



REVISTA CHILENA DE PEDIATRÍA

www.elsevier.es/rchp



ACTUALIDAD

Infecciones y alteraciones epigenéticas en cáncer[☆]



Alejandro H. Corvalán* y María José Maturana

Departamento de Hematología y Oncología, División de Medicina, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

Recibido el 30 de mayo de 2016; aceptado el 20 de junio de 2016

Disponible en Internet el 26 de julio de 2016

PALABRAS CLAVE

Helicobacter pylori;
Metilación del ADN;
Cáncer gástrico

Resumen La participación de mecanismos epigenéticos, junto con infecciones en etapas tempranas de la vida, moldean lesiones premalignas del cáncer, en particular el cáncer gástrico, uno de los tumores más frecuentes en Chile, Latinoamérica y el mundo. El principal objetivo de este artículo, como parte de la serie de revisiones en torno a mecanismos epigenéticos en el desarrollo de enfermedades crónicas, es actualizar el rol de alteraciones epigenéticas (i.e. metilación del ADN) en el contexto de la infección crónica por *H. pylori* en las etapas precursoras del cáncer gástrico. Las investigaciones desarrolladas en esta área permiten delinear desafíos e interrogantes, en los cuales la pediatría tiene un papel preponderante en el desarrollo de estrategias de prevención y detección temprana de esta enfermedad.

© 2016 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Chilena de Pediatría. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Helicobacter pylori;
DNA methylation;
Gastric cancer

Infections and epigenetic changes in cancer

Abstract The role of epigenetics and infectious diseases at early stages of life influence premalignant lesions of cancer, in particular, gastric cancer, one of the most frequent tumours in Chile, Latin America, and worldwide. This article examines the role of *H.pylori* and epigenetic alterations (i.e. DNA methylation) at early stages of gastric cancer and proposes, from the paediatric point of view, strategies for prevention and early detection.

© 2016 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Chilena de Pediatría. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

[☆] Esta actualidad forma parte de un ciclo de 5 actualidades consecutivas sobre el tema de Epigenética, a ser publicadas en los números de 1 a 5 Vol. 87 de la REVISTA CHILENA DE PEDIATRÍA 2016.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: corvalan@med.puc.cl (A.H. Corvalán).

Introducción

El cáncer, como otras enfermedades crónicas, es el resultado de interacciones complejas entre genoma y ambiente. Es así como exposiciones prolongadas a agentes infecciosos contribuyen al desarrollo del cáncer en sujetos con determinanda programación epigenética. Este artículo es la continuación de la serie de revisiones en torno a la participación de los mecanismos epigenéticos en el desarrollo de enfermedades crónicas, y los capítulos anteriores ya han presentado los conceptos de modificaciones epigenéticas y su rol en la accesibilidad y modulación de la transcripción génica^{1,2}. También ya han señalado cómo algunas de estas modificaciones epigenéticas son permanentes y potencialmente reversibles^{1,2}. Esta revisión se enfoca en cáncer, como otro ejemplo de enfermedades crónicas, y en concreto en un tipo de cáncer particularmente relevante en la población adulta, el cáncer gástrico, y el rol de las alteraciones epigenéticas en el desarrollo de esta enfermedad a consecuencia de infecciones crónicas adquiridas durante la infancia.

El cáncer representa el 13% y el 24,6% de la mortalidad en el mundo y en Chile, respectivamente. Por otra parte, los agentes infecciosos representan la tercera causa de mortalidad asociada a cáncer³. En particular el cáncer gástrico, con 951.000 casos nuevos y 723.000 muertes anuales, ocupa el quinto lugar en incidencia y el tercero en mortalidad en el mundo, respectivamente. En países en vías de desarrollo el cáncer gástrico es un tumor particularmente prevalente, donde concentra 2/3 de su mortalidad⁴, y Latinoamérica tiene una de las mayores tasas de incidencia y mortalidad en el mundo⁵. En esta región los países con mayor mortalidad (por ejemplo > 20 casos por 100.000) están en las costas del pacífico (Chile, Costa Rica, Colombia y Ecuador) y los de menor mortalidad (< 4/100.000) en América del Norte (EE. UU. y Canadá) o Centroamérica (por ejemplo Cuba y Puerto Rico)⁵. A diferencia de otras zonas del mundo, en Latinoamérica el cáncer gástrico no está en disminución^{6,7}, sino que al contrario, debido al envejecimiento de la población, esta neoplasia ascenderá al décimo lugar como causa global de muerte en los próximos años⁸.

