

CAROLINA DE OLIVEIRA GIGEK

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA NO ENVELHECIMENTO E
NO CÂNCER GÁSTRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marília de Arruda
Cardoso Smith

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth Suchi
Chen

São Paulo

2011

Gigek, Carolina de Oliveira

Regulação epigenética no envelhecimento e no câncer gástrico / Carolina de Oliveira
Gigek.-- São Paulo, 2011.

xvii, 152 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.
Programa de Pós-Graduação em Morfologia.

Título em Inglês: Epigenetic regulation in aging and gastric cancer.

1. Envelhecimento. 2. Neoplasias gástricas. 3. Metilação de DNA. 4. Epigênese genética.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Morfologia e Genética

Chefe do Departamento de Morfologia e Genética: Prof.^a Dra. Sima Katz

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação: Prof.^a Dra. Janete Maria Cerutti

Chefe da Disciplina de Genética: Prof.^a Dra. Marília de Arruda Cardoso Smith

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

Reitor: Prof. Dr. Walter Manna Albertoni

Vice Reitor: Prof. Dr. Ricardo Luiz Smith

Chefe de Gabinete: Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão

Este trabalho foi desenvolvido na seguinte instituição:

Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina
(UNIFESP/EPM)

Departamento de Morfologia e Genética - Disciplina de Genética

Apoio Financeiro

FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa de São Paulo):

- Bolsa de Doutorado Direto: Processo 2009/50435-8
- Auxílio a Pesquisa - Temático: Processo 2009/07145-9

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico):

- Edital Universal Processo 473780/2009-7

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior):

- Auxílio e Pós-Doc SUS 23038.051640-2009-01

CAROLINA DE OLIVEIRA GIGEK

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DO ENVELHECIMENTO E DO CÂNCER
GÁSTRICO**

Presidente da banca: Prof.^a Dr^a Marília de Arruda Cardoso Smith

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr^a Miriam Galvonas Jasiulionis

Prof.^a Dr^a Silvia Regina Caminada De Toledo

Prof. Dr Rommel Rodrigues Burbano

Prof. Dr Spencer Luiz Marques Payão

Aprovada em: 23/03/2011

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Shirlei e Osvaldo,
às minhas irmãs, Patrícia e Isabella,
ao meu namorado e melhor amigo Marco.

Agradecimentos

À Prof.^a Dra. Marília de Arruda Cardoso Smith, por todo o apoio, carinho, confiança e amizade, por me ensinar a verdadeira dedicação e amor à pesquisa e por todos os ensinamentos durante todo o período de iniciação científica à conclusão dessa tese.

À Prof.^a Dra. Elizabeth Chen, minha mãezinha científica Betty, por sempre responder prontamente a todas minhas dúvidas, pelos ensinamentos, apoio, e todo auxílio recebido, além da grande amizade e companheirismo.

Aos Prof. Dr. Spencer Payão, Prof. Dr. Rommel Rodriguez Burbano, Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima, pelas colaborações, dedicação e toda atenção (e amostras) fornecidas.

Às queridas companheiras de epigenética: as precursoras Mari e Pat, a minha filhinha por um ano Luara e a nova geração Fewis, Thaís e Dani por todos os ensinamentos, apoio e amizade.

A todas (os) (ex e atuais) “genéticas e genéticos”: Ana Rosa, Bia, Belisa, Denise, Diego, FeBellucco, Ias, Leo, Leslie, Márcio, Mari 2, Marquinhos, Núbia, Renata, Roberta, Stella, Sylvinha, Tatinha, Tuty, Van.

Aos professores da Disciplina de Genética, Décio Brunoni, Dértia Freire-Maia, Gianna Carvalheira, Janete Cerutti, Maria Isabel Melaragno, Silvia Toledo, Sintia Iole Nogueira Belangero, por todo apoio, ensinamentos e amizade.

Às queridas Cleidoca, Mara e Regina por me aguentarem sempre.

A todos da minha querida turma Bio37, especial a LL-37, Fêfa e Gabis, que não me deixaram desistir nunca.

Aos meus avós *in memoriam*, à vó Irene, tios e tias, primos e primas e a todos meus amigos que sempre me apoiaram, incentivaram e torceram por mim.

Às minhas sogras (!) maravilhosas vó Dica, Tita e Fafi por todo carinho e torcida.

Ao Marco, meu namorado incrível, por toda amizade e amor, apoio e compreensão.

Às minhas queridas irmãzinhas Patty e Isa, pelo amor, amizade, momentos de risadas, companheirismo e ensinamentos de vida.

Aos meus queridos pais, meus amores incondicionais, pelo exemplo de vida, de dedicação à família e ao trabalho, por sempre darem o melhor de si por mim, além de todo incentivo (e “paitrocínio”) durante minha formação.

Muito obrigada a todos, de coração.

Sumário

Apoio Financeiro	iv
Agradecimentos	vii
Sumário	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Quadros	xiii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xiv
RESUMO	xvi
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivos	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Envelhecimento	5
2.2 Câncer Gástrico	8
2.2.1 Classificações	10
2.2.2 Aspectos básicos do câncer gástrico	17
2.3 Epigenética	19
2.3.1 Metilação do DNA	23
2.3.2 Metilação do DNA no Envelhecimento	25
2.3.3 Metilação do DNA no Câncer Gástrico	26
2.4 Genes selecionados para o presente estudo	29
2.4.1 Sirtuínas	29
2.4.2 <i>SMARCA5 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5)</i>	36
2.4.3 <i>hTERT</i>	37
2.4.4 <i>CAV1</i>	41
2.4.5 <i>IGFBP-3</i>	43
2.4.6 <i>CDH1</i>	46
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
4. ARTIGOS	70
4.1 Artigos publicados.....	70
4.1.1 <i>hTERT</i> methylation and expression in gastric cancer	70
4.1.2 <i>Insulin-like growth factor binding protein-3</i> gene methylation and protein expression in gastric adenocarcinoma	78
4.1.3 <i>SMARCA5</i> methylation and expression in gastric cancer	84
4.2 Artigos submetidos	90
4.2.1 Epigenetic pattern, mRNA and protein expression of E-cadherin and Caveolin-1 in gastric adenocarcinoma	90
4.2.2 Protein expression and promoter DNA methylation of <i>SIRT1</i> and 3 in gastric cancer.....	113
4.2.3 <i>SIRT1</i> , <i>IGFBP-3</i> and <i>CAV1</i> promoter DNA methylation in aging process ..	131
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	141
6. ANEXOS	144
6.1 Termos de Consentimento Livre e Esclarecido	144

6.2	Aprovação do Comitê de Ética	147
7.	APÊNDICE	152

Lista de Figuras

- Figura 1: Esquema ilustrando as subdivisões anatômicas do estômago e em maior aumento, as camadas histológicas (adaptado de: <http://www.daviddarling.info>). 11
- Figura 2: Aspecto microscópico dos tipos histológicos de Laurén (HE). (a) O adenocarcinoma tipo intestinal é caracterizado pela formação glandular ou estruturas tubulares. Coloração van Gieson, 400x. (b) O tipo difuso apresenta uma massa de células mucocelular (células em anel de sinete) que cresce na mucosa e na parede gástrica com pouca ou nenhuma diferenciação glandular. Coloração ácido periódico-Schiff, 400x (adaptado de Vauhkonen et al, 2006). 13
- Figura 3: Esquema retirado de (Vauhkonen et al, 2006) que relaciona os tipos de classificação da Organização Mundial da Saúde e a de Laurén..... 14
- Figura 4: Extensão do tumor gástrico. T1 quando o tumor está restrito a mucosa gástrica e submucosa, denominado precoce; T2 quando o tumor atinge a muscular própria ou subserosa; T3 quando o tumor atinge a subserosa; T4 quando o tumor invade a serosa e/ou estruturas adjacentes. 15
- Figura 5: Sequências e eventos moleculares propostos na patogênese do cancer gástrico subtipo difuso e intestinal (adaptado de Vauhkonen et al, 2006) 18
- Figura 6: Esquema da estrutura de um nucleossomo. A: As caudas das histonas projetadas do centro do nucleossomo são representadas com variados tipos de modificações pos-traducionais. Metilação do DNA e ligação de RNAs não codificantes também estão ilustradas. B: Esquema ilustrando as diferenças entre eucromatina e heterocromatina. Eucromatina é caracterizada por hiperacetilação de histonas e hipometilação de histonas de DNA. Em contraste, a heterocromatina apresenta hipoacetilação de histonas e hipermetilação de histonas e DNA. C: As quatro caudas de histonas são ilustradas com as modificações pos-traducionais em resíduos específicos correspondentes (modificado de Gonzalo 2010). 22
- Figura 7: Metilação da citosina. A DNA metiltransferase catalisa a transferência do grupo metil proveniente de uma S-adenosilmetionina para a citosina, produzindo 5-metilcitosina e S-adenosilhomocisteína (adaptado de Richardson, 2003) 23
- Figura 8: Modelo clonal genético do câncer. A visão clássica do câncer originado a partir de uma série de mutações, incluindo a ativação dominante de oncogenes (ONC) e recessiva de genes supressores tumorais (TSG). Cada mutação leva supercrescimento seletivo de uma população monoclonal de células tumorais, e cada propriedade tumoral, como invasividade, metástase e resistência à droga, é adquirida por uma mutação (adaptado de Feinberg et al, 2006). 27

Figura 9: Modelo progenitor epigenético do câncer. De acordo com este modelo, o câncer acontece após três etapas. Primeiro ocorre uma alteração epigenética em uma célula progenitora de um tecido específico, evento mediado por regulação errônea de genes progenitores tumoral (TPG). Essa alteração pode ser decorrente de um evento da própria célula tronco, da influência do estroma, ou dano ambiental. Em seguida, há uma mutação em genes de manutenção (GKM). O terceiro passo consiste na instabilidade genética e epigenética, que leva a uma evolução tumoral aumentada (adaptado de Feinberg et al, 2006). ONG: oncogenes, TSG: genes supressores tumorais..... 28

Figura 10: Metilação do DNA em células normal e tumoral. E=exon. Modificado de Esteller, 2007..... 29

Figura 11: A reação de Sir2. Desacetilação de proteína catalisada por Sir2p na presença de NAD⁺ (adaptado de Sauve et al, 2006). 30

Lista de Quadros

Quadro 1: Definição do TNM patológico para câncer gástrico (Adaptado da Classificação TNM - (UICC, 2009).	16
Quadro 2: Agrupamento por estadiamento para câncer gástrico (UICC, 2009).	17

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ADP	Adenosina difosfato
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
G	Guanina
H2A	Histona 2A
H2B	Histona 2B
H3	Histona 3
H4	Histona 4
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
K	Lisina
kDa	Kilodalton
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida adenina
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido
NoRC	Complexo remodelador nucleolar
pb	Pares de base
RNA	Ácido ribonucleico
μL	Microlitro

