



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

CYNTHIA FARIAS VIEIRA DE MELO

**ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES *THBS1*, *GPX3* E *COX2*
E IDENTIFICAÇÃO DE *Helicobacter pylori* EM AMOSTRAS DE CÂNCER
GÁSTRICO**

João Pessoa – PB



2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

CYNTHIA FARIAS VIEIRA DE MELO

**ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES *THBS1*, *GPX3* E *COX2* E
IDENTIFICAÇÃO DE *Helicobacter pylori* EM AMOSTRAS DE CÂNCER
GÁSTRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima

João Pessoa – PB
2013

CYNTHIA FARIAS VIEIRA DE MELO

**ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES *THBS1*, *GPX3* E *COX2* E
IDENTIFICAÇÃO DE *Helicobacter pylori* EM AMOSTRAS DE CÂNCER
GÁSTRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima
Universidade Federal da Paraíba

Prof^a. Dr^a. Darlene Camati Persuhn
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Arnaldo Correia de Medeiros
Universidade Federal da Paraíba

João Pessoa, _____ de _____ de 2013.

Á Deus, pelo seu amor incondicional e aos meus pais e familiares pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima, orientador e amigo, pela oportunidade e confiança em mim depositada ao longo desses dois anos de convívio.

A CAPES pelo apoio financeiro de extrema importância.

Ao programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPB, bem como ao coordenador do curso, Eleonidas, e a secretária, Ludmilla.

Aos amigos do laboratório do Laboratório de Genética Humana e Oncogenética LGHO, especialmente Rubistenia, Talita, Juarez, Jaíse e João Ricardo, pelo apoio técnico nos momentos de precisão.

Aos laboratórios do Departamento de Biologia Molecular pela disponibilização dos equipamentos.

Ao meu noivo, pela força, apoio e por sempre querer o meu melhor.

Aos meus pais e familiares por me apoiarem em todas as decisões que já tomei na vida, por terem me ensinado a ser quem sou hoje e por confiarem em mim.

Aos colegas do mestrado, pelo convívio e amizade principalmente na época de realização das disciplinas do programa. São pessoas muito queridas que levarei para sempre comigo.

RESUMO

O câncer é uma doença com alta taxa de mortalidade no Brasil, dentre eles, o câncer de estômago constitui atualmente, o quarto tipo de câncer mais comum a nível mundial, sendo responsável por inúmeros casos de morte. A sua etiologia é multifatorial, pois estudos sugerem associações a diversos fatores como: hábitos alimentares, fatores ambientais, fatores genéticos e epigenéticos e a infecção gástrica por *Helicobacter pylori*. Alterações epigenéticas tais como a metilação das regiões promotoras de genes envolvidos na homeostase celular podem contribuir para carcinogênese gástrica. Para verificar o estado de metilação de genes THBS1, GPX3 e COX2 e avaliar a sua associação com a *H. pylori* em adenocarcinomas gástricos, Metilação Sensível a Enzima de Restrição - PCR (MSRE-PCR) foi realizada em 39 carcinomas gástricos (intestinal e tipo difusa) e 15 amostras de tecido normal do estômago. A presença de *H. pylori* foi realizada por amplificação de um fragmento de rRNA 16S. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste exato de Fisher. A hipermetilação de GPX3, THBS1 e COX2 ocorreu em 18% (n = 7), 5% (n = 2) 36% (n = 14) das amostras de câncer gástrico, respectivamente, ao passo que em amostras normais foi encontrada em 13%, 7 % e 67%. A presença de *H. pylori* foi detectada em 67% das amostras de câncer gástrico e 67% em amostras gástricas normais. Não foi encontrada correlação entre o perfil de metilação das amostras estudadas com variáveis clínico-patológicas e com presença de *H. pylori* (P > 0,05). A presença de *H. pylori* nas amostras de câncer gástrico e normais não foi associada com as variáveis clínico-patológicas analisadas (P > 0.05).

Palavras – chave: Câncer gástrico, Metilação, TBBS1, COX2, GPX3, *H. pylori*.

ABSTRAT

Cancer is a disease with a high mortality rate in Brazil, including, stomach cancer is currently the fourth most common type of cancer worldwide, responsible for countless deaths. Its etiology is multifactorial, because studies suggest associations to various factors such as dietary habits, environmental factors, genetic and epigenetic factors and gastric infection by *Helicobacter pylori*. Epigenetic changes such as methylation of the promoter regions of genes involved in cellular homeostasis may contribute to gastric carcinogenesis. To verify the methylation status of THBS1, GPX3 and COX2 genes and to evaluate their association with *H. pylori* in gastric adenocarcinomas, Methylation-Sensitive Restriction Enzyme PCR (MSRE-PCR) assay was performed in 39 gastric carcinomas (intestinal and diffuse types) and 15 normal stomach tissue samples. The presence of *H. pylori* was performed by amplification of the fragment of the 16S rRNA. Statistical analyses were performed using Fisher's exact test. The hypermethylation of GPX3, THBS1 and COX2 occurred in 18% (n = 7), 5% (n = 2) 36% (n = 14) of gastric cancer samples, respectively, whereas in normal samples was found in 13%, 7% and 67%. The presence of *H. pylori* was detected in 67% of gastric cancer samples and 67% in normal gastric samples. No correlation was found between the methylation profile of the studied samples and clinicopathological variables and the presence of *H. pylori* ($P \geq 0,05$). The presence of *H. pylori* in gastric cancer samples and normal was not associated with clinicopathologic variables analyzed ($P > 0.05$).

Key words: gastric cancer, methylation, TBBS1, COX2, GPX3, *H. pylori*

Lista de Figuras

Figura 1 - O estomago humano e dividido em cardia, fundo, corpo e antro/piloro	13
Figura 2 - Localização do primer do gene THBS1 em 50% de ilhas CpG. As bases representadas no eixo horizontal não representa a posição das bases na sequencia do gene.	30
Figure 3 - Localização do primer do gene COX2 em 50% de ilhas CpG. As bases representadas no eixo horizontal não representa a posição das bases na sequencia do gene.	30
Figure 4 - Localização do primer do gene GPX3 em 50% de ilhas CpG. As bases representadas no eixo horizontal não representa a posição das bases na sequencia do gene.....	30
Figura 5 - Esquema de visualização do gel com as amostras tratadas com as enzimas <i>HpaII</i> e <i>MspI</i> . No sítio CCGG metilado a enzima <i>HpaII</i> não corta a sequência, ocorrendo a amplificação. No sítio CCGG não metilado a enzima corta a sequência, não ocorrendo amplificação. Já a enzima <i>MspI</i> reconhece ambos os sítios e corta independente da metilação, funcionando como um controle de corte do sítio.....	32
Figura 6 - Amplificação do gene COX2 das amostra 57 de tecido normal (metilada) e das amostras 1 (não metilada) e 8 (metilada) de câncer gástrico em gel de poliacrilamida a 8%, corado com prata. Br = Branco da reação; B = DNA + água (controle negativo da enzima), H = DNA + enzima <i>HpaII</i> ; M = DNA + enzima <i>MspI</i> (controle positivo da enzima).....	36
Figura 7 - Amplificação do gene THBS1 da amostra 57 de tecido normal (não metilada) e das amostras 9 (não metilada) e 1 (metilada) de câncer gástrico em gel de poliacrilamida a 8%, corado com prata. Br = Branco da reação; B = DNA + água (controle negativo da enzima), H = DNA + enzima <i>HpaII</i> ; M = DNA + enzima <i>MspI</i> (controle positivo da enzima).....	36
Figura 8 - Amplificação do gene GPX3 da amostra 57 de tecido normal (não metilada) e das amostras 30 e 1 (não metilada) de câncer gástrico em gel de poliacrilamida a 8%, corado com prata. Br = Branco da reação; B = DNA + água (controle negativo da enzima), H = DNA + enzima <i>HpaII</i> ; M = DNA + enzima <i>MspI</i> (controle positivo da enzima).	36
Figura 6 - Amplificação referente ao fragmento da fração 16S do rRNA de <i>H. pylori</i> das amostra 57 de tecido normal, da amostra 1 de câncer gástrico (<i>H. pylori</i> positivo). Amostra 2 não amplificou (ausência de <i>H. pylori</i>). Gel de poliacrilamida a 8%.....	40

Lista de Tabela

Tabela 1 - TNM Patológico.....	15
Tabela 2 - Agrupamento por Estadiamento.....	16
Tabela 3 - Dados histopatológicos das amostras de adenocarcinoma gástrico e tecidos normais.....	27
Tabela 4 - Os iniciadores utilizados para técnica MSRE-PCR.....	31
Tabela 5 - Análise do perfil de metilação dos genes associados a carcinogênese gástrica.....	35
Tabela 6 - Características de gênero, clínicopatológicas, e da presença de <i>H. pylori</i> associadas com o perfil de metilação do gene COX2	37
Tabela 7 - Características de gênero, clínicopatológicas, e da presença de <i>H. pylori</i> associadas com o perfil de metilação do gene THBS1.....	38
Tabela 8 - Características de gênero, clínicopatológicas, e da presença de <i>H. pylori</i> associadas com o perfil de metilação do gene GPX3.....	39
Tabela 9 - Características de gênero, clínicopatológicas, associadas à presença de <i>H. pylori</i>	40

Lista de abreviaturas

ANAPC1	Anaphase-promoting complex subunit 1
Cag	Gene associado a itotoxina
CG	Câncer Gástrico
CD36	Cluster of Differentiation 36
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COX1	Ciclooxygenase 1
COX2	Ciclooxygenase 2
DAP-kinase	Death Associated Protein Kinase
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DNMTs	DNA Metiltransferases
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
GPX3	Glutathione Peroxidase 3
hMLH1	human MutL Homolog 1
HpaII	Haemophilus Parainfluenzae II
LBMEO	Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética
MSRE	PCR - Methylation-Sensitive Restriction Enzyme PCR
ncRNAs	RNA não-codificante
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico

ROS	Reactive Oxygen Species
RUNX3	Runt-Related Transcription Factor 3
SMARCA5	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-b1	Transforming Growth Factor beta
THBS1	Thrombospondin 1
TIMP-3	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3
TP53	Tumor Protein 53
TSP2	Thrombospondin 2
TSP3	Thrombospondin 3
TSP4	Thrombospondin 4
TSP5	Thrombospondin 5
VacA	Citotoxina Vacuolizadora

SUMÁRIO

Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstrat	vi
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	i
Lista de Abreviaturas	vi
Sumário	ii
1 INTRODUÇÃO	ix
1.1 CÂNCER GÁSTRICO	xi
1.1.1 Estadiamento do câncer e sistema TNM	1
1.1.2 MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER	3
1.1.2.1 Epigenética	1
1.1.2.2 METILAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À CACINORGÊNESE	5
1.1.2.3 THBS1: Thrombospondin 1	1
1.1.2.4 GPX3: Glutathione Peroxidase 3	6
1.1.2.5 COX2: Ciclo-oxigenase 2	1
1.1.2.6 <i>Helicobacter pylori</i> E CANCER GASTRICO	8
2 OBJETIVOS	1
3 METODOLOGIA	9
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	2

3.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	2
		8
3.3	EXTRAÇÃO DO DNA.....	2
		9
3.4	VALIDAÇÃO <i>IN SÍLICO</i>	3
		0
3.4.	Determinação de ilhas CpG.....	3
1		0
3.5	MSRE-PCR (Methylation-sensitive restriction enzyme)	3
		1
3.6	IDENTIFICAÇÃO DE <i>H. pylori</i> POR PCR.....	3
		2
3.7	ELETROFORESE E GEL.....	3
		3
3.8	Análise Estatística.....	3
		3
4	RESULTADOS	3
		4
5	DISCUSSÃO	4
		1
6	CONCLUSÃO	4
		7
7	REFERÊNCIAS	4
		8
	ANEXO	5
		6
	ANEXO A (CEPHC-FMRP sob o número 12479/2004)	5
		7
	ANEXO B Artigo para submissão	5
		9

1. INTRODUÇÃO

O câncer é segunda causa de morte na população brasileira. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, sendo estimado 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino (INCA, 2013). Confirma-se a estimativa que o câncer da pele do tipo não melanoma (134 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil). (INCA, 2013).

1.1 CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico é uma das mais frequentes ocorrências de câncer mundialmente. No ano de 2012, estimam-se, para o Brasil, 12.670 casos novos de câncer do estômago em homens e 7.420 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e 7 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012). O câncer gástrico já foi o tipo de câncer mais incidente em todo o mundo (PARKIN et al., 2005). Na região Norte e Nordeste o câncer gástrico é o terceiro tipo de neoplasia mais freqüente entre homens e mulheres (INCA, 2012).

A sua etiologia é multifactorial, pois estudos sugerem associações à diversos fatores como: hábitos alimentares, fatores ambientais, fatores genéticos e epigenéticos e a infecção gástrica por *H. pylori*. (TERRY et al. 2011; EVERATT et al. 2012)

Atualmente, o câncer gástrico ocupa o quarto lugar devido ao aumento na incidência de outras neoplasias e ao declínio de sua ocorrência nos últimos 70 anos (PARKIN et al., 2005). Esta diminuição na incidência de câncer gástrico se deve aos avanços dos métodos de investigação complementar, os quais permitem que o diagnóstico e o tratamento sejam realizados de maneira mais precoce além de melhorias no saneamento básico e mudanças no estilo de vida da população (INCA, 2012).

O câncer gástrico permanece como um importante problema de saúde pública mundial por se tratar da segunda causa de óbito relacionado ao câncer mais ocorrente no mundo (~700.000 óbitos/ano), precedida apenas pelo câncer de pulmão (PARKIN et al., 2005). O número de mortes ocasionado por câncer gástrico no ano de 2010 foi de 22.035, sendo 8.633 homens e 13.402 mulheres (INCA, 2012)

O câncer gástrico pode ocorrer em qualquer parte do estômago (figura 1) e os sítios mais comuns são a porção proximal do estômago (cárdia) que ocorrem em aproximadamente 25% dos casos, a porção distal (antro e piloro, não-cárdia) em cerca de 50-60% dos casos e os demais no corpo e fundo (CONTRAN, et al., 2000).

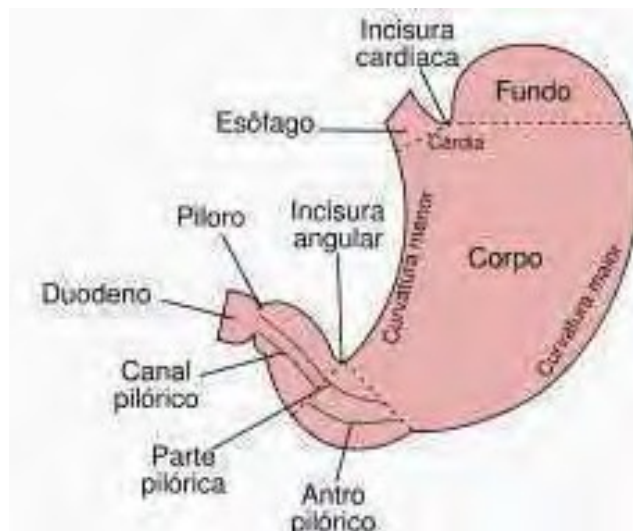


Figura 1 - O estômago humano é dividido em cárdia, fundo, corpo e antro/piloro. Fonte: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/63/Estomago.svg/790px-stomago.svg.png>,

Dentre os sistemas de classificação para adenocarcinoma gástrico, o mais utilizado é o de Lauren (1965). Segundo esta classificação, os adenocarcinomas gástricos, do ponto de vista histopatológico são divididos em dois tipos: adenocarcinoma gástrico tipo intestinal e adenocarcinoma gástrico tipo difuso (LAUREN, 1965).

O tipo intestinal é caracterizado pela presença de células tumorais com núcleos grandes e irregulares, formando estruturas tubulares. O tipo difuso parece originar-se diretamente de células da mucosa gástrica (sem passar por metaplasia intestinal), as células neoplásicas são pouco diferenciadas, infiltrativas e separadas, que podem também estar em pequenos grupamentos, porém sem formar estruturas glandulares e

com núcleos periféricos (células em sinete) devido a concentração de mucina em seu citoplasma (CORREA et al., 1994)

1.1.1 Estadiamento do câncer gástrico e sistema TNM

Após diagnóstico do câncer gástrico, a determinação do estadiamento da doença é fundamental para a tomada de decisão terapêutica. O sistema mais utilizado para se realizar o estadiamento do câncer gástrico é o TNM, proposto pela UICC (União Internacional Contra o Câncer), o qual se apoia em três componentes: T- a extensão do tumor primário na parede gástrica, N- ausência ou presença e extensão das metástases em linfonodos regionais e M- ausência ou presença de metástases à distância (UICC, 2011)

Tabela 1 - TNM Patológico

Tumor Primário (pT)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor invade a lâmina própria ou submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria ou suberosa
T2a	Tumor invade a muscular própria
T2b	Tumor invade subserosa
T3	Tumor invade a serosa sem invadir estruturas adjacentes
T4	Tumor invade estruturas adjacentes
Linfonodos Regionais (pN)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástase para linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 6 linfonodos regionais
N2	Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais
N3	Metástase em mais de 15 linfonodos regionais
Metástase à Distância (pM)	
MX	Presença de metástase a distância não pode ser avaliada
M0	Sem metástase à distância
M1	Com metástase à distância

Tabela 2 - Agrupamento por Estadiamento

Estadiamento		pTNM	
o			
	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2a/b	N1	M0
II	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
IIIB	T3	N2	M0
IV	T4	N1/N2/N3	M0
	T1/T2/T3	N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

1.2 MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER GÁSTRICO

O câncer pode ser definido como um conjunto complexo de doenças que difere na base e na origem do tecido, nos genes dentro do qual as mutações ocorreram, bem como nas consequências clínicas causadas pelos eventos moleculares (HANAHA; WEINBERG, 2000). A perda do controle do ciclo celular devido a alterações moleculares permite a proliferação celular descontrolada desencadeando um estado neoplásico. A maioria delas envolve modificações em genes que estão de alguma forma, envolvidos com o controle do ciclo celular (PARK; LEE, 2003).

