regula genes relacionados à transição epitélio-mesenquimal (Bi *et al.*, 2017). Similarmente, foi

identificado o papel do miR-7 como supressor tumoral no câncer de próstata, atuando na via PI3K/Akt (Chang *et al.*, 2015).

No hepatocarcinoma (HCC), vários estudos mostraram que o miR-7 participa de diversas vias reguladoras. De acordo com Fang *et al.* (2012), o miR-7 regula a via PI3K/Akt/mTorin *in vitro* e *in vivo*, regulando assim a proliferação celular e metástase. Em outro estudo, o miR-7 foi capaz de regular a via do EGFR, a qual é geralmente superexpressa em tumores epiteliais (Webster *et al.*, 2009). O miR-7 também foi capaz de inibir o crescimento do glioblastoma regulando o substrato do receptor da insulina 2 (IRS2) através da via EGFR/IRS2/Akt (Kefas *et al.*, 2008).

O câncer de cólon (CRC) é caracterizado por diversas mutações de genes como *TP53*, *APC*, *PIK3CA* e *BRAF* (Kaemmerer *et al.*, 2013). O miR-7 tem como alvo genes conhecidos na carcinogênese deste tumor, como o *EGFR* e *RAF1*, e a diminuição de expressão do miR-7 está relacionada com o desenvolvimento do CRC e com pior prognóstico (Suto *et al.*, 2015).

1.4.2 miRNA-155

O miR-155 tem sido implicado no desenvolvimento de múltiplos tumores sólidos, e está comumente hiperexpresso em malignidades sólidas e hematológicas, e tem sido associado ao desenvolvimento de diversos tumores como leucemia, mama, pulmão e colón. Por este motivo, tem se mostrado um alvo importante para o diagnóstico, prognóstico e terapia (Bandrés *et al.*, 2006; Higgs e Slack, 2013; Hammond, 2015). Contudo, no câncer gástrico este gene tem demonstrado exercer um papel de supressor tumoral (Li, S. *et al.*, 2018).

A superexpressão do miR-155 inibiu a proliferação de células CG e promoveu a apoptose, atuando na via do gene *MAP3K10*, a qual está correlacionada com a regulação de apoptose, enquanto a diminuição da expressão do miR-155 promoveu a proliferação de células CG e diminuiu a sensibilidade das células CG à cisplatina, reforçando seu papel de supressor tumoral na tumorigênese do CG (Figura 8) (Li, S. *et al.*, 2018).

Similarmente, Li *et al.* (2012), com objetivo de melhor explorar o papel do miR-155 no CG, identificaram *in vitro* que a super-expressão de miR-155 em células de CG foi capaz de suprimir a migração celular, invasão e aderência, sugerindo um papel no desenvolvimento da metástase.

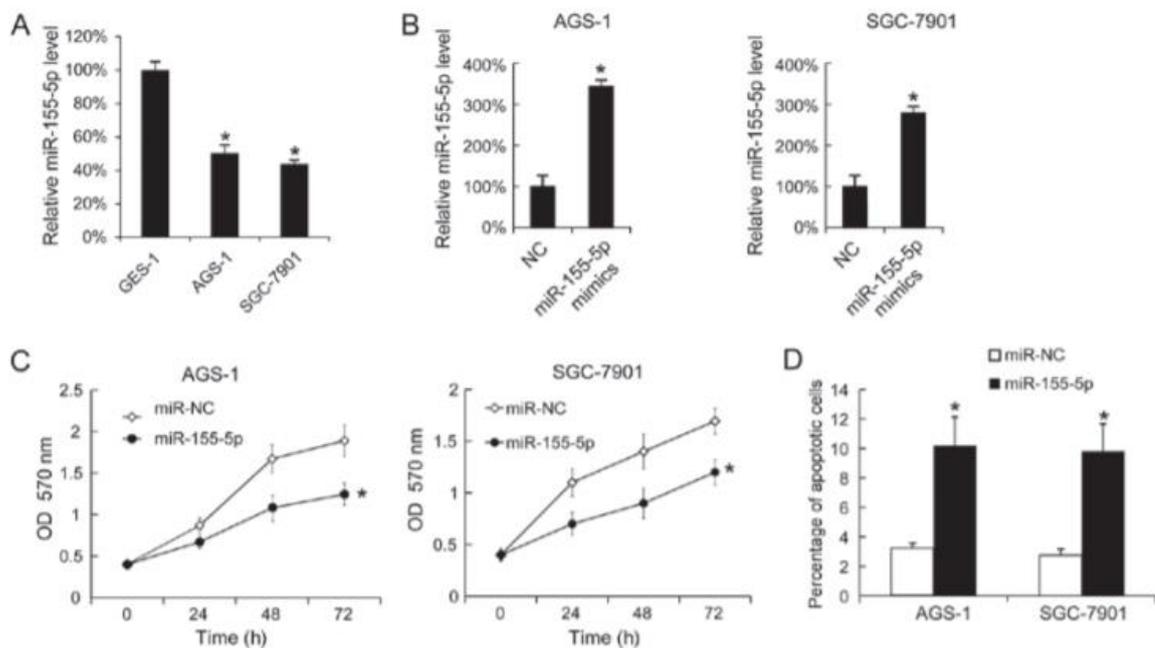


Figura 8: miR-155 inibe a proliferação de células AGS-1 e SGC-790, e promove a apoptose. (A) O nível de expressão de miR-155 em células GES-1 foi arbitrariamente definido como 100% para comparação entre linhas celulares. (B) O nível de miR-155-5p em células miR-NC-transfectadas expressão foi arbitrariamente definida como 100% por comparação com células transfectadas. (C) Um total de 24, 48 e 72 h após a transfecção, a proliferação foi analisada por ensaio MTT. (D) Um total de 48 h após o miR-155-5p imita-transfecção, a apoptose foi medida por coloração de iodeto de Anexina V-propio. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão, e as experiências foram repetidas 3 vezes. * $P < 0,05$ vs. NC NC, controle negativo; ASO, oligonucleótido antisense(Li, S. *et al.*, 2018).

O miR-155 é produzido a partir do processamento do BIC (B-Cell Integration Cluster), que é um transcrito não-codificante expresso em células B ativadas, células T, monócitos e macrófagos (Higgs e Slack, 2013).

Acredita-se que o miRNA-155, que está com expressão aumentada em resposta ao *H. pylori*, atua diminuindo a resposta imune e inflamatória contra a bactéria, agindo como um regulador negativo, e, assim, diminuindo a atividade de NF- κ B, através do complexo MyD88 e as proteínas adaptadoras (IRAK-1 e TRAF6) da cascata de sinalização de TLRs (receptores semelhantes a toll) e através da redução da expressão do seu gene alvo IKK (Figura 9) (Xiao *et al.*, 2009; Zabaglia, 2017).

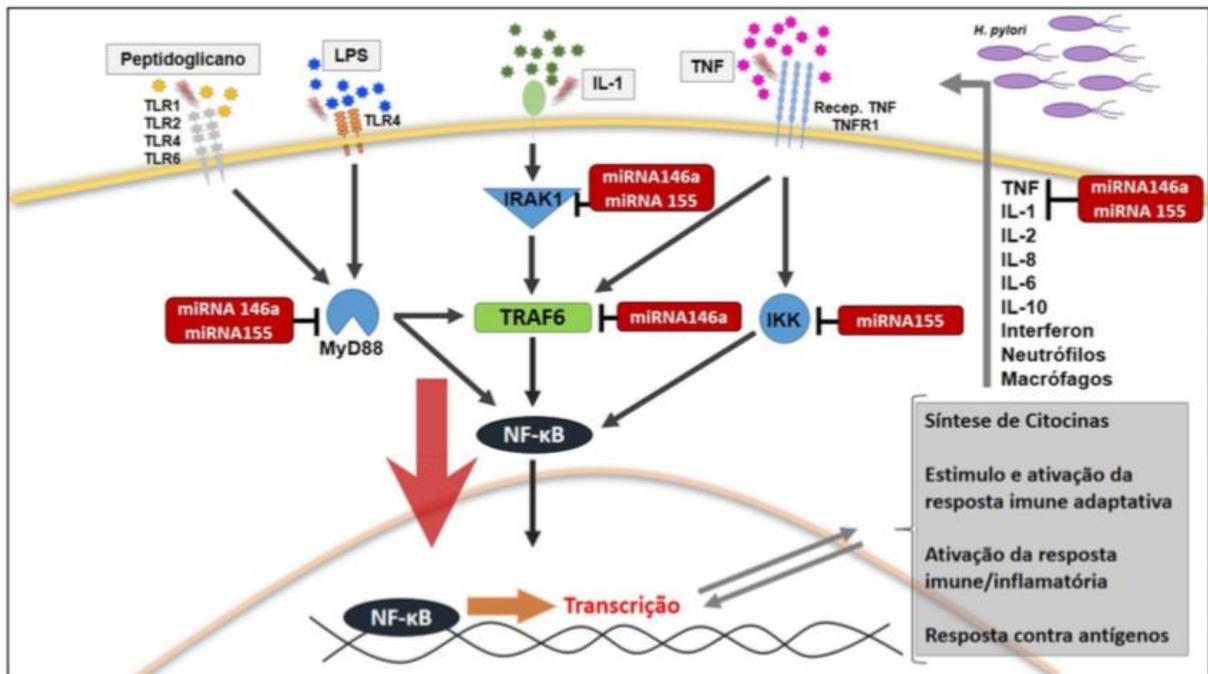


Figura 9: Esquema ilustrando as vias de atuação dos microRNAs 146a e 155 com seus genes alvos (Zabaglia *et al.*, 2018).

Yang *et al.* (2014) conduziram um estudo com 40 pacientes com câncer colo-retal e foi observado maior expressão do miR-155 no tumor quando comparado com tecido adjacente; além disso pode-se correlacionar a expressão do 155 com estadiamento linfonodal e de Dukes, sugerindo um possível fator preditor de estadiamento.

