

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO
DO GENE *CDH1* EM *Cebus apella* COMO MODELO
EXPERIMENTAL PARA CÂNCER GÁSTRICO**

SYMARA RODRIGUES ANTUNES

Belém/PA
Julho - 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO
DO GENE *CDH1* EM *Cebus apella* COMO MODELO
EXPERIMENTAL PARA CÂNCER GÁSTRICO**

SYMARA RODRIGUES ANTUNES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Curso de Mestrado, no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo

Co-orientadora: Prof^a Dra Bárbara do Nascimento Borges

Belém/PA
Julho – 2012

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

Antunes, Symara Rodrigues

Avaliação do perfil de metilação e expressão do gene *CDH1* em *Cebus apella* como modelo experimental para câncer gástrico / Symara Rodrigues Antunes; orientador, Nilson Praia Anselmo; co-orientadora, Bárbara do Nascimento Borges. – 2012.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2012.

1. Estômago - Câncer. 2. Estômago – Câncer - Modelos animais. 3. Modelos animais em pesquisa. 4. Expressão gênica. 5. Metilação.
I. Título.

CDD – 22. ed. 616.99433

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

SYMARA RODRIGUES ANTUNES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO
DO GENE *CDH1* EM *Cebus apella* COMO MODELO
EXPERIMENTAL PARA CÂNCER GÁSTRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Curso de Mestrado, no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, sob avaliação:

Orientador: Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo

Co-orientadora: Prof^a Dra Bárbara do Nascimento Borges

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria Lúcia Harada (Membro Titular)
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano (Membro Titular)
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira (Suplente)
Universidade Federal do Pará

“Proteja-me de ficar sabendo daquilo que não preciso saber. Proteja-me até mesmo de ficar sabendo que existem coisas que não sei. Proteja-me de ficar sabendo que decidi não saber das coisas que decidi não saber. Amém”

“Senhor, Senhor, Senhor. Proteja-me das conseqüências da oração anterior. Amém.”

Douglas Adams.

Às minhas mães,
Nea Rodrigues Farache e
Maria Dorotéia Kamizono,
Pelo apoio hoje e sempre,
e ao meu marido e filho,
Por toda a paciência e
confiança depositadas em mim.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos mililitros de taq. Foram muitas horas discutindo o que poderia estar ocorrendo para que as PCRs não padronizassem. Então, é muita gente para agradecer!

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelas oportunidades e dificuldades que colocou em meu caminho. Aprendi muito nesta jornada chamada mestrado.

Agradeço à minha mãe Nea Farache, por me conceder conselhos nas horas exatas, mesmo sem saber que eu estava precisando. À minha outra mãe, Dora, que infelizmente não está aqui pra me abraçar, mas com certeza onde estiver está muito feliz por mais esta conquista. Ao meu pai de coração, Richard Farache, por toda a ajuda dada e todas as caronas fornecidas. Ao meu marido, pelo incentivo inicial, pela ajuda extraordinária, pela coragem que eu não tive em certos momentos, por me levantar quando eu caí. Ao meu filho, pelos abraços calorosos, por me lembrar todos os dias o motivo de eu sempre querer seguir em frente e conquistar novos objetivos. Agradeço ao meu gato também, pelas noites de companhia que fiquei escrevendo esta dissertação.

Meu muito obrigada ao meu orientador, Nilson Praia, por aceitar a tarefa, mesmo sabendo de todas as dificuldades que minha vida pessoal possui. Obrigada pela confiança depositada em mim. Não posso esquecer do meu “orientador adotivo” Edivaldo Oliveira, sem ele não teria nem começado esta jornada!

À minha co-orientadora e amiga, Bárbara Borges, agradeço imensamente por tudo, pelas conversas, pelo apoio nos momentos que eu mais precisei, pelos puxões de orelha, por me permitir fazer parte deste time que só cresce.

Aos meus amigos, Ana Paula e Luiz Henrique, que sempre me deram força e incentivo para terminar este mestrado. À Helem Ribeiro, a Dayse Alencar, a Camila Pará, a Nathalia Nogueira, a Nathalia Chamma, a Nathalia Moitinho, entre tantos a citar. Enfim terminei gente!

À Mariana Diniz, que sempre me ajudou quando pedi, sempre estava lá nas apresentações e nunca me abandonou. Ao Wallax Augusto por todos estes anos de amizade e pelas amostras seqüenciadas. Aos novos integrantes da equipe, Thamiris Faro e Mariceli Baia, que apesar do pouco contato, sempre me incentivaram. À professora Claudia e Margarida Lima pelas horas do cafezinho e palavras de apoio, afinal “tudo dá certo quando o fim está próximo”. A todo o pessoal do labiomol, pelos momentos de risadas.

Agradeço também à coordenação do curso de mestrado, à UFPA e à Capes pelo concessão da bolsa de estudos.

À todos que em algum momento me ajudaram e torceram por mim, só tenho a agradecer.

Termino uma fase pra começar outra.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1.2	BASES GENÉTICAS DO CÂNCER.....	13
1.3	EPIGENÉTICA E CÂNCER.....	18
1.4	O CÂNCER GÁSTRICO	22
1.4.1	Epidemiologia	22
1.4.2	Fatores Etiológicos.....	23
1.4.3	Classificação Histopatológica	25
1.4.4	Fatores Genéticos e epigenéticos associados	28
1.5	O GENE <i>CDH1</i>	34
1.6	MODELOS ANIMAIS.....	38
1.7	OBJETIVOS	42
1.7.1	Objetivo Geral.....	42
1.7.2	Objetivos específicos	42
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
2.1	AMOSTRAS.....	43
2.1.1	Seqüência genômica	44
2.1.2	Modificação por Bissulfito.....	45
2.1.3	PCR metilação específica (MSP).....	45
2.1.4	Imunohistoquímica.....	47
3	RESULTADOS	49
3.1	CARCINOGENESE EM <i>Cebus apella</i>	49
3.2	REGIÃO PROMOTORA DE <i>CDH1</i> EM <i>Cebus apella</i>	50
3.3	IMUNOHISTOQUÍMICA E MSP	53
4	DISCUSSÃO	56
5	CONCLUSÃO.....	64
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - O ciclo celular e suas fases.	14
Figura 2 - As Marcas do Câncer.	16
Figura 3 - Metilação da Citosina.....	19
Figura 4 - Modificações epigenéticas do DNA e histonas que podem influenciar a expressão do gene.....	21
Figura 5 - Anatomia do estômago.	26
Figura 6 - Cortes histopatológicos de tecido gástrico.	27
Figura 7 - Cortes histopatológico de tecido gástrico.....	28
Figura 8 - Modelo de via da carcinogênese do câncer gástrico e alguns genes envolvidos.	30
Figura 9 - Representação esquemática da <i>E-caderina</i>	34
Figura 10 - Representação da localização no mapa do genoma humano dos principais genes envolvidos no desenvolvimento de câncer.....	35
Figura 11 - Via Wnt de sinalização.	36
Figura 12 - Estrutura química do MNU (N-Metil-N-nitrosurea).	39
Figura 13 - Reação de formação de MNU a partir da Creatinina.....	40
Tabela 1 - Iniciadores e condições da PCR para obtenção da sequência sequencia promotora parcial do gene <i>CDH1</i> de <i>C. apella</i>	44
Tabela 2 - Iniciadores utilizados em cada reação de MSP.....	46
Tabela 3 - Distribuição das amostras segundo o tipo histológico.....	49
Figura 14 - Sequencia de <i>C. jacchus</i> (Ensembl ENSCJAG00000015504) flanqueada pelos iniciadores desenhados.	50
Figura 15 - Comparação entre sequencia de <i>CDH1</i> de <i>C. jacchus</i> e <i>Homo sapiens</i>	51
Figura 16 - Fragmento do promotor de <i>CDH1</i> de <i>Cebus apella</i> obtido a partir de iniciadores desenhado baseado em sequencias do mesmo gene da espécie <i>Calithrix jacchus</i>	51
Figura 17 - Comparação entre fragmentos de promotor de <i>CDH1</i> entre as espécies <i>C. apella</i> e <i>Homo sapiens</i>	52
Figura 18 - Fragmentos de sequencia do promotor de <i>CDH1</i> das espécies <i>C. apella</i> e <i>Homo sapiens</i>	53
Tabela 4 - Resultado das análises de imunohistoquímica (IHQ) e MSP.	54
Figura 19 - Imagem gel de agarose a 3% com os resultados de MSP. .	55

RESUMO

O câncer gástrico continua sendo uma importante causa de morte dentre os tipos de câncer no Brasil e no mundo. A origem do câncer de estômago provém, assim como nos demais, de acúmulo de alterações genéticas. Portanto, se faz necessário saber quais alterações genéticas são importantes para desencadear a patogênese do câncer gástrico. O MNU, conhecido carcinógeno, quando ingerido de forma oral em doses determinadas desencadeia o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, com aparecimento de estágios pré definidos característico deste tipo tumoral. Com base nestes conhecimentos, realizamos um experimento com 6 macacos da espécie *Cebus apella* induzidos à desenvolver câncer gástrico do tipo intestinal. Os animais ingeriam 16mg/kg de peso diariamente da droga, com desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em todos. Infelizmente, devido à toxicidade da droga, somente um animal sobreviveu ao tratamento e desenvolveu desenvolveu uma massa tumoral propriamente dita. Foram feitas avaliações periódicas dos animais, em dias pré-determinados (ao início, no 120°, 150°, 300°, 940°) com coletas de fragmentos da mucosa gástrica. Foram coletadas 20 amostras de tecido, distribuídas entre mucosa normal, gastrite, displasia, metaplasia e tumoral. Destas amostras extraímos DNA para as análises do gene *CDH1*. Não há na literatura sequencia deste gene para a espécie utilizada no estudo. Com este objetivo, utilizamos iniciadores construídos a partir de sequencias de *CDH1* de *Callithrix jacchus* (espécie filogeneticamente) e seqüenciamos cerca de 342pb da região promotora de *CDH1* de *C. apella*. As análises mostraram uma similaridade de 98% desta região com a dos humanos, com presença de vários sítios de ligação de fatores de transcrição (sp1, Ap2, NF-x, AREB6, Puf e CTF) além da presença do CAAT Box. Esta região ainda possui 30 sítios CpGs, o que indica que ela pode estar sofrendo regulação epigenética. Para se verificar como se encontrava o padrão de metilação desta região realizamos uma análise de MSP com iniciadores específicos e constatamos que houve predominância de alelos não metilados de *CDH1* para todas as amostras pré neoplásicas e a amostra de adenocarcinoma encontra-se metilada. O que pode ser constatado com um ensaio de Imunohistoquímica, onde somente a amostra tumoral não expressava a proteína caderina. Desta maneira nossas análises sugerem que a metilação do gene *CDH1* desempenha papel importante na tumorigênese gástrica em *C. apella*, e é um evento tardio, uma vez que não é observado nos outros tipos teciduais não tumorais E, partindo-se da similaridade entre as seqüências, podemos sugerir que o mesmo evento pode está ocorrendo em humanos. Esta metilação do promotor do *CDH1* leva a um silenciamento deste gene o que desencadeia o estabelecimento de adenocarcinomas gástricos, fato apoiado pela literatura onde vários trabalhos apontaram que a hipermetilação do promotor da caderina está associada ao desenvolvimento do câncer gástrico.

Palavras chaves: câncer gastrico; metilação, caderina, *Cebus apella*, *CDH1*.

ABSTRACT

The gastric cancer remains a major cause of death among cancers in the world. In Brazil, are expected around 500 000 new cases in 2012/2013. The origin of stomach cancer, as in others, arises from the accumulation of genetic alterations. Therefore, it is necessary to know which genetic changes are important in triggering the pathogenesis of gastric cancer. We know that the intestinal type develops through well defined stages. The MNU - a known carcinogen - when ingested in oral form at dosages determined triggers development of this histological type of gastric cancer. Based on this knowledge, we conducted an experiment with six specime of *Cebus paella*, induced to develop intestinal type gastric cancer. The animals consumed 16mg/kg of body weight daily drugs. All pre-neoplastic lesions developed. Due to drug toxicity, only one survived the entire treatment and developed a tumor. Periodic evaluations were made of animals in pre-determined days (the beginning, days 120, 150, 300, 940) during which samples were made of the gastric mucosa. We collected 20 samples of tissue, distributed among normal mucosa, gastritis, dysplasia, metaplasia, and tumor. DNA extracted from these samples for further analyzes of the *CDH1* gene. There is no sequence of this gene in the literature for the species under study. So the first step was to get this sequence. Using the initiators constructed from sequences of *CDH1 Callithrix jacchus* (species phylogenetically closer to *C. apella*) we get a sequence of 342pb. There is a similarity of 98% with humans, the presence of binding sites for transcription factors like (sp1, Ap2, NF-x, AREB6, Puf and CTF) and the presence of CAAT Box. The sequence has 30 CpG sites could suffer epigenetic regulation. We also performed MSP analysis with specific primers and found that the region analyzed, there was predominance of the unmethylated *CDH1* alleles for all samples pre-neoplastic and adenocarcinoma sample is methylated. When we compared these data with immunohistochemistry revealed that only tumor sample did not express the protein cadherin. Our analyzes suggest that methylation of the *CDH1* gene plays an important role in gastric tumorigenesis in *C. apella*. And, from the similarity between sequences, we suggest that the same occurs in humans. This cadherin promoter methylation leads to inactivation of the gene and establishment of gastric adenocarcinomas. The cadherin promoter hypermethylation has been reported in several articles associated with the development of gastric cancer.

Keywords: gastric cancer, methylation, cadherin, *Cebus apella*, *CDH1*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que se caracterizam pela perda de controle da proliferação celular e ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástases para tecidos distantes (Sieber *et al.*, 2005; Pazdur *et al.*, 2005; INCA, 2009).

É considerado hoje como um dos grandes problemas de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008 era esperado a ocorrência de 12 milhões de novos casos de câncer no mundo e cerca de sete milhões de mortes. Estima-se que em 2020 cerca de 20 milhões de pessoas sejam afetadas por esta doença e mais de 10 milhões venham a óbito (Love, 2010).

Para o ano de 2008, em termos mundiais, o tipo histológico mais incidente foi o de pulmão (1,52 milhões de casos novos), seguido pelo de mama (1,29 milhões) e cólon/reto (1,15 milhões). O câncer de pulmão, por ser o de pior prognóstico, levou a óbito 1,31 milhões de pessoas. Já o de estômago aparece em segundo nas taxas de mortalidade, responsável por 780 mil mortes seguido pelo de fígado com 699 mil óbitos (WHO, 2009). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) em seu relatório para o biênio de 2010/2011 foram aguardados em torno de 500 mil novos casos de câncer e, destes, oito mil só no estado do Pará (INCA, 2009).

De acordo com Luo *et al.* (2009), o câncer origina-se a partir de alterações em genes do controle do ciclo celular. A célula passa então

a se proliferar desobedecendo aos mecanismos de controle, podendo adquirir a capacidade de invadir outros tecidos.

As alterações conhecidas que podem afetar o DNA e levar ao desenvolvimento de tumores incluem desde mutações cromossômicas (translocações, quebras cromossômicas, inversões), até mutações gênicas (mutações de ponto, inserções/deleções) e mesmo eventos epigenéticos (acetilação de histonas, metilação de DNA) (Stock & Otto, 2005; Ponder, 2001; Feinberg *et al.*, 2006; Esteller, 2007a; Esteller, 2007b; Halazonetis *et al.*, 2008).

Fatores externos e internos podem desencadear os processos mutagênicos. O consumo excessivo de álcool, o fumo, o sedentarismo e a exposição às radiações ionizantes são alguns dos agentes externos associados direta ou indiretamente a muitos tipos de cânceres (Rock *et al.*, 2000; Tsugane & Sasazuki, 2007). Como fatores internos podemos citar os subprodutos metabólicos – produzidos pelo próprio organismo em seu metabolismo normal – capazes de afetar o DNA, tais como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os produtos de peroxidação lipídica, os metabólitos de estrógeno e o colesterol, além dos radicais livres, entre outros (Hoeijmakers, 2009).

1.2 BASES GENÉTICAS DO CÂNCER

O ciclo celular consiste em uma seqüência de fases durante as quais eventos ordenados ocorrem a fim de se duplicar os componentes das células e dividi-la em duas células filhas. São quatro as fases: **G₁**, **S**, **G₂** e **M** (Figura 1). Eventos específicos ocorrem em cada fase: em **S** ocorre a síntese de DNA e em **M** a divisão das células-filhas. As fases **G₁** e **G₂** são consideradas as de intervalo, durante as quais a célula terá o

tempo necessário para a correção de eventuais erros ou danos ao DNA e também para duplicar seus componentes celulares (Evan & Vousden, 2001; Vermeulen *et al.*, 2003; Malumbres & Barbacid, 2009).

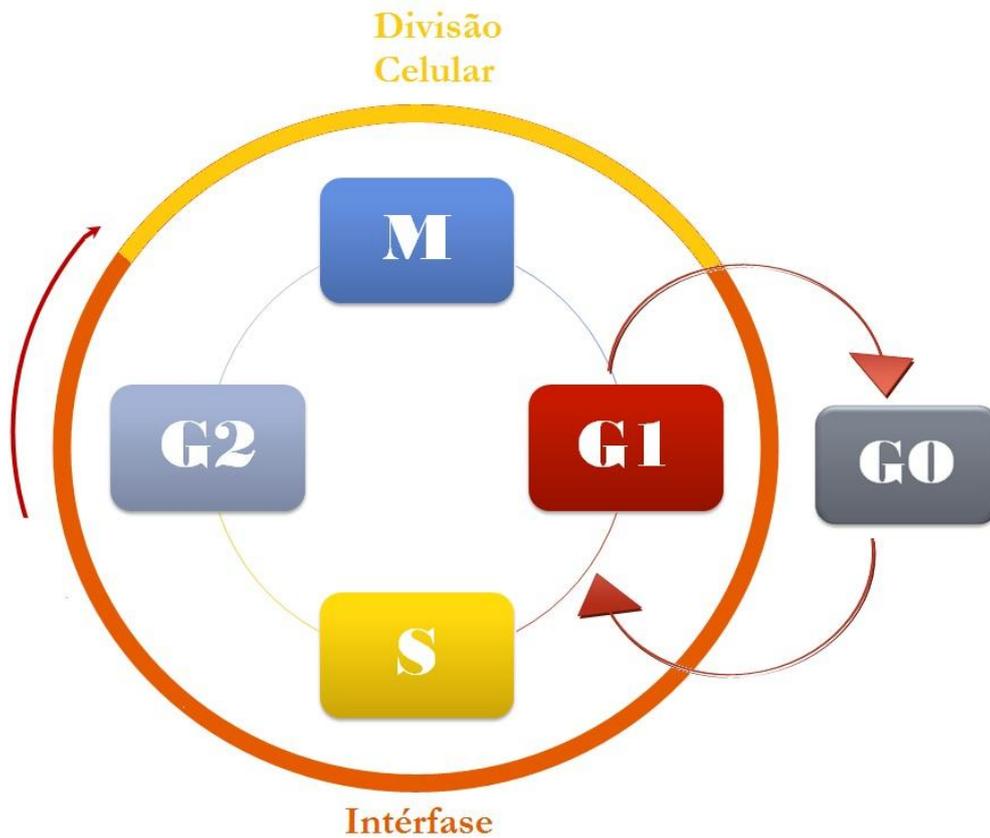


Figura 1 - O ciclo celular e suas fases. M=Mitose/ I= Interfase/ G1= fase de gap (intervalo) 1/ G2=fase de intervalo 2/ S= fase de síntese do DNA/ G0: fase de senescência.

A correta progressão através do ciclo celular é monitorada pelos pontos de checagem. Os defeitos na síntese de DNA e/ou na segregação cromossômica disparam uma cascata de sinalização que termina por modular as CDKs (ciclina dependentes de cinase, enzimas chaves neste processo). Esta modulação faz com que a célula suspenda o ciclo até que o processo defeituoso seja corrigido. Todo este aparato

impede que erros sejam transmitidos às células filhas (Hartwel & Weinert, 1989; Elledge, 1996; Kastan & Bartek, 2004; Malumbres & Barbacid, 2009).

Se o reparo desencadeado no ponto de checagem não obtiver sucesso – seja por excesso de danos no DNA ou por defeitos no próprio sistema de reparo – a célula deve ser encaminhada à senescência ou até mesmo para a apoptose. Entretanto, algumas células podem burlar esses mecanismos e ganhar uma sobrevida, acumulando mais mutações em outros genes e dando início ao processo neoplásico (Malumbres & Barbacid, 2009; Malumbres & Carnero, 2003; Kastan & Bartek, 2004).