RESUMO

Objetivos: O processo de envelhecimento e a maioria das neoplasias podem ser regulados por alterações epigenéticas, dentre elas a metilação do DNA. Este estudo tem como objetivos: a) analisar a frequência de metilação dos promotores dos genes *SIRT1*; *SIRT3*, *hTERT*, *SMARCA5*, *CDH1*, *IGFBP3*, *CAV-1* no envelhecimento e no adenocarcinoma gástrico; b) avaliar a expressão das proteínas codificadas desses genes em tecidos gástricos tumoral e normal; c) associar resultados com dados clinicopatológicos da amostra. **Métodos:** A frequência de metilação desses genes foi analisada por PCR metilação-específica (MS-PCR) em amostras de linfócitos de jovens e idosos, bem como em adenocarcinoma gástrico e margens normais. A análise da expressão protéica foi realizada por imunistoquímica. **Resultados:** Os promotores dos genes *SIRT1* e *IGFBP-3* apresentaram maior metilação em idosos, quando comparado ao grupo jovem. Além disso, dentre os sete genes estudados, cerca de 85% dos idosos apresentaram quatro ou mais desses genes hipermetilados, enquanto que entre jovens mais de 50% apresentou até três genes metilados ($p=0,001$). A proteína *SIRT1* apresentou uma expressão seis vezes maior em tumores do que em tecido não neoplásico ($p=0,0003$), já *SIRT3* apresentou maior expressão em tecido não neoplásico do que em tumoral ($OR=0,313$; $p=0,005$). *SIRT3* encontrou-se mais frequentemente hipermetilado quando não havia expressão de sua proteína ($p=0,0019$). O gene *hTERT* apresentou-se mais frequentemente hipermetilado em amostras tumorais ($p=0,0002$) e sua expressão protéica foi observada somente em tumores ($p<0,0001$). *SMARCA5* apresentou maior expressão no tecido neoplásico quando comparado com a margem do tecido gástrico ($p<0,001$) e a expressão de sua proteína estava associada à ausência de metilação do promotor gênico ($p=0,0104$). Caveolina-1 também foi mais

frequentemente observada em tumores quando comparada ao não neoplásico ($p < 0,0001$), principalmente no tipo intestinal ($P = 0,0008$). A metilação do promotor do gene *CAV1* foi associada à ausência de expressão em amostras tumorais ($p = 0,0001$). Para IGFBP-3, foi observado ainda maior expressão em tumores do que em tecido não neoplásico ($p < 0,0001$). *CDH1* estava presente em 100% das amostras de tecido não neoplásico, diferindo do tumoral ($p < 0,0001$). **Conclusões:** No processo do envelhecimento natural, ocorre um aumento da metilação em promotores de genes específicos com a idade, que pode influenciar a expressão gênica. Além disso, no câncer gástrico, as proteínas SIRT1, hTERT, SMARCA5, *CDH1*, IGFBP-3 e *CAV1* apresentaram uma maior expressão, podendo configurar bons biomarcadores e possíveis alvos terapêuticos. SIRT3 foi a única proteína com função protetora contra esse tipo tumoral. A regulação epigenética pela metilação do DNA parece ocorrer em tecido gástrico somente para os genes *SIRT3*, *SMARCA5* e *CAV1*, porém a análise da metilação dos genes *hTERT* e *CDH1* também pode servir como marcador para a neoplasia estudada.

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento pode ser definido como um declínio funcional e progressivo, decorrente do aumento da vulnerabilidade do organismo com o passar do tempo. Sabe-se que o aumento da expectativa de vida nas últimas décadas tem elevado significativamente o número de idosos, e com isso o aumento de doenças relacionadas a este processo. Portanto, o envelhecimento biológico parece se originar de alterações que se iniciam ao nível molecular e depois se transmitem à célula e ao organismo (Hayflick, 1976).

O câncer, uma das principais doenças relacionadas ao envelhecimento, ainda não possui causa bem definida. O aumento progressivo da incidência de tumores malignos em função da idade já é bem documentado (Anisimov, 2009). Como a maioria dos tumores sólidos, o câncer gástrico é considerado uma doença do envelhecimento, atingindo o auge de incidência na sétima década de vida (Saif et al, 2010). Além disso, sabe-se que a incidência do câncer gástrico é influenciada por fatores geográficos, étnicos e culturais (Crew e Neugut, 2006). Aproximadamente dois terços dos casos dessa neoplasia ocorrem em países em desenvolvimento, sendo que, na população brasileira, a ocorrência desses tumores aparece em terceiro lugar entre homens e em quinto nas mulheres (INCA, 2010).

A compreensão de fatores associados a processos multifatoriais, como o envelhecimento e a carcinogênese gástrica, pode ajudar no direcionamento de diagnósticos, prognósticos e/ou tratamentos.

A epigenética é o estudo das alterações herdadas mitoticamente na expressão gênica, que ocorrem independente de mudanças na sequência de DNA, ou seja, de forma não-Mendeliana. A maioria dessas alterações é estabelecida durante a diferenciação celular e mantida através dos múltiplos ciclos de divisão das células, permitindo que estas tenham identidades distintas enquanto carregam a mesma informação gênica (Sharma et al, 2010).

As modificações epigenéticas incluem metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas, dentre outras. A metilação do DNA é a

modificação epigenética mais estudada atualmente e possui um papel essencial no desenvolvimento normal, mantendo o silenciamento da transcrição em regiões não expressas ou não codificantes do genoma (McCabe et al, 2009).

O silenciamento epigenético por hipermetilação ocorre tão frequentemente quanto mutações e deleções e, isso pode ocasionar silenciamento de genes supressores tumoral em câncer. Além disso, tem sido observado um aumento da metilação em promotores de genes específicos durante os processos de envelhecimento e da carcinogênese (Gonzalo, 2010).

Sob esse aspecto, foram selecionados para este estudo sete genes relacionados a importantes vias celulares, sendo estes: *SIRT1*; *SIRT3*, *SMARCA5*, *hTERT*, *CAV1*, *IGFBP-3* e *CDH1*. O estudo das diferenças do padrão de metilação pode ser usado como um biomarcador molecular e ainda pode propiciar uma melhor compreensão dos mecanismos etio e fisiopatológicos da carcinogênese gástrica.

A identificação de um mapa preciso de marcas epigenéticas, como a hipermetilação de genes, é importante para o desenvolvimento de agentes terapêuticos que modifiquem o estado epigenético alterado da célula doente, permitindo o desenvolvimento da medicina personalizada.

1.1 Objetivos

1. Avaliar o padrão de metilação de ilhas CpG da região promotora dos genes *SIRT1*; *SIRT3*, *SMARCA5*, *hTERT*, *CAV1*, *IGFBP-3* e *CDH1*;
2. Associar o padrão de metilação desses genes ao envelhecimento;
3. Avaliar a presença das proteínas codificadas e/ou mRNA dos genes já mencionados em amostras de tecido gástrico não neoplásico e tumoral por imunistoquímica e/ou qRT-PCR;
4. Associar o padrão de metilação e a expressão protéica a sexo, idade, infecção por *Helicobacter pylori*, localização, estágio, características histopatológicas e expressão das proteínas nas amostras de adenocarcinomas gástricos e de tecido gástrico normal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Envelhecimento

O envelhecimento pode ser definido como um declínio funcional e progressivo, decorrente do aumento da vulnerabilidade do organismo com o passar do tempo. Sabe-se que o aumento da expectativa de vida nas últimas décadas tem elevado significativamente o número de idosos, especialmente em países desenvolvidos. Dados da população brasileira indicam que aproximadamente 19 milhões de pessoas possuem idade de 60 anos ou mais (IBGE, 2010).

Cerca de 300 hipóteses e/ou teorias foram descritas para explicar o fenômeno do envelhecimento. Fundamentalmente, porém, elas podem ser classificadas em duas categorias: a teoria dos eventos programados e a teoria dos eventos casuais ou não programados (Hayflick, 2007). A primeira postula que o processo de envelhecimento é um fenômeno estritamente genético decorrente da ação de determinados genes. A segunda refere-se à ocorrência de danos nas macromoléculas por exposição do organismo ao meio ambiente. Dentre estas teorias, destaca-se a teoria da mutação somática.

A teoria das espécies ativas de oxigênio, desenvolvida por Harman em 1956, propõe que, no processo de envelhecimento, as reações oxidativas podem gerar subprodutos que provocam danos em macromoléculas, como DNA, proteínas e lipídios, direcionando o dano ao envelhecimento (Harman, 1956; Harman, 2006).

Certamente, o processo do envelhecimento deve ser resultante tanto de eventos programados como acúmulo de erros casuais, evidenciando uma regulação complexa e multifatorial deste processo.

Uma hipótese recente postula, ainda, que alterações na homeostase das proteínas acarretam acúmulo de proteínas agregadas ou o dobramento errôneo levando a disfunções celulares que contribuem, parcialmente, para o dano ao tecido e o fenótipo do envelhecimento, como é o caso de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer ou Parkinson (Morimoto e Cuervo, 2009).

Diferentes tipos de danos celulares podem ainda explicar a heterogeneidade das doenças em idosos, formando um modelo multifatorial, e promovendo um maior entendimento das diversas patologias relacionadas à idade (Burtner e Kennedy, 2010). Além disso, mutações em um único gene podem acelerar ou retardar múltiplos efeitos no processo de envelhecimento e podem ser responsáveis pelas síndromes progeróides genéticas (de Magalhaes e Faragher, 2008). O primeiro gene do envelhecimento, o gene da síndrome de Werner (*WRN*), foi descrito por meio de estudo colaborativo internacional, do qual nosso grupo participou (Oshima et al, 1996).

A maioria dos genes de envelhecimento foi identificada a partir de estudos com modelos invertebrados, como *C. elegans*. A procura por mecanismos conservados entre invertebrados e mamíferos levou a descoberta de importantes vias de sinalização, como as da insulina e mTOR, por exemplo, associadas com longevidade (Burtner e Kennedy, 2010).

O envelhecimento em humanos também tem sido estudado no sentido da identificação de polimorfismos associados ao aumento da longevidade, por estudos genômicos em larga escala ou por abordagens direcionadas (Burtner e Kennedy, 2010). Nesse enfoque, nosso grupo já relatou a associação entre diversos polimorfismos de genes do metabolismo lipídico e morbidades relacionadas ao envelhecimento (Gigek et al, 2007; Chen et al, 2009; Araujo et al, 2010; Chen et al, 2010; Chen et al, 2010; Mazzotti et al, 2011)

Outra abordagem para o entendimento da longevidade humana é o estudo da senescência celular *in vitro*. Esse termo foi originalmente empregado na década de 60, por Hayflick e Moorhead, a partir de experimentos com fibroblastos em culturas, em que se observou que o número de divisões celulares *in vitro* é pré-determinado geneticamente (Hayflick e Moorhead, 1961).

Essa observação levou à hipótese de que as células possuem um mecanismo interno capaz de controlar o número de divisões celulares já ocorridas e parar qualquer futura divisão após um número pré-determinado de divisões (limiar de Hayflick). Sabe-se que ocorre uma perda progressiva do comprimento telomérico durante as divisões celulares quando esse o telômero atinge um limiar no qual perde a

capacidade de proteger a porção terminal do cromossomo, resultando em crise, isto é, fusões cromossômicas terminais e morte celular apoptótica. Porém, algumas células podem transpor a crise, e esses clones podem levar a formação tumoral (Stewart e Weinberg, 2006).

Análises das funções de diversos genes associados ao envelhecimento e à longevidade mostraram que esses abrangem um grande espectro de vias bioquímicas como metabolismo energético, sinalização intra e extracelular, manutenção e reparo de processos como estresse oxidativo e vias de sinalização do ciclo celular. Existem ainda as mudanças induzidas por danos na regulação, estrutura e/ou atividade dos produtos gênicos que resultam em alteração da função biológica no envelhecimento (Rattan, 2007).

Em 1976 foi proposto que o envelhecimento biológico deve originar-se de alterações que se iniciam ao nível molecular e depois se transmitem à célula e ao organismo (Hayflick, 1976). Além disso, diversos tipos de danos se acumulam em diferentes taxas nas células e em órgãos de indivíduos de uma população (Burtner e Kennedy, 2010).

O câncer, uma das principais doenças relacionadas ao envelhecimento, ainda não possui causa bem definida. O aumento progressivo da incidência de tumores malignos em função da idade já é bem documentado. Três hipóteses foram propostas para explicar a associação entre esses dois processos: a primeira sugere que esta associação é consequência da duração do processo carcinogênico, isto é, os passos requeridos para a transformação de um tecido normal em tumoral seria prolongado; portanto, o câncer seria mais frequentemente observado em indivíduos idosos por efeitos de exposição mais prolongada a carcinógenos. A segunda hipótese propõe que as mudanças progressivas relacionadas à idade no organismo podem promover um ambiente favorável ao desenvolvimento de neoplasmas e ao crescimento de células malignas latentes pré-existentes. A terceira hipótese então presume que o fenótipo reflete a combinação de efeitos de acúmulo de mutações, aumento de silenciamento epigenético e disfunção telomérica (Anisimov, 2009).

2.2 Câncer Gástrico

Atualmente o câncer constitui um dos principais problemas de saúde pública do mundo, sendo responsável por aproximadamente 12,7 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo em 2008 (Jemal et al, 2011). Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões e cerca de 60% destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento.