Entre eles, estão os proto-oncogenes que atuam no estímulo do ciclo celular normal e quando na sua forma mutada ou amplificada são denominados de oncogenes, sendo observados em células tumorais (FANG et al., 1996; CHEUNG et al., 2009). Em contraste, os genes supressores de tumor atuam regulando negativamente o ciclo celular normal e estão geralmente silenciados por diversos mecanismos no câncer. Apesar do meio mais comum de perda de função desses genes ser através de mutação na estrutura do DNA, em alguns casos, pode ocorrer silenciamento destes genes por processos epigenéticos, como a hipermetilação do DNA, que é transmitida de

maneira estável por mitose (KANG et al., 2000; EBINGER et al., 2004; CHEUNG et al., 2009).

De acordo com a “hipótese dos dois eventos” proposta por Alfred Knudson em 1971, duas mutações devem ocorrer, uma em cada alelo, para desenvolver a doença. Nos tumores de caráter hereditário, uma mutação é herdada na linhagem germinativa e outra mutação, desta vez somática, é adquirida ao longo da vida. Nos tumores esporádicos, as duas mutações são somáticas e adquiridas ao longo da vida. Isso explica como alguns tipos de câncer podem ser tanto esporádicos quanto hereditários, como o retinoblastoma (KNUDSON, 1971). Hoje, sabemos que estes eventos não são apenas provocados por mutações, mas também por eventos epigenéticos tais como a metilação de região promotora.

Além de eventos a nível molecular, a segregação correta das cromátides irmãs durante a mitose também é necessária para evitar a aneuploidia, que é encontrada em muitos tumores (LENGAUER; KINZLER; VOGELSTEIN, 1998), sugerindo que a maquinaria que inspeciona o processo de segregação é comprometida de alguma forma durante o desenvolvimento desses tumores.

Apesar destes inúmeros mecanismos genéticos e epigenéticos participarem da oncogênese, alguns tumores limitam o seu crescimento a uma determinada região, estes tumores são classificados como benigno. Quando as células adquirem o comportamento invasivo, metástase, estas são classificadas como malignas ou cancerosas (CHEON; ORSULIC, 2011).

Hanahan e Weinberg (2000) sugeriram a existência de seis alterações fundamentais na fisiologia da célula para que ela adquira um fenótipo maligno. São elas: autossuficiência de sinais de crescimento; insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial replicativo ilimitado; angiogênese sustentada; e metástase.

As células tumorais não precisam de estímulos externos para se proliferar. Três estratégias moleculares são utilizadas para adquirir autonomia proliferativa: alterações nos sinais de crescimento extracelulares; transdutores dos sinais intracelulares e nos circuitos intracelulares que traduzem os sinais em ação (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000). A maioria dos fatores de crescimento celular são produzidos por uma célula, a

fim de estimular a proliferação de outra célula, processo de sinalização heterotípica. No entanto, células cancerosas adquirem a capacidade de sintetizar estes fatores de crescimento, criando assim uma estimulação autócrina (CHAFFER; WEINBER, 2011).

Outro mecanismo adquirido pelas células cancerosas é a resistência à morte celular programada ou apoptose. Esse processo de morte celular programada reconhecido por Kerr et al., (1972) ocorre em diversas situações fisiológicas e patológicas a fim de manter a homeostase tecidual (ANAZETTI; MELO, 2007). O fenômeno de apoptose pode ser ativado por uma variedade de estímulos fisiológicos, patológicos e citotóxicos. Quando iniciada, a apoptose, promove o desencadeamento de eventos intracelulares que tem com alvo a ativação de proteases, denominadas caspases (*cysteine aspartate-requiring proteinases*) (PRADELLI et al., 2010).

O câncer gástrico apresenta mecanismos moleculares descontrolados devido a alterações genéticas ou epigenéticas em oncogenes e genes supressores de tumor, e tem sido associado com os diferentes estágios da carcinogênese gástrica. Yamashita et al. estima que aproximadamente 421 genes são silenciados por hipermetilação das ilhas CpG promotoras em linhagens de células de câncer gástrico. O gene TP53, o mais extensivamente estudado gene supressor tumoral, é freqüentemente alterado em vários tipos de cânceres humanos, é encontrado mutado em 50% das neoplasias gástricas em estadios histologicamente avançados (YAMASHITA et al., 2006).

Tamura, observou no tipo difuso, alterações genéticas como a perda de heterozigosidade (LOH) e mutações no gene p53 e E-caderina (TAMURA, 2006). A hipermetilação do gene BRCA1 estar associado com o início carcinogênese gástrica (BERNAL, et al 2008) . Estudos tem associado a frequência de metilação de vários genes com a carcinogênese gástrica. A metilação do gene p16 estar presente entre 30-40% dos estudos realizados, enquanto que o gene APC estar metilado entre 53-84% (ZHAO; BUO , 2012).

1.2.1 Epigenética

Em princípio, estudos consideram que o câncer se origina através de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em genes específicos responsáveis pelo controle do ciclo celular. O termo epigenética foi utilizado pela primeira vez por Conrad

Waddington, definindo as interações entre o genoma e o ambiente que levam a formação do fenótipo (WADDINGTON, 1942). De acordo com Laird (2005), o fenômeno epigenético pode ser definido como mudança no material genético, que altera o padrão da regulação da expressão gênica de maneira herdada pelas células somáticas e, algumas vezes, também pelas células da linhagem germinativa, porém ele não é caracterizado como mutação, pois não envolve mudança na sequência de DNA. Nas últimas décadas estudos mostraram que o fenômeno epigenético está envolvido em vários processos biológicos.

As três principais alterações epigenéticas conhecidas são: metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas e ação de RNAs não codificadores (ncRNAs). Todos atuam de alguma forma na regulação e modificação da expressão gênica da célula (RODENHISER, 2009). Assim, as alterações tanto genéticas quanto epigenéticas promovem a instabilidade da homeostase celular (KNUDSON, 1971; BAYLIN et al., 1986; TAHARA, 2004).

1.3 METILAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À CACINORGÊNESE

Uma das modificações epigenéticas mais bem conhecida em eucariontes é a metilação do carbono 5 de citosinas adjacentes a guaninas, os chamados dinucleotídeos CpG. A metilação ocorre quando um grupo metil é adicionado à posição 5 do anel pirimídico da citosina (C), gerando a 5-metilcitosina, processo este catalisado pelas enzimas DNA Metiltransferases (DNMTs). Estas citosinas estão normalmente desmetiladas em genes ativamente transcritos, enquanto que as citosinas metiladas são geralmente associadas com o silenciamento do DNA (BIRD, 2002).

Em tumores humanos, o primeiro gene retratado por estar hipermetilado na ilha de CpG da sua região promotora foi o gene retinoblastoma (Rb) (GREGER et al., 1989). Desde então, diversos genes tem sido reportados como hipermetilados no câncer e a maioria deles está envolvida em diversas vias do desenvolvimento e da progressão do tumor (HERMAN et al., 1996). Muitos estudos têm correlacionado a metilação de genes responsáveis pela homeostase celular com a progressão do câncer gástrico, tais como *p16*, *hMLH1*, *DAP-kinase*, *THBS1*, *TIMP-3*, *SMARCA5*, *CDKN2A*, *ANAPC1*, *CDKN2A*, *TP53*, *RUNX3*, *GPX3*, *COX2*, dentre outros (KANG et al., 2000; KANG et al., 2001;

KANYAMA et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2007; LIMA, et al, 2007, 2008; FALCK et al., 2010; GIGEK et al., 2011).

Muitos genes envolvidos na regulação e manutenção das células impedem a proliferação, bem como o processo metastático desenvolvido pelas células cancerosas (PEÑA et al., 2010; STEWART; CROOK, 2011; KORNFELD et al., 2011). Células metastáticas podem diferir geneticamente a partir de células do tumor primário (RODENHISER, 2009).

Metástase é um processo complexo de múltiplos passos biológicos caracterizada por uma série de etapas distintas: intravasação, extravasamento e colonização. A intravasação caracteriza se pela capacidade de invasão do tecido circundante. A etapa de extravasamento da metástase ocorre no local do tumor primário, onde o processo de angiogênese fornece nutrientes e um canal através do qual as células podem se espalhar, e posteriormente colonizar novos tecidos formando um tumor secundário (CHAFFER; WEINBER, 2011).

A identificação de modificações epigenéticas, tais como a hipermetilação de genes responsáveis pela homeostase celular, pode contribuir para o diagnóstico e prognóstico da metástase. A interrupção da progressão do câncer devido a não permissão de modificações genéticas ou por meio de tratamento pode atrasar ou interromper a cascata metastática (CHAFFER; WEINBER, 2011).

As ilhas CpG hipermetiladas podem ser usadas como marcadores para identificar células cancerosas em amostras biológicas. Esta metodologia é altamente informativa, pois o perfil de genes supressores de tumor inativados por metilação é específico para cada tipo de câncer. Um único gene, ou genes combinados, que são inativados pela metilação pode ser usado como um fator prognóstico. Os genes supressores de tumor metilados podem ser reativados por agentes desmetilantes (DAS; SINGAL, 2004).

1.3.1 THBS1: Thrombospondin 1

O gene THBS1 também conhecido como TSP1, codifica a proteína thrombospondin-1 e está localizado na região cromossômica 15q15. A Thrombospondin-1 é parte da família da thrombospondin que consiste em cinco

membros, TSP1, TSP2, TSP3, TSP4 e TSP5. TSP1 e TSP2 são estruturalmente semelhantes, e elas são expressas na superfície celular durante eventos fisiológicos (TRAN, et. al 2006; GUO et al. 2010).

TSP1 foi descrita pela primeira vez por Baenziger em 1971 como uma glicoproteína de alto peso molecular secretada por plaquetas do sangue sobre a ativação da trombina (BAENZIGER et al., 1971) TSP1 é também sintetizada e segregada por vários tipos de células, incluindo osteoblastos, fibroblastos, monócitos, macrófagos, lisas células de músculo, e uma variedade de células neoplásicas (GUO et al., 2010).

Este gene codifica uma glicoproteína matricelular multifuncional, contendo domínios de interação para uma grande variedade de proteínas, receptores celulares e enzimas, e estar envolvido em inúmeros processos biológicos incluindo, adesão celular, migração, proliferação, interação célula-células, angiogênese, metástase de células tumorais, inflamação e trombooses (MAJACK et al., 1985; ADAMS; LAWLER, 2004).

A glicoproteína TSP1 influencia no comportamento celular por interação com outros componentes da matriz extracelular incluindo fator latente TGF- β 1 e com receptores de superfície celular. O papel de TSP1 na inibição da progressão do câncer estar associado à atividade antiangiogênese (ROBERTS, 1996; VOLPERT et al., 2002)

Células de câncer de mama que produz TSP1 pode exercer efeito inibitório na progressão tumoral. A inibição da angiogênese de células tumorais ocorre devido a ativação de CD36 pela TSP1 e induzindo a apoptose de células endoteliais (SASLOW, 1994).

Estudos sugerem que a metilação de regiões promotoras do gene TBHS1 está associado com o seu silenciamento. A hipermetilação deste gene tem sido encontrada em muitos carcinomas primário humanos incluindo carcinoma gástrico e câncer colo retal (LI et al., 1999; OUE et al., 2003; GUO et al., 2010)

1.3.2 GPX3: Glutathione Peroxidase 3

As células tem um sistema antioxidante que controla o balanço entre a produção e a remoção de radicais de oxigênio, importantes para a proteção contra danos oxidativos. Os mecanismos defensivos antioxidantes incluem a enzima dismutase

superoxidase, catalase e glutathione peroxidase, bem como as não enzimáticas tais como a alfa-tocopherol, beta-caroteno e vitamina C (DRÖGE, 2002). Aumento de danos induzidos pelas espécies reativas ao oxigênio (ROS) pode causar carcinogênese por mutação do DNA nuclear ou mitocondrial, ou ainda por danos estruturais de lipídios e proteínas (SIMONS et al., 2009).

O crescimento de tumor resulta também em stress oxidativo, acompanhado por um aumento das (ROS). As ROS servem como um segundo mensageiro molecular e podem resultar em uma crescente proliferação, invasão celular e angiogênese. Além disto, ROS são também conhecidos por estimular a via que pode levar a resistência de drogas pelas células cancerígenas (MEGHAN et al., 2009).

O gene GPX3 está localizado na região cromossômica 5q23. A proteína glutathione peroxidase 3 (GPX3) catalisa a redução de peróxidos e protege a célula contra danos oxidativos (TAKAHASHI, et al. 1990). A perda ou diminuição da expressão de GPX3 pode resultar em uma crescente taxa de mutação em genes que participam da homeostase celular como os genes supressores de tumores. Usualmente, o gene GPX3 é desregulado em células cancerosas, onde a sua superexpressão é inibida pelo crescimento do tumor e metástase (WANG; DUBOIS, 2010).

Estudos sugerem que a expressão deste gene pode ser alterado devido a mecanismo genéticos e epigenéticos, tais como a hipermetilação do DNA (WANG; DUBOIS, 2010; CHEN et al. 2011). Vários trabalhos tem abordado a perda da expressão de GPX3 em diversos tipos de tumores, tais como adenocarcinoma endometrial, cólon, rim, fígado, pulmão, gástrico, dentre outros (FALCK et al. 2010; WANG; DUBOIS, 2010; CHEN et al. 2011).

1.3.3 COX2: Ciclo-oxigenase 2

A ciclo-oxigenase (COX) é uma enzima que converte o ácido araquidônico em prostaglandinas. A COX1 é expressa constitutivamente em diversos tecidos e a COX2, também conhecida por PGHS (*prostaglandin endoperoxide synthase*), é induzida por citocinas, factores de crescimento, agentes mitogênicos, oncoproteínas, etc. (RAMSAY et al., 2000).

O gene do COX2 está localizado na região cromossômica 1q31.1. A sua ativação está envolvida em muitos processos que conduzem a progressão do tumor, tais como a sobrevivência, a angiogênese, proliferação, metabolismo das células neoplásicas, produção de moléculas reativas ao oxigênio, invasão e imunossupressão (WANG; DUBOIS, 2010).

A expressão aumentada do gene COX2 foi detectada em diversos tipos de tumores. Em humanos, a expressão do COX2, mas não a do gene COX1, é elevada em tecidos de câncer gástrico (SAUKKONEN et al. 2003). A enzima ciclo-oxigenase é considerada um agente terapêutico potencial na prevenção e tratamento do câncer. Mrena e colaboradores (2005) sugerem que pacientes com estágio inicial de tumor com alta expressão do COX2 tiveram maior risco de morte para câncer gástrico, do que em pacientes apresentam hipoexpressão do gene COX2.

Estudos epidemiológicos de caso-controle têm sugerido que o uso de aspirina e outros antiinflamatórios não esteroidais reduz mortalidade de câncer gástrico (ROTHWELL et al., 2011). A utilização de métodos para prevenir o câncer através da aplicação de inibidores seletivos do COX2 não é viável, uma vez que este tratamento aumenta o risco de eventos cardiovasculares (BRESALIER et al., 2005).

Várias vias podem promover a expressão do COX2 em células de câncer gástrico, incluindo a infecção de *H. pylori* e subsequente liberação de mediadores inflamatórios (THIEL et al., 2011). A metilação da região promotora de vários genes pode estar associado com inibição da expressão proteica. As utilizações de enzimas de restrição para detectar sítios metilados demonstraram uma correlação positiva entre o estágio metilado do gene COX2 com a expressão proteica, sendo esta aumentada quando o gene encontrava-se desmetilado (WANG et al., 2005). O gene COX2 tem sido considerado um oncogene, desta forma, sua expressão tem sido associado ao fenótipo invasivo e a um pobre prognóstico.

1.4 *Helicobacter pylori* E CÂNCER GÁSTRICO

A *H. pylori* consiste em uma bactéria Gram-negativa em forma de espiral (WARREN; MARSHALL, 1983). *H. pylori* uma bactéria verdadeiramente "oportunista" que usa qualquer maneira disponível para ganhar acesso ao estômago. A bactéria

normalmente entra no estômago por via fecal-oral, mas também pode ser transmitido através de alimentos contaminados ou de água (HOPKINS et al., 1993). *H. pylori* tem sido implicada em numerosas doenças gastrointestinais depois da sua associação com gastrite crônica estabelecida em 1983 por Warren e Marshall.

É amplamente difundido que a infecção por *H. pylori* é seguida pela indução de respostas inflamatórias alterações na mucosa gástrica, que pode persistir durante décadas sem causar distúrbios gástricos (BHANDARI; CROWE, 2012). No entanto, uma pequena porcentagem de pacientes adultos podem iniciar alterações inflamatórias no corpo ou antro do estômago acompanhado pelo aumento da expressão e liberação de gastrina, aumento da expressão do gene COX2, liberação de prostaglandinas, bem como numerosas alterações morfológicas e bioquímicas que levam à transformação de células da mucosa em células malignas (KONTUREK et al., 2009).

