



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Hector Matioli da Silva

Avaliação do padrão de metilação dos genes *WT1* e *RAR β* em metaplasia intestinal e associação com infecção pela *Helicobacter pylori*





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Hector Matioli da Silva

**Avaliação do padrão de metilação dos genes *WT1* e
RAR β em metaplasia intestinal e associação com
infecção pela *Helicobacter pylori***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Elizabete Silva

**São José do Rio Preto, SP
2008**

SILVA, Hector Matioli.

Avaliação do padrão de metilação dos genes *WT1* e *RAR β* em metaplasia intestinal e associação com infecção pela *Helicobacter pylori* / Hector Matioli da Silva. – São José do Rio Preto: [s.n], 2008.

68 f. : il; 30 cm.

Orientador: Ana Elizabete Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1.Genética Humana. 2. Metaplasia 3. Adenocarcinoma 4. Estômago – Câncer 5. *Helicobacter pylori* 6. Metilação aberrante – Genética molecular. I. Silva, Ana Elizabete. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616.33

HECTOR MATIOLI DA SILVA

**Avaliação do padrão de metilação dos genes *WT1* e
RAR β em metaplasia intestinal e associação com
infecção pela *Helicobacter pylori***

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRADO

Presidente e Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Elizabete Silva

2^o Examinador: Prof^a. Dr^a Maria Inês Moura Pardini

3^o Examinador: Prof^a. Dr^a Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto, 28 de fevereiro de 2008.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto SP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, com bolsa de Mestrado do CNPq.

Dedico a todos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, incentivando, e dando forças para nunca desistir de meus sonhos...

... a Deus por estar ao meu lado, protegendo e guiando meus passos sempre.

... aos meus pais Francisco (in memoriam) e Meire :

“Vocês um dia sonharam comigo... e me amaram antes que eu existisse. Vocês se alegraram com a minha chegada ao mundo como alguém que recebe um presente, renunciando muitas vezes, aos seus sonhos para que os meus se realizassem. Vocês com seus gestos de bondade e prontidão para perdoar, são o exemplo de fé e esperança que me dá força e coragem para vencer na vida. Por isso, dedico lhes esta conquista com a minha profunda admiração e respeito”.

... a Michelle (Tata), pela pessoa maravilhosa que é , me dando cada dia mais a certeza de ser um privilegiado tendo você como irmã.

... a Samara, fundamental também em minha formação, além do amor, carinho e compreensão em todos os momentos, mesmo tendo a distância como obstáculo.

AGRADECIMENTO

A minha orientadora, Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, pela amizade, apoio, incentivo e confiança em mim depositada nesse tempo. Agradeço pela grande oportunidade oferecida e por me ensinar o que hoje sei na área científica. Admirada não só pela excelente profissional que é, mas principalmente pela humanidade demonstrada sempre em ocasiões difíceis que passamos na vida.

A Profa. Dra. Claudia Rainho, colaboradora no trabalho, pela receptividade, auxílio e incentivo sempre nas horas mais angustiantes. Também participadora ativa em meu aprendizado científico, sem a qual não seria possível a conclusão desse trabalho.

Ao Dr. Marcos Estécio, que mesmo de longe e apenas por contatos virtuais nos auxiliou bastante e sempre esteve de prontidão para todas nossas dúvidas.

A Profa. Dra. Paula Rahal que nos auxiliou na técnica e disponibilizou seu laboratório para a possível realização em suas dependências.

A doutoranda Marília Calmon, pela sua disponibilidade e paciência logo no começo da técnica e aprendizado científico.

Ao Dr. Kenji Miyazaki, responsável pelo serviço de endoscopia do Hospital de Base de São José o Rio Preto, local onde foram coletadas as amostras para o estudo.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Maria Inês Pardini e Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza pela aceitação e disponibilidade, além de valiosas sugestões, que contribuirão para a melhoria do trabalho.

A todos pacientes, portadores de câncer gástrico ou metaplasia intestinal, pela disponibilidade de serem incluídos neste estudo, sem os quais não seria possível a realização do trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e principalmente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana, pela receptividade, prontidão e auxílio em todos os momentos que necessitei, além da convivência nesses dois anos.

Aos amigos que conquistei em São José do Rio Preto, que graças a Deus são muitos e não conseguiria listá-los brevemente aqui, pelos ótimos momentos desfrutados juntos e por facilitarem minha vida longe de casa, proporcionando momentos de descontração além do trabalho.

A minha família e amigos, que mesmo à distância sempre me acompanharam ao longo da caminhada.

A Samara, que participou intensamente de minha formação e contribui muito no que sou hoje em dia. Pela sua cumplicidade, compreensão, carinho sempre dispensado e principalmente pelo seu amor.

A minha irmã, que sempre esteve presente em todas necessidades enfrentadas por nossa família, mostrando uma força surpreendente principalmente em momentos que estive ausente.

A meu pai Francisco (*in memoriam*) pelo amor, dedicação e confiança além da incrível lição de vida deixada, mostrando o valor da vida e quanto é preciso lutar por ela.

Em especial a minha mãe Meire, meu alicerce e porto seguro, exemplo de vida e superação em todos os sentidos. Transmitindo os valores mais importantes que podemos ter na vida. Renunciando realmente de seus sonhos para que pudéssemos realizar os nossos. Essa conquista também é sua.

A DEUS, pelo presente da vida e por tudo que consegui em minha curta caminhada.

MUITO OBRIGADO...

*“Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida, são tomadas de você muito depressa. Por isso, sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos...
... Aprenda que a mais dos seus pais em você do que você supunha...”*

William Shakespear

Sumário

I. Introdução	15
1. Epigenética e expressão gênica.....	15
1.1 Modificação de histonas.....	15
1.2 Metilação do DNA.....	17
2. Desregulação epigenética e câncer.....	19
3. Carcinogênese gástrica.....	25
4. Objetivos.....	33
II. Materiais e Métodos	34
1. Caracterização das amostras.....	34
2. Extração de DNA.....	37
3. Conversão do DNA pelo bissulfito de sódio.....	38
4. Técnica MS-PCR.....	38
5. Diagnóstico Molecular da <i>Helicobacter pylori</i>	41
6. Análise estatística.....	41
III. Resultados	42
1. Padrões de metilação dos genes <i>WT1</i> e <i>RARβ</i>	42
2. Avaliação molecular da <i>H. pylori</i>	45
IV. Discussão	49
V. Referências bibliográficas	59
V. Anexos	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Manutenção da metilação do DNA	18
Figura 2. Representação da hipótese de dois eventos mutacionais	20
Figura 3. Esquema de acetilação e metilação das histonas	21
Figura 4. Alteração no padrão de metilação na formação tumoral	23
Figura 5. Imagens endoscópicas	27
Figura 6. Diagrama esquemático dos sítios de <i>splicing</i> do gene <i>WT1</i>	30
Figura 7. Possível via de supressão para carcinogênese envolvendo o gene <i>RARβ</i>	32
Figura 8. Gel mostrando o padrão de bandas do gene <i>WT1</i>	42
Figura 9. Gel mostrando o padrão de bandas do gene <i>RARβ</i>	44
Figura 10. Gel mostrando o padrão para <i>H. pylori</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Acetilação e metilação de histonas na regulação transcricional	17
Tabela 2. Outros genes hipermetilados em câncer gástrico	29
Tabela 3. Efeito do gene <i>WT1</i> na apoptose em diferentes linhagens celulares	31
Tabela 4. Caracterização das amostras do grupo de metaplasia intestinal (MI) quanto ao sexo, idade, etilismo, tabagismo, classificação da metaplasia intestinal e diagnóstico histológico da <i>H. pylori</i>	35
Tabela 5. Caracterização das amostras do grupo de câncer gástrico (CG) quanto ao sexo, idade, etilismo, tabagismo, classificação do câncer gástrico e diagnóstico histológico da <i>H. pylori</i>	36
Tabela 6. Distribuição demográfica e clinico-patológica dos indivíduos dos grupos de metaplasia intestinal e câncer gástrico.	37
Tabela 7. Seqüência dos <i>primers</i> e tamanho dos produtos amplificados.	39
Tabela 8. Especificações para <i>PCR</i> .	39
Tabela 9. Frequências de amostras metiladas e não metiladas nos diversos grupos para os genes <i>RARβ</i> e <i>WT1</i> .	43
Tabela 10. Associação entre o padrão de metilação dos genes <i>WT1</i> e <i>RARβ</i> no grupo de metaplasia intestinal.	45
Tabela 11. Frequências dos casos com diagnóstico molecular e histológico da <i>H. pylori</i> nos grupos de metaplasia intestinal e câncer gástrico.	46
Tabela 12. Divergências entre diagnósticos histológico e molecular da <i>H. pylori</i> , com presença de falso-negativos e falso-positivos.	47
Tabela 13. Frequências do padrão de metilação dos genes <i>WT1</i> e <i>RARβ</i> e variáveis idade, sexo, tipo histológico e infecção pela <i>H. pylori</i> no grupo de metaplasia intestinal (MI).	48

RESUMO

O câncer gástrico é a segunda causa de morte por câncer no mundo e o quinto tipo com maior prevalência no Brasil, sendo previstos 21.800 casos novos em 2008. Esta neoplasia apresenta etiologia bastante complexa, envolvendo fatores genéticos e ambientais. Os fatores etiológicos de maiores destaques incluem a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, a ingestão de determinados alimentos, como defumados, enlatados e com elevada quantidade de sal, além do estilo de vida dos indivíduos, associado ao consumo de cigarro e álcool. Uma lesão pré-cancerosa importante no desenvolvimento da neoplasia gástrica é a metaplasia intestinal, podendo aumentar o seu risco em até 10 vezes. Atualmente é reconhecida a participação de alterações epigenéticas como metilação aberrante do DNA, que atua de forma igualmente relevante e complementar no processo de desenvolvimento e progressão do câncer. Vários genes com papel importante no controle do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose, angiogênese e adesão celular podem apresentar expressão alterada devido metilação aberrante de sua região promotora, assim a investigação do padrão de metilação de genes envolvidos com o processo neoplásico pode ser uma estratégia interessante para a indicação de marcadores moleculares que possam auxiliar no diagnóstico precoce do câncer. Desta forma, no presente trabalho foi investigado o padrão de metilação dos genes *WT1* e *RARβ* em metaplasia intestinal (35 amostras) e suas respectivas mucosas gástricas normais, em comparação com o câncer gástrico (8 amostras) também com suas respectivas mucosas normais, através da técnica MS-PCR (Methylation Specific PCR). Devido à participação da infecção pela *H. pylori* na carcinogênese gástrica, foi investigada molecularmente a presença dessa bactéria nas amostras estudadas e possível associação com o padrão de metilação apresentado por ambos os genes. Os resultados demonstraram padrão elevado de metilação em ambas lesões avaliadas, ou seja, 97% e 100% respectivamente das amostras metiladas no grupo de metaplasia e câncer gástrico para o gene *WT1*, e 74% e 100% respectivamente, para o gene *RARβ*. Porém, como as respectivas amostras de mucosas normais de ambos os grupos também apresentaram frequências elevadas de metilação, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos de metaplasia e câncer gástrico com os tecidos normais. Da mesma forma, não foi detectada associação entre o padrão de metilação de ambos genes e a infecção pela *H. pylori*, que foi detectada em 32% e 63% das amostras de metaplasia intestinal e câncer gástrico, respectivamente. Também não se observou associação entre o padrão de metilação dos genes e outras variáveis como idade, sexo e tipo histológico da metaplasia. Portanto, no presente trabalho, como ambos os genes encontraram-se frequentemente metilados nos grupos de metaplasia intestinal, câncer gástrico assim como nas mucosas normais, não é possível indicar que tal alteração esteja diretamente envolvida no desenvolvimento dessas doenças.

Palavras-chave: metaplasia intestinal, câncer gástrico, *H. pylori*, metilação do DNA, gene *WT1*, gene *RARβ*.

ABSTRACT

Worldwide, the gastric cancer is the second cause of death by cancer. In Brazil, it is the fifth type with more abundant, foreseen 21.800 new cases in 2008. This neoplasia presents very complex etiology involving genetic and environmental factors. The main etiologic factors include: infection by *H. pylori*, intake of specific foods such as curing food, canned food, and high consumption of salt wealthy food, besides people life style associated to alcohol and cigarette consumptions. An important previous-cankered lesion in development of gastric neoplasia is the intestinal metaplasia, what can increase your risk in ten times. At this moment, it is recognized the participation of epigenetic alterations like ADN aberrant methylation, which actuate in a same way considerable and complementary in development process and cancer evolution. Many genes with important role in control of cellular cycle, ADN repair, apoptosis, angiogenesis and cellular adhesion can present changed expression due aberrant metthylation of your promoter region. In this manner, the investigation of metithyation pattern of genes involved with the neoplastic process can be an interesting strategy for the indication of molecular markers that can help in cancer precocious diagnosis. Thus, in this present study were investigated the metthylation pattern of *RAR β* and *WT1* genes (35 samples) and their respective normal mucous gastrics by technic MS-PCR (Methylation Specific PCR). Due to participation of infection by *H. pylori* in gastric carcinogenesis, it was too molecular investigated the presence of this bacterium in the studied samples and the possible association with the metthylation pattern presented by both genes. The results showed high pattern of methylation in both valued lesions, that is, 97% and 100%, respectively of methylated samples in metaplasia group and gastric cancer to *WT1* gene, and 74% and 100%, respectively, to *RAR β* gene. However, how the respective samples of normal mucous of both groups presented too high frequencies of methylation, weren't observed significant differences between gastric cancer and metaplasia groups with the normal tissues. The same way, it was not detected association between methylation pattern of both genes and the infection by *H. pylori* which was detected in 32% and 63% of intestinal metaplasia samples and gastric cancer, respectively. It was not too observed association between the gene methylation pattern and others variables like age, sex and histological type of metaplasia. Hence, in this study, how both genes come across frequently methylated in intestinal metaplasia and gastric cancer groups, as well as in normal mucous, it is not possible indicate that such alteration was directly involved in development of these diseases.

Key-words: intestinal metaplasia, gastric cancer, *H. pylori*, ADN methylation, *WT1* gene, *RAR β* gene.

I. Introdução

1. Epigenética e expressão gênica

Com os avanços tecnológicos e a disponibilidade de diferentes técnicas para a investigação dos processos biológicos, foi possível estabelecer que além da seqüência de DNA, outras estruturas e eventos são importantes para a expressão e regulação gênica. Assim consistindo em um conjunto de processos denominados epigenéticos necessários para a manutenção do funcionamento biológico. A epigenética pode ser definida, portanto, como sendo o mecanismo que mantém padrões herdáveis de expressão e função gênica sem que haja alteração na seqüência de nucleotídeos do DNA (HOLLIDAY, 1987). Este mecanismo epigenético que estabelece e mantém a expressão gênica tecido-específica das células, tem auxiliado a esclarecer como o mesmo genótipo pode ser traduzido em diferentes fenótipos (ESTELLER, 2006).

A regulação epigenética apresenta uma grande complexidade, porém, pode ser resumida em dois principais processos: a modificação de histonas e a metilação do DNA, ambas podendo interferir na remodelação da cromatina e com isso atuar no controle da regulação transcricional. Nan et al. (1998) e Jones et al. (1998) foram os pioneiros em evidenciar a associação entre a modificação de histonas e a metilação do DNA, a partir de bases específicas do DNA metiladas que podiam atrair determinadas proteínas a essas regiões metiladas do DNA durante a compactação da cromatina, assim promovendo o silenciamento gênico.

1.1 Modificação de histonas

O genoma de mamíferos é compactado em uma estrutura denominada nucleossomo que envolve proteínas básicas altamente conservadas, as histonas. O nucleossomo, unidade fundamental da cromatina, consiste de um complexo de oito proteínas histonas, sendo duas moléculas de cada tipo: H2A, H2B, H3 e H4 e a dupla fita de DNA com 146 nucleotídeos de comprimento.

Uma série de modificações dinâmicas pós-transcricionais determinam a ligação de fatores remodeladores da cromatina ao nucleossomo, alterando assim a estrutura cromatínica e promovendo uma maior ou menor acessibilidade dos fatores e co-fatores

transcricionais, controlando dessa forma a maquinaria geral de transcrição do DNA e a expressão gênica (BAYLIN, 2005; SANTOS et al. 2005; DUCASSE; BROWN, 2006).

As histonas não são consideradas simples proteínas de empacotamento do DNA, atuam como reguladores dinâmicos da atividade gênica, envolvidas em muitas modificações químicas pós-transcricionais, incluindo acetilação, metilação, fosforilação, entre outras. Assim promovendo ou prevenindo a ligação de proteínas e complexos a regiões particulares do genoma e dessa forma atuando como marcadores de ativação ou repressão de eucromatina ou heterocromatina, respectivamente. Principalmente o padrão de acetilação e metilação de resíduos específicos de lisina do nucleossomo tem papel crucial na regulação estrutural da cromatina e na expressão gênica (ESTELLER, 2007). Portanto, a modificação covalente das histonas constitui um potencial “código de histonas” que pode ser transmitido estavelmente durante as divisões celulares (JIANG; BRESSLER; BEAUDET, 2004).