Este processo é caracterizado por um conjunto de características (ou “marcas”), compartilhado por praticamente todos os tipos de cânceres. Em 2000, Hanahan e Weinberg definiram as seis primeiras “marcas”: a autossuficiência em relação aos sinais de crescimento, a resistência aos sinais antiproliferativos, a evasão a apoptose, o potencial proliferativo ilimitado, a angiogênese, a invasão a tecidos adjacentes e a metástase. Com o avanço dos estudos sobre o câncer foram sendo sugeridas novas propriedades como: a evasão ao sistema imunológico, a instabilidade genômica, o estresse metabólico, mitótico e oxidativo e de danos ao DNA (Luo *et al.*, 2009; Negrini *et al.*, 2010). Até que em 2011, Hanahan e Weinberg reeditaram suas “marcas do câncer” e reformularam acrescentando às já existentes (que continuam sendo verdadeiras até os dias atuais) outras quatro, as quais são: a evasão à destruição auto-imune, a promoção de inflamação tumoral, a instabilidade genômica e mutação, e a desregulação da cinética celular (**Figura 2**).

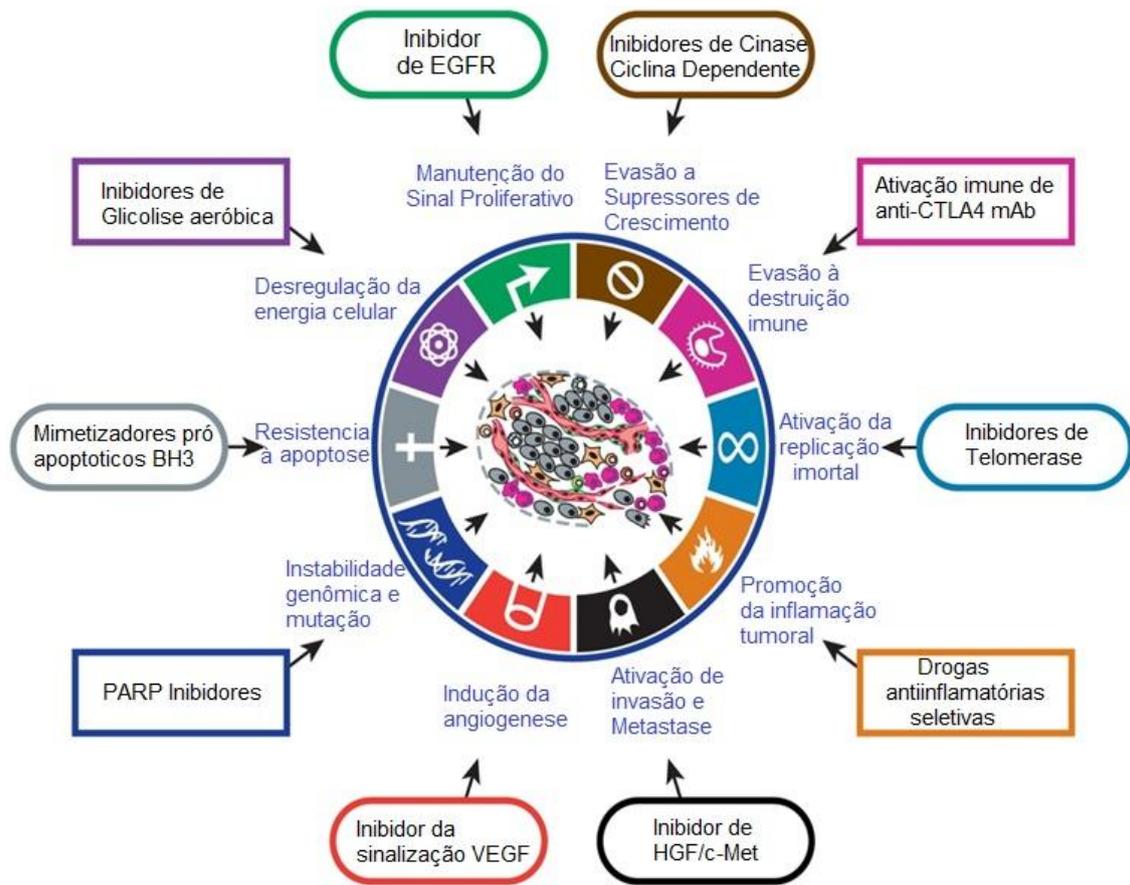


Figura 2 - As Marcas do Câncer. Fonte (traduzida): Hannahan & Winberg, 2011.

Todas estas “marcas” são desencadeadas por mutações em genes que devem conferir à célula portadora a capacidade de sobreviver e proliferar em condições as quais normalmente seriam deletérias (Ali & Sjoblom, 2009; Luo *et al.*, 2009). Como são muitos os genes envolvidos em todo o processo, estes podem ser divididos em duas classes: os **oncogenes** e os **genes supressores tumorais**. Os produtos desses genes fazem parte de uma rede de fatores que, juntos, trabalham no controle da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência das células. Mutações envolvendo-os são cruciais para o desencadeamento do processo neoplásico (Yokota, 2000; Ponder, 2001; Vogelstein & Kinzler, 2004; WHO, 2009; Ali & Sjoblom, 2009).

Os oncogenes são correlacionados com eventos genéticos de ganho de função e possuem efeito dominante (Ponder, 2001). São responsáveis por codificar proteínas responsáveis pelo controle positivo da proliferação celular (Croce, 2008). São originários da ativação dos proto-oncogenes através de translocações, ampliações gênicas ou ainda por alterações intragênicas que alterem a regulação do gene. Tais mutações garantem a célula portadora uma vantagem proliferativa ou um aumento da sobrevivência da mesma (Volgelstein & Kinzler, 2004; Croce, 2008).

De acordo com o tipo de proteína codificada, os oncogenes podem ser classificados em fatores de transcrição, remodeladores de cromatina, fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, transdutores de sinais e os reguladores da apoptose. Cada uma dessas classes influencia a carcinogênese de uma maneira (Croce, 2008). Genes como o *Myc1*, *Kras*, *Nras*, *PDGF*, *MDM2* entre outros, são exemplos de oncogenes (WHO, 2009).

Os genes supressores tumorais por sua vez estão envolvidos em funções críticas e altamente conservadas dentro da célula. Eles são responsáveis pela regulação do ciclo celular e apoptose, diferenciação celular, vigilância da integridade genômica e reparo de erros no material genético, transdução do sinal e adesão celular (Oliveira *et al.*, 2005; Vogelstein & Kinzler, 2004).

De acordo com sua função, os genes supressores tumorais podem ainda ser subdivididos em dois grupos, os “*gatekeepers*” ou genes protetores e os “*caretakers*” ou genes de manutenção (Oliveira *et al.*, 2005).

Os *gatekeepers* reúnem genes que desempenham papel diretamente ligado a regulação do ciclo celular. Eles são responsáveis por promover a proliferação ou enviar a célula ao processo apoptótico. Mutações nesta subclasse de genes estão diretamente ligadas ao processo de carcinogênese e progressão tumoral de inúmeros tipos de

câncer. Os *caretakers* por sua vez, são responsáveis por processos adjacentes ao ciclo celular como o reparo do DNA e a conservação da integridade genômica. Mutações nesta classe de gene não levam a célula ao desenvolvimento do fenótipo mutante, mas favorecem o surgimento de mutações em genes classificados como *gatekeepers* (Volgelstein & Kinzler, 2004). Exemplos de genes supressores tumorais são: *BRCA1 e 2*, *APC*, *TP53*, *VHL*, *RB1*, *NF1 e 2*, entre outros.

A hipótese mais aceita de como os genes supressores tumorais estariam envolvidos na carcinogênese foi proposta por Alfred Knudson em 1971. A chamada Hipótese dos Dois Eventos de Knudson propõe que deva ocorrer dois eventos mutacionais distintos, um em cada alelo do gene, para que o mesmo seja inativado. Essas mutações podem ser herdadas ou ocorrer de forma espontânea (Macleod, 2000; Oliveira *et al.*, 2005).

1.3 EPIGENÉTICA E CÂNCER

As mutações na seqüência de DNA por si só não são capazes de explicar toda a diversidade de fenótipos dentro de uma população de células cancerosas. Os Fenômenos Epigenéticos oferecem uma explicação adicional à essa diversidade. A epigenética é definida como modificações na expressão do DNA sem, no entanto alterar a sua seqüência (Das & Singal, 2004; Sharma *et al.*, 2010). Essas alterações são reversíveis e herdáveis. Em uma célula normal, fenômenos epigenéticos direcionam um desenvolvimento adequado e uma apropriada diferenciação celular (Iacobuzio-Donahue, 2009).

As modificações epigenéticas normais podem ser de três tipos: as modificações de cromatina, a metilação do DNA e o *imprinting*

genômico (Iacobuzio-Donahue, 2009). O mais bem estudado destes mecanismos é a metilação do DNA, que possui um importante papel no controle da atividade gênica (Esteller, 2008; López *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010).

Em mamíferos, a metilação do DNA ocorre pela transferência de um radical metil da S-adenosilmetionina (SAM – doador universal de radical metil) para o carbono de posição 5 do anel de pirimidina da citosina. A reação é catalisada pela enzima DNA metiltransferase (DNMT). Somente citosinas situadas a 5' de guaninas podem ser metiladas formando os chamados dinucleotídeos CpG (Esteller, 2008; Iacobuzio-Donahue, 2009, Gronbaek *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2010) (**Figura 3**).

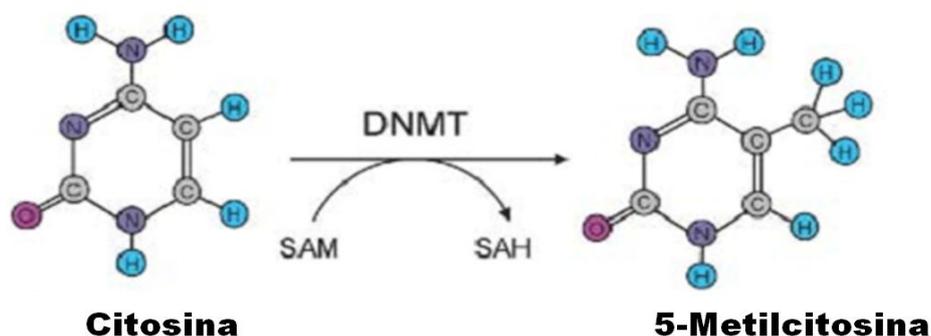


Figura 3 - Metilação da Citosina. SAM= S-adenosilmetionina. SAH= S-adenosilhomocisteína. DNMT= DNA Metiltransferase. Fonte: Gronbaek *et al.*, 2007.

A primeira DNMT identificada foi a DNMT1. Ela é responsável pela manutenção da metilação do genoma após a replicação. Outras DNMTs identificadas foram a DNMT3a e a DNMT3b. Ambas possuem função de realizar a reação de metilação *de novo* no DNA (Esteller, 2005; Gronbaek *et al.*, 2007).

Entretanto, os papéis distintos das enzimas DNMTs foram contestados em modelos de câncer: estudos vem demonstrando que a

depleção severa de DNMT1 produz tanto uma insignificante diminuição da metilação do DNA e da metilação global de promotores, quanto mudanças detectáveis na expressão de genes supressores tumorais silenciados (Iacobuzio-Donahue, 2009).

Os dinucleotídeos **CG**s são desigualmente distribuídos pelo genoma, havendo ricas regiões chamadas de ilhas **CpG**s. Estas “ilhas” compreendem pequenas regiões ricas em CpG, com tamanho variável de 0,5 a 5 kb. Cerca de 50% das ilhas CpG são encontradas em regiões que não coincidem com promotores de genes, como os centrômeros e seqüências de microssatélites. Não se conhece a real função dessas ilhas nestas regiões supracitadas (Esteller, 2007b; Jones & Baylin, 2002; Kondo & Issa, 2010).

Além desses locais, cerca de 60% dos promotores de genes possuem regiões ricas em CpG, onde em geral estão não metiladas (Iacobuzio-Donahue, 2009; Kondo & Issa, 2010). Quando metiladas, estas ilhas CpG situadas em regiões promotoras promovem um bloqueio da transcrição pela interferência na ligação dos fatores de transcrição. A metilação do DNA pode também afetar modificações das histonas e estrutura da cromatina, que em conjunto alteram a expressão do gene (**Figura 4**) (Tycko, 2000; Das & Singal, 2004; Laird, 2005).

Duas formas de metilação aberrante do DNA são encontradas: a hipometilação global do DNA e hipermetilação gene específica através de metilação de ilhas CpG dos seus promotores (Esteller, 2008; Kondo & Issa, 2010).

A hipometilação global do genoma em tumores, comparada ao nível de metilação das suas contrapartes em tecidos normais, foi a primeira alteração epigenética observada em cânceres humanos (Esteller, 2008). Alterações na metilação global podem gerar instabilidade genômica, reativação de elementos de transposição e perda do *imprinting*, que consiste no silenciamento de um dos alelos

parentais herdados, através do processo de metilação (Esteller, 2008; Gronbaek *et al.*, 2007; Iacobuzio-Donahue, 2009).

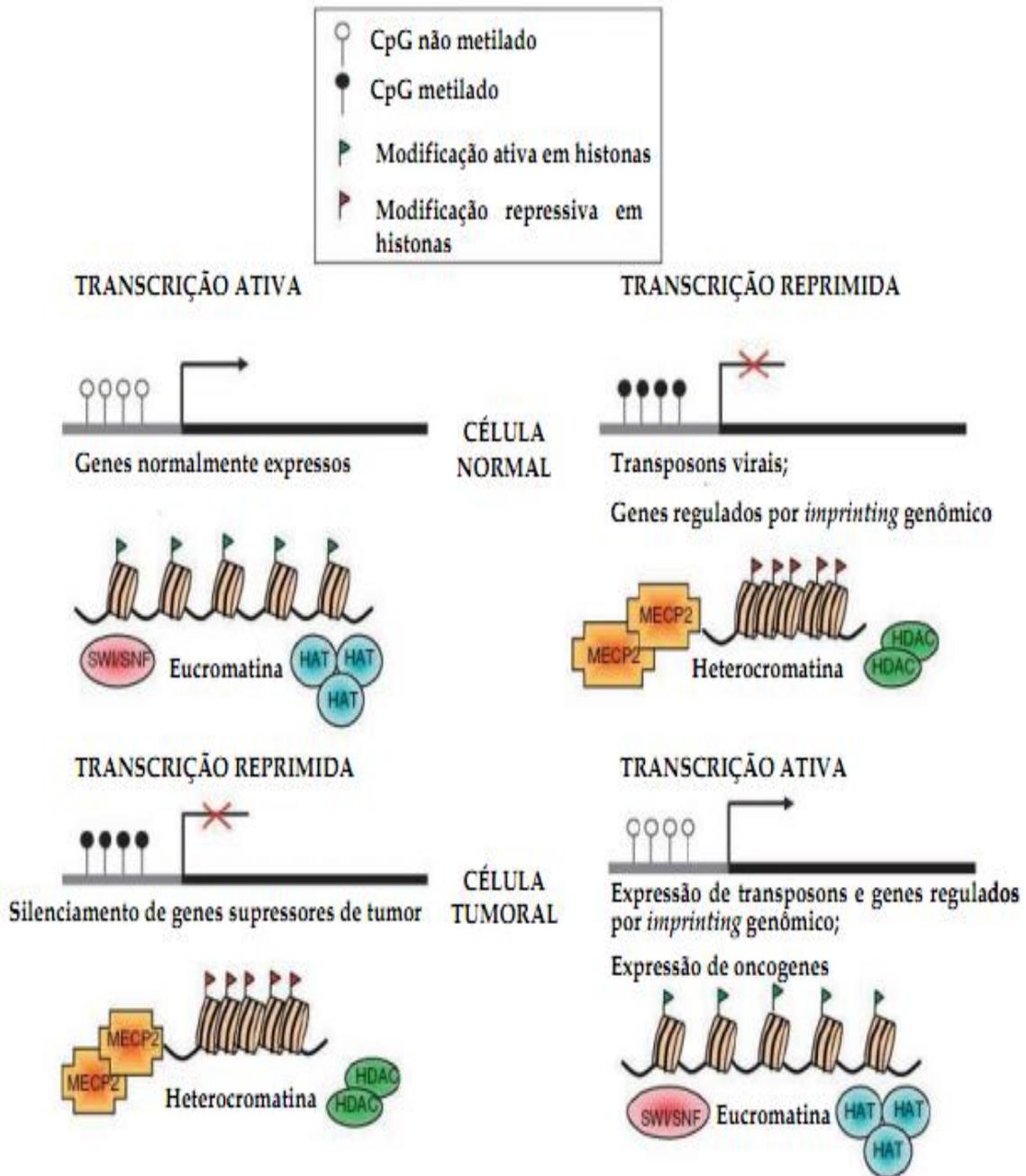


Figura 4 - Modificações epigenéticas do DNA e histonas que podem influenciar a expressão do gene. Fonte (adaptado): Lopez *et al.* (2009)

A hipermetilação de genes pode acarretar em perda de função, o que pode proporcionar à célula uma vantagem seletiva similar a observada nas mutações clássicas (Feinberg *et al.*, 2006; Iacobuzio-Donahue, 2009). Essa metilação se dá principalmente nas das ilhas CpGs situadas em seus promotores. Pode afetar genes envolvidos no ciclo celular, reparo do DNA, metabolismo de carcinógenos, interação célula-célula, apoptose e angiogênese, todos envolvidos no processo de carcinogênese. A hipermetilação pode ocorrer em diferentes estágios do processo neoplásico (Esteller, 2008).

O perfil de metilação das ilhas CpG's varia de acordo com o tipo tumoral em questão, e não é característica somente de tumores esporádicos, podendo ocorrer em cânceres hereditários, configurando como um dos passos da Teoria de Knudson (Esteller, 2007b, 2008).

1.4 O CÂNCER GÁSTRICO

1.4.1 Epidemiologia

O câncer gástrico é o quarto tipo de câncer mais incidente no mundo e o segundo tipo que mais leva a óbito (WHO, 2009). Entretanto, observa-se um declínio nesses números nos últimos 30 anos, devido, principalmente, a mudanças alimentares da população em geral, como maior ingestão de frutas e verduras e a diminuição do uso do sal como conservante de alimentos (Roder, 2002; Johnson & Evers, 2008). Por outro lado, o aumento do número de diagnósticos precoces tem

aumentado o número de novos casos e diminuído o número de óbitos (Parkin, 2005; Johnson & Evers, 2008; Catalano *et al.*, 2009).

A incidência deste tipo de câncer não é uniforme ao redor do mundo. América Central e do Sul, Ásia, Leste e Sul Europeu são áreas de elevada incidência do câncer gástrico. Já América do Norte, Austrália e Nova Zelândia apresentam as mais baixas taxas de incidência (Parkin, 2005; Forman & Burley, 2006; WHO, 2009; Catalano *et al.*, 2009).

No Brasil, segundo o INCA, são aguardados para o biênio 2010/2011 mais de 20 mil novos casos de câncer de estômago, sendo 13.820 para homens e 7.680 para mulheres (INCA, 2009). Para o estado do Pará, para o mesmo biênio, especula-se que ocorram 650 novos casos e quase 50% ocorra em sua capital, Belém (INCA, 2009), que já foi considerada a 11^a cidade no mundo em números de casos deste tipo de neoplasia (IARC, 2001).

1.4.2 Fatores Etiológicos

Estudos epidemiológicos sugerem uma forte correlação entre fatores ambientais e genéticos/epigenéticos na gênese do câncer gástrico (Liu *et al.*, 2005a; Crew & Neugut, 2006; Smith *et al.*, 2006; Forman & Burley, 2006; Catalano *et al.*, 2009).

O fator ambiental mais fortemente correlacionado com o câncer gástrico é a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*. Esta bactéria coloniza especificamente o epitélio gástrico e é a mais comum infecção bacteriana no mundo, tendo sido considerada carcinógeno tipo 1 (definitivo) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC - *International Agency For Research on Cancer*) em 1994 (Suzuki

et al., 2009; Polk & Peek, 2010). Países que possuem uma alta taxa de ocorrência de câncer de estômago possuem também uma alta taxa de infecção por *H. pylori* (Crew & Neugut, 2006; Polk & Peek, 2010). Este microorganismo causa uma gastrite crônica, que se não tratada, evolui para uma gastrite atrófica e atrofia gástrica. Sabe-se que a atrofia gástrica é um fator de risco importante para o desenvolvimento do câncer de estômago (Kelley & Duggan, 2003; Polk & Peek, 2010, Pandey *et al.*, 2010).