É importante ressaltar que para que a bactéria possa colonizar superfície do epitélio gástrico, ela precisa primeiramente atravessar a camada de muco espesso. A presença de flagelos unipolar ajuda a *H. pylori* a colonizar o estômago, permitindo que ela mova-se rapidamente para o lúmen gástrico, onde o pH é mais baixo do que a superfície do epitélio, permitindo boas condições de crescimento. A inflamação induzida por *H. pylori* pode progredir através de estágios pré-malignas de atrofia gástrica, metaplasia intestinal, displasia e finalmente adenocarcinoma. Esta associação *H. pylori* entre infecção e câncer gástrico foi confirmada em determinadas espécies de animais, como roedores e ratos (KONTUREK et al., 2009). Esta predisposição envolve a interação de três fatores principais: a virulência do agente (*H. pylori*), o sistema imune do hospedeiro e a fatores ambientais.

H. pylori possui enzimas, tais como urease, para manter um pH neutro no microambiente do lúmen gástrico. Além disso, existem fatores de virulência codificados por genes da bactéria *H. pylori*, que exercem diferentes tipos de ações e estão associados a uma maior agressividade da bactéria. Os principais são Cag PAI (gene associado a citotoxina) e VacA (citotoxina vacuolizadora). Cepas que possuem a cag PAI são chamadas de linhagens cagA-positivas e induzem alta titulação de anticorpos anti-proteína CagA (LUCA et al., 2004).

A ausência de manifestações clínicas em pacientes portadores de *H. pylori* levou pesquisadores investigarem se existiam cepas mais virulentas do que outras. Estas investigações chegaram à conclusão que as cepas mais virulentas da *H. pylori* tinham a capacidade de provocar alterações morfológicas, vacuolização e degenerações sucessivas em cultura de células. Esta capacidade foi relacionada à presença da proteína CagA (BARBOSA et al., 2011).

H. pylori pode ser dividida em duas classes: o tipo I possui a região Cag patogênica (*cag* PAI), e tipo II que não possui esta região (LUCA et al., 2004). Provavelmente o fator de virulência de *H. pylori* mais importante com um papel bem estabelecido na indução de inflamação da mucosa é Cag.

A prevalência da infecção varia muito ao longo de diferentes partes do mundo, com uma crescente prevalência em países em desenvolvimento e locais com nível socioeconômico mais baixo em comparação às nações desenvolvidas, onde a frequência de infecção caiu substancialmente. Fatores como a alta densidade de habitantes no lar e falta de água corrente tem sido vinculada a uma maior aquisição de infecção pela *H. pylori*.

A alta incidência de câncer gástrico em algumas regiões como a Ásia estar associado a presença de *H. pylori*. (HUR et al., 2012). No Brasil, cerca de 64% - 75% da população estão infectadas por *H. pylori*. Uma recente revisão indica que 2 milhões de casos de câncer por ano são atribuídas para a infecção com *H. pylori* (BHANDARI; CROWE, 2012).

A infecção de *H. pylori* e a dieta pouco saudável causam modificações genéticas e epigenéticas, respectivamente, nas células do estômago. De fato, os níveis mais elevados de metilação foram encontrados em pacientes que sofrem de infecção por *H. pylori*. Infecção por *H. pylori* na mucosa gástrica normal, pode causar mutações do gene p53 e/ou metilação do DNA do promotor de E-caderina, um iniciador do câncer gástrico (YAMASHITA et al., 2011).

Esta visão geral fornece evidências de que a infecção pela *H. pylori* é um dos principais fatores de riscos para o câncer gástrico e que a erradicação da mesma pode reverter muitas alterações bioquímica, genéticas e epigenética.

Em virtude da alta incidência de câncer gástrico tanto no mundo como no Brasil, do crescente uso de análogos de citosina no tratamento de neoplasias de forma indiscriminada, e dos poucos trabalhos realizados tendo como tema o valor prognóstico e preditivo da avaliação epigenética em câncer gástrico, em especial dos genes THBS1, GPX3 e COX2 e sua associação com *H. pylori*, o presente estudo permitirá a geração de informações que poderão ser usadas para propor novos métodos de intervenção na carcinogênese gástrica, bem como, melhor compreender os mecanismos moleculares envolvidos na oncogênese gástrica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Estabelecer o perfil de metilação dos genes THBS1, GPX3 e COX2 e a infecção por *H. pylori* em amostras de câncer gástrico e tecido gástrico normal.
- Associar o perfil de metilação dos genes e da infecção de *H. pylori* ao tipo e estadiamento do câncer gástrico e estabelecer seus valores prognósticos e preditivos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de metilação do gene THB1 em amostras de câncer gástrico e tecido gástrico normal;
- Determinar o perfil de metilação do gene GPX3 em amostras de câncer gástrico e tecido gástrico normal;
- Determinar o perfil de metilação do gene COX2 em amostras de câncer gástrico e tecido gástrico normal;
- Avaliar a associação da infecção de *H. pylori* com o perfil de metilação dos genes THBS1, GPX3 e COX2;

3. METODOLOGIA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

No presente estudo foram analisadas 39 amostras de câncer gástricos, do banco de amostra presente no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética – LBMEO, sendo 16 amostras de câncer gástrico tipo difuso e 23 do tipo intestinal segundo a classificação de Laurén (LAUREN, 1965) e 15 amostras de tecidos normais (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados histopatológicos das amostras de adenocarcinoma gástrico e tecidos normais.

Amostra	Idade	Sexo	Histopatologia	Estadiamento	<i>H. pylori</i>
1	52	Feminino	Difuso	T2N1Mx	negativo
2	57	Masculino	Difuso	T4N1	positivo
4	42	Masculino	Difuso	T3N1	positivo
8	45	Masculino	Difuso	T3N0	positivo
9	53	Feminino	Difuso	T3N0	positivo
14	76	Masculino	Difuso	T3N1	positivo
15	41	Feminino	Difuso	T4N1	negativo
16	46	Masculino	Difuso	T2N0	positivo
19	45	Masculino	Difuso	T3N0	positivo
20	62	Masculino	Difuso	T4N1	positivo
21	48	Feminino	Difuso	T2N0	positivo
24	60	Masculino	Difuso	T2N0	positivo
25	27	Masculino	Difuso	T3N1	negativo
31	76	Masculino	Difuso	T3N1	positivo
32	61	Masculino	Difuso	T3N1	positivo
34	62	Masculino	Difuso	T2N0	positivo
3	72	Feminino	Intestinal	T3N2	positivo
5	47	Masculino	Intestinal	T3N2	negativo
6	42	Masculino	Intestinal	T3N0	positivo
7	57	Masculino	Intestinal	T2N2Mx	positivo
10	60	Masculino	Intestinal	T3N1Mx	positivo
11	61	Feminino	Intestinal	T3N1	negativo
12	49	Masculino	Intestinal	T2N0	positivo
13	62	Masculino	Intestinal	T3N1	positivo
17	70	Masculino	Intestinal	T3N1Mx	positivo
18	49	Feminino	Intestinal	T2N0	positivo
22	71	Masculino	Intestinal	T3N1	negativo
23	73	Feminino	Intestinal	T3N1	negativo

Amostra	Idade	Sexo	Histopatologia	Estadiamento	<i>H. pylori</i>
26	66	Masculino	Intestinal	T2N0	negativo
27	59	Masculino	Intestinal	T2N1	negativo
28	72	Feminino	Intestinal	T3N0	positivo
29	64	Feminino	Intestinal	T3N1	negativo
30	56	Masculino	Intestinal	T4N1	positivo
33	54	Masculino	Intestinal	T3N0	positivo
37	63	Masculino	Intestinal	T3N0	negativo
47	59	Masculino	Intestinal	T2N1	positivo
49	63	Feminino	Intestinal	T3N1Mx	positivo
211	71	Masculino	Intestinal	T3N1	negativo
216	59	Masculino	Intestinal	T2N1	negativo
57	59	Masculino	Normal	--	positivo
72	73	Feminino	Normal	--	negativo
78	71	Masculino	Normal	--	positivo
79	55	Masculino	Normal	--	positivo
200	66	Masculino	Normal	--	negativo
201	64	Feminino	Normal	--	positivo
203	72	Feminino	Normal	--	positivo
204	62	Masculino	Normal	--	negativo
205	56	Masculino	Normal	--	positivo
300	45	Masculino	Normal	--	negativo
305	64	Feminino	Normal	--	positivo
304	61	Masculino	Normal	--	negativo
307	71	Masculino	Normal	--	positivo
308	56	Masculino	Normal	--	positivo
309	66	Masculino	Normal	--	positivo

3.2. ASPECTOS ÉTICOS

Atendendo à Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Ministério da Saúde, 2003), que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos, este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEPHC-FMRP) e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), em Brasília. O presente trabalho foi avaliado e aprovado pelo CEPHC-FMRP sob o número 12479/2004 (Anexo A).

Os pacientes ou seus responsáveis legais foram informados da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), autorizando a

utilização das amostras. Foram excluídos do estudo indivíduos, por qualquer razão ou motivo, tenham a sua capacidade de autodeterminação reduzida, sobretudo no que se refere ao TCLE ou por livre e espontânea vontade não concordarem em participar do projeto. Todas as mostras foram codificadas com o intuito de resguardar o direito a privacidade dos seus doadores.

3.3. EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras foram submetidas à extração do DNA, no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LBMEO). Amostras de aproximadamente 1 cm³ de tecidos neoplásicos e normais, foram submetidas ao processo de maceração após criopreservação (-196°C em nitrogênio líquido). Depois de pulverizada, cada amostra foi transferida para um tubo de centrífuga e foram adicionados 5 mL de tampão de extração (Tris 1M; EDTA 0,5 M; NaCl 5 M), 50 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 0,5 mL de SDS 20%. O tubo foi agitado por inversão até a obtenção de uma mistura completamente homogênea e em seguida incubada em banho-maria a 37°C *overnight* ou a 57°C por 3 horas.

Decorrido este tempo, foram adicionados de 3 a 5 mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Neste novo passo, a mistura sofreu inversões suaves por aproximadamente 5 minutos para a completa homogeneização. A solução homogeneizada foi centrifugada a 3000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um outro tubo de centrífuga, onde foram adicionados 3 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Este tubo também sofreu inversões suaves até sua homogeneização. Após centrifugação a 3000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, no qual foi adicionado um volume de acetato de amônio 7.5 M equivalente a um terço do volume do sobrenadante e acrescentado um volume de etanol absoluto gelado, que correspondeu a três vezes o volume do sobrenadante.

Para obtenção do DNA, o frasco foi agitado suavemente por diversas vezes e centrifugado a 10000rpm por 15 minutos até a precipitação do DNA. O DNA foi lavado em etanol absoluto e ressuspendido em 100-500 µL de água Milli-Q estéril. As amostras onde o DNA não foi visualizado foram congeladas *overnight* e, em seguida,

centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos. Logo depois, foram lavadas com etanol absoluto, ressuspendidas (*pellet*) com água Milli Q e estocadas em freezer a -20°C .

3.4. VALIDAÇÃO *IN SÍLICO*

3.4.1. Determinação de ilhas CpG

As regiões de Ilha CpG correspondentes a região promotora mais a sequência do primeiro éxon de cada gene de interesse (figura 2, 3 e 4), foram determinadas com o auxílio do programa *MethPrimer* (LI; DAHIYA, 2002).

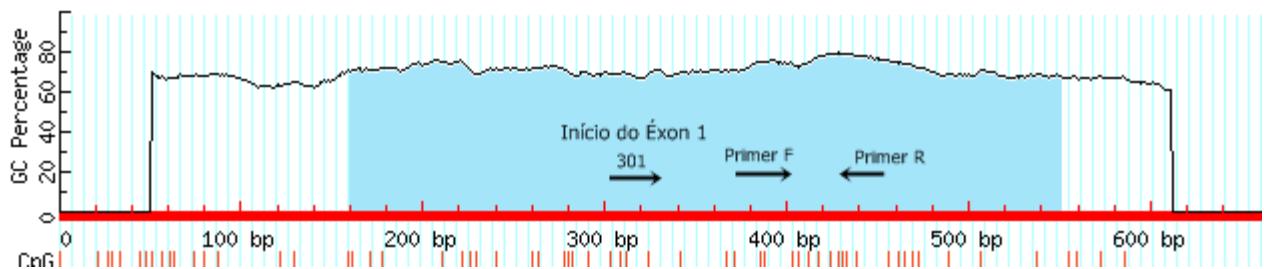


Figura 2. Localização do primer do gene THBS1 em 50% de ilhas CpG. As bases representadas no eixo horizontal não representa a posição das bases na sequência do gene.

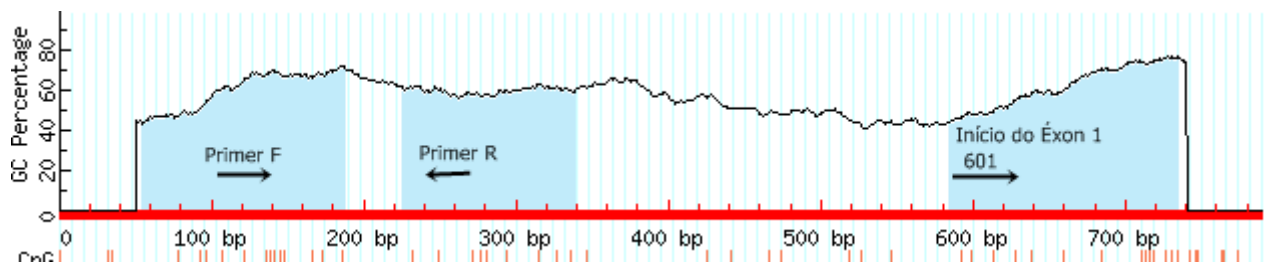


Figura 3. Localização do primer do gene COX2 em 50% de ilhas CpG. As bases representadas no eixo horizontal não representa a posição das bases na sequência do gene.

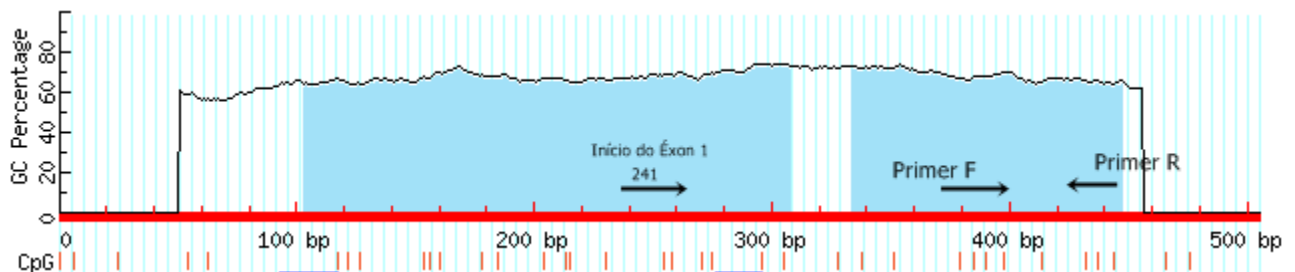


Figura 4. Localização do primer do gene GPX3 em 50% de ilhas CpG. As bases representadas no eixo horizontal não representa a posição das bases na sequência do gene.

3.5 MSRE-PCR (*Methylation-Sensitive Restriction Enzyme PCR*) e desenho dos iniciadores

A técnica utilizada foi a MSRE-PCR (*Methylation-Sensitive Restriction Enzyme PCR*). Esta técnica consiste em um método clássico de análise de metilação com base na propriedade de algumas enzimas de restrição serem capazes de cortar regiões metiladas. As enzimas izoesquizômeros *HpaII* e *MspI* reconhecem a sequência 5' CCGG 3'. A enzima *HpaII* reconhece quando citosina interna estiver metilada (C⁵mCGG) e não cliva a sequência. A enzima *MspI* funciona como um controle positivo, pois corta tanto a sequência metilada quanto a não metilada. Os iniciadores usados foram desenhados com o auxílio do programa *MethPrimer* (LI; DAHIYA, 2002) Ensembl e Gene Runner, criado especialmente para construção de oligonucleotídeos para PCR, flanqueando o sítio de corte das enzimas (Tabela 4).

Tabela 4 - Os iniciadores utilizados para técnica MSRE-PCR.

Gene	Primer	Sequência	Posição	Tamanho	Tm/°C
THBS1	THBS1 F	5'- GCAACCTCTACTCCGGAC -3'	+55/+155	101pb	54°C
	THBS1 R	5'-CTTACCTGTGTGTACCGGAG-3'			
COX2	COX2 F	5'- TACAGACCAGACACGGCG-3'	-328/ -477	150pb	62°C
	COX2 R	5'- CGAGAGCCAGTTCTGGAC-3'			
GPX3	GPX3 F	5' TCCTGGCCGGCTTCGTCT 3'	+133/ +221	89pb	54°C
	GPX3 R	5' CTAGGTTTTTCTCCCGGCC 3'			

Para cada amostra foi feita tais condições para o tratamento com as enzimas: entre 0,1µg-0,05 µg de DNA genômico, de 5U a 10U da enzima (*HpaII* e *MspI*, separadamente), RE 10X Buffer, Acetylated BSA 10µg/µl e completado com água em um volume final de 20µl. O controle negativo foi utilizado a mesma quantidade de DNA das amostras que foram tratadas e completado com água para um volume final de 20µl. Em seguida foi submetido a uma temperatura de 36°C por 16h. Após este tempo, a temperatura foi alterada para 65°C por 15 minutos para a inativação da enzima.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µl contendo 200µM de dNTPs (deoxinucleotídeo trifosfato), 2.0 mM de MgCl₂ (Cloreto de magnésio), entre 10 e 50 ng de DNA, 200pM de cada primer (tabela 1) e 0.5U AmpliTaq GOLD (Applied

Biosystems, Foster City, CA). As condições da PCR para amplificação dos genes foram as seguintes: uma desnaturação prévia por 5 minutos a 94°C e 35 ciclos de 94°C por 40 segundos e uma temperatura variando para cada gene (tabela 4) por 1 minuto e 72°C por 40 segundos, com uma extensão final de 5 min a 72°C. A figura 5 mostra o esquema de visualização do gel das amostras tratadas com as enzimas *HpaII*, *MspI* e das amostras sem as enzimas (branco).