A acetilação de resíduos de lisina (K), ou seja, adição de um grupo acetil (Ac) é observada na região amino-terminal das histonas H2A, H2B, H3 e H4, sendo concentrada em eucromatina, caracterizando atividade transcricional. As histonas H2A são acetiladas nos resíduos de lisina H2A-K5, -K9 e -K13; as histonas H2B são acetiladas nos resíduos de lisinas H2B-K5, -K12, -K15 e -K20, enquanto as histonas H3 e H4 (Tabela 1) são acetiladas pelas H3-K9, -K14, -K18, -K23, -K27 e H4-K5, -K8, -K12 e -K16 (YOO & JONES, 2006). A correlação mais freqüentemente associada à ativação é a acetilação das lisinas H3K9Ac, H3K14Ac e H4K16Ac. As duas principais famílias enzimáticas envolvidas nesse processo de acetilação e deacetilação de histonas são denominadas histonas acetiltransferases (HATs) e histonas deacetilases (HDACs).

Outro processo de modificação das histonas consiste na metilação de resíduos de lisina (K), ou seja, adição de um grupo metil (Me) promovida pelas histonas metiltransferases (HMTs). Por outro lado, o processo inverso de demetilação é realizado por uma simples demetilase (LSD-1) recentemente identificada (TOMASI et al., 2006). Os resíduos de lisina podem ser mono, di ou tri-metilados apresentando atividades diferentes cada um deles, provavelmente relacionado à estabilidade. Aparentemente a tri-metilação é a forma mais estável, não sendo removida pela demetilase LSD-1. A correlação funcional mais forte com a repressão gênica é a tri-metilação das lisinas H3K9Me3, H3K27Me3 e

H4K20Me3 e com a expressão gênica é a tri-metilação das lisinas H3K4me3, H3K36me3 e H3K79me3. Além das lisinas, as argininas (R) podem ser metiladas, as quais estão também relacionadas à sinalização celular, reparo do DNA, apoptose e regulação transcricional (TOMASI et al., 2006).

Tabela 1. Acetilação e metilação de histonas na regulação transcricional (modificado a partir de Tomasi et al. 2006)

Efeito na Transcrição	Modificação sítio-específico
Ativação	H3-K9 Ac*
	H3-K14 Ac*
	H3-K18 Ac
	H3-K23 Ac
	H4-K5 Ac
	H4-K8 Ac
	H4-K16 Ac*
	H3-K4 Me
	H3-K36 Me*
H3-K79 Me*	
Repressão	H3-K9 Me
	H3-K27 Me
	H4-K20 Me

* Modificações essas mais correlacionadas com a ativação

1.2 Metilação do DNA

O processo de metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil nas citosinas localizadas na posição 5' adjacente a guanina ligada por um fosfato em uma região rica com esses dinucleotídeos denominada ilha CpG, após a síntese do DNA. A família de enzimas específicas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) promovem a doação do grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) que posteriormente é convertida em S-adenosilhomocisteína (SAH). A 5-Metil-citosina (5mC) constitui 0,75 – 1% de todas as bases nucleotídicas do DNA, e aproximadamente 3 – 4% das citosinas são metiladas no DNA de tecido normal humano (ESTELLER, 2006).

A família de enzimas DNA metiltransferase é composta pela DNMT1, DNMT2, DNMT3A e DNMT3B (LUCZAK; JAGODZINNSKI, 2006) podendo ser dividida em duas

classes, onde a DNMT1 mantém a ligação dos grupos metil ao DNA hemi-metilado durante a replicação e as DNMT3A e DNMT3B (Figura 1) adicionam grupos metil aos dinucleotídeos CpG não metilados, denominada metilação *de novo* (BLASCO, 2007).

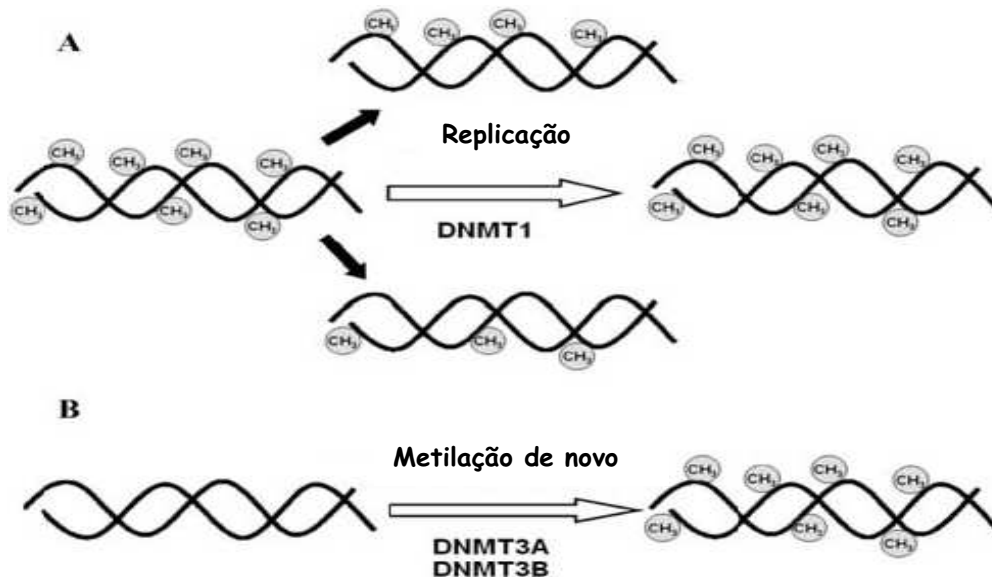


Figura 1. Manutenção da metilação do DNA (A) e metilação do DNA *de novo* (B). DNMT1 adiciona grupos metil ao DNA hemi-metilado durante a replicação. DNMT3A e DNMT3B adicionam grupos metil ao DNA não-metilado (modificado a partir de Lucsak; Jagodzinski, 2006).

No genoma humano ocorre cerca de 29.000 ilhas CpG, que são consideradas como toda janela do genoma que possua 500 pares de bases com um conteúdo C:G, de pelo menos 55% e frequência observada sobre a esperada de CpG, de pelo menos 0,657, cuja distribuição obedece a um padrão aleatório, porém com preferência pelas regiões promotoras do primeiro éxon de genes codificadores (VENTER et al., 2001; LAIRD, 2003). Normalmente a metilação do DNA ocorre em aproximadamente 70 a 80% dos sítios CpG, mas essas porcentagens podem aumentar, estando relacionadas com silenciamento de alguns genes e promoção tumoral, ou até mesmo diminuir, promovendo assim instabilidade cromossômica e rearranjos, durante o processo de envelhecimento (RODENHISER; MANN, 2006).

Em genes regularmente expressos, na presença dos fatores de transcrição, as modificações de histonas como acetilação e metilação de resíduos específicos de lisina são

permissivas mantendo a cromatina descondensada e a ilha CpG em estado não-metilado, possibilitando a transcrição gênica. Entretanto, pode-se encontrar no genoma ilhas CpG normalmente metiladas em genes específicos em linhagens germinativas, os quais são expressos apenas em alguma fase do desenvolvimento; genes tecido-específicos expressos apenas em tecidos particulares; genes silenciados por “*imprinting*”, acarretando em uma expressão mono-alélica; e na inativação do cromossomo X em fêmeas de mamíferos para efeito de compensação de dose (FEINBERG et al., 2002; LAIRD, 2003; ESTELLER, 2006). Portanto, a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento normal, atuando no controle da expressão gênica; na integridade cromossômica e nos eventos de recombinação.

2. Desregulação epigenética e câncer

Atualmente, é amplamente conhecido que a desregulação epigenética atua de forma igualmente importante e complementar no processo de desenvolvimento e progressão do câncer (JONES, 2003). Um exemplo de colaboração entre as alterações genéticas e epigenéticas ocorre entre os genes de reparo *MLH1* e o gene supressor de tumor *CDKN2A* em linhagens HCT1 (linhagem de câncer de cólon). Enquanto em um dos alelos de cada um desses genes é observada uma mutação nas células dessa linhagem celular, o alelo tipo selvagem é silenciado devido hipermetilação (BAYLIN; OHM, 2006). Estudos recentes têm mostrado que embora o silenciamento epigenético anormal possa ocorrer em qualquer momento durante a progressão tumoral, ele é mais freqüentemente relacionado com estágios precoces do processo neoplásico, como estágios pré-cancerosos do desenvolvimento tumoral (BAYLIN; OHM, 2006).

De acordo com a hipótese de dois eventos mutacionais (*Two - hits*) extensamente aceita para a carcinogênese, proposta por Knudson (1971), é necessária a perda de função de ambos os alelos de um gene supressor tumoral para a transformação maligna. De forma semelhante, a hipermetilação da região promotora pode constituir o passo inicial em muitos cânceres somáticos, com subsequente mutação ou deleção eliminando a segunda cópia do gene (Figura 2). Alterações epigenéticas também têm sido relacionadas ao segundo passo em cânceres hereditários. Além disso, a hipermetilação de ambos alelos tem sido verificada

em tumores não-hereditários na ausência de mutações ou outros mecanismos genéticos (BAYLIN, 2005).

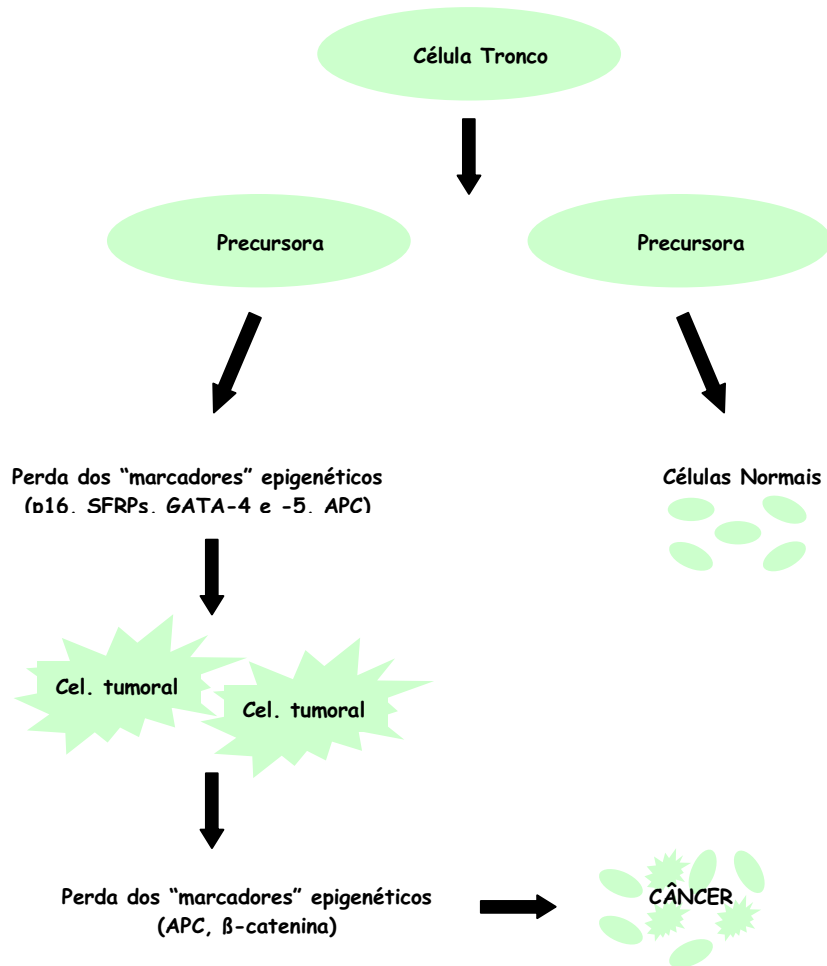


Figura 2. Representação da hipótese de dois eventos mutacionais para a carcinogênese. Os dois passos são representados por alterações epigenéticas, como por exemplo, metilação do p16, APC ou β-catenina e promoção tumoral (modificado a partir de BAYLIN, 2005).

A desregulação epigenética ocorre por meio de modificações no padrão tanto das histonas como também na metilação do DNA propriamente dito. A metilação do DNA pode ocorrer em duas regiões ricas em dinucleotídeos CpG, como as ilhas CpG em regiões promotoras, que encontram-se frequentemente hipometiladas e regiões intergênicas (não codificadoras) como heterocromatina pericentromérica (condensada e inativa), que apresentam-se hipermetiladas.

Em células saudáveis os “marcadores de ativação” e “repressão” das histonas encontram-se sob regulação normal. Por exemplo, regiões promotoras de genes supressores tumorais apresentam marcadores relacionados à atividade transcricional tais como acetilação das histonas H3 e H4 (lisinas K5, K8, K9, K12 e K16) e trimetilação da histona H3 (lisina K4) e em regiões de DNA repetitivo ou outras regiões de heterocromatina apresentam marcadores relacionados à repressão transcricional como tri e di-metilação da histona H3 (lisinas K27 e K9, respectivamente) e trimetilação da histona H4 pela lisina K20. Já em células cancerosas esse padrão é alterado devido à perda desses marcadores de ativação em regiões transcricionalmente ativas, como as regiões promotoras de genes supressores tumorais, e perda também dos marcadores de repressão nas regiões transcricionalmente inativas (Figura 3). Essas alterações nas células cancerosas podem alterar a conformação da cromatina, tornando as regiões anteriormente ativas mais compactadas, ou as regiões anteriormente inativas mais abertas, alterando assim a possibilidade de transcrição de ambas (ESTELLER, 2007).

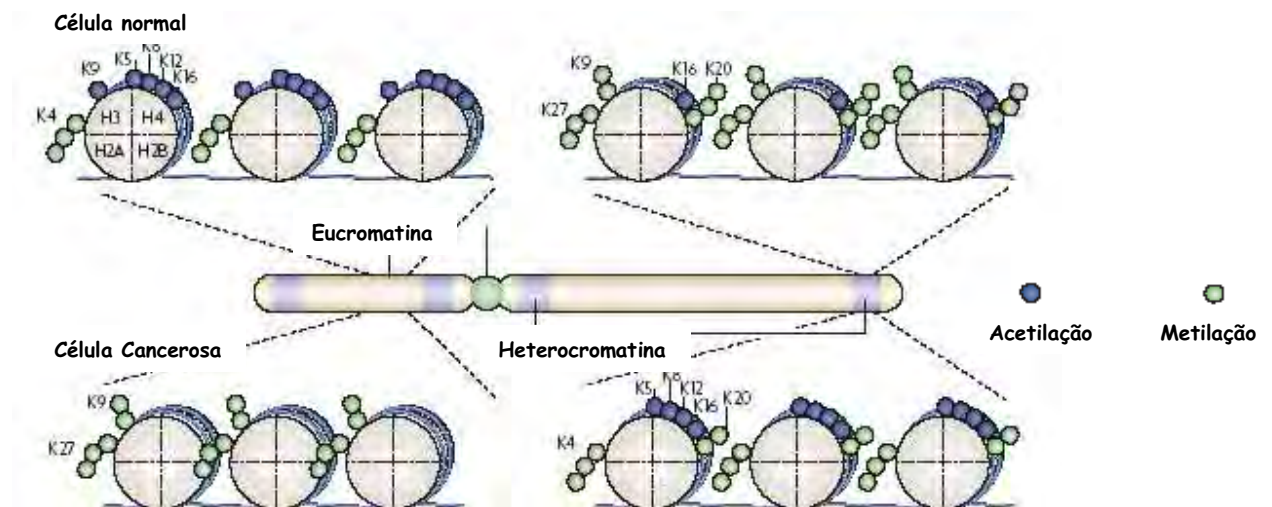


Figura 3. Esquematização dos padrões de acetilação e metilação das histonas H3 e H4 e relação com a região ocupada no cromossomo, sendo de eucromatina ou heterocromatina em células normais e cancerosas. Octâmeros de histonas são representados pelos círculos maiores em cinza. (modificado a partir de Esteller, 2007).

As alterações mais comuns, consideradas como marcadores quase universais, na transformação maligna são a deacetilação da lisina K16 e a trimetilação da lisina K20 na histona H4 (ESTELLER, 2006; MINUCCI & PELICCI, 2006; JONES & BAYLIN, 2007).

Outra forma de desregulação epigenética é pela metilação aberrante, que consiste na modificação epigenética mais estudada, sendo apresentada em duas principais situações: hipometilação de genes individuais ou global e hipermetilação de genes específicos, acarretando respectivamente, no aumento da expressão, diminuição e até silenciamento de determinados genes, modificação da cromatina ou ainda alteração do *imprinting* genômico (ESTELLER, 2000).

Células malignas podem apresentar uma diminuição da 5-metilcitosina (5mC) de 20 - 60% comparadas com suas contra-partes normais. A hipometilação aberrante do DNA pode contribuir para a carcinogênese pela perda de *imprinting* gênico, pela promoção de instabilidade cromossômica e pela reativação de possíveis elementos transponíveis presentes no genoma. A hipometilação em células tumorais deve predispor também a instabilidade genômica, pela ativação transcricional de possíveis proto-oncogenes ou movimentação de elementos transponíveis, além do rearranjo genômico, pela recombinação mitótica. Estudos têm demonstrado que elementos repetitivos se tornam não-metilados em tumores e que o grau de hipometilação correlaciona-se com a progressão patológica (ROBERTI et al, 2006; WILSON et al. 2007).

A hipermetilação aberrante de regiões específicas, como por exemplo, região promotora de genes supressores tumorais, está intimamente associada à repressão transcricional dos mesmos, favorecendo com isso o desenvolvimento tumoral (Figura 4).

Segundo Luczak; Jagodzinski (2006), essa repressão transcricional pode apresentar-se por meio de dois mecanismos. No primeiro, a hipermetilação inibe diretamente a ligação de fatores transcricionais (TFs) tais como AP-2, c-Myc/Myn, E2F e NFkB a seus sítios-alvo dentro da região promotora. Porém nesse mecanismo, os dinucleotídeos CpG devem estar presentes dentro dos sítios-alvo dos fatores transcricionais, assim sendo sensíveis a essa hipermetilação. No segundo mecanismo, o DNA metilado recruta proteínas específicas ligantes (MeCP) aos dinucleotídeos metilados e domínios ligantes (MBD) formando um obstáculo espacial no genoma, impossibilitando a ligação dos fatores transcricionais à seqüência promotora.