El cáncer gástrico tiene un origen multifactorial, asociado a infecciones crónicas y a una variedad de condiciones ambientales que pueden interactuar en su desarrollo. En relación con las infecciones crónicas esta neoplasia ha sido asociada a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) y virus de Epstein-Barr (EBV)^{9,10}. La infección por *H. pylori* ha sido encontrada hasta en el 87,4% de los casos¹¹, y en similar frecuencia a nivel poblacional¹². Por otro lado, la infección por EBV se ha descrito entre un 5% a 17% de casos¹³. Al igual que otros tumores asociados a agentes infecciosos, el cáncer gástrico se inicia con infecciones adquiridas en etapas tempranas de la vida¹⁴, y de ahí el rol de la pediatría en la prevención y detección temprana de esta enfermedad.

Las clasificaciones histológicas del cáncer gástrico incluyen las variantes papilar, tubular, mucinoso (coloidal) y carcinomas pobremente cohesivos, según la OMS¹⁴, como también los subtipos intestinal y difuso, según Lauren¹⁵. En esta segunda clasificación el subtipo intestinal se caracteriza por la formación de estructuras glandulares que asemejan mucosa colónica y que está precedida por una secuencia de lesiones premalignas¹⁶. Por otra parte, el subtipo difuso no forma estructuras glandulares, y en consecuencia no tiene

lesiones precursoras¹⁶. Esta última forma de cáncer gástrico está fuertemente asociada a herencia familiar^{17,18}. La vigencia de la clasificación histológica de Lauren, en el contexto de la urgencia de nuevas clasificaciones moleculares¹⁹, se basa en que esta permite su asociación con lesiones premalignas del cáncer gástrico. En este sentido, y a consecuencia de infección persistente por *H. pylori*, las lesiones premalignas siguen una secuencia específica¹⁶, iniciándose con inflamación crónica en la mucosa del estómago en etapas tempranas de la vida²⁰, denominada gastritis crónica no atrófica (GCNA). A consecuencia de la infección persistente por *H. pylori*, la GCNA puede evolucionar hacia lesiones específicamente premalignas que incluyen gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y finalmente carcinoma gástrico¹⁶. Estudios epidemiológicos han identificado el riesgo de desarrollar cáncer gástrico para cada una de estas lesiones, que van desde 0,1% para MAG, 0,25% para metaplasia intestinal y 0,6% a 6% para displasia²¹.

El rol de *Helicobacter pylori* en la progresión de lesiones premalignas del cáncer gástrico

La cascada premaligna del cáncer gástrico postula que se inicia con la infección de *H. pylori*¹⁶. Modelos experimentales en primates han descrito 2 patrones de infección de *H. pylori*: transitoria o persistente^{22,23}. Ambos modelos han sido confirmados en humanos y en particular en población pediátrica^{24,25}. En Latinoamérica los 2 tipos de infección por *H. pylori* han sido caracterizados en asintomáticos menores de 5 años^{26,27} y en niños sintomáticos mayores de 3 años²⁸. En menores de 5 años los estudios indican de 18% a 41% y de 11% a 49% (n=95) de infección persistente y transitoria, respectivamente^{26,27}. Las infecciones persistentes fueron adquiridas durante los 24 primeros meses de vida y estuvieron asociadas al fenotipo no-secretor, definido por la incapacidad de secretar en saliva antígenos sanguíneos (p=0,02), una condición relevante a la patogenicidad de *H. pylori*²⁹ y a la asistencia a salas cuna (p=0,019)²⁷. Estos resultados indicaron además una mayor frecuencia de infección persistente en población pediátrica de Latinoamérica en comparación con otras regiones del mundo^{24,25,30}. Un estudio subsecuente identificó que niños con infección persistente de *H. pylori* tenían una mayor frecuencia de cepas cagA (p=0,002) y tendencia a cepas vacA s1 (p=0,067)³¹.