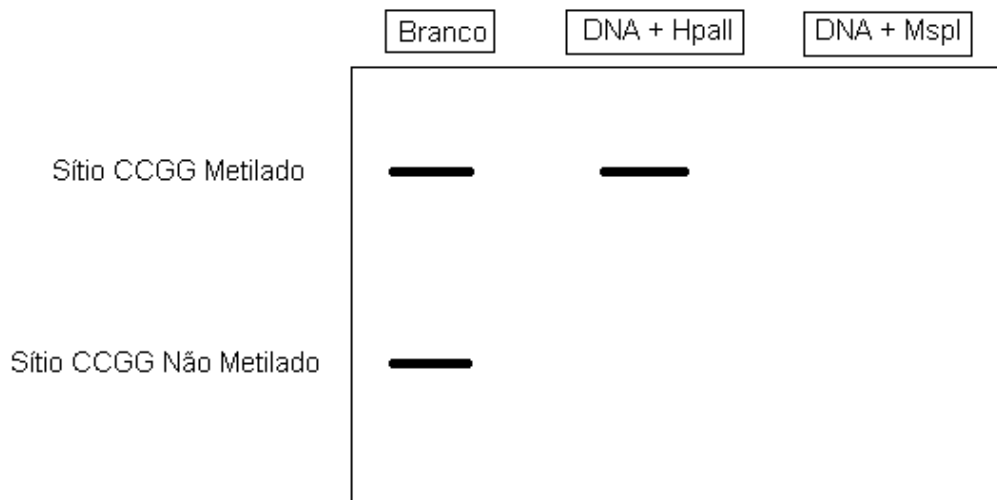


Figura 5 - Esquema de visualização do gel com as amostras tratadas com as enzimas *HpaII* e *MspI*. No sítio CCGG metilado a enzima *HpaII* não corta a sequência, ocorrendo a amplificação. No sítio CCGG não metilado a enzima corta a sequência, não ocorrendo amplificação. Já a enzima *MspI* reconhece ambos os sítios e corta independente da metilação, funcionando como um controle de corte do sítio.

3.6 IDENTIFICAÇÃO DE *H. pylori* POR PCR

Para o diagnóstico de *H. pylori* nas amostras de câncer gástrico, foi utilizado a técnica de PCR para a amplificação de um fragmento de 150 pb, referente ao fragmento da fração 16S do rRNA bacteriano. Foram utilizados os oligonucleotídeos F 5'-CTGGAGARACTAAGYCCTCC-3' e R 5'-GAGGAATACTCATTGCGAAGGCGA-3', descritos por Scholte et al. (1997). As condições da PCR foram 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 59°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. Foi considerado diagnóstico positivo a visualização do fragmento.

3.7 ELETROFORESE E GEL

As corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida na concentração de 8% a partir de uma solução de acrilamida 30% (sistema 29:1), contendo 5% de glicerol, tampão TBE 10X (Tris 0,7M, Ácido Bórico 1,1M, EDTA 0,4M), persulfato de amônia (0,02g) e Temed (15 μ l), a 20°C, durante aproximadamente 2 horas. Para a corrida, foi utilizado 500ml de tampão de corrida (TBE 1X). Foi utilizado 4 μ l do DNA amplificado e 4 μ l de corante blue (0,25% azul bromofenol, 0,25% xileno cianol 7ml de glicerol).

Após a corrida, o gel foi colocado em recipiente e adicionado um volume de 200 mL de uma solução fixadora (etanol 18%; ácido acético glacial 0,75%, concentrações finais) por 5 minutos; após este tempo, adicionado 2 mL de uma solução de nitrato de prata a 10% por 2 minutos; os géis foram, então, lavados com água por aproximadamente 1 minuto. Na etapa seguinte de coloração, os géis foram submetidos a um processo de revelação em meio básico (NaOH 9%; formaldeído 0,3%). Logo após o processo de revelação, os géis foram fotografados.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar os valores prognósticos e preditivos do perfil de metilação dos genes, GPX3, THBS1 e COX2 em adenocarcinoma gástrico e associar o perfil de metilação dos genes com a infecção de *H. pylori* e ao tipo de estadiamento do câncer gástrico, foram realizadas análises estatísticas utilizando o teste exato de Fisher do software BioEstat 5.0. Foi considerado significativo $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Foram analisadas 54 amostras de origem gástrica, sendo 16 amostras de câncer gástrico tipo difuso, 23 amostras do tipo intestinal e 15 amostras de tecido gástrico normal. Das 39 amostras de câncer gástrico analisadas 49% (n=19) apresentaram pelo menos um gene metilado.

A técnica de *Methylation-Sensitive Restriction Enzyme PCR* revelou que a hipermetilação dos genes COX2, THBS1 e GPX3 ocorreu em 36% (n=14), 5% (n=2) e 18% (n=7), das amostras de câncer gástrico, respectivamente (Tabela 5 e Figura 6, 7 e 8).

Tabela 5 - Análise do perfil de metilação dos genes associados a carcinogênese gástrica.

Amostras	THBS1	GPX3	COX2	* <i>H.pylori</i>
1□				
2□				
4□				
8□				
9□				
14□				
15□				
16□				
19□				
20□				
21□				
24□				
25□				
31□				
32□				
34□				
3□				
5□				
6□				
7□				
10□				
11□				
12□				
13□				
17□				
18□				
Amostras	THBS1	GPX3	COX2	* <i>H.pylori</i>

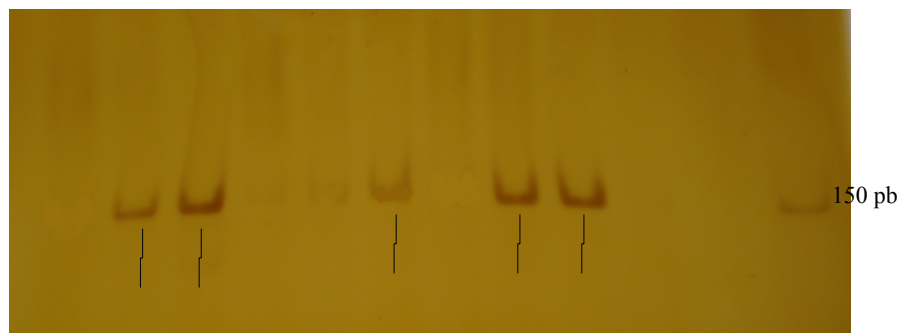


Figura 6. Amplificação do gene COX2 das amostra 57 de tecido normal (metilada) e das amostras 1 (não metilada) e 8 (metilada) de câncer gástrico em gel de poliacrilamida a 8%, corado com prata. Br = Branco da reação; B = DNA + água (controle negativo da enzima), H = DNA + enzima *HpaII*; M = DNA + enzima *MspI* (controle positivo da enzima).

AMOSTRA 57 AMOSTRA 9 AMOSTRA 1
 57M 57H 57B Br 9M 9H 9B 1M 1H 1B Br Lader

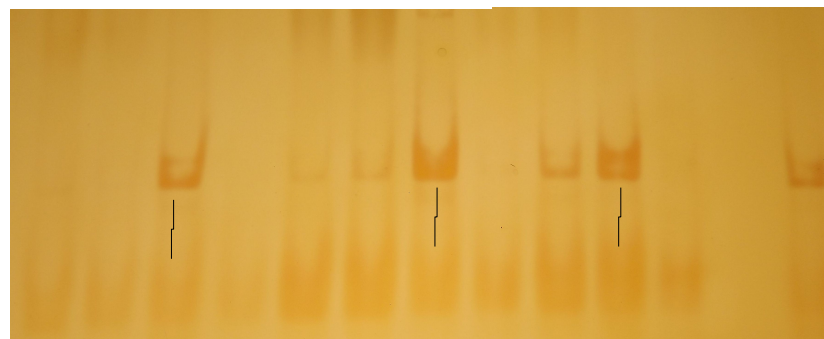


Figura 7. Amplificação do gene THBS1 da amostra 57 de tecido normal (não metilada) e das amostras 9 (não

metilada) e 1 (metilada) de câncer gástrico em gel de poliacrilamida a 8%, corado com prata. Br = Branco da reação; B = DNA + água (controle negativo da enzima), H = DNA + enzima *HpaII*; M = DNA + enzima *MspI* (controle positivo da enzima).

AMOSTRA 57 AMOSTRA 30 AMOSTRA 1
 57M 57H 57B 30M 30H 30B 1M 1H 1B Br Lader

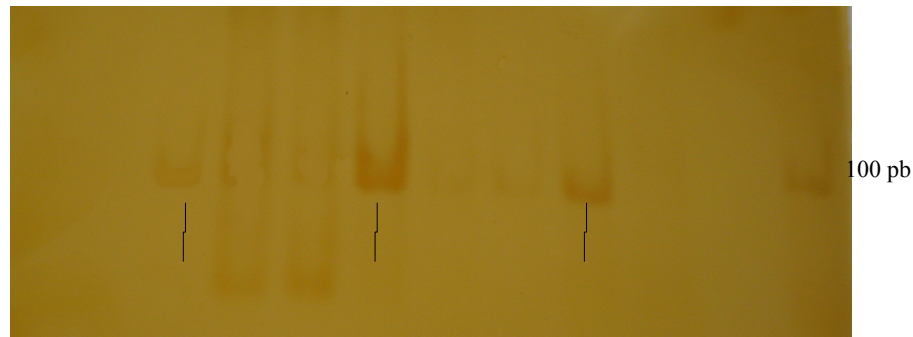


Figura 4. Amplificação do gene GPX3 da amostra 57 de tecido normal (não metilada) e das amostras 30 e 1 (não metilada) de câncer gástrico em gel de poliacrilamida a 8%, corado com prata. Br = Branco da reação; B = DNA + água (controle negativo da enzima), H = DNA + enzima *HpaII*; M = DNA + enzima *MspI* (controle positivo da enzima).

Apesar do percentual do perfil de metilação encontrado no gene COX2 ter sido 36% nas amostras de câncer gástrico contra 67% nos tecidos normais (tabela 8), não houve significância estatística entre o perfil de metilação deste gene ao tipo de tumor ($p=0,179$), ao estágio ($p=0,739$), à presença de metástase nos linfonodos ($p=0,269$) e à metástase distante ($p=0,213$).

Tabela 8 - Características de gênero, clinicopatológicas, e da presença de *H. pylori* associadas com o perfil de metilação do gene COX2.

	Gene COX2			
Variável	Total	Metilado	Não Metilado	p valor
Gênero				
Feminino	11	5 (45%)	6 (55%)	0,478
Masculino	28	9 (32%)	19 (68%)	
Tecido				
Normal	15	10 (67%)	5 (33%)	0,066
CG	39	14 (36%)	25 (64%)	
Classificação Lauren				
Intestinal	23	6 (26%)	17 (74%)	0,179
Difuso	16	8 (50%)	8(50%)	
Estágio				
I/II	15	6 (40%)	9 (60%)	0,739
III/IV	24	8 (33%)	16 (67%)	
Metastase nos linfonodos				
Presente	25	7 (28%)	18 (72%)	

Ausente	14	7 (50%)	7 (50%)	0,269
Metastase distante				
Presente	0			
Ausente	34	13 (38%)	21 (62%)	
Não distinguida	5	1 (20%)	4 (80%)	0,636
H. pylori				
Presente	26	11 (42%)	15 (58%)	
Ausente	13	3 (23%)	10 (77%)	0.303

A análise de metilação do gene THBS1 não mostrou significância entre o gênero ($p=0,0742$), ao tipo de tumor ($p=1,000$), ao estágio ($p=1,000$), a presença de metástase nos linfonodos ($p=0,527$) e a presença de metástase distante ($p=0,242$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Características de gênero, clinicopatológicas, e da presença de *H. pylori* associadas com o perfil de metilação do gene THBS1.

	Gene THBS1			
Variável	Total	Metilado	Não Metilado	p valor
Gênero				
Feminino	11	2 (18%)	9 (82%)	0,0742
Masculino	28	0 (0%)	28 (100%)	
Tecido				
Normal	15	1 (7%)	14 (93%)	0,981
CG	39	2 (5%)	37 (95%)	
Classificação Lauren				
Intestinal	23	1 (4%)	22 (96%)	1,000
Difuso	16	1 (6%)	15 (94%)	
Estágio				
I/II	15	1 (6,6%)	14 (93,4%)	1,000
III/IV	24	1 (4,2%)	23 (95,8)%	
Metastase nos linfonodos				
Presente	25	2 (8%)	23 (92%)	0,527
Ausente	14	0 (0%)	14 (100%)	
Metastase distante				
Presente	0	0	0	

Ausente	34	1 (3%)	33 (93%)	0,242
Não distinguida	5	1 (20%	4 (80%)	
<i>H. pylori</i>				
Presente	26	1 (4%)	25 (98%)	1,000
Ausente	13	1 (7,6%)	12 (92,4%)	

Também não foi encontrada associação entre o perfil de metilação do gene GPX3 com o gênero ($p=0,379$), ao tipo de tumor ($p=1,000$), ao estágio ($p=0,999$), a presença de metástase nos linfonodos e metástase distante ($p=0,684$) e ($p=0,213$) respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7 - Características de gênero, clinicopatológicas, e da presença de *H. pylori* associadas com o perfil de metilação do gene GPX3.

Gene GPX3				
Variável	Total	Metilado	Não Metilado	p valor
Gênero				
Feminino	11	3 (27%)	8 (77%)	0,379
Masculino	28	4 (14%)	24 (86%)	
Tecido				
Normal	15	2 (13%)	13 (87%)	1,000
CG	39	7 (18%)	32 (82%)	
Classificação Lauren				
Intestinal	23	2 (9%)	21 (91%)	0,100
Difuso	16	5 (31%)	11 (79%)	
Estágio				
I/II	15	3 (20%)	12 (80%)	0,999
III/IV	24	4 (16%)	20 (84%)	
Metastase nos linfonodos				
Presente	25	5 (20%)	20 (80%)	0,684
Ausente	14	2 (14%)	12 (86%)	
Metastase distante				
Presente	0			
Ausente	34	5 (15%)	29 (85%)	

Não distinguida	5	2 (40%)	3 (60%)	0,213
<i>H. pylori</i>				
Presente	26	6 (23%)	20 (77%)	
Ausente	13	1 (7,7%)	12 (92,3%)	0,388

H. pylori estava presente em 67% (n=26) das amostras de câncer gástrico e nas amostras normais também apresentaram um percentual de (67%/n=10) (Figura 6). Os dados analisados não demonstraram uma associação significativa entre a presença de *H. pylori* com amostras de câncer gástrico ($p=0,999$), quando comparadas às amostras normais.

Tabela 9 - Características de gênero, clinicopatológicas, associadas à presença de *H. pylori*.

	<i>H. pylori</i>			
Variável	Total	Positivo	Negativo	<i>p valor</i>
Gênero				
Feminino	11	6 (55%)	5 (45%)	p=0,452
Masculino	28	20 (71%)	8 (29%)	
Tecido				
Normal	15	10 (67%)	5 (33%)	p=0,999
CG	39	26 (67%)	13 (33%)	
Classificação Lauren				
Intestinal	23	13 (56%)	10 (44%)	p=0,169
Difuso	16	13 (81%)	3 (19%)	
Estágio				
I/II	15	10 (67%)	5 (33%)	p=1,000
III/IV	24	16 (67%)	8 (33%)	
Metastase nos linfonodos				
Presente	25	14 (56%)	11 (44%)	p=0,088
Ausente	14	12 (86%)	2 (14%)	
Metastase distante				
Presente	0			p=0,6478
Ausente	34	22 (65%)	12 (35%)	
Não distinguida	5	4 (80%)	1 (20%)	



Figura 6. Amplificação referente ao fragmento da fração 16S do rRNA de *H. pylori* das amostra 57 de tecido normal, da amostra 1 de câncer gástrico (*H. pylori* positivo). Amostra 2 não amplificou (ausência de *H. pylori*). Gel de poliacrilamida a 8%.

5. DISCUSSÃO

O silenciamento gênico mediado por eventos epigenéticos tais como a metilação do DNA é um importante fenômeno molecular relacionado ao desenvolvimento embrionário e diferenciação de tecidos, quando alterado pode estar associado à formação e progressão tumoral. O presente trabalho examinou a metilação de ilhas CpG nas regiões promotoras de três genes, todos com um importante envolvimento na via molecular da carcinogênese. Estes genes incluem COX2 (progressão do tumor), THBS1 (atividade antiangiogênica) e GPX3 (atividade antioxidativa), sendo bastante estudados em células tumorais (GUO et al., 2010; WANG; DUBOIS, 2010; CHEN et al., 2011).