Entretanto, a infecção por esta bactéria não é o único fator ambiental envolvido na gênese deste tipo de neoplasia. Hábitos alimentares também estão associados. Há evidências de que elevado consumo de sal e compostos N-nitrosos e baixa ingestão de frutas e vegetais frescos aumentam o risco de câncer gástrico (Bae *et al.*, 2008; Liu & Russel, 2008; Hernández-Ramírez *et al.*, 2009).

Estudos caso-controle associam positivamente a ingestão de sal e compostos N-nitrosos com o desenvolvimento de câncer de estômago, apesar de estudos prospectivos obterem resultados controversos. Ingestão de elevadas concentrações de sal destroem a mucosa gástrica, causando lesões e inflamações, propiciando a instalação da *H. pylori* e/ou levando ao desenvolvimento de uma gastrite, elevando o risco de desenvolvimento de câncer gástrico. Nitritos e nitratos – encontrados principalmente em alimentos defumados e em conserva – quando digeridos são convertidos em nitrosaminas. Estas moléculas são capazes de provocar a desaminação de purinas e pirimidinas do DNA podendo levar a mutações de ponto, alterando genes que possam estar envolvidos no processo de carcinogênese (Kono & Hirohata, 1996; Brandt & Goldbohm, 2006; Hernández-Ramírez *et al.*, 2009).

A ingestão de uma maior quantidade de frutas e vegetais frescos por sua vez, possui uma ação protetora com relação ao câncer de estômago (Kelley & Duggan, 2003; Lochhead & El-Omar, 2008).

Estes alimentos contêm substâncias anti-oxidantes e que garantem a integridade do DNA por evitarem a conversão de nitritos para nitrosaminas (Liu & Russel, 2008). Entre as substâncias candidatas a este papel estariam o beta-caroteno, selênio, vitamina C e o folato (Kelley & Duggan, 2003; Jakszyn & Gonzalez, 2006). Este último tem recebido um interesse especial como protetor contra o câncer devido sua importante participação na síntese de nucleotídeos e na metilação de DNA (Choi & Mason, 2000; Ziegler & Lim, 2007).

O tabagismo possui uma relação dose-dependente no desenvolvimento do câncer gástrico. Fumantes teriam um aumento no risco de desenvolvimento de tumor gástrico em relação aos não fumantes (Ladeiras-Lopes *et al.*, 2008; Koizumi *et al.*, 2004; Nishino *et al.*, 2006). Já no caso do consumo de álcool, os resultados são controversos. Alguns estudos evidenciam a associação deste hábito com o desenvolvimento de neoplasia no estômago (Terry *et al.*, 2002; Kelley & Duggan, 2003; Den Brandt & Goldbohm, 2006) enquanto outros não encontram uma clara associação (Franceschi & Vecchia, 1994).

Além de fatores externos, fatores genéticos estão associados ao câncer de estômago. Por exemplo, mais de 50 mutações no gene *CDH1* estão relacionadas com o câncer gástrico difuso hereditário. Isto quer dizer que indivíduos com essas mutações ao associar hábitos relacionados ao desenvolvimento dessa neoplasia, aumentam sua probabilidade de desenvolvê-la (Lynch *et al.*, 2008).

1.4.3 Classificação Histopatológica

Anatomicamente, o estômago é dividido em tres grandes áreas denominadas fundo, corpo e antro. Histologicamente, é constituído de cinco camadas sendo a mais interna a mucosa glandular, seguida pela submucosa, muscular, subserosa e mais externamente a serosa (**Figura**

5). O câncer gástrico pode se desenvolver em qualquer uma dessas áreas (Shang & Peña, 2005).

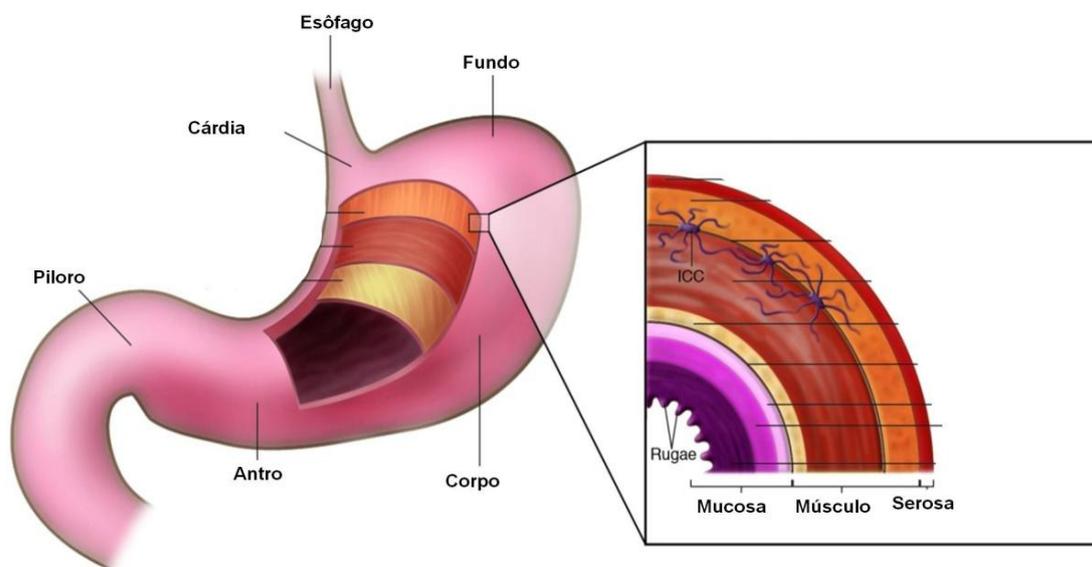


Figura 5 - Anatomia do estômago. Fonte (adaptado): Coffey *et al.*, 2007

Dentre os tipos histológicos de câncer que podem acometer o estômago, mais de 90% são do tipo adenocarcinoma (derivam do epitélio gástrico). Dos 10% restantes, predominam os tipos leiomiossarcoma e linfoma Não-Hodgkin. Outros tipos são extremamente raros (Kelley & Duggan, 2003; Hamilton & Meltzer, 2006).

Várias classificações histopatológicas para o adenocarcinoma gástrico foram propostas. A mais difundida, e a utilizada no presente trabalho, foi proposta por Láuren em 1965. Nesta classificação, os tumores são divididos em **intestinal** (ou bem diferenciado) e **difuso** (ou pobremente diferenciado). Estes sub-tipos diferem tanto em suas características histológicas, quanto na epidemiologia, patogenicidade e perfil genético (Hamilton & Meltzer, 2006).

O tipo difuso caracteriza-se por apresentar células pouco coesas, difusamente infiltradas no estroma gástrico, com pouca ou

nenhuma formação glandular (**Figura 6**). Não há descrição de lesões pré-neoplásicas e não possui distribuição geográfica definida. Os pacientes acometidos por este tipo são em sua maioria jovens, do gênero feminino, com histórico familiar e apresentam o pior prognóstico em comparação ao tipo intestinal (Nardone, 2003; Hamilton & Meltzer, 2006). Microscopicamente, a lesão não apresenta limites definidos, apresentando espalhamento extensivo na submucosa e metástases precoces (Caldas *et al.*, 1999). Possui um componente hereditário mais forte do que o tipo intestinal e possui correlação com fatores ambientais, como infecção por *H. pilory* (Dickens *et al.*, 2005; Lynch *et al.*, 2008; Hamilton & Meltzer, 2003).

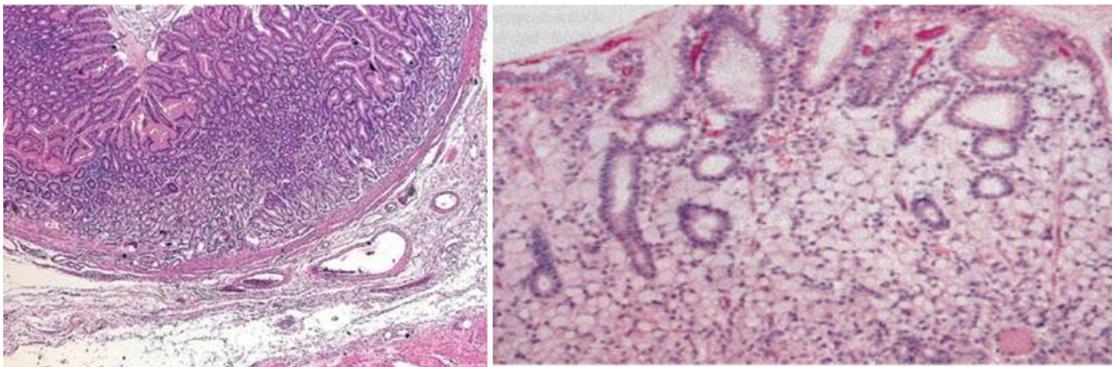


Figura 6 – Cortes histopatológicos de tecido gástrico. À esquerda tecido normal e à direita adenocarcinoma gástrico tipo difuso, segundo classificação de Lauren, 1965. Fonte (modificadas): Hartgrink *et al.*, 2009; Hoenberg & Greschel, 2003

O tipo intestinal por sua vez apresenta-se como uma formação glandular similar a mucosa colonial (**Figura 7**). Esta formação pode ser de tumores pobremente a altamente diferenciados, os quais crescem com padrão mais expansivo que infiltrativo e maior vascularização (Dickens *et al.*, 2005). São descritas lesões pré-neoplásicas associadas, e é o tipo mais comum em áreas com elevada incidência de tumores gástricos (Hamilton & Meltzer, 2003; Dickens *et al.*, 2005). Este tipo de câncer é mais comum em homens com idade avançada e possui forte componente ambiental (Nardone, 2003).

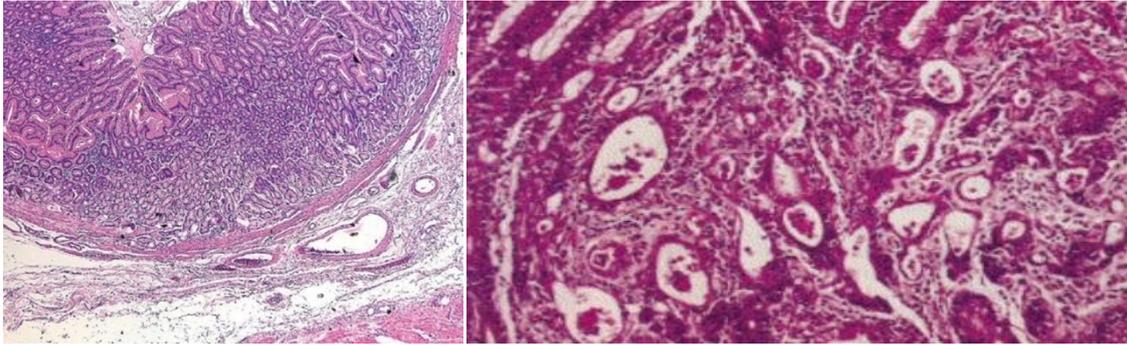


Figura 7 – Cortes histopatológico de tecido gástrico. À esquerda mucosa do estômago normal. À direita adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, segundo classificação de Láuren, 1965. Fonte (modificadas): Hartgrink *et al.*, 2009; Hoenberg & Greschel, 2003

Existem ainda tumores que apresentam um padrão misto, com quantidades iguais de componentes do tipo difuso e do tipo intestinal. Estes tumores são chamados de carcinomas mistos. Outros estão demasiadamente indiferenciados e são chamados de indeterminados (Hamilton & Aatonen, 2000).

1.4.4 Fatores Genéticos e epigenéticos associados

Várias são as causas de desregulação de genes em câncer gástrico e pode ocorrer em diferentes níveis: no genômico, a nível de sinalização e a nível pós transcricional (Stock & Otto, 2005). Portanto, o desenvolvimento e progressão deste tipo de câncer envolve um grande número de alterações genéticas e epigenéticas tanto em genes supressores tumorais quanto em oncogenes (Tamura, 2006; Park, 2010). Apesar da patogênese do câncer de estômago ser muito incerta – principalmente quando se trata do tipo difuso – muito tem se descoberto acerca da biologia molecular do câncer como um todo, o

qual tem proporcionado evidências de que a malignização de uma célula epitelial se dá através de um processo de múltiplas etapas, resultado de acúmulos de anomalias genéticas (Yasui *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2004; Ushijima & Sasako, 2004; Park, 2010).

Correa (1992) propôs um modelo para explicar a carcinogênese gástrica. De acordo com ele existiriam fases pré-neoplásicas desencadeadas por uma gastrite crônica (proveniente em sua maioria por uma infecção de *H. pylori*) que evoluiria até a instalação do câncer de estômago. As fases intermediárias seriam – em ordem crescente de malignização – gastrite atrófica, metaplasia intestinal e displasia (Yasui *et al.*, 2000).

A progressão por esta sequência de mudanças histológicas é acompanhada por sucessivas mudanças genéticas e epigenéticas. Pesquisas apontam que este modelo se aplica principalmente ao tipo intestinal, que possui fases pré-neoplásicas mais bem definidas (**Figura 8**) (Panani, 2008; Park, 2010).

As alterações genéticas mais comuns seriam a perda de heterozigidade e mutações de pontos em genes supressores tumorais; e as epigenéticas seriam a inativação de genes supressores tumorais através de metilação de ilhas **CpG**'s e silenciamento a nível transcricional (Yasui *et al.*, 2006). Mutações genéticas locais que alteram a expressão gênica incluem amplificação gênica, deleções e mutações em regiões codificadoras ou regulatórias (Stock & Otto, 2005). Outras alterações associadas ao câncer gástrico são a instabilidade de microssatélites (MSI), mutações em reguladores do ciclo celular, ativação da telomerase e polimorfismos genéticos (Yasui, 2001; Keller *et al.*, 2005; Milne *et al.*, 2009).

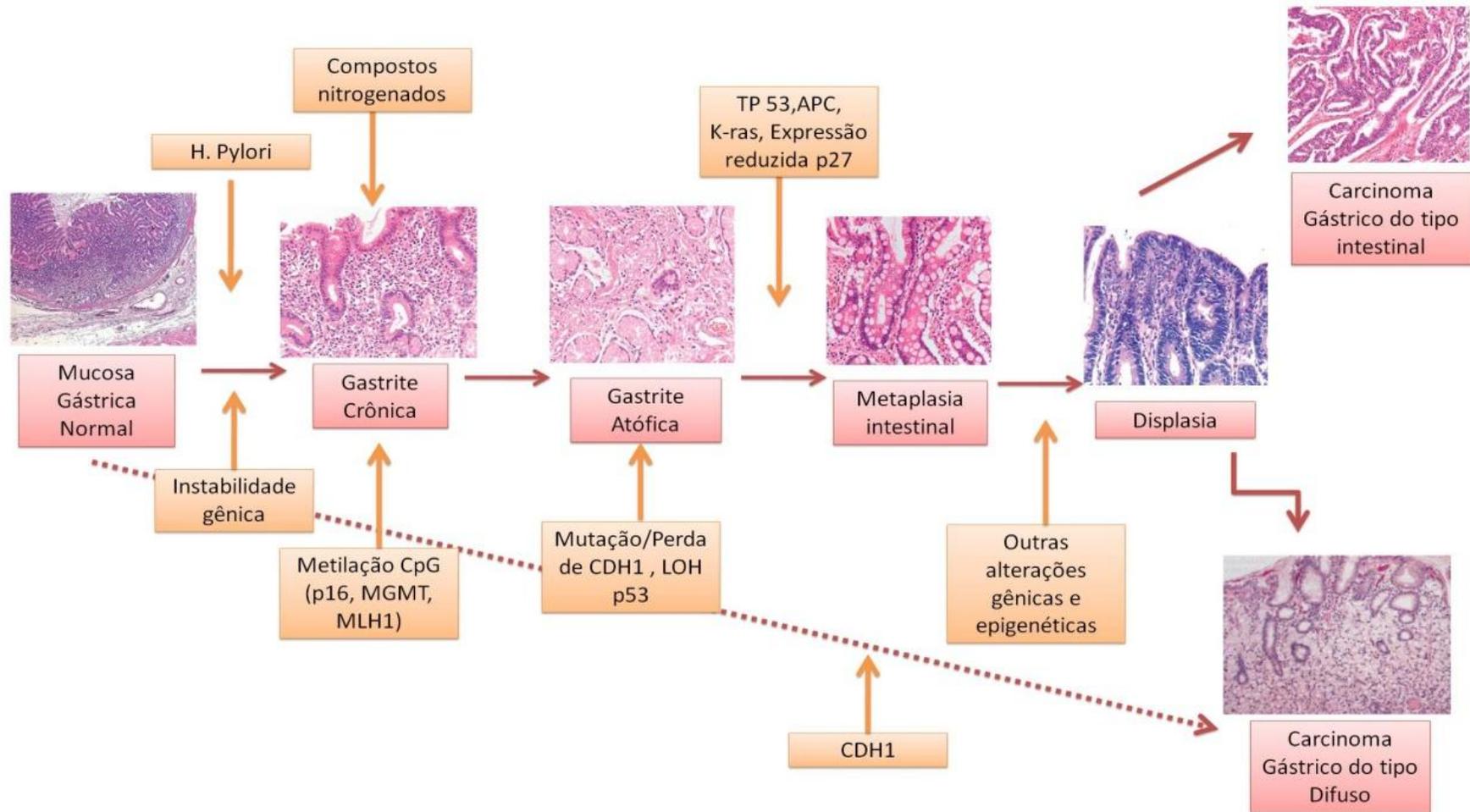


Figura 8 - Modelo de via da carcinogênese do câncer gástrico e alguns genes envolvidos.

Fonte (adaptado): Hartgrink *et al.*,2009; Yasui *et al.*,2005, 2006; Carl-McGrath *et al.*,2007.

Um mecanismo comum de inativação de genes em câncer gástrico é o silenciamento epigenético através da metilação do DNA e está normalmente associada a genes supressores tumorais (Toyota *et al.*, 1999; Stock & Otto, 2005). No câncer gástrico, inúmeros genes supressores tumorais já foram descritos como silenciados através deste mecanismo como o *hMLH1*, *APC*, *CHFR*, *COX2*, *DAP-kinase*, *DCC*, *E-cadherina (CDH1)*, *GSTP1*, *HRK*, *LOX*, *MGMT (O6-metilguanina metiltransferase)*, *p14*, *p15*, *p16*, *PTEN*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *14-3-3 sigma*, *THBS1*, *TIMP-3*, e *TSLC1* (Tamura, 2006; Vauhkonen *et al.*, 2006; Yasui *et al.*, 2006). Pesquisadores observaram que há um aumento do número de genes metilados a medida que ocorre a progressão tumoral, indicando uma correlação entre a progressão tumoral e a metilação do DNA (Yasui *et al.*, 2006; Park, 2010).

Em tumores gástricos, muitos proto-oncogenes são ativados. Os mecanismos envolvidos podem ser desde uma amplificação gênica com conseqüente aumento de expressão do mesmo, quanto alterações epigenéticas (principalmente a metilação de ilhas *CpG*'s). Dentre os oncogenes envolvidos na carcinogênese gástrica podemos citar o *c-met*, *c-erB2*, *K-ras*, *c-myc*, *c-Kit*, *K-sam* e o *TNF- α* . No caso deste último, polimorfismos podem lhe conferir uma maior susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento do câncer de estômago (Yasui *et al.*, 2006; Panani, 2008; Milne *et al.*, 2009).

Os genes supressores tumorais também aparecem alterados em tumores de estômago. Algumas deleções intragênicas - ou até mesmo do gene inteiro - já foram descritas na literatura, envolvendo principalmente o gene *CDH1*. Outras mutações podem ocorrer neste gene. São descritos polimorfismos em seu promotor (Zhang *et al.*, 2008; Jenab *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011) e alterações nos padrões de metilação das ilhas *CpG*'s que modificam a expressão do gene (Machado *et al.*, 2001; Prasad *et al.*, 2008). Uma super-expressão de *CDH1* é encontrada em câncer gástrico e correlacionada com a aquisição de habilidades infiltrativas e de metástase (Panani, 2008). As mutações

genéticas e os eventos epigenéticos neste gene também foram correlacionadas com alterações na linhagem germinativa que levam ao desenvolvimento de câncer gástrico do tipo difuso de origem familiar (Moran *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Carl-McGrath *et al.*, 2007). Outro gene supressor tumoral largamente estudado e envolvido na carcinogênese gástrica é o *TP53*. Este gene codifica uma proteína responsável pelo controle do ciclo celular, reparo do DNA, diferenciação celular e apoptose (Chumakov, 2000; Park, 2010). Sua função pode ser alterada através de perda de heterozigosidade, mutações e alterações nos padrões de metilação de seu promotor. Mudanças nos padrões de expressão deste gene são uma das mais prevalentes alterações genéticas em cânceres humanos, incluído em tumores gástricos, onde aparece alterado em cerca de 40% dos casos (Cervantes *et al.*, 2007; Park, 2010). Observa-se ainda que em pacientes mais jovens, em comparação aos de idade avançada, há uma menor incidência de mutações no *TP53* (Nobili *et al.*, 2011).

