



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

STEFANIE BRAGA MAIA DE SOUSA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE DNA
METILTRANSFERASES E *METHYL-BINDING PROTEINS*
NA CARCINOGENESE GÁSTRICA**

Belém-PA

2018

STEFANIE BRAGA MAIA DE SOUSA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE DNA METILTRANSFERASES
E *METHYL-BINDING PROTEINS* NA CARCINOGENESE
GÁSTRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração Medicina I do Núcleo de Pesquisas em Oncologia, da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.
Linha de Pesquisa: Epigenética

Orientadora: Prof^a. Dra. Danielle Queiroz Calcagno

BELÉM-PA
2018

STEFANIE BRAGA MAIA DE SOUSA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE DNA METILTRANSFERASES E *METHYL-BINDING PROTEINS* NA CARCINOGENESE GÁSTRICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração Medicina I do Núcleo de Pesquisas em Oncologia, da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

DATA DA AVALIAÇÃO: ____/____/____

CONCEITO: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dra. Danielle Queiroz Calcagno
Universidade Federal do Pará
Orientadora

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira
Membro

Prof^ª. Dra. Bárbara do Nascimento Borges
Membro

Prof^ª. Dra. Carolina Oliveira Gigek
Membro

“Sou muito grato às adversidades que apareceram na minha vida. Pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades, eu jamais conheceria.”

(Napoleon Hill)

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por iluminar meus caminhos e me dar forças para prosseguir nessa jornada.

À minha família, pela compreensão, principalmente durante esses últimos meses que tive que me ausentar de tudo e de todos.

À minha orientadora, Danielle Calcagno, que abriu as portas do mestrado e de sua residência para me orientar, mesmo em meio a problemas de saúde. Sou muito grata por tê-la conhecido, pois com ela pude me inspirar a ser mais. Mais esforçada, mais estudiosa, mais confiante e mais mulher.

A meus amigos de trabalho, principalmente a minha parceira de laboratório, Jéssica, na qual a calma, paciência e dedicação, me auxiliaram até os meus últimos dias de mestrado. Me sinto uma pessoa mais sortuda de ter conhecido a todos as pessoas da equipe da professora Danielle, pois me proporcionaram uma experiência única de mestrado, a qual tenho certeza que fiz mais do que meros colegas de trabalho, mas amigos que pretendo levar comigo durante muito tempo.

A Dielly Catrina e Laine Pinto, que se mostraram muito solícitas em compartilhar seus conhecimentos durante esse período do mestrado, sem elas essa caminhada teria sido muito mais difícil.

Ao núcleo de pesquisas em oncologia e toda a sua equipe de secretários e auxiliares, que se mostraram muito compreensivos e amáveis as minhas desventuras e receios decorrentes do mestrado.

A FAPESPA que me proporcionou o investimento financeiro, no qual sem ele, o desejo de ter um mestrado não teria sido concretizado.

Ao meu namorado, Daniel Unger, que mesmo antes de se tornar meu namorado ficou ao meu lado, me dando suporte emocional durante os momentos mais críticos da minha vida. “Quando tudo caiu foi os seus ombros que me seguraram”.

RESUMO

Apesar da diminuição mundial da incidência do câncer gástrico nos últimos anos, esse tipo de câncer é o terceiro com maior mortalidade. Modificações no padrão de metilação do DNA são comuns em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer gástrico. Adicionalmente, alterações na expressão de proteínas responsáveis por esse mecanismo epigenético nos tumores são associadas a modificações nos padrões de metilação do DNA. Portanto, compreender o funcionamento dos genes da maquinaria de metilação do DNA durante a carcinogênese é crucial para o entendimento dos processos biológicos envolvidos no desenvolvimento tumoral. No presente estudo foi realizada quantificação relativa por PCR em tempo real da expressão do mRNA dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MECP2* e *MBD4* de 61 amostras pareadas de tumores gástricos e tecidos gástricos não neoplásico adjacente, e 30 amostras de tecido gástrico de indivíduos sem neoplasia. Na análise entre os diferentes grupos de amostras, o mRNA do gene *DNMT1* foi significativamente mais expresso em tecido tumoral gástrico e adjacente quando comparado a tecido gástrico de indivíduo sem neoplasia ($p= 0,0196$; $p= 0,0466$, respectivamente). Além disso, observamos que o mRNA do *DNMT3A* foi significativamente mais expresso em tecido gástrico não neoplásico adjacente comparado ao tecido tumoral e ao tecido de indivíduos sem neoplasia ($p=0,0076$; $p= 0,0029$, respectivamente). A análise com os dados clinicopatológicos relevou associação entre a expressão de mRNA do *DNMT3B* com presença de metástase em linfonodos ($p=0,034$) e com estadiamento III-IV do tumor gástrico ($p= 0,048$). Ao realizar a correlação dos genes, observou que a *MECP2* teve forte correlação entre os genes *DNMT1* (0,686), *DNMT3B* (0,685) e *MBD4* (0,790) outra correlação foi encontrada entre *DNMT3B* e *MBD4* (0,650). Estes resultados sugerem que alterações na expressão de mRNA do gene *DNMT1* e *DNMT3A* podem estar presentes em estágios iniciais da carcinogênese gástrica, a *DNMT3B* pode ser usado como marcador de prognóstico.

Palavras chaves: metilação do DNA. Modificação epigenética. *DNMT1*. *DNMT3A*. *DNMT3B*. *MECP2*. *MBD4*.

ABSTRACT

Despite the worldwide decline in the incidence of gastric cancer in recent years, this type of cancer is the third with higher mortality. Modifications in the pattern of DNA methylation are common in different types of cancer, including gastric cancer. In addition, changes in the expression of proteins responsible for this epigenetic mechanism in tumors are associated with changes in DNA methylation patterns. Therefore, understanding the gene machinery of the DNA methylation during carcinogenesis is crucial for understanding the biological processes involved in tumor development. In the present study, the relative mRNA expression of the *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MeCP2* and *MBD4* genes from 61 paired samples of gastric tumors and adjacent non-neoplastic gastric tissues and 30 gastric tissue samples from individuals without neoplasia. In the analysis between the different groups of samples, mRNA of *DNMT1* gene was significantly more expressed in gastric tumor and non-neoplastic adjacent tissue when compared to gastric tissue of individual without neoplasia ($p = 0.0196$, $p = 0.0466$, respectively). In addition, we observed that *DNMT3A* mRNA was significantly more expressed in adjacent non-neoplastic gastric tissue compared to tumor tissue and non-neoplastic individuals ($p = .0.0076$, $p = 0.0029$, respectively). The analysis with clinicopathological data showed an association between *DNMT3B* mRNA expression with presence of lymph node metastasis ($p = 0.034$) and gastric tumor stage III-IV ($p = 0.048$). When performing the gene correlation, it was observed that MECP2 had a strong correlation between *DNMT1* (0.666), *DNMT3B* (0.685) and *MBD4* (0.790) genes, another correlation was found between *DNMT3B* and *MBD4* (0.650). These results suggest that alterations in *DNMT1* and *DNMT3A* gene mRNA expression may be present in the early stages of gastric carcinogenesis, *DNMT3B* can be used as a marker of prognosis.

Keywords: DNA methylation. Epigenetic modification. *MECP2*. *MBD4*. *DNMT1*. *DNMT3A*. *DNMT3B*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Subtipos histológicos do CG segundo a classificação de Laurèn.	13
Figura 2 - Metilação e desmetilação do DNA.....	17
Figura 3 - Ciclo do Um carbono.....	19
Figura 4 - Classificação da DNMTs e sua estrutura.....	20
Figura 5 - Metilação de DNA de novo versus de manutenção.	21
Figura 6 - Processo de formação dos padrões de metilação de DNA genômicos.....	22
Figura 7 - Proteínas da subfamília MeCP2-MBD e seus respectivos domínios.	24
Figura 8 - Ilustração dos mecanismos de reparo da enzima MBD4 nas ilhas CpG metiladas. 26	
Figura 9 - Regulação epigenética da expressão gênica.	27
Figura 11 - Metilação do DNA em célula normal versus célula cancerígena.	29
Figura 12 - Mediana e desvio interquartilico dos valores de RQ das amostras de tecido gástrico de pacientes sem neoplasia (N), não-neoplásico adjacente (NT) e neoplásico (T). * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clinicopatológicas das amostras de tumores gástricos.....	39
Tabela 2 - Valores de mediana e desvio interquartílico da quantificação relativa da expressão de genes da maquinaria de metilação do DNA.....	43
Tabela 3 - Comparação dos valores de RQ dos genes da maquinaria da metilação com os dados clinicopatológicos dos pacientes com CG.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Agrupamento por estadiamento para o CG.....	15
Quadro 2 - Definição do pTNM patológico para o CG.....	16
Quadro 3 - Genes alterados por metilação do DNA no CG e associações características clinicopatológicas.....	31
Quadro 4 - Genes da maquinaria de metilação alterados no CG.....	34
Quadro 6 - Correlação da expressão dos genes DNMTs, MBD4 e MeCP2.....	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

HDAC1	Histona desacetilase 1
5caC	5-carboxilcitosina
5fC	5-formilcitosina
5hmC	5-hidroximetilcitosina
5MC	5-metilcitosina
AJCC	Comitê Conjunto Americano de Câncer
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CG	Câncer gástrico
CpG	Regiões do DNA ricas em Citosinas e Guaninas
Ct	cycle threshold
DHT	Dihidrofolato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNMT	DNA Metiltransferase
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
H	Histona
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona deacetilase
HMTs	Histona metiltransferases
HSP	Hospital São Paulo
HUJBB	Hospital Universitário João de Barros Barreto
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MAT	Metionina adenosiltransferase
MAT	Metionina adenosiltransferase
MBD	Proteína de domínio de ligação de metil-CpG
MeCP	Proteína de ligação à metil-CpG 2
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
NNA	Tecido gástrico não-neoplásico adjacente
NNA	Amostras neoplásicas
NTA	Tecido não neoplásicas adjacentes
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pri-microRNA	microRNA primário
pré-microRNA	microRNA precursor
pTNM	TNM patológico
SAH	S adenosilhomocisteína
SAM	S adenosilmetionina
SN	Tecido gástrico de pacientes sem neoplasia
ST	Tecido gástrico de pacientes sem tumor
T	Amostra de tumor gástrico
TET	Proteína translocação dez-onze
TMN	Tumor, nódulos e metástase
UICC	União Internacional para o Controle de Câncer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Considerações Gerais	12
1.2	Câncer Gástrico	13
1.2.1	Classificações do câncer gástrico.....	13
1.3	Metilação do DNA	17
1.3.1	Metabolismo do um carbono	18
1.3.2	DNA metiltransferases	19
1.3.3	Interação do DNA metilado com proteínas ligadoras de metil cpg	23
1.4	Modificações de Histonas	26
1.5	Metilação do DNA no câncer gástrico	28
1.6	Aplicabilidade clinica	36
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo Geral	37
2.1.1	Objetivo específicos	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Tumores primários	38
3.2	Extração	39
3.3	Detecção de <i>Helicobacter pylori</i>	40
3.4	Expressão por PCR em tempo real	40

3.5	Análise Estatística.....	41
4	RESULTADOS	43
4.1	Expressão dos genes	43
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXOS.....	66
	ANEXO I.....	66
	ANEXO II.....	67
	ANEXO III.....	69
	ANEXO IV	70
	ANEXO V	72
	ANEXO VI.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

No Brasil, o câncer gástrico (CG) aparece em quarto lugar de incidência entre os homens e o sexto entre as mulheres (INCA, 2018). A falta de sintomas nas fases iniciais da carcinogênese, a detecção tardia do câncer, já em estado avançado, e limitações terapêuticas demonstram a necessidade de estudar essa patologia para modificação deste panorama. (JIN; JIANG; WANG, 2015).

Nas últimas décadas, estudos sobre o CG demonstraram que esta doença é resultado de uma complexa interação entre o genoma e fatores externos. Estes estudos revelaram um ambiente de alterações heterogêneas em diversos genes, desregulação de vias de sinalização, instabilidade cromossômica, alterações nos padrões de metilação de DNA e modificações de histonas (HUDLER, 2012; TAN et al., 2012; MCLEAN; EL-OMAR, 2014; CALCAGNO et al., 2015; GIGEK et al., 2017). Apesar disso, ainda não se chegou à um consenso sobre quais alterações genéticas e epigenéticas são responsáveis pela inicialização e progressão do CG, mas estratégias neste sentido estão em curso (BASS et al., 2014).

O campo emergente da epigenética oferece uma melhor perspectiva de biomarcadores do câncer, uma vez que alterações epigenéticas podem ser detectadas nas etapas iniciais da carcinogênese e serem potencialmente reversíveis (SHANKAR et al., 2016).

O interesse pela epigenética aumentou desde que este termo foi cunhado por Conrad Waddington, em 1942, para explicar a causalidade entre o genótipo e o fenótipo nos campos da embriologia, a partir daí novos aspectos foram incluídos na concepção de Waddington. Atualmente, a epigenética pode ser definida como fenótipo hereditário estável, resultante de mudanças em um cromossomo sem alterações na sequência de DNA (BERGER et al., 2009; DEANS; MAGGERT, 2015). Os principais mecanismos epigenéticos incluem metilação do DNA, modificações de histonas e RNAs não codificantes (JONES et al., 2015; GREER et al., 2015).

Alterações em genes da maquinaria responsável por essas modificações epigenéticas são frequentes em diferentes tipos de câncer. No presente estudo, analisamos a quantificação relativa da expressão de genes da maquinaria de metilação do DNA, como DNA metiltransferases (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*) e proteínas ligadoras de metil CpG (*MBD4* e *MECP2*).

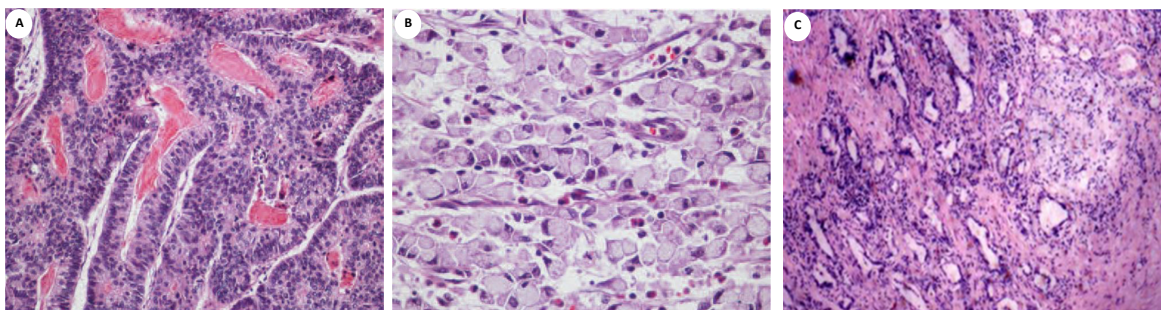
1.2 Câncer Gástrico

1.2.1 Classificações do câncer gástrico

Anatomicamente, o estômago pode ser dividido em três regiões: fundo, corpo e antro. Sendo que a parede do estômago pode ser dividida em cinco principais camadas. Na parte mais externa, encontra-se a subserosa, em seguida a serosa, muscular, submucosa e mucosa. Na mucosa, a camada mais interna, estão presentes as glândulas gástricas. As neoplasias podem ter origem em todas as camadas do órgão, mas os com início na mucosa gástrica são as predominantes (90-95%), denominados de adenocarcinoma (SHANG; PENAS, 2005).

A classificação do adenocarcinoma quanto a arquitetura celular foi introduzida em 1965 por Laurèn, e permanece amplamente aceita e utilizada no ocidente, uma vez que constitui uma abordagem de classificação simples e robusta. Segundo os critérios de Laurèn, o câncer gástrico é classificado em dois tipos principais: intestinal e difuso (LAURÈN, 1965). Quando o tumor apresenta a mesma proporção de células com características do tipo intestinal e difuso é denominado de misto. A Figura 1 ilustra os três diferentes tipos histológicos definidos por Laurèn.

Figura 1 - Subtipos histológicos do CG segundo a classificação de Laurèn.



Fonte: Adaptado de Correa e Piazeu (2011).

Nota: A: as células tumorais são dispostas de forma coesiva, formando estruturas glandulares irregulares infiltrando o estroma (H & E, $\times 200$). B: tipo difuso. Células tumorais isoladas se infiltram difusamente no estroma. Neste subtipo o excesso de muco produzido pelas células neoplásicas pode ser observado no citoplasma na forma de um grande vacúolo. Esse fenômeno comprime o núcleo contra a periferia da célula, dando-lhe a aparência característica de anel de sinete (H & E, $400 \times$). C: tipo misto. Células com formação tubular e presença de anel de sinete.

O subtipo intestinal é caracterizado por alta adesão celular, organização tubular ou com formações de estruturas semelhantes a glândulas, as quais são associadas à metaplasia intestinal, majoritariamente, sendo associado à invasão linfática ou vascular (LAURÈN, 1965). Sua prevalência é superior em homens e no antro do estômago. Comparado com o tipo difuso, apresenta melhor prognóstico com uma média de sobrevida global e livre de doenças de 5 anos (QUI et al., 2013; CHEN et al., 2015a; LUU et al., 2017).

Os principais fatores etiológicos desse tipo de câncer são a obesidade e infecção por *Helicobacter pylori*, no entanto, este último é o mais relevante. *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa, biocarcinógeno de classe I para o câncer gástrico, que coloniza seletivamente a mucosa gástrica. Os problemas incorridos pela relação de longo prazo entre o *H. pylori* e os seres humanos, confere um risco significativamente aumentado de adenocarcinoma gástrico devido o desenvolvimento de inflamação crônica (CORREA; PIAZUELO 2011).

No câncer gástrico difuso, as células tumorais carecem de adesão entre si e infiltram-se no estroma como células únicas ou subgrupos pequenos, originando uma população de células tumorais dispersas e não coesivas (QUI et al., 2013). A produção de muco intracelular, o qual pode afastar o núcleo da célula para as extremidades, formam células em anel de sinete. O tipo difuso está associado a pacientes mais jovens e apresenta predileção pelo sexo feminino em comparação ao tipo intestinal. A metástase peritoneal do câncer gástrico difuso, sem lesões precursoras são facilmente reconhecidas e comuns. Geralmente, esse tipo de câncer afeta o corpo do estômago e apresenta pior prognóstico em comparação com o tipo intestinal (LAURÉN, 1965; CHEN et al., 2015a).