Este estudo mostrou que um percentual de 36% das amostras de câncer gástrico encontravam-se metiladas o gene COX2. Silva, et al., (2010) ao analisarem o perfil de metilação de diferentes genes, obteve 91% das amostras de câncer gástrico com genes COX2 metilado. A análise do perfil de metilação de ilhas CpG da linhagens celulares SUN-601, estabelecida a partir de uma amostra de câncer gástrico, obteve resultados semelhantes (SONG et al., 2001). Ferrasi, et al. 2010, estudaram a metilação do gene COX2 e outros genes em amostras de adenocarcinoma gástrico, e obtiveram um percentual 63,5%. Nossos resultados não apresentaram associação entre o estado de metilação e as variáveis clinicopatológicas, bem como seus valores prognósticos. No entanto, trabalhos tem associado o perfil de metilação deste gene com o seu valor prognóstico. XU, et. al. (2004) analisaram o perfil de metilação de 31 genes em amostras de câncer de colorretal onde o gene COX2 apresentou um percentual de 74%

das amostras metiladas. Houve associação entre a hipermetilação destes genes e a ausência de expressão do gene COX2 nas amostras analisadas (XU, et al., 2004).

A correlação entre a metilação de COX2 e a desregulação deste gene tem sido encontrada na literatura, embora a hiperexpressão de COX2 também tem sido relatada em tecidos de câncer gástrico (CHANG, et al. 2004). O perfil de metilação do gene COX2 nas 39 amostras de câncer gástrico analisadas apresentou o padrão não metilado em 64% (n=25) das amostras. Este resultado corrobora com os resultados obtidos por Wang et al, (2005), onde o mesmo demonstrou que a COX2 não está metilado na maior parte dos casos de câncer gástrico.

Estudos sugerem a existência de hipometilação de proto-oncogenes e hipermetilação de genes supressores na carcinogênese gastrointestinal (RODENHISER, 2009). A COX2 é conhecida como uma proteína oncogênica. Muitos trabalhos tem relatado sua expressão aumentada em células tumorais, quando comparadas com tecidos normais. A mucosa gástrica humana expressa normalmente, níveis dificilmente detectáveis da proteína do COX2 – o gene estará, em princípio, metilado. No entanto, esta proteína tem sido identificada como estando hiperexpressa em câncer gástrico, sugerindo que o gene não se encontra metilado, constituindo assim um fator importante no crescimento e desenvolvimento de câncer gástrico (SHI, et al., 2003; XUE, et al., 2003).

A superexpressão de COX2 está associada com a melhor proliferação, angiogênese, resistência à apoptose e tumorigênese (CHANG, et al. 2004). SHI, et. al. (2003) avaliaram o valor prognóstico da expressão de COX2 e VEGF em 281 amostras de câncer gástrico, esse estudo revelou que a taxa de sobrevida em 5 anos de pacientes com expressão de COX-2 ou de VEGF foi significativamente mais baixa do que a dos pacientes sem a expressão de COX-2 ou de VEGF. A superexpressão da COX-2 e VEGF em doentes com carcinoma gástrico pode aumentar a possibilidade de invasão e metástase, implicando um mau prognóstico (SHI, et al., 2003).

Nossos resultados não corroboraram com esses estudos, pois apesar de ser observado que em 64% das amostras de câncer gástrico o gene Cox2 não estava metilado, não foi possível associar com as variáveis clinicopatológicas nem com a

agressividade do tumor. A avaliação da expressão proteica poderia ser utilizada como recurso para auxiliar neste estudo.

O gene THBS1 tem um importante papel na angiogênese, uma característica indispensável para a proliferação e metástase das células tumorais. Seu papel é fundamental, pois inibe a formação dos vasos sanguíneos devido à manutenção da liberação de VEGF. Em pacientes com câncer, há uma desregulação do controle da angiogênese, com o aumento de VEGF e diminuição de TSP1, favorecendo angiogênese tumoral e a inflamação (FLEITAS, et al., 2012). A inibição da angiogênese de células tumorais também ocorre devido a ativação de CD36 pela TSP1 e induzindo a apoptose de células endoteliais (SASLOW, 1994). Os resultados deste trabalho demonstraram que 5% das amostras de câncer gástrico estavam com o gene THBS1 metilado e apenas 7% nas amostras de tecido normal. Guo, et. al., (2010) encontraram o padrão metilado do gene THBS-1 em 35,4% das amostras de câncer gástrico, e apenas 3,1% de tecido normal, sendo significativamente ($P<.001$) maior em tecido do tumor comparado com o tecido normal. Neste trabalho, a frequência de metilação foi significativamente alta nos estágios III e IV ($P=0.04$) do que nos estágios I e II. Guo, et. al. (2010) não encontraram associação entre o perfil de metilação do gene THBS1 aos tipos histológicos ($P=0.55$) (GUO, et. al., 2010). O resultado deste trabalho não encontrou correlação entre o perfil de metilação do gene THBS1 ao estadiamento, ao tipo histológico, a presença de *H. pylori* nas amostras de adenocarcinoma nem com as amostras normais. Estudos realizados por Oue, et al., (2003) apresentaram também um percentual significativo de amostras de THBS1 metiladas, porém, o nível de expressão de mRNA não foi associado com o estágio TNM e nem ao tipo histológico (OUE, et al., 2003).

Uma análise comparativa da metilação entre câncer gástrico primário e metastático observou que o perfil de metilação do gene THBS1 não foi significativamente diferente nesses tecidos (KIM, et al., 2009). Outros estudos sugerem que não há associação do tipo tumoral ao perfil de metilação do gene THBS1. Aydemir et al., (2012) ao analisarem o perfil de metilação do THBS1 em amostras de meningiomas, observaram que nenhuma amostra apresentava padrão metilado (AYDEMIR, et al., 2012).

Nossos resultados não apresentaram associação entre o estado de metilação do gene THBS1 e as variáveis clinicopatológicas. Portanto, com base nos resultados obtidos sugerimos que o gene THBS1 não pode ser usado como biomarcador para o número amostral estudado. Este gene tem sido utilizado como biomarcadores em outros tipos de tumores como câncer de cabeça, pescoço e câncer de mama (SEPIASHVILI, et al., 2012; SUH, et al., 2012).

Espécies reativas ao oxigênio (ROS) são constantemente geradas por processos metabólicos e exposições ambientais. ROS induz danos ao DNA levando a destruição da integridade genômica, e isto tem sido uma importante causa de câncer humano. A proteína glutathione peroxidase 3 (GPX3) catalisa a redução de peróxidos e protege a célula contra danos oxidativos juntamente com a dismutase superoxidase (SOD) e catalase (CAT). Assim, o silenciamento de GPX3 poderia prejudicar a defesa contra compostos genotóxicos endógenos e exógenos que potencializam taxas de mutação em genes. Muitos trabalhos tem associado a perda da expressão deste gene à carcinogênese gástrica (JEE et al., 2009; ZHANG et al., 2010). No entanto, o resultado deste estudo não mostraram associação entre o perfil de metilação do gene GPX3 as diferentes variáveis clinicopatológicas estudadas (Tabela 7).

Em corroboração com o nosso resultados, Jee, et al. (2009) analisaram o perfil de metilação de seis genes em três linhagens de câncer gástrico (SNU-1, -601, e -719). Apesar do gene GPX3 estar metilado em 30,1% das amostras, nenhuma correlação foi encontrada entre o estado de metilação destes genes e as variáveis clinicopatológica (JEE et al., 2009). Os resultados obtidos por Chen, et. al. (2011) demonstraram que pacientes com HNSCC (Head and neck squamous cell carcinoma) também não apresentaram correlação entre o perfil de metilação do gene GPX3 ao estadiamento. Porém, obteve uma correlação significativamente alta ($p=0,0142$) a respostas de quimioterápicos, onde 82,6% que não apresentavam o gene GPX-3 metilado responderam o tratamento com uma completa ou redução parcial do tumor.

Nossos dados não apresentaram associação entre o estado de metilação do gene GPX3 em amostras de câncer gástrico e tecido normal no número amostral estudado, outros trabalhos tem associado o seu papel como biomarcadores em linhagens de carcinoma de células escamosas do esôfago (ESCC) (HE, et al., 2011).

Nas linhagens de ESCC a expressão de mRNA foi desregulada nas ilhas CpG metiladas da região promotora de GPX3. O tratamento com agentes desmetilantes 5-Aza-dC restaurou a expressão de GPX3. Da mesma forma, as amostras de tecidos estudadas demonstraram um perfil de metilação superior nas amostras de câncer de ESCC (71,4%) quando comparadas com tecidos normais (10,7%), sendo correlacionado com a desregulação da expressão de GPX3 ($p \leq 0,001$). A expressão da proteína GPX3 foi significativamente mais baixa em amostras de tecido de tumor ECSS quando comparadas com amostras de tecido normal. Neste trabalho, gene a desregulação através da hipermetilação do GPX3 em ESCC pode ser um potencial biomarcador em carcinoma de células escamosas do esôfago (HE, et al., 2011).

Vários outros fatores podem estar associado a mecanismo de perda ou deficiência de expressão gênica, tais como perda de heterozigosidade. Além de estudar o perfil de metilação, Yu et. al., (2007) indicaram que o gene GPX3 além de metilado, estava deletado (hemizigose ou homozigose) em 39% das amostras de câncer de próstata estudada.

Mais estudos sobre o padrão de metilação de outros genes poderiam ajudar a expor o perfil de metilação das amostras de câncer gástrico estudadas e de outros tumores, e conseqüentemente, guiar a um profundo entendimento da patogênese da doença, garantindo assim uma melhor compreensão do prognóstico e considerando novas opções de tratamento.

A infecção no estômago por *H. pylori* é associado com o aumento do risco de câncer gástrico. Infecção por *H. pylori* na mucosa gástrica normal, pode causar mutações do gene p53 e/ou metilação do DNA do promotor de E-caderina, hMLH1, um iniciador do câncer gástrico (YAMASHITA et al., 2011).

Os resultados obtidos neste estudo identificaram a presença de *H. pylori* em 67% das amostras de câncer gástrico pela técnica de PCR para a amplificação de uma fragmento de 150 pb, referente ao fragmento da fração 16S do rRNA bacteriano (figura 6). A presença de *H. pylori* não foi associada ($p > 0,05$) a nenhuma variável clinicopatológica, nem a valores de metilação dos genes em estudos (Tabela 9). No entanto, a maioria dos indivíduos infectados pela *H. pylori* permanecem assintomáticos,

entre 10 a 20% vão desenvolver úlcera péptica e apenas 1% evoluirão para o câncer gástrico (ERNST et al., 2006).

A avaliação da presença de *H. pylori* em pacientes com câncer gástrico é fundamental para o prognóstico. A taxa de sobrevivência em 5 anos aumentou para 60 anos, devido a uma maior taxa de diagnósticos precoce através da triagem em massa programas em áreas de alta incidência de câncer gástrico coincidindo com áreas epidêmicas *H. pylori*. Ainda neste estudo, foi avaliado o efeito de *H. pylori* no prognóstico de pacientes na Coreia com alta taxa de infecção. Dos 149 pacientes, 85,5% eram soro positivo para *H. pylori*, apesar disto, não obteve nenhuma correlação entre características clinicopatológicas e infecção por *H. pylori* (HUR, et al. 2012).

Estudos descobriram que existem cepas mais virulentas do que outras, aquelas que possuem o fator de virulência Cag (GIORDANO; CITO, 2012). Modelos animais têm sido utilizados para uma melhor compreensão do papel dos fatores de virulência da *H. pylori*. Em um modelo de camundongo transgênico, demonstrou-se que a expressão de CagA em camundongos induziram vários tumores, hiperplasia epitelial gástrica, pólipos hiperplásicos, carcinomas gastrointestinais e doenças hematológicas malignas, como leucemia mielóide e Linfoma de célula B. (OHNISHI et al., 2008). A avaliação do fator de virulência CagA poderia ser utilizado como recurso para auxiliar neste estudo.

O número amostral avaliado no presente trabalho dificultou as análises estatísticas, tendo em vista que não foi observado significância com nenhuma análise realizada. No entanto, um dado relevante foi observado entre o perfil de metilação do gene COX2 das amostras de câncer gástrico comparadas com tecido gástrico normal ($P=0,06$). Em amostras de câncer gástrico este gene encontra-se não metilado (64%) quando comparado com amostras normais, sugerindo assim que o estado do gene metilado é mais observado em amostras normais. Este dado pode ser tendencioso para um dado significativo caso o número amostral aumente.

Apesar de nenhum dos genes estudados tenham sido associados com as amostras de câncer gástrico, vários outros fatores, não apenas epigenéticos, poderiam contribuir para a formação de células tumorais, como, presença de *H. pylori*, álcool, hábitos alimentares, cigarros, etc. (TERRY et al., 2011).

A variação geográfica pode resultar na incidência e taxa de mortalidade, indicando que fatores ambientais e estilo de vida tem um importante papel na etiologia do câncer gástrico. Os resultados de estudos recentes supõe uma associação entre o consumo frequente de álcool e o risco de câncer gástrico em homens (EVERATT, et al., 2012)

Modificações celulares resultantes de substâncias químicas presentes nos cigarros têm sido amplamente investigadas em adultos, onde provocam danos ao DNA, evidenciados por mutações genéticas, micronúcleos, alterações cromossômicas, trocas de cromátides irmãs e quebras de cadeias de DNA (DEMARINI, 2004). Além disso, estudos revelam importante papel da nicotina ou NNK (nitrosamina derivado de nicotina) na patogênese do câncer através de processos celulares como proliferação celular, angiogênese e EMT (transição mesenquimal-epitelial) um importante fator na invasão tumoral. (CHU et al., 2013).

6. CONCLUSÃO

1. O estado de metilação dos genes THBS1, GPX3 e COX2 não foi significativamente diferente em câncer gástrico quando comparado com as amostras normais.
2. Os resultados sugerem que não há associação entre o perfil de metilação dos genes THBS1, GPX3 e COX-2 e as variáveis clinicopatológicas nas amostras analisadas;
3. Os resultados sugerem que não há associação entre o perfil de metilação dos genes THBS1, GPX-3 e à presença de *H. pylori*.
4. Os resultados sugerem que não há associação entre a presença de *H. pylori* nas amostras de câncer gástrico e os dados clinicopatológicos nas amostras analisadas.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS J. C.; LAWLER J. "The thrombospondins," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 36, n. 6, p. 961–968, 2004.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*, v. 01, n. 01, p. 37-58, 2007.
- AYDEMIR, F.; YURTCU, E.; BALCI, T.B.; SAHIN, F.I.; GULSEN, S.; ALTINORS N. Identification of promoter region methylation patterns of MGMT, CDKN2A, GSTP1, and THBS1 genes in intracranial meningioma patients. *Genet Test Mol Biomarkers*. V.16, n.5, p.335-40, 2012.
- BAENZIGER, N. L.; BRODIE, G.N.; MAJERUS, P.W., "A thrombinsensitive protein of human platelet membranes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 68, n. 1, p. 240–243, 1971.
- BARBOSA, J. A.; SCHINONNI, M. I. *Helicobacter pylori*: Associação com o câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. *Revista de Ciências Médicas e Biológica.*, v.10, n.3, p.254-262, 2011.
- BAYLIN, S.B; HOPPENER, J.W.; DE BUSTROS A; et al,. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Research*, v.46, n.6, p.2917-22, Jun. 1986.
- BERNAL, C. et al. Reprimo as a Potential Biomarker for Early Detection in Gastric Cancer *Clin Cancer Res*, v.14, p. 6264-6269, 2008.
- BHANDARI, A.; CROWE, S. *Helicobacter pylori* in Gastric Malignancies. Current Gastroenterology Reports. v. 14, p.489–496, 2012.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. v.16, p.6-21, 2002.
- BRESALIER, R. S.; SANDLER, R. S.; QUAN, H.; BOLOGNESE, J. A.; OXENIUS, B., HORGAN, K., et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *The New England Journal of Medicine*, v.352, n.11, p.1092–1102, 2005.
- CHAFFER, C.L.; WEINBERG, R.A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*, v.331, 2011.
- CHANG, Y.J.; WU, M.S.; LIN, J.T.; SHEU, B.S.; MUTA, T.; INOUE, H.; CHEN, C.C. Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor kappaB activation. *Molecular Pharmacology*, v.66, p.1465-1477, 2004.

CHEN, B.; XI R. D; MICHAEL, G.; HOUSE, KENNETH, P.; NEPHEW, K. J. CULLEN, GUO, Z. GPx3 promoter hypermethylation is a frequent event in human cancer and is associated with tumorigenesis and chemotherapy response. *Cancer Letters*. v.309, p.37–45, 2011.

CHEON, D.J.; ORSULIC, S. Mouse Models of Cancer. *Annual Review of Pathology-mechanisms of Disease*. v. 6, p.95–119, 2011.

CHEUNG, H. H; LEE, T.L.; RENNERT, O.M.; CHAN, W.Y. DNA Methylation of Cancer Genome. *Birth Defects Research*. v.87, p.335–350, 2009.

CHU, K.M.; CHI, H; CHO, V.; SHIN, Y. Nicotine and Gastrointestinal Disorders: Its Role in Ulceration and Cancer Development. *Current Pharmaceutical Design*, v.19, p.5-10, 2013.

CORREA, P., SHIAO, Y. H. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. *Cancer Research*, v.54, p.1941-1943, 1994.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins: *PATOLOGIA Estrutural e Funcional*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DAS, P. M.; SINGAL, R. DNA Methylation and Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 22, p.4632-4642, 2004.

DEMARINI, D.M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutation Research*, v.74 p.567:447, 2004.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological Reviews*, v.82, p. 47–95, 2002.

EBINGER, M.; SENF, L.; WACHOWSKI, O.; SCHEURLIN, W. Promoter Methylation Pattern of Caspase-8, P16INK4A, MGMT, TIMP-3, and E-Cadherin in Medulloblastoma. *Pathology Oncology Research*. v.10, p.17-21, 2004.

ERNST, P. B.; PEURA, D. A.; CROWE, S. E. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. *Gastroenterology* , v.130, n.1, p.188–206, Jan. 2006.