Outra característica genética marcante dos tumores gástricos é a presença de MSI. A instabilidade de microssatélite é a consequência de defeitos no processo de reparo do DNA que leva a instabilidade gênica (Stock & Otto, 2005). A principal causa desta alteração, é o silenciamento do gene de reparo *hMLH1* e *hMSH2* através de hipermetilação de seus promotores (Yasui *et al.*, 2006; Cervantes *et al.*, 2007; Nobili *et al.*, 2011). Há então uma alteração espontânea em seqüências repetitivas simples chamadas de microssatélites, com inserção ou deleção de uma ou mais repetições. Existem três níveis de MSI que podem ser identificados: alta instabilidade de microssatélite (MSI-H), baixa (MSI-L) e ausência de instabilidade (MSS) (Tamura, 2006; Nobili *et al.*, 2011).

A prevalência de MSI é variável no câncer gástrico, ficando entre 15% e 60% de acordo com a população estudada (Yasui *et al.*, 2001; Nardone, 2003; Keller *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006; Tamura, 2006). A sua presença propicia um acúmulo de outras mutações que

contribuem para a patogênese deste tipo de câncer. Tumores com MSI-H apresentam características diferentes quando correlacionadas aos que possuem MSI-L ou mesmo MSS, sendo relatado um melhor prognóstico e maior sobrevida (Tamura, 2006; Zheng *et al.*, 2004; Nobili *et al.*, 2011).

A existência de polimorfismo genéticos também foi associada a instalação de tumores gástricos e estariam principalmente envolvidos na progressão dos mesmos. Polimorfismo são variações genéticas funcionais encontradas em cerca de 1% da população que ocasionam variabilidade genética. Trata-se de uma importante causa endógena do câncer (Yasui, 2005). Alguns polimorfismos que comprovadamente modificam o risco ao câncer gástrico envolvem os genes *IL-1beta (IL1B)*, o receptor antagonista *IL-1 (IL1RN)* e o *N-acetiltransferase (NAT1)* (Yasui, 2005). Outros ainda apresentam uma correlação fraca com a gênese do câncer gástrico, mas são associados a respostas diferenciadas aos tratamentos quimioterápicos. Como por exemplo os de genes são os envolvidos na via do folato, como o metileno tetrahydrofolato (*MTHFR*) e o timidilato sintase (*TS*) (Zhang *et al.*, 2005; Reeves *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2010; De Re *et al.*, 2010).

Há ainda outros genes – com mutações associadas ao câncer gástrico – os quais envolvem outras vias celulares como a apoptose (*BAX, Bcl, Survivina*), a angiogênese (*VEGF*), os reguladores de ciclo celular (*p27, E2F*), os fatores de crescimento (*EGF, TGFa, IGFII*) dentre outros também estão envolvidos na instalação e/ou desenvolvimento do câncer gástrico (Zheng *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006; Yasui *et al.*, 2006, Panani, 2008; Nobili *et al.*, 2011)

1.5 O GENE *CDH1*

As caderinas compreendem uma superfamília de proteínas transmembranas que medeiam a adesão célula-célula dependente de cálcio, funcionando como uma proteína chave na morfogênese de inúmeros órgãos (Roy & Berx, 2008).

A E-caderina é um dos membros desta família e está presente em células epiteliais de mamíferos (Beavon, 2000). É uma caderina tipo I (conhecida também como *CDH1*), e é normalmente considerada o protótipo de todas as caderinas devido a sua identificação e posterior caracterização, tanto em tecido normal quanto patológico, ter sido feita precocemente (Roy & Berx, 2008). A proteína funcional é constituída de três grandes domínios: uma grande porção extracelular (éxons 4-13), uma pequena porção transmembrana (éxons 13 e 14) e um domínio citoplasmático pequeno mas conservado que interage com inúmeras proteínas chamadas coletivamente de cateninas, em especial com a β -catenina, e forma também uma ligação com a actina do citoesqueleto (**Figura 9**) (Berx & Roy, 2001; Calmon & Rahal, 2007)

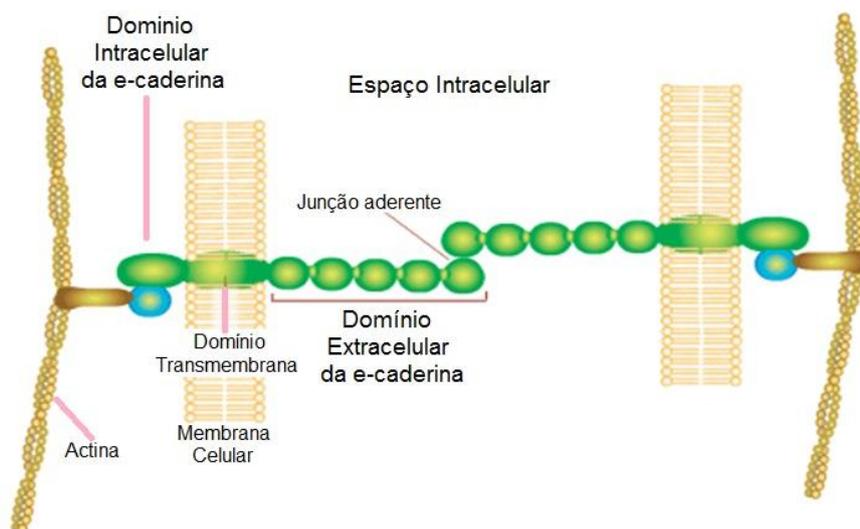


Figura 9 - Representação esquemática da *E-caderina*.
Fonte: Calmon & Rahal, 2007.

Em humanos, o gene *E-caderina* é localizado no cromossomo 16q22.1 (**Figura 10**), composto por 16 éxons, codifica um polipeptídeo com 728 aminoácidos e é considerado um gene supressor tumoral (Beavon, 2000; Fitzgerald & Caldas, 2004; Chan *et al.*, 2006; Calmon & Rahal, 2007). Pode ser inativado tanto por LOH, quanto por mutações ou hipermetilação (Panani, 2008).

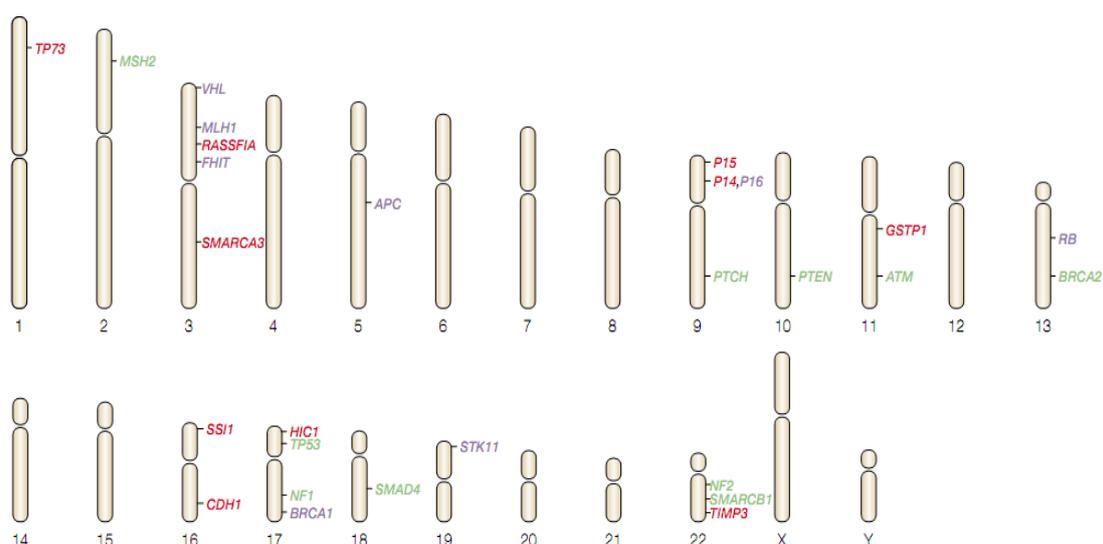


Figura 10 - Representação da localização no mapa do genoma humano dos principais genes envolvidos no desenvolvimento de câncer. Observar a localização do gene *CDH1* no cromossomo 16. Fonte: Jones & Baylin, 2002.

Uma diminuição da expressão de *E-caderina* é encontrada tanto em câncer gástrico como em outros tipos de cânceres, e está correlacionada com ganho de habilidade infiltrativa e de metástase (Chan, 2006; Panani, 2008). Há evidências ainda que suportam a teoria de que a *CDH1* não desempenharia função só na adesão celular, mas também teria participação na sinalização intracelular, contribuindo para o crescimento tumoral (Chan, 2006). Estudos demonstram que alterações na caderina afetam a via Wnt de sinalização (Bienz & Clevers, 2000; Polakis, 2000; Cavallaro & Christofori, 2004; Chan, 2006; MacDonald *et al.*, 2009) (**Figura 11**).

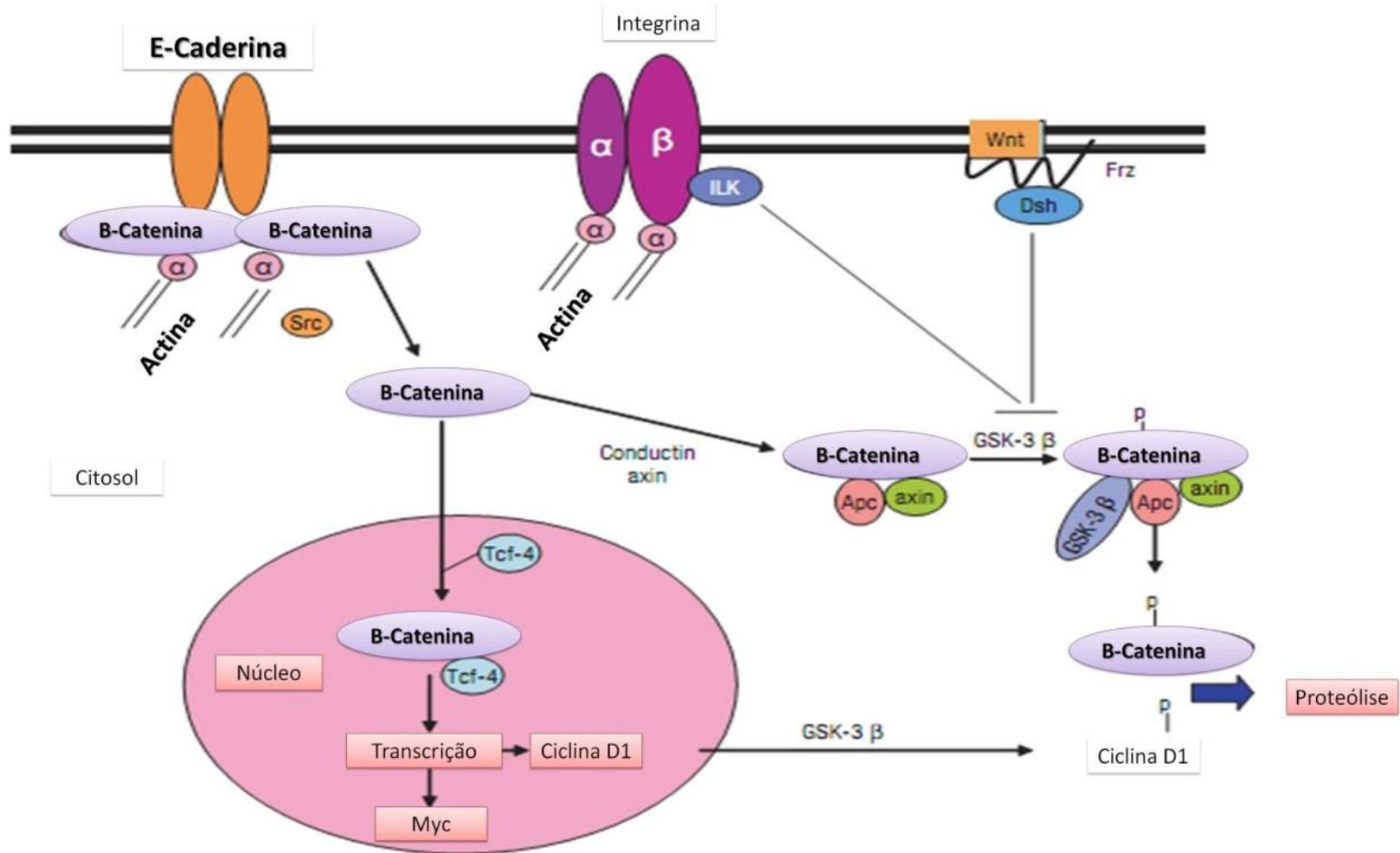


Figura 11 - Via Wnt de sinalização. Fonte (modificada): Cervantes *et al.*, 2007

Alterações somáticas neste gene são as mais freqüentes em tumores gástricos do tipo difuso e alterações na linhagem germinativa são associadas com o tipo familiar deste mesmo subtipo histológico, o qual apresenta um perfil histológico consistente com a perda da adesão célula-célula (Cleton-Jansen, 2002; Nakamura *et al.*, 2002; Suriano *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2005; Cervantes *et al.*, 2007) (**Figura 6**).

Frequentemente a perda da expressão deste gene deve-se a mutações ou mesmo a deleções do mesmo (Stock & Otto, 2005). Outro mecanismo que vem sendo largamente estudado é a hipermetilação do promotor do gene, sendo correlacionado com uma diminuição da expressão do mesmo levando ao desencadeamento do câncer gástrico (Tamura *et al.*, 2000; Graziano *et al.*, 2004; Stock & Otto, 2005; Liu *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2010; Borges *et al.*, 2010).

Esta hipermetilação do gene em câncer gástrico resulta no desenvolvimento do modelo dos dois passos de Knudson para o gene *CDH1* em carcinomas gástricos: o primeiro alelo do gene poderia ser inativado através de mutações genéticas ou mesmo deleção e o segundo alelo então seria silenciado através da metilação do promotor (Grady *et al.*, 2000; Park, 2010).

Observou-se também que havia um aumento na taxa de metilação do gene *CDH1* a medida que ocorria o avanço na progressão tumoral (Vauhkonen *et al.*, 2006; Oue *et al.*, 2006; Park, 2010). Estudos de padrão de metilação confirmam que a freqüência de hipermetilação do promotor do *CDH1* em amostras de câncer gástrico são normalmente superiores a 90% (Graziano *et al.*, 2004; Leal *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010).

Além das alterações que levam a inativação do gene, é relatado um polimorfismo no promotor do gene *CDH1* na posição -160 que estaria envolvido na diminuição da transcrição do gene *in vitro*. Nesta posição podem aparecer resíduos de citosina (C) ou de adenina (A)

(Liu *et al.*, 2006). Comparações entre a variante A demonstram uma diminuição da eficiência de transcrição em 68% quando comparada com a variante C. Este polimorfismo também foi associado como um marcador genético de susceptibilidade ao câncer (Nakamura *et al.*, 2002; Graziano *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2010). Um estudo de meta análise indica fenótipo variável entre asiáticos e caucasianos (Gao *et al.*, 2008)

Portanto, a análise dos padrões de metilação do gene *CDH1* desde as fases pré-neoplásicas até a instalação do cancer em si faz-se necessário para se elucidar em qual estágio há a perda da função do gene.

1.6 MODELOS ANIMAIS

Modelos animais tem se demonstrado valiosas ferramentas nos estudos acerca da carcinogênese. Nas últimas décadas, inúmeros esforços foram combinados para se obter o máximo de informações sobre a patogênese do câncer gástrico e quais são suas etapas pré neoplásicas, além de quais fatores influenciam diretamente em sua instalação e progressão. Alguns desses estudos foram feitos utilizando roedores como modelo experimental, mas o tamanho de seus órgãos impossibilita realizar procedimentos de coleta como coleta de sangue e diagnóstico de imagem demonstrando o desenvolvimento da doença (Tsukamoto *et al.*, 2007). Vale ressaltar que o uso de roedores é muito útil para o teste em larga escala de potenciais carcinógenos, devido ao baixo custo de manutenção desses animais (Ushijima & Sasako, 2004; Takayama *et al.*, 2008).

Os primatas não humanos por sua vez constituem excelentes modelos experimentais para os casos em que se querem avaliar a instalação e progressão dos tumores gástricos. Estes animais possuem proximidade evolutiva e filogenética aos seres humanos, possuindo similaridade anatômica, fisiológica e bioquímica muito maior do que os roedores. O tamanho de seus órgãos também confere uma vantagem para este tipo de experimento, pois permitem a realização de procedimentos de coleta de sangue, biópsias e exames de endoscopia tantas vezes forem necessárias no mesmo animal em diferentes períodos de tempo. Comparados aos roedores, a incidência de tumores esporádicos é baixa. E a longevidade desses animais permite que sejam expostos a carcinógenos por um longo período, comparável aos seres humanos. As desvantagens são óbvias: os custos de manutenção são elevados e o longo tempo para o surgimento dos primeiros resultados. Este tipo de modelo experimental – combinado ao uso de carcinógenos químicos para induzir ao câncer gástrico – vem sendo estabelecido pelo *National Cancer Institute* (NIH) dos Estados Unidos e pelo *National Cancer Research Institute* do Japão (Takayama *et al.*, 2008).

Dentre os carcinógenos químicos capazes de induzir tumores gástricos em modelos experimentais está o N-Metil-N-nitrosurea (MNU) (**Figura 12**). Este agente é capaz de provocar alterações genéticas e epigenéticas levando a alterações neoplásicas. É um conhecido carcinógeno que não necessita de ativação metabólica agindo diretamente sob o organismo (Swan & Magee, 1968; Budán *et al.*, 2008).

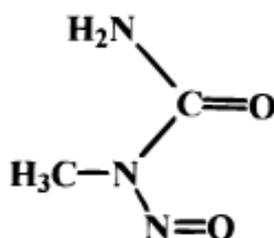


Figura 12 - Estrutura química do MNU (N-Metil-N-nitrosurea).

Fonte: Budán *et al.*, 2008.

O MNU pertence a classe de compostos conhecidos genericamente de N-nitrosamidas, que são instáveis em solução aquosa, especialmente em $\text{pH} > 5$. É improvável que sejam encontradas MNU ou outras nitrosamidas em concentrações apreciáveis em alimentos ou bebidas. Entretanto, é possível que estes compostos sejam formados no estômago *in vivo* de humanos a partir de precursores ingeridos (como amidas e nitritos). Experimentos demonstram que pode haver formação de nitrosamidas (como o MNU) a partir de precursores amidas correspondentes é muito elevada em condições ácidas como as encontradas no estômago. O MNU pode ainda ser formado como produto do metabolismo da creatinina (**Figura 13**) (Sen *et al.*, 2000). Devido haver a probabilidade de formação de MNU a partir de amidas e nitritos, a ingestão de carnes curadas e alimentos salgados torna-se um fator ambiental predisponente ao cancer, principalmente o de estômago (Rock *et al.*, 2000; Liu & Russel, 2008).

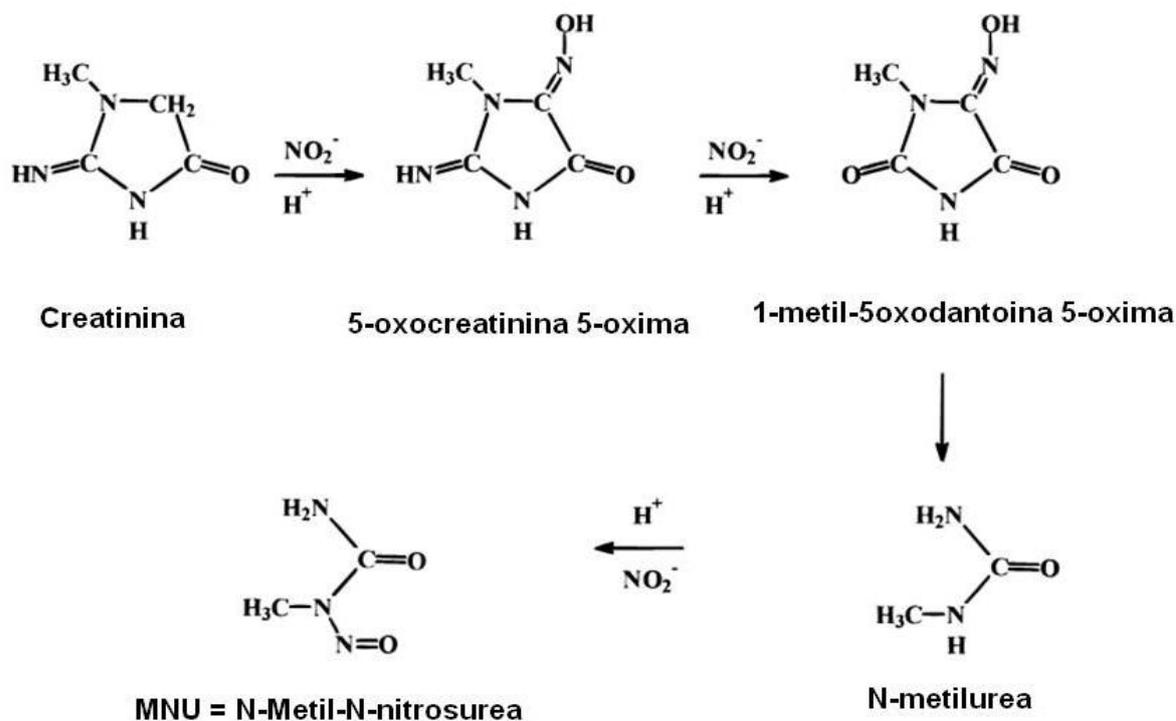


Figura 13 - Reação de formação de MNU a partir da Creatinina.
 Fonte: Sen *et al.*, 2000.