O câncer gástrico é uma das neoplasias mais frequentes e é responsável por 10% das mortes por câncer no mundo (738 mil óbitos em 2008). A incidência desse tumor só é menor que a de pulmão, próstata e colorretal em homens; e a de mama, colorretal, útero e pulmão em mulheres. Além disso, o número de indivíduos afetados do sexo masculino é aproximadamente duas vezes maior que em mulheres (Jemal et al, 2011).

Assim como a maioria dos tumores sólidos, o câncer gástrico é considerado uma doença do envelhecimento, com seu auge de incidência ocorrendo na sétima década de vida (Saif et al, 2010) e sendo relativamente raro em homens e mulheres abaixo de 45 anos (Parkin et al, 2002).

A incidência do câncer gástrico é influenciada por fatores geográficos, étnicos e culturais. Japão e Coréia têm as maiores taxas de incidência no mundo. Aproximadamente dois terços dessa neoplasia ocorrem em países em desenvolvimento (Crew e Neugut, 2006). Na população brasileira, a incidência desses tumores aparece em terceiro lugar entre homens e em quinto entre as mulheres. A estimativa para 2010 foi de 21.500 novos casos, sendo 13.820 homens e 7.680 mulheres. Somente no estado do Pará, foram estimados 10,82 novos casos a cada 100 mil homens e 6,15 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2010).

O consumo elevado de alimentos conservados em sal, o baixo uso de refrigeradores e o pequeno consumo de frutas e vegetais frescos podem ser considerados fatores de risco para o câncer gástrico no Pará (Moutinho e Marinho, 1988). Dietas ricas em frutas e vegetais reduzem o risco de desenvolvimento de tumor gástrico, por diversos mecanismos. Uma possibilidade é relacionada aos antioxidantes

presentes nesses alimentos, como beta-caroteno, alfa-tocoferol e vitamina C (Gonzalez e Riboli, 2010).

Além disso, os alimentos preservados no sal e o nitrito encontrado em alimentos conservados são potencialmente carcinogênicos. A ingestão de sal aumenta o risco de infecção por *Helicobacter pylori* e age sinergicamente para promover o desenvolvimento de câncer gástrico. *H. pylori* é uma bacilo gram-negativo que coloniza o estômago. Países com elevadas taxas de câncer gástrico tem alta prevalência de infecção por essa bactéria. Além disso, a prevalência dessa infecção está relacionada a fatores sócio-econômicos, tais como baixa renda, baixo grau de instrução, falta de saneamento básico adequado e superpopulação (Crew e Neugut, 2006).

Cerca de 70 a 80% dos cânceres gástricos são atribuídos à gastrite crônica associada à infecção por *H. pylori*. Existe ainda um aumento do risco em vinte vezes para pacientes com *H. pylori* em desenvolver essa neoplasia (Hamilton e Meltzer, 2006). Em 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou esse microorganismo como carcinógeno grupo 1, isto é, quando o agente ou substância possuem evidências comprovadas para serem consideradas como carcinogênicas (IARC, 1994).

A infecção do epitélio gástrico por *H. pylori* leva à produção de espécies reativas de oxigênio, ao aumento de óxido nítrico sintase, que promove dano ao DNA e carcinogênese. Além disso, *H. pylori* impede o processo de regeneração da mucosa pela inibição do receptor do fator de crescimento epidermal. Por fim, essa bactéria também pode influenciar a progressão da gastrite crônica ao câncer gástrico por estimular proliferação celular e expressão de fatores de crescimento, inibindo apoptose e aumentando a taxa de mutação do tecido gástrico infectado (Hamilton e Meltzer, 2006).

Estudos prospectivos demonstraram uma relação significativa dose-dependente fumo e risco de câncer gástrico, entretanto, há poucas evidências para associação entre ingestão de álcool e câncer gástrico. Outro fator importante para o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico é a obesidade, já que esta promove

refluxo, predispondo ao esôfago de Barrett's, um estado metaplásico precursor do adenocarcinoma de esôfago (Crew e Neugut, 2006).

Dentre outros fatores de risco para o surgimento do câncer gástrico, estão a radiação, anemia perniciosa, tipo sanguíneo A, cirurgia gástrica em condições benignas e o vírus Epstein-Barr. Um histórico familiar positivo também é um fator de risco significativo, principalmente em síndromes genéticas como câncer de cólon sem polipose hereditário, síndrome de Li-Fraumeni, Peutz-Jeghers e polipose adenomatosa familiar (Fuccio et al, 2010) (Crew e Neugut, 2006).

As agressões contínuas à mucosa gástrica, decorrentes dos fatores alimentares poderiam atuar como facilitadores no processo de infecção causada pela bactéria *Helicobacter pylori* e patógenos relacionados (Hirohata e Kono, 1997).

Uma diminuição na incidência de câncer de estômago tem sido observada em diversos países, que pode ser explicado por mudança de hábitos alimentares e uma diminuição da prevalência do possível agente causal, *H. pylori*, por exemplo (INCA, 2010).

Apesar do declínio da incidência dessa neoplasia, o número total de novos casos diagnosticados no mundo está aumentando, principalmente em função do aumento da expectativa de vida, o que demonstra que o impacto das neoplasias gástricas na saúde pública pode aumentar em função do envelhecimento populacional (Yamashita et al, 2002). Estima-se que pelo menos um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderia ser prevenido (INCA, 2010).

Em geral, o câncer de estômago apresenta prognóstico ruim. A taxa mundial de sobrevida média cumulativa após cinco anos do diagnóstico é estimada em aproximadamente 20% em países em desenvolvimento (INCA, 2010). Esse tipo de neoplasia é amplamente resistente a radio/quimioterapia, sendo a cirurgia o principal tratamento curativo (Shi e Zhou, 2010).

2.2.1 Classificações

O tumor gástrico pode atingir diferentes camadas histológicas de tecidos (mucosa, submucosa, muscular, subserosa e serosa). O tipo mais comum de

câncer gástrico, correspondendo aproximadamente 95% dos casos, é o adenocarcinoma, que se origina na mucosa (Smith et al, 2006).

No que se refere à localização anatômica do tumor no estômago, cerca de 50 a 60 % são observados na região pilórica e no antro, 25% na cárdia e os demais no corpo e fundo (Cotran et al, 2000) (Figura 1). Entretanto, a prevalência da localização anatômica do tumor gástrico é distinta em diferentes regiões geográficas (Sugano, 2008).

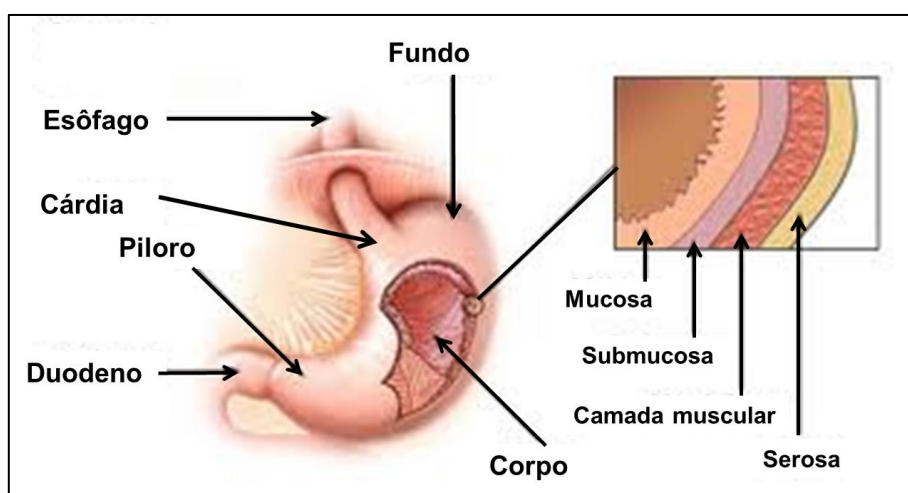


Figura 1: Esquema ilustrando as subdivisões anatômicas do estômago e em maior aumento, as camadas histológicas (adaptado de: <http://www.daviddarling.info>).

O diagnóstico de câncer gástrico requer exame histopatológico ou citológico. Diversos sistemas de classificação foram propostos para descrever o câncer gástrico tanto em características macroscópicas, como é o caso da classificação de Borrmann, ou com base na microscopia, como a de Ming, Carniero e Goseki (Dicken et al, 2005). A classificação mais utilizada do adenocarcinoma gástrico é a de Laurén (1965), que subdivide o tumor em intestinal e difuso. Esse sistema descreve o tumor com base na configuração microscópica e no padrão de crescimento.

Esses dois tipos tumorais diferem em sua histologia, epidemiologia, patogênese, perfil genético e desfecho clínico (Hamilton e Meltzer, 2006). O tipo intestinal é caracterizado pela formação de estruturas glandulares em tumores bem a pouco diferenciados, e cresce se expandindo, pois apresenta coesão celular e células

com núcleos grandes e irregulares, ao invés de apresentar um padrão infiltrativo (figura 2a) (Lauren, 1965; Dicken et al, 2005).

Além disso, o tipo intestinal é mais frequentemente observado em pacientes idosos. O paradigma aceito para patogênese do tipo intestinal é uma progressão de diversos passos da gastrite crônica para atrofia gástrica, para metaplasia intestinal e para displasia (Hamilton e Meltzer, 2006).

O tipo difuso possui células tumorais não coesivas difusamente infiltradas no estroma do estômago e frequentemente com grande infiltração na parede do estômago com pouca ou nenhuma formação glandular (Figura 2b). Esse tipo histológico é encontrado com a mesma frequência pelo mundo e está menos relacionado à influência ambiental. Pacientes com tipo difuso são geralmente jovens e apresentam prognóstico pior do que os de intestinal. A patogênese do câncer gástrico do tipo difuso é pouco compreendida, apesar da infecção por *H. pylori* também ser um fator de risco (Dicken et al, 2005).

O tipo difuso não está associado à metaplasia intestinal e pode se originar de uma mutação em uma única célula, como, por exemplo, de mutações no gene da E-caderina (*CDH1*) que têm sido associadas ao carcinoma gástrico difuso hereditário (Hamilton e Meltzer, 2006). Além disso, esse subtipo tumoral tem alta associação com portadores de anemia perniciosa e pacientes com tipo sanguíneo do grupo A (Khushalani, 2008).

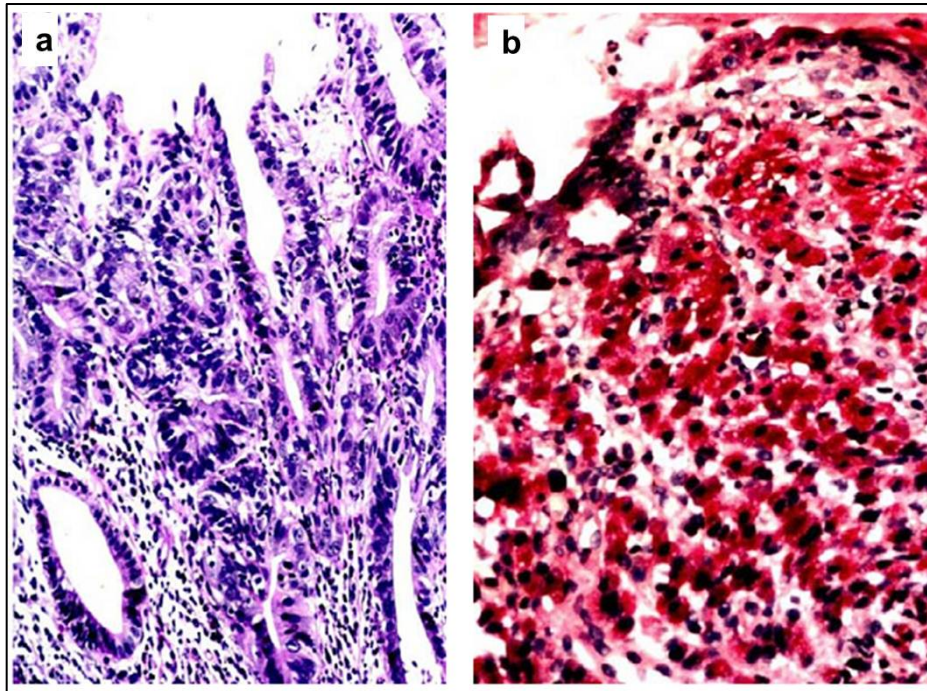


Figura 2: Aspecto microscópico dos tipos histológicos de Laurén (HE). (a) O adenocarcinoma tipo intestinal é caracterizado pela formação glandular ou estruturas tubulares. Coloração van Gieson, 400x. (b) O tipo difuso apresenta uma massa de células mucocelular (células em anel de sinete) que cresce na mucosa e na parede gástrica com pouca ou nenhuma diferenciação glandular. Coloração ácido periódico-Schiff, 400x (adaptado de Vauhkonen et al, 2006).