No subtipo difuso, não há uma associação, entre uma lesão precursora e o desenvolvimento do CG. Em vez disso, esse tipo de câncer parece estar intimamente ligado aos fatores genéticos do paciente (VALENZUELA et al., 2015.). Assim, este tipo é menos afetado por fatores ambientais do que o tipo intestinal, embora a infecção por *H. pylori* também possa estar envolvida no desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico difuso (YOSHIDA et al., 2013). No entanto, ao contrário do CG do subtipo intestinal, o subtipo difuso desenvolve-se como resultado direto da inflamação crônica (NARDONE, ROCCO; MALFERTHEINER, 2004).

Atualmente, o estadiamento do câncer gástrico pode ser feito por meio de duas etapas padronizadas segundo American Joint Committee on Cancer (AJCC) e a Union for International Cancer Control (UICC), são elas, a clínica e a patológica. A classificação clínica se dá por meio da avaliação da extensão do tumor, através de exames radiográficos, endoscópicos e histopatológicos na qual permite ser feito o estadiamento patológico, no qual tem como objetivo observar a profundidade da invasão, o comprometimento de linfonodos e a presença de metástase, por meio do pTNM (GRAZIOSI et al., 2013), onde a letra “T” determina a extensão do tumor, “N” a ausência ou a presença, bem como a extensão das metástases em linfonodos próximos e “M” representa a ausência ou a presença de metástase à distância (Quadro 1). Com o resultado do pTNM é possível determinar o estágio da doença (Quadro 2) o qual está diretamente relacionado com o prognóstico do paciente (IN et al., 2017).

Quadro 1 - Agrupamento por estadiamento para o CG.

Estadiamento		Combinações TNM	
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIB	T1	N3a	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
IIIA	T2	N3a	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1 ou N2	M0
	T4b	N0	M0
IIIB	T1 ou T2	N3b	M0
	T3 ou T4a	N3a	M0
	T4b	N1 ou N2	M0
IIIC	T3 ou T4a	N3b	M0
	T4b	N3a ou N3b	M0
IV	Qualquer	Qualquer	M1

Fonte: Adaptado da Classificação *World Health Organization* (2017).

Quadro 2 - Definição do pTNM patológico para o CG.

Tumor primário (pT)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ: tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria
T1	Tumor que invade a lâmina própria, mucosa muscular ou submucosa
T1a	Tumor que invade a lâmina própria ou mucosa muscular
T1b	Tumor que invade a submucosa
T2	Tumor que invade a muscular própria
T3	Tumor que penetra o tecido conectivo subseroso sem invasão do peritônio visceral ou de estruturas adjacentes. Tumores T3 também incluem aqueles que se estendem para o ligamento gastro-cólico ou gastro-hepático ou no omento maior ou menor, sem perfuração do peritônio visceral cobrindo estas estruturas
T4	Tumor que invade a serosa (peritônio visceral) ou estruturas adjacentes
T4a	Tumor que invade a serosa (peritônio visceral)
T4b	Tumor que invade estruturas adjacentes, como o baço, cólon transversal, fígado, diafragma, pâncreas, parede abdominal, glândula adrenal, rim, intestino delgado e retroperitônio
Linfonodos regionais (pN)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 2 linfonodos regionais
N2	Metástase em 3 a 6 linfonodos regionais
N3	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais
N3a	Metástase em 7-15 linfonodos regionais
N3b	Metástase em 16 ou mais linfonodos regionais
Metástase a distância (pM)	
MX	Presença de metástase a distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase a distância
M	Metástase à distância

Fonte: Adaptado da Classificação *World Health Organization*, 2017.

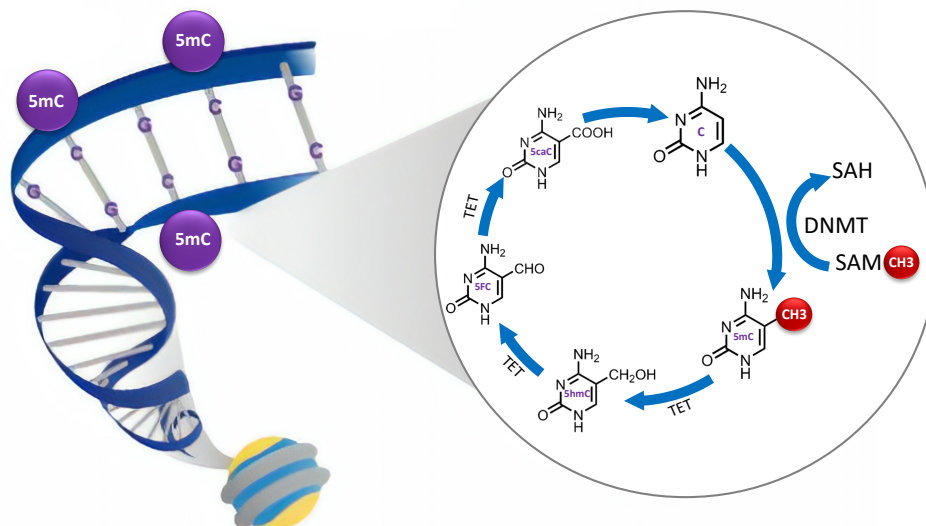
Com o advento de novas tecnologias, diversas alterações genéticas e epigenéticas vêm sendo descritas e com elas novos sistemas de classificação molecular para melhor agrupar os tumores gástricos (LEI et al., 2013; BASS et al., 2014; CRISTESCU et al., 2015). Essas novas classificações levam em consideração a alta heterogeneidade molecular, a instabilidade cromossômica, mutações, perfil da expressão de mRNA e alterações epigenéticas, incluindo metilação do DNA (BASS et al., 2014).

1.3 Metilação do DNA

A metilação do DNA é o primeiro descrito e mais amplamente estudado mecanismo epigenético, no qual desempenha um importante papel na regulação da expressão gênica e manutenção da estabilidade genômica (CUI; XU, 2018).

Assim como toda modificação epigenética, a metilação de DNA é um processo bioquímico, particularmente ocasionada pela adição covalente de um grupo metil no carbono 5' do anel pirimídico da citosina, em regiões ricas em dinucleotídeos Citosina e Guanina (CpG). Essas regiões ricas nesses dinucleotídeos são denominadas de ilhas CpG e são encontradas principalmente em regiões promotoras de genes funcionais. Esse processo é realizado por enzimas específicas denominadas de DNA metiltransferases (DNMTs) (JELTSCH; JURKOWSKA, 2014). Antagonicamente as DNMTs se tem as enzimas da família *Ten-eleven translocation* (TET), que são definidas por um domínio dioxigenase catalítico responsável pela oxidação da 5-metil citosina, revertendo a metilação do DNA e prevenindo a hipermetilação do genoma (RASMUSSEN; HELIN, 2016). Os processos de metilação e desmetilação do DNA, pelas DNMTs e TETs estão ilustrados na Figura 2.

Figura 2 - Metilação e desmetilação do DNA.



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: Ilustrado a esquerda é possível visualizar o DNA compactado envolto a uma histona, nele se tem em roxo os radicais metil conectados as citosinas do DNA, 5 metil-citosina (5mC). Na ampliação é mostrado o processo bioquímico de metilação e desmetilação iniciado a partir da citosina (C) do DNA que é modificada para 5mC quando as DNA metiltransferases (DNMT) transferem o radical metil (em vermelho) do s-adenosil metionina (SAM) para a citosina, transformando o SAM em S-adenosil-homocisteína (SAH). Uma vez metilada, a 5mC torna-se o substrato do processo de oxidação mediado por enzimas da família *Ten-eleven translocation* (TET) que gradualmente forma 5 hidroxmetilcitosina (5hmC), 5 formilcitosina (5fC) e 5 carboxicitosina (5caC), caracterizando a desmetilação do DNA (LYKO, 2018; RASMUSSEN; HELIN, 2016; JOHNSON; EVERS, 2008).

As DNMTs interagem com S-adenil metionina (SAM) que doa o radical metil, o qual será adicionada a citosina, resultando em 5-metilcitosina (5mC) (JELTSCH; JURKOWSKA, 2014). Geralmente, as ilhas CpG que se encontram com a ausência do radical metil estão relacionadas à estrutura transcricionalmente ativa, enquanto que a presença do radical metil nessas ilhas é responsável pelo silenciamento gênico (JOHNSON; EVERS, 2008).

Interessantemente, a presença simétrica de marcas de metilação em ilhas CpG em ambos os filamentos de DNA permite a preservação pós-replicativa dos padrões de metilação do DNA e é, portanto, uma característica chave da regulação epigenética (LYKO, 2018).

O SAM, doador universal do grupo metil que é adicionado a citosina, é formado a partir do ciclo de metabolismo de um carbono. O ciclo do um carbono. tem participação de diferentes nutrientes como folato, metionina, colina, riboflavina, vitaminas B-6 e B-12 (OBEID, 2013; CHAMBERLAIN et al., 2018). Alguns desses nutrientes são advindos somente da alimentação, podendo mostrar a importância de uma dieta balanceada na manutenção epigenética.

1.3.1 Metabolismo do um carbono

O ciclo de metabolismo do um carbono pode ser dividido em dois subciclos co-dependentes: o ciclo do folato, e ciclo da metionina. O ciclo do folato inicia-se após a ingestão do ácido fólico, o qual para ser ativo no organismo é reduzido a dihidrofolato (DHT) e depois em tetraidrofolato (THF) pela ação da enzima dihidrofolato redutase (DHFR). A partir dessa forma ele é convertido em 5,10-metilenotetra-hidrofolato (5mTHF) pela serina hidroximetiltransferase (SHMT). O 5mTHF é catalisado pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), a qual converte em 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF). Por sua vez, 5-MTHF serve de substrato, doando seu grupo metil e se reduzindo a THF (ANDERSON et al., 2013). Além da metilação do DNA, os derivados do folato mantêm a estabilidade do DNA, regulando sua biossíntese e reparo do DNA (DUTHIE, 2010).

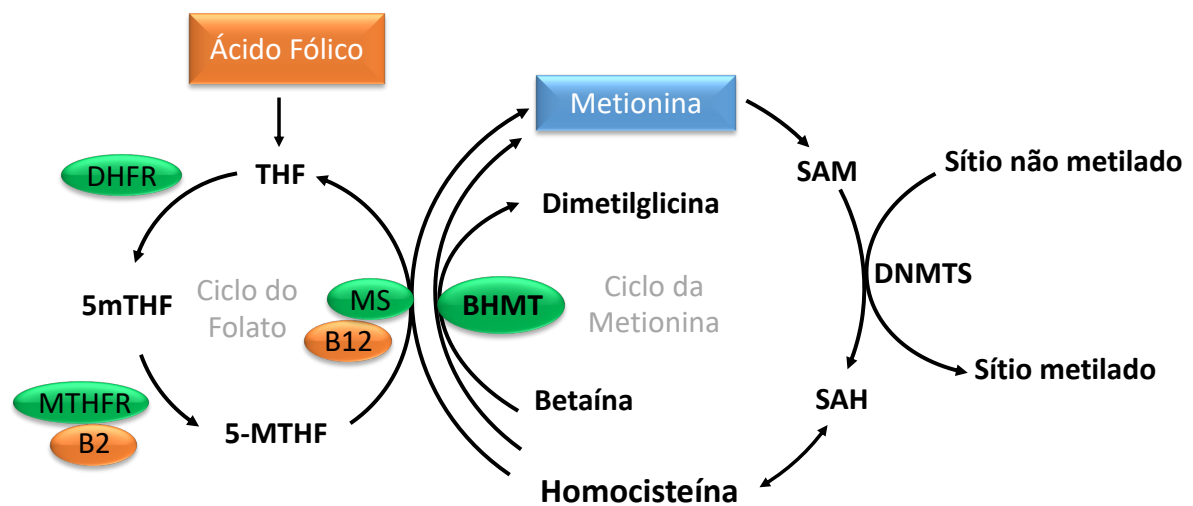
Diferentemente do 5-MTHF, a colina é um doador de grupo metila indiretamente. No metabolismo do um carbono, a colina dietética é oxidada em betaína, e a betaína, por sua vez, contribui para a homeostase da metionina através da doação de um grupo metil à homocisteína, resultando na conversão da homocisteína em metionina (MOSTOWSKA et al., 2011).

O ciclo da metionina começa com a adição do grupo adenosil à metionina pela metionina adenosiltransferase (MAT) formando SAM, que entra no metabolismo de um carbono como doador de metil para a metilação do DNA e modificações histônicas. Após a transferência do grupo metil do SAM para um receptor compatível, é produzida a S-adenosil-

homocisteína (SAH), um potente inibidor de DNMTs e histona metiltransferases (HMTs) (MENTCH; LOCASALE, 2015). Finalmente, a hidrólise da SAH produz adenosina e homocisteína, que podem ser remetiladas por 5-MTHF para metionina pela metionina sintetase (MS) e seu cofator vitamina B12 (cobalamina) (GRUBER, 2016).

A vitamina B12, é essencial para a atividade da MS que transforma a homocisteína em metionina, pois a B12 regula os níveis de SAM e SAH, que por sua vez vão regular a atividade das DNMTs (STEFANSKA et al., 2012). Na Figura 3 é possível visualizar com mais clareza todos os ciclos e processos do metabolismo do um carbono.

Figura 3 - Ciclo do um carbono.



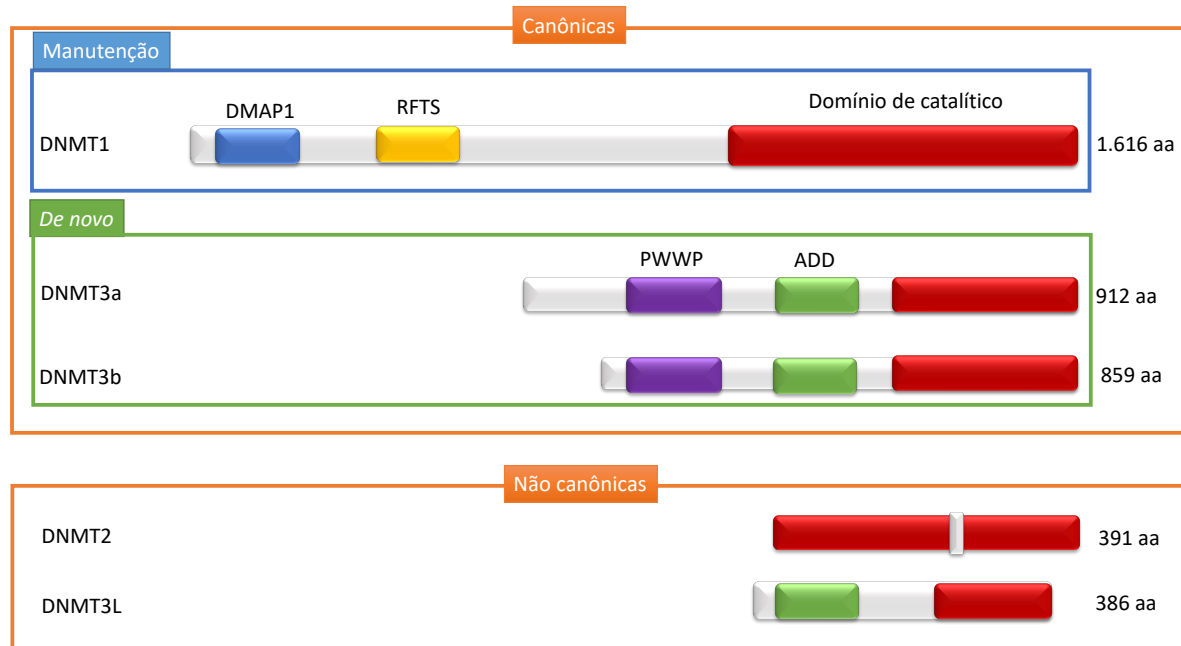
Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Representação do metabolismo de um carbono e seus cofatores. Em laranja estão as vitaminas advindas da alimentação, a betaína não está em laranja uma vez que é seu predecessor (colina) que vem da alimentação, em verde estão as enzimas que catalisam o processo, em azul está a metionina, o principal aminoácido envolvido no ciclo da metionina (CHAMBERLAIN et al., 2018)

1.3.2 DNA metiltransferases

No genoma humano é possível encontrar cinco diferentes tipos de DNMTs codificáveis (*DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3a*, *DNMT3b* e *DNMT3L*), as quais podem ser classificadas em diferentes formas, entre canônicas ou não canônicas, e de manutenção ou *de novo*. As DNMTs canônicas são aqueles em que sua função é conhecida e sua atividade catalítica bem definida, desse grupo fazem parte a DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. Em contrapartida temos as não canônicas, DNMT2 e DNMT3L, as quais suas funções ainda não são bem descritas e apresentam ausência de atividade catalítica. As DNMTs canônicas podem ser subdivididas em dois grupos de acordo com a função que exercem, sendo elas de manutenção (DNMT1) ou *de novo* (DNMT3a e DNMT3b) (LYKO, 2018). A Figura 4 sumariza as classificações das DNMTs e ilustra sua estrutura proteica de cada uma delas.

Figura 4 - Classificação da DNMTs e sua estrutura.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Envoltos pelas linhas laranja é possível identificar as DNA metiltransferase (DNMT) canônicas e não canônica. Envoltos em azul se tem a DNMT1, responsável pela metilação de manutenção e em verde é possível visualizar as enzimas responsáveis pela metilação de DNA *de novo*. Domínios conservados de membros da família DNMT são mostrados em cores diferentes. Todas as enzimas DNMT compartilham o domínio catalítico conservado (mostrado em vermelho). Na DNMT2 pode-se visualizar em prata o domínio CFT, domínio diferencia a DNMT2 das outras DNMTs por não ser capaz de se conectar ao DNA de dupla fita (GOLL; BESTOR, 2005). O número de resíduos de aminoácidos (aa) indicados para cada proteína é representativo do homólogo humano. O DNMT3L é uma variante DNMT3 cataliticamente inativa que não possui a parte N-terminal do domínio regulatório (incluindo o domínio Pro-Trp-Trp-Pro (PWWP)) e a parte C-terminal do domínio catalítico.