En niños asintomáticos Ganga-Zandzou et al.³² evaluaron 18 casos con infección por la misma cepa de *H. pylori* durante 2 años de seguimiento. El análisis histológico durante este periodo de observación longitudinal demostró una inflamación progresiva con extensión desde el antro hacia el cuerpo, y un aumento de la variante nodular de GCNA, en particular en niños infectados por cepas cagA-positivo³². En niños sintomáticos mayores a 3 años Hernandez et al.³³ identificaron infección por *H. pylori* en el 56,1% (n=237). El análisis histológico de la mucosa gástrica en un subgrupo de casos (n=130) demostró hallazgos similares a los observados por Ganga-Zandzou et al.³². Por otra parte, la densidad bacteriana fue similar con o sin úlcera duodenal (fig. 1)³³. Este estudio observó que el aumento de neutrófilos y de IFN-gamma ocurría de manera significativa en los casos con úlcera duodenal. En este sentido es relevante mencionar que la metilación del ADN es el principal mecanismo

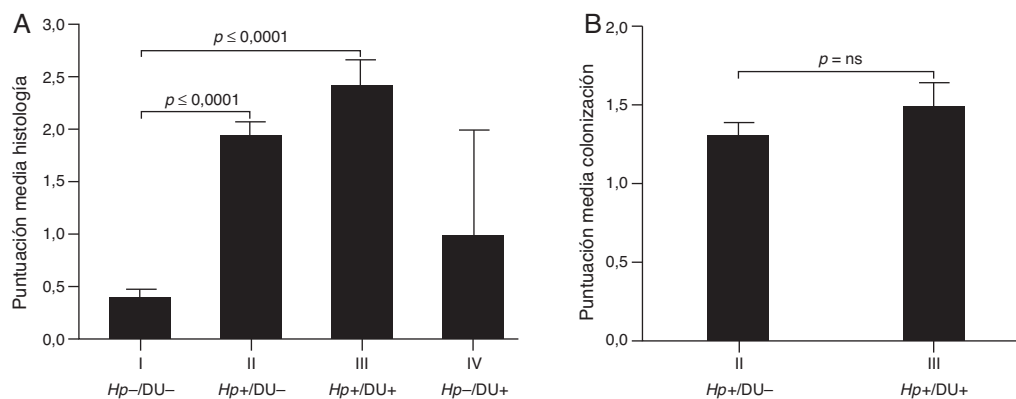


Figura 1 Niveles de inflamación y colonización de *H. pylori* en 130 niños referidos a endoscopia digestiva alta por sintomatología clínica. A. La presencia de *H. pylori* induce de manera significativa la inflamación en la mucosa gástrica, de manera independiente a la presencia de úlcera duodenal. B. Los niveles de colonización de *H. pylori* en la mucosa gástrica fueron similares en niños infectados con o sin úlcera duodenal.

Tomada con autorización de Hernandez et al.³³.

epigenético que controla la expresión de genes asociados a respuesta TH1¹, en particular asociado a la metilación del promotor de IFN-gamma³⁴. Tomados en conjunto, la información presentada sugeriría que la infección persistente de *H. pylori*, y en particular de cepas cagA, está fuertemente asociada a respuesta inmune e inflamación de la mucosa gástrica, y en consecuencia puede evolucionar hacia lesiones premalignas más avanzadas. La decisión de esta progresión dependerá en parte del tipo de cepa infectante, cag-positiva y posiblemente vacA s1m1, que favorecerá la progresión a lesiones premalignas (por ejemplo MAG) o cag-negativa y vacA s2m2 que favorecerá la permanencia en GCNA.