A OMS nomeia graus de adenocarcinoma baseado no grau de semelhança com o tecido intestinal metaplásico, sendo categorizadas em padrões histológicos de adenocarcinoma como papilar, tubular, mucinoso e anel de sinete e pouco diferenciado (Dicken et al, 2005). Na classificação adotada nos países do Oriente, os tipos intestinal e difuso correspondem ao tipo diferenciado e não diferenciado, respectivamente (Schlemper et al, 2001).

O esquema abaixo representa os subtipos das duas principais classificações, de Lauren e da OMS (Figura 3).

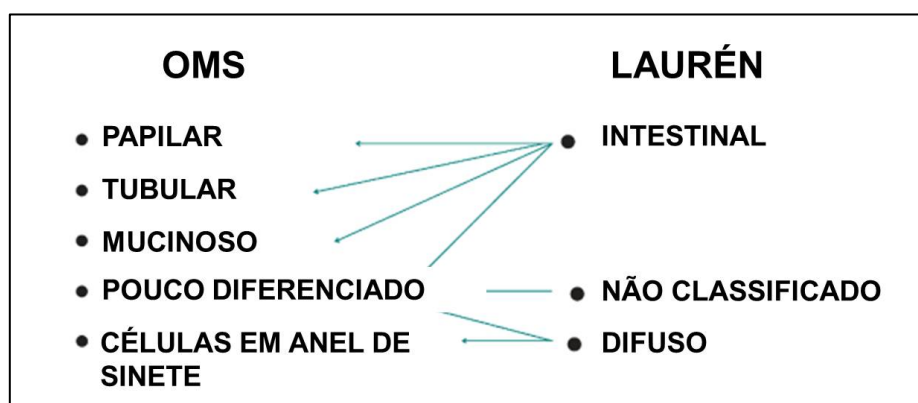


Figura 3: Esquema retirado de (Vauhkonen et al, 2006) que relaciona os tipos de classificação da Organização Mundial da Saúde e a de Laurén.

O estadiamento de tumores é determinado pela classificação TNM estabelecida pela União Internacional Contra o Câncer (UICC, 2009), podendo ser clínico ou patológico. A avaliação clínica é realizada com base na extensão do tumor, por meio de exames físicos auxiliados por exames radiológicos, endoscópicos e histológicos. A endoscopia é o método mais sensível e específico ao qual são submetidos pacientes com suspeita de câncer gástrico. Esse método permite visualização direta da localização tumoral, extensão do envolvimento da mucosa, biópsia (ou exame citológico) para diagnóstico do tecido (Dicken et al, 2005).

A avaliação do estadiamento patológico, definido como pTNM (Quadro 1), é efetuada pela análise macro e microscópica do tumor, visando observar a profundidade da invasão, a presença de linfonodos comprometidos e de metástase à distância. A letra “T” determina a extensão do tumor (Figura 4), “N” determina a ausência ou a presença, bem como a extensão das metástases em linfonodos regionais e “M” estabelece a ausência ou a presença de metástase à distância. Por conseguinte, o resultado do pTNM determina o estágio da doença (Quadro 1), o qual é diretamente relacionado com o prognóstico do paciente (UICC, 2009).

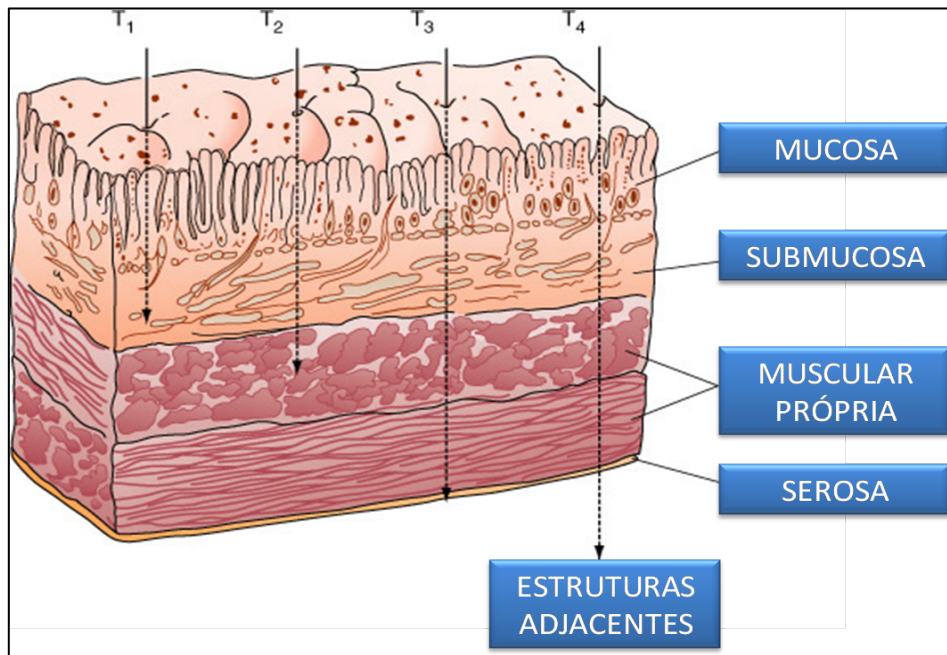


Figura 4: Extensão do tumor gástrico. T1 quando o tumor está restrito a mucosa gástrica e submucosa, denominado precoce; T2 quando o tumor atinge a muscular própria ou subserosa; T3 quando o tumor atinge a subserosa; T4 quando o tumor invade a serosa e/ou estruturas adjacentes.

Quadro 1: Definição do TNM patológico para câncer gástrico (Adaptado da Classificação TNM - (UICC, 2009).

Tumor Primário (pT)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria
T1a	Tumor que invade a lâmina própria
T1b	Tumor que invade a subserosa
T2	Tumor que invade a muscular própria
T3	Tumor que invade a subserosa
T4a	Tumor que penetra a serosa sem invadir as estruturas adjacentes
T4b	Tumor que invade as estruturas adjacentes
Linfonodos Regionais (pN)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 2 linfonodos regionais
N2	Metástase em 3 a 6 linfonodos regionais
N3a	Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais
N3b	Metástase em mais de 16 linfonodos regionais
Metástase à Distância (pM)	
MX	Presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Quadro 2: Agrupamento por estadiamento para câncer gástrico (UICC, 2009).

Estadiamento	Combinações TNM		
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIB	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
IIIA	T3	N2	M0
	T4a	N1	M0
IIIB	T3	N3	M0
	T4b	N0-1	M0
	T4a	N2	M0
	T4a	N3	M0
IIIC	T4b	N2-3	M0
IV	Qualquer	Qualquer	M1

O tumor gástrico geralmente é assintomático quando superficial e potencialmente erradicável por cirurgia. A ausência de sintomas frequentemente atrasa o diagnóstico, sendo que 80 a 90% dos pacientes apresentam câncer gástrico avançado localizado ou tumores metastáticos com baixa taxa de ressecção bem sucedida (Dicken et al, 2005).

2.2.2 Aspectos básicos do câncer gástrico

A existência de lesões precursoras ao câncer gástrico como a gastrite por *H. pylori*, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e neoplasia intramucosa é bem estabelecida. A gastrite atrófica na região do corpo e antro aumenta o risco de câncer de 45-90 vezes quando indivíduos com estômago saudável são comparados com pacientes com gastrite não atrófica. A sequência de passos desde a infecção por *H. pylori* até o câncer gástrico do tipo intestinal é chamada de “sequência Correa” (Correa, 1992). Um esquema de vias hipotéticas na morfogênese do câncer gástrico é apresentado na figura 5.

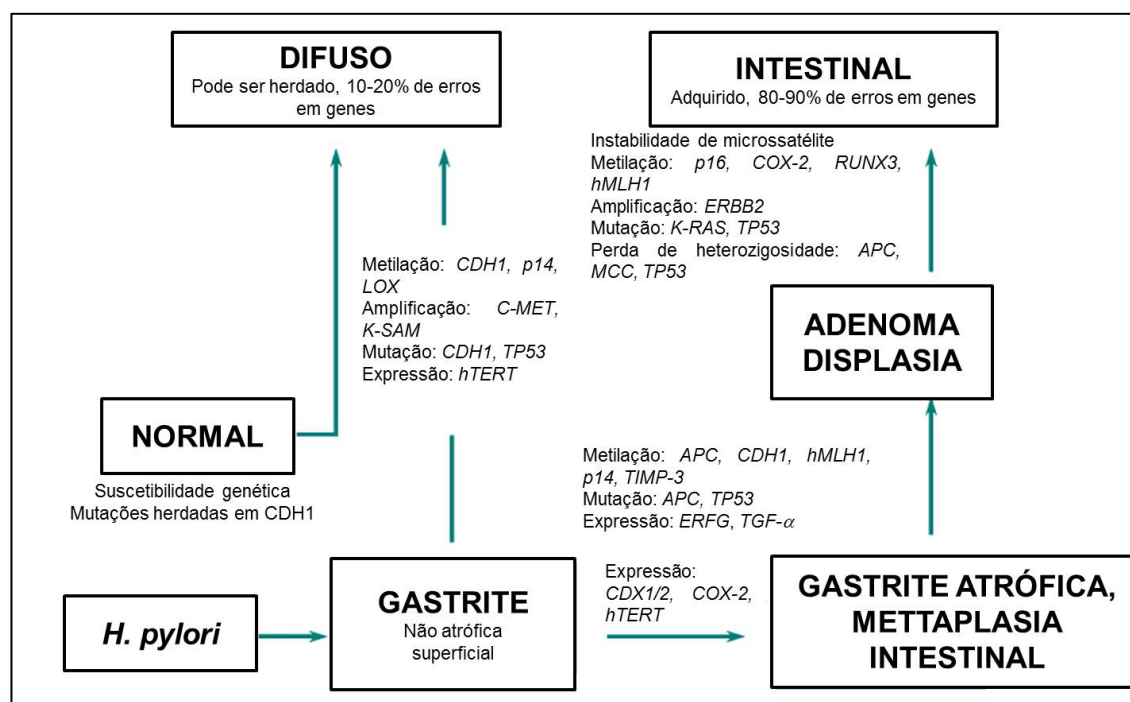


Figura 5: Sequências e eventos moleculares propostos na patogênese do câncer gástrico subtipo difuso e intestinal (adaptado de Vauhkonen et al, 2006)

A patogênese do câncer gástrico representa um exemplo clássico de interações gene-ambiente. Além dos fatores ambientais brevemente descritos anteriormente, fatores genéticos e infecções por bactérias influenciam o desenvolvimento dessa neoplasia (Smith et al, 2006).

O exato mecanismo pelo qual a transformação maligna das células gástrica é pontencializado pela infecção por *H. pylori* ainda não é bem conhecido, porém, a genética do hospedeiro também oferece maior susceptibilidade. Essa bactéria está adaptada para colonizar um ambiente ácido resultando no desenvolvimento da gastrite em quase todos os indivíduos infectados (Fuccio et al, 2010). A enzima urease permite hidrolisar a uréia gástrica em amônia e dióxido de carbono, mantendo o pH constante, o que permite a sua capacidade de colonização (Smith et al, 2006).

Além disso, a inflamação persistente decorrente de sua hospedagem leva a uma instabilidade genômica pela produção de espécies reativas de oxigênio que parecem agir diretamente no núcleo da célula hospedeira e no DNA mitocondrial,

limitando a defesa por diminuir as propriedades antioxidantes da mucosa gástrica (Milne et al, 2009).

A interleucina 1-beta (*IL-1 β*) uma citocina pró-inflamatória que inibe a secreção ácida no estômago e o fator alfa de necrose tumoral (*TNF- α*), que possui um papel central na resposta inflamatória mediando a resposta do hospedeiro à infecção por *H. pylori*. Portanto, mutações nesses genes podem aumentar o risco de câncer gástrico (Correia et al, 2009).