No câncer de mama, o miR-155 também parece atuar como oncomiR, visto que sua super expressão estava correlacionada com a ativação da via STAT3 (*transdutor de sinal e ativador de transcrição 3*) e com a estimulação de células de câncer de mama por citocinas inflamatórias (Jiang *et al.*, 2010).

1.4.3 miRNA-135b

Vidal *et al.* (2016) avaliaram a expressão de miRNAs na mucosa gástrica em diferentes estágios da carcinogênese e observaram potenciais biomarcadores da carcinogênese gástrica, incluindo o miR-29c e o miR-135b. A expressão do miR-29c se apresentou progressivamente menor conforme o dano da mucosa gástrica, enquanto o miR-135b apresentou valores maiores na gastrite atrófica e metaplasia intestinal quando comparados com a mucosa normal e no tecido com câncer gástrico.

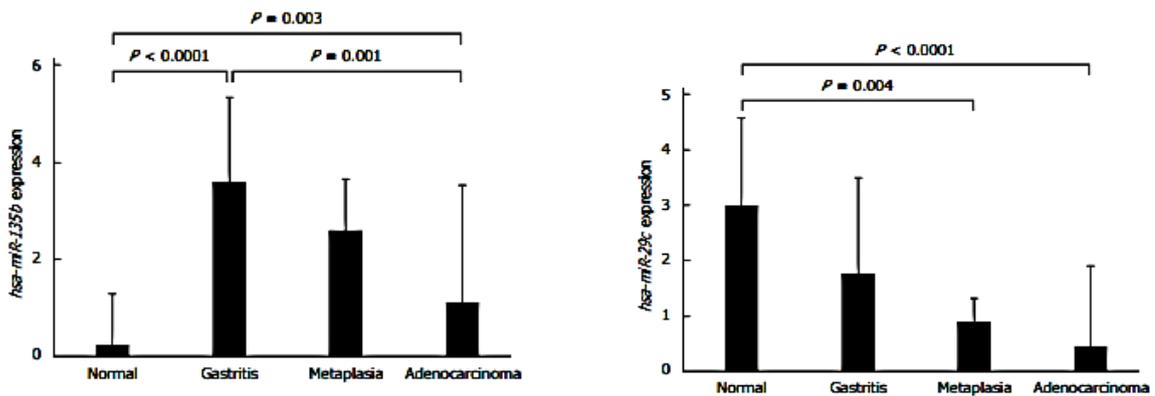


Figura 10: Valores de expressão para miR-135b e miR-29c em amostras de gastrite crônica não-atrótica de mucosa normal, metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (Valores em Escala Logarítmica), p valor obtido pelo teste do ANOVA(Vidal *et al.*, 2016).

O miR-135b está envolvido na progressão de diversos tumores (Arigoni *et al.*, 2013). Shao *et al.* (2018) observaram um aumento da expressão do miR-135b em tecido de câncer gástrico quando comparado ao tecido saudável, além de correlacionar com uma maior resistência ao tratamento quimioterápico (cisplatina).

De acordo com Lu *et al.* (2018), no câncer gástrico, a superexpressão do mir-135b inibiu a via do *CMTM3*, um gene que atua como supressor tumoral em diversos tumores e atua na supressão de metástase e progressão da transição epitélio-mesenquimal, desta forma promovendo a progressão do CG e desenvolvimento de metástases.

No câncer de pulmão, foi identificada a superexpressão do miR-135b, uma desregulação capaz de promover invasão celular e metástases *in vitro* e *in vivo*, tendo como alvo a via hippo, e assim regulando os genes *LATS2*, *β -TrCP*, *NDR2* e *LZTS1* (Lin *et al.*, 2013).

No entanto, apesar de ser descrito como oncomiR, no osteossarcoma, o miR-135b foi identificado como supressor tumoral, pois foi observada a diminuição da expressão do miR-135b no tecido tumoral (de 80 amostras) e em linhagem celular. Adicionalmente, foi identificado o gene *MYC* como um alvo direto do miR-135b. Este gene está relacionado com o desenvolvimento de vários tumores e contribui para a invasão celular, migração e metástase (Liu *et al.*, 2014).

1.4.4 miRNA-29c

O miR29c é descrito como um supressor tumoral em diferentes tumores. No CG, em um estudo conduzido recentemente, observou-se menor expressão deste microRNA em tecido de câncer gástrico (67 pacientes,9 linhagens celulares de CG); além de demonstrar que a super-

expressão do miR-29c inibiu a proliferação e promoveu apoptose na fase G₁/G₀ do ciclo celular, sugerindo um novo biomarcador para esta neoplasia (Yu *et al.*, 2017).

Similarmente, Li, J. *et al.* (2018) relataram a diminuição da expressão do miR-29c em amostras de câncer de próstata quando comparado com tecido normal, além de uma relação negativa com escore de Gleason (prognóstico) e estágio da doença, podendo ser considerado um marcador de progressão do câncer de próstata. Adicionalmente, o SLC2A3 foi identificado como um alvo direto do miRNA-29c, o qual está relacionado com o metabolismo da glicólise em câncer.

Em câncer de pulmão, o miR-29c também é descrito como supressor tumoral. Em um estudo nessa população, os pacientes que apresentavam maior expressão de miR-29c tiveram maior sobrevida livre de progressão e responderam melhor ao tratamento com cisplatina (Figura 12) (Sun *et al.*, 2018).

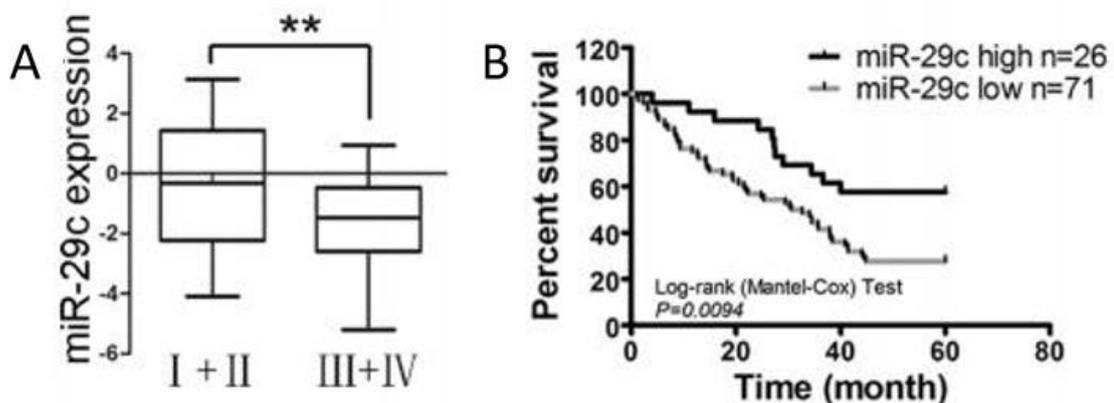


Figura 11: A expressão de miR-29c no cancer de pulmão. A) O nível relativo de miR-29c no estágio pTNM inicial (I + II) e pacientes com estágio pTNM avançado (III + IV) analisados por qRT-PCR. B) Curva de sobrevida de Kaplan-Meier. Os estudos foram realizados com 97 dos 130 pacientes com câncer de pulmão de células não-pequenas submetidos a quimioterapia após a ressecção e as informações de sobrevida (Sun *et al.*, 2018).

No câncer de mama, Li *et al.* (2018) observaram uma relação com a progressão do câncer de mama e níveis decrescentes do miR-29c, sugerindo também um papel de supressor tumoral e tendo como alvo a via TIMP3/STAT1/FOXO1, que está relacionada com proliferação celular e migração (Figura 12).

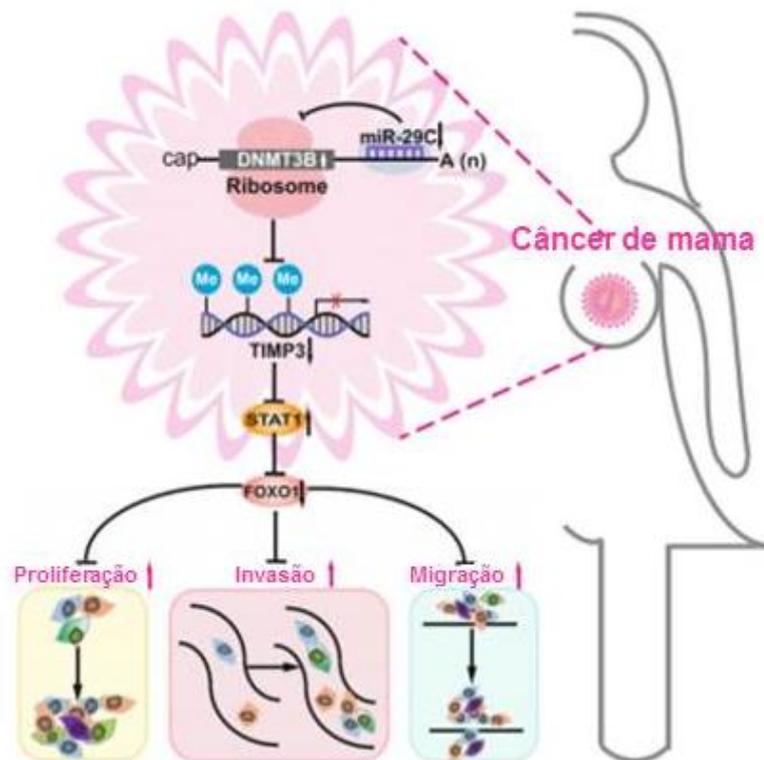


Figura 12: O miR-29c suprime o câncer de mama pela via TIMP3/STAT1/FOXO1. A expressão de miR-29c foi diminuída no câncer de mama, o que levou à expressão elevada de DNMT3B, que é crítica para a metilação do promotor e diminui a expressão de TIMP3. Como resultado, a expressão de STAT1 foi aumentada e inibiu a expressão de FOXO1, levando à proliferação, migração e invasão de células de câncer de mama (Li, W. *et al.*, 2018).