El rol de las alteraciones epigenéticas en la progresión de lesiones premalignas del cáncer gástrico

Las enfermedades crónicas, incluidas las neoplásicas, son el resultado de interacciones complejas entre agentes infecciosos (por ejemplo *H. pylori*), alteraciones del genoma/epigenoma del huésped y una variedad de condiciones ambientales que pueden interactuar en su desarrollo¹. De este modo, no solo la infección persistente por *H. pylori*-cag-positiva y vacA s1m1 contribuiría a la progresión de la cascada de lesiones premalignas del cáncer gástrico, sino que también alteraciones en regiones codificantes y no codificantes del genoma influirían en su desarrollo. En este sentido, polimorfismos de nucleótido simple (*single nucleotide polymorphisms*) en regiones no-codificantes de genes asociados a respuesta inmune (IL-1beta, IL-8, IL-10, TLR-2) tienen una importante influencia en la progresión de la cascada premaligna y subtipos de cáncer gástrico³⁵.

En relación con las alteraciones epigenéticas, y en el contexto de infección persistente por *H. pylori*, Alvarez et al. analizaron el estado de metilación de los genes *Thrombospondin-1*, *Hypermethylated in cancer 1* y *Gata binding protein-4*, previamente asociados a cáncer gástrico¹⁹. Entre ellos, *Thrombospondin-1* y *Gata binding protein-4* estuvieron asociados a la infección por *H. pylori* en población pediátrica ($p < 0,01$)³⁶. Hallazgos similares fueron reportados por Shin et al.³⁷ en 7 regiones promotoras de

12 genes evaluados. En este mismo escenario O’Ryan et al.³¹ realizaron un estudio de perfiles de expresión génica en sangre periférica en niños menores de 3 años con infecciones persistentes y transitorias de *H. pylori*. Entre los 810 genes diferencialmente expresados (fig. 2) se incluían algunos asociados a procesos biológicos asociados a cáncer, tales como ciclo celular (TGFA, CDT1, NUSAP1, BTG3) y apoptosis o muerte celular programada (C3ORF38, GZMH, TIAM 1, IFNG, HIPK2, SLC5A8)³¹. Tomados en conjunto, estas publicaciones indican que alteraciones en perfiles de expresión y metilación de múltiples genes ocurriría en etapas muy tempranas de la vida, en el contexto de infección por *H. pylori*, incluso previo a la aparición de lesiones histológicas asociadas a la cascada premaligna del cáncer gástrico. Estudios longitudinales deberían indicar si la metilación de estos genes favorecería la progresión hacia lesiones premalignas de cáncer gástrico.

El rol de las alteraciones epigenéticas en la erradicación de *Helicobacter pylori*

La reversibilidad de la metilación y la consecuente regulación de la expresión génica³⁸ ha abierto proyecciones terapéuticas en este campo. En este sentido, y en paralelo, Chan et al.³⁹ y Leung et al.⁴⁰ no solo demostraron una frecuente hipermetilación de E-cadherina en relación con la infección por *H. pylori* ($p = 0,002$), sino también una reversión de esta metilación después de la erradicación de *H. pylori*. En esta línea, Maekita et al.⁴¹ han expandido este hallazgo a otros genes en población asintomática con y sin infección por *H. pylori* ($p < 0,0001$). Una asociación particularmente interesante es la reportada por Schneider et al.⁴², al identificar que la metilación específica del gen Reprimo, un potencial gen supresor de cáncer en el cáncer gástrico³⁸, estaría asociado a la presencia de cepas cagA positivo.