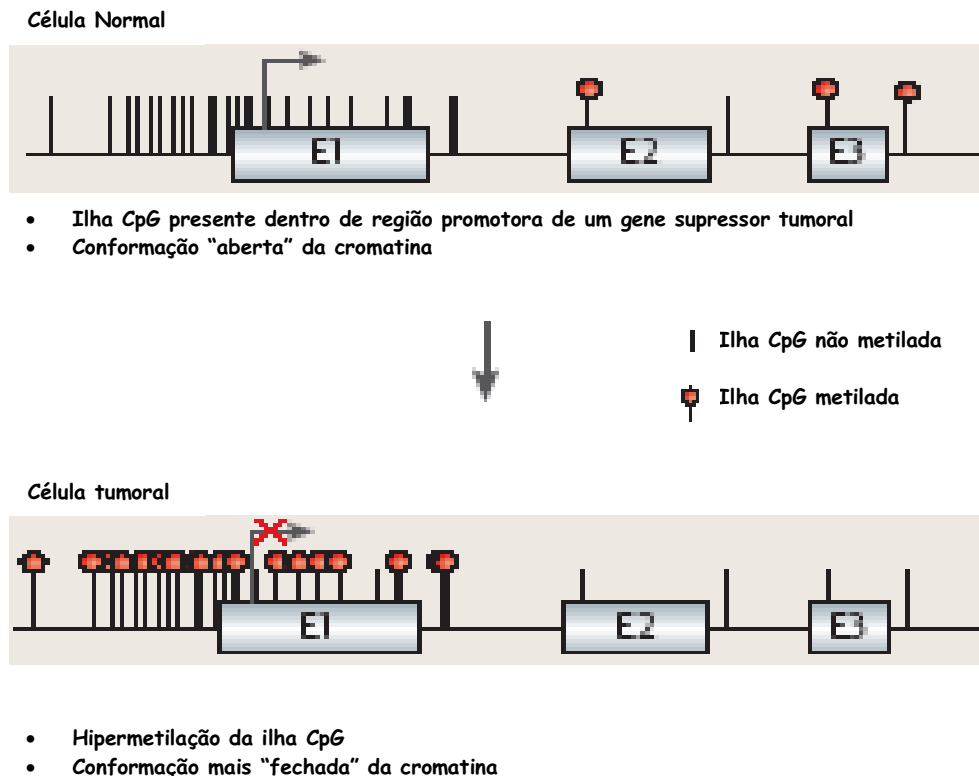


Figura 4. Alteração no padrão de metilação na formação tumoral. Hipermetilação da ilha CpG presente na região promotora de genes supressores tumorais, inativando a transcrição. E= éxon (modificado a partir de Esteller, 2007).

Sendo assim, tanto a hipermetilação, promovendo modificações no ciclo celular; prevenção da apoptose; defeitos no reparo do DNA; angiogênese e perda da adesão celular, quanto a hipometilação do DNA, acarretando na perda do *imprinting* gênico; expressão inapropriada; fragilidade genômica e ativação de elementos transponíveis estão envolvidas com o desenvolvimento neoplásico, ocorrendo em estágios precoces ou durante a progressão tumoral propriamente dita.

Desta forma, a investigação de alterações relacionadas com o desenvolvimento neoplásico que acometem a cromatina, como a metilação anormal da região promotora de genes específicos, constitui uma estratégia promissora para o estabelecimento de marcadores moleculares capazes de auxiliar no acompanhamento de risco, detecção precoce e prognóstico das diversas patologias (USHIJIMA, 2005).

Diferentes metodologias têm sido utilizadas para a avaliação de padrões de metilação do DNA, assim permitindo a detecção de mudanças qualitativas ou quantitativas do genoma inteiro ou de genes específicos (PALUSZCZAK; BAER-DUBOWSKA, 2006). Por exemplo, a técnica MSP ou MS-PCR (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*) é frequentemente utilizada para detecção do padrão de metilação de ilhas CpG em genes específicos. Ela consiste no tratamento inicial do DNA genômico pelo bissulfito de sódio que induz a conversão da citosina em uracila, apresentando-se como timinas em fita dupla após a replicação do DNA, porém a 5-metil citosina, ou seja, as citosinas que estiverem metiladas no DNA não serão convertidas.

A região alvo do estudo é então amplificada por PCR com a utilização de dois pares de oligonucleotídeos específicos, sendo um deles não metilado, reconhecendo as timinas presentes agora nos sítios que possuíam as citosinas não metiladas antes do tratamento, assim produzindo um produto caracterizado como não metilado. Enquanto o outro par de oligonucleotídeos, tido como metilado, reconhecerá as citosinas que não foram convertidas devidas seu estado de metilação, e produzirá um produto caracterizado como metilado. Esta técnica é sensível e rápida na detecção de alelos metilados permitindo a investigação a partir de amostras pequenas e análise de um grande número de casos, especialmente quando as regiões alvo já estiverem identificadas (HERMAN et al., 1996).

Devido aos avanços na compreensão da regulação epigenética surge um campo interessante na farmacologia em busca de novas perspectivas terapêuticas para o câncer. A terapia epigenética possui um grande potencial no combate as neoplasias, pois os defeitos epigenéticos, quando comparados aos genéticos, são reversíveis e apresentam, portanto, uma intervenção terapêutica mais facilitada, considerando-se que não há alterações na seqüência do DNA.

As drogas epigenéticas mais investigadas atualmente são as inibidoras da deacetilase de histonas (HDACi), possivelmente devido seu papel bloqueando a progressão do ciclo celular e causando apoptose, assim como as inibidoras da DNA metiltransferase (DNMTi), levando a reativação de genes silenciados em células cancerosas e possivelmente restabelecendo o controle do ciclo celular (MOSS; WALLRATH, 2006).

Os inibidores de deacetilase de histonas permitem o acúmulo de histonas acetiladas que levam a modulação da transcrição de genes específicos cuja expressão causa inibição

do crescimento de células cancerosas. Já os inibidores da DNA metiltransferase podem ser divididos em três grupos conforme sua forma de ação: inibidores análogos de nucleosídeo como, por exemplo, a 5-azacitidina e decitabinas, ambos análogos de citosina, que são incorporados ao DNA no momento da replicação, e na fase S do ciclo atuam como potentes inibidores impossibilitando a metilação do DNA; inibidores não análogos de nucleosídeo como, por exemplo, procainamida e procaínas, e os oligonucleotídeos antisense que são seqüências complementares aos mRNAs e hibridizam-se com eles inativando-os, bloqueando assim a tradução. Duas dessas drogas, 5-azacitidina e 5-aza-2-deoxicidina, já são utilizadas no tratamento de leucemias e síndromes mielodisplásicas (ESTELLER, 2007) e várias outras estão tendo seu uso testado, em associação ou não com outras drogas com efeitos epigenético, em uma variedade de doenças (PEEDICAYOL, 2006).

3. Carcinogênese gástrica

O câncer gástrico é a segunda causa de morte por câncer mundialmente e o quinto tipo com maior prevalência no Brasil, sendo previstos 21.800 casos novos em 2008 (INCA 2008). Dentre os países com incidência elevada destacam-se o Japão a Coréia, o leste asiático e europeu, América Central e do Sul, incluindo o Brasil, provavelmente relacionada aos hábitos alimentares (CREW; NEUGUT, 2006).

Esta neoplasia apresenta etiologia bastante complexa envolvendo fatores genéticos e ambientais. Dentre os fatores ambientais destacam-se aqueles associados à dieta alimentar e estilo de vida, como o consumo elevado de alimentos ricos em sal (STRUMYLAITE et al., 2006), que em excesso irrita a mucosa do estômago podendo provocar gastrite atrófica, alimentos defumados, enlatados e alta ingestão de carboidratos (ROCCO; NARDONE, 2007). A conversão de nitratos em nitritos e adicional combinação com aminas secundárias para a formação de compostos nitrosos também são relacionados com o aumento do risco de desenvolvimento do câncer gástrico (TERRY et al. 2002). O consumo excessivo de álcool e cigarro também está associado ao risco aumentado dessa neoplasia, além da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, classificada como carcinógeno humano tipo I pela Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer (IARC, 1994). De modo contrário, a ingestão de antioxidantes como ácido ascórbico, vitaminas C e E, além dos carotenóides (KELLEY;

DUGGAN, 2003) parecem exercer um papel importante na prevenção da carcinogênese gástrica. Estes antioxidantes atuam como seqüestradores de compostos nitrosos e espécies reativas de oxigênio (CREW; NEUGUT, 2006), resultantes da inflamação gástrica devido à infecção pela *H. pylori* (LOCHHEAD; EL-OMAR, 2007). Da mesma forma a ingestão de vegetais e frutas, mesmo em pequenas quantidades, tem um efeito protetivo na mucosa gástrica, assim estando associada ao baixo risco de câncer gástrico (NARDONE; MORGNER, 2003).

Dentre as neoplasias malignas do estômago, o adenocarcinoma gástrico (Figura 5) representa cerca de 95% dos casos, seguido pelos linfomas, tumores carcinóides e mesenquimais. Baseado em aspectos histopatológicos e clínicos, é classificado em tipo intestinal e difuso, conforme a classificação de Lauren (1965). As lesões do tipo intestinal são mais freqüentes, bem diferenciadas e dependentes de fatores ambientais, sendo freqüentemente associadas à presença de lesões pré-cancerosas, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia. O tipo difuso, no entanto, é pouco diferenciado, tem prognóstico ruim, não apresenta associação com lesões pré-cancerosas e tem uma alta ocorrência familiar, principalmente entre indivíduos com tipo sanguíneo A.

No processo de múltiplas etapas do adenocarcinoma tipo intestinal a gastrite crônica constitui a lesão inicial, geralmente acompanhada de infecção pela bactéria *H. pylori*, progredindo para atrofia gástrica, metaplasia intestinal, displasia e câncer (CORREA, 2004). Neste modelo de progressão tumoral a metaplasia intestinal (Figura 5B), uma das lesões precursora, pode aumentar o risco para esta neoplasia em até 10 vezes (FILIPE et al., 1994).

Na metaplasia intestinal, a mucosa gástrica é substituída por um epitélio semelhante ao do intestino delgado, tendo seu início devido à irritação persistente da mucosa pela *H. pylori*. Essa lesão pode ser classificada em completa ou incompleta. O tipo completo, ou tipo I é caracterizado pela presença de células absortivas, células de Paneth e células secretoras de sialomucinas, que corresponde ao fenótipo do intestino delgado, sendo esse, associado a um risco menor de câncer gástrico do que os outros tipos. A metaplasia incompleta compreendendo os tipos II e III é caracterizada por células colunares e células secretoras de sialomucinas e/ou sulfomucinas (LEUNG; SUNG, 2002). Onde o tipo III, também denominada colônica, apresenta uma associação mais forte com o câncer gástrico.

Filipe et al. (1994) verificaram que pacientes com esse tipo de lesão tinham um risco quatro vezes maior de desenvolver câncer que indivíduos com o tipo I. O surgimento da metaplasia intestinal na mucosa gástrica parece ser o resultado de uma resposta adaptativa e pressões de seleção em reação a um ambiente adverso. A infecção pela *H. pylori*, o tabagismo e a elevada ingestão de sal são os fatores etiológicos de maiores destaques no desenvolvimento da metaplasia intestinal (DIXON, 2001).

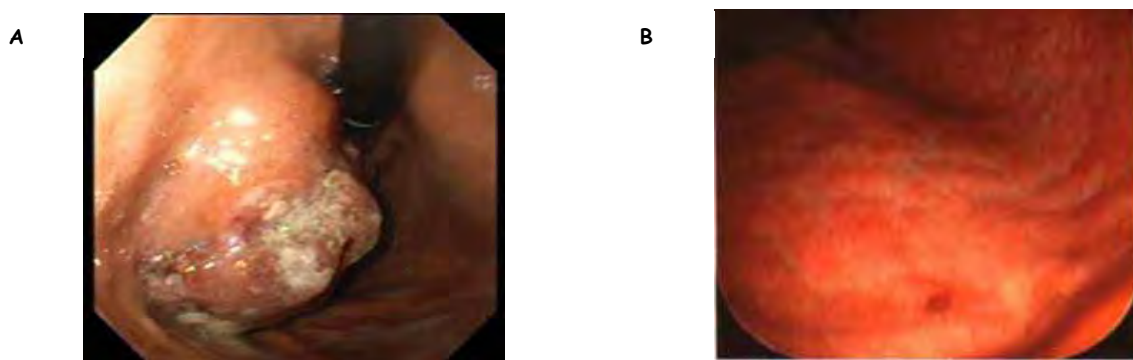


Figura 5. Imagens endoscópicas. A- Adenocarcinoma gástrico e B- Metaplasia intestinal (modificado e disponível em www.escuela.med.puc.cl/.../CaGastrico.htm - adenocarcinoma gástrico e www.ufpe.br/gastro/publicacoes/11/lesoes.html - metaplasia intestinal).

A *H. pylori*, o principal fator etiológico do câncer gástrico, é uma bactéria Gram-negativa capaz de invadir e colonizar o estômago humano interagindo diretamente com as células gástricas epiteliais, sendo a infecção principalmente adquirida durante a infância, por via oral, persistindo por toda vida se não tratada eficazmente (CREW; NEUGUT, 2006). O processo de inflamação crônica, iniciado por essa infecção, apresenta íntima ligação com o desenvolvimento da carcinogênese gástrica (LOCHHEAD, 2007). Esse organismo é bem adaptado a elevadas condições ácidas, possuindo uma potente enzima, a urease que hidrolisa determinada quantidade de uréia, produzindo amônia e dióxido de carbono acarretando na neutralização do pH gástrico, proporcionando assim uma área mais permissiva ao seu redor.

A habilidade patológica da bactéria deve-se aos seis principais fatores de virulência (*cagA*, *vacA*, *iceA*, *babA*, *oipA* e *sabA*) possivelmente presentes na linhagem infectante, aos fatores genéticos do hospedeiro e também aos fatores ambientais. Entre os fatores bacterianos destacam-se os genes: *cagA* que codifica uma proteína altamente imunogênica relacionada

com linhagens mais virulentas capazes de induzir mudanças morfológicas, vacuolização e degeneração celular sucessiva; o gene *vacA*, pois sua proteína induz forte vacuolização, formação de canais na membrana, efeitos na sinalização celular além de indução da apoptose e modulação imune, além do *babA*, *oipA* e *sabA* relacionados principalmente à adesão celular (KUSTERS, 2006).

Segundo Ushijima (2007), a exposição aos carcinógenos gástrico, incluindo a infecção pela *H. pylori*, pode induzir a metilação aberrante de genes específicos. Desta forma, além da sua participação no desenvolvimento das lesões gástricas pré-cancerosas, metaplasia intestinal e úlcera péptica, a infecção pela *H. pylori* pode estar relacionada com mais essa via no desenvolvimento do câncer gástrico.

Na carcinogênese gástrica é observada elevada heterogeneidade nos padrões histológicos acompanhada por vias moleculares distintas no adenocarcinoma tipo intestinal e difuso. No tipo intestinal, por exemplo, observam-se principalmente amplificações em *c-ERB2*, *c-MET* e *ciclina E*, mutações em *K-RAS*, inativação do *APC*, *TP53*, *p16*, *MGMT*, *MLH1*, perda de heterozigosidade do *TP73* e redução na expressão das proteínas p27 e nm23. No tipo difuso tem sido relatada a redução ou perda de função das caderinas, inativação do *TP53*, perda de heterozigosidade da região 17q21, amplificação dos genes *K-SAM*, *c-MET* e *ciclina E* e também redução nas proteínas p27 e nm23 (CÉSAR et al., 2002; TAHARA, 2004).

Além dessas alterações genéticas, o câncer gástrico é um dos tumores com nível elevado de metilação aberrante nas ilhas CpG (KANG et al., 2003), onde muitos genes envolvidos na regulação do ciclo celular, invasão de tecidos, reparo do DNA e apoptose têm sido inativados e/ou ativados por esse tipo de mecanismo epigenético (KIM et al., 2004). Por exemplo, tem sido relatado hipermetilação ocasionando o silenciamento do gene *14-3-3* (SUZUKI et al. 2000), *E-caderina*, *p16*, *p15*, *GSTP1*, *hMLH1* (LEUNG et al., 2001), *THBS-1*, *TIMP-3* (KANG et al., 2001), *AKAP12* (CHOI et al., 2004) *APC*, *RASSF1A* e *RUNX3* (TAMURA, 2004), *hMSH2* (FANG, 2004), *RAR β* (KOIKE et al., 2005), *HLTF*, *RIZ1*, *TM* e *FLNc* (OUE et al., 2006) além de hipometilação nos oncogenes *c-Myc* e *c-Ha-Ras* (FANG et al., 1996), dentre outros genes conforme Tabela 2.

Tabela 2. Outros genes hipermetilados em câncer gástrico (modificado a partir de Esteller, 2007).