Além disso, genes supressores tumorais, como *TP53*, têm sido descritos em alguns tipos de lesões pré-neoplásicas, como a metaplasia intestinal e lesões displásicas, sugerindo que a inativação desse gene é um evento inicial na carcinogênese gástrica (Correia et al, 2009).

Nesse mesmo contexto, a instabilidade de microssatélites, definida como a presença de erros na replicação de sequências repetitivas de microssatélites devido a defeitos dos genes da via de reparo, também apresenta grande importância no desenvolvimento da neoplasia gástrica (Milne et al, 2009). Foi descrito recentemente que o gene *MLK3*, que codifica uma cinase envolvida na via da MAP cinase, encontra-se frequentemente mutado. Uma mutação sem sentido nesse gene promove potencial para transformação e tumorigênese à célula (Resende et al, 2010).

Além desses fatores, alterações nos níveis de expressão de diversos genes também é um fator determinante na patogênese do câncer gástrico. Assim, aumento da expressão de oncogenes, como *Her-2/neu* e *c-myc*, que possuem papel na indução da proliferação celular (Calcagno et al, 2008; Resende et al, 2010), ou o silenciamento gênico de genes como o *CDH1* por mecanismos epigenéticos (Resende et al, 2010) são mecanismos já descritos nas carcinogênese gástrica, e que, entretanto, necessitam de melhor compreensão.

2.3 Epigenética

Em um organismo multicelular, todas as células possuem carga genética idêntica, proveniente de um mesmo genoma embrionário. As células possuem estruturas e funções distintas devido à expressão diferencial dos genes, fato que permite direcionamento do desenvolvimento celular e tecidual.

O termo epigenética foi concebido por Waddington na década de 40, a partir da fusão das palavras “genética” com “epigênese”, que se refere à teoria de Aristóteles de que o adulto se desenvolve a partir do embrião por meio de passos graduais, em oposição à teoria da época, que postulava que o zigoto já se encontrava pré-formado. Waddington queria criar uma nova disciplina para estudar o controle genético no processo do desenvolvimento, unindo os campos da embriologia e da genética (Waddington, 1942). Entretanto, a definição de epigenética evoluiu e atualmente refere-se a uma ampla variedade de processos biológicos.

A definição atual de epigenética é “o estudo de alterações hereditárias mitoticamente na expressão gênica, que ocorre independente de mudanças na sequência de DNA”. A maioria dessas alterações é estabelecida durante a diferenciação e mantida através dos múltiplos ciclos de divisão celular, permitindo com que as células tenham identidades distintas enquanto carregam a mesma informação gênica (Sharma et al, 2010).

Essa hereditariedade do padrão de expressão gênica é mediada por modificações epigenéticas, que incluem metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas, posicionamento dos nucleossomos ao longo do DNA e participação de microRNAs (miRNA). Esses mecanismos estão associados a processos que afetam estabilidade, dobramento, posicionamento e organização do DNA (DeAngelis et al, 2008). O conjunto dessas informações compreende o epigenoma, que fornece um mecanismo para diversidade celular por regular a informação genética que pode ser acessada por maquinaria celular (Sharma et al, 2010).

As histonas podem sofrer diversos tipos de modificações pós-traducionais, como acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação (Esteller, 2007). Histonas são proteínas que desempenham um papel crítico no acondicionamento do DNA ao formarem o nucleossomos. Cada nucleossomos é formado por octâmero de histonas H2A, H2B, H3 e H4 (Figura 06a). Aproximadamente 140pb de DNA estão associados a cada nucleossomos, formando quase duas voltas ao redor do octâmero de histonas (Nussbaum et al, 2008).

As histonas H3 e H4 possuem cauda N-terminal, que estão positivamente carregadas quando não acetiladas, levando a um estado condensado da configuração da cromatina ao redor da carga negativa do DNA, chamado de heterocromatina, associada a regiões pobres em genes e transcricionalmente inativa (figura 6b). A adição de um grupo acetil neutraliza essa carga no resíduo lisina (K) da histona, abrindo a forte ligação entre DNA e histona, resultando em um estado mais aberto da cromatina, configurando uma acessibilidade para iniciar a transcrição, caracterizando a eucromatina, região rica em genes e domínios transcricionalmente ativos (Figura 6b) (Gonzalo, 2010; Taby e Issa, 2010).

As modificações de histona compreendem reações covalentes que afetam a cauda N-terminal de resíduo de aminoácidos que compõe a cadeia protéica da histona, e isso leva a um código refinado da maneira que o DNA está enrolado no nucleossomos (Taby e Issa, 2010). Sendo assim, o estado de acetilação e a metilação de histonas específicas (figura 06c) têm papel importante na regulação da cromatina e expressão gênica (Esteller, 2007).

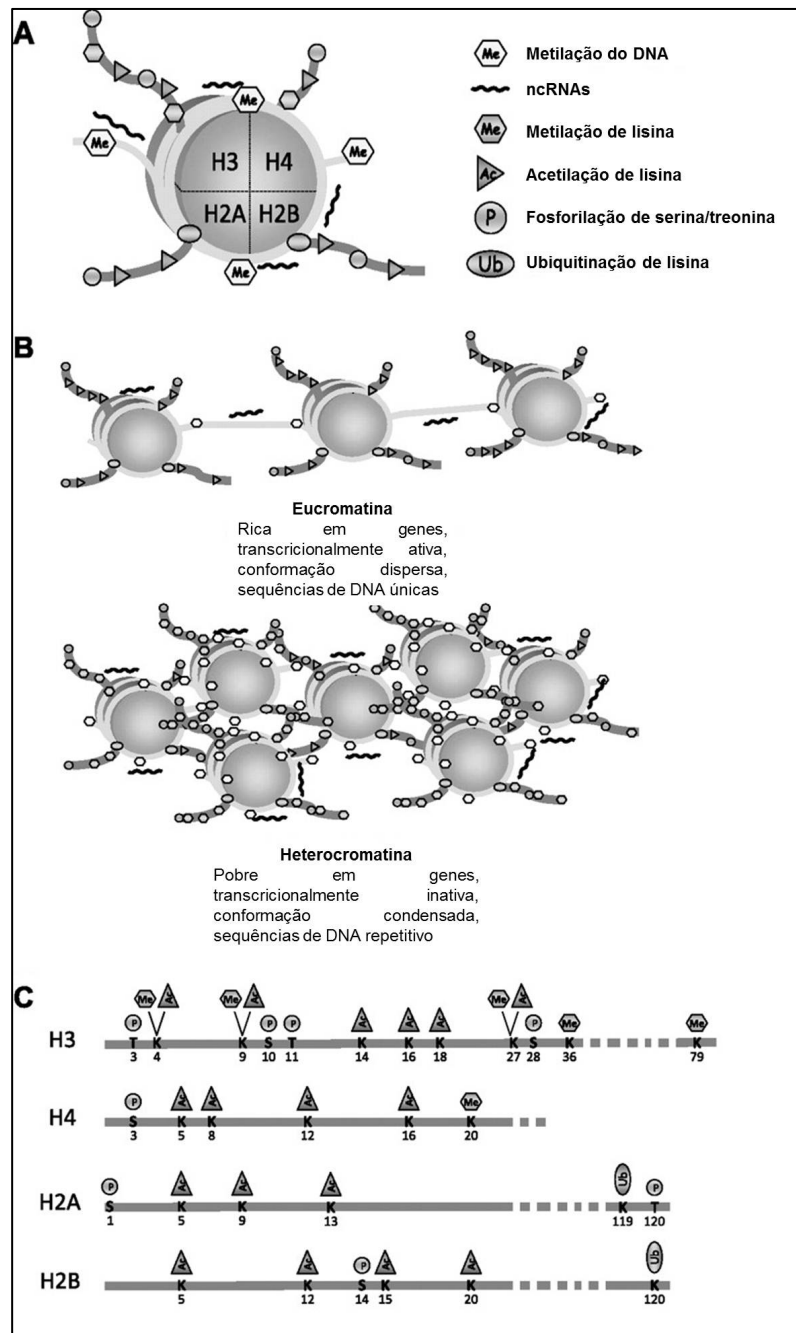


Figura 6: Esquema da estrutura de um nucleossomo. **A:** As caudas das histonas projetadas do centro do nucleossomo são representadas com variados tipos de modificações pós-traducionais. Metilação do DNA e ligação de RNAs não codificantes também estão ilustradas. **B:** Esquema ilustrando as diferenças entre eucromatina e heterocromatina. Eucromatina é caracterizada por hiperacetilação de histonas e hipometilação de histonas e DNA. Em contraste, a heterocromatina apresenta hipoacetilação de histonas e hipermetilação de histonas e DNA. **C:** As quatro caudas de histonas são ilustradas com as modificações pós-traducionais em resíduos específicos correspondentes (modificado de Gonzalo 2010).

O estudo da epigenética tem se desenvolvido rapidamente, tornando-se uma das áreas mais influentes da pesquisa científica e essencial em processos biológicos. O número de patologias associadas à desregulação epigenética continua aumentando, levando a uma maior lista de alvos terapêuticos potenciais.

2.3.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais estudada atualmente e possui um papel essencial no desenvolvimento normal devido à sua atuação no mecanismo *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X e silenciamento transcricional de elementos repetitivos (McCabe et al, 2009).

Em mamíferos, a metilação do DNA ocorre por uma ligação covalente de um radical metil no carbono 5 do anel pirimidina da citosina utilizando-se uma molécula de S-adenosilmetionina como doadora (Taby e Issa, 2010). A metilação do DNA resulta da atividade enzimática de uma família de DNAmetiltransferases (DNMT), enzimas que catalisam a transferência do grupo metil da S-adenosil-metionina para citocinas nos dinucleotídeos CpG (figura 7). A DNMT1 é uma metiltransferase de manutenção, responsável pelo estabelecimento do padrão de metilação pré-existente. Já os padrões de metilação do DNA são estabelecidos durante o desenvolvimento por pelas DNA metiltransferases *de novo* 3A e 3B (DeAngelis et al, 2008).

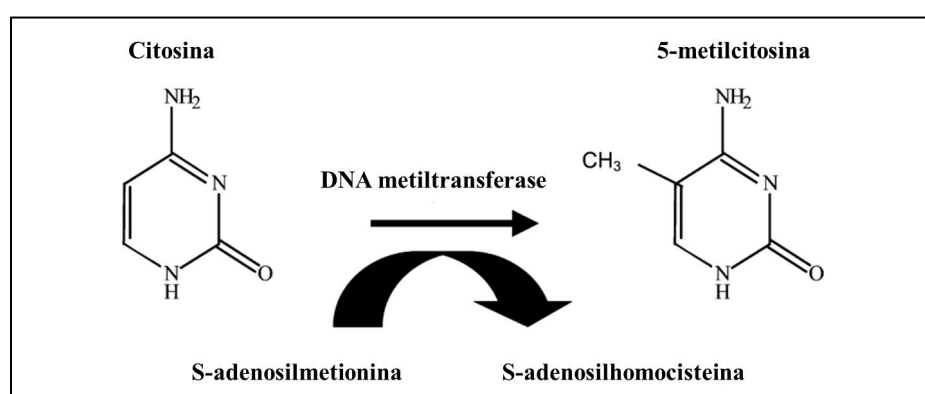


Figura 7: Metilação da citosina. A DNA metiltransferase catalisa a transferência do grupo metil proveniente de uma S-adenosilmetionina para a citosina, produzindo 5-metilcitosina e S-adenosilhomocisteína (adaptado de Richardson, 2003)

A reação de metilação é catalisada quando no contexto de um dinucleotídeo CpG (Vertino et al, 1996). Os dinucleotídeos CpG encontram-se concentrados em trechos do DNA ricos em CG, as chamadas ilhas CpG e regiões de sequencias repetitivas, como regiões centroméricas, elementos retrotransposons, entre outras (Sharma et al, 2010).