A nível molecular, o MNU reage com a guanina do DNA formando O⁶-metilguanina. A alquilação na posição O6 da guanina é associada à formação de mutação do DNA nos cânceres, como a transição de pares de guanina-citosina e de adenina-timina na mutação no gene *K-ras* ou no *TP53*, que ocorre porque guanina alquilados são reconhecidas como adeninas durante a replicação do DNA (Esteller, 2000; Budán *et al.*,2008).

Devido às características supracitadas, o MNU tem sido utilizado como carcinógeno em modelos experimentais (Uwagawa *et al.*, 1991; Sugiyama *et al.*, 1998; Crallan *et al.*, 2006; Tomita *et al.*, 2010).

Sendo assim, a indução pelo MNU de lesões pré-neoplásicas semelhantes as que ocorrem antes do desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (Tsukamoto *et al.*,2007) em primatas não humanos, permite que sejam coletadas amostras de tecido gástrico de cada estágio de desenvolvimento da doença e caracterizar quais as alterações genéticas e epigenéticas presentes.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de metilação e expressão do gene *CDH1* em amostras de mucosa gástrica – nos diferentes estágios da patogênese do câncer de estômago – em modelo experimental desenvolvido em primatas da espécie *Cebus apella*.

1.7.2 Objetivos específicos

- Estabelecer modelos de carcinogênese gástrica *in vivo* a partir da inoculação de MNU;
- Caracterizar o promotor do gene *CDH1* para *Cebus apella*;
- Avaliar o perfil de expressão do gene *CDH1* nos diferentes estágios do processo carcinogênico induzido por MNU em primatas da espécie *Cebus apella*;
- Avaliar o perfil de metilação do gene *CDH1* nas mesmas amostras acima;
- Comparar o perfil de expressão com o perfil de metilação do gene *CDH1* nos diferentes estágios do processo carcinogênico induzido por MNU em primatas da espécie *Cebus apella*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Pará (Parecer MED002-10). Previamente a este trabalho, seis primatas adultos da espécie de *Cebus apella* foram tratados com MNU (N1517 Sigma-Aldrich, USA) durante dois anos e meio. Os animais tinham entre seis e sete anos e pesavam entre 2,7 e 3,6 kg, sendo considerados saudáveis ao início do estudo após uma avaliação veterinária. Durante todo o tempo de tratamento com a droga, ficaram sob os cuidados do Centro Nacional de Primatas (CENP), identificados por microchips, submetidos a uma dieta balanceada, não enriquecida com cloreto de sódio e pesados diariamente.

Os animais foram tratados por 940 dias com doses diárias de MNU na dosagem de 16 mg/kg, além de ser oferecido também diluído em água em vasilhames protegidos da luz. Exames periódicos de endoscopia com biópsia gástrica e ultrassonografia (dias 0, 90, 120, 300 e 940) foram realizados ao longo do tratamento, para monitoramento. As amostras coletadas de biópsia foram então submetidas à análise histopatológica a fim de se avaliar o grau de malignidade.

Após a obtenção das amostras de biópsia e da análise histopatológica, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de biologia molecular para que fosse realizada a extração do DNA.

O DNA foi obtido através da utilização do *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Mainz, Rheinland-Pfalz, Alemanha) seguindo as instruções

do fabricante. Após a extração, foi realizada a quantificação no NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 (Thermo Scientific).

2.1.1 Seqüência genômica

A sequencia genômica para a região promotora do gene *CDH1* de *C. apella* foi obtida a partir de iniciadores desenhados utilizando-se regiões conservadas da sequencia de *Callithrix jacchus* (acesso em Ensembl pelo código ENSCJAG00000015504).

Primeiramente realizou-se uma PCR somente com amostras de mucosa gástrica normal. Esta reação possui volume final de 25 µl contendo: 50 ng de DNA molde, 10 pM de cada um dos iniciadores, 0,20 mM de dNTP, 2,5 mM MgCl₂ e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™). Os iniciadores e as condições de PCR utilizados são demonstrados na Tabela 1. As amostras utilizadas nesta etapa foram somente as de mucosa normal.

Tabela 1 – Iniciadores e condições da PCR para obtenção da seqüência sequencia promotora parcial do gene *CDH1* de *C. apella*.

Iniciador	Tamanho fragmento esperado	Temperatura anelamento	Quantidade de ciclos
<u>Foward:</u> ACCGGCGGGGCTGGGATTCGAA	403 pb	60 °C	40
<u>Reverse:</u> CGCGGAGTGGCTGCGGCTCAAA			

pb= pares de base

Após a PCR, os fragmentos obtidos foram então seqüenciados utilizando o seqüenciador automático ABI377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems).

As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa BioEdit (Hall, 2011) juntamente com amostras de *CDH1* de humanos (*Genebank* NT_010498) e de *C. jacchus*. As análises da região promotora foram feitas utilizando os programas *Transcription Element Search System* (TESS - Chug & Overtin, 1998) e *Promoter Scan* (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) para a identificação de sítios de ligação de fatores de transcrição.

2.1.2 Modificação por Bissulfito

A modificação por bissulfito consiste na conversão de todas as citosinas não metiladas em uracilas, com a preservação das que estiverem metiladas. Desta forma torna-se possível análises do padrão de metilação das amostras em questão. O DNA de todas as amostras de tecido coletados e todas elas passaram por este processo.

Resumidamente, 2 µg do DNA genômico foram desnaturados através de um tratamento com NaOH e modificado com bissulfito de sódio a 3M por 16h em banho-maria à 54°C. Após o período de incubação, as amostras foram purificadas com o kit *Wizard DNA purification resin* (Promega), tratado com NaOH novamente, precipitado com etanol e ressuspendido em 40 µl de água. Após esta etapa, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C protegidos da luz.

2.1.3 PCR metilação específica (MSP)

A técnica de MSP inicia-se a partir de um DNA modificado pela técnica do bissulfito que é então submetido a uma PCR com iniciadores específicos que contem ao menos um sítio CpG.

No presente estudo, a reação de PCR possuía volume final de 25µl que continham: 2µl de DNA modificado, 10 pM de cada iniciadores, 0,20 mM de dNTP, 2,5 mM MgCl₂ e 0,5 U de Taq DNA polymerase. Os iniciadores para MSP foram desenhados a partir da sequencia genômica de *CDH1* para *C. apella* obtidas anteriormente no presente trabalho, utilizando-se o programa *Methyl Primer Express Software v1.0* (Applied Biosystem). Os iniciadores utilizados são demonstrados na Tabela 2- **Iniciadores utilizados em cada reação de MSP** Para cada amostra foi realizada uma reação com o par de iniciador metilado e outra com o par de iniciador não metilado. A PCR foi realizada utilizando a estratégia de “*Hot Start*”, iniciando-se com um ciclo de 95°C por 5 minutos antes da adição de Taq DNA polimerase (Invitrogen™). Após este estágio, seguiu-se com 40 ciclos de 95°C por 30 segundo, 54°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e, por último, uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 2- Iniciadores utilizados em cada reação de MSP

Iniciador		Seqüência
Metilado	<i>Foward</i>	5' AGGGTTATCCGTTTATGC 3'
	<i>Reverse</i>	5' CCCC GTACCGCTAATTA ACT 3'
Não metilado	<i>Foward</i>	5' GAGAGGGTTATTGTGTTTATGT 3'
	<i>Reverse</i>	5' CCCC CATACCACTAATTA ACT 3'

Os produtos das PCRs foram então visualizados em gel de agarose a 3%. Surgimento de banda no gel na reação com par de iniciador metilado indica amostra metilada. O inverso indica amostra não metilada.

2.1.4 Imunohistoquímica

Com a finalidade de se avaliar a expressão do gene da caderina em cada uma das amostras, foi realizado testes de imunohistoquímica. A detecção da proteína e-caderina nas células tumorais utilizou anticorpo primário da marca Zymed®. O método imunohistoquímico adotado foi o da estreptavidina-biotina-peroxidase descrito por Hsu *et al.*(1981), com modificações.

Em primeiro lugar, foi realizada a desparafinação e hidratação das lâminas. Estas eram colocadas em estufa pré aquecida a 60°C, durante 120 minutos. Em seguida foram mergulhadas em xilol aquecido a 60°C por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas passaram por uma bateria de xilol (I, II, III); álcool etílico 100% (I, II e III); álcool etílico 80%, permanecendo 1 minuto em cada passagem. No final as lâminas foram passadas em água por 10 minutos.

O segundo passo consistia em uma recuperação antigênica das lâminas, durante o qual foi utilizado tampão citrato 10mM pH 6, ±99 °C em forno de microondas, por 15 minutos. Após esse período as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos.

Em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado mergulhando-se as lâminas em um borel com peróxido de hidrogênio a

3%. Os cortes histológicos foram então cobertos por anticorpo primário diluído (1:60) e as lâminas incubadas (4-8°C) por 16 horas. A detecção foi realizada pelo sistema LSAB+ (DakoCytomation®), seguindo as recomendações do fabricante. A revelação pelo sistema DAB+ (3,3'-*diaminobenzidine*) (DakoCytomation®), também foi realizada seguindo recomendações do fabricante.

Para a contra-coloração, as lâminas foram mergulhadas em um borel contendo Hematoxilina de Harris a 40% seguida pela desidratação das lâminas que foram passadas em gradiente água/álcool/xileno. As lâminas foram montadas com laminulas e Bálsamo do Canadá.

O parâmetro de normalidade foi definido utilizando amostras de tecido gástrico não-tumoral fixadas em formamida e incluídas em parafina obtidas dos animais no início do tratamento com MNU.

3 RESULTADOS

3.1 CARCINOGENESE EM *Cebus apella*

Todos os seis primatas utilizados no presente trabalho desenvolveram lesões pré-neoplásicas, porém somente em um foi observada a presença de tecido tumoral gástrico do tipo intestinal. Os demais macacos faleceram antes do término do experimento, muito provavelmente devido à intoxicação por MNU, uma vez que apresentaram sintomas característicos como náuseas e vômitos excessivos.

Como já relatado, em cada um dos exames de acompanhamento dos animais foram coletadas amostras de tecido da mucosa gástrica. No total obtivemos 20 amostras classificadas de acordo com as análises histopatológicas em mucosa normal, gastrite, gastrite atrófica, metaplasia e tumoral do tipo intestinal (Tabela 3)

Tabela 3 - Distribuição das amostras segundo o tipo histológico

TIPO DE TECIDO	NÚMERO AMOSTRAL
Mucosa Gástrica Normal	06
Gastrite	06
Gastrite atrófica	05
Metaplasia	02
Tumoral (tipo intestinal)	01
Total de amostras	20

3.2 REGIÃO PROMOTORA DE *CDH1* EM *Cebus apella*

Devido à ausência na literatura da seqüência promotora de *CDH1* para *C. apella*, foram desenhados iniciadores baseados nas regiões conservadas compartilhadas entre duas espécies de primatas: *C. jacchus* (Ensembl ENSCJAG00000015504) e *Homo sapiens* (Genebank NT_010498). Na **Figura 14** observamos a região flanqueada pelos iniciadores na seqüência de *C. jacchus*.

```
1 ACCGGCGGGGCTGGGATTCGAAACCCAGTGGATCGATCCCATAACCCATCT 50
51 AGACCCTAGCAACTCCAGACTGGTGGGTACCCGGTCTGCCGGAGGCCGAG 100
101 GGGCGGGACCGCGGGCGGGCCGTCATTCCCGCGGCGGAGGGTTCCGTGCT 150
151 GCTGATTGGCCGCGGCCGGCAGGTGCACCCTCAGCCAATCAGCGGAGCCG 200
201 GAGGCGGTGCCTCCGAGGCTCACCTGGCGGGCCGCGCGCCGCCCTCTCA 250
251 GTGTCGTCGGAGCCTCAAAGCACCTGTGAGCTCGCGAAAGTCCGTTTCAGA 300
301 CTCCAGCCCCGGCCCAGACCGGCCCGACCCGACCGCACCCGGCCCCCGCCC 350
351 TTGCTCGGCGTCCCCGGCCGACCATGGGCCCTTTGAGCCGCAGCCACTCC 400
401 GCG 403
```

Figura 14 - Seqüência de *C. jacchus* (Ensembl ENSCJAG00000015504) flanqueada pelos iniciadores desenhados. Em vermelho os iniciadores.

Comparando-se a seqüência flanqueada pelos iniciadores de *C. jacchus* com a de *Homo sapiens* (Genebank NT_010498), observa-se que a similaridade entre as amostras é de cerca de 84%, com presença de somente 24 *gaps*, demonstrando que se trata de uma área conservada do gene (**Figura 15**)

C. jacchus	1	ACCGGCGGGGCTGGGATTCGAA	CCAGTGG-AT-----C--G-A--TCCCATAACCCAT	48
Humano	22385141	ACCGGCGGGGCTGGGATTCGAA	CCAGTGGAAATCAGAACCCTGCAGGTCCCATAACCCAC	22385200
C. jacchus	49	CTAGACCCTAGCAACTCCAGACTGGTGGGTACCGGTCTGCCGAGGCCGAGGGGCGGGA	108	
Humano	22385201	CTAGACCCTAGCAACTCCAGGCTAGAGGGTCACC-G-C-GTC-TATG-CGA--GGCCGG-	22385252	
C. jacchus	109	CCGCGGGCGGGCCGTCA-TTCC-CGCGGGCAGGGGTCCCGTGTCTGATTGGCCGCGGC	166	
Humano	22385253	--GTGGGCGGGCCGTCACTCCGCCCTGGGGAGGGGTCCGCGCTGTGATTGGCTGTGGC	22385310	
C. jacchus	167	CGGCAGGTGCACCCTCAGCCAATCAGCGGAGCCGAGGCGGTGCCCTCCGAGGCTCACCTG	226	
Humano	22385311	CGGCAGGTGAACCCTCAGCCAATCAGCGGTACGGGGGCGGTGCCCTCCGGGCTCACCTG	22385370	
C. jacchus	227	GCGGCCGCGCGCCGCCCTCTCAGTGTCTCGGAGCCTCAAAGCACCTGTGAGCTCGCG	286	
Humano	22385371	GCTGCAGCCACGCACCCCTCTCAGTGGGTCTCGGAACTGCAAAGCACCTGTGAGCTTGGC	22385430	
C. jacchus	287	AAAGTCCGTTCCAGACTCCAGCCCGGCCAGACCCGCCCCGACCCGACCCGACCCGGCCCCC	346	
Humano	22385431	GAAGTCCGTTCCAGACTCCAGCCCGCTCCAGCCCGGCCGACCCGACCCGACCCGGCGCCT	22385490	
C. jacchus	347	GCCCTTGCTCGGCGTCCCCGGCCAGCCATGGGCCCTTTGAGCCGACCCACTCCGCG	403	
Humano	22385491	GCCCTCGCTCGGCGTCCCCGGCCAGCCATGGGCCCTTTGAGCCGACCCACTCCGCG	22385547	

Figura 15 - Comparação entre seqüência de *CDH1* de *C. jacchus* e Homo sapiens. Nos quadros em vermelho os iniciadores utilizados.

O fragmento obtido do promotor de *CDH1* de *C. apella* é representado na **Figura 16**. Este fragmento, obtido através dos iniciadores descritos anteriormente, possui 342pb e 30 sítios CpGs.

1	TAGTACACTAGCAACTACCTAGGCTGAGAGGGTCA	CGCGTCTATGCGAG	50
51	GCCGGGTGGGCGGGCCGTCAGCTCCGCCCTGGGGAGGGGTCCGGCGTGT	100	
101	GATTGGCTGTGGCCGGCAGGTGAACCCTCAGCCAATCAGCGGTACGGGGG	150	
151	GCGGTGCCTCCGGGGCTCACCTGGCTGCAGCCACGCACCCCTCTCAGTG	200	
201	GCGTCCGGAAC TGCAAAGCACCTGTGAGCTTTGCGGAAGTCAGTTCA	250	
251	CAGCCCGCTCCAGCCCGGCCGACCCGACCCGACCCGGCGCCTGCCCTCG	300	
301	CTCGGCGTCCCCGGCCAGCCATGGGCCCTTTGAGCCGCAGC	342	

Figura 16 – Fragmento do promotor de *CDH1* de *Cebus apella* obtido a partir de iniciadores desenhado baseado em seqüências do mesmo gene da espécie *Calithrix jacchus*. Em amarelo são enfatizados os sítios CpGs.

A região obtida do promotor de *CDH1* de *C. apella* foi comparada com a seqüência de humano. A similaridade encontrada entre os fragmentos foi de 98%, com 4 *gaps* e 2 trocas de bases (**Figura 17**).

<i>C. apella</i>	1	TAGTACACTAGCAACTACCTAGGCTGAGAGGGTCACCGCGTCTATGCGAGGCCGGGTGGG	60
Humano	22385202	TAG-ACCCTAGCAACT-CC-AGGCT-AGAGGGTCACCGCGTCTATGCGAGGCCGGGTGGG	22385257
<i>C. apella</i>	61	CGGGCCGTCAGCTCCGCCCTGGGGAGGGGTCCGCGCTGCTGATTGGCTGTGGCCGGCAGG	120
Humano	22385258	CGGGCCGTCAGCTCCGCCCTGGGGAGGGGTCCGCGCTGCTGATTGGCTGTGGCCGGCAGG	22385317
<i>C. apella</i>	121	TGAACCCCTCAGCCAATCAGCGGTACGGGGGGCGGTGCCTCCGGGGCTCACCTGGCTGCAG	180
Humano	22385318	TGAACCCCTCAGCCAATCAGCGGTACGGGGGGCGGTGCCTCCGGGGCTCACCTGGCTGCAG	22385377
<i>C. apella</i>	181	CCACGCACCCCTCTCAGTGGCGTCGGAACTGCAAAGCACCTGTGAGCTTGCGGAAGTCA	240
Humano	22385378	CCACGCACCCCTCTCAGTGGCGTCGGAACTGCAAAGCACCTGTGAGCTTGCGGAAGTCA	22385437
<i>C. apella</i>	241	G TTCAGACTCCAGCCCGCTCCAGCCCGCCCGACCCGACCCGCGCCTGCCCTCG	300
Humano	22385438	G TTCAGACTCCAGCCCGCTCCAGCCCGCCCGACCCGACCCGCGCCTGCCCTCG	22385497
<i>C. apella</i>	301	CTCGGCGTCCCGGCCAGCCATGGGCCCTTTGAGCCGCAGC	341
Humano	22385498	CTCGGCGTCCCGGCCAGCCATGGGCCCTTTGAGCCGCAGC	22385538

Figura 17 – Comparação entre fragmentos de promotor de *CDH1* entre as espécies *C. apella* e Homo sapiens. Em ênfase as diferenças entre as espécies, sendo 4 *gaps* e 2 trocas de bases.

As análises da região promotora com os programas TESS e Scan Promoter revelaram que há inúmeros sítios de ligação a fatores de transcrição, sendo os principais destacados na **Figura 18**. Devido à alta similaridade entre as seqüências de humano e macaco podemos deduzir que, com a exceção do fator de transcrição Ap-2, todos os demais fatores de transcrição identificados ligam-se nas mesmas regiões nas duas seqüências. Além do que outros fatores de transcrição são prováveis de se ligar neste trecho, dentre eles podemos citar AREB6, Puf e CTF. Na região seqüenciada também identificamos a presença do sitio

CAAT Box, um sitio importante de reconhecimento para o inicio da transcrição.