Gene	Função	Neoplasia
<i>MLH1</i>	Reparo do DNA	Câncer de cólon e gástrico
<i>p14</i>	Inibidor de MDM2	Câncer gástrico e renal
<i>CRBP1</i>	Retinol ligante	Câncer de cólon, gástrico e linfoma
<i>CDH1</i>	Adesão celular	Câncer de mama, gástrico e leucemia
<i>COX-2</i>	Pró-inflamatória	Câncer de cólon e gástrico
<i>GATA 4</i>	Fator transcricional	Câncer de cólon e gástrico
<i>GATA 5</i>	Fator transcricional	Câncer de cólon e gástrico
<i>ID4</i>	Fator transcricional	Câncer gástrico e leucemia
<i>WRN</i>	Reparo do DNA	Câncer de cólon e gástrico

Estudos sobre ocorrência de alterações genéticas e epigenéticas em lesões pré-cancerosas como a metaplasia intestinal são limitados. Algumas alterações descritas são expressão aumentada de *hTERT* (transcriptase reversa da telomerase humana) com ativação de telomerase e mutações nos genes *TP53* e *APC*, que correspondem a eventos precoces no desenvolvimento de múltiplas etapas do câncer gástrico tipo intestinal, além de mutações no oncogene *K-RAS* (TAHARA, 2004).

Ainda em metaplasia intestinal, um estudo recente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa detectou pela técnica FISH (hibridação *in situ* fluorescente) trissomias dos cromossomos 7, 8 e 9 em 71% dos casos de metaplasia intestinal em associação com a infecção pela *H. pylori*. Nessas lesões também se observou deleção do gene *TP53* e expressão aumentada da proteína p53 em 60% e 12% dos casos, respectivamente (CÉSAR et al., 2004). Estes achados evidenciam a ocorrência de instabilidade cromossômica nos estágios precoces da carcinogênese gástrica associada com a infecção pela *H. pylori*.

Alguns dos poucos estudos de metilação realizados em metaplasia intestinal têm evidenciado hipermetilação nos genes *DAP-kinase*, *E-caderina*, *GSTP1*, *hMLH1* e *RASSF1A* (KANG et al., 2003), *p16* e *hMLH1* (LEE et al., 2004), *ZIK1*, *KAL1* e *FGF14* (MIHARA et al., 2006), assim como aumento da expressão de *Shh* devido a hipometilação (WANG et al., 2006). Tendo como suporte esses achados de padrão de metilação aberrante foram

selecionados no presente estudo os genes *WT1* e *RARβ* para investigação do padrão de metilação em metaplasia intestinal.

O gene Tumor de Wilms 1 (*WT1*) está localizado na região cromossômica 11p13 com aproximadamente 50 kb e 10 éxons sendo inicialmente caracterizado como um gene supressor de tumor, responsável pelo tumor de Wilms, uma neoplasia que afeta os rins de crianças (CALL et al., 1990). Embora, *WT1* tenha sido inicialmente caracterizado como gene supressor tumoral, ele é superexpresso em uma variedade de outras neoplasias, incluindo carcinomas de pescoço (OJI et al., 2002) cólon (KOESTERS et al., 2004), pâncreas (OJI et al., 2004) entre outros, sugerindo possível atividade oncogênica nesses e outros tipos de neoplasias. Devido evidências suportando um papel supressor de tumor em alguns contextos, mas função oncogênica em outros, o gene *WT1* apresenta funções diferentes em tipos diferentes de neoplasias. Ele apresenta quatro principais isoformas de proteínas resultantes de dois principais eventos de *splicing* alternativo (Figura 6), sendo elas: $Ex5^-/KTS^-$; $Ex5^+/KTS^-$; $Ex5^-/KTS^+$ e $Ex5^+/KTS^+$, as quais apresentam diferentes funções celulares (ARIYARATANA; LOEB, 2007).

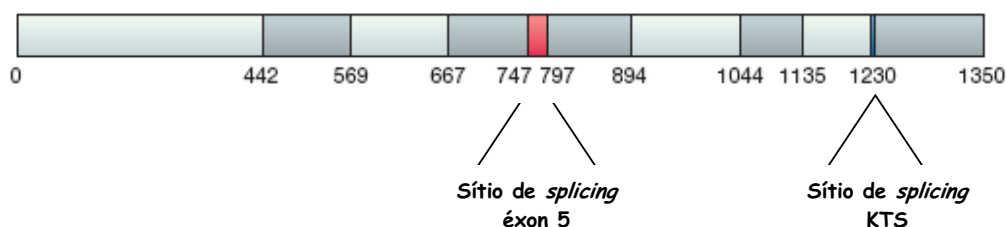


Figura 6. Diagrama esquemático dos sítios de *splicing* do gene *WT1*. (modificado a partir de Ariyaratana; Loeb, 2007)

O *WT1* tem sido ainda implicado na regulação de diversos genes com atuação como fator de crescimento; receptor de insulina e vitamina D; fatores de transcrição (*EGR1* e *MYC*); adesão celular (*E-caderina*); apoptose (*BCL2* e *A1*) e ciclo celular (*p21* e *ciclina E*), de acordo com as linhagens celulares específicas avaliadas (ARIYARATANA; LOEB, 2007). Na Tabela 3 estão apresentados alguns dos efeitos do gene *WT1* no processo de apoptose.

Tabela 3. Efeito do gene *WT1* na apoptose em diferentes linhagens celulares (modificado a partir de Ariyaratana; Loeb, 2007).

Linhagem celular	Efeito	Mecanismo proposto
G401 (tumor de Wilms)	Ex5 ⁺ /KTS ⁻ anti-apoptótico Ex5 ⁻ /KTS ⁺ neutro	Aumento de <i>BCL2</i>
U2OS e Saos-2 (osteocarcinoma)	Ex5 ⁺ /KTS ⁻ pró-apoptótico	Diminuição de <i>EGFR</i>
K562 (CML) e HL60 (AML)	Ex5 ⁺ /KTS ⁻ anti-apoptótico	Diminuição de <i>BAX</i>

* CML= Leucemia Mielóide Crônica, AML= Leucemia Mielóide Aguda.

O gene *WT1* apresenta expressão tecido-específica, expresso primariamente no sistema urogenital durante o desenvolvimento embrionário. Já em tecidos maduros, além do sistema urogenital essa expressão é encontrada no sistema nervoso central e em tecidos envolvidos com a hematopoiese (Yang et al. 2007).

O gene *RARβ*, provável gene supressor tumoral, localizado na região cromossômica 3p24 codifica o receptor de ácido retinóico, membro da superfamília dos receptores de hormônios esteróides, sendo ele o único dos três receptores de ácido retinóico que é freqüentemente deletado ou silenciado epigeneticamente em estágios precoces da progressão tumoral (ALVAREZ et al., 2007). Os retinóides (derivados naturais ou sintéticos da vitamina A) são moléculas sinalizadores que possuem papel importante em diversas vias, tendo como receptores heterodímeros formados por um dos três receptores de ácido retinóico (*RARα*, *RARβ* e *RARγ*) e um receptor de retinóides X (*RXRα*, *RXRβ* e *RXRγ*). O receptor de ácido retinóico (*RARβ*) localiza-se no citoplasma e em compartimentos subnucleares e atua na regulação da sinalização celular durante o desenvolvimento embrionário, crescimento celular, diferenciação, sobrevivência e morte celular resultantes dos efeitos diretos e indiretos da vitamina A (SOPRANO et al., 2004).

O gene possui dois sítios promotores (P1 e P2) originando quatro isoformas (β_1 , β_2 , β_3 e β_4), cada uma delas apresentando afinidades diferentes aos retinóides e diferentes funções biológicas, sendo *RARβ₂* a principal e mais abundante isoforma, usualmente referida na literatura apenas por *RARβ*. Os mecanismos moleculares responsáveis pela sua atividade antitumoral ainda não são bem compreendidos, porém uma possível via seria a

supressão da expressão de *EGFR*, ativando a proteína 1 (AP-1) e o gene *COX-2*, além da fosforilação das quinases 1 e 2 (Erk 1/2) (Figura 7).

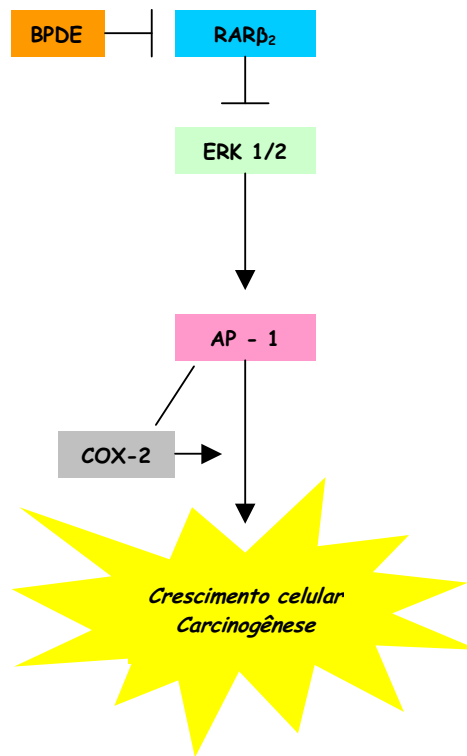


Figura 7. Possível via de supressão da carcinogênese envolvendo o gene *RARβ*. Benzo(a)pireno diol (BPDE) atua suprimindo a expressão do *RAR β₂*, superegulando a expressão de *EGFR* e a fosforilação de Erk 1/2 resultando na indução de AP-1 e expressão de *COX-2*, promovendo com isso a carcinogênese (modificado a partir de Xu, 2007).

4. Objetivos

Devido à complexidade do processo da carcinogênese gástrica e aos poucos estudos sobre alterações epigenéticas em lesões gástricas precursoras como a metaplasia intestinal, este trabalho teve por objetivos:

- a- Determinar os padrões de metilação da região promotora dos genes *WT1* e *RAR β* em amostras de metaplasia intestinal, em comparação com o adenocarcinoma e mucosa gástrica normal;
- b- Avaliar a ocorrência de associação entre padrão de metilação nas diferentes lesões com a infecção pela bactéria *H. pylori*.

II. Material e Métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa / IBILCE-UNESP (Parecer nº 27/2006) e foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana, Departamento de Biologia, IBILCE-UNESP, Campus de São José do Rio Preto – SP, conforme as Normas Regulamentadoras de Pesquisas em Seres Humanos, Resolução CNS 196/96. De todos os indivíduos foram obtidos os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), para a coleta das amostras, além de entrevista para obtenção de informações sobre identificação pessoal, história familiar de câncer ou lesões gástricas, e estilo de vida como tabagismo, etilismo, dentre outras (Anexo 1).

1. Caracterização das amostras

O padrão de metilação do DNA foi avaliado a partir de 35 amostras de metaplasia intestinal e 8 amostras de adenocarcinoma gástrico além de suas respectivas mucosas normais, coletadas de área macroscopicamente normal distante das lesões, geralmente região antral. Todas as amostras consistiram de biópsias coletadas no Serviço de Endoscopia do Hospital de Base, São José do Rio Preto, com a colaboração do médico Kenji Miyazaki. Todos os casos foram confirmados por diagnóstico histopatológico das lesões, realizado pelo Serviço de Patologia do mesmo hospital. Para o diagnóstico histopatológico dos adenocarcinomas foi utilizada a classificação de Lauren (1965), enquanto para as metaplasias foi utilizada a classificação de Sydney (DIXON et al., 1996).

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentados os dados quanto à caracterização demográfica e clínico-patológica das amostras do grupo de metaplasia intestinal (MI) e do grupo de câncer gástrico (CG) respectivamente, e na Tabela 6 as frequências em cada grupo quanto as variáveis idade, sexo, tabagismo, etilismo e tipo histológico. No grupo de metaplasia intestinal foram obtidas amostras de 35 indivíduos, com idades entre 38 e 87 anos ($\chi \pm s = 60,4 \pm 12,66$), sendo a maioria do sexo feminino (54%), fumantes (71%) e não etilistas (69%). Quanto ao tipo histológico a maioria apresentou metaplasia intestinal completa (83%). Em dois indivíduos o laudo histopatológico indicou os dois tipos de metaplasia (completa e incompleta), além de 85% das amostras serem negativas para *H. pylori* segundo o prontuário médico, sendo realizados o teste histológico e urease como rotina no Hospital de Base, São

José do Rio Preto. Por sua vez, no grupo de câncer gástrico foram coletadas amostras de oito indivíduos com idade entre 38 e 80 anos ($\chi \pm s = 58 \pm 15,59$), a maioria do sexo masculino (87%), fumantes (63%) e metade das amostras sendo etilistas. Neste grupo, 50% das amostras de adenocarcinoma eram do tipo intestinal e um indivíduo apresentou diagnóstico histopatológico para o tipo intestinal e difuso do adenocarcinoma. No diagnóstico histopatológico da *H. pylori* apenas seis amostras continham informações no prontuário médico, dentre essas, quatro foram positivas, representando 67%.

Tabela 4. Caracterização das amostras do grupo de metaplasia intestinal (MI) quanto ao sexo, idade, etilismo, tabagismo, classificação da metaplasia intestinal e diagnóstico histológico da *H. pylori*

Caso	Sexo	Idade (anos)	Etilista	Tabagista	Classificação da MI	<i>H. pylori</i>*
MI 01	F	66	N	S	Completa	-
MI 02	F	77	N	N	Completa	-
MI 03	F	57	N	N	Completa	-
MI 04	M	52	N	S	Completa	-
MI 05	M	87	N	S	Completa	-
MI 06	M	55	N	N	Completa	-
MI 07	M	55	N	S	Completa	-
MI 08	M	78	S	S	Completa	-
MI 09	F	66	N	N	Completa	-
MI 10	F	43	N	S	Completa	-
MI 11	M	55	S	S	Completa	-
MI 12	F	79	N	N	Incompleta	-
MI 13	F	43	N	S	Completa	+
MI 14	F	77	S	S	Incompleta	-
MI 15	M	51	N	S	Incompleta	-
MI 16	F	52	N	N	Incompleta	-
MI 17	F	61	N	S	Completa	-
MI 18	M	59	N	N	Completa/ incompleta	-
MI 19	M	65	N	N	Completa	-
MI 20	M	66	S	S	Completa	-
MI 21	F	48	S	S	Completa	-
MI 22	M	76	S	S	Completa	-
MI 23	F	52	S	S	Completa	+
MI 24	F	64	N	N	Completa	-

MI 25	M	67	S	S	Completa	-
MI 26	M	46	N	S	Completa	-
MI 27	F	61	S	N	Completa	-
MI 28	M	47	N	S	Completa/ incompleta	-
MI 29	F	59	N	S	Completa	+
MI 30	F	54	N	S	Completa	-
MI 31	M	67	S	S	Completa	*
MI 32	F	38	N	S	Completa	+
MI 33	M	83	S	S	Completa	-
MI34	F	68	N	S	Completa	-
MI35	F	40	N	S	Completa	+

F= feminino; M= masculino; N= não; S= sim; * informação não disponível no prontuário médico.

Tabela 5. Caracterização das amostras do grupo de câncer gástrico (CG) quanto ao sexo, idade, etilismo, tabagismo, classificação do câncer gástrico e diagnóstico histológico da *H. pylori*.

Código	Sexo	Idade (anos)	Etilista	Tabagista	Classificação do CG	<i>H. pylori</i>*
CG 01	M	60	S	S	Intestinal/Difuso	+
CG 02	M	74	S	S	Difuso	+
CG 03	M	41	N	N	Difuso	-
CG 04	F	38	N	N	Difuso	+
CG 05	M	45	S	S	Intestinal	+
CG 06	M	68	N	N	Intestinal	*
CG 07	M	80	N	S	Intestinal	-
CG 08	M	58	N	N	Intestinal	*

F= feminino; M= masculino; N= não; S= sim; * informação não disponível no prontuário médico

Tabela 6. Distribuição demográfica e clinico-patológica dos indivíduos dos grupos de metaplasia intestinal e câncer gástrico.

Variáveis/grupos	Metaplasia intestinal	Câncer gástrico
Nº amostras	35	8
Idade ($\chi \pm s$)	60,4 \pm 12,66	58 \pm 15,59
Variação (anos)	38-87	38-80
Sexo		
Masculino	16 (46%)	7 (87%)
Feminino	19 (54%)	1 (13%)
Fumantes		
Sim	25 (71%)	5 (63%)
Não	10 (29%)	3 (37%)
Etilistas		
Sim	11 (31%)	4 (50%)
Não	24 (69%)	4 (50%)
Histologia		
MI Completa	29 (83%)	
MI Incompleta	4 (11%)	
MI Completa/Incompleta	2 (6%)	
CG Intestinal		4 (50%)
CG Difuso		3 (38%)
CG Intestinal/Difuso		1 (12%)
HP+	5 (15%)	4 (67%)
HP-	29 (85%)	2 (33%)

CG= câncer gástrico; MI= metaplasia intestinal; Hp+= presença de *H. pylori*; Hp-= ausência de *H. pylori*

2. Extração de DNA

Como este material também foi utilizado em um projeto de doutorado do nosso laboratório para o estudo da expressão transcricional de genes relacionados ao ciclo celular e atividade da telomerase, foi utilizado um protocolo que permite a extração simultânea de RNA e DNA, utilizando o kit comercial (Trizol). Portanto, as biópsias coletadas foram imediatamente acondicionadas em solução de RNA Later (Qiagen) para preservação da

integridade do RNA e mantidas a -20°C. A extração dos ácidos nucleicos realizou-se conforme as especificações do fabricante, com algumas modificações. Brevemente, após a retirada da fase que contém o RNA, foi adicionado 20µL de SDS 10%, 20mg/mL de proteinase K e 20mg/mL de RNase ao restante da amostra para a extração do DNA, sendo esse precipitado com etanol 100% gelado. O *pellet* obtido foi lavado com solução de citrato de sódio 0,1M em etanol 10%, eluído em água ultrapura autoclavada e estocado a -20°C para uso posterior.