As ilhas CpG estão preferencialmente localizadas na porção 5' dos genes com cerca de 1kb de comprimento. Apresentam uma frequência de CpG de 60% e se sobrepõe a regiões promotoras em 60-70% dos genes humanos. São geralmente caracterizadas por um estado permissivo da cromatina, o que sugere que as ilhas CpG promovem um meio de distinção entre regiões promotoras e regiões transcricionalmente irrelevante intergênica (Illingworth e Bird, 2009).

A maioria das ilhas CpG são hipometiladas, porém uma pequena porcentagem é metilada durante o desenvolvimento e nos processos de inativação do cromossomo X e *imprinting*. A quebra desse padrão de metilação nas ilhas CpG tem sido descrita como marcadores de neoplasias (Esteller, 2007).

A metilação do DNA na ilha CpG do promotor gênico tem sido correlacionada ao silenciamento permanente da expressão, como observado no cromossomo X inativo em mulheres. Essa marcação leva ao silenciamento por inibir diretamente a ligação de fatores de transcrição ao sítio por recrutar as proteínas de ligação à metilcitosina (MBD). Essa família de proteínas está presente em complexos co-repressores da transcrição, envolvendo diversos outros membros da maquinaria epigenética, como desacetilases e metiltransferases de histonas, resultando no remodelamento da cromatina e silenciamento gênico (Nan et al, 1998). Portanto, o remodelamento da cromatina por modificações nas histonas e a metilação do DNA atuam em conjunto para organizar o genoma em zonas transcricionalmente ativas e não ativas (DeAngelis et al, 2008).

Geralmente, ilhas CpG não metiladas estão relacionadas à estrutura transcricionalmente ativa, enquanto que o DNA metilado recruta complexos proteicos que promovem desacetilação de histonas, direcionando a cromatina à compactação e silenciamento (Johnson e Evers, 2008).

Alterações nos padrões de metilação e/ou no processo de remodelamento da cromatina têm sido observadas em processos carcinogênicos por alterarem a expressão gênica (DeAngelis et al, 2008). Essas alterações têm, portanto, um papel significativo no desenvolvimento e na progressão de neoplasias.

2.3.2 Metilação do DNA no Envelhecimento

Evolutivamente, a metilação do DNA tem sido utilizada para silenciar a expressão de sequências repetitivas endógenas e retrotransposons de agentes infecciosos, prevenindo a quebra de genes de expressão regular. Porém, apesar dos padrões de metilação do DNA serem relativamente estáveis em células adultas, alterações significativas têm sido descritas em tecidos envelhecidos (Taby e Issa, 2010).

Uma associação entre envelhecimento e epigenética foi primeiramente observada na década de 60 em salmão, mostrando uma diminuição da metilação global com a idade (Berdyshev et al, 1967). Essa diminuição foi posteriormente observada também em mamíferos, como em camundongos, ratos, vacas (Golbus et al, 1990). Na espécie humana, foram descritas em cérebro, fígado, mucosa de intestino delgado, coração, baço e linfócitos T (Vanyushin et al, 1970; Vanyushin et al, 1973; Romanov e Vaniushin, 1980; Wilson et al, 1987). Uma diminuição global da metilação também foi relatada em cultura de fibroblastos humanos (Issa et al, 1994).

Além da hipometilação global observada, certo número de loci específicos têm sido descritos como hipermetilados durante o processo normal de envelhecimento. Estudos com linfócitos T de indivíduos com idades diferentes mostrou hipermetilação de aproximadamente 1% dos *loci* examinados com aumento da idade. Além disso, foram observados aumento de metilação em DNA ribossômico em ratos (Oakes et al, 2003) e em ilhas CpG de supressores tumorais (Calvanese et al, 2009), além de tecido epitelial (Ahuja et al, 1998).

Exemplos de genes hipermetilados relatados incluem o receptor de estrógeno, fator de crescimento de insulina II (IGF-II), p14^{ARF}, p16^{ink4a}, E-caderina, c-fos e colágeno α 1 (Gonzalo, 2010). Muitos desses promotores também se apresentam

hipermetilados durante a tumorigênese, sugerindo um envolvimento no aumento da suscetibilidade ao câncer associado à idade (Esteller, 2008). Este fato sugere que o acúmulo de alterações epigenéticas durante o envelhecimento possa contribuir diretamente para transformação maligna da célula (Fraga, 2009).

Essas diferenças indicam que uma hipometilação global do genoma no processo de envelhecimento é acompanhada por um aumento da metilação em promotores de genes específicos. Foi proposto que a diminuição global da metilação pode ser devido a uma progressiva queda da eficácia da atividade em DNMT1 durante no envelhecimento. Porém, a hipermetilação de promotores gênicos específicos pode ser explicada por um aumento da expressão das DNMTs *de novo* (Gonzalo, 2010). Sob esse aspecto, alguns estudos já descrevem um aumento da expressão de DNMT3b foi observado em fibroblastos em cultura (Casillas et al, 2003).

Alterações epigenéticas podem ter grande impacto nos domínios cromossômicos ou em loci genômicos específicos dentro dos cromossomos. A principal consequência para a célula são as mudanças de ativação e repressão transcricional de diversos genes, um aumento da instabilidade genômica e defeitos estruturais nos domínios de heterocromatina (Gonzalo, 2010). A variedade de processos celular que são afetados por mecanismos epigenéticos pode representar um fator fisiopatológico importante para o envelhecimento e doenças relacionadas, especialmente o câncer.

Sabe-se que algumas alterações epigenéticas são comuns ao envelhecimento e câncer, sugerindo que o acúmulo de defeitos epigenéticos com a idade pode promover a transformação de uma célula e aumentar sua suscetibilidade ao câncer (Gonzalo, 2010).

2.3.3 Metilação do DNA no Câncer Gástrico

Uma teoria recente bastante utilizada para a origem do câncer sugere uma base comum de uma modificação epigenética policlonal de células progenitoras. Nos últimos 30 anos, a teoria corrente é a de uma única célula dar origem ao câncer. De acordo com essa visão, uma série de alterações genéticas é responsável pela seleção clonal continua e pela heterogeneidade da célula tumoral (Figura 8) (Feinberg et al, 2006).

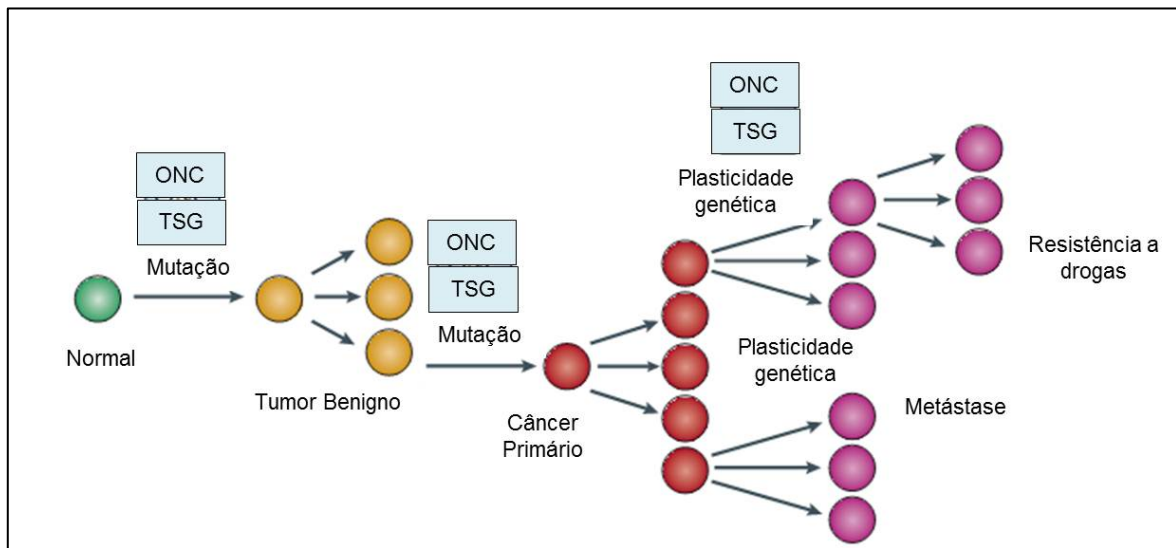


Figura 8: Modelo clonal genético do câncer. A visão clássica do câncer originado a partir de uma série de mutações, incluindo a ativação dominante de oncogenes (ONC) e recessiva de genes supressores tumorais (TSG). Cada mutação leva supercrescimento seletivo de uma população monoclonal de células tumorais, e cada propriedade tumoral, como invasividade, metástase e resistência à droga, é adquirida por uma mutação (adaptado de Feinberg et al, 2006).

Esse modelo foi mantido pela descoberta dos oncogenes e genes supressores tumorais, além das mutações em genes de manutenção, necessários para controle de estágios iniciais do crescimento tumoral, como em câncer colorretal e carcinoma renal (Feinberg et al, 2006).

Porém, os mecanismos genéticos não são a única forma de desequilíbrio gênico no câncer. Modificações epigenéticas patológicas são processos alternativos a mutações e alterações cromossômicas para resultar em função gênica alterada. Isso inclui hipometilação global do DNA, hiper e hipometilação de genes específicos, alterações na cromatina e perda de *imprinting* (Feinberg et al, 2006).

As modificações epigenéticas também contribuem para perda cromossômica e rearranjos durante a progressão tumoral. O fato de essas alterações serem encontradas inicialmente na tumorigênese e até em tecidos normais antes do tumor aparecer indica que essas alterações precoces nas células progenitoras são a chave para determinar o risco de câncer, progressão tumoral e heterogeneidade das células filhas de tumores que nascem dessas progenitoras. A figura 9 ilustra a ideia dos

eventos epigenéticos precoces em três fases: quebra do padrão epigenético normal da célula progenitora, mutação inicial e plasticidade genética e epigenética.

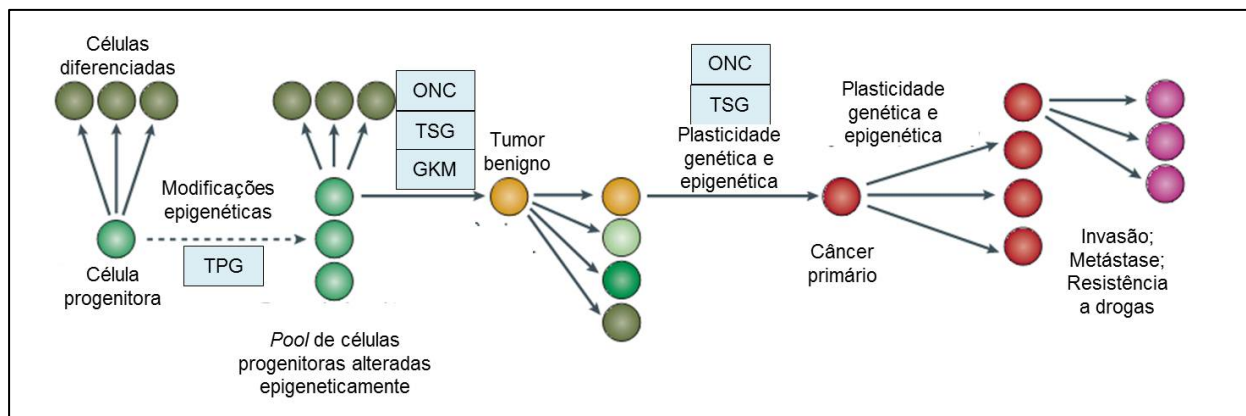


Figura 9: Modelo progenitor epigenético do câncer. De acordo com este modelo, o câncer acontece após três etapas. Primeiro ocorre uma alteração epigenética em uma célula progenitora de um tecido específico, evento mediado por regulação errônea de genes progenitores tumoral (TPG). Essa alteração pode ser decorrente de um evento da própria célula tronco, da influência do estroma, ou dano ambiental. Em seguida, há uma mutação em genes de manutenção (GKM). O terceiro passo consiste na instabilidade genética e epigenética, que leva a uma evolução tumoral aumentada (adaptado de Feinberg et al, 2006). ONG: oncogenes, TSG: genes supressores tumorais.

Sabe-se que as modificações epigenéticas possuem papel chave na carcinogênese gástrica (Panani, 2008). O estômago é um dos órgãos com maior frequência de metilação de ilhas CpG relacionada à idade em células epiteliais não neoplásicas. Foi observado que diversos genes encontraram-se metilados em mucosa gástrica não neoplásica, com ou sem associação ao câncer gástrico (Esteller, 2002).