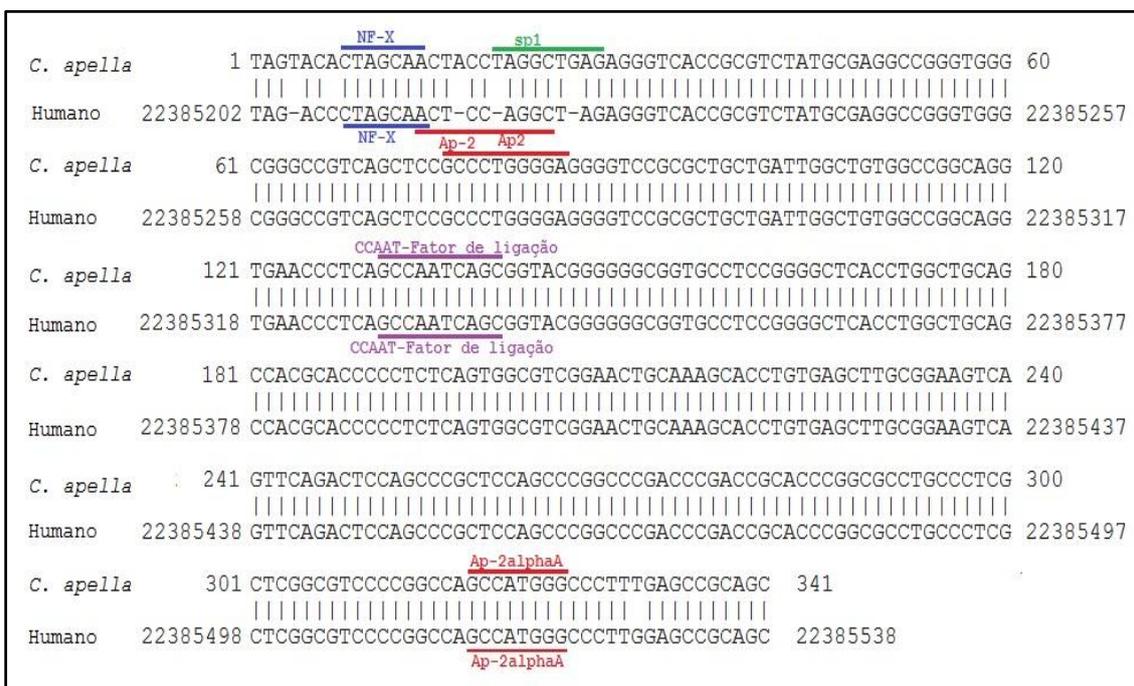


Figura 18 – Fragmentos de seqüencia do promotor de *CDH1* das espécies *C. apella* e *Homo sapiens*. Em destaque os sítios de ligação dos principais fatores de transcrição encontrados através dos programas TESS e Scan Promoter.

3.3 IMUNOHISTOQUÍMICA E MSP

Com a finalidade de verificar se o gene *CDH1* estava sendo expresso nas amostras obtidas, foi realizado ensaios de imunohistoquímica. Os resultados revelaram que a amostra tumoral foi a única dentre todas as analisadas, que não apresentou expressão do gene (Tabela 4).

Já a análise de metilação do promotor de *CDH1* foi feita de forma qualitativa através da técnica de MSP. De uma forma geral, as amostras demonstraram-se estar em sua forma não metilada para o

gene em estudo. A amostra tumoral do único macaco sobrevivente a todo o tratamento estava não metilada. Curiosamente, as amostras de um dos macacos, o qual sobreviveu até o desenvolvimento de uma gastrite atrófica, apresentava-se na forma metilada indicando um pior prognóstico.

Tabela 4 – Resultado das análises de imunohistoquímica (IHQ) e MSP.

Tipo tumoral	Quantidade amostras	Metiladas	Não metiladas	Resultado IHQ
Mucosa gástrica normal	6	1	5	Positiva
Gastrite	6	1	5	Positiva
Gastrite atrófica	5	1	4	Positiva
Metaplasia	2	1	1	Positiva
Tumoral	1	1	0	Negativa

Na **Figura 19** observamos um gel de agarose a 3% com a representação de duas amostras de cada tipo histológico coletado (à exceção do adenocarcinoma gástrico que só resultou em uma amostra) com o produto das PCRs com iniciadores metilados (M) e não metilados (UM). As amostras 1, 3, 5, 7 e 9 (M e UM) são do macaco que desenvolveu câncer gástrico. As amostras 2, 4 e 6 são do macaco que apresentou metilação do promotor de *CDH1* desde as amostras de mucosa normal.

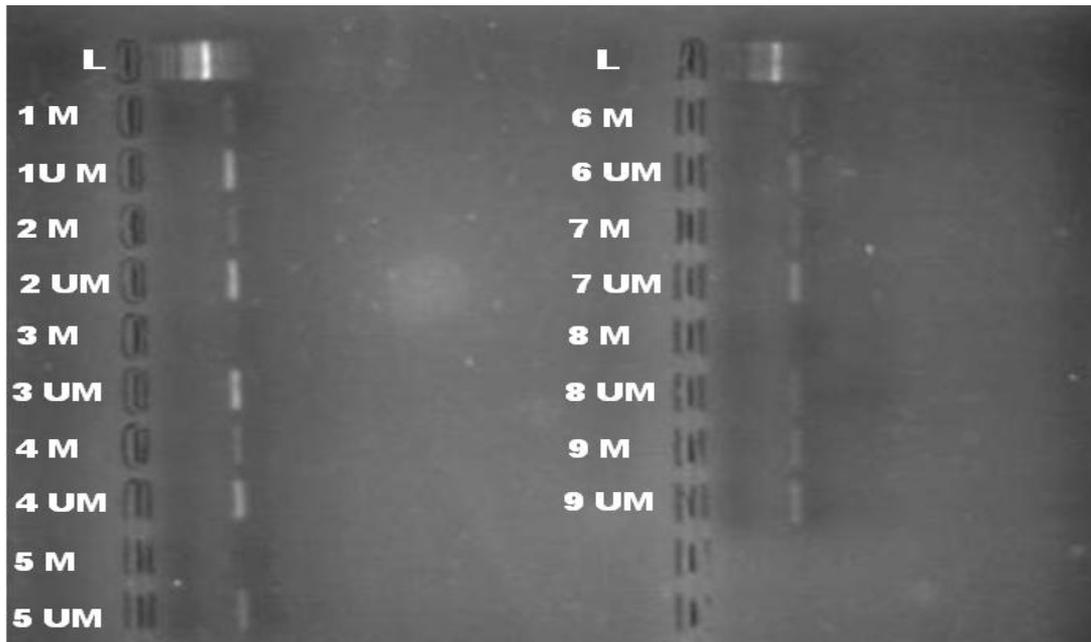


Figura 19 - Imagem gel de agarose a 3% com os resultados de MSP. Amostra 1 e 2: mucosa gástrica normal. Amostra 3 e 4: gastrite. Amostra 5 e 6: gastrite atrófica. Amostra 7 e 8: metaplasia. Amostra 9: adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal. As amostras 1, 3, 5, 7 e 9 pertencem ao mesmo macaco, assim como as amostras 2, 4 e 6. A amostra 8 pertence a um terceiro macaco. L=ladder; M=iniciador metilado; UM= iniciador não metilado.

4 DISCUSSÃO

Estudos com modelos animais proporcionam uma boa ferramenta para se tentar elucidar os mecanismos de patogênese das mais variadas doenças humanas a nível molecular e celular, incluindo o câncer. Com estes tipos de estudos é possível não só testar hipóteses sobre a origem de doenças, mas também desenvolver e testar novas terapias. O animal preferencialmente escolhido para estes estudos são os camundongos, por serem animais de pequeno porte e de fácil manuseio, que precisam de pouco espaço e possibilitam estudos em larga escala (Lieschke & Currie, 2007; Reis *et al.*, 2010).

Na área de pesquisa com modelos experimentais do câncer, há inúmeros modelos propostos para os mais variados tipos de câncer, como o de mama (Cowin *et al.*, 2005; Thorpe *et al.*, 2011), o do sistema urinário (Reis *et al.*, 2010) até o de estômago (Tsukamoto *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2011). Apesar de nestes estudos o animal largamente utilizado também ser o camundongo, estes animais oferecem desvantagens: não são filogeneticamente tão próximos dos humanos, seus sistemas e órgãos possuem diferenças anatômicas e bioquímicas quando comparados a humanos e suas dimensões impossibilitam o acompanhamento da evolução tumoral por meio de diagnósticos por imagem (Lieschke & Currie, 2001).

Diante destes fatores, se começou a utilizar primatas não humanos como modelo experimental para o estudo do câncer e de outras patologias que afetam os humanos. Estes animais oferecem algumas vantagens, como proximidade filogenética com os humanos, além de possuir grandes similaridades na anatomia, fisiologia, bioquímica e estrutura de sistemas e órgãos quando comparados aos

camundongos; o tamanho do animal possibilita exames de diagnóstico como endoscopia e até mesmo uma coleta de sangue para dosagens bioquímicas, por exemplo; há uma baixa incidência de tumores espontâneos quando comparado a camundongos; e a longevidade destes animais pode ser comparada a de humanos e possibilitam estudos a longo prazo. As desvantagens residem no alto custo dos estudos e no longo prazo para a obtenção de resultados (Takayama *et al*, 2008).

No presente trabalho, como dito anteriormente, utilizamos amostras de mucosa gástrica extraída de *C. apella*, induzidos à tumorigenese através da ingestão de MNU. Esta espécie oferece algumas vantagens para se trabalhar como modelo experimental: é um animal de fácil manuseio, além de possuir uma grande adaptabilidade e apesar de seu pequeno porte, permite que sejam realizados exames de diagnóstico por imagem. Esta última característica é de suma importância, pois permitiu o acompanhamento da evolução das lesões pré neoplásicas até o surgimento do tumor propriamente dito. O primeiro estudo estabelecendo um modelo de carcinogênese gástrica em *Cebus apella* foi por feito por Costa *et al.* (2011).

Existem outros trabalhos que utilizaram este mesmo *design* experimental, porém utilizando macacos do velho mundo. Como o de Takayama e colaboradores (2008) que submeteram primatas não humanos¹ a doses diárias 10mg/kg de MNU durante 10 anos para obter a formação tumoral. Em nosso experimento os macacos aqui utilizados receberam um tratamento com MNU durante 940 dias, com doses de 16mg/kg. O menor tamanho do *C. apella* em comparação aos macacos do velho mundo foi um importante fator para a obtenção rápida da amostra tumoral. Vale ressaltar que não houve infecção com outros agentes carcinógenos, como a *H. pilory*, como ocorreu em outros trabalhos que utilizam principalmente o gerbil ou esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) como modelo experimental (Watanabe *et al.*,

¹ Espécies utilizadas no estudo: *Rhesus*, *Cynomolgus* e *African Green*. (Takayama *et al.*, 2008)

1992; Sugiyama *et al.*, 1998; Kodama *et al.*, 2004; Kawazoe *et al.*, 2007).

Em estudos com modelos experimentais para o câncer outra variável importante é a escolha do carcinógeno que irá induzir a formação do tumor, pois existe uma grande variedade de carcinógenos que podem ser utilizados para a indução de câncer. Dentre eles o MNU é um conhecido agente cancerígeno pluripotente de atuação direta (Budán *et al.*, 2008). Faz parte do grupo de compostos nitrosos que tem sido associado ao câncer gástrico e, teoricamente, pode ser formado no interior do estômago a partir de precursores ingeridos na alimentação (Sen *et al.*, 2000). A administração oral desta droga pode levar a formação de tumores em todo o tubo digestivo, desde a cavidade oral, mas principalmente no estômago (Tsukamoto *et al.*, 2007), por este motivo ele foi o agente escolhido para ser utilizado neste experimento (Costa *et al.*, 2011).

O câncer gástrico pode ser dividido em tipo intestinal e tipo difuso segundo a classificação de Lauren (1965). O tipo intestinal tem por característica a formação de estágios pré-neoplásicos, o que não ocorre no tipo difuso. O MNU leva ao aparecimento do tipo intestinal (Tsukamoto *et al.*, 2007). De fato foi o que se pode observar neste experimento, pois todos os macacos tratados com MNU desenvolveram as seguintes lesões: os seis desenvolveram gastrite, cinco deles apresentaram displasia e apenas dois desenvolveram metaplasia. Somente um dos macacos sobreviveu a todo o tratamento e desenvolveu um tumor. O interessante é que as lesões apresentadas pelos animais eram muito semelhantes às descritas em humanos como sendo as precursoras na formação do tumor de estômago do tipo intestinal e na mesma ordem de aparecimento (Correa, 1992). Foram coletadas amostras de biopsia da mucosa gástrica de cada estágio de desenvolvimento das lesões, incluindo desde a mucosa gástrica normal até o tumor propriamente dito. Isto nos possibilitou fazer análises do promotor do gene *CDH1* em cada um destes estágios.

Porém, ainda não havia disponível na literatura a seqüência do promotor de *CDH1* de *C. apella*. A espécie filogeneticamente mais próxima ao *Cebus* que possuía a sequência de *CDH1* disponível era a de *Callithrix jacchus*. E foi a partir da identificação de regiões conservadas desta sequência depositada na literatura que foram confeccionados os iniciadores para o seqüenciamento de um fragmento do promotor do gene para *C. apella*. Desta maneira obtivemos o primeiro fragmento do gene *CDH1* para a espécie em questão (**Figura 16**).

As análises deste fragmento revelaram uma grande similaridade entre a seqüência de *C. apella* e a de humanos (**Figura 17**) indicando se tratar de um trecho conservado da região promotora deste gene. Outra importante observação foi a alta densidade de sítios CpG's no fragmento seqüenciado levando a confirmação da existência de um forte controle epigenético neste ponto (**Figura 16**). Esta grande densidade de sítios CpG's é condizente com outros trabalhos da literatura. Como o de Borges *et al.* (2010) onde encontraram 22 sítios CpG's nesta mesma região deste fragmento analisado *CDH1* em amostras de adenocarcinoma gástrico. Já Leal *et al.* (2007) analisaram 12 sítios. E em ambos os estudos, houve uma correlação positiva entre a quantidade de CpG's, o padrão de metilação do promotor e perda de função do gene.

Em uma análise mais detalhada da região amplificada foram encontrados também vários sítios conservados que servem para a ligação de fatores de transcrição neste fragmento. Os principais encontrados foram o NF-X, o sp1, o Ap-2 e o CCAAT Box (**Figura 18**). Estas mesmas regiões também são relatados como importantes sítios de reconhecimento e ligação de fatores de transcrição em humanos (Peinado *et al.*, 2004).

Em 1991, Behrens *et al.*, isolaram o promotor de *CDH1* de camundongo. Nesta caracterização inicial foi demonstrado que antes do TATA Box existiam inúmeros elementos regulatórios em potencial,

incluindo o *CCAAT Box* (-65), uma região rica em GC (-30 a -58) e um elemento palíndromo (-70 a -90). Nossos resultados se mostraram em conformidade com estes dados descritos em camundongos. Ainda baseado em dados da literatura a presença do sítio *CCAAT* proximal e da região rica em CG são essenciais não só para a expressão basal da caderina, mas também são importantes para o reconhecimento e ligação dos fatores de transcrição AP2 e Sp1, além das proteínas de ligação ao *CCAAT* (Behrens *et al.*, 1991; Hennig *et al.*, 1996).

Dentre os fatores de transcrição com sítios encontrados no fragmento do promotor de *CDH1* de *C. apella* mais amplamente estudado está o Sp1. Este pertence a uma família de fatores de transcrição que se liga a regiões de promotores ricas em GC's, regulando inúmeros processos celulares (Wierstra, 2008, Tan & Khachigian, 2009). Sua descrição preliminar ocorreu na análise do genoma do vírus 40 de símios, onde ativava seletivamente promotores de genes iniciais e tardios sem com isso influenciar os demais genes (Dyran & Tjian, 1983).

Desde então, tem sido demonstrado que o Sp1 regula a expressão de vários genes envolvidos no controle de diversos processos celulares como o crescimento celular, a apoptose (Kaczynski *et al.*, 2003), a diferenciação (Opitz & Rustgi, 2000), angiogênese (Mazure *et al.*, 2003) e a resposta imune (Jones *et al.*, 1986), dentre outros. Além disso, Sp1 tem sido relacionado à tumorigênese através da regulação da transcrição de genes relacionados com o crescimento e proliferação celular (Black *et al.*, 2001). Recentemente, Hsu *et al.* (2011), demonstraram que a expressão de Sp1 é diminuída durante a evolução de tumores de pulmão e que baixas taxas de expressão estão correlacionadas com um pobre prognóstico para pacientes com adenocarcinoma de pulmão. Entretanto, não encontramos dados na literatura correlacionando este fator de transcrição com câncer gástrico ou com o gene *CDH1*. Embora, devido a característica multifatorial da regulação do gene da caderina, a influencia de Sp1 na sua regulação

não pode ser descartada sem estudos mais aprofundados (Reinhold *et al.*, 2010). De fato, o controle transcricional do *CDH1* através de fatores de transcrição vem sendo reportado como um importante mecanismo de controle da expressão (Liu *et al.*, 2005b, Reinhold *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura a metilação do promotor é considerada como a principal fonte de inativação do gene *CDH1* durante a evolução tumoral (Wang *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2008; Reinhold *et al.*, 2010). Outros importantes fatores de inativação são mutação somática e repressão transcricional também são relatados (Strathdee, 2002; Yang *et al.*, 2005; Caldeira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2009; Borges *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2010).

Para se averiguar o perfil ou taxa de metilação da região promotora das amostras de DNA, várias técnicas são propostas. Porém, uma das técnicas mais utilizadas é a de MSP, por isto foi a escolhida para o nosso estudo. Esta técnica é utilizada para detectar a ocorrência ou não de metilações nas ilhas CpG's da região promotora baseada no anelamento de iniciadores diferentes durante a PCR. Trata-se de uma técnica qualitativa, de sensibilidade apreciável, em que se define o *status* da amostra: se metilado ou não metilado (Herman *et al.*, 1996; Laird, 2003; Shames *et al.*, 2007).

Os nossos resultados de MSP revelaram que houve predominância do padrão não metilado nas amostras analisadas para o promotor de *CDH1*. Ao se confrontar estes resultados com os dados obtidos pelas análises de imunohistoquímica, observamos que houve uma correlação entre os padrões de metilação apresentado e a expressão da proteína. A amostra tumoral por sua vez, apresentou-se metilada para *CDH1* e sem expressão da proteína caderina.

A não expressão da caderina em amostra tumoral é relatada na literatura. Sun *et al.* (2012) analisaram a expressão da e-caderina, por meio de ensaios de imunohistoquímica, de 58 amostras de tecido de câncer gástrico, 40 de lesões pre-neoplásicas e 42 de gastrite atrófica.

Os resultados deste estudo demonstraram que só havia expressão da proteína em menos de 30% das amostras tumorais, dado que corrobora os obtidos no presente estudo. Aparentemente, quanto maior o tamanho tumoral, o comprometimento tecidual e de linfonodos, menor é a expressão da caderina (Sun *et al.*, 2012).

Nossas análises sugerem que a metilação do gene *CDH1* desempenha papel importante na tumorigênese gástrica em *C. apella*. E, partindo-se da similaridade entre as seqüências, podemos sugerir que o mesmo ocorre em humanos. Esta metilação do promotor da caderina leva a uma inativação do gene e estabelecimento de adenocarcinomas gástricos. A hipermetilação do promotor da caderina é relatada em vários artigos associado ao desenvolvimento do câncer gástrico (Borges *et al.*, 2010; Pinheiro *Et al*, 2010; Kague *et al.*, 2010; Balassiano *et al.*, 2011)

Da mesma forma como encontradas em amostras de mucosa gástrica de um dos macacos do presente estudo, a metilação da caderina foi identificada em lesões iniciais de estágios pré neoplásicos, e em pelo menos 31% de amostras de mucosa gástrica com gastrite crônica (Chan *et al*, 2003b). É relatado na literatura ainda uma correlação entre infecção por *H. pylori* e metilação de *CDH1* com consequente instalação de câncer gástrico (Quian *et al.*, 2008)

Vários estudos apontam a importância da caderina no desenvolvimento no câncer gástrico. Chan *et al.*. (2003a)relataram uma desregulação do complexo e-caderina-catenina na maioria as lesões pré neoplásicas de pacientes com adenocarcinoma gástrico analisado . Alterações na linhagem germinativa de *CDH1* são associados ao câncer gástrico difuso hereditário (Guilford *et al.*, 2010; Mimata *et al.*, 2011; Corso *et al.*, 2011).