No sistema geniturinário, o miR-29c é mais expresso no tecido normal e diminuído nas neoplasias como de bexiga e rim (Wang *et al.*, 2010; Heinzelmann *et al.*, 2011). E, no câncer colo-retal, o miR-29c suprimiu a migração celular e a habilidade de invasão *in vitro* das células cancerígenas, regulando negativamente a transição epitélio-mesenquimal (Zhang *et al.*, 2014).

Levando em consideração o exposto acima, é importante ressaltar que apesar de estar bem descrita na literatura a importância das alterações epigenéticas no desenvolvimento e na progressão do câncer gástrico, não existem estudos que investiguem os efeitos da ingestão de água alcalina sobre as alterações epigenéticas envolvidas na carcinogênese gástrica. Por este motivo, este trabalho visa avaliar a expressão dos microRNAs miR-29c, miR-7, miR-155, miR-135b no tecido gástrico de pacientes com gastrite antes e depois do consumo de água alcalina, no intuito de entender de que forma a mudança deste hábito pode influenciar na modulação da expressão destes microRNAs, assim como nas características clinicopatológicas dos pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a relação entre o consumo de água de pH alcalino e alterações epigenéticas e histopatológicas compatíveis com alterações inflamatórias da mucosa gástrica.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a expressão dos microRNAs miR-29c, miR-7, miR-155, miR-135b no tecido gástrico de pacientes com gastrite antes e depois do consumo de água alcalina por 4 meses;

Avaliar as alterações histopatológicas e endoscópicas no tecido gástrico de pacientes com gastrite antes e depois do consumo de água alcalina por 4 meses;

Correlacionar os resultados observados com as características clinicopatológicas dos pacientes estudados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos indivíduos acima de 35 anos, diagnosticados com gastrite por meio de exame anatomopatológico.

3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos: I) todos os pacientes com história prévia de câncer; II) história familiar positiva de câncer gástrico; III) indivíduos que façam uso rotineiro de água alcalina; III) indivíduos que não aceitem preencher o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE - Anexo 1); IV) indivíduos que apresentarem doença cardiovascular ou qualquer outra doença crônica não transmissível que possa acarretar em risco para realização de EDA com menos de 6 meses; V) critérios endoscópicos de erradicação imediata do *H. pylori*: úlcera gástrica e/ou duodenal passada ou presente com ou sem complicações; linfoma MALT gástrico; gastrite atrófica ou desejo do paciente; ou VI) uso de antiácidos recentes ou no momento da pesquisa.

3.3 Amostra e amostragem

Foram recrutados um total de 50 indivíduos, incluídos no trabalho *H. pylori* positivo e negativo. A amostragem foi o tipo não probabilística, por conveniência, com indivíduos de centro de realização de EDA, realizadas na Clínica Oncológica Brasil.

Dos 50 indivíduos recrutados apenas 28 completaram o estudo, com os dois exames de endoscopia digestiva alta, antes e após o consumo da água com pH alcalino.

A frequência absoluta e relativa das variáveis qualitativas avaliadas dos indivíduos deste trabalho, antes e após o consumo da água alcalina, encontram-se na tabela 1 e na tabela 2.

Tabela 1: Análise descritiva das variáveis qualitativas de pacientes com gastrite antes do consumo da água alcalina em Belém do Pará

Variável	N	%
Sexo		
Masculino	5	17,86
Feminino	23	82,14

H. pylori 1º exame		
Negativo	20	71,43
Positivo	8	28,57
Classificação de Sydney 1º exame		
Leve	2	7,14
Moderado	26	92,86
Quantidade de líquidos ingeridos por dia		
500 mililitros	1	3,57
1 litros	6	21,43
1 litros - 1,5 litros	10	35,71
2 litros	6	21,43
Mais que 2 litros	2	7,14
Não responderam	3	10,72
Tipo de água ingerido por dia		
Abastecimento público filtrada	6	21,43
Mineral com gás	1	3,57
Mineral sem gás	14	50
Poço artesiano filtrada	4	14,28
Não responderam	3	10,72
Ingestão alcoólica		
Não	11	39,28
Sim	14	50
Não responderam	3	10,72
Frequência de bebida alcoólica		
Uma vez por semana	1	3,57
Finais de semana	13	46,43
Não responderam	14	50
Volume de álcool		
500 mililitros	11	39,29
2 litros	2	7,14
Não responderam	15	53,57
Tipo de álcool		
Cerveja	8	28,57
Vinhos e outros destilados	6	21,43
Não responderam	14	50
Prática de atividade física		
Não	7	25,01
Sim, às vezes	9	32,14
Sim, regularmente	8	28,57
Não responderam	4	14,28
Fumam		
Não	28	100
Não responderam	0	0
Uso de medicação controlada		

Não	16	57,14
Sim	9	32,14
Não responderam	3	10,72
Tratamento prévio para gastrite		
Nunca realizou	11	39,29
Já realizou	13	46,43
Não responderam	4	14,28

Tabela 2: Análise descritiva das variáveis qualitativas de pacientes com gastrite após o consumo da água alcalina em Belém do Pará

Variável	N	%
Classificação de Sydney 2º exame (retorno)		
Leve	12	42,3
Moderada	16	57,7
H. Pylori 2º exame (retorno)		
Negativo	16	57,14
Positivo	12	42,86

Na tabela 3 é possível observar a mediana e percentis 25%-75% da idade dos sujeitos da pesquisa.

Tabela 3: Análise descritiva das variáveis quantitativas de pacientes com gastrite em Belém do Pará

Variável	Mediana	p25%-75%
Idade	44,5	38,75-52,25

3.4 Intervenção avaliada

Os indivíduos recrutados foram submetidos à ingestão, por livre demanda, de água com pH 8,5-9,0 durante 4 meses. Os filtros para alcalinização da água foram disponibilizados pelos pesquisadores.

3.5 Desfechos avaliados

Para todos os indivíduos recrutados foram realizados a avaliação de expressão de miR-155, miR-7, miR-29c e o miR-135b.

3.6 Coleta de dados

3.6.1 Técnica de endoscopia para coleta do material

Todas as EDAs foram feitas pelo mesmo endoscopista, sendo coletadas amostras: uma do antro pré-pilórica e outra do corpo gástrico e em locais de zonas suspeitas de um possível foco de *H. pylori* (Coelho *et al.*, 2013).

Caso o diagnóstico anatomopatológico comprovasse gastrite, o indivíduo era recrutado para a pesquisa. Nesse momento, foi assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e explicados todos os riscos e benefícios deste projeto. Em sequência, o participante preenchia o formulário de entrada no estudo (Anexo 2).

As amostras coletadas na primeira EDA para a entrada no estudo foram avaliadas para os desfechos propostos. Os indivíduos do grupo intervenção receberam a instalação do filtro de alcalinização da água em sua casa, por profissional capacitado. O mesmo foi instruído a utilizar a água de maneira completa em sua rotina doméstica, por livre demanda.

Cada participante realizava o consumo da água por 4 meses. Após esse período, todos os indivíduos foram submetidos a uma nova EDA em que eram avaliados novamente os parâmetros anatomopatológicos e os desfechos propostos.

Após a intervenção e o término da pesquisa todos os indivíduos foram encaminhados para consulta com gastroenterologista. Não houve armazenamento do material, pois o mesmo foi todo utilizado apenas para os testes propostos.

Os dados referentes a todas as variáveis coletas foram armazenados em banco de dados no programa Microsoft Excel.

3.7 Aspectos éticos

Os pesquisadores submeteram o trabalho à Plataforma Brasil e o mesmo foi aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa, com o seguinte número do parecer 2.033.180.

3.8 Extração de RNA

O RNA total foi extraído utilizando o kit miRVanamiRNAisolation (Ambion, Texas, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de RNA foram determinadas pelo espectrofotômetro SpectraMax i3 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA), sendo usada a concentração de maior que 10 como padrão, e a integridade do RNA foi verificada em gel de agarose.

3.9 PCR em tempo real para avaliação da expressão de miRNAs

Para detecção da expressão dos miRNAs, a transcrição reversa foi realizada a partir das amostras de RNA total (TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies, Foster City, CA), seguida por reação de PCR em tempo real com *primers* comerciais específicos (TaqMan MicroRNA Assays, Life Technologies, Foster City, CA). Todos os ensaios seguiram estritamente as recomendações do fabricante e foram realizados em quadruplicata.

Os endógenos utilizados para a normatização foram o RNU6B, o mir-101 e o mir-1403p, que foram selecionados após análise de dados disponíveis na literatura (Ribeiro-Dos-Santos *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2015; Anauate *et al.*, 2017).

As condições de reação seguiram as recomendações do fabricante (95°C por dez minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto) com volume final de 20 µl.

Após a expressão de cada miRNA ser normalizada com os endógenos, o Ct normalizado foi comparado com o Ct do calibrador, de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O calibrador foi composto por uma mistura de cinco amostras de tecido coletadas de pacientes que não apresentaram gastrite.

3.10 Padronização e Ajuste dos miRNAs

Ao início da análise, 4 indivíduos foram excluídos devido à infecção aguda por *H. pylori* durante o período de acompanhamento do estudo, já que a infecção por este microrganismo pode afetar a expressão de miRNAs da mucosa gástrica. Para todas as amostras restantes da primeira e segunda EDA, antes e depois da ingestão de água alcalina,

respectivamente, foram realizados conjuntos de triplicatas ou quadruplicatas de CTs para cada miRNA alvo (mir-7, mir-155c, mir-29c e mir-135) e endógenos (RNU6b, mir-1403p). Nesse ponto, um indivíduo foi excluído pois não foi possível a avaliação por PCR na segunda EDA. Para todos os outros indivíduos foram realizados os cálculos das médias e seus desvios padrões para as triplicatas ou quadruplicatas dos CTs. Após essa avaliação, foram realizados os cálculos dos coeficientes de variação (CV) para cada sujeito. Para aqueles miRNAs alvos ou endógenos que apresentavam $CV > 4\%$, foi avaliado a diferença de cada CT para a média das quadruplicatas. Aqueles CTs que apresentaram maior diferença para a média foram excluídos da análise final. Para aqueles miRNAs que foram realizados somente triplicatas e apresentaram $CV > 4\%$, os indivíduos foram excluídos da análise final.