3. Conversão do DNA pelo Bissulfito de Sódio

A conversão do DNA pelo bissulfito de sódio foi realizada conforme protocolo de Herman et al. (1996), com algumas modificações. Brevemente, após determinação da concentração de cada amostra de DNA por espectrofotômetro (Nanodrop – ND-1000), as amostras foram submetidas à desnaturação por NaOH (concentração final de 0,2M) por 30 minutos a 55°C no termociclador, tendo assim uma maior controle da temperatura. Subseqüentemente, o DNA foi tratado adicionando bissulfito de sódio / solução de hidroquinona com pH 5,0 e incubados a 70°C por 3 horas também no termociclador. Logo após o tratamento, o DNA foi purificado utilizando o kit Wizard (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A modificação foi completada pelo tratamento com NaOH (concentração final de 0,3M) por 5 minutos, seguida pela precipitação com etanol, sendo o DNA ressuspendido em água e estocado a -80°C até o momento do uso.

4. Técnica MS-PCR: PCR específica para metilação

Após a conversão do DNA, a reação de cadeia da polimerase específica para metilação (MS-PCR) foi realizada para análise dos genes *WT1* e *RARβ* que apresentam ilhas CpG em suas regiões promotoras. As seqüências dos *primers* específicos, para o DNA metilado e não metilado foram todos encontrados na literatura (Tabela 7) e confirmados com auxílio do programa Methyl Primer Express v. 1.0.

Tabela 7. Sequência dos *primers* específicos dos genes e tamanho dos produtos amplificados.

Gene	Primers	Produtos	Referência
<i>WT1</i>	U-F: GAGGGTGTTTTTAAGGAGTAGTGT	122pb	Kaneuchi et al. (2005)
	U-R: AAACCTCAAATAAAAAAAAAACCAACAAC		
	M-F: GTTTTTAAGGAGTAGCGCGC	114pb	
	M-R: ACTCAAATAAAAAAAAAACCGACGAC		
<i>RARβ</i>	U-F: GGATTGGGATGTTGAGAATGT	158 pb	Evron et al. (2001)
	U-M: CAACCAATCCAACCAAAACAA		
	M-F: GAACGCGAGCGATTTCGAGT	143 pb	
	M-R: GACCAATCCAACCGAAACG		

U= não metilado; M= metilado

Na reação de PCR foram utilizados 5 μ L do DNA genômico modificado, cerca de 160 μ M a 200 μ M de cada um dos *primers sense* e *anti-sense*, Tris-HCl-KCl 150 μ M (pH 8,0), 200 μ M de MgCl₂, *Taq* DNA polimerase Platinum (1U) e água ultra-pura autoclavada para completar o volume final para 25 μ L. Na Tabela 8 estão descritas as condições específicas no processo de amplificação para cada gene.

Tabela 8. Especificações para *PCR*.

Etapas da PCR	Condições da PCR	
	<i>WT1</i>	<i>RARβ</i>
	<i>Primers</i> U e M	<i>Primers</i> U e M
Pré-desnaturação	95° - 5 minutos	95° - 5 minutos
Desnaturação inicial	95° - 30 segundos	95° - 45 segundos
Anelamento dos <i>primers</i>	58° - 45 segundos	55° - 1 minuto
Extensão das cadeias	72° - 1 minutos	72° - 5 minutos
Extensão final	72° - 5 minutos	72° - 5 minutos
Resfriamento	4° - indefinido	4° - indefinido

Para todas as amostras foram realizadas duas *PCRs*, a primeira constituída de 35 ciclos e a segunda constituída de 25 ciclos, nas mesmas condições da primeira, semelhante a *Hemi Nested PCR* com algumas modificações, ferramenta essa usada em alguns trabalhos da literatura como por exemplo SATOH et al. (2003) aumentando com isso sua sensibilidade. Essa foi a forma adotada, devido a variação entre as amostras após a primeira *PCR* que

apresentavam, na maioria das vezes, bandas muito claras ou mesmo não apresentavam bandas visíveis para análise no gel de poliacrilamida.

Como controles, positivo e negativo, foram utilizados DNA genômico de sangue periférico extraído com Ficoll Paque de indivíduo saudável. Após a extração uma amostra desse DNA genômico foi tratada com a enzima MSssI (CpG Methylase – New England BioLabs) para hipermetilação do DNA e conseqüente utilização do mesmo como controle positivo. Subseqüentemente ambas amostras de DNA, para controle positivo e negativo, foram modificadas com bissulfito de sódio.

Para eletroforese e posterior análise das bandas de interesse, foi preparado gel de poliacrilamida na concentração de 7,5% (a partir de acrilamida e bis-acrilamida), polimerizado em placas de 16,0 x 20,0cm e 1,5mm de espessura (aparato BioRad). O DNA amplificado por PCR (5 µL) foi diluído em uma solução contendo azul de bromofenol (0,025%) e aplicado no gel, sendo submetido a uma corrente elétrica de 120V, 90mA, 30W (fonte Electrophoresis Power Supply – EPS 600- Pharmacia Biotech) por aproximadamente 2 horas e 30 minutos em temperatura ambiente, utilizando-se tampão TEB 0,5x (Tris-borato 90mM pH 8,0, EDTA 20mM) para a corrida.

Após a eletroforese, as amostras no gel foram coradas com nitrato de prata (AgNO_3), para a visualização das bandas de interesse. Inicialmente, os géis foram fixados por 10 minutos em etanol a 10% e ácido acético a 0,75%, sob agitação leve e constante. Em seguida, foi realizada a impregnação com uma solução de AgNO_3 a 0,15% por 5 minutos, também sob agitação constante. Posteriormente, os géis foram rapidamente lavados duas vezes com água destilada e, finalmente, as amostras no gel foram reveladas com uma solução de hidróxido de sódio a 3% e formaldeído a 0,3% até o aparecimento total das bandas. A revelação foi em seguida bloqueada com solução fixadora (etanol 10% e ácido acético a 7,5%) por 10 minutos sob agitação leve e constante e o gel foi então conservado entre duas folhas de papel celofane, contendo glicerol 10% (CERON et al., 1992).

Na interpretação dos resultados da eletroforese, conforme indicado na literatura, a presença da banda M (metilada) no gel de poliacrilamida foi adotada como critério para interpretação dos casos com hipermetilação, assim os casos U- e M+, ou U+ e M+ foram considerados hipermetilados e os casos U+ e M- como ausência de alelos metilados.

5. Diagnóstico molecular da *H. pylori*

Para a investigação da presença da bactéria *H. pylori* nas amostras de interesse, utilizou-se uma PCR *multiplex* composta por três pares de *primers*: URF e URR, específicos para o gene da *Urease A*; Hp1 e Hp2, específicos para o gene *TsaA*, ambos bacterianos e, CYP1A1F e CYP1A1R específicos para o gene humano *CYP1A1*, utilizado como controle interno da reação. A reação foi realizada a partir de 200ng de DNA genômico, 25pmol de cada um dos pares de *primers* descritos, 5,4x200/3 µM de dNTPs, Tris-HCl-KCl 10 mM (pH 8,3), 4 mM de MgCl₂, *Taq* DNA polimerase (2,5 U) e água ultra-pura autoclavada para completar 45 µl. As condições para amplificação foram: 94°C por 5 minutos (pré-desnaturação); 45 ciclos nas condições de 94°C por 1 minuto (desnaturação inicial), 58°C por 1 minuto (anelamento dos primers), 72°C por 2 minutos (extensão das cadeias); seguido de 10 minutos a 72°C (extensão final) e por último o resfriamento a 4 °C por tempo indeterminado.

Após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, juntamente com um controle positivo para a *H. pylori*. A presença das bandas de 413 pb (referente ao gene *TsaA*), 313 pb (referente ao gene *UreaseA*) e de 226 pb (referente ao gene *CYP1A1* humano) no gel de agarose indicaram a ocorrência da *H. pylori* no controle positivo e este mesmo critério foi utilizado para as demais amostras estudadas.

Nesta investigação da *H. pylori* foi inicialmente utilizado o DNA extraído a partir das biópsias de mucosas normais de todos os indivíduos. Em algumas amostras em que se observou um diagnóstico molecular negativo para infecção pela bactéria, mas que havia informação no prontuário do paciente de laudo positivo realizado pelo próprio hospital, optou-se em testar também o DNA extraído a partir das biópsias obtidas das regiões de metaplasia ou adenocarcinoma.

6. Análise estatística

Para comparações dos dados obtidos foi utilizado o teste exato de Fisher's, realizado pelo programa GraphPad InStat, versão 3.06. O nível de probabilidade (p) < 0.05 foi utilizado como critério de significância.

III. Resultados

1. Padrões de metilação dos genes *WT1* e *RARβ*

A investigação do padrão de metilação do gene *WT1* foi realizada em 35 amostras do grupo de metaplasia intestinal (Anexo 2) e em 8 amostras do grupo de câncer gástrico (Anexo 3), além de suas respectivas mucosas normais. Os produtos de PCR não-metilado (U) e metilado (M) apresentaram 122 pb e 116 pb respectivamente (Figura 8).

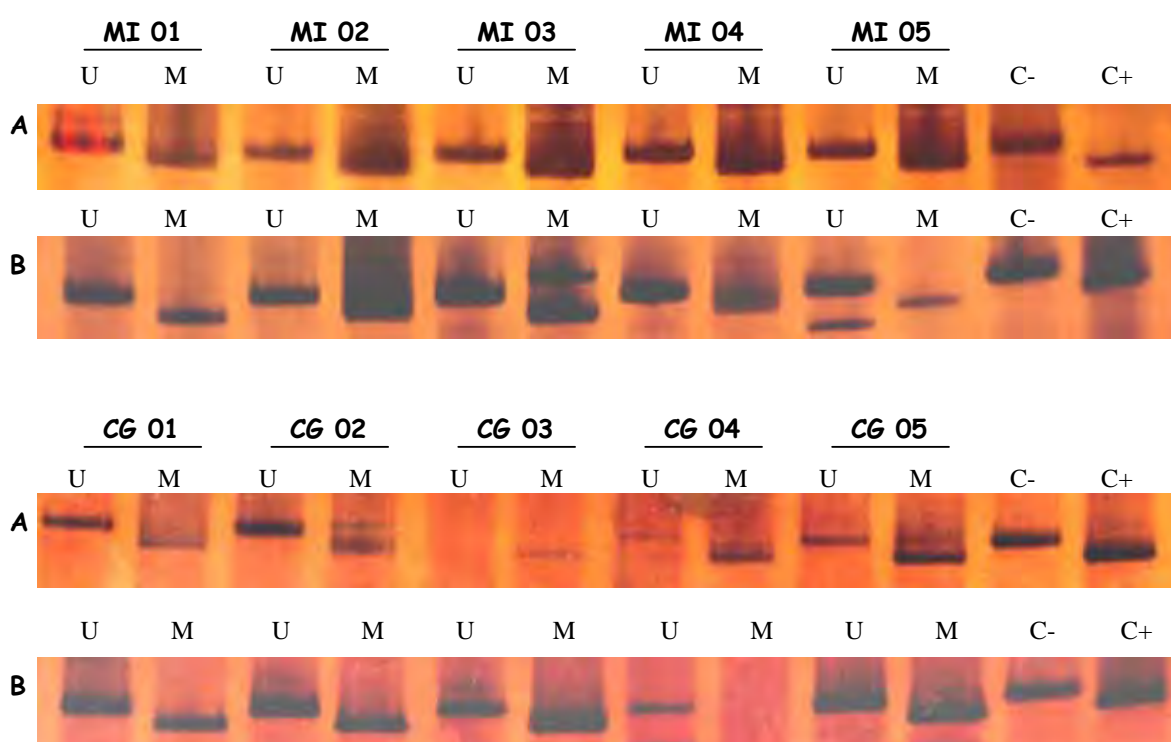


Figura 8. Géis de poliacrilamida 7,5% mostrando o padrão de bandas após amplificação do gene *WT1*. Em A e B, amostras de metaplasia intestinal e suas respectivas mucosas normais (MI) 01, 02, 03, 04, 05 e controles negativo (C-) e positivo (C+). Em C e D, amostras de câncer gástrico e suas respectivas mucosas normais (CG) 01, 02, 03, 04, 05 e controles negativo (C-) e positivo (C+). U= não metilado; M= metilado. Análise das amostras: U+/M- = amostra não-metilada; U+/M+ ou U-/M+ = amostra metilada.

No presente estudo, assim como indicado pela literatura, a presença da banda M (metilada) no gel de poliacrilamida foi adotada como critério para interpretação dos casos com hipermetilação, portanto os casos com bandas U- e M+, ou U+ e M+ foram considerados hipermetilados e apenas os casos com bandas U+ e M- como ausência de alelos metilados. O

grupo de metaplasia intestinal apresentou 34/35 (97%) amostras metiladas, e no grupo de respectivas mucosas normais a metilação foi de todas as amostras. Da mesma forma, no grupo de câncer gástrico também se observou 100% de metilação, e nas amostras de mucosas normais, apenas uma amostra (12%) apresentou o padrão considerado não metilado (Tabela 9).

Tabela 9. Frequências de amostras metiladas e não metiladas nos diversos grupos para os genes *RARβ* e *WT1*.

Grupos	N	<i>WT1</i>			<i>RARβ</i>		
		U	U/M	M	U	U/M	M
MI	35	1 (3%)	34 (97%)	0	9 (26%)	26 (74%)	0
NMI	35	0	35 (100%)	0	6 (17%)	28 (80%)	1 (3%)
			<i>p</i> =1,000			<i>p</i> =0,5613	
CG	08	0	8 (100%)	0	0	7 (88%)	1 (12%)
NCG	08	1(12%)	7 (88%)	0	1 (12%)	7 (88%)	0
			<i>p</i> =1,000			<i>p</i> =1,000	

MI= metaplasia intestinal; NMI= mucosa normal correspondente as metaplasias; CG= câncer gástrico; NCG= mucosa normal correspondente aos cânceres; N= número amostral; U= não metilado (U+ e M-); M= metilado

A investigação do padrão de metilação do gene *RARβ* também foi realizada em 35 amostras do grupo de metaplasia intestinal (Anexo 2) e 8 amostras do grupo de câncer gástrico (Anexo 3), além de suas respectivas mucosas normais. Os produtos de PCR correspondentes ao DNA não-metilado (U) e metilado (M) apresentaram 158 pb e 143 pb, respectivamente (Figura 9).

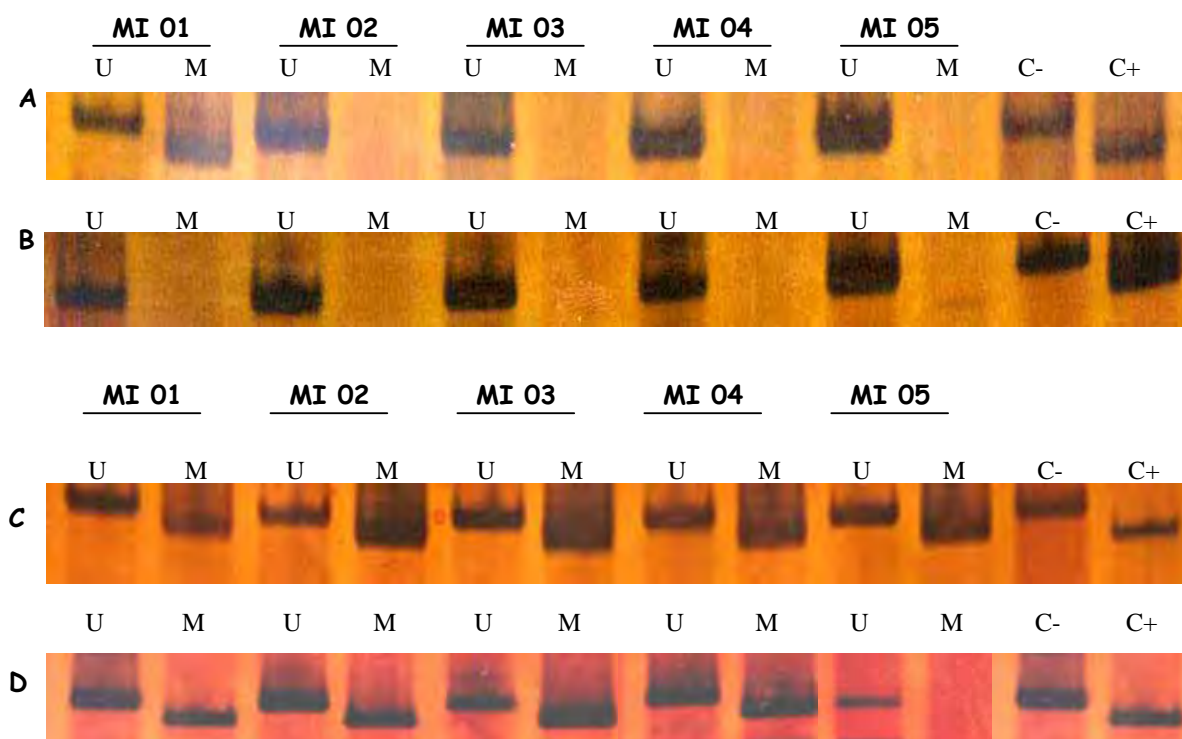


Figura 9. Géis de poliacrilamida 7,5% mostrando o padrão de bandas após amplificação do gene *RARβ*. Em A e B, amostras de metaplasia intestinal e suas respectivas mucosas normais (MI) 01, 02, 03, 04, 05 e controles negativo (C-) e positivo (C+). Em C e D, amostras de câncer gástrico e suas respectivas mucosas normais (CG) 01, 02, 03, 04, 05 e controles negativo (C-) e positivo (C+). U= não metilado; M= metilado. Análise das amostras: U+/M- = amostra não-metilada; U+/M+ ou U-/M+ = amostra metilada.