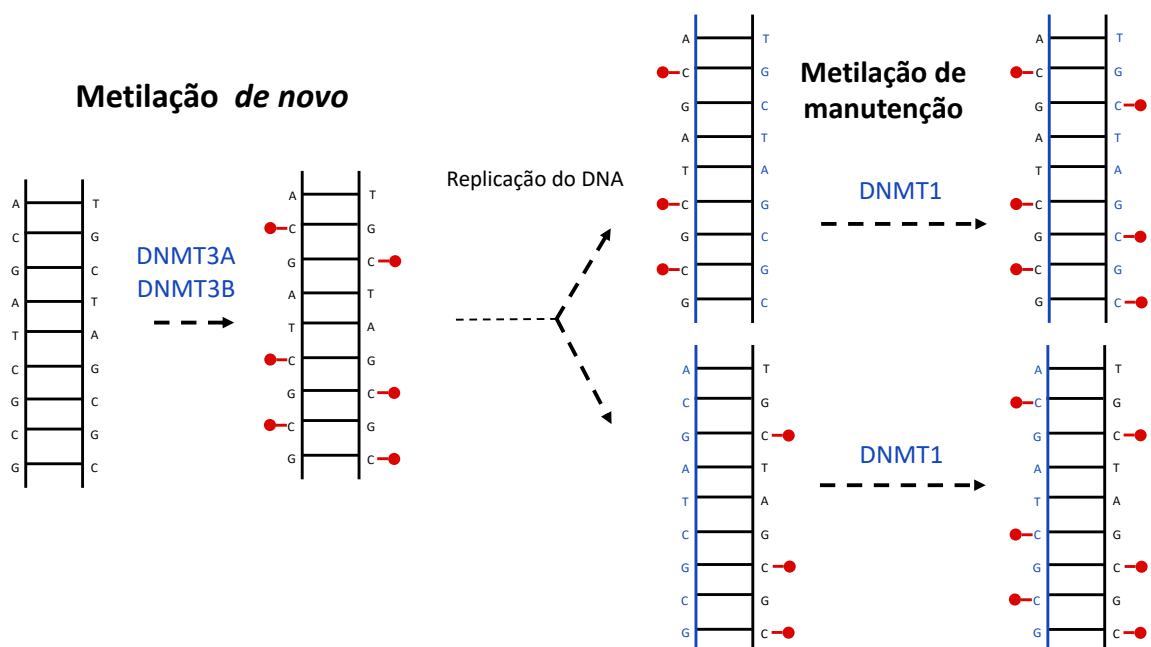
A DNMT1 foi a primeira enzima a ser descrita e clonada, devido a sua alta conservação em ratos e humanos (BESTOR, 2000; ILLINGWORTH et al., 2010; CUI; XUE, 2018). Essa enzima caracteriza-se por conter aproximadamente 1620 aminoácidos e sua função consiste na manutenção de padrões de metilação de DNA pré-existentes durante a replicação de DNA, graças a atração que essa enzima possui por DNA hemimetilado em ilhas CpGs (YODER et al., 1997; CUI; XUE, 2018). Ou seja, no processo de replicação do DNA, a fita nascente não possui o radical metil, somente a fita parental. Identificando esta condição, esta enzima é responsável por adicionar um radical metil nos sítios CpG simétricos da fita nascente, dessa forma, mantendo o padrão de metilação do DNA (LYKO, 2018)

O domínio N-terminal da enzima DNMT1 contém vários subdomínios que medeiam interações moleculares que podem proporcionar o silenciamento gênico, como o domínio de ligação da proteína 1 associada a DNMT1 (DMAP1). Esse domínio é importante para a interação da DNMT1 com a histona deacetilase 2 (HDAC2), mecanismo esse interligado a compactação da cromátide e silenciamento gênico (ROUNTREE et al., 2000; LYKO, 2018).

Outro fator é a sequência de direcionamento dos focos de replicação ou, como denominado em inglês, *replication foci targeting sequence* (RFTS), domínio necessário para direcionar a DNMT1 aos focos de replicação e auxiliar na manutenção da metilação do DNA por meio da interação da proteína com citosinas hemimetiladas (LEONHARDT et al., 1992; LYKO, 2018).

Esses domínios presentes na DNMT1 propiciam uma maior seletividade por metilar ilhas CpG uma vez que a simetria entre as fitas de DNA com CpGs permite a identificação das citosinas hemimetiladas e a preservação pós-replicativa dos padrões de metilação do DNA (LYKO, 2018)(Figura 5).

Figura 5 - Metilação de DNA de novo versus de manutenção.



Fonte: Adaptada de Moison et al. (2013).

Nota: Na metilação *de novo* é possível visualizar o DNA sem padrão de metilação e após a ação das enzimas DNMT3A e DNMT3B é feito esse padrão de metilação, uma vez estabelecido quando o DNA é replicado as fitas mães que continham o padrão de metilação servem de molde para a DNMT1 repetir o padrão na fita não metilada, caracterizando a metilação de manutenção.

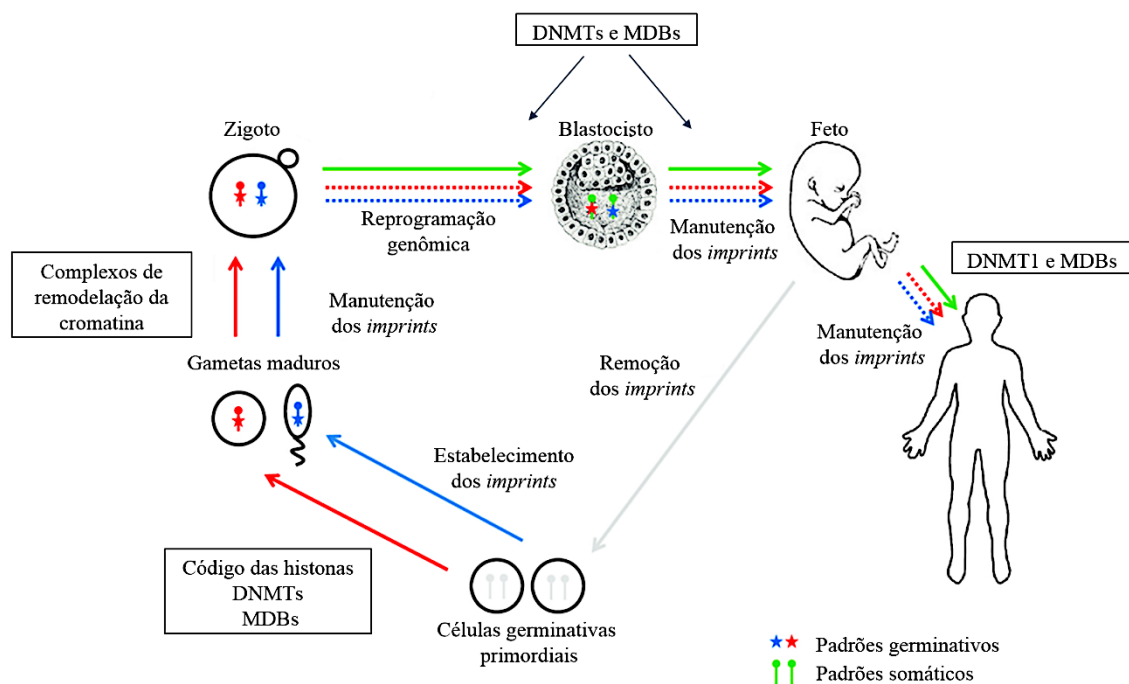
Em contraste a essas características temos as DNMT3A e DNMT3B que agem em sua maioria na replicação celular durante o desenvolvimento embrionário, estabelecendo novos padrões de metilação, metilação *de novo* (OKANO et al., 1999; LYKO, 2018). As DNMT3A e DNMT3B são muito similares contendo os mesmos domínios, tanto o PWWP e ADD. O domínio PWWP é responsável pela interação proteína-proteína que medeia a ligação das DNMT3A e DNMT3B às moléculas de histona, particularmente na histona 3 na trimetilação

de lisina 36. Enquanto, o domínio ADD medeia o direcionamento dos complexos DNMT3 para as moléculas de histona H3 que não são metiladas na lisina 4 (LYKO, 2018).

Outro membro da família de DNMT3 é a DNMT3L, uma versão truncada que não possui o domínio PWWP e a porção C-terminal do domínio catalítico ativa. Assim, a DNMT3L apresenta ausência da função catalítica isoladamente (AAPOLA et al., 2000), porém quando duas moléculas de DNMT3L se associam a duas moléculas de DNMT3A formam um complexo heterotetramérico, no qual as moléculas de DNMT3A estão no centro, aumentando a afinidade do complexo pelo DNA e resultando em uma metilação mais eficiente (JIA et al., 2007; LYKO, 2018).

Para compreender a metilação *de novo* é necessário saber que os padrões de metilação do DNA genômico são estabelecidos no estágio inicial da embriogênese pela DNMT3a e DNMT3b. Uma vez estabelecidos os padrões globais de metilação, eles são mantidos durante a replicação de uma maneira dependente da linhagem celular pela DNMT1, sofrendo uma segunda reprogramação da metilação na gametogênese, nos quais os padrões globais de metilação do DNA são removidos durante o estágio inicial do desenvolvimento de células germinativas pelas enzimas da família TET e restabelecidos antes da meiose em gonócitos e oócitos pela DNMT3a e DNMT3b (BIRD, 2002). A Figura 6 ilustra bem esse processo de formação dos padrões de metilação e reprogramação

Figura 6 - Processo de formação dos padrões de metilação de DNA genômicos.



Fonte: Adaptada de Mackay e colaboradores (2014).

Nota: Na linha germinal fetal, todos os padrões de metilação do DNA são apagados (linha cinza), e depois as impressões de metilação paterna (azul) e materna (vermelha) são estabelecidas durante a gametogênese pelas DNMT3a e DNMT3b, juntamente com as MBPs com domínio MBD. Os dois genomas germinativos que são combinados na fertilização sofrem reprogramação do genoma específico do pai no embrião inicial, o qual a maioria dos padrões germinativos é novamente apagada e padrões somáticos (verde) são estabelecidos, pelas DNMT3. Apenas os genes impressos mantêm seus padrões germinativos durante o desenvolvimento do novo organismo, sendo a DNMT1a principal enzima responsável por essa manutenção.

Uma particularidade dos padrões de metilação do DNA estabelecidos pela metilação *de novo* é que eles não são seletivos para ilhas CpG; essa metilação inespecífica foi inicialmente considerada um subproduto da atividade das DNMT3, que não são seletivas para os dinucleotídeos CpG (OKANO; XIE; LIE, 1998; RAMSAHOYE et al., 2000; LISTER et al., 2009). Entretanto, vários estudos sugeriram uma função epigenética independente da metilação de ilhas CpG (LISTER et al., 2013; KEOWN et al., 2017).

Embora a "divisão do modelo de trabalho", que propõe que a DNMT3 estabeleça os padrões de metilação do DNA, que a DNMT1 os mantenha e que as TETs os desfaçam, seja amplamente admitido, acredita-se que seja um modelo muito simplista (LYKO, 2018). Por exemplo, vários estudos demonstraram que as enzimas responsáveis pela metilação *de novo* também contribuem para a manutenção e remodelação dinâmica dos padrões de metilação do DNA em células diferenciadas (LIAO et al., 2015; ARAND et al., 2012; RADDATZ et al., 2012), ilustrando a complexidade da função dessas enzimas que se interligam com outras proteínas metilando o DNA, mas também mediando vários outros processos.

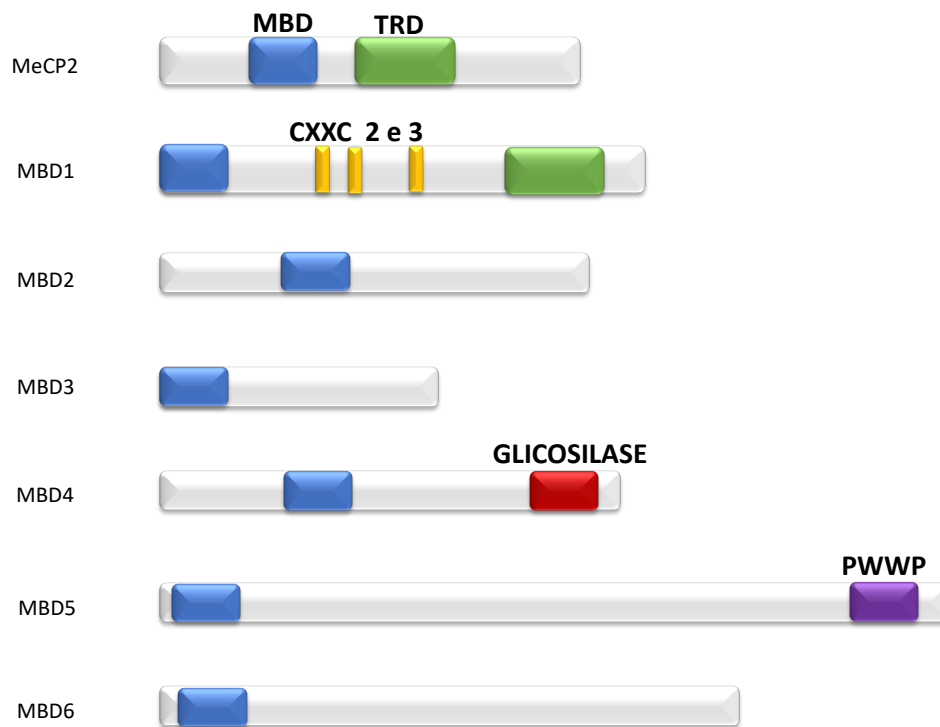
1.3.3 Interação do DNA metilado com proteínas ligadoras de metil CpG

O processo de metilação do DNA promove o recrutamento de complexos protéicos chamados de proteínas ligadoras de metil CpG (MBP). Uma vez ligado ao DNA metilado, as MBPs traduzem o sinal de metilação do DNA em estados funcionais apropriados, através de interações com diversos parceiros, um bom exemplo é a interação de MBPs com enzimas modificadoras de histonas, que levam à conformação de heterocromatina que por sua vez acarreta o silenciamento gênico (FOURNIER et al., 2011).

As MBPs são divididas em três diferentes famílias de acordo com os seus domínios: proteínas com domínio MBD, proteínas que possuem dedos de zinco e proteínas contendo o domínio SRA (HUNG; SHEIN, 2003). A família das proteínas que possuem domínio MBD é mais numerosa e se divide em três subfamílias, sendo o MeCP2-MBD a maior e mais estudada. As proteínas MBD compartilham uma capacidade comum de ligar citosinas simetricamente metiladas através do domínio MBD. Cada proteína apresenta uma estrutura de domínio distinta

que interage com diferentes proteínas. Nesse grupo é possível encontrar: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MBD5 e MBD6 (Figura 7).

Figura 7 - Proteínas da subfamília MeCP2-MBD e seus respectivos domínios.



Fonte: Adaptada de Parry e Clarke (2011) e Laget et al. (2010).

Nota: Em azul está o domínio MBD que em sua maioria permite a ligação da proteína ao DNA metilado, em verde o domínio TRD que é um repressor transcricional, em vermelho o domínio glicosilase, que permite o reparo do DNA, em amarelo os domínios de dedos de zinco e em roxo o domínio PWWP que medeia a ligação com o DNA metilado e o silenciamento gênico por modificação da conformação da cromatina.

A proteína 2 de ligação a metil-CpG (MeCP2) é a proteína fundadora das MBP, sendo a primeira MBP descoberta, tendo como função a repressão transcricional global. Ela pode se ligar a uma única citosina metilada e recrutar o complexo repressor Sin3A para silenciar a transcrição via desacetilação de histonas (CHEN et al., 2015, GABEL et al., 2015).

A proteína MBD1 é o maior membro da família, tendo um perfil de expressão complexo, pois há treze isoformas do gene. A principal diferença entre as isoformas é a presença de dois ou três domínios de dedos de zinco do tipo CXXC (JØRGENSEN, BEN-PORATH; BIRD, 2004). As isoformas contendo dois domínios CXXC são as que tem sua função definida na repressão de citosinas metiladas (NAKAO et al., 2001). Onde ao se agregar com outras proteínas (SETDB1: MCAF1) formam o complexo MBD1: SETDB1: MCAF1 que converte a histona 3 dimetilada na lisina 9 em histona 3 trimetilada na lisina 9, resultando na compactação da cromatina e repressão transcricional (ICHIMURA et al., 2005; WANG et al., 2003)

A proteína MBD2 é um repressor transcricional indireto, uma vez que para silenciar a expressão gênica a MBD2 teria que se ligar a dois complexos repressores transcricionais diferentes, MECP188 e Mi2/NuRD. Com isso ambos dos complexos direcionam as histonas desacetilases e remodeladores de cromatina para promotores metilados, onde eles remodelam a cromátide de forma a reprimir a transcrição (GUEZENNEC et al., 2006; FENG et al., 2002).

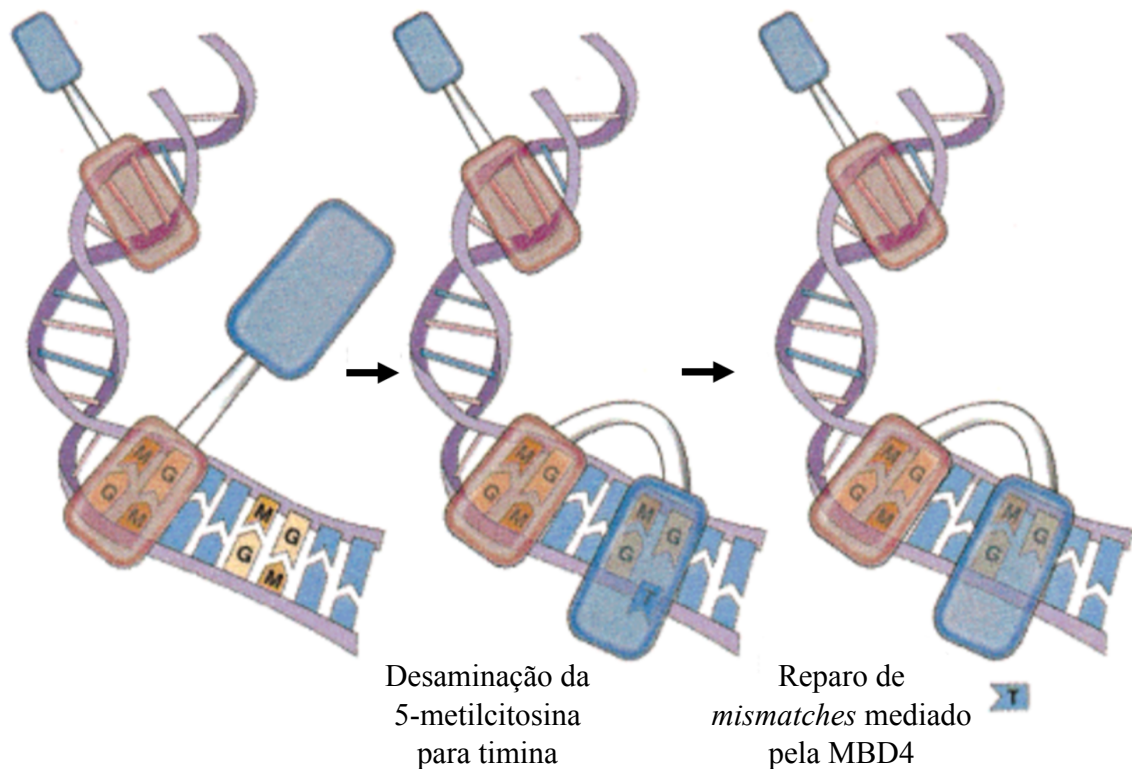
A proteína MBD3 possui uma estrutura muito parecida com a da MBD2, com a diferença de ser incapaz de se ligar a citosinas metiladas devido a duas alterações no domínio MBD. Apesar disso, essa proteína ainda desempenha um papel crucial no silenciamento gênico se ligando ao complexo NuRD/Mi2 que participa da remodelação da cromatina a partir das atividades da histona deacetilase, particularmente a histona desacetilase 1 (HDAC1) e a proteína associada a metástase 2 (MTA2) (SAITO; ISHIKAWA, 2002).