Após este primeiro ponto, foram realizados novamente os cálculos das médias, desvios padrões e CVs, com a retirada dos CTs mais discrepantes e indivíduos com maior variação de CT. Aqueles que mesmo com a retirada dos CTs mais discrepantes ainda permaneceram com $CV > 4\%$ foram retirados da análise.

Foram escolhidas as médias dos miRNAs endógenos RnU6B e 1403p para normalização (Anauate *et al.*, 2017).

Em seguida foi realizado o cálculo do $2^{-\Delta CT}$ para cada miRNA alvo ($\Delta CT =$ média padronizada CT miRNA alvo – média padronizada das médias dos miRNAs endógenos RnU6B e mir1403p) das EDAs antes e depois da ingestão de água alcalina.

3.11 Análise de dados

As variáveis qualitativas clínico-epidemiológicas foram descritas por meio de suas frequências absolutas e relativas. A variável quantitativa “idade” (Shapiro wilk $< 0,05$) foi descrita por meio de mediana e percentis 25%-75%. Para avaliação da correlação entre as variáveis categóricas foi utilizado o teste Exato de Fisher.

Para avaliação da associação entre o $2^{-\Delta CT}$ da primeira e da segunda EDAs, primeiramente foi avaliado distribuição das variáveis pelo teste de Shapiro Wilk ($p > 0,05$). Para todas as avaliações os $2^{-\Delta CT}$ não apresentaram distribuição normal. Dessa forma, foi realizado teste de correlação de Wilcoxon com alfa significativo $< 5\%$. As análises foram realizadas por dois pesquisadores nos softwares Stata 11.0 e BioStat.

4. RESULTADOS

Entre maio de 2017 e fevereiro de 2018, um total de 50 pacientes foram recrutados após a confirmação de gastrite por EDA, para trocar o tipo do consumo de uma água com pH ácido ($\text{pH} < 6$) para uma água com pH alcalino (pH entre 8 e 9). Após 4 meses de acompanhamento, 28 pacientes realizaram a segunda EDA, apenas estes entrando nas análises.

Os resultados demonstraram uma melhora endoscópica da gastrite ($p=0,024$), tabela 4, uma vez que 12 pacientes (43%) que foram diagnosticados com gastrite moderada na primeira EDA, apresentaram na segunda EDA (retorno após o consumo da água alcalina) gastrite leve (tabela 4). Além de não haver nenhum paciente com piora da gastrite.

Tabela 4: Avaliação da classificação de Sidney entre as endoscopias em pacientes com gastrite em Belém do Pará.

Classificação de Sidney 1ª EDA	Classificação de Sidney 2ª EDA (retorno)	
	Leve	Moderada
	N (%)	N (%)
Leve	2 (7%)	0
Moderada	12 (43%)	14 (50%)

Teste Exato de Fisher, $p = 0,0024$.

A figura 11 ilustra a avaliação da associação entre os $2^{-\Delta\text{CT}}$ dos microRNAs alvo do estudo, antes e depois do consumo da água alcalina por 4 meses (primeira e segunda EDAs).

Sendo as médias obtidas: para o miR155c na primeira EDA de 12,11 e na 2 EDA de 24,11 ($p=0.130$), do miR135 na primeira EDA de 7,74 e na 2 EDA de 15,70 ($p=0.192$), do miR29c na primeira EDA de 31,14 e na 2 EDA de 64,80 ($p=0.217$) e do miR7 na primeira EDA de 3,6 e na 2 EDA de 10,85 ($p=0.098$).

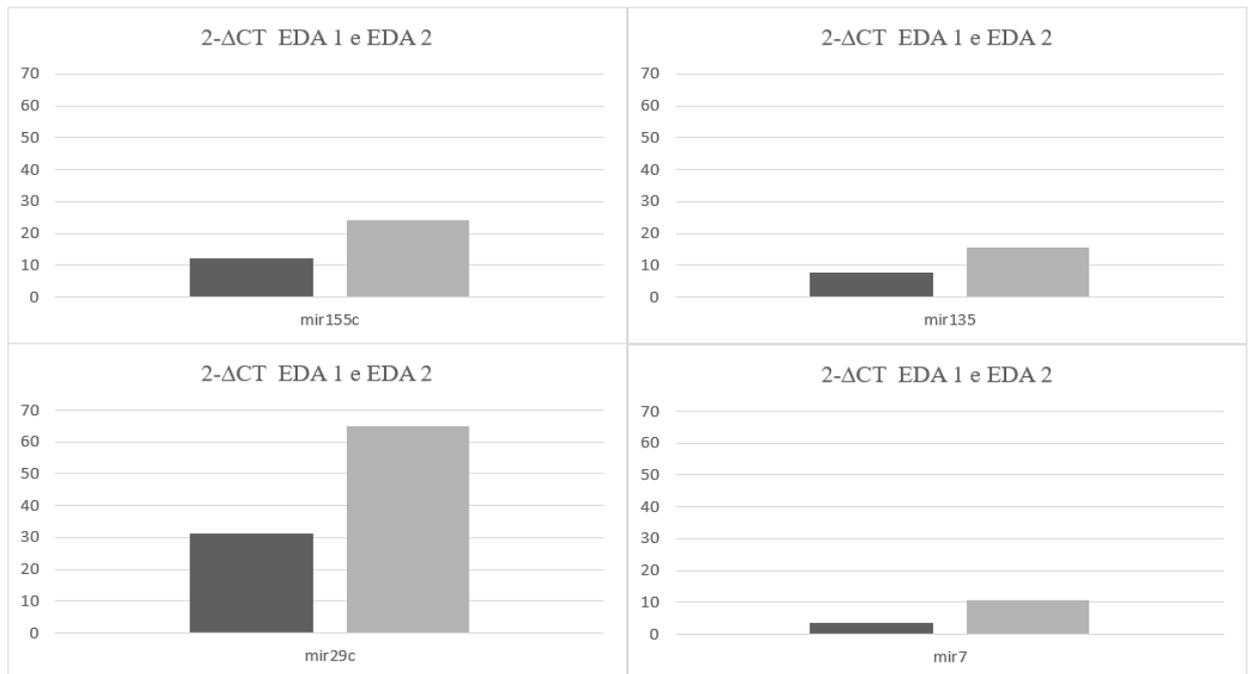


Figura 14: Comparação entre níveis de expressão do miR-155; miR135; miR29c e miR7 antes(primeira EDA) e depois(segunda EDA) do consumo da água alcalina.

A figura 15 representa a análise com FoldChange, do $2^{-\Delta CT}$ dos microRNAs alvo do estudo, antes e depois do consumo da água alcalina por 4 meses (primeira e segunda EDAs), para cada microRNA alvo com valor superior a um.

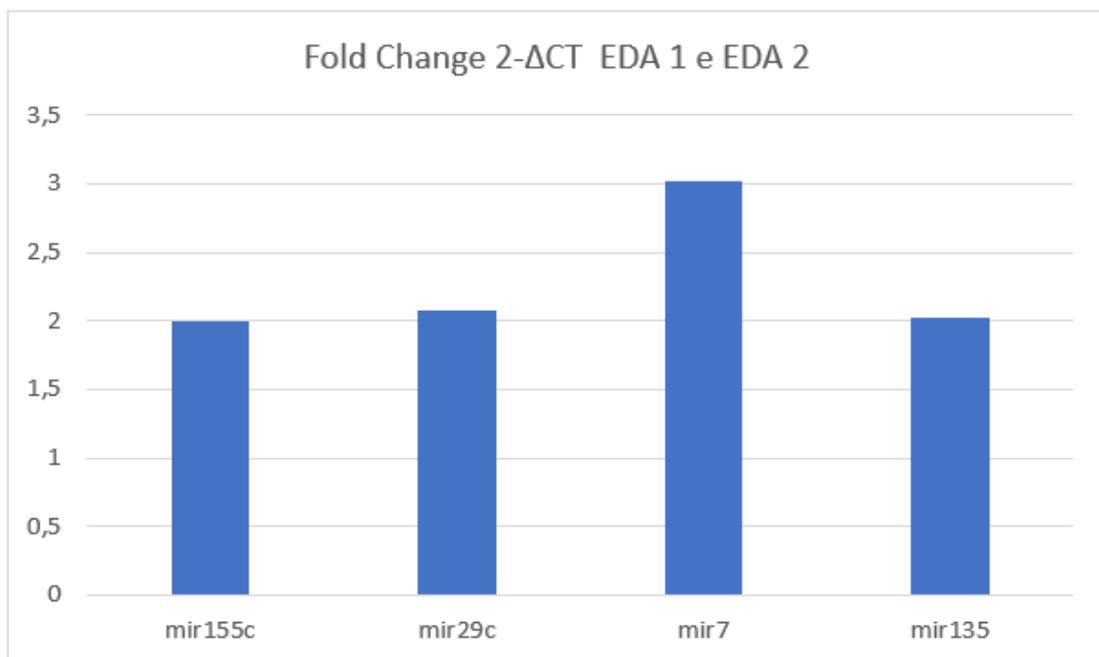


Figura 15: FoldChange dos micro-RNA alvo do estudo, antes e depois do consumo da água alcalina por 4 meses.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi comparada a expressão de quatro microRNAs antes e após o consumo de água alcalina (pH =8 a 9), com objetivo de avaliar os efeitos a longo prazo em pessoas que consumiam anteriormente água com pH ácido (<5). Os alvos epigenéticos escolhidos são frequentemente desregulados no câncer gástrico e alterados em tecidos com inflamação, como ocorre na gastrite, sendo assim, potenciais biomarcadores para a carcinogênese da neoplasia gástrica (Xiao *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2012; Vidal *et al.*, 2016; Zabaglia, 2017).