O grupo de metaplasia intestinal apresentou 26/35 (74%) de suas amostras metiladas e 9/35 (26%) de não-metiladas, enquanto, o grupo de mucosas normais apresentou 29/35 (83%) de suas amostras com padrão metilado e 6/35 (17%) de não-metilado, sendo que essas diferenças não foram estatisticamente significantes, conforme o teste exato de Fisher ($p= 0,5613$). O grupo de câncer gástrico, por sua vez, apresentou 100% das amostras metiladas, enquanto nas mucosas normais o padrão metilado foi observado em 88% delas (Tabela 9), também não havendo diferenças significantes conforme o teste exato de Fisher ($p= 1,0000$).

No grupo de metaplasia intestinal também foi avaliada a ocorrência de associação entre o padrão de metilação de ambos os genes (*WT1* e *RARβ*), sendo que 71% das amostras foram metiladas para os dois genes (*RARβ* M/*WT1* M), 26% e 3% apresentaram metilação respectivamente, apenas do gene *WT1* ou *RARβ* e nenhuma das amostras apresentou o padrão não-metilado dos dois genes simultaneamente (Tabela 10).

Tabela 10. Associação entre o padrão de metilação dos genes *WT1* e *RARβ* no grupo de metaplasia intestinal.

	<i>RARβ</i> M	<i>RARβ</i> U
<i>WT1</i> M	25 (71%)	9 (26%)
<i>WT1</i> U	1 (3%)	0
<i>p</i> =1,0000		

2. Avaliação molecular da *H. pylori* e associação com o padrão de metilação dos genes *WT1* e *RARβ*

Na investigação molecular o critério adotado para detectar a presença do DNA da bactéria *H. pylori* foi a amplificação de três bandas, as quais duas correspondem a fragmentos de DNA bacterianos de 413 pb (gene *TsaA*) e de 316 pb (gene *Urease A*) e uma correspondente ao DNA do gene humano *CYP1A1* (226pb) utilizada como controle interno da reação (Figura 10). Foram analisadas 35 amostras de metaplasia intestinal e 8 de câncer gástrico, cujos resultados foram comparados com os diagnósticos disponíveis nos prontuários médicos dos pacientes. Contudo para uma amostra de metaplasia intestinal e duas de câncer gástrico, essas informações não foram obtidas, assim para a comparação das frequências de casos com a presença (Hp+) ou ausência (Hp-) de infecção pela bactéria entre os dois diagnósticos, tais amostras foram excluídas para o cálculo estatístico.

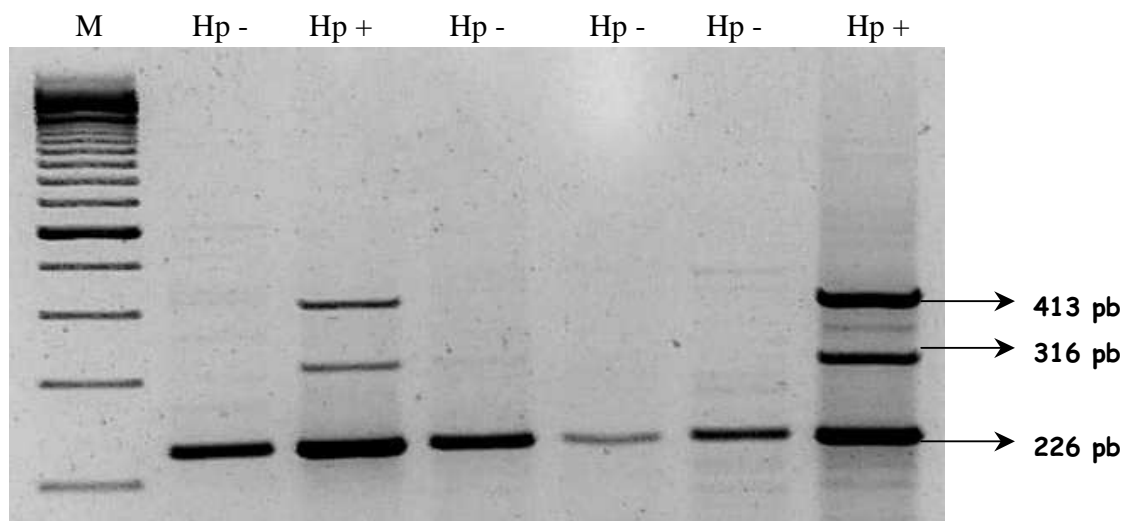


Figura 10. Gel mostrando padrão de bandas para *H. pylori*. Gel de agarose 2% mostrando padrão de bandas após PCR-multiplex para detecção molecular do DNA da *H. pylori*. M= marcador de peso molecular de 100 pb; Hp - = ausência da bactéria; Hp+ = presença da bactéria.

O teste molecular evidenciou o DNA da *H. pylori* em 32% (11/35) dos casos de metaplasia intestinal e 63% (5/8) dos casos de câncer gástrico. Comparando-se com os resultados obtidos dos prontuários médicos é possível observar divergências entre ambos. O teste histológico apresentou falso-negativos em 5 das 33 (15%) amostras investigadas de metaplasia intestinal, enquanto nas amostras de câncer gástrico foi observado tanto falso-negativo em uma amostra (17%), como dois falso-positivos (33%) dentre as seis amostras investigadas (Tabela 11). As duas amostras de câncer gástrico (CG02 e CG04) que apresentaram diagnóstico histológico positivo para *H. pylori* foram novamente testadas molecularmente a partir do DNA extraído das biópsias do tumor, confirmando o diagnóstico molecular negativo para a bactéria.

Tabela 11. Frequências dos casos com diagnóstico molecular e histológico da *H. pylori* nos grupos de metaplasia intestinal e câncer gástrico.

Grupos	Molecular		Histológico*	
	Hp+	Hp-	Hp+	Hp-
MI	11/34 (32%)	23/34 (70%)	5/33 (15%)	28/33(85%)
CG	5/8 (63%)	3/8 (37%)	4/6 (67%)	2/6 (33%)

Hp - = ausência da bactéria; Hp+ = presença da bactéria; MI= metaplasia intestinal; CG= câncer gástrico; * resultados obtidos dos prontuários médicos.

Tabela 12. Divergências entre diagnósticos histológico e molecular da *H. pylori*, com presença de falso-negativos e falso-positivos.

	Código	Hp Histológico	Hp Molecular
Falso-negativos ←	MI 16	-	+
	MI 21	-	+
	MI 26	-	+
	MI 30	-	+
	MI 34	-	+
	CG 07	-	+
Falso-positivos ←	CG 02	+	-
	CG 04	+	-

A partir do diagnóstico molecular da bactéria *H. pylori* foi avaliada a ocorrência de associação entre o padrão de metilação dos genes *WT1* e *RARβ* e a infecção pela bactéria, assim como com as variáveis idade, sexo e tipo histológico, apenas no grupo de metaplasia intestinal (Tabela 13), pois o grupo de câncer gástrico apresentou apenas amostras metiladas. Para o gene *WT1*, o padrão metilado foi observado em 77% dos indivíduos com até 50 anos, 51% deles do sexo feminino, 80% com metaplasia intestinal completa e 31% das amostras com infecção pela *H. pylori* (Hp+). Enquanto para o gene *RARβ*, o padrão de metilação ocorreu em 57% dos indivíduos com até 50 anos, 43% deles do sexo feminino, 57% com metaplasia intestinal completa e 26% das amostras metiladas apresentavam infecção pela *H. pylori* (Hp+). Contudo, em nenhuma das comparações realizadas foi observada diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 13. Frequências do padrão de metilação dos genes *WT1* e *RARβ* conforme as variáveis idade, sexo, tipo histológico e infecção pela *H. pylori* no grupo de metaplasia intestinal (MI).

Variáveis	<i>WT1</i>		<i>RARβ</i>	
	Não metilado	Metilado	Não metilado	Metilado
Idade (anos)				
≤ 50	1 (3%)	27 (77%)	8 (23%)	20 (57%)
≥ 50	0	7 (20%)	1 (3%)	6 (17%)
	p=1,000		p=0,6478	
Sexo				
feminino	1 (3%)	18 (51%)	4 (11%)	15 (43%)
masculino	0	16 (46%)	5 (14%)	11 (31%)
	p=1,000		p= 0,7003	
Tipo histológico				
MI completa	1 (3%)	28 (80%)	9 (26%)	20 (57%)
MI incompleta	0	6 (17%)	0	6 (17%)
	p=1,000		p=0,3037	
<i>H. pylori</i>				
Hp+	0	11 (31%)	2 (6%)	9 (26%)
Hp-	1 (3%)	23 (66%)	7 (20%)	17 (49%)
	p=1,000		p=0,6855	

Hp - = ausência da bactéria; Hp+ = presença da bactéria (diagnóstico molecular).

IV. Discussão

O câncer gástrico é a segunda causa de morte por câncer no mundo e o quinto tipo com maior prevalência no Brasil (INCA 2008). Essa neoplasia apresenta grande complexidade e diferentes fatores etiológicos envolvidos, sendo eles genéticos ou ambientais, tais como os associados à dieta alimentar, através da ingestão de alimentos ricos em sal, alimentos enlatados e defumados (STRUMYLAITE et al., 2006; ROCCO; NARDONE, 2007) e ao estilo de vida, como o tabagismo e o alcoolismo (KELLEY; DUGGAN, 2003), além da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*.

Uma das lesões pré-cancerosas de maior destaque no desenvolvimento da carcinogênese gástrica é a metaplasia intestinal geralmente associada à infecção pela *H. pylori* (CORREA, 2004), podendo aumentar o risco para esta neoplasia em até 10 vezes (FILIPE et al., 1994).

Na carcinogênese gástrica, como em outras neoplasias, além de vários tipos de alterações genéticas, o envolvimento de alterações epigenéticas também tem se destacado (ESTELLER, 2007). Dessa forma, a análise do padrão de metilação em genes relacionados à diferenciação, crescimento, ciclo celular e apoptose podem contribuir para a identificação de marcadores moleculares em lesões gástricas com potencial pré-canceroso, como a metaplasia intestinal, auxiliando no diagnóstico precoce e conseqüentemente em maior sucesso na prevenção do adenocarcinoma gástrico.

Para a análise de metilação do presente trabalho foi utilizada a técnica de MS-PCR (Methylation Specific PCR), a qual permitiu a avaliação do padrão de metilação da região promotora dos genes *WT1* e *RARβ*, em metaplasia intestinal em comparação com o adenocarcinoma gástrico e possível associação entre o perfil de metilação desses genes com a infecção pela *H. pylori*. De modo geral, se observou para ambos os genes, que tanto no grupo de metaplasia intestinal como de câncer gástrico as amostras apresentavam-se freqüentemente metiladas, assim como nas mucosas normais.

A técnica de MS-PCR, descrita por Herman et al. (1996), utiliza inicialmente um tratamento com bissulfito de sódio para diferenciar as citosinas metiladas das não metiladas no genoma, esse processo é realizado, pois as citosinas não metiladas são convertidas em timinas após a replicação do DNA. Com isso, dois tipos de *primers* específicos reconhecem e anelam-se ao DNA, um par de *primers* se anelando ao DNA metilado e o outro ao DNA não metilado, podendo produzir assim dois produtos específicos. Desta forma, após a PCR e eletroforese é possível classificar as amostras como metiladas ou não metiladas devido à presença dessas bandas específicas. As principais vantagens da técnica incluem a especificidade promovida pelos *primers* e alta sensibilidade, possibilitando a detecção de metilação mesmo quando apenas 0,1% dos alelos são metilados; o tempo para a obtenção e análise dos resultados e a utilização de pequenas quantidades de DNA (aproximadamente 5µg). Porém apresenta algumas desvantagens devida a possibilidade de contaminação, como em todas as técnicas envolvendo PCR e obtenção de resultados falso-positivos (HERMAN et al. 1996; SULEWSKA et al. 2007).

Para o gene *WT1*, 97% das amostras do grupo de metaplasia intestinal e 100% de suas respectivas mucosas normais apresentaram o padrão metilado. De forma semelhante, no grupo de câncer gástrico se observou 100% das amostras com padrão metilado e 88% das amostras de mucosa normal correspondentes. Todas as amostras consideradas metiladas apresentaram os dois produtos de interesse, ou seja, as bandas U/M, não sendo encontrada nenhuma amostra apenas com a banda M.

O gene *WT1* foi descrito inicialmente como supressor tumoral (CALL et al., 1990), associado a anomalias do trato urogenital, retardo mental e predisposição ao tumor de Wilms. Ele está envolvido na regulação de diversos genes com atuação como fatores de crescimento; receptores de insulina e vitamina D; fatores de transcrição; adesão celular; apoptose e ciclo celular (ARIYARATANA; LOEB, 2007). Atualmente sua função é controversa, pois evidências apontam-no como possível oncogene em carcinoma de pulmão (OJI et al. 2002), câncer de cólon (KOESTERS et al. 2004), leucemia (ARIYARATANA; LOEB, 2007), carcinoma renal e tumores cerebrais (HOHENSTEIN; HASTIE 2006; YANG et al. 2007). Porém, em câncer e lesões gástricas essa investigação é bastante escassa.

Laux et al. (1999) analisaram o padrão de metilação de algumas linhagens celulares de câncer de mama humano (MCF-7, MDA-MB-231, ZR-75-1 e Hs578t), além de amostras tumorais de mama e suas mucosas não neoplásicas adjacentes através de *Southern* e *Northern hybridization* e RT-PCR. As linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 apresentaram-se metiladas e tiveram suas expressões restauradas parcialmente depois de tratadas com o agente demetilante DeoxyC, enquanto nas amostras tumorais observaram metilação em 25% dos casos. Apesar da frequência de metilação ser bem menor que a observada no trabalho ora realizado, deve-se destacar os tipos diferentes de tecidos analisados, considerando que a expressão do gene *WT1* é tecido-específica, onde em adultos, é encontrada no sistema urogenital, no sistema nervoso central e em tecidos envolvidos na hematopoiese (YANG et al. 2007). Ainda em câncer de mama, Loeb et al. (2001) também analisaram vários tipos de linhagens celulares através de MS-PCR, RT-PCR e *Northern blotting* tendo como resultado a não expressão do *WT1* em tecido mamário normal e sua super-expressão em tecido tumoral, concluindo que a hipermetilação poderia não estar tão intimamente relacionada à expressão do gene.

Estudos em tumores de Wilms também apresentam alguns resultados divergentes. Por exemplo, Mares et al. (2001) analisaram 31 pacientes com tumor de Wilms por PCR e digestão com *HpaII* e pela técnica MS-PCR, sendo que nenhuma das amostras de tumor, de tecido normal e de sangue dos pacientes foi considerada metilada para a região investigada. Satoh et al. (2003) analisaram 22 amostras também de tumores de Wilms através de Real-Time RT-PCR, MS-PCR e ensaio de gene repórter e sugeriram que a expressão diminuída apresentada nas amostras avaliadas eram decorrentes da metilação da região investigada. Nesse último trabalho, foi utilizada como ferramenta para maior sensibilidade da técnica a Hemi-Nested PCR, em que consistiu na utilização de um par de *primer* inicial para a primeira PCR, e na segunda foi utilizado apenas mais um *primer* formando par com um dos *primers* já utilizado na primeira PCR. Esses dois trabalhos investigaram regiões distintas do gene *WT1*, portanto, possíveis divergências nos resultados seriam compreensivas. Em nosso estudo também se utilizou ferramenta semelhante a Hemi-Nested PCR, com algumas modificações, mas foram utilizados outros pares de *primers*, localizados próximo à região denominada *TSS* (aproximadamente 600 pb antes do início da transcrição), sendo essa a região mais relacionada com a regulação gênica.

Em outros tipos de tumores, Kaneuchi et al. (2005) analisaram 42 amostras de adenocarcinoma de ovário e evidenciaram metilação em 88% das amostras de adenocarcinoma de células claras, considerando o gene *WT1* como possível supressor tumoral, contudo não foram analisadas amostras de tecidos normais para que pudessem inferir sobre o padrão de metilação nesse tipo de tecido. Porém os autores observaram uma correlação significativa entre o padrão de metilação e expressão do mRNA. Em outro estudo realizado em câncer de ovário, Yamamoto et al. (2007) investigaram 119 amostras através de imuno-histoquímica e RT-PCR. Os resultados obtidos indicaram níveis elevados de *WT1*, tanto do mRNA como da proteína propriamente dita, sendo significativamente associados à expressão de Ki-67 e Bcl-2, inibindo desta forma a apoptose. Com isso, o *WT1* poderia estar relacionado à aceleração da progressão tumoral.

Em câncer de próstata Devilard et al. (2006) analisaram 85 pacientes submetidos à ressecção da próstata, quanto à expressão do *WT1* através de imuno-histoquímica, RT-PCR e microarrays. O nível de expressão do gene foi maior em lesões malignas do que nas benignas, sugerindo assim um possível papel oncogênico neste tipo de tumor. Coosemans et al. (2007) também sugeriram possível papel oncogênico ao *WT1* após análise de sarcomas uterinos utilizando as técnicas de imuno-histoquímica, RT-PCR e *Western Blotting*. Os resultados apontaram uma super-expressão do gene nas amostras analisadas, indicando também uma função oncogênica na biologia tumoral de sarcomas uterinos.