De fato, a desregulação da caderina, uma das principais proteínas envolvida no processo de adesão celular, propicia a capacidade de invasão tumoral de tecidos e órgão próximos e até

mesmo mais distantes (Huiping *et al.*, 2001). Estudos das alterações deste gene se fazem necessário para se elucidar todos os fatores envolvidos nesta desregulação e principalmente, em qual ponto essas alterações se tornam irreversíveis para a tumorigênese. Estudos como o apresentado aqui propiciam este entendimento e abrem novos caminhos de pesquisa.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- O primata não humano da espécie *C. apella* apresenta-se como um excelente modelo experimental para a carcinogênese gástrica;
- A dosagem de MNU fornecida aos animais (16 mg/kg de peso) mostrou-se a ideal para o surgimento de adenocarcinoma em menor tempo do que o relatado na literatura;
- A região promotora do gene da *e-caderina* em *C. apella* possui uma alta similaridade com a seqüência de *Homo sapiens*, ratificando a excelência do modelo experimental utilizado;
- A grande concentração de ilhas CpG's no promotor do gene *CDH1* junto com a presença de vários sítios de reconhecimento e ligação de fatores de transcrição, indicam que este gene está sob um forte controle epigenético;
- A não expressão da proteína caderina no adenocarcinoma gástrico se dá por alteração no padrão de metilação da região promotora do gene, indicando que esta é uma proteína importante e está envolvida na carcinogênese;
- A metilação do gene em estágios pré neoplásicos pode ser indicativo de um pior prognóstico;
- Devido a grande similaridade entre as sequencias de *C. apella* e Humanos, as conclusões aqui encontradas podem ser extrapoladas para os humanos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, M.A.; SJOBLUM, T. Molecular pathways in tumor progression: from discovery to functional understanding. **Mol. BioSyst.**, 5: 902–908. 2009.
- BAE, J-M; LEE, E.J.; GUYATT, G. Citrus fruit intake and stomach cancer risk: a quantitative systematic review. **Gastric Cancer**, 11: 23–32. 2008.
- BALASSIANO, K.; LIMA, S.; JENAB, M.; OVERVAD, K.; TJONNELAND, A.; BOUTRON-RUAULT, M.C.; CLAVEL-CHAPELON, F.; CANZIAN, F.; KAKS, R.; BOEING, H.; MEIDTNER, K.; TRICHOPOULOU, A.; LAGLOU, P.; VINEIS, P.; PANICO, S.; PALLI, D.; GRIONI, S.; TUMINO, R.; LUND, E.; BUENO-DE-MESQUITA, H.B.; NUMANS, M.E.; PEETERS, P.H.M.; RAMON QUIRÓS, .; SÁNCHEZ, M.J.; NAVARRO, C.; ARDANAZ, E.; DORRONSORO, M.; HALLMANS, G.; STENLING, R.; EHRNSTRÖM, R.; REGNER, S.; ALLEN, N.E.; TRAVIS, R.C.; KHAW, K.-T.; OFFERHAUS, G.J.; SALA, N.; RIBOLI, E.; HAINAUT, P.; SCOAZEC, J-Y.; SYLLA, B.S.; GONZALEZ, C.; HERCEG, Z. Aberrant DNA methylation of cancer-associated genes in gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). **Cancer letters**, 311(1): 85-95. 2011.
- BEAVOM, I.R.G. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. **European Journal of Cancer**, 36:1607-1620. 2000.
- Behrens, J; Löwrick, O; Klein-Hitpass, L; Birchmeier, W. The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 88:11495-9. 1991.
- BERX, G.; ROY, F.V. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. **Breast Cancer Res**, 3:289–293. 2001.
- BIENZ, M.; CLEVERS, H. Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling. **Cell**, 103, 311–320. 2000.
- BLACK, A.R; BLACK, J.D.; AZIZKHAN-CLIFFORD, J. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. **J Cell Physiol**, 188: 143–160. 2001
- BORGES, B.N.; SANTOS, E.S.; BASTOS, C.E.M.C.; PINTO, L.C.; ANSELMO, N.P.; QUARESMA, J.A.S.; CALCAGNO, D.Q.; BURBANO, R.M.R.; HARADA, M.L. Promoter Polymorphisms and Methylation of E-Cadherin (*CDH1*) and KIT in Gastric Cancer Patients from Northern Brazil. **Anticancer Research**, 30: 2225-2234. 2010.

- BRANDT, P.A.V.D.; GOLDBOEHM, R.A. Nutrition in the prevention of gastrointestinal cancer. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 20(3): 589-603. 2006.
- BUDÁN, F.; VARJAS, T.; NOWRASTEH, G.; VARGA, Z.; BONCZ, I.; CSEH, J.; PRANTNER, I.; ANTAL, T.; PÁZSIT, E.; GÖBEL, G.; BAUER, M.; GRACZA, T.; PERJÉSI, P.; EMBER, I.; GYÖNGYI, Z. Early Modification of c-myc, Ha-ras and p53 Expressions by N-Methyl-N-nitrosourea. **in vivo**, 22: 793-798. 2008.
- CALDAS, C.; CARNEIRO, F.; LYNCH, H.T.; YOKOTA, J.; WIESNER, G.L.; POWELL, S.M.; LEWIS, F.R.; HUNTSMAN, D.G.; PHAROAH, P.D.P.; JANKOWSKI, J.A.; MACLEOD, P.; VOGELSANG, H.; KELLER, G.; PARK, K.G.M.; RICHARDS, F.M.; MAHER, E.R.; GAYTHER, S.A.; OLIVEIRA, C.; GREHAN, G.; WIGHT, D.; SERUCA, R.; ROVIELLO, F.; PONDER, B.A.J.; JACKSON, C.E. Familial gastric cancer : over view and guidelines for management. **J Med Genet**, 36:873-880. 1999.
- CALDEIRA, J.R.F.; PRANDO, E.C.; QUEVEDO, F.C.; NETO, F.A.M.; RAINHO, C.A.; ROGATTO, S.R. CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. **BMC Cancer**, 9:1-9. 2006.
- CALMON, M.F.; RAHAL, P. *CDH1* (cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)). **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol**. October 2007 . URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/CDH1ID166ch16q22.html>. Acesso em 19 de maio de 2011.
- CARL-MCGRATH, S.; EBERT, M.; RÖCKEN, C. Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis. **Cancer Therapy**, 5: 877-894. 2007.
- CATALANO V.; LABIANCA, R.; BERETTA, G. D.; GATTA, G.; DE BRAUD, F.; CUTSEM, E. V. Gastric câncer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 71:127-164. 2009.
- CAVALLARO, H.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signaling by cadherins an IG-CAMS in cancer. **Nature**, 4:118-132. 2004.
- CERVANTES, A.; BRAUN, E.R.; FIDALGO, A.P.; GONZÁLEZ, I.C. Molecular biology of gastric câncer. **Clin Transl Oncol**, 9:208-215. 2007.
- CHAN, A.O.O.; WONG, B.C.Y.; LAN, H.Y.; LOKE, S.L.; CHAN, W.K.; HUI, W.M.; YUEN, Y.H.; NG., E.; HOU, L.; WONG, W.M.; YUEN, M.F.; LUK, J.M.C.; LAM, S.K. Deregulation of E-cadherin-catenin complex in precancerous lesions of gastric adenocarcinoma. **Journal of Gastroenterology and Hepatology** 18:534-539. 2003a.
- CHAN, A O-O; LAM, S-K; WONG, B C-Y; WONG, W-M; YUEN, M-F; YEUNG, Y-H; HUI, W-M; RASHID, A; KWONG, Y-L. Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with Helicobacter pylori infection and in gastric cancer. **Gut**, 52: 503-506. 2003b.
- CHAN, A. O.O. E-cadherin in gastric cancer. **World J Gastroenterol**, 12(2):199-203. 2006a.

- CHAN, A. O.O.; HUANG, C.; HUI, W . M.; CHO , C. H.; YUEN, M.F.; LAM, S.K.; RASHID, A.; WONG, B.C.-Y. Stability of E-cadherin methylation status in gastric mucosa associated with histology changes. **Alimen t Pharmacol Ther**, 24: 831 –836. 2006b.
- CHEN, B.; ZHOU, Y.; YANG, P.; LIU, L.; QIN, X-P.; WU, X-T. *CDH1* -160C>A gene polymorphism is an ethnicity-dependent risk factor for gastric cancer. **Citokine**, 55(2): 266-273. 2011.
- CHOI, S.; MASON, J.B. Folate and Carcinogenesis: An Integrated Scheme. **J Nutr**, 130: 129 –132. 2000.
- CHUMAKOV, P.M. Function of the p53 Gene: Choice between Life and Death. **Biochemistry (Moscow)**, 65(1): 28-40. 2000. Traduzido de Biokhimiya, 65(1):34-47. 2000.
- CLETON-JANSEN, A.-M. E-cadherin and loss of heterozygosity at chromosome 16 in breast carcinogenesis: different genetic pathways in ductal and lobular breast cancer? **Breast Cancer Res**, 4:5-8. 2002.
- COFFEY, R.J.; WASHINGTON, M. K.; CORLESS, C.L.; HEINRICH, M.C. Ménétrier disease and gastrointestinal stromal tumors: hyperproliferative disorders of the stomach. **The Journal of Clinical Investigation**, 17(1): 70-80. 2007.
- CORREA, P. Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process - First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Research**, 52:6735-6740. 1992.
- CORSO, G.; PEDRAZZANI, C.; PINHEIRO, H.; FERNANDES, E.; MARRELLI, D.; RINNOVATI, A.; PASCALE, V.; SERUCA, R.; OLIVEIRA, C.; ROVIELLO, F. E-cadherin genetic screening and clinico-pathologic characteristics of early onset gastric cancer. **European journal of cancer**, 47(4): 631-639. 2011.
- COSTA, J.F.F.B.; LEAL, M.F.; SILVA,T.C.R.; ANDRADE JUNIO, E.F.; REZENDE, A.P.; MUNIZ, J.A.P.; LACRETA JUNIOR, A.C.C.; ASSUMPÇÃO, P.P.; CALCAGNO, D.Q.; DEMACHKI, S.; RABENHORST, S.H.B; SMITH, M.A.C.; BURBANO, R.M. Experimental Gastric Carcinogenesis in *Cebus apella* Nonhuman Primates. **Plos one**, 6(7):1-13. 2011.
- CRALLAN, R.A.; GEORGOPOULOS, N.T.; SOUTHGATE, J. Experimental models of human bladder carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 27(3):374–381. 2006.
- CREW, K.D.; NEUGUT, A.I. Epidemiology of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, 12: 354 – 362. 2006.
- CROCE, C.M. Oncogenes and Cancer. **The new England journal of medicine**, 358: 502-511. 2008.
- DAS, P.M.; SINGAL, R. DNA Methylation and Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 22: 4632-4642. 2004.

- DE RE, V.; CANNIZZARO, R.; CANZONIERI, V.; CECCHIN, E.; CAGGIARI, L.; DE MATTIA, E.; PRATESI, C.; DE PAOLI, P.; TOFFOLI, G. MTHFR polymorphisms in gastric cancer and in first-degree relatives of patients with gastric cancer. **Tumor Biol.**,31:23-32. 2010.
- DICKEN, B.J.; BIGAM, D.L.; CASS, C.; MACKEY, J.R.; JOY, A.A.; HAMILTON, S.M. Gastric Adenocarcinoma: Review and Considerations for Future Directions. **Ann of Surg**, 241: 27 – 39. 2005.
- DYNAN, W. S.; TJIAN, R. Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. **Cell** 32:669-680. 1983.
- ELLEDGE, S.J.; Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. **Science**, 6 (274): 1664-1672, 1996.
- ESTELLER, M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. **European Journal of Cancer**, 36: 2294-2300. 2000.
- ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature**, 8:286-298. 2007a.
- ESTELLER, M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. **Human Molecular Genetics**, 16(Review 1): R50-R59. 2007b.
- ESTELLER, M. Molecular Origins of Cancer: Epigenetics in Cancer. **The new england journal of medicine**, 358:1148-59. 2008.
- EVAN, G.I.; VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, 411: 342-348. 2001.
- FEINBERG, A.P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature Reviews**, 7: 21-33. 2006.
- FITZGERALD, R. C.; CALDAS, C. Clinical implications of E-cadherin associated hereditary diffuse gastric cancer. **Gut**, 53:775-778. 2004.
- FORMAN, D.; BURLEY, V.J. Gastric cancer : global pattern of the disease and an over view of environmental risk factors. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 20(4): 633-649. 2006.
- FRANCESCHI, S.; LA VECCHIA, C. Alcohol and the risk of cancers of the stomach and colon-rectum. **Dig Dis**, 12: 276 – 289. 1994.
- GAO, L.; NIETERS, A.; BRENNER, H. Meta-analysis: tumour invasion-related genetic polymorphisms and gastric cancer susceptibility. **Aliment Pharmacol Ther.**, 28:565 –573. 2008.
- GRADY, W.M.; WILLIS, J.; GUILFORD, P.J.; DUNBIER, A.K.; TORO, T.; LYNCH, H.; WIESNER, G.; FERGUSON, K.; ENG, C.; PARK, J.-G.; KIM, S.-J.; MARKOWITZ, S. Methylation of the *CDH1* promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. **Nature Genetics**, 26: 16-17. 2000.

- GRAZIANO, F.; ARDUINI, F.; RUZZO, A.; BEARZI, I.; HUMAR, B.; MORE, H.; SILVA, R.; MURETTO, P.; GUILFORD, P.; TESTA, E.; MARI, D.; MAGNANI, M.; CASCINU, S. Prognostic Analysis of E-Cadherin Gene Promoter Hypermethylation in Patients with Surgically Resected, Node-Positive, Diffuse Gastric Cancer. **Clinical Cancer Research**, 10:2784 – 2789. 2004.
- GROENBAEK, K.; HOTHER, C.; JONES, P.A. Epigenetics changes in cancer. **APMIS** 115: 1039–1059. 2007.
- GUILFORD, P.; HUMAR, B.; BLAIR, V. Hereditary diffuse gastric cancer: translation of CDH1 germline mutations into clinical practice. **Gastric cancer**, 13(1): 1-10. 2010.
- HALAZONETIS, T.D.; GORGOULIS, V.G; BARTEK, J. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. **Science**, 319: 1352-1355. 2008.
- HALL, T. BioEdit: An important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Biosciences**, 2(1):60-61. 2011.
- HAMILTON, S.R.; AALTONEN, L.A. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. **IARC Press: Lyon**. 2000.
- HAMILTON, J.P.; MELTZER, S.J. A Review of the Genomics of Gastric Cancer. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 4: 416-425. 2000.
- HANAHAHAN D, WEINBERG RA. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, 100: 57 – 70. 2000.
- HARTGRINK HH, JANSEN EPM, VAN GRIEKEN NCT, VAN DE VELDE CJH. Gastric cancer. **Lancet**, 374: 477 – 490. 2009.
- HARTWELL, L.H; WEINERT, T.A. Checkpoints: Controls That Ensure the Order of Cell Cycle Events. **Science**, 246: 629-634. 1989.
- HERMAN, J G; GRAFF, J R; MYÖHÄNEN, S; NELKIN, B D; BAYLIN, S B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93 (18): 9821-9826. 1996
- HERNANDEZ-RAMIREZ, R.U.; GALVAN-PORTILLO, M. V.; WARD, M. H.; AGUDO, A.; GONZALEZ,C.A.; OÑATE-OCAÑA,L. F.; HERRERA-GOEPFERT, R.; PALMA-COCA, O.; LOPEZ-CARRILLO,L. Dietary intake of polyphenols, nitrate and nitrite and gastric cancer risk in Mexico City. **Int. J. Cancer**, 125: 1424–1430. 2009.
- HOELJMAKERS, J.H.J. Molecular Origins of Cancer: DNA Damage, Aging, and Cancer. **The new england journal of medicine**, 361:1475-85. 2009.
- HOENBERGER, P.; GRETSCHHEL, S. Gastric Cancer. **Lancet**, 362: 305 – 315. 2003.

- HSU, T-I; WANG, M- C; CHEN, S-Y; YEH, Y-M; SU, W-C; CHANG, W-C; HUNG, J-J. SP1 expression regulates lung tumor progression. **Oncogene**, 1-16. 2011.
- IACOBUZIO-DONAHUE, C.A. Epigenetic Changes in Cancer. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** 4:229–49. 2009.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Cancer incidence and mortality worldwide in 2001**. Disponível em www.iarc.fr, Acesso em 31 de janeiro de 2011.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
- JAKSZYN, P.; GONZÁLEZ, C.A. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence. **World J Gastroenterol**, 12(27): 4296-4303. 2006.
- JENABA, M.; MCKAYA, J.D.; FERRARIA, P.; BIESSYA, C.; LAING, S.; MUNARC, G.M.C.; SALA, N.; PEÑA, S.; CRUSIUS, J.B.A.; OVERVAD, K.; JENSEN, M.K.; OLSEN, A.; TJONNELAND, A.; CLAVEL-CHAPELON, F.; BOUTRON-RUAULT, M-C.; KAKS, R.; LINSEISEN, J.; BOEING, H.; BERGMANNI, M.M.; TRICHOPOULOU, A.; GEORGILA, C.; PSALTOPOULOU, T.; MATTIELLO, A.; VINEIS, P.; PALA, V.; PALLI, D.; TUMINO, R.; NUMANS, M.E.; PEETERS, P.H.M.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; LUND, E.; ARDANAZ, E.; SANCHEZ. M.J.; DORRONSOROU, M.; SANCHEZ, C.N.; QUIROS, J.R.; HALLMANS, G.; STENLINGY, R.; MANJERZ, J.; REGNER, S.; KEYS, T.; BINGHAM, S.; KHAWAC. K.T.; SLIMANI, N.; RINALDI, S.; BOFFETTA, P.; CARNEIRO, F.; RIBOLI, E.; GONZALEZ, C. *CDH1* gene polymorphisms, smoking, Helicobacter pylori infection and the risk of gastric cancer in the European prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). **European Journal of cancer**, 44: 774-780. 2008.
- JONES, K. A.; KADONAGA, J. T.; LUCIW, P. A.; TJIAN, R. Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. **Science** 232: 755–759.1986.
- JONES, P.A.; BAYLIN, S. The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer. **Nature Reviews**, 3: 415-426. 2002.
- JOHNSON SM, EVERS BM. Translational Research in Gastric Malignancy. **Surg Oncol Clin N Am**, 17: 323 – 340. 2008.
- JUNG, H.; LEE, J.I.; LEE, H.H.; KIM, S.H.; HUR, H.; JEON, H.M. Gastric Cancer Susceptibility according to Methylenetetrahydrofolate Reductase and Thymidylate Synthase Gene Polymorphism. **J Korean Surg Soc**, 79:27-34. 2010.
- KACZYNSKI, J.; COOK, T.; URRUTIA, R. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. **Genome Biol.** 4: 206. 2003
- KAGUE, E.; THOMAZINI, C.M.; PARDINI, M.I.C.M.; CARVALHO, F.; LEITE, C.V.; PINHEIRO, N.A. Methylation status of *CDH1* gene in samples of

gastric mucous from Brazilian patients with chronic gastritis infected by *Helicobacter pylori*. **Arq Gastroenterol**, 47(1):7-12. 2010