A partir da análise dos resultados do presente estudo foi possível observar uma melhora da gastrite avaliada pela segunda EDA após a intervenção, onde 42% dos pacientes que tinham gastrite moderada na primeira EDA se tornaram leve, na segunda, conforme critérios de Sidney. Vale ainda ressaltar que os pacientes não fizeram tratamento medicamentoso para gastrite no período da intervenção, tendo somente como mudança no período o consumo da água alcalina.

A gastrite é caracterizada como uma condição pré-neoplásica, pois participa da carcinogênese gástrica, nas fases iniciais do processo, seguida pela atrofia gástrica, ulcerações, metaplasia intestinal, displasia e, por fim, neoplasia maligna (Figura 4) (Cotran *et al.*, 1999; Yakirevich e Resnick, 2013; Kishino *et al.*, 2016).

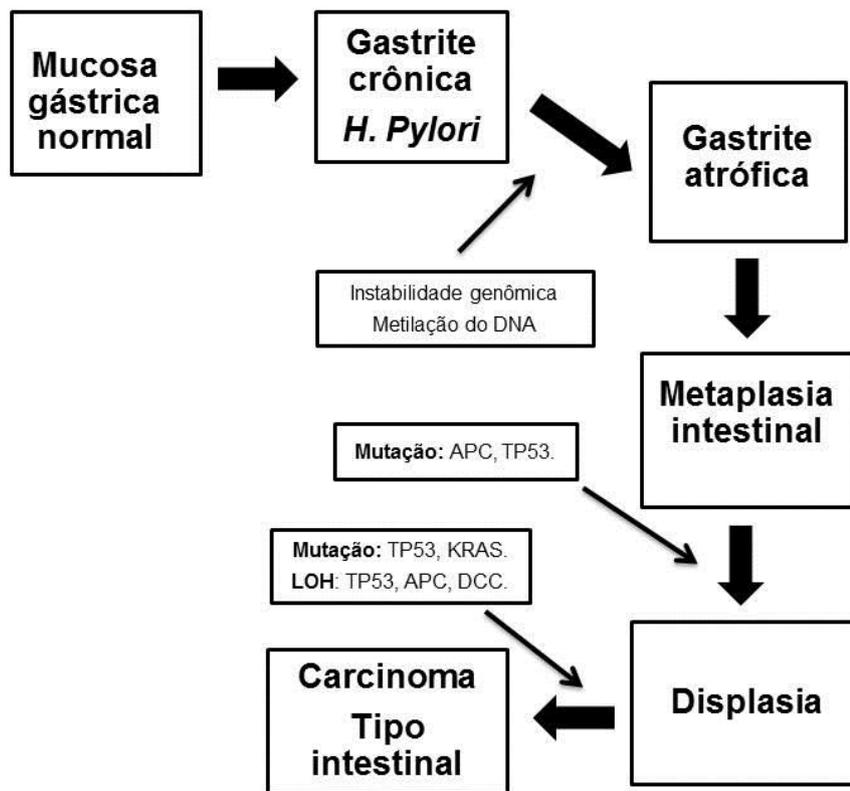


Figura 16: A cascata de Correa da carcinogênese gástrica. O tipo intestinal de câncer gástrico é um processo de múltiplas etapas com múltiplas alterações genéticas e epigenéticas que podem levar anos ou até décadas para se desenvolver (Yakirevich e Resnick, 2013).

Desta forma, a melhora da gastrite observada no presente estudo pode representar um fator protetor da inflamação da mucosa gástrica. Sendo uma medida simples de modificação do hábito de vida, que pode estar atuando positivamente na primeira etapa da cascata de carcinogênese da neoplasia gástrica.

Os inibidores da bomba de prótons (IBP) estão entre os medicamentos mais comumente prescritos no mundo, entretanto, embora sejam geralmente considerados seguros, apresentam diversos efeitos adversos associados ao uso prolongado de IBP, incluindo fratura óssea, pneumonia, infarto do miocárdio e até mesmo acidente vascular cerebral (AVC) (Brusselsaers *et al.*, 2017; Cheung *et al.*, 2018). Os IBPs estão associados ao aumento do risco do desenvolvimento de lesões pré-malignas (pólipos da glândula fúndica, piora da atrofia gástrica e metaplasia) e de câncer gástrico, particularmente em indivíduos infectados pelo *Helicobacter pylori* (HP) e, especialmente, com o uso prolongado (acima de um ano) (Tran-Duy *et al.*, 2016; Brusselsaers *et al.*, 2017; Cheung *et al.*, 2018).

O mecanismo medicamentoso de supressão ácida, a longo prazo, pode interferir na microbiota gástrica e na formação de nitrosaminas, causar gastrite atrófica crônica e aumentar os níveis séricos de gastrina, um potente fator de crescimento, que induz a hiperplasia das células do tipo enterocromafina e que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer gástrico (Tran-Duy *et al.*, 2016; Brusselsaers *et al.*, 2017; Cheung *et al.*, 2018; Waldum *et al.*, 2018). Por razões de comparação, o uso de antagonistas do receptor de histamina 2 (H2RAs), que são usados para indicações similares como IBP, também foi avaliado em diversos estudos, entretanto não foi encontrada a mesma relação que os IBPs (Tran-Duy *et al.*, 2016; Brusselsaers *et al.*, 2017; Cheung *et al.*, 2018).

Assim como o uso da água alcalina não se compara com o mecanismo de ação dos IBP, uma vez que não há inibição da secreção ácida, havendo apenas a menor exposição a substâncias ácidas a uma mucosa que encontra-se danificada pela gastrite.

Além disso houve também um aumento, porém não significativo, da expressão dos quatro microRNAs selecionados, quais sejam miR-7, miR-29c e miR155 e miR-135b após a intervenção por quatro meses.

O miR-29c é comumente descrito como supressor tumoral por inibir a proliferação, invasão e migração de células malignas. A diminuição da expressão desse microRNA têm sido relatada em várias malignidades humanas, como câncer de pâncreas (Lu *et al.*, 2016), câncer de mama (Li, W. *et al.*, 2018), câncer de próstata (Li, J. *et al.*, 2018), câncer hepatocelular (Dong *et al.*, 2016), câncer nasofaríngeo (Niu *et al.*, 2016) e também em câncer gástrico (Matsuo *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2016).

Foi relatado por Han *et al.* (2015) que os níveis de expressão de miR-29c apresentaram-se significativamente diminuídos ($p < 0,001$) em tecidos de câncer gástrico quando comparados com tecido normal. Além disso, foi demonstrado por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* que o aumento da expressão desse miRNA suprimia o crescimento tumoral, através da regulação negativa de *ITGB1* (integrina $\beta 1$, também conhecida como CD29).

Como já descrito anteriormente, os níveis de expressão de miR-29c foram gradativamente menores conforme a evolução do carcinogênese gástrica, nas diferentes etapas da agressão a mucosa, demonstrando uma correlação direta entre a perda de expressão do miR-29c e a tumorigênese desta neoplasia (Vidal *et al.*, 2016).

Foi reportado que a transfecção do precursor do miR-7 nas linhagens celulares de câncer gástrico AZ521 e Kato III inibiu significativamente a capacidade de proliferação das células (Kong *et al.*, 2012).

A via da COX-2/PGE2 é conhecida por desempenhar um papel crucial na tumorigênese gástrica induzida por inflamação. Sendo a COX-2 uma das enzimas responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandina (Smith *et al.*, 1996) e relacionada por mediar respostas inflamatórias (Wang e Dubois, 2006). Sua expressão é estimulada por fatores de natureza diversa, incluindo várias citocinas inflamatórias (IL-1, TNF- α), fatores de crescimento (EGF, TGF- β , PDGF), hormônios (LH, FSH) e carcinogênicos (Smith *et al.*, 1996). Diversas neoplasias revelam níveis elevados de COX-2 e prostaglandinas, assim sugerido que a COX-2 desempenha um papel em alguns processos de transformação maligna (Dubois *et al.*, 1998).

Cao *et al.* (2015) estudaram a via da COX-2 no CG induzido em camundongos e observaram que o miR-7 regulou negativamente a transcrição do gene de COX-2, sugerindo seu papel na resposta inflamatória persistente que gera o desenvolvimento do CG.

Em uma revisão feita sobre o papel do miR-7 no sistema digestivo, pôde-se observar seu papel no trato gastrointestinal em vários órgãos, apresentado diversos alvos de acordo com sítio tumoral primário. No CG, ele suprime duas vias relacionadas com invasão e metástases, a via IGFR1R e EGFR. Enquanto na neoplasia de cólon pode atuar em vários genes e vias oncogênicas assim atuando em muitos processos celulares como, diferenciação, proliferação e apoptose. Baixos níveis de miR-7 nesta neoplasia, são correlacionados com pior prognóstico. (Chen *et al.*, 2016).

O miR-155 é descrito como oncomiR em diversos tumores, porém a expressão dos microRNAs é tecido-específica e varia no mesmo tecido de acordo com a diferenciação e a proliferação celular (Bartel, 2004).

Trata-se de um microRNA que possui um papel importante na regulação do sistema imune (O'connell *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2011). Sendo as células imunes um componente fundamental do microambiente tumoral, ele pode também desenvolver um papel de supressor tumoral em tumores sólidos (Huffaker *et al.*, 2012; Dudda *et al.*, 2013; Zonari *et al.*, 2013).

A diminuição da expressão do miR-155 contribuiu para aceleração no crescimento tumoral *in vivo* e *in vitro*, por aumentar o recrutamento de MDSCs (*células supressoras*

derivadas da linhagem *mielóide*) para o microambiente tumoral(Wang *et al.*, 2015). É conhecido que a progressão neoplásica é sustentada pelo microambiente inflamatório crônico e é caracterizado pela secreção contínua de fatores inflamatórios e infiltração de uma variedade de células, dentre elas o MDSCs representa um importante agente(Umansky e Sevko, 2013).