A elevada frequência de metilação pode estar relacionada à acessibilidade do tecido a agentes exógenos, pois o tecido gástrico é diretamente exposto a esses agentes. Sendo assim, fatores alimentares ou metais pesados podem ser possíveis candidatos (Kang et al, 2003). Produtos endógenos, incluindo espécies reativas de oxigênio, também são possíveis causas da metilação relacionada à idade do estômago (Issa, 2000; Shen et al, 2002).

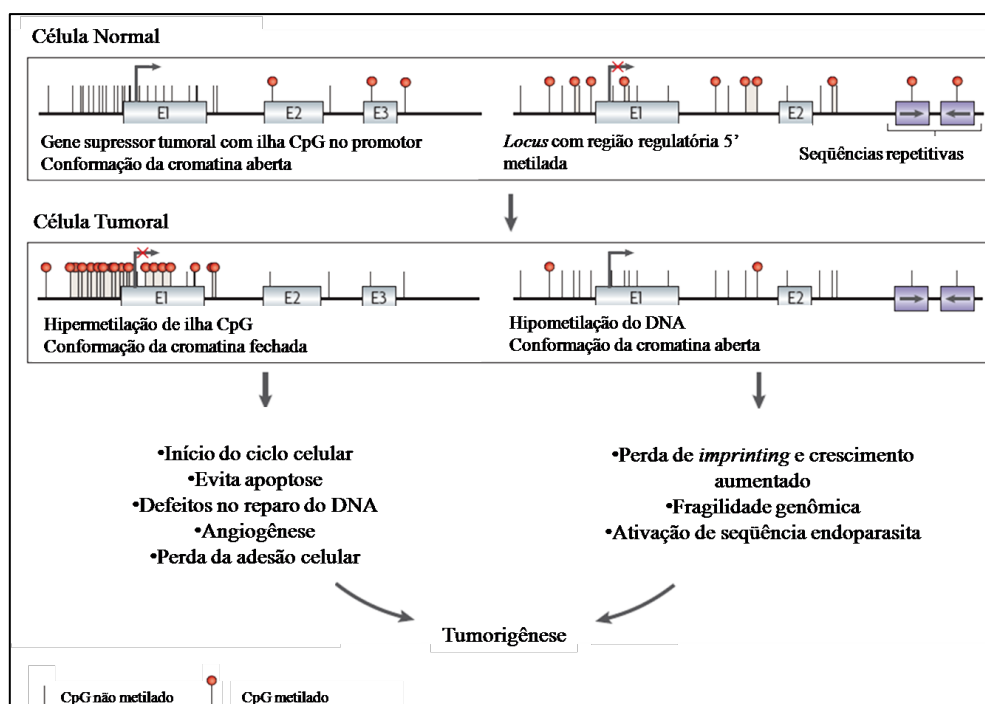


Figura 10: Metilação do DNA em células normal e tumoral. E=éxon. Modificado de Esteller, 2007.

2.4 Genes selecionados para o presente estudo

Sete genes foram escolhidos de acordo com sua função e/ou seu envolvimento na gênese do câncer gástrico e papel na promoção da longevidade: *SIRT1*, *SIRT3*, *SMARCA5*, *hTERT*, *CAV1*, *IGFBP3* e *CDH1*.

2.4.1 Sirtuínas

As sirtuínas constituem uma família de proteínas altamente conservadas evolutivamente, que regulam importantes processos biológicos como duração de vida, acúmulo de gordura em células humanas, secreção de insulina, resposta celular ao estresse, degeneração axonal, atividade basal de fatores de transcrição, regulação de atividade enzimática, recombinação de DNA ribossômico (rDNA) e apoptose (Sauve et al, 2006).

Em leveduras, foi observado que a proteína Sir2 (*silent information regulator 2*) participa do silenciamento transcricional de diversos *loci* por possuir função desacetilase NAD (*nicotinamida adenine dinucleotide*)-dependente (Imai et al, 2000).

Nesses organismos, Sir2 controla longevidade por estabilizar rDNA, evitando recombinação e reduzindo taxa de formação de rDNA circular extracromossômico, que limitaria a vida replicativa da célula e por regular modificação de histonas de telômeros (Westphal et al, 2007).

Sua atividade desacetilase de histona classe III está associada à repressão transcricional, na reação em que, ao consumir NAD^+ , libera nicotinamida, O-acetil ADP ribose e o substrato desacetilado (Sauve et al, 2006) (Figura 11). Sabe-se que NAD e NADH estão envolvidas em centenas de reações metabólicas da célula; portanto, a atividade bioquímica de Sir2 leva à ideia de que as sirtuínas conectam dieta e metabolismo ao envelhecimento (Westphal et al, 2007).

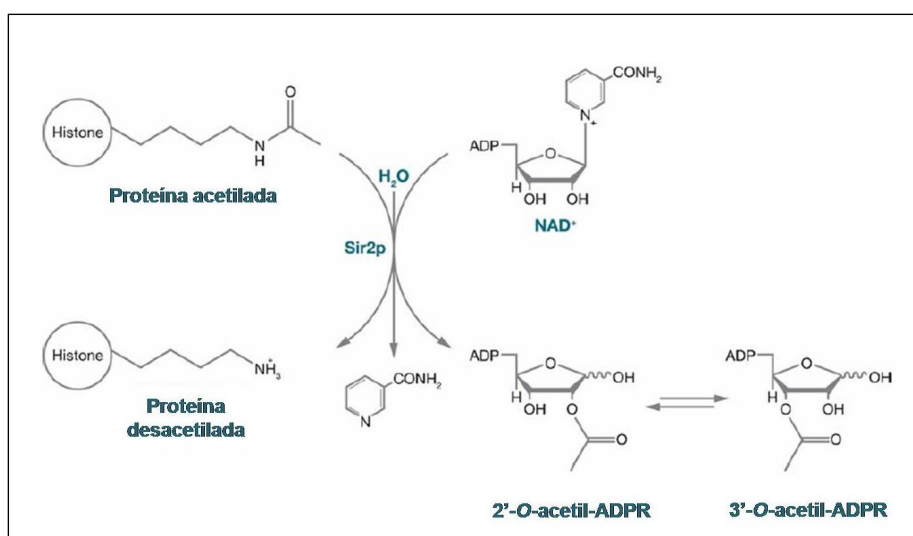


Figura 11: A reação de Sir2. Desacetilação de proteína catalisada por Sir2p na presença de NAD^+ (adaptado de Sauve et al, 2006).

Evidências sugerem que as sirtuínas estão envolvidas na promoção da longevidade, particularmente por regime de restrição calórica em diversos organismos (Sauve et al, 2006). A via de sinalização do IGF1 (*insulin-like growth factor 1*), um mediador dos efeitos do envelhecimento por restrição calórica (Barbieri et al, 2003), tem sido associada à expressão de ortólogos de Sir2 em mamíferos (Cohen et al, 2004). É possível que a regulação do envelhecimento mediada por Sir2 seja conservada em organismos complexos, incluindo humanos (Michishita et al, 2005).

Em humanos, há sete proteínas descritas pertencentes à família de proteínas desacetilases, com mesmo domínio catalítico que Sir2, e também com atividade de ADP-ribosiltransferase (Jacobs et al, 2008). A atividade de desacetilase dessas proteínas sugere que essas proteínas servem como sensores do estado oxidativo e metabólico das células (Shi et al, 2005).

A proteína SIRT1 é codificada pelo gene de mesmo nome, localizado na região cromossômica 10q21.3, e possui maior similaridade à sequência de Sir2 (Inoue et al, 2007). SIRT1 modula resposta celular ao estresse e a sobrevivência da célula pela regulação de fatores e cofatores de transcrição, como a proteína supressora tumoral p53, família FOXO (*forkhead-box class O*), NF- κ B, dentre outros (Westphal et al, 2007). Tem função celular de estabilizar cromatina, aumentar longevidade, permitir maior sobrevivência celular, metabolismo, diferenciação muscular esquelética, adipogênese e síntese de RNA ribossômico (rRNA) (Inoue et al, 2007).

SIRT2 é uma proteína citoplasmática, codificada pelo gene *SIRT2*, localizado na região cromossômica 19q13.2, co-localizada com microtúbulos, com função de desacetilar α -tubulina, uma proteína relacionada à regulação da divisão celular (North et al, 2003). Foi observado que os níveis de SIRT2 aumentavam durante a mitose, sugerindo um papel na regulação do ciclo celular (Inoue et al, 2007). SIRT2 tem sido estudada em modelo de doença de Parkinson em *Drosophila* e sua inibição tem efeitos positivos contra essa doença (Outeiro et al, 2007).

A proteína mitocondrial SIRT3 torna-se ativa por processamento proteolítico de sua porção N-terminal (Schwer et al, 2002) e participa de funções de termogênese adaptativa, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio e o potencial de membrana da mitocôndria. É codificada pelo gene *SIRT3*, localizado na região cromossômica 11p15.5 e alguns polimorfismos deste gene foram associados à longevidade e ao aumento de expressão em câncer de mama (Inoue et al, 2007).

O gene *SIRT4*, na região cromossômica 12q24.31, codifica para a quarta sirtuína que possui localização mitocondrial e apresenta função no metabolismo de glutamato. SIRT5 é codificada por gene localizado em 6p23, também tem localização mitocondrial e estudo em murinos *knockout* para receptor de serotonina mostrou um aumento de sua expressão desse gene (Sibille et al, 2007).

SIRT6, com gene na região cromossômica 19p13.3, tem localização nuclear associada a cromatina e função de reparo de DNA, homeostase de glicose e manutenção de níveis normais de IGF. SIRT7 tem localização nucleolar e está associada a genes de rRNA transcricionalmente ativos, com função de promover transcrição de rRNA pela polimerase I (Inoue et al, 2007).

2.4.1.1 SIRT1 (*Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog 1*)

SIRT1 regula o metabolismo e a sobrevivência celular em vários tipos celulares por influenciar silenciamento gênico e atividade de vários fatores de transcrição e correguladores (Kuningas et al, 2007). Em mamíferos, seus substratos para atividade de desacetilase incluem histonas, principalmente os resíduos de lisina 16 e 9, das histonas H4 e H3, respectivamente, e fatores de transcrição, como p53, FOXO, acetiltransferase de histona p300, p73, E2F1, fator de reparo do DNA Ku70, NF-κB e receptores de andrógeno (Fraga et al, 2007).

A diminuição da expressão de SIRT1 em células senescentes e durante envelhecimento já é bem conhecida, bem como seu aumento de expressão em cânceres humanos de pulmão, próstata e leucemia, e às vezes diminuída em tumor de cólon. O aumento de expressão de SIRT1 em alguns tipos tumorais e sua relação com proliferação e longevidade sugere que a função de desacetilase NAD⁺ -dependente pode estar envolvida diretamente na tumorigênese (Fraga et al, 2007).

O potencial oncogênico de SIRT1 é indicado por seu papel em controlar diferentes vias moleculares na célula. Provavelmente, a associação mais direta é a desacetilação e consequente inativação dos genes supressores tumorais p53 e p73 (Dai et al, 2007), inibindo a senescência celular e prolongando a vida replicativa das células humanas. SIRT1 pode inativar genes supressores tumorais e coativadores como p300 e E2F1 (Fraga et al, 2007). SIRT1 atua também inibindo a apoptose induzida por estresse e promovendo sobrevivência de células cancerosas ao desacetilar Ku70 (Cohen et al, 2004). E ainda pode contribuir para imortalidade celular ao desacetilar os fatores de transcrição da família FOXO, especialmente FOXO3, potencializando o efeito desse fator na parada do ciclo celular e alvo de genes de

reparo de DNA, mas diminuindo sua capacidade de promover apoptose em resposta ao estresse (Brunet et al, 2004).

Em outros casos, como em sua ação sobre o receptor de andrógeno e regulação de NF- κ B, SIRT1 mostra propriedades antitumorais (Fraga et al, 2007).