A proteína MBD5 possui duas isoformas: uma isoforma longa contendo um domínio PWWP próximo ao seu terminal carboxil; e uma isoforma menor que não possui esse domínio. Codificada, a MBD5 interage com o complexo repressivos policomb PR-DUB que catalisa a desubiquitinação da H2A lisina 118 (BAYMAZ et al., 2014), remodelando a cromatina e promovendo o silenciamento gênico.

A função da proteína MBD6 ainda não é bem definida, mas hoje já se sabe que a MBD6 tem uma atração por genes alvo (FOXK2 e BAP1) e que é recrutada para locais de danos no DNA (BAYMAZ et al., 2014).

Diferentemente das funções de outras MBDs que agem no silenciamento gênico direto ou indiretamente, a MBD4 interage com os mecanismos de reparo do DNA (HENDRICH et al., 1999). A MBD4 usa seu domínio MBD N-terminal para ligar-se a ilha CpG metilada e seu outro domínio glicosilase C-terminal para mediar o reparo da citosina mutada, evitando possíveis erros de transcrição e tradução do DNA. Assim, a MBD4 desempenha um papel fundamental na manutenção da regulação gênica do DNA metilado e na supressão das mutações nos sítios CpG (PARRY; CLARKE, 2011). A Figura 8 ilustra os mecanismos de reparo da enzima MBD4 nas ilhas CpG metiladas.

Figura 8 - Ilustração dos mecanismos de reparo da enzima MBD4 nas ilhas CpG metiladas.



Fonte: Adaptada de Bellacosa (2001).

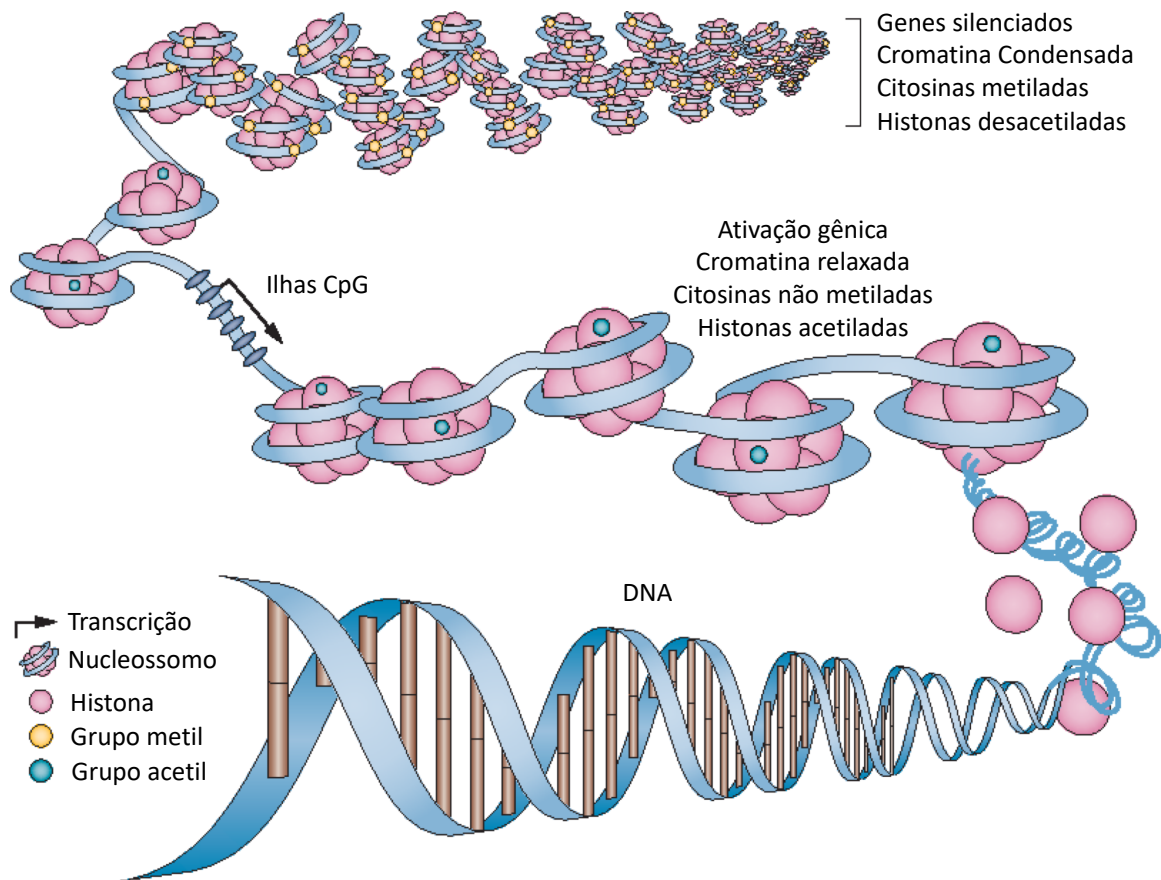
Nota: A MBD4 com seu domínio MBD (em vermelho) procura no genoma sítios CpG metilados. A desaminação de 5-metilcitosina (M) e da timina (T) em uma ilha CpG gera um desajuste G: T que é processado pelo domínio glicosil-catalítico da MBD4 (em azul). A atividade da timina glicosilase da MBD4 produz um local apurínico / apirimidínico (AP) ao qual o domínio catalítico permanece fortemente ligado, até eventos de reparação subsequentes.

A maioria das MBPs para executar sua função de silenciamento gênico necessitam do auxílio de outras proteínas, um bom exemplo são as enzimas modificadoras de histonas, presentes em quase todos os processos de silenciamento gênico das MBDs, ilustrando a forte associação entre metilação de DNA, MBPs e modificações de histonas (PARRY; CLARKE, 2011; FOURNIER et al., 2011).

1.4 Modificações de Histonas

As histonas são proteínas básicas em eucariotos que formam uma estrutura octamérica que empacota o DNA em uma estrutura conhecida como nucleossomo (KANWAL; GUPTA, 2012). Esses nucleossomos atuam como importantes reguladoras da expressão gênica, uma vez que determinam o grau de compactação e o remodelamento da cromatina, podendo inibir ou facilitar o acesso dos fatores de transcrição. Na Figura 9 é ilustrado a regulação gênica de acordo com o grau de compactação da cromatina.

Figura 9 - Regulação epigenética da expressão gênica.



Fonte: Adaptada de Azad et al (2013).

Nota: No topo da imagem é possível visualizar a cromatina condensada onde há o silenciamento gênico, citosinas metiladas e histonas desacetiladas, mais abaixo se visualiza ilhas CpG e com ela há a transcrição do gene, ilustrando a expressão gênica, relaxamento da cromatina, citosinas não metiladas e histonas acetiladas.

As modificações de histonas estão intrinsicamente relacionadas com a metilação do DNA, uma vez que as DNMTs interagem diretamente com as enzimas modificadoras de histonas ou indiretamente por meio das MBPs. Alguns exemplos já foram citados nesse trabalho como a interação da DNMT1 com a HDAC2 e a interação DNMT3a que interagem com a MeCP2, que recruta uma Sin3A que nada mais é do que uma HDAC.

As modificações de histonas constituem marcas características, que em conjunto são chamadas de “código de histonas”, determinantes da atividade ou inatividade da cromatina (MARSH et al., 2014). Os resíduos de lisinas (K) conservados nas caudas amino-terminais das histonas, conhecidos como caudas histônicas, permitem a ligação covalente de radicais metil e acetil (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

A metilação de histona inclui metilação única, dupla ou tripla em lisinas (K) ou arginina (R) na cauda N-terminal de H3 e H4, pelas enzimas da família K metiltransferase (HKMTs) e R metiltransferases (PRMTs) (WANG; ZHU, 2008). Os seus efeitos epigenéticos podem variar dependendo de quantos radicais metil se ligarão e em qual resíduo de K ou R ocorreu a modificação. Um bom exemplo dessa característica é a metilação única de H3K27 que ativa a expressão gênica, enquanto a dupla ou trimetilação de H3K37 inibe a expressão gênica (YANG; GU; ZHEN, 2014).

Por sua vez, a acetilação de histonas ocorre na K presente nas caudas N-terminais das histonas (LEGUBE; TROUCHE, 2003). A acetilação de histonas resulta de um equilíbrio dinâmico da atividade de duas famílias enzimáticas: histona acetiltransferases (HATs) e histona desacetilases (HDACs). A transferência do grupo acetil para K específicas na cauda amino terminal das histonas é realizada pelas HAT, resultando em transcrição do gene (YANG; GU; ZHEN, 2014; DI CERBO; SCHNEIDE, 2013). Por outro lado, as HDACs são enzimas que removem o grupo acetil da K e impedem que os elementos reguladores da transcrição se liguem aos promotores, inibindo a transcrição do gene, por meio da compactação da cromátide (AUDIA; CAMPBELL, 2016; SEIDEL et al., 2012).

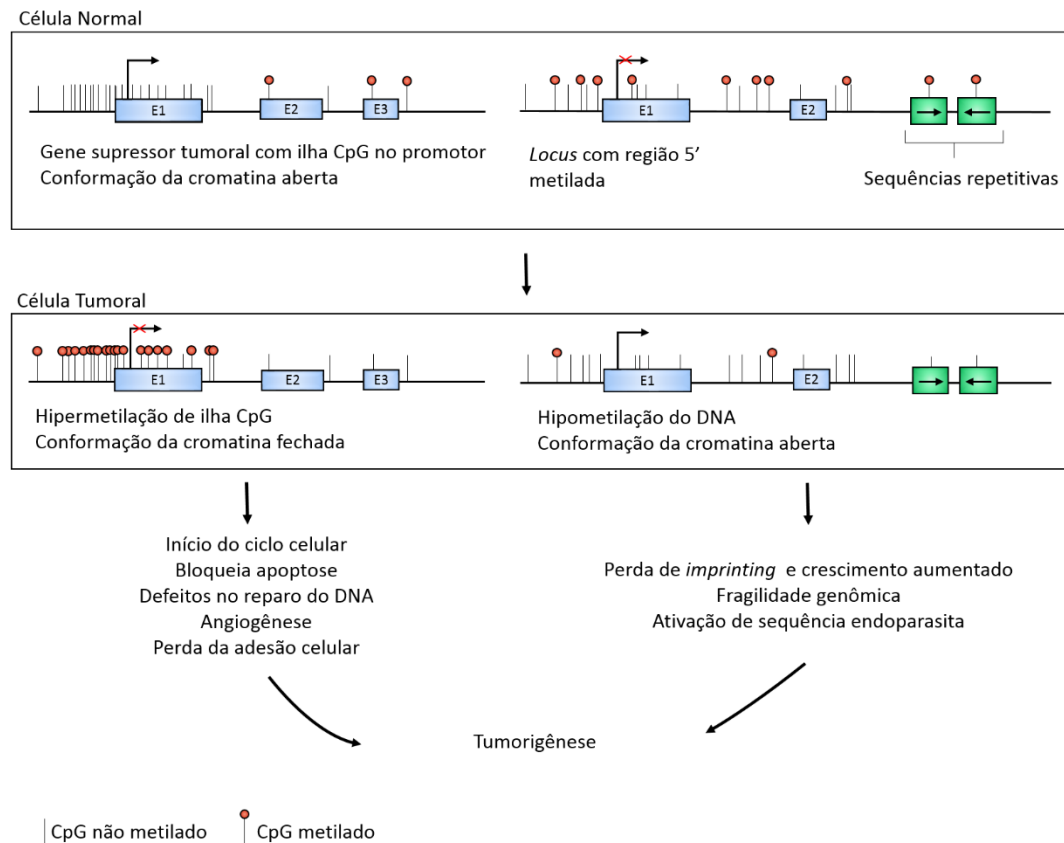
Esse dinamismo no organismo promovido pelas HATs e HDACs são vitais para a vida dos seres vivos, pois agem como reguladores e mantenedores do equilíbrio molecular. No entanto as modificações de histonas são uma pequena parte dos mecanismos epigenéticos que permitem o bom funcionamento do corpo, outro mecanismo como a metilação de DNA auxilia nesse processo, assim quando esses mecanismos são desregulados precedente para doenças são abertos, entre elas o câncer.

1.5 Metilação do DNA no câncer gástrico

No câncer, a alteração do padrão de metilação do DNA pode ser caracterizada como hipermetilação das ilhas CpG ou hipometilação global. A hipermetilação das ilhas CpG é caracterizada pelo ganho de metilação em citocinas que não estavam metiladas anteriormente, geralmente ocorrendo nas ilhas CpG localizadas em regiões promotoras de genes diretamente envolvidos na carcinogênese, como os genes supressores tumorais. Já a hipometilação global caracteriza-se pela perda de metilação em citosinas metiladas anteriormente, podendo ser determinada como uma das causas da instabilidade cromossômica e ativação de oncogenes (USHIJIMA; ASADA, 2010). Os genes supressores tumorais são responsáveis pelo reparo do DNA ou mecanismos de controle de crescimento e morte celular, enquanto que os oncogenes

são ligados ao crescimento e multiplicação celular e processos relacionados a tumorigênese (MOISON et al., 2013). A Figura 11 ilustra a comparação do status de metilação do DNA em células normais e tumorais.

Figura 10 - Metilação do DNA em célula normal versus célula cancerígena.



Fonte: Adaptada de Esteller (2007).

Nota: A hipermetilação de ilhas CpG de genes supressores tumorais é uma alteração comum em células tumorais, e resulta em silenciamento desses genes e perda da função celular normal. Ao mesmo tempo, o genoma das células tumorais passa por processo de hipometilação global do DNA nas sequências repetitivas, em tecido específico e em genes que sofrem *imprinting*, podendo levar mudanças e/ou perda de *imprinting*. E: exon.

Cada câncer tem um perfil de metilação de DNA que varia de acordo com seu tipo (MOISON et al., 2013). Um exemplo é o da família de genes *MAGE* que são normalmente hipermetilados em todos os tipos de células, com exceção das células testiculares saudáveis (DE SMET et al., 1999). Em contrapartida temos os oncogenes que se encontram hipoexpressos, alguns exemplos são: *R-RAS*, *RHOB* e *ELK1* descritos como re-expressos em CG após a desmetilação de seus promotores (NISHIGAKI et al., 2005).

O CG é um dos tumores com uma alta e precoce frequência de metilação aberrante, assim várias pesquisas vem desenvolvendo trabalhos relacionados ao status de metilação e a influência no prognóstico de pacientes com CG. Padrões de metilação de DNA recorrentes poderia ser útil como biomarcador na avaliação do risco de GC, no diagnóstico precoce, na

previsão do prognóstico do paciente e na avaliação da sensibilidade aos quimioterápicos (CALCAGNO; SMITH; BURBANO, 2015, OH et al., 2014, ZHANG et al., 2016).

No CG, vários genes foram identificados com sua expressão desregulada por alterações na metilação do DNA. O Quadro 3 sumariza alguns genes descritos como alterados por metilação do DNA em CG e suas associações aos dados clinicopatológicos dos pacientes. Além disso, outros estudos vêm explorando a importância clínica dos genes da maquinaria de metilação no CG (Quadro 4).

Quadro 3 - Genes alterados por metilação do DNA no CG e associações características clinicopatológicas

(continua)

Gene	Função	Metodologia	Clinicopatológico	Referências
<i>BNIP3</i>	Apoptose	Q-MSP	Resistência à quimioterapia Pior prognóstico	MURAI et al. (2005) SUGITA et al. (2011) HIRAKI et al. (2011)
<i>CDHI</i>	Invasão tecidual e metástase	Q-MSP MSP	Maior invasão tecidual Subtipo difuso Infecção por <i>H. pylori</i> Metástase em linfonodos Tamanho tumoral	KANG et al. (2008) BORGES et al. (2010) TAHARA et al. (2010) AL-MOUNDHRI et al. (2010) LEAL et al. (2007) YU et al. (2012) LEE et al. (2013) OH et al. (2014)
<i>CHFR</i>	Regulação do ciclo celular	MSP PS	Metástase em linfonodos Sensibilidade à quimioterapia Tamanho do tumor Diferenciação	OKI et al. (2009) HIRAKI et al. (2010) HU et al. (2010) HU et al. (2011) LI et al. (2014)

Quadro 3 - Genes alterados por metilação do DNA no CG e associações características clinicopatológicas

(continuação)

Gene	Função	Metodologia	Clinicopatológico	Referências
<i>DAPK</i>	Apoptose	Q-MSP MSP	Metástase em linfonodos	ZOU et al. (2009) HU et al. (2010) TAHARA et al. (2010) SUGITA et al. (2011) BEN AYED-GUERFALI et al. (2011) YAO et al. (2012)
<i>MGMT</i>	Reparo do DNA	MSP	Metástase em linfonodos Óbito relacionado ao câncer Infecção por <i>H. pylori</i>	KSIAA et al. (2009) ZOU et al. (2009) HIRAKI et al. (2010) BALASSIANO et al. (2011) SHI et al. (2012) YOUSUF et al. (2014) ZHANG et al. (2016)
<i>MLH1</i>	Reparo do DNA	MSP COBRA	Diferenciação Pior prognóstico Resistência à quimioterapia Estadiamento Sobrevida global	POPLAWSKI et al. (2008) HIRAKI et al. (2010) KIM et al. (2010) SHIN et al. (2012) LI et al. (2014) SHIGEYASU et al. (2015)

Quadro 3 - Genes alterados por metilação do DNA no CG e associações características clinicopatológicas.