Una aproximación «ómica» también ha sido desarrollada por Zhang et al.⁴³, quienes han identificado 3.000 y 386 regiones diferencialmente metiladas después de erradicar *H. pylori* en mucosa gástrica y sangre periférica, respectivamente. Las regiones diferencialmente metiladas después de la erradicación correspondieron a regiones

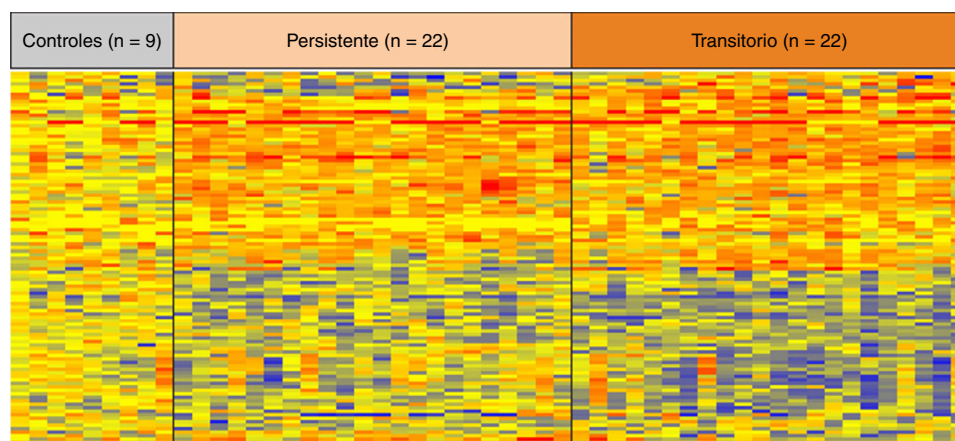


Figura 2 Perfiles de expresión génica en sangre total en niños infectados por *H. pylori* de forma permanente y transitoria y controles sanos. La expresión de cada gen fue normalizada según la media de expresión. Cada columna representa a un individuo participante en el estudio y cada fila representa la expresión de un gen. El color rojo indica genes sobreexpresados y el color azul genes con pérdida de expresión. Tomado con autorización de O’Ryan et al.³¹.

promotoras de genes, en mucosa gástrica y regiones no asociadas a genes en linfocitos de sangre periférica⁴³. Los genes identificados en mucosa gástrica estaban principalmente asociados a vías inflamatorias, y su evaluación en el *The Cancer Genome Atlas* sugería una asociación a cáncer gástrico⁴³. Tomados en conjunto, estos estudios sugieren que la infección por *H. pylori* está fuertemente asociada a metilación del ADN. La infección por *H. pylori* provocaría una masiva desregulación de genes asociados a procesos inflamatorios y cáncer. Por último, la erradicación de *H. pylori* lograría regresar la metilación del ADN, al menos en etapas de gastritis atrófica. Estudios experimentales que exploren estas observaciones clínicas serán necesarios para comprender en profundidad los mecanismos biológicos asociados a *H. pylori* y metilación del ADN.

Conclusiones finales

El cáncer gástrico es un problema de salud pública en Chile, Latinoamérica y el mundo. A diferencia de otras regiones, en Latinoamérica el cáncer gástrico no está en disminución^{6,7}. A consecuencia de la infección persistente por *H. pylori*, las lesiones premalignas siguen una secuencia específica¹⁶, iniciándose con inflamación crónica en la mucosa del estómago en etapas tempranas de la vida²⁰. La infección por *H. pylori* ha sido caracterizado en asintomáticos menores de 5 años^{26,27} y en niños sintomáticos mayores de 3 años²⁸. La información recogida sugeriría que la infección persistente de *H. pylori* y en particular de cepas cagA está fuertemente asociada a respuesta inmune e inflamación. La progresión de lesiones premalignas del cáncer gástrico son el resultado de interacciones complejas entre agentes infecciosos (por ejemplo *H. pylori*) y alteraciones del genoma/epigenoma del huésped las que resultan en alteraciones en perfiles de expresión y metilación de múltiples genes en etapas muy tempranas de la vida. Las alteraciones epigenéticas y la reversibilidad de la metilación han abierto nuevas proyecciones en este campo. No solo hay una frecuente hipermetilación de E-cadherina y otros genes, sino también reversión de la metilación después de erradicación de *H. pylori*. Tomados en conjunto, la infección por

H. pylori está fuertemente asociada a metilación del ADN, provocando masiva desregulación de genes asociados a procesos inflamatorios y cáncer. La erradicación de *H. pylori* lograría regresión de la metilación del ADN abriendo nuevas oportunidades de prevención a temprana edad de una de las enfermedades de mayor mortalidad a nivel mundial.