Xie *et al.* (2014) relataram uma diminuição da expressão do miR-155 em linhagens celulares e em tecidos de câncer gástrico e observaram uma correlação com pior estadiamento patológico (Bormann) no grupo de menor expressão do miR-155, sugerindo seu papel supressor tumoral nesta neoplasia.

Similarmente, Liu *et al.* (2018) sugerem que o miR-155 previne a progressão do câncer e metástase atuando na via do CTHRC1 (collagen triple helix repeat containing 1) no câncer de cólon. No melanoma, Levati *et al.* (2011) demonstraram sua capacidade de inibir proliferação em linhagens celulares de melanoma, regulando negativamente a via de um conhecido oncogene do melanoma, o *SKI*.

O miR135b descrito na literatura como oncomiR na maioria dos tecidos tumorais como no câncer de colón(Valeri *et al.*, 2014), câncer de pulmão(Li *et al.*, 2014), câncer oral (Lopes *et al.*, 2018) e câncer de mama(Arighi *et al.*, 2013). Porém poucos estudos avaliam seu papel no tecido gástrico, Vidal *et al.* (2016), observaram que expressão do miR135b estava aumentada em lesões gástricas quando comparadas com mucosa gástrica normal.

No entanto também foi descrito como supressor tumoral no osteossarcoma, no qual foi identificado o gene *MYC* como seu alvo direto e este relacionado com a progressão de diversos tumores(Liu *et al.*, 2014). Assim como, no câncer de próstata, Wang *et al.* (2016), observaram diminuição da expressão do miR135b em tecidos com câncer de próstata quando comparados com tecidos normal, agindo como supressor tumoral, por inativar a via STAT6, conhecida como oncogênica em diversos tumores.

No presente estudo foi identificado um aumento, porém não significativo da expressão de mi7, miR-29c e mir-155 que possuem um papel de supressor tumoral em diversos tumores incluindo no CG (Chen *et al.*, 2016), sugerindo um possível efeito favorável do consumo da água não acida (alcalina).

Similarmente, houve um aumento do miR135b descrito como oncomiR na maioria dos tumores, porém também descrito como tsmiR no osteosarcoma e neoplasia de próstata, não

podendo definir que tal aumento seja prejudicial à saúde do paciente, uma vez que seu papel na carcinogênese é controverso e existem poucos dados do seu papel no tecido gástrico.

Para as avaliações de expressão, embora tenhamos detectado diferenças entre as EDA, a falta da significância estatística observada pode ser justificada pelo pequeno número de participantes que finalizaram a pesquisa.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou uma intervenção do hábito de vida em pacientes com a alteração mais precoce desta cascata, a gastrite, e pôde-se observar que a alteração do pH da água ingerida por 4 meses foi capaz de melhorar a gastrite clinicamente, e parece ter uma tendência ao aumento de expressão de microRNAs considerados benéficos no processo de carcinogênese em câncer gástrico.

Desta forma, o atual estudo, serve como gerador de hipóteses e como questionamento sobre qual será o pH ideal das bebidas consumidas com regularidade como a água, podendo servir como base para estudos maiores e randomizados.

REFERÊNCIAS

ABÓS-HERRÀNDIZ, R. et al. Risk factors of mortality from all asbestos-related diseases: a competing risk analysis. **Canadian respiratory journal**, v. 2017, 2017. ISSN 1198-2241.

ANAUATE, A. C. et al. Identification of suitable reference genes for miRNA expression normalization in gastric cancer. **Gene**, v. 621, p. 59-68, 2017. ISSN 0378-1119.

ARIGONI, M. et al. miR-135b coordinates progression of ErbB2-driven mammary carcinomas through suppression of MID1 and MTCH2. **The American journal of pathology**, v. 182, n. 6, p. 2058-2070, 2013. ISSN 0002-9440.

AZZARITO, T. et al. Effect of modified alkaline supplementation on syngenic melanoma growth in CB57/BL mice. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0159763, 2016. ISSN 1932-6203.

BANDRÉS, E. et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. **Molecular cancer**, v. 5, n. 1, p. 29, 2006. ISSN 1476-4598.

BARCHITTA, M. et al. LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e109478, 2014. ISSN 1932-6203.

BARSTAD, B. et al. Intake of wine, beer and spirits and risk of gastric cancer. **European journal of cancer prevention**, v. 14, n. 3, p. 239-243, 2005. ISSN 0959-8278.

BARTEL, B.; BARTEL, D. P. MicroRNAs: at the root of plant development? **Plant physiology**, v. 132, n. 2, p. 709-717, 2003. ISSN 0032-0889.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004. ISSN 0092-8674.

BEASLEY, R. P. et al. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22 707 men in Taiwan. **The Lancet**, v. 318, n. 8256, p. 1129-1133, 1981. ISSN 0140-6736.

BHUJWALLA, Z. et al. Combined vascular and extracellular pH imaging of solid tumors. **NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In Vivo**, v. 15, n. 2, p. 114-119, 2002. ISSN 0952-3480.

BI, Y. et al. MicroRNA-7 functions as a tumor-suppressor gene by regulating ILF2 in pancreatic carcinoma. **International journal of molecular medicine**, v. 39, n. 4, p. 900-906, 2017. ISSN 1107-3756.

BRASIL, M. D. S. Portaria nº 2.194, de 12 de dezembro de 2011. **Brasília, DF**, 2011.

BRUSSELAERS, N. et al. Maintenance therapy with proton pump inhibitors and risk of gastric cancer: a nationwide population-based cohort study in Sweden. **BMJ open**, v. 7, n. 10, p. e017739, 2017. ISSN 2044-6055.

CAIRNS, R.; PAPANDREOU, I.; DENKO, N. Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. 2, p. 61-70, 2006. ISSN 1541-7786.

CAO, D. et al. Canolol inhibits gastric tumors initiation and progression through COX-2/PGE2 pathway in K19-C2mE transgenic mice. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120938, 2015. ISSN 1932-6203.

CASTLE, P. E. et al. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 18, p. 1406-1414, 2002. ISSN 1460-2105.

CHANG, Y.-L. et al. MicroRNA-7 inhibits the stemness of prostate cancer stem-like cells and tumorigenesis by repressing KLF4/PI3K/Akt/p21 pathway. **Oncotarget**, v. 6, n. 27, p. 24017, 2015.

CHEN, A. et al. Activation of GPR4 by acidosis increases endothelial cell adhesion through the cAMP/Epac pathway. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e27586, 2011. ISSN 1932-6203.

CHEN, W.-Q. et al. Role of microRNA-7 in digestive system malignancy. **World journal of gastrointestinal oncology**, v. 8, n. 1, p. 121, 2016.

CHEUNG, K. S. et al. Long-term proton pump inhibitors and risk of gastric cancer development after treatment for *Helicobacter pylori*: a population-based study. **Gut**, v. 67, n. 1, p. 28-35, 2018. ISSN 0017-5749.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process—first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. **Cancer research**, v. 52, n. 24, p. 6735-6740, 1992. ISSN 0008-5472.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Red cells and bleeding disorders. **Robbins Pathologic Basis of Disease (6th edition)**. WB Saunders Company, Philadelphia, p. 638-640, 1999.

CRAVO, M. et al. Global DNA hypomethylation occurs in the early stages of gastric carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 108, n. 4, p. A458, 1995. ISSN 0016-5085.

DIPPOLD, R. P. et al. Chronic Ethanol Feeding Alters mi RNA Expression Dynamics During Liver Regeneration. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 37, p. E59-E69, 2013. ISSN 0145-6008.

DONG, C. et al. Low miR-29c expression is a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 3, 2016.

DONG, L. et al. Acidosis activation of the proton-sensing GPR4 receptor stimulates vascular endothelial cell inflammatory responses revealed by transcriptome analysis. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61991, 2013. ISSN 1932-6203.

DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **The FASEB journal**, v. 12, n. 12, p. 1063-1073, 1998. ISSN 0892-6638.

DUDDA, J. C. et al. MicroRNA-155 is required for effector CD8⁺ T cell responses to virus infection and cancer. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 742-753, 2013. ISSN 1074-7613.

FANG, Y. et al. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 1852-1862, 2012. ISSN 1527-3350.

FENTON, T. R.; HUANG, T. Systematic review of the association between dietary acid load, alkaline water and cancer. **BMJ open**, v. 6, n. 6, p. e010438, 2016. ISSN 2044-6055.

FERLAY, J. et al. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2012. ISSN 0007-9235.

FERLAY, J. et al. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. **Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase**, n. 10, 2012.

FISCHER, B. et al. Acidic pH inhibits non-MHC-restricted killer cell functions. **Clinical Immunology**, v. 96, n. 3, p. 252-263, 2000. ISSN 1521-6616.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 11, p. 891, 2004. ISSN 1474-1768.

GILES, K. M. et al. microRNA-7-5p inhibits melanoma cell proliferation and metastasis by suppressing RelA/NF- κ B. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 31663, 2016.

GUO, J. et al. Genomic landscape of gastric cancer: molecular classification and potential targets. **Science China Life Sciences**, v. 60, n. 2, p. 126-137, 2017. ISSN 1674-7305.

HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Advanced drug delivery reviews**, v. 87, p. 3-14, 2015. ISSN 0169-409X.

HAN, T.-S. et al. MicroRNA-29c mediates initiation of gastric carcinogenesis by directly targeting ITGB1. **Gut**, v. 64, n. 2, p. 203-214, 2015. ISSN 0017-5749.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. ISSN 0092-8674.

HARDMAN, J.; LIMBIRD, L. Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 10ª edição. **Mc Grawtil**, v. 65, p. 1349-1351, 2003.

HEINZELMANN, J. et al. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. **World journal of urology**, v. 29, n. 3, p. 367-373, 2011. ISSN 0724-4983.

HELMLINGER, G. et al. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 4, p. 1284-1291, 2002. ISSN 1078-0432.