- KASTAN, M.B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, 432: 316-323. 2004.
- KELLER, G.; HÖFLER, H.; BECKER, K-F. Molecular medicine of gastric adenocarcinomas. **Expert Rev. Mol. Med.**, 7(17): 1-13. 2005.
- KELLEY, J.R.; DUGGAN, J.M. Gastric cancer epidemiology and risk factors. **J Clin Epidemiol**, 56: 1-9. 2003.
- KNUDSON JR, A.G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 68(4):820-823. 1971.
- KOIZUMI, Y.; TSUBONO, Y.; NAKAYA, N.; KURIYAMA, S.; SHIBUYA, D.; MATSUOKA, H.; TSUJI, I. Cigarette smoking and the risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan. **Int J Cancer**, 112: 1049 – 1055. 2004.
- KONDO, Y.; ISSA, J-P. J. DNA methylation profiling in cancer. **Expert Rev. Mol. Med.**, 12: 1-26. 2010.
- KONO, S.; HIROHATA, T. Nutrition and stomach cancer. **Cancer Causes Control**, 7: 41– 55. 1996.
- LADEIRAS-LOPES, R.; PEREIRA, A.K.; NOGUEIRA, A.; PINHEIRO-TORRES, T.; PINTO, I.; SANTOS-PEREIRA, R.; LUNET, N. Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Cancer Causes Control**, 19: 689 – 701. 2008.
- LAIRD, P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature Reviews – Cancer**, 3:253-266. 2003.
- LAIRD, P.W. Cancer epigenetics. **Human Molecular Genetics**, 14(1):R65-R76. 2005.
- LAUREN, T. The two histologic main types of gastric carcinoma. **Acta Pathol Microbiol Scand**, 34, 1965.
- LEAL, M.F.; LIMA, E.M.; SILVA, P.N.O.; ASSUMPÇÃO, P.P.A.; CALCAGNO, D.Q.; PAYÃO, S.L.M.; BURBANO, R.R.; SMITH, M.A.C. Promoter hypermethylation of *CDH1*, *FHIT*, *MTAP* and *PLAGL1* in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil. **World J Gastroenterol**, 13(18): 2568-2574. 2007.
- LIU, Y.-C.; SHEN, C.-Y.; WU, H.-S.; CHAN, D.-C.; CHEN, C.-J.; YU, J.-C.; YU, C.-P.; HARN, H.-J.; SHYU, R.-Y.; SHIH, Y.-L.; HSIEH, C.-B.; HSU, H.-M. *Helicobacter pylori* infection in relation to E-cadherin gene promoter polymorphism and hypermethylation in sporadic gastric carcinomas. **World J Gastroenterol**, 11(33):5174-5179. 2005.
- LIU, Y.-C.; SHEN, C.-Y.; WU, H.-S.; HSIEH, T.-Y.; CHAN, D.-C.; CHEN, C.-J.; YU, J.-C.; YU, C.-P.; HARN, H.-J.; CHEN, P.-J.; HSIEH, C.-B.; CHEN, T.-W.; HSU, H.-M. Mechanisms inactivating the gene for E-cadherin in

- sporadic gastric carcinomas. **World J Gastroenterol**, 12(14): 2168-2173. 2006.
- LIU, C.; RUSSEL, R.M. Nutrition and gastric cancer risk: an update. **Nutrition Reviews**, 66(5):237-249. 2008.
- LOCHHEAD, P.; EL-OMAR, E.M. Gastric cancer. **Br Med Bull**, 85: 87 – 100. 2008.
- LOOTS, G.G.; OVCHARENKO, I. rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding sites. **Nucleic Acids Research**, 32(Web Server issue): W217–W221. 2004.
- LOPEZ, J.; PERCHARDE, M.; COLEY, H.M.; WEBB, A.; CROOK, T. The context and potential of epigenetics in oncology. **British Journal of Cancer**, 100, 571 – 577. 2009.
- LOVE, R.R. Global cancer research initiative. **Cancer Management and Research**. 10:105-109. 2010.
- LU, Y.; XU, Y.-C.; SHEN, J.; YU, R.-B.; NIU, J.-Y.; GUO, J.-T.; HU, X.; SHEN, H.-B. *E-cadherin* gene C-160A promoter polymorphism and risk of non-cardia gastric cancer in a Chinese population. **World J Gastroenterol**, 11(1):56-60. 2005.
- LUO J, SOLIMINI NL, ELLEDGE SJ. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, 136: 826 – 837. 2009.
- LUTSIK, P.; FEUERBACH, L.; ARAND, J.; LENGAUER, T.; WALTER, J.; BOCK, C. BiQ Analyzer HT: locus-specific analysis of DNA methylation by high-throughput bisulfite sequencing. **Nucleic Acids Research**, 1–6. 2011.
- LYNCH, H.T; KAURAH, P.; WIRTZFELD, D.; RUBINSTEIN, W.S.; WEISSMAN, S.; LYNCH, J.F.; GRADY, W.; WIYRICK, S.; SENZ, J.; HUNTSMAN, D.G. Hereditary Diffuse Gastric Cancer: Diagnosis, Genetic Counseling, and Prophylactic Total Gastrectomy. **Cancer**, 112(12): 2655-2663. 2008.
- MACDONALD, B.T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. **Developmental Cell**, 17: 9-26. 2009.
- MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, C.; CARVALHO, R.; SOARES, P.; BERX, G.; CALDAS, C.; SERUCA, R.; CARNEIRO, F.; SOBRINHO-SIMÕES, M. *E-cadherin* gene (*CDH1*) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. **Oncogene**, 20:1525-1528. 2001.
- MACLEOD K. Tumor suppressor genes. **Cell Prolif**, 10: 81 – 93. 2000.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Review**, 9:153-166. 2009.
- MALUMBRES, M.; CARNERO, A. Cell Cycle Desregulation: a Common Motif in Câncer. **Progress in Cell Cycle Research**, 5: 5-18. 2003.

- MAZURE, N. M., BRAHIMI-HORN, M. C; POUYSSEGUR, J. Protein kinases and the hypoxia-inducible factor-1, two switches in angiogenesis. **Curr. Pharm. Des.** 9: 531–541. 2003
- MILNE AN, CARNEIRO F, O'MORAIN C, OFFERHAUS GJA. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. **Hum Genet**, 126: 615 – 628. 2009.
- MIMATA, A.; FUKAMACHI, H.; EISHI, Y.; YUASA, Y. Loss of E-cadherin in mouse gastric epithelial cells induces signet ring-like cells, a possible precursor lesion of diffuse gastric cancer. **Cancer science**, 102(5): 942-950. 2011.
- MORAN, C.J.; JOYCE, M.; MCANENA, O.J. *CDH1* associated gastric cancer: a report of a family and review of the literature. **EJSO**, 31: 259–264. 2005.
- NAKAMURA, A.; SHIMAZAKI, T.; KANEKO, K.; SHIBATA, M.; MATSUMURA, T.; NAGAI, M.; MAKINO, R.; MITAMURA, K. Characterization of DNA polymorphisms in the E-cadherin gene (*CDH1*) promoter region. **Mutation Research**, 502: 19–24. 2002.
- NARDONE, G. Review article: Molecular basis of gastric carcinogenesis. **Aliment Pharmacol Ther**, 17 (Suppl. 2): 75–81. 2003.
- NEGRINI S, GORGOULIS VG, HALAZONETIS TD. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. **Mol Cell Biol**, 11: 220 – 228. 2010.
- NISHINO, Y.; INOUE, M.; TSUJI, I.; WAKAI, K.; NAGATA, C.; MIZOUE, T.; TANAKA, K.; TSUGANE, S. Tobacco smoking and gastric cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. **Jpn J Clin Oncol**, 36: 800 – 807. 2006.
- NOBILI, S.; BRUNO, L.; LANDINI, I.; NAPOLI, C.; BECHI, P.; TONELLI, F.; RUBIO, C.A.; MINI, E.; NESI, G. Genomic and genetic alterations influence the progression of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, 17(3): 290-299. 2011.
- OLIVEIRA, A.M.; ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A. Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: The Gatekeepers and the Caretakers. **Am J Clin Pathol**; 124(Suppl 1):S16-S28. 2005.
- OLIVEIRA, C.; SERUCA, R.; CARNEIRO, F. Genetics, Pathology, and Clinics of Familial Gastric Cancer. **International Journal of Surgical Pathology**, 14(1):1-13. 2006.
- OLIVEIRA,C.;SOUSA,S.; PINHEIRO,H.; KARAM,H.; BORDEIRA-CARRIÇO, R.; SENZ, J.; KAURAH, P.; CARVALHO, J.; PEREIRA, R.; GUSMÃO,L.; WEN,X.; CIPRIANO, M.A.; YOKOTA, J.; CARNEIRO,F.; HUNTSMAN, D.; SERUCA, R. Quantification of Epigenetic and Genetic 2nd Hits in*CDH1* During Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome Progression.**Gastroenterology**, 136:2137–2148. 2009.

- OPITZ, O. G.; RUSTGI, A. K. Interaction between Sp1 and cell cycleregulatory proteins is important in transactivation of a differentiation-related gene. **Cancer Res.** 60:2825–2830. 2000.
- OUE, N.; MITANI, Y.; MOTOSHITA, J.; MATSUMURA, S.; YOSHIDA, K.; KUNIYASU, H.; NAKAYAMA, H.; YASUI, W. Accumulation of DNA Methylation Is Associated with Tumor Stage in Gastric Cancer. **Cancer**, 106(6): 1250:1259. 2006.
- PANDEY, R.; MISRA, V.; MISRA, S.P.; DWIVEDI, M.; KUMAR, A.; TIWARI, B.K. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 11:583-588. 2010.
- PANANI, A.D. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: Clinical implications. **Cancer Letters**, 266: 99–115. 2008
- PARK, W.S. Molecular Pathogenesis of Gastric Cancer. **J Korean Med Assoc**, 53(4): 270 – 282. 2010.
- PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108, 2005.
- PAZDUR, R.; HOSKINS, W.J.; CAIA, L.R.; WAGMAN, L.D. Cancer management: a multidisciplinary approach. **Medical, surgical and radiation oncology**. CMP United Business Media, 9th edition, 2005 cap14 (259-271).
- PEINADO, H.; PORTILLO, F.; CANO, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. **The International journal of developmental biology**, 48: 365-375. 2004.
- PINHEIRO, H.; BORDEIRA-CARRIÇO, R.; SEIXAS, S.; CARVALHO, J.; SENZ, J.; OLIVEIRA, P.; INACIO, P.; GUSMÃO, L.; ROCHA, J.; HUNTSMAN, D.; SERUCA, R.; OLIVEIRA, C. Allele-specific CDH1 downregulation and hereditary diffuse gastric cancer. **Human Molecular Genetics**, 19(5): 943-952. 2010.
- POLAKIS, P. Wnt signaling and cancer. **Genes Dev.**, 14: 1837-1851. 2000.
- POLK, D.B.; PEEK, R.M. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. **Nature Reviews**, 10: 403-414. 2010.
- PONDER, B.A.J. Cancer Genetics. **Nature**, 411: 336-341, 2001.
- QIAN, X.; HUANG, C.; CHO, C.H.; HUI, W.M.; RASHID, A.; CHAN, A.O.O. E-cadherin promoter hypermethylation induced by interleukin-1beta treatment or H. pylori infection in human gastric cancer cell lines. **Cancer letters**, 263(1): 107-113. 2008.
- PRASAD, C. P.; MIRZA, S.; SHARMA, G.; PRASHAD, R.; DATTA GUPTA, S.; RATH, G.; RALHAN, R. Epigenetic alterations of CDH1 and APC genes: Relationship with activation of Wnt/ β -catenin Pathway in invasive ductal carcinoma of breast. **Life Sciences**, 83: 318 –325. 2008.

- REEVES, S.G.; MELDRUM, C.; GROOMBRIDGE, C.; SPIGELMAN, A. D.; SUCHY, J.; KURZAWSKI, G.; LUBINSKI, J.; MCELDUFF, P.; SCOTT, R. J. MTHFR 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms and the age of onset of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **European Journal of Human Genetics**, 17: 629 – 635. 2009.
- REINHOLD, W.C.; REIMERS, M.A.;LORENZI, P.;HO, J.;SHANKAVARAM, U.T.; ZIEGLER, M.S.; BUSSEY, K.J.; NISHIZUKA, S.; IKEDIOBI, O.; POMMIER, Y.G.; WEINSTEIN, J.N. Multifactorial regulation of E-cadherin expression: an integrative study. **Molecular Cancer Therapeutics**. 9(1):1-16. 2010
- ROCK, C. L; LAMPE J.W. ; PATTERSON, R. E. Nutrition, Genetics, And Risks Of Cancer. **Annu. Rev. Public. Health**. 21:47-64. 2000.
- RODER, D.M. The epidemiology of gastric cancer. **Gastric Cancer**, 5(Suppl 1): 5–11. 2002.
- ROY, F.V.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cell. Mol. Life Sci.**, 65:3756 – 3788. 2008.
- SCHUG, J.; OVERTON, G.C. TESS: Transcription Element Search Software on the WWW. Disponível em: <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>. Acesso em: 15 de maio de 2011.
- SEN, N.P.; SEAMAN, S.W.; BURGESS, C.; BADDOO, P.A.; WEBER, D. Investigation on the Possible Formation of N-Nitroso-N-methylurea by Nitrosation of Creatinine in Model Systems and in Cured Meats at Gastric pH. **J. Agric. Food Chem.**, 48: 5088–5096. 2000.
- SIEBER, O.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I. Genomic stability and tumorigenesis. **Seminars in Cancer Biology** 15: 61–66. 2005.
- SILVA, M.; AZENHA,D.; PEREIRA,C.; ALMEIDA, A.;BALSEIRO, S.; SAMPAIO, A.M.; SANTOS, S.; CARVALHO, L. Carcinoma Gástrico e Gastrite crônica Regulação Epigenética por Metilação dos genes *CDH1* (Caderina-E), *CDKN2A* (p16INK4A), *PTGS2* (COX2) e *EGFR*. **Acta Med Port**, 23: 005-014. 2010.
- SHANG, J.; PEÑA, A.S. Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, 11: 4131 – 4139. 2005.
- SHAMES, D.S.; MINNA, J.D.; GAZDAR, A.F. Methods for detecting DNA methylation in tumors: From bench to bedside. **Cancer Letters**, 251:187–198. 2007.
- SHARMA, S.; KELLY, T.K.; JONES, P.A. Epigenetics in Cancer. **Carcinogenesis**, 31: 27-36. 2010.
- SMITH, M.G.; HOLD, G.L.; TAHARA, E.; EL-OMAR, E.M. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, 12(19): 2979-2990. 2006.

- STOCK, M., OTTO, F. Gene deregulation in gastric cancer. **Gene**, 360: 1-19. 2005.
- STRATHDEE G. Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. **Seminars in Cancer Biology** 12(5):373-379, 2002.
- SUGIYAMA, A.; MARUTA, F.; IKENO, T.; ISHIDA, K.; KAWASAKI, S.; KATSUYAMA, T.; SHIMIZU, N.; TATEMATSU, M. Helicobacter pylori Infection Enhances W-Methyl-/V-nitrosourea-induced Stomach Carcinogenesis in the Mongolian Gerbil. **Cancer Research**, 58: 2067-2069. 1998.
- SUN, G-Y; WU, J-X; WU, J-S, PAN, Y-T, JIN, R. Caveolin-1, E-cadherin and β -catenin in Gastric Carcinoma, Precancerous Tissues and Chronic Non-atrophic Gastritis. **Chin J Cancer Res**, 24(1): 23-28, 2012.
- SURIANO, G.; MULHOLLAND, D.; WEVER, O.D; FERREIRA, P.; MATEUS, A.R.; BRUYNEEL, E.; NELSON, C.C.; MAREEL, M.M.; YOKOTA, J.; HUNTSMAN, D.; SERUCA, R. The intracellular E-cadherin germline mutation V832M lacks the ability to mediate cell-cell adhesion and to suppress invasion. **Oncogene**, 22: 5716-5719. 2003.
- SUZUKI, H.; IWASAKI, E.; HIBI, T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. **Gastric Cancer**, 12: 79-87. 2009.
- SWAN, P.F; MAGEE, P.N. Nitrosamine-Induced Carcinogenesis. The alkylation of nucleic acids of the rat by N-methyl-N-nitrosourea, dimethylnitrosamine, dimethyl sulphate and methyl methanesulphonate. **Biochem. J.**, 110: 39-47. 1968.
- TAKAYAMA , S.; THORGEIRSSON, U.P.; ADAMSON, R.H. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates. **Proc . Jpn. Acad.**, 84(6): 176-187. 2008.
- TAMURA, G.; YIN, J.; WANG, S.; FLEISHER, A.S.; ZOU, T.; ABRAHAM, J.M.; KONG, D.; SMOLINSKI, K.N.; WILSON, K.T.; JAMES, S.P.; SILVERBERG, S.G.; NISHIZUKA, S.; TERASHIMA, M.; MOTOYAMA, T.; MELTZER, S.J. E-Cadherin Gene Promoter Hypermethylation in Primary Human Gastric Carcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**, 92(7): 569-573. 2000.
- TAMURA, G. Genetic and Epigenetic Alterations of Tumor Suppressor and Tumor Related Genes in Gastric Cancer. *Histology and Histopathology* 17: 323 - 329. 2002.
- TAMURA, G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, 12: 192 - 198. 2006.
- TAN, N.Y.; KHACHIGIAN, L.M. Sp1 Phosphorylation and Its Regulation of Gene Transcription. **Molecular and Cellular Biology**, 29 (10): 2483-2488. 2009.
- TERRY, M.B.; GAUDET, M.M.; GARNMONF, M.D. The Epidemiology of Gastric Cancer. **Semin Radiat Oncol**, 12: 111 - 127. 2002.

- TOMITA, H.; HIRATA, A.; YAMADA, Y.; HATA, K.; OYAMA, T.; MORI, H.; YAMASHITA, S.; USHIJIM, T.; HARA, A. Suppressive effect of global DNA hypomethylation on gastric carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 31(9):1627–1633. 2010
- TOYOTA, M.; HO, C.; AHUJA, N.; JAIR, K-W.; LI, Q.; OHE-TOYOTA, M.; BAYLIN, S.B.; ISSA, J-P J. Identification of Differentially Methylated Sequences in Colorectal Cancer by Methylated CpG Island Amplification. **Cancer Research**, 59: 2307–2312. 1999.
- TSUGANE, S.; SASAZUKI, S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. **Gastric Cancer**, 10: 75–83. 2007.
- TSUKAMOTO, T.; MIZOSHITA, T.; TATEMATSU, M. Animal Models of Stomach Carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, 35:636–648. 2007.
- TYCKO, B. Epigenetic gene silencing in cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, 105 (4): 401-407. 2000.
- USHIJIMA, T.; SASAKO, M. Focus on gastric cancer. **Cancer Cell**, 5:121-125. 2004.
- UWAGAWA, S.; TSUDA, H.; INOUE, T.; TAGAWA, Y.; AOKI, T.; KAGAWA, M.; OGISO, T.; ITO, N. Enhancing potential of 6 diferent carcinogens on multi-organ tumorigenesis after initial treatment with N-Methyl-N-nitrosourea in Rats. **Jpn. J. Cancer. Res.**, 82: 1397-1405. 1991.
- VAUHKONEN, M.; VAUHKONEN, H.; SIPPONEN, P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 20(4): 651-674. 2006.
- VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D.R.V.; BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, 36: 131–149. 2003.
- VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Cancer genes and the pathways they control. **Nat Med**, 10: 789 – 799. 2004.
- WIERSTRA I. Sp1: emerging roles–beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. **Biochem Biophys Res Commun** 372: 1–13. 2008
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Fact sheet N°297. February 2006. Disponível em: <http://www.WHO.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>. Acesso em 26 de fevereiro de 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Cancer Report, 2008. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon. 2009.
- WU, W.K.K.; CHO, C.H.; LEE, C.W.; FAN, D.; WU, K.; YU. J.; SUNG, J.J.Y. Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. **Cancer Lett**, 295: 144 – 153. 2010.

- YANG, B.; HOUSE, M.G.; GUO, M.; HERMAN, J.G.; CLARK, D.P. Promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. **Modern Pathology**, 18:412-420. 2005.
- YASUI, W.; YOKOZAKI, H.; FUJIMOTO, J.; NAKA, K.; KUNIYASU, H.; TAHARA, E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol*, 35:111-115. 2000.
- YASUI, W.; OUE, N.; KUNIYASU, H.; ITO, R.; TAHARA, E.; YOKOZAKI, H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer*, 4: 113 – 121. 2001.
- YASUI, W.; OUE, N.; AUNG, P.P.; MATSUMURA, S.; SHUTOH, M.; NAKAYAMA, H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer*, 8: 86 – 94. 2005.
- YASUI, W.; SENTANI, K.; MOTOSHITA, J.; NAKAYAMA, H. Molecular Pathobiology of Gastric Cancer. **Scand J Surg**, 95: 225 – 231. 2006.
- YOCOTA, J. Tumor Progression and Metastasis. **Carcinogenesis**, 21: 497-503. 2000.
- ZHANG, Z.; XU, Y.; ZHOU, J.; WANG, X.; WANG, L.; HU, X.; GUO, J.; WEI, Q.; SHEN, H. Polymorphisms of Thymidylate Synthase In The 5'- And 3'- Untranslated Regions Associated With Risk Of Gastric Cancer In South China: A Case-Control Analysis. **Carcinogenesis**, 26: 1764 – 1769. 2005.
- ZHANG, Y.J.; FANG, J.Y. Molecular staging of gastric cancer. **J Gastroenterol Hepatol**, 23: 856 – 860. 2008.
- ZHENG, L.; WANG, L.; AJANI, J.; XIE, K. Molecular basis of gastric cancer development and progression. **Gastric Cancer**, 7: 61-77. 2004.
- ZIEGLER, R.G.; LIM, U. One-Carbon Metabolism, Colorectal Carcinogenesis, Chemoprevention - with Caution. **JNCI** 99 (16): 1214-1215. 2007.