Financiamiento

Este trabajo ha sido financiado por CONICYT-FONDAP #15130011 y Fondecyt Regular #1151411 del Gobierno de Chile.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

1. Castro-Rodriguez JA, Krause BJ, Uauy R, Casanello P. Epigenetics in allergic diseases and asthma. *Rev Chil Pediatr.* 2016;87:88–95.
2. Krause BJ, Castro-Rodriguez JA, Uauy R, Casanello P. General concepts of epigenetics: Projections in paediatrics. *Rev Chil Pediatr.* 2016;87:4–10.
3. De Flora S, La Maestra S. Epidemiology of cancers of infectious origin and prevention strategies. *J Prev Med Hyg.* 2015;56:E15–20.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136:E359–86.
5. Chatenoud L, Bertuccio P, Bosetti C, et al. Trends in mortality from major cancers in the Americas: 1980–2010. *Ann Oncol.* 2014;25:1843–53.
6. Merchant SJ, Kim J, Choi AH, Sun V, Chao J, Nelson R. A rising trend in the incidence of advanced gastric cancer in young Hispanic men. *Gastric Cancer.* 2016;2016:1–9.
7. Wang C, Weber A, Graham DY. Age, period, and cohort effects on gastric cancer mortality. *Dig Dis Sci.* 2015;60:514–23.
8. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3:e442.