EVERATT, R.; et al. Alcohol consumption and risk of gastric cancer: a cohort study of men in Kaunas, Lithuania, with up to 30 years follow-up. *BMC Cancer*, v.12 p.1-12, 2012.

FALCK, E.; SANDRA K.; JESSICA C.; GISELA H.; MATS K.; KARIN KLINGA-LEVAN. Loss of glutathione peroxidase 3 expression is correlated with epigenetic mechanisms in endometrial adenocarcinoma. *Cancer Cell International*, v.10, P.1-9, 2010.

FANG, J.Y.; ZHU, S.S.; XIAO, S. D., et al. Studies on the hypomethylation of *cmyc*, *c-Ha-ras* oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v.11, p.1079–1082, 1996.

FERRASI, A.C.; PINHEIRO, N.A.; et al, *Helicobacter pylori* and EBV in gastric carcinomas: Methylation status and microsatellite instability. *World Journal of Gastroenterology*, v.16, p.312-319, 2010.

FLEITAS, T.; MARTÍNEZ-SALES, V.; VILA, V.; REGANON, E.; MESADO, D.; MARTÍN, M.; GO´MEZ-CODINA, J.; MONTALAR, J.; REYNE´S, G. VEGF and TSP1 levels correlate with prognosis in advanced non-small cell lung cancer. *Clinical and Translational Oncology*. 2013.

GIGEKE, C.O. et al. SMARCA5 Methylation and Expression in Gastric Cancer. *Cancer Investigation*, v. 29, p.162–166, 2011.

GIORDANO, A.; CITO, L. Advances in gastric cancer prevention *World Journal of Clinical Oncology*, v.3, p.128-136, 2012.

GREGER, V.; PASSARGE, E. et al. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Human Genetics*, v.83, p.155-8, 1989.

GUIMARÃES, A.C.; LIMA, E.M.; KHAYAT, A.S. et al. Interrelationships among chromosome aneuploidy, promoter hypermethylation, and protein expression of the CDKN2A gene in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, v. 179, p.45-51, 2007.

GUO, W.; DONG, Z.; HE, M, GUO, Y.; GUO, J.; CHEN, Z.; YANG, Z.; KUANG G. AberrantMethylation of Thrombospondin-1 and Its Association with Reduced Expression in Gastric Cardia Adenocarcinoma. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*,V.2010, p.1-10, 2010.

HANAHAN, D; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v.100, p.57–70, 2000.

HE, Y.; WANG, Y.; LI, P.; ZHU, S; WANG, J.; ZHANG, S. Identification of GPX3 Epigenetically Silenced by CpG Methylation in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*, v.6, p.681–688, 2011.

HERMAN, J.G.; GRAFF, J.R; MYOHANEN, S; et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.93, n.18, p.9821-6, 1996.

HOPKINS, R.J.; VIAL P.A.; FERRECCIO, C., et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables many serve as one route of transmission. *The Journal of Infectious Diseases*, v.168, p.222 -226, 1993.

HUR, H. et al. The Effects of *Helicobacter pylori* on the prognosis of patients with curatively resected gastric cancers in a population with high infection rate. *Journal of the Korean Surgical Society*, v.83, p.203-211, 2012.

INCA (2012) Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Disponível. em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/lancamento_estimativa_2012 >. Acesso em: 2012.

INCA (2013) Estimativa 2013: incidência de câncer no Brasil. Disponível. em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/lancamento_estimativa_2013 >. Acesso em: 2013.

JEE, C.D.; KIM, M.A.; JUNG, E.J.; KIM, J.; KIM, W.H. Identification of genes epigenetically silenced by CpG methylation in human gastric carcinoma. *European Journal of Cancer*, v.45, p.1282-1293, 2009.

KANG, G.H.; SHIM, Y.H.; JUNG, H.Y.; KIM, W.H.; RO, J.Y.; RHYU, M.G. CpG Island Methylation in Premalignant Stages of Gastric Carcinoma. *Cancer research*, v.61, p.2847–2851, 2001.

KANG, S. H. *et al.* Transcriptional inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene by DNA hypermethylation of the 59-CpG island in human gastric cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, v. 86, p. 632–635, 2000.

KANYAMA, Y.; HIBI, K.; NAKAYAMA, H *et al.* Detection of p16 promoter hypermethylation in serum of gastric cancer patients. *Cancer Science*, v.94, p. 418-420, 2003.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, v.26, p. 239–257, 1972.

KIM, J.H.; JUNG, E.J.; LEE, H.S.; KIM, M.A.; KIM, W.H. Comparative analysis of DNA methylation between primary and metastatic gastric carcinoma. *Oncology Reports*, v.21, p.1251-9, 2009.

KNUDSON, A.G. JR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.68, n.4, p.820-3, Apr. 1971.

KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKI T. Helicobacter Pylori Infection In Gastric Cancerogenesis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v.60, p.3-21. 2009.

KORNFELD, J.W. *et al.* Overexpression of TACE and TIMP3 mRNA in head and neck cancer: association with tumour development and progression. *British Journal of Cancer* v. 104, p.138 – 145, 2011.

LAIRD, P.W. Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet*, v.14, p.65-76, 2005.

LAUREN, P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*, v.64, p.31-49. 1965.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, v.386, p.623–627, 1997.

LI L-C; DAHIYA, R. Methprimer: designing primers for methylation pcrs. *Bioinformatics* v.18, p.1427-1431, 2002.

LI, Q.; AHUJA, N.; BURGER, P.C.; ISSA, J.P. Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene*, v.18, p. 3284-3289, 1999.

LIMA, E.M.; LEAL, M.F.; BURBANO, R.R. et al. Methylation status of ANAPC1, CDKN2A and TP53 promoter genes in individuals with gastric cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, p. 549, 2008.

LIMA, E.M.; LEAL, M.F.; MOTTA, F.J.N. et al. Study of Methylation Pattern of de Novo DNA Methyltransferase Genes and its Correlation with DNA Methylation Pattern of RUNX3 in Individuals with Gastric Cancer from Northern Region of Brazil. *International Journal of Morphology*, v. 25, p. 817, 2007.

LUCA, A.; IAQUINTO, G. *Helicobacter pylori* and gastric diseases: a dangerous association. *Cancer Letters*. V.15, p.1-10, 2004.

MAJACK, R. A.; COOK, S. C.; BORNSTEIN, P. "Platelet-derived growth factor and heparin-like glycosaminoglycans regulate thrombospondin synthesis and deposition in the matrix by smooth muscle cells," *Journal of Cell Biology*, v. 101, n. 3, p. 1059–1070, 1985.

MEGHAN, B. A.; YONGQIANG, C.; SPENCER, B. G. Regulation of Autophagy by Reactive Oxygen Species (ROS): Implications for Cancer Progression and treatment. *Antioxidants & Redox signaling*, V.11, Number 4, 2009.

MRENA, J.; WIKSTEN, J.P.; THIEL, A, et al: Cyclooxygenase- 2 is an independent prognostic factor in gastric cancer and its expression is regulated by the messenger RNA stability factor HuR. *Clinical Cancer Research*, v.11, p.7362-7368, 2005.

OHNISHI, N. et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. V.105, n. 3, p. 1003–1008, Jan. 2008.

OUE, N.; MATSUMURA, S.; NAKAYAMA, H.; et al., "Reduced expression of the TSP1 gene and its association with promoter hypermethylation in gastric carcinoma," *Oncology*, v. 64, n. 4, p. 423–429, 2003.

PARK, M. T.; LEE, S. J. Cell cycle and cancer. *Journal of biochemistry and molecular biology*, n.1, p.60-5, 2003.

PARKIN, D.M.; BRAY, F. FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 55, p.74–108, 2005.

PEÑA, S.; SAMPIERI, C.L. et al. Metaloproteasas de la matriz extracelular como marcadores moleculares en cáncer gástrico. *Medicina Clínica* v. 134, p.123–126, 2010.

PRADELLI, L.A.; BÉNÉTEAU, M.; RICCI, J.E. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.67, p.1589–97, 2010.

RAMSAY, R.G.; FRIEND, A.; VIZANTIOS, Y.; FREEMAN, R.; SICURELLA, C.; HAMMETT, F.; ARMES, J.; VENTER, D.; Cyclooxygenase-2, a colorectal cancer nonsteroidal anti-inflammatory drug target, is regulated by c-MYB. *Cancer Research*, v.60, p.1805-1809, 2000.

ROBERTS, D. D. "Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1," *FASEB Journal*, v. 10, n. 10, p. 1183– 1191, 1996.

RODENHISER, D.I. Epigenetic contributions to cancer metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*. v.26, p.5–18, 2009.

ROTHWELL, P.M; FOWKES, F.G.; BELCH, J.F.; OGAWA, H.; WARLOW, C. P.; MEADE, T.W. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomized trials. *Lancet*, v.377, p.31–41, 2011.

SASLOW, D. L. W.; ZABRENETZKY, V. S.; VANHOUTTE K.; W. A. FRAZIER, ROBERTS D. D.; STEEG, P. S., "Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis," *Cancer Research*, v. 54, n. 24, p. 6504–6511, 1994.

SAUKKONEN, K.; RINTAHAKA, J.; SIVULA, A.; BUSKENS, C. J.; VAN REES, B. P.; RIO, M. C.; et al. Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, v.11, p.915–925, 2003.

SCHOLTE, G.H. ; VAN DOORN, L.J. ; QUINT, W.G. ; LINDEMAN, J. Polymerase Chain Reaction for detection of *Helicobacter pylori* in formaldehyde-sublimate fixed, paraffin-embedded gastric biopsias. *Diagnostic Molecular Pathology*, v.6, p. 238-243, 1997.

SEPIASHVILI, L.; HUI, A.; IGNATCHENKO, V.; SHI, W.; et al. Potentially Novel Candidate Biomarkers for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Identified Using an Integrated Cell Line-based Discovery Strategy. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 11. p.1404-1415, 2012.

SHI, H.; XU, J.M.; HU, N.Z.; XIE, H.J. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*, v.9, p.1421-1426, 2003.

SILVA, M.; AZENHA, D.; PEREIRA, C.; ALMEIDA, A.; BALSEIRO, S.; SAMPAIO, A. M.; SANTOS, P.; CARVALHO, L. CARCINOMA GÁSTRICO E GASTRITE CRÓNICA Regulação Epigenética por Metilação dos genes CDH1 (Caderina-E), CDKN2A (p16INK4A) PTGS2 (COX2) e EGFR. *Acta Médica Portuguesa*. V.23, p.005-014, 2010.

SIMONS, A.L.; MATTSON, D.M.; DORNFELD, K.; SPITZ, D.R. Glucose deprivation-induced metabolic oxidative stress and cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v.5, p.1-6, 2009.

SONG, S.H.; JONG, H.S.; CHOI, H. H.; et al: Transcriptional silencing of Cyclooxygenase-2 by hyper-methylation of the 5' CpG island in human gastric carcinoma cells. *Cancer Research*, v.61, p.28-35, 2001.

STEWART, C.J.R.; CROOK, M.L. CD147 (EMMPRIN) and matrix metalloproteinase-2 expression in uterine endometrioid adenocarcinoma. *Pathology – Research and Practice*. v. 207, p.30–36, 2011.

SUH, E. J.; KABIR, M. H.; KANG, U.B.; LEE, J.W.; YU, J; NOH, D.Y.; LEE, C. Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and BRWD3 as serological biomarkers. *Experimental and Molecular Medicine*, v.44, p. 36-44, 2012.

TAHARA E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Scientific Publications Series*, n.157, p.327-49. 2004.

TAKAHASHI, K., AKASAKA, M., YAMAMOTO, Y., KOBAYASHI, C., MIZOGUCHI, J., KOYAMA, J. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *The Journal of Biochemistry*. v.108, p.145-148, 1990.

TAMURA, G. “Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer.” *World J Gastroenterol* , v.12, p.192-8, 2006.

TERRY, M.B.; et al. DNA methylation in white blood cells. Association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics*, v.6, p.828-837, 2011.

THIEL, A.; MRENA, J.; RISTIMÄKI, A. Cyclooxygenase-2 and Gastric Cancer. *Cancer Metastasis Rev*, v.30, p.387–395, 2011.

TRAN, M. D.; NEARY, J. T. Purinergic signaling induces thrombospondin-1 expression in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.103, p. 9321-9326, 2006.

UICC. Union for International Cancer Control. 2011: Disponível em: www.uicc.org.

VOLPERT, O. V.; PILI, R.; SIKDER, H. A.; NELIUS, T.; ZAICHUK, T.; MORRIS, C.; SHIFLETT, C.B.; DEVLIN, M.K.; CONANT, K.; ALANI, R.M. Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer cell*. V.2, p. 473-483, 2002.

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

WANG, B.; GUO, C.Q.; SUN, C.; SUN, Q.L.; LIU, G.Y.; LI, D.G. Mechanism and clinical significance of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. v.11, n.21, p.3240-3244, 2005.

WANG, D.; DUBOIS, R.N. Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptors in chronic inflammation and colorectal cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, v.39, p.697-707, 2010.

XU, X.L.; YU, J.; ZHANG, H.Y.; SUN, M.H.; GU, J.; DU, X.; SHI, D.R.; WANG, P., YANG, Z.H.; ZHU, J.D. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, v. 10, p.3441-3454, 2004.

XUE, Y.W.; ZHANG, Q.F.; ZHU, Z.B.; WANG, Q.; FU, S.B. Expression of cyclooxygenase-2 and clinicopathologic features in human gastric denocarcinoma. *World J Gastroenterol* v.9, n.2, p.250-253, 2003.

YAMASHITA K, SAKURAMOTO S, WATANABE M. Genomic and epigenetic profiles of gastric cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Surgery Today*. v.41, p.24-38, 2011.

YAMASHITA, K.; PARK, H.L; KIM, M.S; OSADA, M.; TOKUMARU, Y.; INOUE, H.; MORI, M.; SIDRANSKY, D "PGP9.5 Methylation in Diffuse type Gastric Cancer." *Cancer Research* v.66, p.3921-3927, 2006.

YU, Y.P.; YU, G.; TSENG, G.; CIEPLY, K.; NELSON, J.; DEFRANCES, M.; ZARNEGAR, R.; MICHALOPOULOS, G.; LUO, J.H. Glutathione Peroxidase 3, Deleted or Methylated in Prostate Cancer, Suppresses Prostate Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Res*, v.67, p.8043-8050, 2007.

ZHANG, X.; YANG, J.J.; KIM, Y.S.; KIM, K.Y.; AHN, W.S.; YANG, S: An 8-gene signature, including methylated and down-regulated glutathione peroxidase 3, of gastric cancer. *International Journal of Oncology*, v.36, p.405-414, 2010.

ZHAO, C.; BU, X. Promoter methylation of tumorrelated genes in gastric carcinogenesis. *Histol Histopathol* v.27, p.1271-1282, 2012.

ANEXOS

ANEXO A - (CEPHC-FMRP sob o número 12479/2004)



CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 10 de dezembro de 2004

Ofício nº 3411/2004
CEP/SPC

Prezado Senhor:

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM LESÕES PROLIFERATIVAS DO ESTÔMAGO”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 194ª Reunião Ordinária realizada em 06/12/2004, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 12479/2004.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.



PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
ELEONIDAS MOURA LIMA
PROFª DRª CACILDA CASARTELLI (Orientadora)
Laboratório de Oncogenética – FMRP-USP
Em mãos

ANEXO C – Artigo submetido à revista

Title page

Authorship: **Cynthia Farias Vieira de Melo**, Rubistenia Miranda de Araújo, Juarez Nóbrega da Silva, Carolina Oliveira Giguek, Marília de Arruda Cardoso Smith, Rommel Mario Rodríguez Burbano, **Eleonidas Moura Lima**

Title: Analysis of genes methylation profile *THBS1*, *GPX3* and *COX2* in samples and gastric cancer

Short Title: Profile of methylated genes in gastric cancer

Cynthia Farias Vieira de Melo, Juarez Nóbrega da Silva and Rubistenia Miranda Soares de Araújo, Graduate Program in Cellular and Molecular Biology and Laboratory of Structural Molecular Biology and Oncogenetics – LBMEQ, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba UFPB, 58051-900, João Pessoa-PB, Brazil.

Eleonidas Moura Lima, Laboratory of Structural Molecular Biology and Oncogenetics – LBMEQ, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba UFPB, 58051-900, João Pessoa-PB, Brazil.

Carolina Oliveira Giguek and Marília de Arruda Cardoso Smith, Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo, 04023-900, São Paulo, SP, Brazil.

Rommel Mario Rodríguez Burbano, Department of Biology, Center of Biological Sciences, 66075-110, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil.

Author contributions: Melo CFV, Araújo RMS, Silva JN and Lima EM designed, performed the research and analyzed the data; Burbano RMR, Giguek CO and Smith MAC provided specimens; contributed new reagents and contributed to the histopathological analyses.

Supported by CNPq and CAPES, Brazil

Correspondence to: **Eleonidas Moura Lima**, Laboratory of Structural Molecular Biology and Oncogenetics – LBMEQ, Department of Molecular Biology, CCEN, Federal University of Paraíba UFPB, s/n, 58051-900, João Pessoa – PB, Brazil, eleonidas@pq.cnpq.br / eleonidas@dbm.ufpb.br

Telephone and Fax: Telephone +55-83- 3216-7436

Fax: +55-83- 3216-7436

ABSTRACT

To verify the methylation status of *THBS1*, *GPX3* and *COX2* genes and to evaluate their association with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) in gastric adenocarcinomas. Methylation-Sensitive Restriction Enzyme PCR (MSRE-PCR) assay was performed in 39 gastric carcinomas (intestinal and diffuse types) and 15 normal stomach tissue samples. The presence of *H. pylori* was performed by amplification of the fragment of the 16S rRNA. Statistical analyses were performed using Fisher's exact test. The hypermethylation of *GPX3*, *THBS1* and *COX2* occurred in 18% (n = 7), 5% (n = 2) 36% (n = 14) of gastric cancer samples, respectively, whereas in normal samples was found in 13%, 7% and 67%. The presence of *H. pylori* was detected in 67% of gastric cancer samples and 67% in normal gastric samples. The methylation status of the *THBS1*, *GPX3* and *COX2* significantly was not different between CG and normal samples, with the presence of *H. pylori* or with clinicopathologic variables studied ($P \geq 0,05$). The presence of *H. pylori* was not associated with any clinicopathologic variables.