Da mesma forma, recentemente Wagner et al. (2008) pela análise de 10 amostras de melanomas malignos, 27 de lesões benignas e cinco amostras normais, em que também foi investigada a proliferação celular e apoptose observaram que *WT1* é expresso em melanoma maligno em 80% das células tumorais, mas não em pele normal ou nevo melanocítico benigno. Assim sugerindo a participação do gene *WT1* no processo oncogênico do melanoma devido sua ação no controle da proliferação celular, pois os autores verificaram redução da proliferação de células do melanoma quando esse gene era silenciado.

Como pode ser observado o gene *WT1* apresenta ainda uma função muito discutível no processo carcinogênico. Porém devem ser considerados alguns aspectos importantes que podem estar envolvidos nestes estudos divergentes, como o tecido alvo de investigação,

uma vez que a expressão do *WT1* é tecido específica; a região do gene investigada; a análise conjunta de tecido tumoral e normal e a realização de microdissecção.

No estudo ora realizado, tanto no tecido tumoral, como na lesão pré-cancerosa e no tecido normal foi observado o mesmo padrão elevado de metilação. Considerando-se que cerca de 80-100% das amostras de mucosa normal apresentaram-se metiladas, sugerindo que o gene *WT1* não é expresso ou tem baixa expressão neste tecido, não é possível afirmar que neste tipo de câncer a ocorrência de metilação esteja associada com o processo carcinogênico em consequência da inativação do gene, com perda de sua função de supressão tumoral. Portanto, mesmo que o gene *WT1* tenha envolvimento com diferenciação, ciclo celular e apoptose, talvez não possua associação com a carcinogênese gástrica. Também deve ser considerado que não foi realizada a microdissecção das amostras, provavelmente com a presença de células normais nas biópsias do tumor e metaplasia, assim também podendo justificar a ocorrência sempre das bandas metiladas e não metiladas nas amostras avaliadas. Atualmente, em nosso laboratório está sendo investigada a expressão do mRNA de *WT1* pela técnica de PCR em tempo real nessas mesmas amostras, o que poderá auxiliar no esclarecimento dessa questão.

Para o gene *RAR β* , 74% das amostras do grupo de metaplasia intestinal e 83% de suas respectivas mucosas normais apresentaram o padrão metilado. No grupo de câncer gástrico se observou 100% das amostras com padrão metilado e 88% das amostras de mucosa normal correspondentes a esse grupo.

O gene *RAR β* , provável supressor tumoral tem participação na regulação da sinalização celular durante o desenvolvimento embrionário, crescimento celular, diferenciação, sobrevivência e morte celular (SOPRANO et al., 2004). Este gene é o único dos três receptores de ácido retinóico que é freqüentemente deletado ou silenciado epigeneticamente em estágios precoces da progressão tumoral (ALVAREZ et al., 2007). Sua possível relação com a atividade antitumoral seria através da ativação da proteína AP-1, proteína com atividade apoptótica e de fosforilação das quinases. Estudos avaliando o padrão de metilação do gene *RAR β* têm sido realizados em diversos tipos de neoplasias como pulmão (VIRMANI et al., 2000), estômago (HAYASHI et al., 2001), mama (JERONIMO et al., 2003), esôfago (LIU et al. 2004), ovário (MAKARLA et al., 2005) dentre outros.

Em câncer de esôfago Liu et al. (2004) analisaram seis tipos de linhagens celulares por RT-PCR e MS-PCR, obtendo como resultado uma frequência elevada de metilação do gene, acarretando baixa expressão do mesmo e associação com a carcinogênese do esôfago. Outro estudo semelhante foi desenvolvido posteriormente (Liu et al., 2005) com 12 linhagens celulares e 51 amostras tumorais de esôfago e suas respectivas mucosas normais, as quais foram analisadas por RT-PCR, MS-PCR e *Western Blotting*. Nesse trabalho foi utilizado Nested PCR como ferramenta para aumentar a sensibilidade da técnica. Os resultados novamente indicaram que a metilação estava associada à diminuição de expressão gênica e ao processo tumoral, suportada ainda pela restauração da expressão após tratamento com o agente demetilante (5-Aza-2'-deoxycytidine).

Em câncer ovariano, Markala et al. (2005) investigaram a ocorrência de metilação do gene *RARβ* em 69 amostras pela técnica MS-PCR e observaram frequente metilação nesse tipo de câncer em estágios precoces. Estudos sobre a metilação desse gene também foram realizados em leucemia linfóide aguda (ALL), em que Yang et al. (2006) analisaram 10 amostras de indivíduos portadores e 10 indivíduos saudáveis. Dentre os 14 genes analisados por MS-PCR, a metilação do gene *RARβ* foi sugerida como contribuinte para as etapas precoces da transformação maligna. Enquanto em câncer de pulmão, Hsu et al. (2007) avaliaram amostras de plasma, tecido tumoral e tecido normal de 63 indivíduos utilizando também a Nested-PCR e observaram a ocorrência de metilação em 54% das amostras tumorais e 37% no plasma. Outros estudos têm investigado apenas a expressão da proteína *RARβ*, como o trabalho desenvolvido por Ralhan et al. (2006), que analisaram 244 amostras orais cancerosas e pré-cancerosas por imuno-histoquímica e *Western Blotting* verificando a diminuição da expressão nos diferentes estágios de desenvolvimento e progressão do câncer oral.

Em câncer gástrico especificamente há poucos estudos que avaliaram a ocorrência de metilação do gene *RARβ*, e a maioria deles apresenta apenas o padrão de metilação relacionado ao tecido tumoral, porém é escassa a comparação do mesmo com o padrão apresentado em tecidos normais. Por exemplo, Hayashi et al. (2001) estudaram oito linhagens celulares de câncer gástrico humano (MKN-1, MKN-7, MKN-28, MKN-45, MKN-74, TMK-1, HCS-39 e KATO-III) e 20 amostras de câncer gástrico. Apenas as linhagens MKN-28, MKN-45, MKN-74 foram consideradas metiladas para o gene *RARβ*,

pois apresentou tanto o produto não-metilado (U) como o produto metilado (M). Enquanto 45% (9/20) das amostras de câncer gástrico apresentaram hipermetilação desse gene, indicando que a inativação transcricional do gene *RAR β* em consequência de hipermetilação da região promotora está frequentemente associada com a carcinogênese gástrica.

Semelhante ao nosso estudo, Shutoh et al. (2005) analisaram 42 amostras de carcinoma gástrico, 30 amostras de mucosa gástrica não neoplásica correspondentes, das quais 22 com metaplasia intestinal e 10 amostras de mucosa gástrica normal de indivíduos saudáveis, além da análise de linhagens celulares de câncer gástrico, pela técnica MS-PCR (mas utilizaram outros pares de *primers* abrangendo regiões diferentes do nosso estudo) e expressão do mRNA por RT-PCR. A metilação de *RAR β* foi detectada em 36% das amostras de câncer gástrico e em 20% das 30 amostras de mucosa normal não neoplásica, porém essas diferenças não foram estatisticamente significantes. Contudo nas mucosas gástricas normais não foi observada hipermetilação desse gene. Os autores também observaram uma associação entre metilação do DNA e baixo nível de expressão gênica, contudo não observaram correlação entre o padrão de metilação do gene *RAR β* e a presença de metaplasia intestinal.

Os estudos que investigam o padrão de metilação não estão restritos apenas a linhagens celulares ou tecido tumoral, mas também é possível a investigação no plasma dos indivíduos afetados, consistindo, portanto em uma técnica não invasiva para o diagnóstico precoce e prognóstico dos pacientes. Em câncer gástrico, Koike et al. (2004) investigaram o padrão de metilação do gene *RAR β* no soro de 41 pacientes submetidos à gastrectomia e 10 voluntários saudáveis. Não foi verificada a presença de metilação aberrante nas amostras dos indivíduos saudáveis, contudo 15% das amostras dos pacientes com câncer gástrico apresentaram metilação do gene *RAR β* . De forma semelhante, Ikoma et al. (2006) analisaram 97 amostras de plasma de pacientes com câncer gástrico pela técnica MS-PCR e verificaram que 25% apresentaram metilação do gene *RAR β* , assim indicando esse tipo de investigação para o diagnóstico e prognóstico dessa neoplasia.

Os resultados apresentados no presente estudo também evidenciaram a ocorrência de metilação para o gene *RAR β* nos grupos de câncer gástrico, metaplasia intestinal e mucosa normal, da mesma forma como foi observado para o gene *WT1*, em que as

amostras de mucosas normais também apresentaram frequência elevada de metilação. Assim, não se pode associar este padrão de metilação do gene *RARβ* com efeito direto na carcinogênese do estômago.

A investigação molecular para a presença de *H. pylori*, um dos principais fatores etiológicos no desenvolvimento da neoplasia gástrica, para avaliar a ocorrência de associação com o padrão de metilação dos genes estudados evidenciou o DNA da *H. pylori* em 32% (11/35) dos casos de metaplasia intestinal e 63% (5/8) dos casos de câncer gástrico. Comparando-se o resultado molecular com o obtido nos prontuários médicos dos pacientes pode-se confirmar uma maior eficiência do teste molecular e discordância entre ambos, tanto na forma de falso-positivo como falso-negativo. Deve ser ressaltado que o estudo molecular da *H. pylori* foi realizado a partir das biópsias correspondentes a área de mucosa macroscopicamente normal adjacente a cada uma das lesões. Este critério foi adotado pela experiência de nosso grupo de pesquisa em estudo anterior (CESAR et al. 2005). Pois lesões na mucosa gástrica levam a uma disseminação na secreção do muco gástrico, assim dificultando a sobrevivência da bactéria que migra para outro sítio do estômago. No entanto, naqueles casos com diagnóstico histológico positivo da *H. pylori* que apresentaram o teste molecular negativo, também foram avaliadas as biópsias correspondentes a cada uma das lesões, permanecendo o resultado inicialmente obtido.

Segundo CESAR et al. (2005) a presença de falso-positivo pode ser devido à baixa densidade da bactéria na biópsia coletada, a contaminação do aparelho endoscópico, a presença de outros microorganismos que não a *H. pylori*, ou até mesmo a presença da bactéria numa forma específica que não apresenta a atividade da urease. Por outro lado a presença de outros microorganismos com atividade de urease, como, por exemplo, as *Pseudomonas* podem ser responsáveis por falso-positivo no teste de urease, enquanto outras bactérias Gram-negativas, como a *Campylobacter jejuni*, pode gerar falso-positivo histologicamente. Contudo a técnica de PCR para o diagnóstico da *H. pylori*, apesar de não ser amplamente usada no diagnóstico clínico, tem-se mostrado eficiente e sensível para a detecção de DNA dessa bactéria em biópsias gástricas (FABRE et al., 1994), suco gástrico (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2001) e até em fezes (ARGYROS et al., 2000).

Quanto à ocorrência de associação entre a infecção pela *H. pylori* e padrões de metilação dos genes *WT1* e *RARβ* no grupo de metaplasia intestinal do presente estudo, não

foi observada qualquer associação entre esses fatores, como também com outras variáveis como idade, sexo e tipo histológico da metaplasia.

Dentre os fatores que merecem destaque no processo carcinogênico é a idade e conseqüentemente o envelhecimento (MATHERS, 2006). Este fator também está relacionado com o padrão de metilação do DNA, pois tanto a hipometilação global como a hipermetilação local aumentam durante o envelhecimento (HERCEG, 2007). A diminuição progressiva da metilação global do DNA foi observada em animais com idade mais avançada (WILSON et al. 1987) e em culturas de fibroblastos (RICHARDSON, 2003). Durante o envelhecimento a 5-metilcitosina, contida nas células, diminui com o aumento da idade tanto *in vitro* como *in vivo* (MAYS-HOOPES, 1989; FUKU et al. 2004). De modo contrário, alguns trabalhos observaram que a hipermetilação da região promotora de genes específicos aumenta com a idade, em uma variedade de tecidos como o epitélio colorretal (ISSA et al. 1994), células do sistema imune (ISSA, 2003) e mucosa gástrica (KANG et al. 2003), porém a causa e o mecanismo envolvido nesse processo ainda não está bem esclarecido. Uma possível explicação seria a atividade elevada da DNMT3b, enzima responsável pela metilação *de novo* (CASILLAS et al. 2003). Contudo a maioria das amostras de metaplasia intestinal consideradas como metiladas para os genes *WT1* e *RARβ*, no presente trabalho, pertenciam ao grupo de indivíduos até 50 anos, não sendo observada associação entre esses fatores. De modo contrário, Fujiwara et al. (2005) em avaliação do padrão de metilação dos genes *MGMT*, *p16*, *RASSF1A*, *DAPK* e *RARβ* em câncer de pulmão verificaram uma associação significativa entre o padrão de metilação com a idade no grupo controle, mas não encontraram qualquer associação entre sexo e histologia do tumor.

O estilo de vida, principalmente no que diz respeito à dieta, o tabagismo e o etilismo também possuem relação direta com o desenvolvimento da neoplasia gástrica e alguns estudos têm apontado esses fatores como interferentes no processo de metilação do DNA. O acetaldeído, primeiro metabólito altamente tóxico, mutagênico e carcinogênico, interfere em muitos sítios de síntese e reparo do DNA e pode conseqüentemente resultar no desenvolvimento tumoral (POSCHL; SEITZ, 2004). Deficiências de nutrientes e vitaminas em alcoólicos crônicos contribuem para a associação entre álcool e carcinogênese, mesmo porque essa associação apresenta interação com outros fatores como o tabagismo, a dieta e

suscetibilidade genética. Garro et al. (1991) e Choi et al. (1999) verificaram modificações no grau de metilação do DNA de células hepáticas em modelos experimentais de alcoolismo crônico. Possíveis mecanismos pelo qual o etanol pode interagir com o metabolismo de carboidratos e a metilação do DNA seria devido à redução da atividade da metionina sintetase, a qual promove a remetilação a homocisteína em metionina ou talvez pela inibição da atividade da DNA metilase, a qual transfere os grupos metil ao DNA (POSCHL; SEITZ, 2004).

Quanto ao tabagismo, dentre os 4800 componentes do tabaco, 69 são considerados carcinogênicos. O benzo(a)pireno diol epoxido (BPDE), um dos carcinógenos da fumaça do tabaco, exibe preferência por sítios metilados, resultando na formação de aductos e substituição de G→T no DNA, freqüentemente encontrados em cânceres do trato aerodigestivo em tabagistas (HERCEG, 2007). A nicotina, outro componente do tabaco, aumenta a proliferação celular, angiogênese e inibição seletiva do gene *COX-2* induzindo crescimento tumoral e nova vascularização pela redução da expressão do *COX-2* e fosforilação de ERK em tecidos gástricos (SHIN; CHO, 2005).

Em conclusão, no presente estudo foi verificada frequência elevada de metilação dos genes *WT1* e *RARβ* em metaplasia intestinal e câncer gástrico, assim como nas respectivas amostras de mucosas normais. Desta forma, não há indicação de que a ocorrência de metilação da região promotora desses genes esteja diretamente relacionada com a carcinogênese gástrica. Também não há evidências de associação entre o padrão de metilação dos genes *WT1* e *RARβ* e a infecção pela bactéria *H. pylori* em metaplasia intestinal, portanto sendo necessários estudos mais abrangentes que possam auxiliar no esclarecimento dessas questões.

V. Referências bibliográficas

- Alvarez, S. et al. Structure, function and modulation of retinoic acid receptor beta, a tumor suppressor. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39(7-8), p. 1406-15, 2007.
- Argyros, F.C. et al. Evaluation of a PCR primer based on the isocitrate dehydrogenase gene for detection of *Helicobacter pylori* in feces. **Clin Microbiol**, v. 38, p. 3755-3758, 2000.
- Ariyaratana, S.; Loeb, D.M. The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis. **Expert Rev Mol Med.**, v. 9(14), p. 1-17. 2007.
- Baylin, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2 Suppl 1: p. 4-11, 2005.
- Baylin, S.; Ohm, J.E. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction. **Nat Rev Genet**, v. 6(2), p. 107-16, 2006.
- Blasco, M. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. **Nat Rev Genet**, v. (4), p. 299-309, 2007.
- Call, K.M. et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. **Cell**, v.60, p.509-20, 1990.
- Casillas, M.A. et al. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. **Mol Cell Biochem.**, v. 252(1-2), p. 33-43, 2003.
- Ceron, C.R., Santos, J.R., Bicudo, H.E.M.C. the use of gelatin to dry cellophane wound slab ges in an embroidering hoop. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 15, p. 1053-1061, 1992.
- César, A.C.G. et al. Genetics and environmental factors in gastric carcinogenesis. **Arq. Gastroenterol.**, v.39(4), p. 253-9, 2002.
- César, A.C.G. et al. Aneuploidies, deletion, and overexpression of TP53 gene in intestinal metaplasia of patients without gastric cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.153, p.127-32, 2004.
- César, A.C.G. et al. Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in begin lesions and gastric adenocarcinoma. **Brazilian J. Microbiol.**, v.36, p. 12-16, 2005.
- Choi, S.W. et al. Chronic alcohol consumption induces genomic but not p53-specific DNA hypomethylation in rat colon. **J Nutr.**, v. 129(11), p. 1945-50, 1999.