9. Amieva M, Peek RM Jr. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer. *Gastroenterology*. 2016;150:64–78.
10. Camargo MC, Kim WH, Chiaravalli AM, et al. Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein-Barr virus positivity: an international pooled analysis. *Gut*. 2014;63:236–43.
11. Cardenas-Mondragon MG, Torres J, Flores-Luna L, et al. Case-control study of Epstein-Barr virus and *Helicobacter pylori* serology in Latin American patients with gastric disease. *Br J Cancer*. 2015;112:1866–73.
12. Camargo MC, Beltran M, Conde-Glez C, et al. Serological response to *Helicobacter pylori* infection among Latin American populations with contrasting risks of gastric cancer. *Int J Cancer*. 2015;137:3000–5.
13. Camargo MC, Murphy G, Koriyama C, et al. Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *Br J Cancer*. 2011;105:38–43.
14. Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007;21:205–14.
15. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31–49.
16. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis*. 2012;13:2–9.
17. van der Post RS, Vogelaar IP, Carneiro F, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet*. 2015;52:361–74.
18. Alvarez C, Aravena A, Tapia T, et al. Different Array CGH profiles within hereditary breast cancer tumors associated to BRCA1 expression and overall survival. *BMC Cancer*. 2016;16:219.
19. Bass AJ. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513:202–9.
20. De Angelis GL, Cavallaro LG, Maffini V, et al. Usefulness of a serological panel test in the assessment of gastritis in symptomatic children. *Dig Dis*. 2007;25:206–13.
21. De Vries AC, van Grieken NC, Looman CW, et al. Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands. *Gastroenterology*. 2008;134:945–52.
22. Dubois A, Berg DE, Incecik ET, et al. Transient and persistent experimental infection of nonhuman primates with *Helicobacter pylori*: implications for human disease. *Infect Immun*. 1996;64:2885–91.
23. Dubois A, Berg DE, Incecik ET, et al. Host specificity of *Helicobacter pylori* strains and host responses in experimentally challenged nonhuman primates. *Gastroenterology*. 1999;116:90–6.
24. Bhuiyan TR, Qadri F, Saha A, Svennerholm AM. Infection by *Helicobacter pylori* in Bangladeshi children from birth to two years: relation to blood group, nutritional status, and seasonality. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:79–85.
25. Goodman KJ, O'Rourke K, Day RS, et al. Dynamics of *Helicobacter pylori* infection in a US-Mexico cohort during the first two years of life. *Int J Epidemiol*. 2005;34:1348–55.
26. Klein PD, Gilman RH, Leon-Barua R, Diaz F, Smith EO, Graham DY. The epidemiology of *Helicobacter pylori* in Peruvian children between 6 and 30 months of age. *Am J Gastroenterol*. 1994;89:2196–200.
27. O'Ryan ML, Rabello M, Cortes H, Lucero Y, Pena A, Torres JP. Dynamics of *Helicobacter pylori* detection in stools during the first 5 years of life in Chile, a rapidly developing country. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32:99–103.
28. Harris PR, Serrano CA, Villagran A, et al. *Helicobacter pylori*-associated hypochlorhydria in children, and development of iron deficiency. *J Clin Pathol*. 2013;66:343–7.
29. Vidal AF, Cruz AM, Magalhaes L, et al. hsa-miR-29c and hsa-miR-135b differential expression as potential biomarker of gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2016;22:2060–70.
30. Okuda M, Miyashiro E, Booka M, Tsuji T, Nakazawa T. *Helicobacter pylori* colonization in the first 3 years of life in Japanese children. *Helicobacter*. 2007;12:324–7.
31. O'Ryan ML, Lucero Y, Rabello M, et al. Persistent and transient *Helicobacter pylori* infections in early childhood. *Clin Infect Dis*. 2015;61:211–8.
32. Ganga-Zandzou PS, Michaud L, Vincent P, et al. Natural outcome of *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic children: a two-year follow-up study. *Pediatrics*. 1999;104 2 Pt 1:216–21.
33. Hernandez C, Serrano C, Einisman H, et al. Peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori*-infected children: clinical findings and mucosal immune response. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;59:773–8.
34. White GP, Watt PM, Holt BJ, Holt PG. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. *J Immunol*. 2002;168:2820–7.
35. Sandoval-Borquez A, Saavedra K, Carrasco-Avino G, et al. Noncoding genomics in gastric cancer and the gastric precancerous cascade: Pathogenesis and biomarkers. *Dis Markers*. 2015;2015:503762.
36. Alvarez MC, Ladeira MS, Scaletsky IC, Pedrazzoli J Jr, Ribeiro ML. Methylation pattern of THBS1, GATA-4, and HIC1 in pediatric and adult patients infected with *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci*. 2013;58:2850–7.
37. Shin SH, Park SY, Ko JS, Kim N, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation in pediatric gastric mucosa in association with *Helicobacter pylori* infection. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135:759–65.
38. Saavedra K, Valbuena J. Loss of expression of reprimo, a p53-induced cell cycle arrest gene, correlates with invasive stage of tumor progression and p73 expression in gastric cancer. *PLoS One*. 2015;10:e0125834.
39. Chan AO, Lam SK, Wong BC, et al. Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. *Gut*. 2003;52:502–6.
40. Leung WK, Man EP, Yu J, et al. Effects of *Helicobacter pylori* eradication on methylation status of E-cadherin gene in non-cancerous stomach. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3216–21.
41. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, et al. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2006;12 3 Pt 1:989–95.
42. Schneider BG, Peng DF, Camargo MC, et al. Promoter DNA hypermethylation in gastric biopsies from subjects at high and low risk for gastric cancer. *Int J Cancer*. 2010;127:2588–97.
43. Zhang Y, Zhang XR, Park JL, et al. Genome-wide DNA methylation profiles altered by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa and blood leukocyte DNA. *Oncotarget*. 2016. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.9469> [Epub ahead of print].