Key words: Gastric cancer, Methylation, *TBBS1*, *COX2*, *GPX3*, *H. pylori*

INTRODUCTION

Cancer is the second leading cause of death in the Brazilian population. For 2012, the estimated number of new cases was approximately 518,510 in Brazil, therefore is considered a public health issue [1]. Gastric cancer is one of the most frequent occurrences of cancer worldwide. Its etiology is multifactorial previously associated with various factors such as dietary habits, environmental factors, genetic and epigenetic mechanisms and gastric infection by *Helicobacter pylori* [2,3].

Aberrant DNA methylation is a common molecular alteration in carcinomas, and mostly occurs in CpG islands of gene promoters. It can affect expression of genes involved in cell cycle control, therefore having an effect on proliferation and metastatic process observed in cancer cells [4-6].

Many genes have been reported as aberrantly methylated in cancer and most of them is involved in several pathways in the development and progression of the tumor [7]. Studies have correlated the methylation of genes responsible for cellular homeostasis with the progression of gastric cancer, such as *p16*, *hMLH1*, *DAP-kinase*, *THBS1*, *TIMP-3*, *SMARCA5*, *CDKN2A*, *ANAPC1*, *CDKN2A*, *TP53*, *RUNX3*, *GPX3*, *COX-2*, and others [8-14].

The high incidence of gastric cancer in some regions, such as Asia, is associated with the presence of *H. pylori* [15]. In Brazil, about 70% of the population is infected with *H. pylori*. A recent review indicates that 2 million new cases of cancer per year are attributed to infection with *H. pylori* [16].

The aim of this study is to establish the DNA methylation of *COX2*, *THBS1* and *GPX3* genes that are involved in gastric carcinogenesis and related to tumor progression, antiangiogenic and antioxidative activity [17-19] and its association with *H. pylori* infection and clinicopathological data.

MATERIALS AND METHODS

Samples

In the present study we analyzed 39 samples of gastric cancer from the Laboratory of Structural Molecular Biology and Oncogenetics – LBMEO. Among these, 16 were diffuse type gastric cancer samples and 23 intestinal type according to the classification of Laurén [20]. Moreover, we analyzed 15 samples of normal gastric tissue.

Patients were informed of the study and signed an informed consent form authorizing the use of samples. This study was evaluated and approved by Research and Ethics Committee of the Hospital - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - USP (CEPHC-FMRP) under number 12479/2004. All tissues were frozen in liquid nitrogen immediately after tumor resection and

stored at -80°C. Genomic DNA was isolated by proteinase K digestion and phenol-chloroform extraction methods and stored at -20 °C.

Methods

This method for distinguishing methylated from unmethylated sequences in the gene is based on cutting the DNA by MSRE-PCR (Methylation-Sensitive Restriction Enzyme PCR) using enzymes HpaII and MspI (Promega Corporation, Madison City, WY) and subsequently amplifying the gene fragment by PCR using primers specific to sequences flanking the restrictive enzyme cut sites.

The primers used were 5'-TACAGACCAGACACGGCG-3' (sense) and 5'-CGAGAGCCAGTTCTGGAC-3' (antisense) (TM=62°C) and 150pb product for *COX2*; 5'-TCCTGGCCGGCTTCGTCT-3' (sense) and 5'-CTAGGTTTTTTCTCCCGGCC-3' (antisense) (TM=54°C) and 89pb product for *GPX3*; and 5'-GCAACCTCTACTCCGGAC-3' (sense) and 5'-CTTACCTGTGTGTACCGGAG-3' (antisense) (TM=54°C) and 101pb product for *THBS1*.

Briefly, about 0.1 mg of genomic DNA was incubated with 10U of HpaII or MspI enzymes in a final volume of 20µL for 16 h at 37 ° C. The HpaII enzyme does not cut this sequence when methylated, but the enzyme MspI serves as a positive control cutting both methylated and unmethylated sequences.

PCR was performed using primers described above, under the following conditions: 200 µM dNTP (deoxynucleotide triphosphate), 2.0 mM MgCl₂ (magnesium chloride), between 10 and 50 ng of the digested DNA with enzyme MspI or HpaII, of 200pm each primer and 0.5U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA). Amplification was carried out for 35 cycles at 94 °C for 40 s, at 54-62 ° C depending on the gene for 60 s, at 72 °C for 40 s, and a final extension at 72 ° for 5 min. Four microliters of PCR products was loaded on an 8% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate.

A positive *H. pylori* detection in gastric cancer samples was considered for a PCR amplification of a 150bp fragment of the bacterial 16S rRNA. We used the primers 5'-CTGGAGARACTAAGYCCTCC F-3' and 5'-GAGGAATACTCAT TGCGAAGGCGA R 3', described by [21]. Suitable conditions for PCR were 40 cycles of denaturation at 94 ° C for 1 min, annealing at 59 ° C for 1 min, and extension at 72 ° C for 1 min.

Statistical analysis

Fisher's exact test was used, $P < 0.05$ was considered statistically significant. All analysis were performed using BioEstat 5.0 software.

RESULTS

DNA methylation was analyzed in 54 gastric samples: 16 diffuse type gastric cancer, 23 intestinal type and 15 normal gastric tissue samples. Among the 39 gastric cancer samples, 22 (58%) had at least one methylated gene. The technique Methylation-Sensitive Restriction Enzyme PCR revealed that the hypermethylation of *GPX3*, *THBS1* and *COX2* occurred in 18% (n = 7), 5% (n = 2) 36% (n = 14) samples of gastric cancer, respectively. Moreover, the 15 normal tissue samples showed a methylation profile similar to gastric cancer. The gene was found to be methylated *GPX3* in 13% (n = 2) of samples, *THBS1* in 7% (n = 1) and *COX2* in 67% (n = 10) (Fig. 1, 2 and 3). Table 1 summarizes all the results and the correlations between methylation profile of studied genes and clinicopathological characteristics.

No correlation was observed between the methylation of these genes in adenocarcinoma and normal samples ($P \geq 0.05$). *THBS1* and *GPX3* showed no significant correlation between DNA methylation and gender ($P = 0.0742$; $P = 0.379$, respectively), type of tumor ($P = 1$; $P = 1$, respectively), stage ($P = 1$; $P = 0.999$, respectively), presence of lymph node metastasis ($P = 0.527$; $P = 0.684$, respectively) and the presence of distant metastasis ($P = 0.242$; $P = 0.213$, respectively).

Although the percentage of methylation profile found in the *COX2* gene was 36% in the samples of gastric cancer, there was no statistical significance between the methylation profile of this gene to tumor type ($P = 0.179$), stage ($P = 0.739$), in the presence of lymph node metastasis ($P = 0.269$) and distant metastasis ($P = 0.213$).

H. pylori was observed in 67% (n = 26 and n=10) of both gastric cancer and normal gastric tissue samples (Fig. 4). Table 2 summarizes the results obtained from analysis *H. pylori* with clinicopathological variables. The analyzed data showed no significant association between the presence of *H. pylori* with gastric cancer samples ($P = 0.999$) when compared to normal samples.

DISCUSSION

The gene silencing mediated by epigenetic events such as DNA methylation is an important molecular phenomenon to embryonic development and tissue differentiation, however, when altered can be associated with tumor formation and progression. This study examined the methylation of CpG islands in the promoter regions of three genes, each with a particular role in the molecular pathway of carcinogenesis. These include *COX2*, *THBS1* and *GPX3*, being extensively studied in tumor cells [17-19].

The gene *THBS1* encodes the protein Thrombospondin-1 which is a multifunctional glycoprotein matricellular containing areas of interaction with a large variety of proteins, cellular

receptors and enzymes, being involved in numerous biological processes including cell adhesion, migration, proliferation, cell- cells, angiogenesis, tumor cell metastasis, inflammation and thrombosis [22,23]. It has a critical role in inhibit formation of blood vessels due to maintenance release of VEGF. In cancer patients there is a deregulation of angiogenesis, with increased VEGF and decreased TSP1, promoting tumor angiogenesis and inflammation [24].

Hypermethylation of this gene has been found in many human primary cancers including gastric carcinoma and colorectal cancer [25-27]. Our results demonstrated that 33% of gastric cancer samples were methylated within *THBS1* gene promoter and only 7% in samples of normal tissue. Guo, et. al., (2010) found the pattern of methylated gene THBS-1 in 35.4% of samples of gastric cancer, and only 3.1% of normal tissue, which was significantly ($P<0.001$) higher in tumor tissue compared with the normal tissue, and the frequency of methylation significantly higher in stages III and IV ($P=0.04$) than in stages I and II. Guo, et. al. [15] found no association between the methylation profile of the gene *THBS1* and histological types [15]. We also found no correlation between the methylation profile of the gene *THBS1* and staging, histological type or presence of *H. pylori* in samples adenocarcinoma or in normal samples. Report by Oue et al. [26] presented also a significant percentage of samples methylated THBS1, however, the level of mRNA expression was not associated with TNM stage or histological type.

Other studies suggest that there is no association between tumor type profile of gene methylation of *THBS1*. Aydemir et al. [28] by analyzing the methylation profile of *THBS1* in meningiomas found that the sample showed unmethylated pattern [28]. Our results showed no association between methylation status and *THBS1* and clinicopathological characteristic. Therefore, we suggest that the gene *THBS1* cannot be used as a biomarker for the gastric cancer. This gene has been used as biomarkers in other types of tumors such as cancer of the head, neck and breast cancer [29,30].

The protein Glutathione peroxidase 3, encoded by *GPX3*, catalyzes the reduction of peroxides and protects cells against oxidative damage [13]. Reactive oxygen species (ROS) are constantly generated by metabolic processes and environmental exposures. ROS induces DNA damage leading to destruction of genomic integrity, and this has been a major cause of human cancer. The loss or decreased expression of *GPX3* may result in an increased rate of mutation in genes involved in cellular homeostasis as tumor suppressor genes. Several studies have addressed the loss of expression of *GPX3* by methylation of the promoter region in several types of tumors, such as endometrial adenocarcinoma, colon, kidney, liver, lung, gastric, and others [13,18,19]. However, our results showed no association between the methylation profile of this gene and the clinicopathological variables studied (Table 1).

In corroboration of our findings, Jee et al. [31] analyzed the methylation profile of six genes in three strains of gastric cancer (SNU-1, -601, and -719). Despite the gene *GPX3* be methylated in 30.1% of samples, no correlation was found between the methylation status of these genes and the clinicopathological variables [31]. The results obtained by Chen, et. al. [19] demonstrated that patients with HNSCC (Head and neck squamous cell carcinoma) also showed no correlation between gene methylation profile and staging. However, achieved a significantly high correlation ($P = 0.0142$) responses to chemotherapy where that 82.6% had no *GPX3* methylated responded to treatment with a full or partial reduction of the tumor.

Our data showed no association between the methylation status of the gene *GPX3* in samples of gastric cancer and normal tissue in the sample size studied, other studies have associated their role as biomarkers in strains of squamous cell carcinoma of the esophagus (ESCC) [32]. Several other factors may be associated with the mechanism of loss or defect of gene expression, such as loss of heterozygosity. Besides studying the methylation profile, [33] indicated that the methylated gene *GPX3* besides, was deleted (hemizygous or homozygous) in 39% of prostate cancer samples studied.

Cyclooxygenase (COX) is an enzyme that converts arachidonic acid into prostaglandins. The *COX2* gene encodes a protein involved in many important processes leading to tumor progression, such as angiogenesis survival, proliferation, metabolism of the neoplastic cells, production of reactive oxygen molecules, invasion and immunosuppression [18]. Mrena and colleagues [34] suggest that patients with early-stage tumors with high expression of *COX2* had a higher death risk for gastric cancer than in patients with downregulation of *COX2* gene. Increased expression of *COX2* gene was detected in several types of tumors and is considered an oncogene, and thus its expression has been associated with the invasive phenotype and a poor prognosis [35].

Studies suggest the existence of hypomethylation of proto-oncogenes and hypermethylation of tumor suppressor genes in carcinogenesis gastrointestinal [36]. *COX2* is known as an oncogenic protein. The profile of gene methylation in 39 samples of *COX2* gastric cancer analyzed showed the pattern unmethylated in 64% ($n = 25$) samples. This result confirms the results obtained by Wang et al, [37], that demonstrates that *COX2* is not methylated in most cases of stomach cancer. Many works have reported their increased expression in tumor cells when compared to normal tissues. The expressed human gastric mucosa usually hardly detectable levels of *COX2* protein - the gene is in principle methylated. However, this protein has been identified as being overexpressed in gastric cancer, suggesting that the gene is not methylated, thus constituting an important factor in the growth and development of gastric cancer [38,39].

The *COX2* overexpression is associated with proliferation, angiogenesis, tumorigenesis and resistance to apoptosis [35]. Shi, et. al. [38] evaluated the prognostic value of *COX2* and *VEGF* expression in 281 samples of gastric cancer, this study revealed that the rate of 5-year survival of patients with expression of *COX2* or *VEGF* was significantly lower than that of patients without expression of *COX2* or *VEGF*. The overexpression of *COX2* and *VEGF* in patients with gastric carcinoma may increase the chance of invasion and metastasis, entailing a poor prognosis [38].

Our results do not confirm these studies, because despite being observed in 64% of gastric cancer samples showed unmethylated *COX2*, we did not find association with clinicopathologic variables or with tumor aggressiveness. The evaluation of protein expression could be used as examination of other parameters that could help in this study. More studies on the methylation pattern of other genes could help expose the methylation profile of the studied samples of gastric cancer and other tumors, and consequently lead to a deeper understanding of the pathogenesis of the disease, thus ensuring a better understanding of the prognosis and considering new treatment options.

The presence of *H. pylori* was not associated ($P > 0.05$) with clinicopathological variables nor the methylation status of the studied genes. It is known that most patients infected by *H. pylori* remain asymptomatic, 10 to 20% will develop peptic ulcers and only 1% will develop gastric cancer [40]. The evaluation of the presence of *H. pylori* in gastric cancer patients is critical to the prognosis. The survival rate at 5 years increased to 60, due to a higher rate of early diagnosis through mass screening programs in areas of high incidence of gastric cancer epidemic areas coinciding with *H. pylori* [15]. A study by Hur et al. [15] evaluated the effect of *H. pylori* in the prognosis of patients in Korea with high infection rates. Of the 149 patients, 85.5% were positive for serum *H. pylori*, nevertheless, showing no correlation between clinicopathologic characteristics and infection.

Studies have found that there are more virulent strains than others, those having the virulence factor Cag [41]. Animal models have been utilized to better understand the role of the virulence factors of *H. pylori*. In a transgenic mouse model, it was demonstrated that the expression of CagA in mice induced various tumors, gastric epithelial hyperplasia, hyperplastic polyps, carcinomas and gastrointestinal and hematologic malignancies such as lymphoma and myeloid leukemia cell B [42]. Although the results of this study have found the presence of *H. pylori* in 67% of gastric cancer samples by PCR for amplification of a fragment of 150 bp for the fragment of the bacterial 16S rRNA, did not evaluate the presence of virulence factor Cag.

Although none of the genes studied were associated with samples of gastric cancer, several other factors, not only epigenetic could contribute to the formation of tumor cells, as the presence of *Helicobacter pylori*, alcohol, dietary habits, smoking, among others [2]. Geographic

variation can result in incidence and mortality, indicating that environmental factors and lifestyle plays an important role in the etiology of gastric cancer. The results of recent studies assumes an association between regular consumption of alcohol and the risk of gastric cancer in men [3]. Cellular changes resulting from chemicals in cigarettes have been widely investigated in adults, where they cause DNA damage, evidenced by genetic mutations, micronuclei, chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and DNA strand breaks [43]. Furthermore, studies reveal the important role of nicotine or NNK (nicotine-derived nitrosamine) in the pathogenesis of cancer through cellular processes such as cell proliferation, angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition an important factor in tumor invasion [44].

In conclusion, our results indicate that the methylation status of *THBS1*, *GPX3* and *COX2* was not significantly different in gastric cancer compared to normal tissue. The clinicopathological variables was not associated with the methylation profile of the samples studied. The presence of *H. pylori* was not associated with the methylation profile of genes *THBS1*, *GPX3* and *COX2* nor with clinicopathological variables.

Acknowledgements

This work was supported by grants of CAPES and CNPq. The authors would like to thank James Overall for proofreading the article.

Conflicts of interest

None.

The authors: Cynthia Farias Vieira de Melo, Rubistenia Miranda de Araújo, Juarez Nóbrega da Silva, Carolina Oliveira Gígek, Marília de Arruda Cardoso Smith, Rommel Mario Rodríguez Burbano and Eleonidas Moura Lima declare that they have no conflict of interest.