- Choi, S.W. et al. AKAP12/Gravin is inactivated by epigenetic mechanism in human gastric carcinoma and shows growth suppressor activity. **Oncogene**, v. 23(42), p. 7095-103, 2004.
- Coosemans, A. et al. Upregulation of Wilms' tumour gene 1 (WT1) in uterine sarcomas. **Eur J Cancer**, v. 43(10), p. 1630-7, 2007.
- Correa, P. The biological model of gastric carcinogenesis. In: Buffer, P., Rice, J., Bird, M., Boffetta, P. eds. **Mechanisms of carcinogenesis: Contribution of molecular epidemiology**. Lyon: IARC Scientific Publications, n°157, 2004.
- Crew, K. D.; Neugut, A. L. Epidemiology of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v. 12(3), p. 354-62, 2006.
- Devilard, D. et al. FGFR1 and WT1 are markers of human prostate cancer progression. **BMC Cancer**, v. 6, p. 272, 2006.
- Dixon, M. F. et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. **Am J Surg Pathol.**, v. 20(10), p. 1161-81, 1996.
- Dixon, M.F. Prospects for intervention in gastric carcinogenesis: reversibility of gastric atrophy and intestinal metaplasia. **Gut**, v.49, p.2-4, 2001.
- Dominguez-Bello, M. G. et al. PCR detection of *Helicobacter pylori* in string-absorbed gastric juice. **FEMS Microbiol Lett**, v. 198, p. 15-16, 2001.
- Ducasse, M.; Brown, M. Epigenetic aberrations and cancer. **Mol Cancer**, v.5, p. 60-70, 2006.
- Esteller, M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. **Eur. J. Cancer**, v.36, p. 2294-300, 2000.
- Esteller, M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. **Br J Cancer**, v. 94, p. 179-83, 2006.
- Fabre, R. et al. Polymerase chain reaction assay for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. **Gut**, v. 35, p. 905-908, 1994.
- Fang, J.Y. Studies on the hypomethylation of c-myc, c-Ha-ras oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 11(11), p. 1079-82, 1996.
- Fang, J.Y. Expression of Dnmt1, demethylase, MeCP2 and methylation of tumor-related genes in human gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, v. 10(23), p. 3394-98, 2004.
- Feinberg, A.P. et al. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. **Semin. Cancer Biol.**, v.15(5), p.389-98, 2002.

Filipe, M.I. et al. Intestinal metaplasia types and risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. **Int J Cancer**, v.57, p.324-9, 1994.

Forman, D., Burley, B.E. Cardiovascular disease: optimal approaches to risk factor modification of diet and lifestyle. **Curr Treat Options Cardiovasc Med.**, v. 8(1), p. 47-57, 2006.

Fuke, C. et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. **Ann Hum Genet.**, p. 68(Pt 3), p. 196-204, 2004. Erratum in: **Ann Hum Genet.** 69(Pt 1):134, 2005.

Garro, A.J. et al. Ethanol consumption inhibits fetal DNA methylation in mice: implications for the fetal alcohol syndrome. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 15(3), p. 395-8, 1991.

Hayashi, K. Et al. Inactivation of retinoic acid receptor β by promoter CpG hypermethylation in gastric cancer. **Different**, v. 21, p.13-21, 2001.

Herceg, Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. **Mutagenesis**, v. 22(2), p. 91-103, 2007.

Herman, J.G. et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 9821-26, 1996.

Hohenstein, P.; Hastie, N. D. The many facets of Wilm's tumor gene, *WT1*. **Human Mol Genet**, v. 15(2), p. 196-201, 2006.

Holliday, R. DNA methylation and epigenetics defects. **Mutat Res**, v. 181(2), p. 215-7, 1987.

IARC (1994) **IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Vol. 61, Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*, Lyon, IARC Press..

Ikoma, H. et al. Correlation between serum DNA methylation and prognosis in gastric cancer patients. **Anticancer Res.**, v. 26(3B), p. 2313-6, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER-INCA, 2008. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acesso em 03 de fevereiro de 2008.

Issa, J.P. et al. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. **Nat Genet.**, v. 7(4), p. 536-40, 1994.

Issa, J.P. Age-related epigenetic changes and the immune system. **Clin Immunol.**, v. 109(1), p. 103-8, 2003.

- Jeronimo, C. et al. Detection of gene promoter hypermethylation in fine needle washings from breast lesions. **Clin Cancer Res.**, v. 9(9), p. 3413-7, 2003.
- Jiang, Y.H.; Bressler, J.; Beaudet, A.L. Epigenetics and human disease. **Annu Rev Genomics Hum Genet.**, v. 5, p. 479-510, 2004
- Jones, P. L. et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histones deacetylase to repress transcription. **Nat Genet.**, v. 19(2), p. 187-91, 1998.
- Jones, P.A. Epigenetics in Carcinogenesis and Cancer prevention. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 983, p. 213-219, 2003.
- Jones, P.A.; Baylin, S. B. The genomics of cancer. **Cell**, v. 128, p. 683-692, 2007.
- Kaneuchi, M. et al. WT1 and WT1-AS genes are inactivated by promoter methylation in ovarian clear cell adenocarcinoma. **Cancer**, v. 104(9), p. 1924-30, 2005.
- Kang, G.H. et al. CpG island methylation in premalignant states of gastric carcinoma. **Cancer Research**, v. 61, p. 2847-51, 2001.
- Kang, G.H. et al. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. **American J. Pathology**, v. 163(4), p. 1551-56, 2003.
- Kelley, J.R.; Duggan, J.M. Gastric cancer epidemiology and risk factors. **J Clin. Epidemiol.**, v.56(1), p. 1-9, 2003.
- Kim, T.Y. et al. DNA hypermethylation in gastric cancer. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, Suppl. 1, p. 131-42, 2004.
- Knudson, A.G. Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.68(4), p 820-3, 1971.
- Koesters, R. et al. WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells. **Int J Cancer**. v. 109(3), p. 385-92, 2004.
- Koike, H. et al. Comparison of methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) with reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in peripheral blood of gastric cancer patients. **J Surg Oncol**, v. 87, p. 182-186, 2004.
- Koike, H. et al. Comparison of serum aberrant methylation and conventional tumor markers in gastric cancer patients. **Hepathogastroenterol.**, v. 52(64), p. 1293-6, 2005.
- Kusters, J.C.; Van-Vliet, A.H.; Kuispers, E.J. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. **Clin Microbiol Rev.** v.19(3), p. 449-90, 2006.

Laird, P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature Rev.**, v.3, p. 253-66, 2003.

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.

Laux, D. E. Hypermethylation of the Wilm's tumor suppressor gene CpG island in human breast carcinoma. **Breast Cancer Res Treat**, v.56, p. 35-45, 1999.

Lee, J.H. et al. Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas. **Oncogene**, v. 23(26), p. 4646-54, 2004.

Leung, W.K. et al. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. **Cancer**, v. 91(12), p. 2294-301, 2001.

Leung, W.K.; SUNG, J.J.Y. Review article: intestinal metaplasia and gastric carcinogenesis. **Aliment Pharmacol Ther**, v.16, p.1209-16, 2002.

Liu, Z.M. et al. Downregulation of retinoic acid receptor-beta(2) expression is linked to aberrant methylation in esophageal squamous cell carcinoma cell lines. **World J Gastroenterol.**, v. 10(6), p. 771-5, 2004.

Liu, Z. et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces retinoic acid receptor-beta(2) demethylation and growth inhibition in esophageal squamous carcinoma cells. **Cancer Lett.**, v. 230(2), p. 271-83, 2005.

Lochhead, P.; El-Omar, E. M. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 21(2), p. 281-97, 2007.

Loeb, D.M. et al. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. **Cancer Res.**, v. 61(3), p. 921-5, 2001.

Luczak, M.W.; Jagodzinski, P.P. The role of DNA methylation in cancer development. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 44(3), p. 143-154, 2006.

Makarla, P.B. et al. Promoter hypermethylation profile of ovarian epithelial neoplasms. **Clin Cancer Res.**, v. 11(15), p. 5365-9, 2005.

Mares, J. Methylation changes in promoter and enhancer regions of the WT1 gene in Wilms' tumours. **Cancer Lett.**, v. 166(2), p. 165-71, 2001.

Mathers, J.C. Nutritional modulation of ageing: genomic and epigenetic approaches. **Mech Ageing Dev.**, v. 127(6), p. 584-9, 2006.

Mays-Hoopes, L.L. DNA methylation in aging and cancer. **J Gerontol.**, v. 44(6), p.35-6, 1989.

- Mihara, M. et al. Methylation of multiple genes in gastric glands with intestinal metaplasia: A disorder with polyclonal origins. **Am J Pathol.** v. 169(5), p. 1643-51, 2006.
- Minucci, S.; Pelicci, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6(1), p. 38-51, 2006.
- Moss, T. J.; Wallrath, L. L. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. **Mutat Res**, v. 618, p. 163-174, 2007.
- Nan, X. et al. Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. **Novartis Found Symp**, v. 214, p. 6-16, 1998.
- Nardone, G.; Morgner, A. Helicobacter pylori and gastric malignancies. **Helicobacter**, Suppl 1, p.44-52, 2003.
- Oji, Y. et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. **Int J Cancer**, v. 100(3), p. 297-303, 2002.
- Oji, Y. et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary astrocytic tumors. **Cancer Sci.**, v.95, p.822-7, 2004.
- Oue, N. et al. Distinct promoter hypermethylation of p16^{INKa}, CDH1, and RAR-beta in intestinal, diffuse-adherent, and diffuse-scattered type gastric carcinomas. **J Pathol**, v. 198, p. 55-59, 2002.
- Paluszczak, J.; Baer-Dubowska, W. Epigenetic diagnostics of cancer – the application of DNA methylation markers. **J Appl Genet**, v. 47(4), p. 365-375, 2006.
- Peedicayil, J. Epigenetic therapy – a new development in pharmacology. **Indian J Med Res**, v. 123, p. 17-24, 2006.
- Poschl, G., Seitz, H.K. Alcohol and cancer. **Alcohol Alcohol.**, v. 39(3), p. 155-65, 2004.
- Ralhan, R. et al. Clinical significance of altered expression of retinoid receptors in oral precancerous and cancerous lesions: relationship with cell cycle regulators. **Int J Cancer.**, v. 118(5), p. 1077-89, 2006.
- Richardson, B. Impact of aging on DNA methylation. **Ageing Res Rev.**, v. 2(3), p. 245-61, 2003.
- Roberti, A. et al. Multiple genetic and epigenetic interacting mechanisms contribute to clonally selection of drug-resistant tumors: current views and new therapeutic prospective. **J Cell Physiol**, v.207, p. 571-581, 2006.
- Rocco, A.; Nardone, G. Diet, *H. pylori* infection and gastric cancer: Evidence and controversies. **World J Gastroenterol**, v. 13(21), p. 2901-2912, 2007.

- Rodenhiser, D.; Mann, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ**, v. 174(3), p. 341-8, 2006.
- Santos, K.F. et al. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, p. 1531-1541, 2005.
- Satoh, Y. et al. Significant reduction of WT1 gene expression, possibly due to epigenetic alteration in Wilms' tumor. **J Biochem.**, v.133(3), p. 303-8, 2003.
- Shin, V.Y., Cho, C.H. Nicotine and gastric cancer. **Alcohol**, v. 35(3), p.259-64, 2005.
- Shutoh, M. et al. DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in gastric carcinoma, **Cancer**, v. 104(8), p. 1609-19, 2005.
- Soprano, D. R. et al. Retinoic acid receptors and cancer. *Annu Rev Nutr*, v. 24, p. 201-21. 2004.
- Strumylaite, L. et al. Salt-preserved foods and risk of gastric cancer. **Medicina (Kaunas)**, v.42(2), p. 164-70, 2006.
- Sulewska, A. et al. Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. **Folia Histochem Cytobiol.**, v. 45(4), p. 315-24, 2007.
- Suzuki, H. et al. Inactivation of *14-3-3* sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. **Cancer Res**, v. 60(16), p. 4353-7, 2000.
- Tahara, E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. In: Buffer, P., Rice, J., Bird, M., Boffetta, P. eds. **Mechanisms of carcinogenesis: Contribution of molecular epidemiology**. Lyon: IARC Scientific Publications, n°157, 2004.
- Tamura, G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, v. 12(2), p. 192-198, 2004.
- Terry, M.B. et al. The epidemiology of gastric cancer. **Semin Radiat Oncol**, v. 12(2), p. 111-27, 2002.
- Tomasi, T. B. Epigenetic regulation of immune escape genes in cancer. **Cancer Immunol Immunother**, v. 55, p. 1159-1184, 2006.
- Ushijima, T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. **Nat Rev Cancer**, v. 5(3), p. 223-31, 2005.
- Ushijima, T. Epigenetic field for cancerization. **J Biochem Mol Biol**, v. 40(2), p. 142-50. 2007.
- Venter, J.C. et al. The sequence of the human genome. **Science**, v.291(5507), p. 1304-51, 2001.

- Virmani, A. K. et al. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, p. 1303-1307, 2000.
- Yamamoto, S. et al. Clinicopathological significance of WT1 expression in ovarian cancer: a possible accelerator of tumor progression in serous adenocarcinoma. **Virchows Arch.**, v. 451(1), p. 27-35, 2007.
- Yang, Y. et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res.**, v. 30(1), p. 98-102, 2006.
- Yang, L. et al. A tumor suppressor and oncogene: the *WT* story. **Leukemia**, v. 21, p. 868-76, 2007.
- Yoo, C. B.; Jones, P.A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5(1), p. 37-50, 2006. Erratum in: **Nat Rev Drug Discov**, v. 5(2), p.121, 2006
- Wang, L.H. et al. Increased expression of sonic hedgehog and altered methylation of its promoter region in gastric cancer and its related lesions. **Mod. Pathol.**, v. 19(5), p. 675-83, 2006.
- Wagner, M. et al. The Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with melanoma proliferation. **Pflugers Arch.**, v. 455(5), p. 839-47, 2008.
- Wilson, V.L. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. **J Biol Chem.**, v. 262, p. 9948-9951, 1987.
- Wilson, A. S. et al. DNA hypomethylation and human diseases. **Biochim Biophys Acta**, v.1775, p. 138-162, 2007.

QUESTIONÁRIO

Questionário do projeto: Expressão transcricional e protéica de genes relacionados à atividade da telomerase e ciclo celular em metaplasia intestinal e úlcera gástrica, e associação com *Helicobacter pylori*.

Responsáveis: Doutoranda Márcia Cristina Duarte e Profa. Dra. Ana Elizabete Silva (Departamento de Biologia IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto-SP), Dr. Kenji Miyazaki e Dr. Aldenis Albanese Borim (Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP).

I. IDENTIFICAÇÃO

Nome:.....Prontuário:.....

Data de nascimento:...../...../..... Sexo: () F () M

Grupo étnico: () caucasóide () negróide () asiático

Endereço:.....Fone:.....

Cidade:.....Estado:.....

Profissão atual:.....tempo de atuação:.....

Profissão anterior:.....tempo de atuação:.....

II. DADOS PESSOAIS E FAMILIAIS

- Consumo de bebida alcoólica: () sim () não () ex-etilista

Há quantos anos:.....Tipo de bebida.....dose/dia.....

- Consumo de cigarro: () sim () não () ex-fumante

Há quanto anos:.....Quantidade (un/dia):.....

- Doenças anteriores:

() úlcera () gastrite () câncer (tipo:.....)

() outras (tipo:.....)

- Tratamentos anteriores: () sim () não

Tipo:.....

- Cirurgias anteriores: () sim () não

Tipo:.....

- Uso de medicamentos: () sim () não

Tipo:.....

História de câncer ou outras doenças na família (grau de parentesco)

() câncer (tipo:.....) () úlcera () gastrite

() outras (tipo:.....)

III- DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO

() Metaplasia intestinal: () completa () incompleta

() úlcera gástrica

() câncer gástrico: () intestinal () difuso

() *Helicobacter pylori*: () positivo () negativo

Data:...../...../..... Responsável pelo procedimento:.....

ANEXO 2. Distribuição do padrão de metilação dos genes *WT1* e *RARβ* e diagnóstico molecular da *H. pylori* nas amostras de metaplasia intestinal (MI) e respectivas mucosas normais (NMI)

Amostras	<i>WT1</i>				<i>RARβ</i>				HP
	MI		NMI		MI		NMI		
	U	M	U	M	U	M	U	M	
01	+	+	+	+	+	+	+	-	-
02	+	+	+	+	+	-	+	-	-
03	+	+	+	+	+	-	+	-	-
04	+	+	+	+	+	-	+	-	-
05	+	+	+	+	+	-	+	+	-
06	+	+	+	+	+	+	+	+	-
07	+	+	+	+	+	-	+	+	-
08	+	+	+	+	+	-	+	+	-
09	+	+	+	+	+	-	-	+	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	-
11	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12	+	+	+	+	+	+	+	+	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15	+	+	+	+	+	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	-	+	+	+	+	+	+	-
18	+	+	+	+	+	+	+	+	-
19	+	+	+	+	+	+	+	+	-
20	+	+	+	+	+	+	+	+	-
21	+	+	+	+	+	+	+	-	+
22	+	+	+	+	+	+	+	-	-
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+	-
25	+	+	+	+	+	+	+	+	-
26	+	+	+	+	+	-	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+	-
28	+	+	+	+	+	+	+	+	-
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	+	+	-
34	+	+	+	+	+	-	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ANEXO 3. Distribuição do padrão de metilação dos genes *WT1* e *RARβ* e diagnóstico molecular da *H. pylori* em câncer gástrico (CG) e respectivas mucosas normais (NCG)

Amostras	<i>WT1</i>				<i>RARβ</i>				HP
	MI		NMI		MI		NMI		
	U	M	U	M	U	M	U	M	
01	+	+	+	+	+	+	+	+	+
02	+	+	+	+	+	+	+	+	-
03	-	+	+	+	+	+	+	+	-
04	+	+	+	-	+	+	+	+	-
05	+	+	+	+	+	+	+	-	+
06	+	+	+	+	+	+	+	+	+
07	+	+	+	+	+	+	+	+	+
08	+	+	+	+	+	+	+	+	+