(conclusão)

Gene	Função	Metodologia	Clinicopatológico	Referências
<i>RASSF1A/RASSF2</i>	Reparo do DNA Regulação do ciclo celular	Q-MSP MSP	<p>Maior invasão tecidual Diferenciação Metástase em linfonodos Estadiamento Pior prognóstico</p>	<p>ZOU et al. (2009) GUO et al. (2009) SHIN et al. (2012) YAO et al. (2012) BHAT et al. (2016)</p>
<i>RUNX3</i>	Transdução de sinais	Q-MSP MSP	<p>Maior invasão tecidual Metástase a distância Infecção por <i>H. pylori</i> Metástase em linfonodos Estadiamento do Tumor</p>	<p>SAKAKURA et al. (2009) LEE et al. (2009) ZOU et al. (2009) HIRAKI et al. (2010) HU et al. (2010) TAMURA et al. (2009) FAN et al. (2011) AL-MOUNDHRI et al. (2010) LU et al. (2012)</p>

Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.**Nota:** Q-MSP: *Quantitative Methylation-specific PCR*, MSP: *Methylation-specific PCR*, COBRA: *Combined bisulfite restriction analysis*.

Quadro 4 - Genes da maquinaria de metilação alterados no CG.

(continua)

Gene	Função	Alteração	Referências
<i>DNMT1</i>	Manutenção de padrões de metilação, repressão da transcrição	Regulação alta	FANG et al. (2004) DING et al. (2008) MUTZE et al. (2011) YANG et al. (2011) HE et al. (2013) CAO et al. (2014) MA et al. (2017)
<i>DNMT3A</i>	Metilação de novo durante a embriogênese, repressão do estabelecimento de imprints	Regulação alta	DING et al. (2008) FAN et al. (2010) YANG et al. (2011) CAO et al. (2014)
<i>DNMT3B</i>	Metilação de novo durante a embriogênese, repressão da metilação	Regulação alta	DING et al. (2008) SU et al. (2010) HU et al. (2010) YANG et al. (2011) MUTZE et al. (2011) CAO et al. (2014)
<i>MBD2</i>	Repressão da transcrição, DNA desmetilase	Regulação baixa	KANAI et al. (1999) FANG et al. (2004) PONTES et al. (2013)

Quadro 4 - Genes da maquinaria de metilação alterados no CG

(conclusão)

Gene	Função	Alteração	Referências
<i>MBD3</i>	Repressão da transcrição, mas necessita da MBD2 para ser recrutada para o DNA metilado	Regulação baixa	PONTES et al. (2013)
<i>MBD4</i>	Repressão da transcrição Reparo do DNA	Regulação baixa Mutaçao	D'ERRICOA et al. (2009) PINTO et al. (2003)
<i>MECP2</i>	Repressão da transcrição Modificações na cromatina	Regulação Alta	TONG et al. (2016) ZHANG et al. (2017)
<i>KAISO</i>	Repressão da transcrição	Regulação Alta	OGDEN et al. (2008)

Fonte: Elaborado pelo autor do trabalho.

1.5 Aplicabilidade clínica

No câncer é frequentemente discutido o papel das proteínas responsáveis pela metilação do DNA, uma vez que as alterações nos padrões de metilação do DNA são uma das primeiras e mais consistentes mudanças moleculares dos tumores humanos (BAYLIN; JONES, 2011; HEYN; ESTELLER, 2012). Além disso, há medicamentos inibidores de DNMTs, como a 5-azacitidina e a 2-desoxi-5-azacitidina, aprovados para tratamento de neoplasias hematopoiéticas (JONES; ISSA; BAYLIN, 2016). Esses medicamentos são análogos do nucleotídeo citosina presente no DNA e RNA. Seu principal mecanismo consiste na inibição das DNMTs, causando hipometilação do DNA e reexpressão de supressores tumorais anteriormente metilados. Esse processo é realizado por meio de uma cascata de fatores, iniciada pela fosforilação da 5-azacitidina e a 2-desoxi-5-azacitidina por enzimas específicas, esse processo inativa e degrada as DNMTs promovendo uma redução da metilação (STRESEMANN; LYKO, 2008).

Muitos autores sugerem que o uso de medicamentos com efeito na metilação do DNA em sinergia com a imunoterapia poderia melhorar o impacto clínico em neoplasias hematopoiéticas e abranger o tratamento de tumores sólidos (JONES; ISSA; BAYLIN, 2016; CHIAPPINELLI et al., 2016; AHUJA; EASWARAN; BAYLIN, 2014). No entanto, é importante observar que os modos de ação clinicamente relevantes da 5-azacitidina e da 2-desoxi-5-azacitidina faltam ser completamente compreendidos (LYKO, 2018). Além disso, os biomarcadores de metilação que predizem como um paciente responderá a esses inibidores da DNMTs precisam ainda ser estabelecidos, a fim de conhecer os efeitos adversos, como resposta a danos no DNA (MASLOV et al., 2012).

A disponibilidade clínica precoce desses medicamentos e sua potencial atividade comprovadamente em laboratório têm ofuscado a pesquisa sobre os papéis das proteínas responsáveis pela metilação do DNA na condução do desenvolvimento de tumores, que atualmente é apoiada apenas por alguns modelos de camundongos (LYKO, 2018; LINHART et al., 2007; LAIRD et al., 1995). Observando essa realidade, o presente estudo explora a expressão membros da maquinaria de metilação (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MBD4* e *MECP2*), no intuito de compreender os requisitos funcionais de atividades específicas da metilação do DNA na carcinogênese gástrica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de genes da maquinaria de metilação de DNA na carcinogênese gástrica e sua significância clínica.

2.1.1 Objetivo específicos

- Realizar a quantificação relativa da expressão de genes da maquinaria de metilação de DNA – *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MBD4* e *MeCP2* em amostras de tecido gástrico pareadas tumoral e não-neoplásico adjacente, e amostras de tecido gástrico de indivíduos sem câncer;
- Relacionar os resultados obtidos com os dados clinico-patológicos como gênero, idade, tipo histopatológico, extensão do tumor, presença de metástase em linfonodo e à distância.
- Identificar associação dos resultados encontrados entre si.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tumores primários

Foram coletadas 61 amostras pareadas de tecido gástrico tumoral (T) e amostras de tecido gástrico não-tumoral adjacente (NTA) de pacientes com adenocarcinoma gástrico submetidos à gastrectomia. Dentre esses, 38 pacientes (56 anos \pm 12,1; média \pm DP) são provenientes do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) e 23 pacientes (65 anos \pm 12,2) provenientes do Hospital São Paulo (HSP). Todas as amostras foram coletadas antes da administração de tratamento quimioterápico e/ou radioterápico. A análise histopatológica dos fragmentos tumorais a fresco foi realizada no Serviço de Cirurgia Geral e Serviço de Anatomia Patológica do HUJBB e no Departamento de Patologia do HSP. As características clinicopatológicas dos tumores gástricos podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características clinicopatológicas das amostras de tumores gástricos.

	HUJBB	HSP
Idade		
<50 anos	13	7
≥50 anos	25	18
Gênero		
Masculino	25	11
Feminino	13	14
Histopatologia^a		
Intestinal	30	10
Difuso	8	13
Invasão		
pT1	5	2
pT2	7	3
pT3	14	7
pT4	12	13
Metástase em Linfonodos		
pN0	5	9
pN1-N3	33	16
Estádio		
I	7	3
II	11	9
III	7	9
IV	13	4

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: a. Classificação de Laurèn (1965); b. Classificação World Health Organization (2017); c. 8th Edition of the AJCC Cancer Staging manual: Stomach.

Além disso, foram coletadas 30 amostras de tecido gástrico de indivíduos sem tumor (ST), submetidos à endoscopia, todas provenientes do HUJBB. Todos os indivíduos receberam informações quanto aos objetivos e protocolo da pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre-esclarecido, cujo modelo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP e do HUJBB (ANEXOS I, II, III e IV).

3.2 Extração

A extração de DNA e RNA foi realizada por meio de AllPrep® DNA/RNA Mini kit (Qiagen), segundo instruções do fabricante. A qualidade e a quantificação de RNA extraídos foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% e espectrofotômetro NanoDrop ND-100

(Thermo Scientific). Apenas amostras com razão A260/A280 de 1,8-2,0 e A230/A260 maior que 1,8 foram utilizadas.

3.3 Detecção de *Helicobacter pylori*

A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a detecção direta da presença da *H. pylori* a partir de biópsias gástricas a fresco, congeladas ou fixadas em parafina (CLAYTON et al., 1991).

Neste estudo, a detecção de *H. pylori* foi realizada por meio da técnica de PCR para o gene *Hpx*, utilizando um par de nucleotídeos Hpx1 - 5'-CTGGAGARACTAAGYCCTCC-3' e Hpx2 - 5'-GAGGAATACTCATTGCGAAGGCGA - 3' os quais amplificam um fragmento de 150pb correspondente ao gene 16S-rRNA da *H. pylori* (HAMAJIMA, 2003). A reação da PCR foi realizada para um volume final de 25 µl contendo 200 µM de dNTPs, 200 µM de MgCl₂, 200 pM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de Taq polimerase e 100 ng de DNA. Para as amostras inicialmente negativas, foram realizadas mais duas reações de PCR com aumento da concentração de DNA (200ng e 300ng). O resultado é considerado positivo quando é observada a amplificação do produto de PCR em duas reações. As condições de amplificação para o gene *Hpx* utilizadas foram: desnaturação 94°C/5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C/45 seg, 59°C/ 45 seg, 72°C/45 seg e 72°C/7 min de extensão final.

Em cada experimento de PCR para o gene *Hpx*, foi incluída uma amostra controle, previamente caracterizada quanto à presença de *H. pylori*. O resultado da amplificação é observado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio a 0,0004% e visualizado em transluminador ultravioleta.

3.4 Expressão por PCR em tempo real

A conversão de RNA para DNA complementar foi realizada pelo kit High Capacity (Life Technologies) de acordo com instruções do fabricante. Os ensaios para o estudo dos genes da maquinaria da metilação (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MBD4* e *MeCP2*) foram selecionados utilizando-se Taqman® Gene Expression Assay (Life Technologies), enquanto que os genes de referência foram selecionados utilizando-se Taqman® Endogenous Control (Life Technologies).

Os genes de referências selecionados para esse trabalho foram o *GAPDH* e *B2M*, gene esses pré-estabelecidos por Wisnieski e colaboradores (2013), os menores detalhes podem ser vistos no Quadro 5.

Quadro 5 - Genes avaliados neste estudo.

Gene	Nome do Gene	Ensaio TaqMan	Localização	Função
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Hs99999905_m1	12p13	Oxidoreductase; metabolismo de glicose
B2M	Beta 2 Microglobulina	Hs00984230_m1	15q21-q22	Complexo maior de histocompatibilidade de classe I
<i>DNMT1</i>	DNA metiltransferase 1	Hs00154749_m1	19p13.2	Manutenção dos padrões de metilação gênico
<i>DNMT3A</i>	DNA metiltransferase 3 Alfa	Hs00173377_m1	2p23.3	Regulação da expressão gênica
<i>DNMT3B</i>	DNA (citosina-5)-metiltransferase 3 Beta	Hs00171879_m1	20q11.21	Regulação da expressão gênica
<i>MBD4</i>	<i>Metil-CpG Binding Domain 4, DNA glicosilase</i>	Hs00187498_m1	3q21.3	Reparo do DNA
<i>MeCP2</i>	<i>Metil-CpG Binding Protein 2</i>	Hs00172845_m1	Xq28	Repressão transcricional, inativação do cromossomo X.

Fonte: Elaborado pela autora.

O método escolhido para quantificação da expressão gênica foi o método Ct comparativo, o qual se baseia nos valores de *cycle threshold* (Ct) dos genes de referência e genes alvos. O Ct é o ciclo de amplificação onde a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *threshold*, o qual fixa a fase exponencial de amplificação para a coleta de dados pelo programa de análise. Os valores de ΔCt (Ct gene alvo – Ct genes de referência) e $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt teste – ΔCt calibrador) foram calculados e o valor de quantificação relativa (RQ = $E^{-\Delta\Delta Ct}$) foi utilizado de acordo com o método de Livak e Schmittgen (2001). Nesse método, o valor de RQ é ajustado pela eficiência (E) de amplificação dos genes estudados. Onde foram divididos em dois grupos; o primeiro grupo foi dividido pelas suas características histopatológicas, tecido neoplásico, tecido não neoplásico adjacente e não neoplásico, cujo seu calibrador foi o tecido não neoplásico. O segundo grupo foi dividido pelos indivíduos, no qual foram retiradas duas amostras, uma de tecido neoplásico e outra de tecido não neoplásico adjacente onde a segunda foi considerado calibrador (PFAFFL, 2001).

3.5 Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada utilizando-se o teste Shapiro-Wilk, como os dados não estavam em normalidade, foram utilizados testes não paramétricos. Para comparação dos dados de expressão entre os grupos de amostras de tecido gástrico estudadas e comparação dos dados de expressão e características clinicopatológicas utilizou-se Mann-Whitney.

Para análise de correlação entre os níveis de expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MBD4* e *MeCP2* foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Classificou-se como correlação fraca quando $r < 0,40$, moderada quando $0,40 < r < 0,59$, forte quando $0,60 < r < 0,79$ e muito forte quando $r > 0,8$. Valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. Os dados foram analisados utilizando programa SPSS prisma 7.1, assim como no desenvolvimento dos gráficos e quadros.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão dos genes

A primeira expressão gênica realizada foi a do gene *Hpx*, no qual todas as amostras de tecidos tumorais analisadas se mostraram positivas para, por essa razão elas não foram adicionadas nas análises de clinicopatológico.

A segunda quantificação gênica foi realizada em três tipos de amostras de tecidos, sendo elas tecido sem tumor (ST) advindo de indivíduos sem neoplasia, não tumoral adjacente (NTA) e tumoral (T) pareadas.

A mediana (M) e o desvio interquartilico (IQ) da quantificação relativa dos genes da maquinaria de metilação do DNA nos três diferentes grupos de tecido estudados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de mediana e desvio interquartilico da quantificação relativa da expressão de genes da maquinaria de metilação do DNA.

Gene	ST		NTA		T	
	M	IQ	M	IQ	M	IQ
<i>DNMT1</i>	0,862	1,318	1,506	2,172	1,625	2,136
<i>DNMT3A</i>	2,09	2,421	9,816	19,97	2,694	3,3
<i>DNMT3B</i>	1,047	1,629	0,7453	1,363	0,68	1,407
<i>MBD4</i>	1,565	2,113	2,63	4,789	1,09	2,045
<i>MECP2</i>	1,211	1,702	2,504	4,71	1,471	3,048

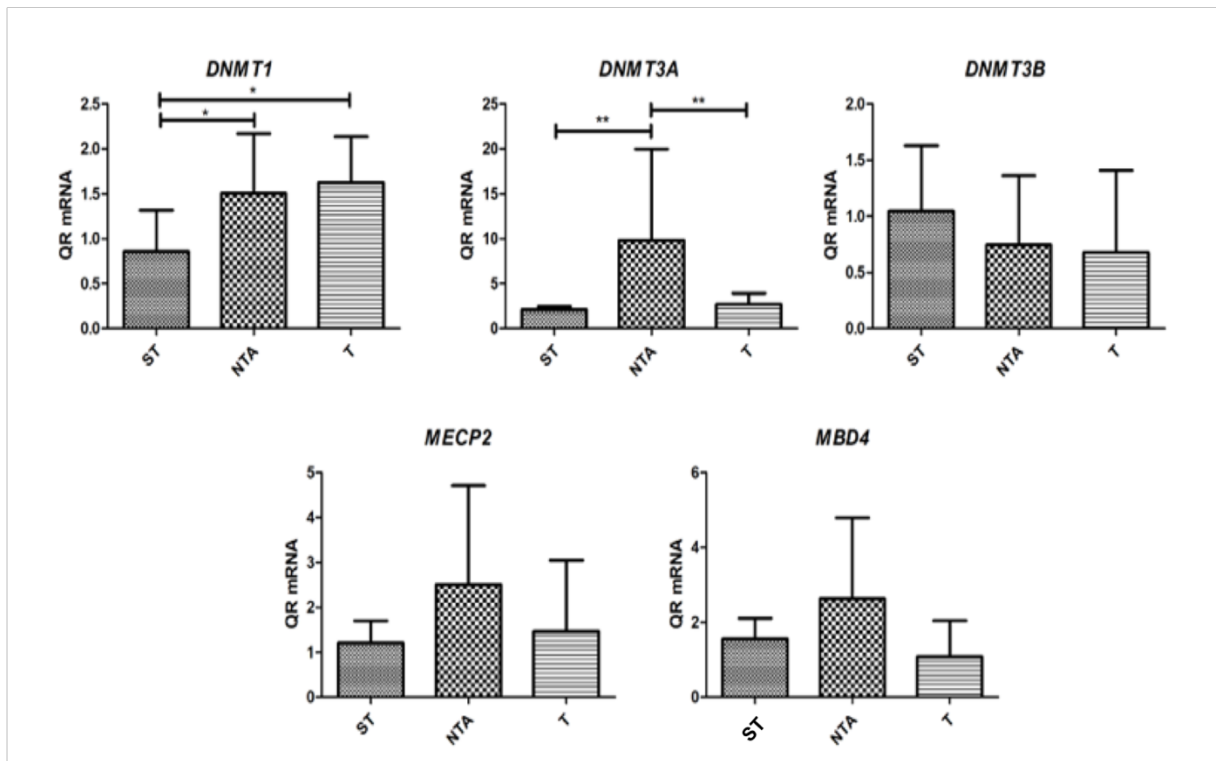
Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: A expressão gênica foi realizada em três diferentes tipos de sendo eles, tecido sem tumor (ST), não tumoral adjacente (NTA) e tumoral (T).

As amostras ST apresentaram níveis de expressão do mRNA de *DNMT1* significativamente menores quando comparadas com as amostras NTA e T ($p=0,0466$; $p=0,0196$, respectivamente). Adicionalmente, foi observado aumento significativo da expressão do mRNA de *DNMT3A* em amostras NTA quando comparadas com as amostras ST e T ($p=0,0029$; $p=0,0076$, respectivamente). Os outros genes não apresentaram expressão significativa em relação aos diferentes grupos de tecido (Figura 12).