References

1. INCA Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. 2012. http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/lancamento_estimativa_2012. Accessed 15 Dez 2012.
2. Terry MB, Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N, Wu HC, Santella RM. DNA methylation in white blood cells. Association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics* 2011; 6:828-837.
3. Everatt R, Tamosiunas A, Kuzmickiene I, Virviciute D, Radisauska R, Reklaitiene R, Milinaviciene E. Alcohol consumption and risk of gastric cancer: a cohort study of men in Kaunas, Lithuania, with up to 30 years follow-up. *BMC Cancer* 2012; 12:1-12.
4. Peña S, Sampieri CL, León-Córdoba K. Metaloproteasas de la matriz extracelular como marcadores moleculares en cáncer gástrico. *Med Clin* 2010; 134:123-126.
5. Stewart CJR, Crook ML. CD147 (EMMPRIN) and matrix metalloproteinase-2 expression in uterine endometrioid adenocarcinoma. *Pathology – Research and Practice* 2011; 207:30-36.
6. Kornfeld JW, Meder S, Wohlberg M, Friedrich RE, Rau T, Riethdorf L, Löning T, Pantel K, Riethdorf S. Overexpression of TACE and TIMP3 mRNA in head and neck cancer: association with tumour development and progression. *British Journal of Cancer* 2011; 104:138-145.
7. Gigeck CO, Chen, ES, Calcagno DQ, Wisnieski F, Burbano RR, Smith MAC. Epigenetic mechanisms in gastric cancer. *Epigenomics*. 2012; 4:279-294.
8. Kang SH, Choi HH, Kim SG, Jong HS, Kim NK, Kim SJ, Bang YJ. Transcriptional inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene by DNA hypermethylation of the 59-CpG island in human gastric cancer cell lines. *Int. J. Cancer* 2000; 86:632-635.
9. Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG Island Methylation in Premalignant Stages of Gastric Carcinoma. *Cancer research* 2001; 61:2847-2851.
10. Kanyama Y, Hibi K, Nakayama H, Kodera Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A. Detection of p16 promoter hypermethylation in serum of gastric cancer patients. *Cancer Sci*. 2003; 94:418-420.
11. Guimarães AC, Lima EM, Khayat AS, Girão Faria MH, Barem Rabenhorst SH, Pitombeira MV, Assumpção PP, de Oliveira Bahia M, Lima de Lima PD, de Arruda Cardoso Smith M, Burbano RR. Interrelationships among chromosome aneuploidy, promoter hypermethylation, and protein expression of the CDKN2A gene in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2007; 179:45-51.
12. Lima EM, Leal MF, Burbano RR, Khayat AS, Assumpção PP, Bello MJ, Rey JA, Smith MA, Casartelli C.. Methylation status of ANAPC1, CDKN2A and TP53 promoter genes in individuals with gastric cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2008; 41:539-543.

13. Falck E, Karlsson S, Carlsson J, Helenius G, Karlsson M, Klinga-Levan K. Loss of glutathione peroxidase 3 expression is correlated with epigenetic mechanisms in endometrial adenocarcinoma. *Cancer Cell International* 2010; 10:1-9.
14. Gigeck CO, Lisboa LC, Leal MF, Silva PN, Lima EM, Khayat AS, Assumpção PP, Burbano RR, Smith Mde A. SMARCA5 Methylation and Expression in Gastric Cancer. *Cancer Investigation* 2011; 29:162–166.
15. Hur H, Lee SR, Xuan Y, Kim YB, Lim YA, Cho YK, Han SU. The Effects of *Helicobacter pylori* on the prognosis of patients with curatively resected gastric cancers in a population with high infection rate. *J Korean Surg Soc.* 2012; 83:203-211.
16. Bhandari A, Crowe SE. *Helicobacter pylori* in Gastric Malignancies. *Curr Gastroenterol Rep.* 2012; 14:489–496.
17. Guo W, Dong Z, He M, Guo Y, Guo J, Chen Z, Yang Z, Kuang G. AberrantMethylation of Thrombospondin-1 and Its Association with Reduced Expression in Gastric Cardia Adenocarcinoma. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; 2010:1-10.
18. Wang D, Dubois RN. Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptors in chronic inflammation and colorectal cancer.*Gastroenterol Clin North Am.* 2010; 39:697-707.
19. Chen B, Rao X, House MG, Nephew KP, Cullen KJ, Guo Z. GPx3 promoter hypermethylation is a frequent event in human cancer and is associated with tumorigenesis and chemotherapy response. *Cancer Letters* 2011; 309:37–45.
20. Lauren P. THE two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965; 64:31-49.
21. Scholte GH, Van DLJ, Quint WG, Lindeman J. Polymerase Chain Reaction for detection of *Helicobacter pylori* in formaldehyde-sublimate fixed, paraffin-embedded gastric biopsias. *Diag. Mol. Pathol.* 1997; 6:238-243.
22. Majack RA, Cook SC, Bornstein P. “Platelet-derived growth factor and heparin-like glycosaminoglycans regulate thrombospondin synthesis and deposition in the matrix by smooth muscle cells,” *Journal of Cell Biology* 1985; 101:1059–1070.
23. Adams JC, Lawler J. “The thrombospondins,” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004; 36:961–968.
24. Fleitas T, Martínez-Sales V, Vila V, Reganon E, Mesado D, Martín M, Gómez-Codina J, Montalar J, Reynés G. VEGF and TSP1 levels correlate with prognosis in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol* 2013; doi 10.1007/s12094-013-1020-6

25. Li Q, Ahuja N, Burger PC, Issa JP. Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* 1999; 18:3284-3289.
26. Oue N, Matsumura S, Nakayama H, Kitadai Y, Taniyama K, Matsusaki K, Yasui W. "Reduced expression of the TSP1 gene and its association with promoter hypermethylation in gastric carcinoma," *Oncology* 2003;64:423-429
27. Guo W, Dong Z, He M, Guo Y, Guo J, Chen Z, Yang Z, Kuang G. Aberrant Methylation of Thrombospondin-1 and Its Association with Reduced Expression in Gastric Cardia Adenocarcinoma. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; 2010:1-10.
28. Aydemir F, Yurtcu E, Balci TB, Sahin FI, Gulsen S, Altinors N. Identification of promoter region methylation patterns of MGMT, CDKN2A, GSTP1, and THBS1 genes in intracranial meningioma patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16:335-40.
29. Sepiashvili L, Hui A, Ignatchenko V, Shi W, et al. Potentially Novel Candidate Biomarkers for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Identified Using an Integrated Cell Line-based Discovery Strategy. *Molecular & Cellular Proteomics* 2012; 11: 1404-1415.
30. Suh EJ, Kabir MH, Kang UB, Lee JW, YU J, Noh DY, Lee C. Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and BRWD3 as serological biomarkers. *Experimental and Molecular Medicine* 2012;44:36-44.
31. Jee CD, Kim MA, Jung EJ, Kim J, Kim WH. Identification of genes epigenetically silenced by CpG methylation in human gastric carcinoma. *Eur J Cancer* 2009;45:1282-1293
32. He Y, Wang Y, Li P, Zhu S, Wang J, Zhang S. Identification of GPX3 Epigenetically Silenced by CpG Methylation in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2011;56:681-688
33. Yu YP, Yu G, Tseng G, Cieply K, Nelson J, Defrances M, Zarnegar R, Michalopoulos G, Luo JH. Glutathione Peroxidase 3, Deleted or Methylated in Prostate Cancer, Suppresses Prostate Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Res*. 2007;67:8043-8050
34. Mrena J, Alexandra T, Ari R. Cyclooxygenase-2 and Gastric Cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2011;30:387-395.
35. Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Sheu BS, Muta T, Inoue H, Chen CC. Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor kappaB activation. *Mol Pharmacol* 2004;66:1465-1477.

36. Rodenhise DI. Epigenetic contributions to cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26:5–18.
37. Wang B, Guo CQ, Sun C, Sun QL, Liu GY, Li DG. Mechanism and clinical significance of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:3240-3244.
38. Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression o cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1421-1426.
39. Xue YW, Zhang QF, Zhu ZB, Wang Q, Fu SB. Expression of cyclooxygenase-2 and clinicopathologic features in human gastric denocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:250-253.
40. Ernst PB, Peura DA, Crowe SE. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. *Gastroenterology* 2006;130:188–206.
41. Giordano A, Cito L. Advances in gastric cancer prevention. *World J Clin Oncol* 2012; 3:128-136.
42. Ohnishi N. et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2008; 105:1003–1008.
43. Demarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res.* 2004;74:567:447.
44. Chu KM, Chi H, Cho V, Shin Y. Nicotine and Gastrointestinal Disorders: Its Role in Ulceration and Cancer Development. *Current Pharmaceutical Design* 2013; 19: 5-10.

Figure Legends

Fig. 1 THBS1 gene amplification of the normal tissue sample 57 (unmethylated) and sample 9 (unmethylated) and 1 (methylated) gastric cancer gel 8% polyacrylamide and stained with silver. B = water + DNA (negative control enzyme), DNA + H = enzyme HpaII, M = DNA + enzyme MspI (positive enzyme control).

Fig. 2 GPX3 gene amplification of the normal tissue sample 57 (unmethylated) and samples 30 and 1 (unmethylated) gastric cancer gel 8% polyacrylamide and stained with silver. B = water + DNA (negative control enzyme), DNA + H = enzyme HpaII, M = DNA + enzyme MspI (positive enzyme control).

Fig. 3 COX2 gene amplification of the normal tissue sample 57 (methylated) and one of the samples (unmethylated) and 8 (methylated) gastric cancer gel 8% polyacrylamide and stained with silver. B = water + DNA (negative control enzyme), DNA + H = enzyme HpaII, M = DNA + enzyme MspI (positive enzyme control).

Fig. 4 Regarding the amplification fragment of 16S rRNA from *H. pylori* of 57 normal tissue sample, the first sample of gastric cancer (*H. pylori* positive). Sample 2 did not amplify (absence of *H. pylori*). Polyacrylamide gel 8%.

Tables

Table 1. Frequency of hypermethylation of *THBS1*, and *COX2 GPX3* paraments associated with clinical samples of 39 gastric cancer and 15 gastric tissue normal.

	THBS1				GPX3			COX2		
Variables (N)	Total	Methylated	Unmethylated	P value	Methylated	Unmethylated	P value	Methylated	Unmethylated	P value
Gender										
Female	11	2 (18%)	9 (82%)	0,074	3 (27%)	8 (77%)	0,379	5 (45%)	6 (55%)	0,478
Male	28	0 (0%)	28 (100%)		4 (14%)	24 (86%)		9 (32%)	19 (68%)	
Tissue										
Normal	15	1 (7%)	14 (93%)	0,981	2 (13%)	13 (87%)	1,000	10 (67%)	5 (33%)	0,066
CG	39	2 (5%)	37 (95%)		7 (18%)	32 (82%)		14 (36%)	25 (64%)	
Laurén type										
Intestinal	23	1 (4%)	22 (96%)	1,000	2 (9%)	21 (91%)	0,1	6 (26%)	17 (74%)	0,179
Diffuse	16	1 (6%)	15 (94%)		5 (31%)	11 (79%)		8 (50%)	8(50%)	
Phase										
I/II	15	1 (6,6%)	14 (93,4%)	1,000	3 (20%)	12 (80%)	0,999	6 (40%)	9 (60%)	0,739
III/IV	24	1 (4,2%)	23 (95,8)%		4 (16%)	20 (84%)		8 (33%)	16 (67%)	
Metastasis in lymph nodes										
Present	25	2 (8%)	23 (92%)	0,527	5 (20%)	20 (80%)	0,684	7 (28%)	18 (72%)	0,269
Absent	14	0 (0%)	14 (100%)		2 (14%)	12 (86%)		7 (50%)	7 (50%)	
Distant Metastasis										
Absent	34	1 (3%)	33 (93%)	0,242	5 (15%)	29 (85%)	0,213	13 (38%)	21 (62%)	0,636
No distinguishe	5	1 (20%)	4 (80%)		2 (40%)	3 (60%)		1 (20%)	4 (80%)	
H. pylori										
Present	26	1 (4%)	25 (98%)	1,000	6 (23%)	20 (77%)	0,388	11 (42%)	15 (58%)	0.303
Absent	13	1 (7,6%)	12 (92,4%)		1 (7,7%)	12 (92,3%)		3 (23%)	10 (77%)	

	<i>H. pylori</i>			
Variables (N)	Total	Positive	Negative	<i>P-value</i>
<i>Gender</i>				
Female	11	6 (55%)	5 (45%)	0,452
Male	28	20 (71%)	8 (29%)	
<i>Tissue</i>				
Normal	15	10 (67%)	5 (33%)	0,999
CG	39	26 (67%)	13 (33%)	
<i>Laurén type</i>				
Intestinal	23	13 (56%)	10 (44%)	0,169
Diffuse	16	13 (81%)	3 (19%)	
<i>Phase</i>				
I/II	15	10 (67%)	5 (33%)	1,000
III/IV	24	16 (67%)	8 (33%)	
<i>Metastasis in lymph nodes</i>				
Present	25	14 (56%)	11 (44%)	0,088
Absent	14	12 (86%)	2 (14%)	
<i>Distant Metastasis</i>				
Absent	34	22 (65%)	12 (35%)	0,6478
No distinguishe	5	4 (80%)	1 (20%)	

Fig. 1

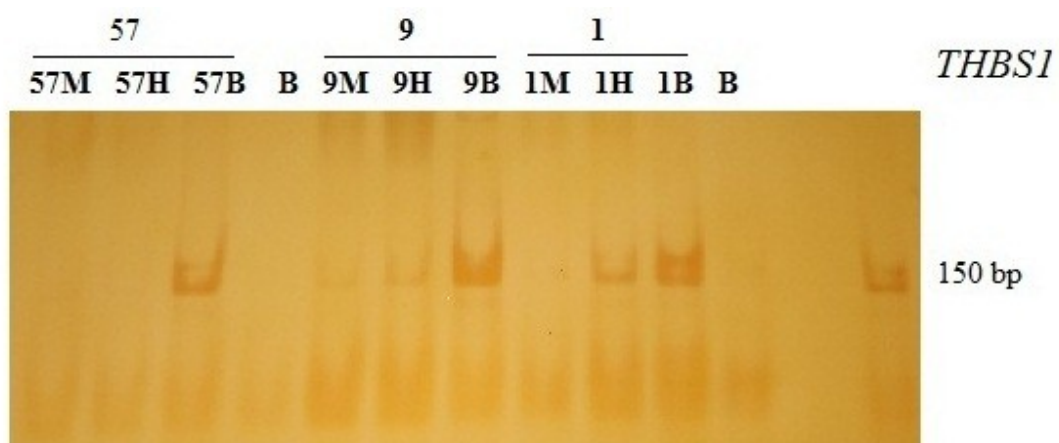


Fig. 2

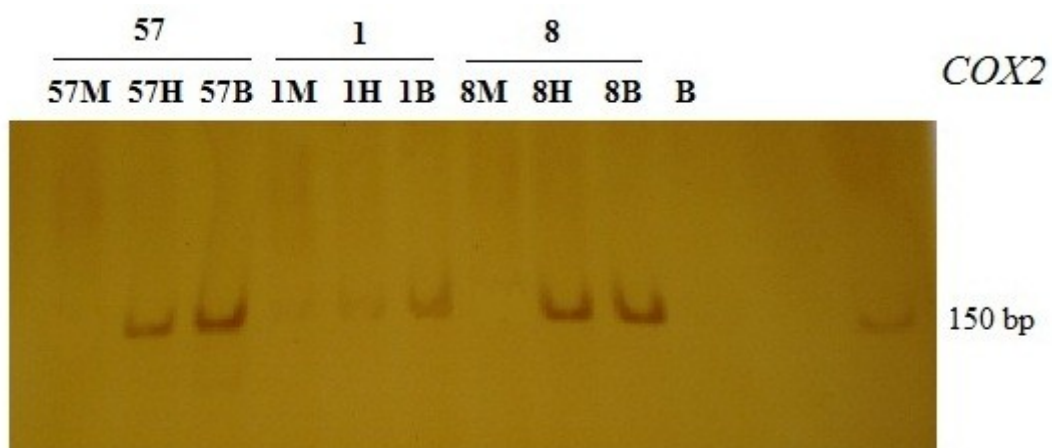


Fig. 3

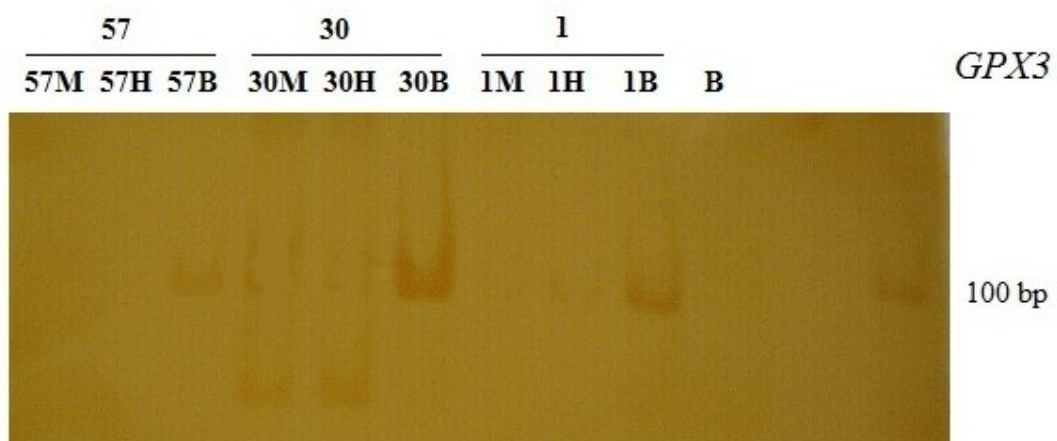


Fig. 4