HIGGS, G.; SLACK, F. The multiple roles of microRNA-155 in oncogenesis. **Journal of clinical bioinformatics**, v. 3, n. 1, p. 17, 2013. ISSN 2043-9113.

HUFFAKER, T. B. et al. Epistasis between microRNAs 155 and 146a during T cell-mediated antitumor immunity. **Cell reports**, v. 2, n. 6, p. 1697-1709, 2012. ISSN 2211-1247.

HUMANS, I. W. G. O. T. E. O. C. R. T. **Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori**. International Agency for Research on Cancer, 1994. ISBN 9283212614.

HUNT, R. H. Importance of pH control in the management of GERD. **Archives of internal medicine**, v. 159, n. 7, p. 649-657, 1999. ISSN 0003-9926.

HWANG, H.; DWYER, J.; RUSSELL, R. M. Diet, Helicobacter pylori infection, food preservation and gastric cancer risk: are there new roles for preventative factors? **Nutrition reviews**, v. 52, n. 3, p. 75-83, 1994. ISSN 1753-4887.

INCA. Estômago. Brasil, 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/definicao>>. Acesso em: 02/09/2018.

IRIMIE, A. I. et al. Current Insights into Oral Cancer Epigenetics. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, p. 670, 2018.

ISHIMOTO, T. et al. Current perspectives toward the identification of key players in gastric cancer micro RNA dysregulation. **International journal of cancer**, v. 138, n. 6, p. 1337-1349, 2016. ISSN 0020-7136.

JASIULIONIS, M. G. Abnormal epigenetic regulation of immune system during aging. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 197, 2018. ISSN 1664-3224.

JIANG, S. et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. **Cancer research**, p. 0008-5472. CAN-09-4250, 2010. ISSN 0008-5472.

JOHNSON, C. M. et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. **Cancer causes & control**, v. 24, n. 6, p. 1207-1222, 2013. ISSN 0957-5243.

JUSTUS, C. R.; DONG, L.; YANG, L. V. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. **Frontiers in physiology**, v. 4, p. 354, 2013. ISSN 1664-042X.

KAEMMERER, E. et al. Molecular classification of colorectal carcinomas: the genotype-to-phenotype relation. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 45, p. 8163, 2013.

KANHERKAR, R. R.; BHATIA-DEY, N.; CSOKA, A. B. Epigenetics across the human lifespan. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 2, p. 49, 2014. ISSN 2296-634X.

KEFAS, B. et al. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. **Cancer research**, v. 68, n. 10, p. 3566-3572, 2008. ISSN 0008-5472.

KIEC-WILK, B. et al. DNA methylation, induced by beta-carotene and arachidonic acid, plays a regulatory role in the pro-angiogenic VEGF-receptor (KDR) gene expression in endothelial cells. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, n. 4, p. 49-53, 2009.

KIM, V. N.; NAM, J.-W. Genomics of microRNA. **TRENDS in Genetics**, v. 22, n. 3, p. 165-173, 2006. ISSN 0168-9525.

KISHINO, M.; NAKAMURA, S.; SHIRATORI, K. Clinical and Endoscopic Features of Undifferentiated Gastric Cancer in Patients with Severe Atrophic Gastritis. **Internal Medicine**, v. 55, n. 8, p. 857-862, 2016. ISSN 0918-2918.

KONG, D. et al. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. **Oncogene**, v. 31, n. 35, p. 3949, 2012. ISSN 1476-5594.

KONTUREK, S. New aspects of clinical pharmacology of antacids. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 44, n. 3 Suppl 1, p. 5-21, 1993. ISSN 0867-5910.

KOUFMAN, J. A.; JOHNSTON, N. Potential benefits of pH 8.8 alkaline drinking water as an adjunct in the treatment of reflux disease. **Annals of Otology, Rhinology & Laryngology**, v. 121, n. 7, p. 431-434, 2012. ISSN 0003-4894.

KRÜTZFELDT, J.; POY, M. N.; STOFFEL, M. Strategies to determine the biological function of microRNAs. **Nature genetics**, v. 38, p. S14, 2006. ISSN 1546-1718.

KUPCINSKAS, J. et al. Gene polymorphisms of micrornas in Helicobacter pylori-induced high risk atrophic gastritis and gastric cancer. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87467, 2014. ISSN 1932-6203.

LADEIRAS-LOPES, R. et al. Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Cancer causes & control**, v. 19, n. 7, p. 689-701, 2008. ISSN 0957-5243.

LAGERGREN, J. et al. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. **New England journal of medicine**, v. 340, n. 11, p. 825-831, 1999. ISSN 0028-4793.

LAUBY-SECRETAN, B. et al. Body fatness and cancer—viewpoint of the IARC Working Group. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 8, p. 794-798, 2016. ISSN 0028-4793.

LEE, H.-J. et al. The role of chronic inflammation in the development of gastrointestinal cancers: reviewing cancer prevention with natural anti-

inflammatory intervention. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 1, p. 129-139, 2016. ISSN 1747-4124.

LEVATI, L. et al. MicroRNA-155 targets the SKI gene in human melanoma cell lines. **Pigment cell & melanoma research**, v. 24, n. 3, p. 538-550, 2011. ISSN 1755-1471.

LI, C.-L. et al. microRNA-155 is downregulated in gastric cancer cells and involved in cell metastasis. **Oncology reports**, v. 27, n. 6, p. 1960-1966, 2012. ISSN 1021-335X.

LI, H. et al. The clinical significance of downregulation of mir-124-3p, mir-146a-5p, mir-155-5p and mir-335-5p in gastric cancer tumorigenesis. **International journal of oncology**, v. 45, n. 1, p. 197-208, 2014. ISSN 1019-6439.

LI, J. et al. Up-regulated miR-29c inhibits cell proliferation and glycolysis by inhibiting SLC2A3 expression in prostate cancer. **Gene**, v. 665, p. 26-34, 2018. ISSN 0378-1119.

LI, S. et al. The tumor suppressor role of miR- 155- 5p in gastric cancer. **Oncology letters**, v. 16, n. 2, p. 2709-2714, 2018. ISSN 1792-1074.

LI, W. et al. miR-29c plays a suppressive role in breast cancer by targeting the TIMP3/STAT1/FOXO1 pathway. **Clinical epigenetics**, v. 10, n. 1, p. 64, 2018. ISSN 1868-7083.

LIN, C.-W. et al. MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. **Nature communications**, v. 4, p. 1877, 2013. ISSN 2041-1723.

LIU, J. et al. MicroRNA-155 acts as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting CTHRC1 in vitro. **Oncology letters**, v. 15, n. 4, p. 5561-5568, 2018. ISSN 1792-1074.

LIU, Z. et al. Up-regulated microRNA-146a negatively modulate Helicobacter pylori-induced inflammatory response in human gastric epithelial cells. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 11, p. 854-863, 2010. ISSN 1286-4579.

LIU, Z. et al. The tumor-suppressive microRNA-135b targets c-myc in osteosarcoma. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e102621, 2014. ISSN 1932-6203.

LOPES, C. B. et al. Differential expression of hsa-miR-221, hsa-miR-21, hsa-miR-135b, and hsa-miR-29c suggests a field effect in oral cancer. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 721, 2018. ISSN 1471-2407.

LU, C. et al. MiR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1 and SOCS-1. **Blood**, p. blood-2010-12-322503, 2011. ISSN 0006-4971.

LU, M. et al. miR-135b-5p promotes gastric cancer progression by targeting CMTM3. **International journal of oncology**, v. 52, n. 2, p. 589-598, 2018. ISSN 1019-6439.

LU, Y. et al. MiR-29c inhibits cell growth, invasion, and migration of pancreatic cancer by targeting ITGB1. **OncoTargets and therapy**, v. 9, p. 99, 2016.

LYRATZOPOULOS, G. Markers and measures of timeliness of cancer diagnosis after symptom onset: a conceptual framework and its

implications. **Cancer epidemiology**, v. 38, n. 3, p. 211, 2014. ISSN 1877-7821.

MAGRO, M. et al. Alkaline Water and Longevity: A Murine Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016. ISSN 1741-427X.

MARTÍNEZ, D. et al. Extracellular acidosis induces neutrophil activation by a mechanism dependent on activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 2, p. 1163-1171, 2006. ISSN 0022-1767.

MATOBA, S. et al. p53 regulates mitochondrial respiration. **Science**, v. 312, p. 1650-1653, 2006.

MATSUDAI, N. M.; MAIAII, C. C.; DE ALMEIDA TRONCONIII, L. E. Dispepsia funcional: revisão de diagnóstico e fisiopatologia. **Cultura**, v. 77, n. 92, p. 100, 2010.

MATSUO, M. et al. MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2. **Molecular cancer**, v. 12, n. 1, p. 15, 2013. ISSN 1476-4598.

MCCARTY, M. F.; WHITAKER, J. Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy. **Altern Med Rev**, v. 15, n. 3, p. 264-72, 2010.

MEUNIER, P. J. et al. Consumption of a high calcium mineral water lowers biochemical indices of bone remodeling in postmenopausal women with low calcium intake. **Osteoporosis international**, v. 16, n. 10, p. 1203-1209, 2005. ISSN 0937-941X.

MOUSA, H. A.-L. Health Effects of Alkaline Diet and Water, Reduction of Digestive-tract Bacterial Load, and Earthing. **Alternative Therapies in Health & Medicine**, v. 22, 2016. ISSN 1078-6791.

NAITO, Y. et al. Chronic administration with electrolyzed alkaline water inhibits aspirin-induced gastric mucosal injury in rats through the inhibition of tumor necrosis factor- α expression. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 32, p. 69-81, 2002. ISSN 0912-0009.

NIU, M. et al. MiR-29c regulates the expression of miR-34c and miR-449a by targeting DNA methyltransferase 3a and 3b in nasopharyngeal carcinoma. **BMC cancer**, v. 16, n. 1, p. 218, 2016. ISSN 1471-2407.

O'CONNELL, R. M. et al. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 5, p. 1604-1609, 2007. ISSN 0027-8424.