Cabe ressaltar, que não foi possível analisar a quantificação relativa da expressão de *DNMT3A* e *DNMT3B* em todas os pacientes com adenocarcinoma gástrico incluídos no estudo. Para *DNMT3A* foi possível analisar somente 23 pacientes, e *DNMT3B* apenas 29 pacientes.

Figura 11 - Mediana e desvio interquartilico dos valores de RQ das amostras de tecido gástrico de pacientes sem neoplasia (N), não-neoplásico adjacente (NT) e neoplásico (T). * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$.



Fonte: Elaborada pela autora.

A análise da expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MECP2* e *MBD4* com os dados clinicopatológicos dos pacientes podem ser observados na Tabela 5. Foi encontrada uma associação do aumento da expressão de *DNMT3B* com a presença de metástase em linfonodos ($p=0,034$) e com estadiamento III-IV do tumor gástrico ($p= 0,048$).

Tabela 3 - Comparação dos valores de RQ dos genes da maquinaria da metilação com os dados clinicopatológicos dos pacientes com CG.

Características Clinicopatológicas	<i>DNMT1</i>	<i>p</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>P</i>	<i>DNMT3B</i>	<i>p</i>	<i>MeCP2</i>	<i>p</i>	<i>MBD4</i>	<i>p</i>
Idade										
<50anos	1,65±1,19	0,879	1,46±2,43	0,593	1,06±2,89	0,321	0,85±0,86	0,69	0,99±0,63	0,932
≥50 anos	1,35±1,00		1,18±2,49		1,62±6,42		0,85±1,00		0,98±1,04	
Gênero										
Masculino	1,35±1,25	0,899	1,28±2,90	0,726	1,53±3,44	0,853	0,84±0,92	0,951	0,94±0,72	0,303
Feminino	1,59±0,64		1,13±0,49		1,60±9,42		0,88±0,99		1,03±1,11	
Histopatológico^a										
Intestinal	1,36±1,11	0,635	1,2±2,09	0,764	1,25±4,99	0,985	0,84±0,89	0,973	0,97±0,84	0,577
Difuso	1,35±1,03		1,17±1,64		1,89±1,81		1,05±0,73		0,99±0,86	
Invasão^b										
pT1	1,59±0,72	0,823	2,3±0,05	1	1,60±0,60	0,625	0,88±0,28	0,859	0,99±0,26	0,888
pT2-pT4	1,35±1,05		1,2±2,41		1,66±6,03		0,84±1,02		0,97±0,96	
Metástase em Linfonodos^b										
pN0	0,86±4,23	0,441	2,02±4,25	1	1,57±1,87	0,034*	0,69±1,09	0,143	1,02±1,05	0,099
pN1-N3	2,24±1,30		1,51±2,85		3,97±6,99		1,32±1,02		1,06±0,92	
Estádio^b										
I-II	1,50±0,78	0,272	1,09±1,24	0,588	1,06±1,81	0,048*	0,72±0,90	0,411	0,94±0,73	0,334
III-IV	1,34±1,34		1,30±3,10		3,97±9,18		0,83±1,44		0,92±1,03	

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: ^aClassificação de Laurèn (1965); ^b8th Edition of the AJCC Cancer Staging manual: Stomach (2010)

A análise de correlação da expressão dos genes estudados foi realizada entre a média das amostras tumorais, sendo utilizado a média do tecido adjacente não tumoral como calibrador, essa análise pode ser visualizada no Quadro 5. Foram observadas várias correlações positivas fortes, entre elas a da *DNMT1* com *MECP2* (0,686), *DNMT3B* com *MBD4* e *MECP2* (0,650 e 0,685, respectivamente) e *MBD4* com *MECP2* (0,790).

Quadro 5 - Correlação da expressão dos genes *DNMTs*, *MBD4* e *MeCP2*.

		<i>DNMT1</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>DNMT3B</i>	<i>MBD4</i>	<i>MECP2</i>
<i>DNMT1</i>	Pearson Correlation	1	0,406	0,405	0,375	,686**
	Sig. (2-tailed)		0,061	0,076	0,059	0,001
<i>DNMT3A</i>	Pearson Correlation	0,406	1	0,244	0,027	0,352
	Sig. (2-tailed)	0,061		0,363	0,916	0,198
<i>DNMT3B</i>	Pearson Correlation	0,405	0,244	1	,650**	,685**
	Sig. (2-tailed)	0,076	0,363		0	0
<i>MBD4</i>	Pearson Correlation	0,375	0,027	,650**	1	,790**
	Sig. (2-tailed)	0,059	0,916	0		0
<i>MECP2</i>	Pearson Correlation	,686**	0,352	,685**	,790**	1
	Sig. (2-tailed)	0,001	0,198	0	0	

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: *Correlação<0,05 **Correlação<0,01

5 DISCUSSÃO

O padrão de metilação do DNA é um mecanismo da regulação epigenética frequentemente alterado em tumores, incluindo CG (CALCAGNO; SMITH; BURBANO, 2015; CALCAGNO et al., 2013; GIGEK et al., 2012). Em geral, a expressão das proteínas responsáveis pela metilação do DNA tende a ser desregulada nos tumores e associada a padrões alterados de metilação do DNA (LYKO, 2018). Portanto, compreender o funcionamento dos genes da maquinaria de metilação do DNA durante a carcinogênese é crucial para o entendimento dos processos biológicos envolvidos no desenvolvimento tumoral.

No presente estudo foi avaliado o nível de expressão de genes codificadores das enzimas responsáveis pela metilação do DNA (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*), e de duas proteínas que reconhecem a citosinas metiladas, *MBD4* e *MECP2*. A *MBD4* é responsável pelo reparo do DNA, e a *MECP2* tem como função a repressão da transcrição e remodelamento da cromatina (PARRY; CLARKE, 2011).

Primeiramente, foi realizado uma análise comparativa da expressão dos genes da maquinaria de metilação do DNA entre os três diferentes grupos de amostras estudados, o grupo de amostra tumoral (T), o de amostra não tumoral adjacente pareadas (NTA) e o de amostra sem tumor (ST), com o intuito de observar se há uma diferença de expressão dos genes estudados entre os diferentes tecidos.

Observamos que as amostras de tecidos NTA e T apresentaram níveis de expressão de *DNMT1* significativamente maior quando comparadas com a amostra ST ($p=0,0466$; $p=0,0196$, respectivamente) e que o tecido NTA apresentou expressão significativamente aumentada do gene *DNMT3A* em comparação com as amostras ST ($p=0,0029$) e T ($p=0,0076$).

Esses dados nos remetem a possibilidade de que no início do processo da carcinogênese há um aumento de metilação *de novo*, estabilizando novos padrões de metilação promovendo o desequilíbrio genômico, alterado o padrão de metilação normal para um tumoral, uma vez estabelecido o novo padrão de metilação a expressão de *DNMT3A* (principal responsável pela metilação *de novo*) é reduzida e o novo padrão é mantido pela *DNMT1*, justificando a manutenção da expressão de *DNMT1* nas amostras de tecido NTA e T.

Estudos prévios reportaram o aumento significativo de expressão de mRNA de *DNMT1* em CG em comparação com tecido adjacente não neoplásico (CHEN et al., 2010;

FANG et al., 2004; KANAI et al., 2001). Em 2004, Etoh e colaboradores descreveram pela primeira vez a expressão significativa da proteína DNMT1 em CG por imunohistoquímica. Além disso, esses autores observaram correlação da expressão de DNMT1 com presença de hipermetilação nas ilhas CpG dos genes hMLH1 e THBS-1.

Na literatura não foram encontrados resultados da expressão de mRNA de *DNMT3A* no CG, somente análises proteicas desse gene foram encontradas (HEN et al., 2013; YANG et al., 2011).

Ding e colaboradores (2008) analisaram a expressão proteica de três DNMTs (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) em 38 pacientes por imunohistoquímica. Desses foram retiradas amostras de três diferentes áreas do estômago, de tecido da mucosa cancerosa, para-cancerosa (dentro de 5 cm das áreas cancerosas) e não-cancerosa (além de 5 cm de áreas cancerosas). Os resultados foram uma expressão aumentada de todas as DNMTs estudadas no tecido canceroso em comparação aos outros dois tecidos. Uma particularidade desse estudo foi que os autores puderam observar onde essas proteínas estavam mais presentes. A DNMT1 estava mais significativamente expressa no núcleo, enquanto que as proteínas DNMT3A e DNMT3B estavam mais significativamente expressas no citoplasma. Esses resultados são importantes por levantar a hipótese que os genes DNMT3A e DNMT3B possam estar sofrendo regulações negativas pós-transcricionais, como a de micro RNAs.

Hoje em dia já se sabe da existência de miRNA e que uma de suas funções é a regulação negativa de proteínas a partir do pareamento com a parte 3'UTR do mRNA no citoplasma, degradando-o ou reduzindo a expressão do gene da proteína alvo. Nós levantamos a hipótese que com o tumor instalado há um aumento da expressão de DNMTs que não consegue ser regulada por miRNA, podendo ser visualizada pela expressão proteica no tecido tumoral, porém não sendo visualizada no adjacente. Com a análise de expressão por mRNA visualizamos que tanto a *DNMT1* quanto a *DNMT3A* estão diferentemente expressas desde as fases iniciais da carcinogênese gástrica podendo ser possíveis biomarcadores de risco para CG.

No presente trabalho os genes *DNMT3B*, *MBD4* e *MECP2* não obtiveram diferença de expressão de mRNA nos três diferentes tecidos estudados, no entanto outros estudos observaram que a expressão desses genes pode estar aumentada em tecido tumoral gástrico em comparação a tecido não neoplásico adjacente (ZHANG et al., 2017; SU et al., 2009; D'ERRICO et al., 2009). Ressaltando que mais estudos necessitam ser realizados para melhor entendimento do papel desses genes no CG.

Na análise de associação da expressão dos genes da maquinaria de metilação com os dados clinicopatológicos, identificamos uma associação do aumento da expressão do mRNA do gene *DNMT3B* com a presença de metástase em linfonodos ($p=0,034$) e estadiamento III-IV do adenocarcinoma gástrico ($p= 0,048$). Este resultado sugere que a diminuição da expressão de *DNMT3B* está associada a pior prognóstico do paciente com CG. Entretanto, os outros genes avaliados não apresentaram nenhuma associação com os dados clinicopatológicos.

A associação da expressão tanto do mRNA do gene *DNMT3B*, quanto da sua proteína, com os dados clinicopatológicos ainda não tinham sido reportados na literatura, mostrando o ineditismo dos nossos resultados. Em 2001, Oue e colaboradores não observaram associação entre a expressão de mRNA de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* com os dados clinicopatológicos de pacientes com CG. Apenas associação da expressão da proteína DNMT1 e DNMT3A com dados clinicopatológicos foram descritos até o momento (CAO et al., 2014; HEN et al., 2013; YANG et al., 2011; DING et al., 2008).

Apesar de descrever expressão elevadas de DNMT1(64,8%), DNMT3A (70,4%) e DNMT3B (51,9%) em tecido de CG de 54 casos, Yang e colaboradores (2011) reportaram apenas associação significativa da expressão da proteína de DNMT1 e DNMT3A com os dados clinicopatológicos. Além disso, a expressão de DNMT3A foi associada com o estadiamento e metástase em linfonodos.

O resultado de Yang e colaboradores (2011) pode ter divergido dos resultados encontrados nesse estudo, primeiramente pela técnica utilizada ser diferente do que a utilizada nesse estudo. No estudo de Yang e colaboradores foi quantificado as proteínas enquanto que nesse trabalho foi realizada a quantificação de expressão gênica. É de amplo conhecimento que vários fatores interagem com as proteínas, mais recentemente RNAs não codificantes vem sendo identificados como reguladores proteicos, a hipótese é que a diferença entre os resultados se dê pela regulação negativa dessas proteínas, por mecanismos não abrangidos nesse estudo.

Em 2014, Cao e colaboradores observaram que a expressão de DNMT3A é um biomarcador independente de pior prognóstico em pacientes com CG após realizar análise de expressão de DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em 300 casos de tumores gástricos avaliados por imunohistoquímica usando tissue microarray.

É importante ressaltar que não foi realizado análise de associação da expressão de genes da maquinaria de metilação do DNA com a presença de *H. pylori* por todas amostras serem positivas. Acredita-se que a infecção por *H. pylori* além de estar

envolvida na carcinogênese gástrica, também promove a hipermetilação do DNA (HUANG et al., 2012). No entanto, Huang e colaboradores (2013) observaram que não houve alterações significativas nas atividades totais de DNMTs em camundongos infectados com *H. pylori*. Adicionalmente, Cao e colaboradores (2014) reportaram que a presença de *H. pylori* não induziu a expressão de DNMTs. Esses estudos sugerem que embora a infecção por *H. pylori* altere a metilação do DNA, ela não induz a expressão de DNMTs. O mecanismo ainda não está claro e merece mais investigações.

Em relação a dificuldade de análise de expressão de mRNA do gene *DNMT3A* e *DNMT3B* em pacientes com CG, a falta de amplificação pode ser justificada pela função dessas DNMTs, que são responsáveis pela metilação de novo e possuem nível elevado de expressão na embriogênese e etapas iniciais do desenvolvimento humano, enquanto que em outras fases da vida sua expressão é reduzida, podendo esta desregulada em tumores (TAJIMA et al., 2016; CAO et al., 2014; YANG et al., 2011).

Além disso, apesar da ausência da associação estatisticamente significativa da expressão de mRNA de *MBD4* e *MECP2* com os dados clinicopatológicos no presente estudo. Howard e colaboradores (2009) investigaram a presença de correlação de *MBD4* com dados clinicopatológicos de pacientes com câncer colorretal ($p=0.081$), não encontrando diferença estatística significativa, achado esse similar ao presente estudo.

Com relação ao gene *MECP2*, foi descrita associação da expressão positiva da proteína com estadiamento, tipos histológicos e status de metástase de linfonodo (ZHANG et al., 2017a). A diferença de dados entre o resultado encontrado e nessa pesquisa pode se dar por mecanismos reguladores pós-transcricionais, não estudados nessa pesquisa.

É importante destacar que processos pós-transcricionais podem estar relacionados com a expressão das proteínas da maquinaria de metilação do DNA, como o de miRNAs. Esses reguladores negativos da transcrição já foram descritos regulando a expressão de proteínas da maquinaria de metilação do DNA no CG (ZHU et al., 2018; ZHANG et al., 2017; JUZÉNAS et al, 2015). Por exemplo, hsa-miR-148a pode suprimir a tumorigênese gástrica através da regulação da expressão da DNMT1 (ZUO et al., 2013). Yan e colaboradores (2014) observaram expressão diminuída de MEG3 em 52 amostras de tumores gástricos e linhagens celulares de CG, por PCR quantitativo em tempo real. A correlação positiva de MEG3 e miR-148a foi ainda confirmada nas linhagens celulares de CG SGC-7901 e BGC-823. Além disso, esses autores relataram a hipermetilação de MEG3 identificada por PCR específica para metilação, e a expressão de MEG3

aumentada com a inibição da metilação com siRNA para DNMT1 em células de CG. Adicionalmente, a transfecção de siRNA MEG3 em células de CG diminuiu a supressão da proliferação induzida pela superexpressão de hsa-miR-148a. Esses resultados juntos sugerem que a supressão do hsa-miR-148a pode contribuir para a regulação negativa do MEG3 no CG pela modulação da DNMT1.

Ao final do nosso estudo foi realizada de forma individualizada a correlação dos genes estudados entre si. As correlações são importantes para identificar possíveis vias de regulação na qual um ou mais genes possam estar ligados exercendo certa influencia sobre outro gene.

Foram observadas várias correlações positivas fortes, entre elas a da *MECP2* com os genes *DNMT1* (0,686), *DNMT3B* (0,685) e *MBD4* (0,790) e do gene *DNMT3B* com *MBD4* (0,650).

A correlação entre *DNMT1* e *DNMT3B* com *MECP2* já é bem descrita, uma vez que as DNMTs determinam os padrões de metilação e as MBPs os leem recrutando os complexos de silenciamento como por exemplo a Sin3a e HDAC1/2 (HAMIDI; SINGH; CHEN, 2015). A DNMT1, no entanto, pode formar complexos com MeCP2, sem necessitar da HDAC1 e acreditasse que o complexo DNMT- MeCP2 auxilia no processo de metilação de manutenção (KIMURA; SHIOTA, 2003).

A correlação encontrada no nosso estudo entre *DNMT3B* com *MBD4*, pode ser melhor explicada por meio dos estudos de Boland e Christman (2008) que demonstraram a correlação das *DNMT3B* com enzimas de reparo *mismatch* G/T, incluindo *MBD4*, levando a redução da eficiência do reparo de *mismatch*, quando diminuída a expressão de *DNMT3B*. As vias pelo qual isso ocorre não foram exploradas, no entanto eles levantaram a hipótese que esse processo pode necessitar de componentes RNA para efetuar o reparo dos *mismatch* G/T.

O nosso achado quanto a correlação da *MBD4* com *MECP2* são inovadores, uma vez que nenhum estudo anterior tenha alegado uma correlação entre elas, acreditamos que talvez a *MECP2* possa servir de marcador para *MBD4* ou vice versa, porém mais estudos tem que ser feitos nesse aspecto para esclarecer o mecanismo pelo qual essas duas MBPs são relacionadas.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível sugerir que a expressão do mRNA de *DNMT1* e *DNMT3A* podem estar alterados em estágios iniciais da carcinogênese gástrica, por observar suas expressões significativas em amostras de tecidos adjacente não tumorais em comparação aos outros tecidos estudados.

Adicionalmente, a associação da elevada expressão do mRNA de *DNMT3B* com a presença de metástase em linfonodos e estadiamento III-IV, sugere que a expressão do mRNA desse gene pode ser usado como biomarcador de prognóstico no CG. Cabe ressaltar que a dificuldade de análise de expressão de mRNA do gene *DNMT3A* e *DNMT3B* em pacientes com CG pode ser explicada pela função dessas DNMTs, que são responsáveis pela metilação *de novo*. Sugerindo-se o desenvolvimento de mais estudos para esclarecer os processos regulatórios pós-transcricionais envolvidos na expressão dos genes da maquinaria de metilação do DNA que possam influenciar no *status* de expressão das mesmas.

Correlações fortes foram encontradas entre o gene *MECP2* com os genes *DNMT1*, *DNMT3B* e *MBD4* e do gene *DNMT3B* com *MBD4*. Demonstrando o quanto o gene *MECP2* está ligado a diferentes genes da maquinaria podendo influenciar nas suas vias ou ser influenciado por esses genes.

REFERÊNCIAS

- AAPOLA, U. et al. Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. **Genomics**, v. 65, n. 3, p. 293–298, 2000.
- AHUJA, N.; EASWARAN, H.; BAYLIN, S. B. Harnessing the potential of epigenetic therapy to target solid tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 1, p. 56–63, 2 jan. 2014.
- AL-MOUNDHRI, M. S. et al. The prognostic significance of whole blood global and specific DNA methylation levels in gastric adenocarcinoma. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15585, 23 dez. 2010.
- ANDERSON, O. S.; SANT, K. E.; DOLINOY, D. C. Nutrition and epigenetics: An interplay of dietary methyl donors, um carbono metabolism, and DNA methylation. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 8, p. 853–859, 2013.
- ARAND, J. et al. In Vivo Control of CpG and Non-CpG DNA Methylation by DNA Methyltransferases. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 6, p. e1002750, 28 jun. 2012.
- AUDIA, J. E.; CAMPBELL, R. M. Histone Modifications and Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 4, p. a019521, 1 abr. 2016.
- AYED-GUERFALI, D. BEN et al. Hypermethylation of tumor-related genes in tunisian patients with gastric carcinoma: Clinical and biological significance. **Journal of Surgical Oncology**, v. 103, n. 7, p. 687–694, 1 jun. 2011.
- AZAD, N. et al. The future of epigenetic therapy in solid tumours—lessons from the past. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 5, p. 256–266, 2 maio 2013.
- BALASSIANO, K. et al. Aberrant DNA methylation of cancer-associated genes in gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC–EURGAST). **Cancer Letters**, v. 311, n. 1, p. 85–95, dez. 2011.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 381–395, 2011.
- BASS, A. J. et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature**, v. 513, n. 7517, p. 202–209, 2014.
- BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 10, p. 726–734, 1 out. 2011.
- BAYMAZ, H. I. et al. MBD5 and MBD6 interact with the human PR-DUB complex through their methyl-CpG-binding domain. **Proteomics**, v. 14, n. 19, p. 2179–2189, 2014.

- BELLACOSA, A. Role of MED1 (MBD4) gene in DNA repair and human cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 187, n. 2, p. 137–144, 2001.
- BERGER, S. L. et al. An operational definition of epigenetics. **Genes and Development**, v. 23, n. 7, p. 781–783, 2009.
- BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum. Mol. Genet.** 2000, 9, 2395–2402.
- BHAT, A. A. et al. Diminished expression of MGMT & RASSF1A genes in gastric cancer in ethnic population of Kashmir. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 6, n. 7, p. 989–995, dez. 2016.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, p. 6–21, 2002.
- BOLAND, M. J.; CHRISTMAN, J. K. Characterization of Dnmt3b:Thymine-DNA Glycosylase Interaction and Stimulation of Thymine Glycosylase-Mediated Repair by DNA Methyltransferase(s) and RNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 379, n. 3, p. 492–504, 2008.
- BORGES, B. DO N. et al. Promoter polymorphisms and methylation of E-cadherin (CDH1) and KIT in gastric cancer patients from northern Brazil. **Anticancer research**, v. 30, n. 6, p. 2225–33, jun. 2010.
- BRACONI, C.; HUANG, N.; PATEL, T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 51, n. 3, p. 881–90, mar. 2010.
- CALCAGNO, D. Q.; SMITH, M. DE A. C.; BURBANO, R. R. Cancer type-specific epigenetic changes: gastric cancer. *In*: VERMA, M. (Ed.). **Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis, Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 1238p. 79–101.
- CAO, X. Y. et al. DNA methyltransferase3a expression is an independent poor prognostic indicator in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 25, p. 8201–8208, 2014.
- CHAMBERLAIN, J. A. et al. Dietary intake of um carbono metabolism nutrients and DNA methylation in peripheral blood. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 108, n. 3, p. 611–621, 2018.
- CHEN, L. et al. MeCP2 binds to non-CG methylated DNA as neurons mature, influencing transcription and the timing of onset for Rett syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 17, p. 5509–5514, 28 abr. 2015.
- CHEN, Y. C. et al. Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer. **Pathology and Oncology Research**, v. 22, n. 1, p. 197–202, 2015.

- CHHABRA, R. miRNA and methylation: A multifaceted liaison. **ChemBioChem**, v. 16, n. 2, p. 195–203, 2015.
- CHIAPPINELLI, K. B. et al. Combining Epigenetic and Immunotherapy to Combat Cancer. **Cancer research**, v. 76, n. 7, p. 1683–9, 1 abr. 2016.
- CLAYTON, C.; KLEANTHOUS, K.; TABAQCHALI, S. Detection and identification of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Pathology**, v. 44, n. 6, p. 515–516, 1991.
- CORREA, P.; PIAZUELO, M. B. *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. **US Gastroenterol Hepatol Rev.**, v. 7, n. 1, p. 59–64, 2011.
- CRISTESCU, R. et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. **Nature medicine**, v. 21, n. 5, p. 449–56, maio 2015.
- CUI, D.; XU, X. Dna methyltransferases, dna methylation, and age-associated cognitive function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, 2018.
- D'ERRICO, M. et al. Genome-wide expression profile of sporadic gastric cancers with microsatellite instability. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 3, p. 461–469, 2009.
- DEANS, C.; MAGGERT, K. A. What do you mean, “Epigenetic”? **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 887–896, 2015.
- DI CERBO, V.; SCHNEIDER, R. Cancers with wrong HATs: The impact of acetylation. **Briefings in Functional Genomics**, v. 12, n. 3, p. 231–243, 2013.
- DING, W.-J. et al. The Expression and Clinical Significance of DNA Methyltransferase Proteins in Human Gastric Cancer. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 53, n. 8, p. 2083–2089, 2008.
- DUTHIE, S. J. Folate and cancer: How DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, n. 1, p. 101–109, 2010.
- ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 286–298, 2007.
- FABBRI, M. et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 40, p. 15805–10, 2 out. 2007.
- FAN, H. et al. A functional polymorphism in the DNA methyltransferase-3A promoter modifies the susceptibility in gastric cancer but not in esophageal carcinoma. **BMC Medicine**, v. 8, n. 1, p. 12, 2010.
- FANG, J. Y. et al. Expression of Dnmt1, demethylase, MeCP2 and methylation of tumor-related genes in human gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 23, p. 3394–3398, 2004.

FENG, Q. et al. Identification and functional characterization of the p66/p68 components of the MeCP1 complex. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 2, p. 536–46, jan. 2002.

FERLAY, A. et al. Cancer incidence and mortality - major patterns in GLOBOCAN 2012, worldwide and Georgia. **International journal of cancer**, v. 9, n. 1, p. 168–173, 2015.

FOURNIER, A. et al. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. **Briefings in Functional Genomics**, v. 11, n. 3, p. 251–264, 2011.

GABEL, H. W. et al. Disruption of DNA-methylation-dependent long gene repression in Rett syndrome. **Nature**, v. 522, n. 7554, p. 89–93, 4 jun. 2015.

GARZON, R. et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6411–8, 18 jun. 2009.

GIGEKE, C. O. et al. Genetic variants in gastric cancer: Risks and clinical implications. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 103, n. 1, p. 101–111, 2017.

GIGEKE, C. O.; CHEN, E. S.; SMITH, M. A. C. Epigenetic alterations in stomach cancer: implications for diet and nutrition. *In*: **Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics**. [s.l.: s.n.]. v. 3.

GRAZIOSI, L. et al. Prognostic value of the seventh AJCC/UICC TNM classification of non-cardia gastric cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 11, n. 1003, 2013.

GREER, E. L. et al. DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. **Cell**, 2015.
GRUBER, B. B-group vitamins: chemoprevention? **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 25, n. 3, p. 561–568, 2016.

GUEZENNEC, X. LE et al. MBD2 / NuRD and MBD3 / NuRD , two distinct complexes with different biochemical and functional properties. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 3, p. 843–851, 2006.

GUO, W. et al. Aberrant CpG Island hypermethylation of RASSF1A in gastric cardia adenocarcinoma. **Cancer Investigation**, v. 27, n. 4, p. 459–465, 20 jan. 2009.

HAMAJIMA N, Persistent *Helicobacter pylori* infection and genetic polymorphisms of the host. *Nagoya J Med Sci*, 2003. 66(3-4): p. 103-17.

HAMIDI, T.; SINGH, A. K.; CHEN, T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. **Epigenomics**, v. 7, n. 2, p. 247–265, abr. 2015.

HASHIMOTO, Y.; AKIYAMA, Y.; YUASA, Y. Multiple-to-Multiple Relationships between MicroRNAs and Target Genes in Gastric Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

- HE, M. et al. Expression of DNMTs and genomic DNA methylation in gastric signet ring cell carcinoma. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 3, p. 942–948, 2013.
- HENDRICH, B. et al. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. **Nature**, v. 401, n. 6750, p. 301–4, 16 set. 1999.
- HEYN, H.; ESTELLER, M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. **Nature reviews. Genetics**, v. 13, n. 10, p. 679–92, out. 2012.
- HIRAKI, M. et al. Aberrant gene methylation in the lymph nodes provides a possible marker for diagnosing micrometastasis in gastric cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 17, n. 4, p. 1177–1186, 3 abr. 2010.
- HOWARD J. H, et al: Epigenetic downregulation of the DNA repair gene MED1/MBD4 in colorectal and ovarian cancer. **Cancer Biol Ther** 2009;8:94–100.
- HU, J. et al. DNMT3B promoter polymorphism and risk of gastric cancer. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 55, n. 4, p. 1011–1016, 2010.
- HU, S. L. et al. Pathobiologic implications of methylation and expression status of Runx3 and CHFR genes in gastric cancer. **Medical Oncology**, v. 28, n. 2, p. 447–454, 2011.
- HUANG, F. Y. *et al.* Characterization of interleukin-1 β in Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and DNA methylation in interleukin-1 receptor type 1 knockout (IL-1R1 $^{-/-}$) mice. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 12, p. 2760–2770, 2013.
- HUANG, F. Y. et al. Helicobacter pylori induces promoter methylation of E-cadherin via interleukin-1 β activation of nitric oxide production in gastric cancer cells. **Cancer**, v. 118, n. 20, p. 4969–4980, 2012.
- HUDLER, P. Genetic aspects of gastric cancer instability. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.
- HUNG, M. S.; SHEN, C.-K. J. Eukaryotic methyl-CpG-binding domain proteins and chromatin modification. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 841–6, out. 2003.
- ICHIMURA, T. et al. Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 14, p. 13928–35, 8 abr. 2005.
- ILLINGWORTH, R. S. et al. Orphan CpG Islands Identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 9, 2010.
- IN, H. et al. Validation of the 8th edition of the AJCC TNM staging system for gastric cancer using the national cancer database. **Annals of Surgical Oncology**, v. 24, n. 12, p. 3683–3691, 2017.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer (2018). Disponível em:<
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>.
Acessado em: 08 de outubro de 2018.

- ISHIDA, C. et al. Genomic organization and promoter analysis of the Dnmt3b gene. **Gene**, v. 310, p. 151–9, 22 maio 2003.
- JELTSCH, A.; JURKOWSKA, R. Z. New concepts in DNA methylation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 7, p. 310–318, 2014.
- JIA, D. et al. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. **Nature**, v. 449, n. 7159, p. 248–51, 2007.
- JIANG, C. et al. MicroRNA-1 functions as a potential tumor suppressor in osteosarcoma by targeting Med1 and Med31. **Oncology Reports**, v. 32, n. 3, p. 1249–1256, 2014.
- JIN, Z.; JIANG, W.; WANG, L. Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis (review). **Oncology Letters**, v. 9, n. 4, p. 1502–1508, 2015.
- JOHNSON, S. M.; EVERS, B. M. Translational Research in Gastric Malignancy. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 17, n. 2, p. 323–340, 2008.
- JONES, P. A.; ISSA, J. P. J.; BAYLIN, S. Targeting the cancer epigenome for therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 10, p. 630–641, 1 out. 2016.
- JØRGENSEN, H. F.; BEN-PORATH, I.; BIRD, A. P. Mbd1 Is Recruited to both Methylated and Nonmethylated CpGs via Distinct DNA Binding Domains. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 8, p. 3387–3395, 2004.
- JUZENAS, S. et al. Analysis of deregulated micrnas and their target genes in gastric cancer. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–20, 2015.
- KANAI, Y. et al. DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. **International Journal of Cancer**, v. 91, n. 2, p. 205–212, 2001.
- KANG, G. H. et al. DNA methylation profiles of gastric carcinoma characterized by quantitative DNA methylation analysis. **Laboratory Investigation**, v. 88, n. 2, p. 161–170, 24 fev. 2008.
- KANWAL, R.; GUPTA, S. Epigenetic modifications in cancer. **Clinical Genetics**, v. 81, n. 4, p. 303–311, abr. 2012.
- KIM, H. G. et al. Aberrant methylation of DNA mismatch repair genes in elderly patients with sporadic gastric carcinoma: A comparison with younger patients. **Journal of Surgical Oncology**, v. 101, n. 1, p. 28–35, 1 jan. 2010.
- KIMURA, H.; SHIOTA, K. Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 7, p. 4806–4812, 2003.

KINNEY, S. R. M.; PRADHAN, S. **Regulation of expression and activity of DNA (Cytosine-5) methyltransferases in mammalian cells**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 101

KSIAA, F. et al. Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma. **Clinica Chimica Acta**, v. 404, n. 2, p. 128–133, jun. 2009.

LAGET, S. et al. The human proteins MBD5 and MBD6 associate with heterochromatin but they do not bind methylated DNA. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.

LAI, K. W. et al. MicroRNA-130b regulates the tumour suppressor RUNX3 in gastric cancer. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 46, n. 8, p. 1456–63, maio 2010.

LAIRD, P. W. et al. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. **Cell**, v. 81, n. 2, p. 197–205, 21 abr. 1995.

LAURÉN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. **Acta pathologica et microbiologica Scandinavica**, v. 64, p. 31–49, 1965.

LEAL, M. F. et al. Promoter hypermethylation of CDH1, FHIT, MTAP and PLAGL1 in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil. **World journal of gastroenterology**, v. 13, n. 18, p. 2568–74, 14 maio 2007.

LEE, K. H. et al. Frequent promoter methylation of CDH1 in non-neoplastic mucosa of sporadic diffuse gastric cancer. **Anticancer research**, v. 33, n. 9, p. 3765–74, set. 2013.
LEGUBE, G.; TROUCHE, D. Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. **EMBO Reports**, v. 4, n. 10, p. 944–947, 2003.

LEI, Z. et al. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. **Gastroenterology**, v. 145, n. 3, p. 554–65, set. 2013.

LEONHARDT, H. et al. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. **Cell**, v. 71, n. 5, p. 865–873, 1992.

LI, Y. et al. Predictive value of CHFR and MLH1 methylation in human gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 18, n. 2, p. 280–287, 21 abr. 2014.

LIAO, J. et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. **Nature Genetics**, v. 47, n. 5, p. 469–478, 30 maio 2015.

LINHART, H. G. et al. Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. **Genes & development**, v. 21, n. 23, p. 3110–22, 1 dez. 2007.

LISTER, R. et al. Epigenetic reconfiguration in Mammalian Brain Development. **Science**, v. 341, n. 6146, p. 1–21, 2013.

- LISTER, R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, n. 7271, p. 315–322, 14 nov. 2009.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LU, X.-X. et al. Stepwise cumulation of RUNX3 methylation mediated by Helicobacter pylori infection contributes to gastric carcinoma progression. **Cancer**, v. 118, n. 22, p. 5507–5517, 15 nov. 2012.
- LUU, C. et al. Does histology really influence gastric cancer prognosis? **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 8, n. 6, p. 1026–1036, 2017.
- LYKO, F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. **Nature reviews. Genetics**, v. 19, n. 2, p. 81–92, fev. 2018.
- MA, T. et al. DNMT1 overexpression predicting gastric carcinogenesis, subsequent progression and prognosis: a meta and bioinformatic analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 56, p. 96396–96408, 2017.
- MACKAY, D. J. G. et al. Multilocus methylation defects in imprinting disorders. **Biomolecular Concepts**, v. 6, n. 1, p. 47–57, 2015.
- MALUMBRES, M. MiRNAs and cancer: An epigenetics view. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 4, p. 863–874, 2013.
- MARSH, D. J.; SHAH, J. S.; COLE, A. J. Histones and their modifications in ovarian cancer - drivers of disease and therapeutic targets. **Frontiers in Oncology**, v. 4, 12 jun. 2014.
- MASLOV, A. Y. et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine-induced genome rearrangements are mediated by DNMT1. **Oncogene**, v. 31, n. 50, p. 5172–5179, 20 dez. 2012.
- MCLEAN, M. H.; EL-OMAR, E. M. Genetics of Gastric Cancer. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol**, v. 11, 2014.
- MENTCH, S. J.; LOCASALE, J. W. One carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1363, n. 1, p. 91–98, 2016.
- MOISON, C.; GUIEYSSE-PEUGEOT, A.-L.; ARIMONDO, P. B. A. DNA Methylation in Breast Cancer. **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, v. 18, n. C=4, p. 285–292, 2013.
- MOSTOWSKA, A. et al. Folate and choline metabolism gene variants and development of uterine cervical carcinoma. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 8–9, p. 596–600, 2011.
- MURAI, M. et al. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. 1021–7, 1 fev. 2005.

MUTZE, K. et al. DNA methyltransferase 1 as a predictive biomarker and potential therapeutic target for chemotherapy in gastric cancer. **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 12, p. 1817–1825, 2011.

NAKAO, M. et al. Regulation of transcription and chromatin by methyl-CpG binding protein MBD1. **Brain & development**, v. 23 Suppl 1, p. S174-6, dez. 2001.

NARDONE, G.; ROCCO, A.; MALFERTHEINER, P. Review article: Helicobacter pylori and molecular events in precancerous gastric lesions. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, n. 3, p. 261–270, 2004.

NISHIGAKI, M.; AOYAGI, K.; DANJOH, I. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. **Cancer Research**, n. 6, p. 2115–2124, 2005.

OBEID, R. The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway. **Nutrients**, v. 5, n. 9, p. 3481–3495, 2013.