OSHIMA, A. A critical review of cancer screening programs in Japan. **International journal of technology assessment in health care**, v. 10, n. 3, p. 346-358, 1994. ISSN 1471-6348.

OSTHUS, R. C. et al. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 29, p. 21797-21800, 2000. ISSN 0021-9258.

PELETEIRO, B. Risk Factors for Gastric Intestinal Metaplasia. **ARQUIVOS DE MEDICINA-PORTO-**, v. 20, n. 4, p. 115, 2006. ISSN 0871-3413.

PINTO, A. C. R. *Helicobacter pylori: uma revisão*. São Paulo: Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, 2007.

QU, Y.-L. et al. Up-regulated miR-155-5p promotes cell proliferation, invasion and metastasis in colorectal carcinoma. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 6, p. 6988, 2015.

RESENDE, A. L. D. S.; KOIFMAN, S.; MATTOS, I. E. Dieta e câncer gástrico: aspectos históricos associados ao padrão de consumo alimentar no Estado do Pará. **Rev. nutr**, p. 511-519, 2006.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. et al. Ultra-deep sequencing reveals the microRNA expression pattern of the human stomach. **PloS one**, v. 5, n. 10, p. e13205, 2010. ISSN 1932-6203.

RICARTE FILHO, J.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 50, n. 6, p. 1102-1107, 2006. ISSN 0004-2730.

RODRIGUES, E. D. S. F. **Águas Envasadas: Características Físico-Química, Processo de Produção E Comercialização no Nordeste Paraense** 2012.

SAITO, N. et al. An annexin A1–FPR1 interaction contributes to necroptosis of keratinocytes in severe cutaneous adverse drug reactions. **Science translational medicine**, v. 6, n. 245, p. 245ra95-245ra95, 2014. ISSN 1946-6234.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 8, p. 628, 2008. ISSN 1471-0080.

SCHORNACK, P. A.; GILLIES, R. J. Contributions of cell metabolism and H⁺ diffusion to the acidic pH of tumors. **Neoplasia**, v. 5, n. 2, p. 135-145, 2003. ISSN 1476-5586.

SHAO, L. et al. Helicobacter pylori-induced miR-135b-5p promotes cisplatin resistance in gastric cancer. **The FASEB Journal**, p. fj. 201701456RR, 2018. ISSN 0892-6638.

SHERMAN, H.; GETTLER, A. O. The balance of acid-forming and base-forming elements in foods, and its relation to ammonia metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 323-338, 1912. ISSN 0021-9258.

SHIM, H. et al. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 13, p. 6658-6663, 1997. ISSN 0027-8424.

SILVA, F. M. Dispepsia: caracterização e abordagem. **Revista de Medicina**, v. 87, n. 4, p. 213-223, 2008. ISSN 1679-9836.

SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and- 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33157-33160, 1996. ISSN 0021-9258.

SONG, H. et al. Incidence of gastric cancer among patients with gastric precancerous lesions: observational cohort study in a low risk Western population. **Bmj**, v. 351, p. h3867, 2015. ISSN 1756-1833.

SUN, D.-M. et al. MiR-29c reduces the cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells by negatively regulating the PI3K/Akt pathway. **Scientific reports**, v. 8, 2018.

SUTO, T. et al. MicroRNA-7 expression in colorectal cancer is associated with poor prognosis and regulates cetuximab sensitivity via EGFR

regulation. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 3, p. 338-345, 2015. ISSN 0143-3334.

SWIETACH, Á. et al. New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. **Oncogene**, v. 29, n. 50, p. 6509, 2010. ISSN 1476-5594.

TRAN-DUY, A. et al. Use of proton pump inhibitors and risks of fundic gland polyps and gastric cancer: systematic review and meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 12, p. 1706-1719. e5, 2016. ISSN 1542-3565.

TSUGANE, S.; SASAZUKI, S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. **Gastric cancer**, v. 10, n. 2, p. 75-83, 2007. ISSN 1436-3291.

UMANSKY, V.; SEVKO, A. Tumor microenvironment and myeloid-derived suppressor cells. **Cancer Microenvironment**, v. 6, n. 2, p. 169-177, 2013. ISSN 1875-2292.

USHIJIMA, T.; OKOCHI-TAKADA, E. Aberrant methylations in cancer cells: where do they come from? **Cancer Science**, v. 96, n. 4, p. 206-211, 2005. ISSN 1347-9032.

VALERI, N. et al. MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. **Cancer cell**, v. 25, n. 4, p. 469-483, 2014. ISSN 1535-6108.

VAN SLUIS, R. et al. In vivo imaging of extracellular pH using ¹H MRSI. **Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine**, v. 41, n. 4, p. 743-750, 1999. ISSN 0740-3194.

VAUPEL, P.; KALLINOWSKI, F.; OKUNIEFF, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. **Cancer research**, v. 49, n. 23, p. 6449-6465, 1989. ISSN 0008-5472.

VIDAL, A. F. et al. hsa-miR-29c and hsa-miR-135b differential expression as potential biomarker of gastric carcinogenesis. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 6, p. 2060, 2016.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. **Endeavour**, v. 1, p. 18-20, 1942.

WALDUM, H. L.; SØRDAL, Ø.; FOSSMARK, R. Proton pump inhibitors (PPIs) may cause gastric cancer—clinical consequences. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 53, n. 6, p. 639-642, 2018. ISSN 0036-5521.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Prostaglandins and cancer. **Gut**, v. 55, n. 1, p. 115-122, 2006. ISSN 0017-5749.

WANG, F. et al. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. **Cancer letters**, v. 345, n. 2, p. 196-202, 2014. ISSN 0304-3835.

WANG, G. et al. Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common. **International urology and nephrology**, v. 42, n. 1, p. 95-102, 2010. ISSN 0301-1623.

WANG, J. et al. Micro RNA-155 deficiency enhances the recruitment and functions of myeloid-derived suppressor cells in tumor microenvironment and promotes solid tumor growth. **International journal of cancer**, v. 136, n. 6, p. E602-E613, 2015. ISSN 0020-7136.

WANG, N. et al. miR- 135b inhibits tumour metastasis in prostate cancer by targeting STAT6. **Oncology letters**, v. 11, n. 1, p. 543-550, 2016. ISSN 1792-1074.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956. ISSN 0036-8075.

WATARI, J. et al. Helicobacter pylori associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 18, p. 5461, 2014.

WEBSTER, R. J. et al. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 9, p. 5731-5741, 2009. ISSN 0021-9258.

WHO. Stomach Cancer. 2012. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>>. Acesso em: 02/09/2018.

WOLFE, M. M.; SACHS, G. Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. **Gastroenterology**, v. 118, n. 2, p. S9-S31, 2000. ISSN 0016-5085.

WOO, H. D.; KIM, J. Global DNA hypomethylation in peripheral blood leukocytes as a biomarker for cancer risk: a meta-analysis. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e34615, 2012. ISSN 1932-6203.

WU, X.; TAN, X.; FU, S. W. May circulating microRNAs be gastric cancer diagnostic biomarkers? **Journal of Cancer**, v. 6, n. 12, p. 1206, 2015.

WYNN, E. et al. Alkaline mineral water lowers bone resorption even in calcium sufficiency:: Alkaline mineral water and bone metabolism. **Bone**, v. 44, n. 1, p. 120-124, 2009. ISSN 8756-3282.

XIAO, B. et al. Induction of microRNA-155 during Helicobacter pylori infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 6, p. 916-925, 2009. ISSN 1537-6613.

XIE, J. et al. miR-7 inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer cells by suppressing epidermal growth factor receptor expression. **Oncology reports**, v. 31, n. 4, p. 1715-1722, 2014. ISSN 1021-335X.

XU, N. et al. miR-7 Increases Cisplatin Sensitivity of Gastric Cancer Cells Through Suppressing mTOR. **Technology in cancer research & treatment**, v. 16, n. 6, p. 1022-1030, 2017. ISSN 1533-0346.

YAKIREVICH, E.; RESNICK, M. B. Pathology of gastric cancer and its precursor lesions. **Gastroenterology Clinics**, v. 42, n. 2, p. 261-284, 2013. ISSN 0889-8553.

YANG, L. V.; CASTELLONE, R. D.; DONG, L. Targeting tumor microenvironments for cancer prevention and therapy. In: (Ed.). **Cancer Prevention-From Mechanisms to Translational Benefits**: InTech, 2012.

YANG, Y. et al. MicroRNAs as promising biomarkers for tumor-staging: evaluation of MiR21 MiR155 MiR29a and MiR92a in predicting tumor stage of rectal cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 15, n. 13, p. 5175-5180, 2014. ISSN 1513-7368.

YU, B. et al. microRNA-29c inhibits cell proliferation by targeting NASP in human gastric cancer. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 109, 2017. ISSN 1471-2407.

ZABAGLIA, L. M. Expressão de MicroRNAs e dos genes da interleucina 2 e fator de necrose tumoral e suas correlações com o H. pylori. 2017.

ZABAGLIA, L. M. et al. Expression of miRNA-146a, miRNA-155, IL-2, and TNF- α in inflammatory response to Helicobacter pylori infection associated with cancer progression. **Annals of human genetics**, v. 82, n. 3, p. 135-142, 2018. ISSN 0003-4800.

ZHANG, J. et al. MiR-29c mediates epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal carcinoma metastasis via PTP4A and GNA13 regulation of β -catenin signaling. **Annals of oncology**, v. 25, n. 11, p. 2196-2204, 2014. ISSN 1569-8041.

ZHOU, X. et al. MicroRNA-7 inhibits tumor metastasis and reverses epithelial-mesenchymal transition through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting EGFR in epithelial ovarian cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96718, 2014. ISSN 1932-6203.

ZONARI, E. et al. A role for miR-155 in enabling tumor-infiltrating innate immune cells to mount effective anti-tumor responses. **Blood**, p. blood-2012-08-449306, 2013. ISSN 0006-4971.