OGDEN, S. R. et al. Current concepts in anterior cruciate ligament reconstruction surgery. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 10, p. 4110–4121, 2008.

OH, J.-H. et al. Slow Overmethylation of Housekeeping Genes in the Body Mucosa Is Associated with the Risk for Gastric Cancer. **Cancer Prevention Research**, v. 7, n. 6, p. 585–595, 1 jun. 2014.

OKANO, M. et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, p. 247–257, 1999.

OKANO, M.; XIE, S.; LI, E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. **Nature genetics**, v. 19, n. 3, p. 219–20, jul. 1998.

OKI, E. et al. Checkpoint with forkhead-associated and ring finger promoter hypermethylation correlates with microsatellite instability in gastric cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 15, n. 20, p. 2520–5, 28 maio 2009.

OLIVEIRA, K. C. D. S. et al. Role of miRNAs and their potential to be useful as diagnostic and prognostic biomarkers in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 35, p. 7951–7962, 2016.

PARRY, L.; CLARKE, A. R. The roles of the methyl-CpG binding proteins in cancer. **Genes and Cancer**, v. 2, n. 6, p. 618–630, 2011.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 1 maio 2001.

PINTO, M. et al. MBD4 mutations are rare in gastric carcinomas with microsatellite instability. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 145, n. 2, p. 103–107, set. 2003.

PONTES, T. B. et al. Reduced mRNA expression levels of MBD2 and MBD3 in gastric carcinogenesis. **Tumor Biology**, v. 35, n. 4, p. 3447–3453, 13 abr. 2013.

POPLAWSKI, T. et al. Promoter methylation of cancer-related genes in gastric carcinoma. **Experimental oncology**, v. 30, n. 2, p. 112–6, jun. 2008.

QIU, M. Z. et al. Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of Lauren classification in gastric adenocarcinoma in China. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

RADDATZ, G. et al. Dnmt3a Protects active chromosome domains against cancer-associated hypomethylation. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 12, p. e1003146, 20 dez. 2012.

RAMSAHOYE, B. H. et al. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 10, p. 5237–42, 2000.

RASMUSSEN, K. D.; HELIN, K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. **Genes and Development**, v. 30, n. 7, p. 733–750, 2016.

ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; BAYLIN, S. B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. **Nature Genetics**, v. 25, n. 3, p. 269–277, 2000.

SAITO, M.; ISHIKAWA, F. The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35434–35439, 2002.

SAKAKURA, C. et al. Quantitative analysis of tumor-derived methylated RUNX3 sequences in the serum of gastric cancer patients. **Anticancer research**, v. 29, n. 7, p. 2619–25, jul. 2009.

SEIDEL, C. et al. Histone deacetylase modulators provided by Mother Nature. **Genes and Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 357–367, 2012.

SHANG, J.; PENA, A. Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 11, n. 27, p. 4131–9, 2005.

SHANKAR, E. et al. Dietary phytochemicals as epigenetic modifiers in cancer: Promise and challenges. **Seminars in cancer biology**, v. 40–41, p. 82–99, 2016.

SHI, J. et al. Prognostic significance of aberrant gene methylation in gastric cancer. **American journal of cancer research**, v. 2, n. 1, p. 116–29, 2012.

SHIGEYASU, K. et al. Clinical Significance of MLH1 Methylation and CpG Island Methylator Phenotype as Prognostic Markers in Patients with Gastric Cancer. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130409, 29 jun. 2015.

SHIN, C. M. et al. Prediction of the risk for gastric cancer using candidate methylation markers in the non-neoplastic gastric mucosae. **The Journal of Pathology**, v. 226, n. 4, p. 654–665, mar. 2012.

SMET, C. DE et al. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 11, p. 7327–7335, 1999.

STEFANSKA, B. et al. Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components - The implications in cancer prevention. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 2, p. 279–297, 2012.

STRESEMANN, C.; LYKO, F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. **International journal of cancer**, v. 123, n. 1, p. 8–13, 1 jul. 2008.

SU, X. et al. Expression pattern and clinical significance of DNA methyltransferase 3B variants in gastric carcinoma. **Oncology Reports**, v. 23, p. 819–826, 2010.

SUGITA. Methylation of BNIP3 and DAPK indicates lower response to chemotherapy and poor prognosis in gastric cancer. **Oncology Reports**, v. 25, n. 2, 1 fev. 2011.

TAHARA, T. et al. Increased number of CpG island hypermethylation in tumor suppressor genes of non-neoplastic gastric mucosa correlates with higher risk of gastric cancer. **Digestion**, v. 82, n. 1, p. 27–36, 2010.

TAJIMA, S. et al. Domain structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA methyltransferases. *In: DNA Methyltransferases - Role and Function*. [s.l.: s.n.]. v. 945p. 63–86.

TAMURA, G. et al. Quantitative assessment of gene methylation in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia using methylation-specific DNA microarray: Short communication. **Pathology International**, v. 59, n. 12, p. 895–899, 2009.

TAN H. T. et al. Cancer proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, n. 5, p. 583–605, set. 2012.

TONG, D. et al. MECP2 promotes the growth of gastric cancer cells by suppressing miR-338-mediated antiproliferative effect. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 34845–34859, 2016.

USHIJIMA, T.; ASADA, K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Science**, v. 101, n. 2, p. 300–305, 2010.

VALENZUELA, M. A. et al. Helicobacter pylori -induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 45, p. 12742–12756, 2015.

WANG, H. et al. mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. **Molecular Cell**, v. 12, n. 2, p. 475–487, 2003.

WANG, X.; ZHU, W. G. Advances in histone methyltransferases and histone demethylases. **Chinese journal of cancer**, v. 27, n. 10, p. 1018–1025, 2008.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature cell biology**, v. 11, n. 3, p. 228–34, mar. 2009.

WISNIESKI, F. et al. Differential expression of histone deacetylase and acetyltransferase genes in gastric cancer and their modulation by trichostatin a. **Tumor Biology**, v. 35, n. 7, p. 6373–6381, 2013.

YANG, J. et al. Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 4, n. 6, p. 1139–1143, 2011.

YANG, W.-Y.; GU, J.-L.; ZHEN, T.-M. Recent advances of histone modification in gastric cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 10, n. 8, p. 240, 2014.

YAO, D. et al. Quantitative assessment of gene methylation and their impact on clinical outcome in gastric cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 7–8, p. 787–794, abr. 2012.

YODER, J.; WALSH, C.; BESTOR, T. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends in Genetics**, v. 13, n. 8, p. 335–340, 1997.

YOSHIDA, T. et al. Altered mucosal DNA methylation in parallel with highly active *Helicobacter pylori*-related gastritis. **Gastric Cancer**, v. 16, n. 4, p. 488–497, 2013.

YOUSUF, A. et al. MGMT gene silencing by promoter hypermethylation in gastric cancer in a high incidence area. **Cellular Oncology**, v. 37, n. 4, p. 245–252, 2014.

YU, Q.-M. et al. CDH1 methylation in preoperative peritoneal washes is an independent prognostic factor for gastric cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 106, n. 6, p. 765–771, 1 nov. 2012.

ZHANG, B. et al. *Helicobacter pylori* CagA induces tumor suppressor gene hypermethylation by upregulating DNMT1 via AKT-NF κ B pathway in gastric cancer development. **Oncotarget**, v. 7, n. 9, p. 9788–9800, 2016.

ZHANG, J. et al. MECP2 expression in gastric cancer and its correlation with clinical pathological parameters. **Medicine (United States)**, v. 96, n. 31, p. 1–5, 2017a.

ZHANG, Q. et al. MiR-143 inhibits cell proliferation and invasion by targeting DNMT3A in gastric cancer. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 39, n. 7, p. 1010428317711312, jul. 2017b.

ZHU, F. et al. miR-19a/b and MeCP2 repress reciprocally to regulate multidrug resistance in gastric cancer cells. **International journal of molecular medicine**, v. 42, n. 1, p. 228–236, 2018.

ZOU, X.-P. et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions. **Human Pathology**, v. 40, n. 11, p. 1534–1542, nov. 2009.

ANEXOS

ANEXO I

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UFPA/HUJBB



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COORDENADORIA DE ATIVIDADES ACADÊMICAS
DIVISÃO DE PESQUISA E EXTENSÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

TERMO DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética em Pesquisa analisou no dia 14.05.2004, o projeto de pesquisa intitulado "**Genética do Câncer Gástrico**", desenvolvido por Marília de Arruda Cardoso Smith, Rommel Burbano, Silvia Regina Caminada de Toledo e Maisa Yoshimoto, sob a Orientação do Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção, obtendo **APROVAÇÃO** para desenvolvê-lo nesta instituição.

Belém, 14 de maio de 2004


DR. EDUARDO LEITÃO MAIA

CRM 1997

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa/ HUJBB

ANEXO II

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 15 de maio de 2009.
CEP 0511/09

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ELIZABETH SUCHI CHEN
Co-Investigadores: Rommel Rodriguez Burbano; Mariana Ferreira Leal; Elizabeth Suchi Chen; Carolina de Oliveira Gigeck; Fernanda Wisnieski; Marília de Arruda Cardoso Smith (orientadora)
Disciplina/Departamento: Genética Humana/Morfologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Aspectos genéticos e epigenéticos na carcinogênese gástrica**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo clínico observacional caso-controle.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco intenso, desconforto intenso, procedimento cirúrgico.

OBJETIVOS: Identificar alterações genéticas e epigenéticas envolvidas na carcinogênese gástrica..

RESUMO: Serão obtidas amostras de tecido gástrico tumoral e normal durante procedimento cirúrgico, para análises genéticas e epigenéticas. Inicialmente serão selecionados genes diferencialmente expressos por microarray em duas linhagens celulares gástricas após tratamento com agentes desmetilante e desacetilante para a identificação de genes controlados por metilação da DNA e/ou metilação e acetilação de histonas. Em seguida, esses genes terão sua expressão avaliada em 50 amostras de tecido gástrico normal e 50 amostras de tecido tumoral. Os genes que apresentarem diferença de expressão serão avaliados quanto ao padrão de metilação nos promotores gênicos por MS-HRM, e/ou padrão de metilação e acetilação de histona H3K9 por ChIP. Também será avaliado o padrão de metilação e de acetilação de histonas associadas a genes previamente estudados. Paralelamente, será avaliada a expressão de genes envolvidos na maquinaria de metilação de DNA, de metilação de histonas e de acetilação de histona. A expressão gênica e as modificações epigenéticas serão associadas ao sexo, à idade, à localização, à presença de *H. pylori* nas amostras de tecido gástrico, e à extensão do tumor, à presença de metástases em linfonodo e à distância, e ao tipo histopatológico nas amostras de adenocarcinoma gástrico.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A identificação dos genes hipermetilados em células cancerígenas poderá ainda gerar novos marcadores tumorais associados, que poderão subsidiar o diagnóstico, o prognóstico e a terapêutica..

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos laboratoriais moleculares que serão realizados por equipe especializada..

TCLE: Apresentado adequadamente.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto..

CRONOGRAMA: Adequado.

OBJETIVO ACADÊMICO: Pós-Doutorado.



ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 10/05/10 e 10/05/11.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0511/09

Anexo III

Termo de consentimento livre e esclarecido UFPA/HUJBB

A Universidade Federal do Pará, em colaboração com o Hospital Universitário João de Barros Barreto, está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá conhecer melhor os mecanismos que ocasionam as lesões do estômago e o desenvolvimento de tumor gástrico, através da identificação das alterações genéticas (cromossomos e genes) associadas ao quadro clínico do paciente e exame histopatológico.. Estes estudos são realizados em pequenos fragmentos de tecido estomacal removido por cirurgia ou por exame endoscópico e oferecem novas possibilidades de diagnóstico.

Você está sendo admitido(a) neste Hospital, para estabelecimento de diagnóstico e/ou tratamento de alguma doença gástrica e há a necessidade da remoção de material biológico relacionado à enfermidade. Parte do material retirado é encaminhado para exames laboratoriais, necessários para o diagnóstico definitivo. O restante do material não utilizado é armazenado para novos exames, se necessário.

A obtenção do fragmento de tecido estomacal para pesquisa não implicará em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem em aumento no tempo do exame ou cirurgia. O fragmento de material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras, preservando sua privacidade e identidade. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do paciente.

É necessário esclarecê-lo (a) que não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu atendimento ou tratamento.

Caso você tenha alguma dúvida sobre este documento ou em relação à pesquisa, por gentileza, entre em contato com a Prof. Rommel Burbano, pelo telefone 211-1727 ou 88027972.

Uma cópia deste documento será arquivada em seu prontuário e, se desejar, uma cópia lhe será fornecida.

Declaro estar ciente das informações prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o teor, e autorizo a utilização de amostras de tecido retiradas de meu organismo.

Belém, de de

Assinatura do Paciente ou Responsável

Nome:

RG:

ANEXO IV

Termo de consentimento livre e esclarecido UNIFESP/HSP

Termo de consentimento livre e esclarecido

ASPECTOS GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS NA CARCINOGENESE GÁSTRICA

As seguintes informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo.

A Disciplina de Genética do Departamento de Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) está desenvolvendo uma pesquisa, por meio da identificação das alterações genéticas e epigenéticas associadas ao quadro clínico do paciente e ao exame histopatológico, que permitirá conhecer melhor os mecanismos causadores das lesões do estômago e do desenvolvimento de tumor gástrico e, conseqüentemente, oferecerá novas possibilidades de diagnóstico.

Serão coletados 10 mL de sangue periférico no dia anterior à cirurgia. Serão obtidas amostras de tecido gástrico tumoral e não-neoplásico (margem livre cirúrgica) durante o procedimento cirúrgico. A obtenção de sangue periférico e do fragmento de tecido gástrico para a pesquisa não implicará riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem aumento no tempo do exame ou cirurgia. O desconforto que poderá ocorrer será devido ao próprio procedimento cirúrgico. As amostras coletadas serão utilizadas para análises genéticas e epigenéticas. Como rotineiramente, parte da amostra tumoral será encaminhada para exames laboratoriais, necessários para o diagnóstico definitivo. Será utilizado material estéril e descartável.

Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que alterações genéticas e epigenéticas estão envolvidas no desenvolvimento do câncer. Somente no final do estudo, poderemos identificar a presença de algum benefício.

Em qualquer etapa do estudo, o paciente ou seu responsável terá acesso aos profissionais relacionados com a pesquisa para esclarecimento de dúvidas. Os principais investigadores são Prof^ª. Dr^ª. Marília Smith, Prof. Dr. Laércio Gomes Lourenço e Prof. Dr. Ricardo Artigiani, que podem ser encontrados na UNIFESP, Rua Botucatu, 740, Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Genética, telefone (011) 5576-4260. Se houver alguma consideração a fazer, ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da UNIFESP, Rua Botucatu, 572, 1^º andar, cj 14, 5571-1062, fax 5539-7162, e-mail: cepunifesp@epm.br.

É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. O material biológico será identificado no laboratório

por um código formado por números e letras, preservando sua privacidade e identidade. Os resultados obtidos estarão à disposição do paciente. O material biológico obtido será utilizado somente para o presente estudo. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do paciente.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consulta. Também não há compensação financeira relacionada à participação.

Na eventualidade de ocorrer qualquer dano pessoal causado direta ou indiretamente pelos procedimentos propostos neste estudo (anexo causal comprovado), o participante terá direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações estabelecidas.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "ASPECTOS GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS NA CARCINOGENESE GÁSTRICA".

Eu discuti com o Dr. _____ sobre minha decisão de participar do estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o processo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Nome do paciente

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do participante / representante legal

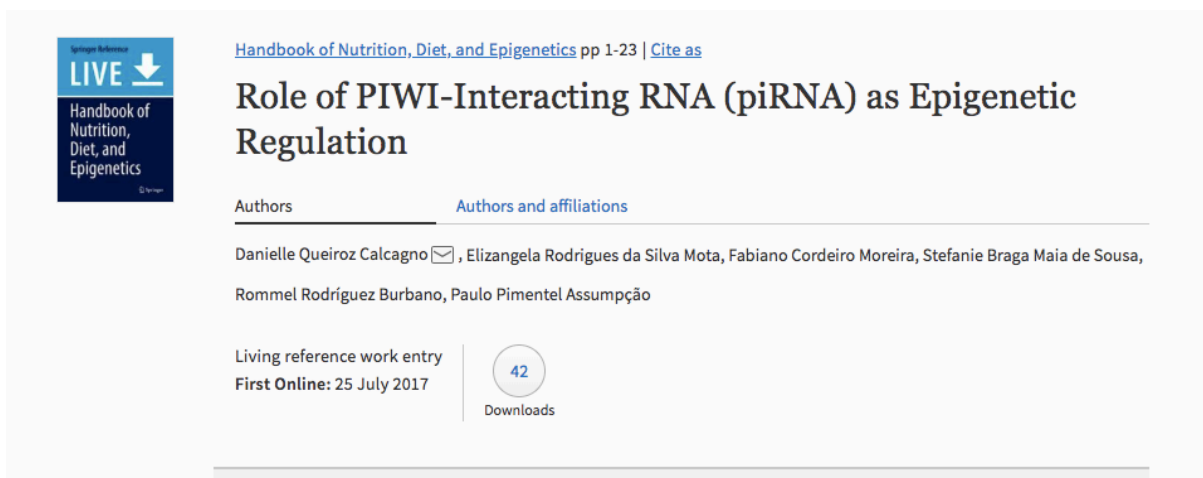
Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXO V


Capítulo de livro publicado durante o período de mestrado



Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics pp 1-23 | [Cite as](#)

Role of PIWI-Interacting RNA (piRNA) as Epigenetic Regulation

Authors [Authors and affiliations](#)

Danielle Queiroz Calcagno , Elizangela Rodrigues da Silva Mota, Fabiano Cordeiro Moreira, Stefanie Braga Maia de Sousa, Rommel Rodríguez Burbano, Paulo Pimentel Assumpção

Living reference work entry
First Online: 25 July 2017

42 Downloads

doi:10.1007/978-3-319-31143-2_77-1

ANEXO VI

Artigo aprovado em aguardo para publicação

Manuscripts I Have Co-Authored

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM: Martin, Joseph ADM: Chard, Lucy	EPI-2018-0081.R2	Role of histone acetylation in gastric cancer: implications of dietetic compounds and clinical perspectives View Submission Submitting Author: Calcagno, D	18-Sep-2018	21-Sep-2018
<ul style="list-style-type: none"> Immediate Accept (24-Sep-2018) Awaiting Assignment to Batch 				