Um estudo em pacientes com leucemia mielóide aguda observou níveis elevados de SIRT1, que se mostrou importante para a manutenção da sobrevivência de células afetadas por toxicidade ou agentes quimioterápicos (Bradbury et al, 2005). Outro estudo relatou um aumento de expressão de SIRT1 citoplasmático em linhagens celulares e em amostras de pacientes com carcinoma colorretal (Stunkel et al, 2007). Neste mesmo estudo, foi observado que animais *knockdown* para mRNA de *SIRT1* apresentaram uma diminuição na proliferação celular e indução de apoptose independente de p53 e que a expressão de SIRT1 era induzida por dano ao DNA (Stunkel et al, 2007).

Em modelo animal de câncer de cólon, observou-se que um aumento de expressão de SIRT1 reduz proliferação celular deste tipo tumoral, ou seja, SIRT1 atuaria como supressor da formação e do crescimento tumoral (Firestein et al, 2008). Este grupo também mostrou que SIRT1 interage e suprime β -catenina, que leva a uma variedade de tumores. O aumento de expressão de SIRT1 inibe crescimento de células de câncer de cólon via atividade de β -catenina, suprimindo a localização desta proteína no núcleo e atenuando a capacidade de ativar transcrição (Firestein et al, 2008).

A função conservada de SIRT1 em invertebrados e em mamíferos sugere que o aumento da expressão do gene *SIRT1* e o subsequente aumento de sua proteína podem manifestar efeitos da longevidade em humanos. Neste caso, potenciais mutações afetando a transcrição do gene poderiam estar envolvidas, mas um estudo de cinco variantes comuns de *SIRT1* em idosos com média de idade de 98,3 anos não encontrou associação entre os polimorfismos e longevidade (Flachsbar et al, 2006).

Outro estudo de *SIRT1* em diferente população de idosos com mais de 85 anos também não encontrou associação entre os SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) e mortalidade, mas observou uma menor mortalidade por doenças cardiovasculares em portadores de uma das variantes. Nesse mesmo estudo, verificou-

se também a associação entre melhor função cognitiva e uma segunda variante, sugerindo um papel protetor de *SIRT1* em cardiomiócitos e corroborando possível papel de *SIRT1* no cérebro (Kuningas et al, 2007). O fato de polimorfismos não estarem atuando na longevidade, sugere que outros mecanismos podem estar influenciando a expressão de *SIRT1* no envelhecimento.

No referente ao controle transcricional de *SIRT1*, sabe-se que o regulador do ciclo celular E2F1 é capaz de se ligar ao promotor desse gene, regulando o nível de expressão basal da proteína. Sob condições de estresse oxidativo, E2F1 apresenta maior estabilidade, levando, portanto, a um aumento de transcrição de *SIRT1*. Outro regulador de *SIRT1* é o supressor tumoral H1C1 (*hypermethylated in cancer 1*), que promove formação de complexo de repressão transcricional (Zschoernig e Mahlknecht, 2008).

Em mamíferos, a expressão da proteína *SIRT1* é ativada por diversos fatores, como estímulo ao estresse, levando a uma quebra de gordura armazenada, induzindo a parada do ciclo celular e processo de reparo do DNA ou diminuição da apoptose (Flachsbar et al, 2006).

2.4.1.2 *SIRT3* (Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog 3)

A mitocôndria é a organela central nos processos de metabolismo celular de energia, mas também em processos como apoptose, senescência celular e regulação da longevidade (Schlicker et al, 2008). A falência das funções mitocondriais e de sua regulação contribui para doenças associadas à idade, como diabetes, neurodegeneração e carcinogênese (Singh, 2006). Neste sentido, o estudo da proteína mitocondrial *SIRT3* e sua expressão tornam-se oportuno.

O gene *SIRT3* localiza-se na extremidade telomérica do braço curto do cromossomo 11, em uma região sujeita a *imprinting* genômico (p15.5), que contém genes relacionados ao envelhecimento. Essa região contém genes supressores tumorais e loco associado à síndrome de Beckwith-Wiedemann, que leva à predisposição ao câncer (Schwer et al, 2002).

Um estudo da região promotora deste gene identificou a presença de um promotor bidirecional, que regula expressão tanto de *SIRT3*, quanto de

PSMD13, que codifica para uma subunidade de proteossomo, com função de *checkpoint* do ciclo celular e replicação de DNA, estando assim, também associado à senescência celular e ao envelhecimento. Este grupo identificou também que esta região contém 67% de CGs que compreende duas ilhas CpG (Bellizzi et al, 2007).

Uma associação entre um marcador polimórfico de *SIRT3* e longevidade foi observada em estudo com idosos centenários (Rose et al, 2003). A partir deste, este mesmo grupo observou que um polimorfismo intrônico de VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*), aumenta a atividade de *SIRT3*, e apresentou distribuições genótípicas dos alelos favoráveis a um grupo de homens idosos em relação a um grupo de homens jovens de uma mesma população, indicando que o nível de expressão deste gene pode afetar longevidade por agir no padrão mitocondrial de apoptose (Bellizzi et al, 2005).

O cDNA de *SIRT3* possui aproximadamente 44kD, é sintetizada no citoplasma como precursor inativo, e transportada à mitocôndria, onde é proteoliticamente ativada por peptidases de matriz na mitocôndria (Schwer et al, 2002).

Por sua localização mitocondrial, *SIRT3* é um regulador de termogênese adaptativa, e atua diminuindo potencial da membrana e a produção de espécies reativas de oxigênio, enquanto aumenta respiração celular (Schlicker et al, 2008). Em tecido adiposo marrom de ratos, é encontrada uma expressão aumentada de *Sirt3*, devido a alterações da temperatura ambiente e restrição calórica imposta (Shi et al, 2005).

Estudo em camundongos relatou que *Sirt3* pode desacetilar, e assim promover ativação de um regulador central metabólico na matriz mitocondrial, a enzima glutamato desidrogenase. Neste mesmo aspecto, age sobre outra enzima que promove regeneração de antioxidantes e catalisa um fator regulatório do ciclo de ácido cítrico, a isocitrato desidrogenase (Schlicker et al, 2008).

SIRT3 também se caracteriza por participar da regulação da via da apoptose, haja vista função da mitocôndria na regulação de morte celular e apoptose. Por exemplo, *Bcl-2*, é uma proteína anti-apoptótica, que se localiza na membrana externa da mitocôndria e atua na supressão de apoptose, promovendo a sobrevivência celular. A localização mitocondrial de *p53* pode ocorrer em resposta ao estresse

genotóxico, e há evidências de associação de p53 e proteínas da família Bcl-2 para promover liberação de citocromo c que leva a ativação de caspases que culminam em apoptose. Neste contexto, foi observado que SIRT3 é requerido na fase de parada do ciclo celular em G1 induzida por perda de Bcl-2 em linhagem celular epitelial não cancerosa, indicando papel de SIRT3 na inibição do crescimento durante certas condições ambientais. Neste mesmo estudo, mostrou-se que SIRT3 é pró-apoptótica e essencial como mediador da regulação da apoptose por Bcl-2/p53 (Allison e Milner, 2007).

Assim, o estudo da expressão de *SIRT3* e câncer ainda é novo na literatura, havendo apenas um trabalho que relaciona este gene e câncer de mama. Neste, observou-se que a expressão de *SIRT3* encontrava-se aumentada em amostras de câncer de mama nódulo positiva, de acordo com hipótese por eles proposta, de que as sirtuínas estariam ligando as funções da mitocôndria, do complexo telomérico e de produção ribossômica, sugerindo que a super expressão desta sirtuína pode estar relacionada a disseminação (Ashraf et al, 2006).

2.4.2 *SMARCA5 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5)*

O gene *SMARCA5* encontra-se na região 4q31.1 e codifica para um peptídeo de 1.052 aminoácidos, denominado hSNF2H, que possui 73% de identidade a família ISWI, componente chave do fator de remodelamento da cromatina em *Drosophila* (Aihara et al, 1998).

A família de proteínas ISWI possui atividades de helicase e ATPase e função reguladora da transcrição pela modificação da estrutura da cromatina adjacente. A proteína codificada por *SMARCA5* compõe, juntamente com a proteína Tip 5 (*TTF-I interacting protein 5*) o complexo regulador nucleolar NoRC (*Nucleolar remodeling complex*), que atua na repressão da transcrição de DNA ribossômico por induzir metilação do DNA, metilação dos resíduos K9 na histona H3 e desacetilação de histona (McStay e Grummt, 2008).

A família ISWI associa-se a sequências *Alu* e correlaciona-se a modificação de histona e associação do complexo SWI, podendo estar regulada por

metilação do DNA (Hakimi et al, 2002). O mecanismo de remodelamento da estrutura da cromatina é um mecanismo chave regulatório de muitos processos celulares.

Um estudo relacionando o gene *SMARCA5* em câncer demonstra que há indução na diferenciação de células sanguíneas em medula óssea de murinos seguida de *downregulation* de *SMARCA5*. A expressão elevada de *SMARCA5* pode desregular a programação genética necessária para diferenciação normal, em células progenitoras de pacientes com leucemia mielóide aguda (Stopka et al, 2000).

O gene *SMARCA5* pode, portanto, estar envolvido no desenvolvimento de câncer, atuando na maquinaria de remodelação da cromatina e na transcrição de certos genes por metilação de histona H3, em leveduras (Santos-Rosa et al, 2003).

2.4.3 *hTERT*

Os telômeros são sequências de DNA formadas por repetições TTAGGG em humanos, localizada no final de cada cromossomo, com função de preservação da integridade, por prevenir degradação, fusões finais, rearranjos e desgaste do cromossomo. Em células somáticas normais, cada divisão celular está associada a uma perda de 30-150 bp de DNA telomérico. Essa perda de DNA não codificante no final do cromossomo resulta em redução do tamanho telomérico que é associado à parada de crescimento e senescência celular (Poole et al, 2001).

Na presença da telomerase, uma DNA polimerase RNA dependente, o comprimento telomérico é mantido e a senescência replicativa é evitada. A telomerase humana é constituída por três componentes, a unidade catalítica transcriptase reversa da telomerase (*hTERT*), o *template* de RNA (*hTER* ou *hTERC*) e proteína associada a telomerase humana - *hTEP* (Choi et al, 2007; Li et al, 2008). A expressão de *hTERT* é altamente associada à atividade da telomerase, enquanto as outras subunidades são constitutivamente expressas em células normais e tumorais (Kyo et al, 2008).

A maioria das células somáticas normais não exhibe atividade telomérica, devido à repressão do gene *hTERT* (Li et al, 2008), enquanto que em células altamente proliferativas como linhagens germinativas, células hematopoiéticas

e em mais de 95% das células tumorais expressam telomerase em diferentes níveis (Poole et al, 2001).

A expressão de *hTERT* é altamente regulada por mecanismos transcricionais. O promotor do gene, localizado em 5p15.3, contém sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, além de ser regulado por remodelamento da cromatina (Kyo et al, 2008).

Diversos sítios de ligação de fatores de transcrição foram identificados no promotor de *hTERT*, como *E-boxes* (CACGTG) localizados a -165 a +44 (numeração a partir do sítio de início de transcrição) e sítios de ligação para família do oncogene *Myc*. Sabe-se que este é um regulador chave da transcrição de *hTERT* durante a carcinogênese. Outra característica do promotor deste gene é a presença de pelo menos cinco *GC-boxes* (GGGCGG), que contém sítios de ligação para o fator Sp1. Mutações nessa sequência diminuem atividade transcricional do promotor, enquanto que aumento da expressão de Sp1 eleva a atividade do promotor (Kyo et al, 2008).

Além disso, esse gene pode ser regulado por fatores como HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*), AP-1 (*activator protein 1*), por hormônios como estrógeno, citocinas e oncogenes (Kyo et al, 2008). Há ainda repressores identificados que regulam negativamente *hTERT*: Mad1, SIRT1, BRIT1 (Lin -43), p53, via Sp1, o supressor de tumor de Wilms, WT1, MZF-2 (*myeloid-specific zinc finger protein-2*) e CTCF (Kyo et al, 2008).

O foco do presente estudo está no outro tipo de regulação que esse promotor também possui: a epigenética. O promotor de *hTERT* contém uma ilha CpG de aproximadamente 4kb, de -1800 a +2200, com uma proporção de CG de mais de 70% na região 5', incluindo o núcleo do promotor de -310 a -20 (Choi et al, 2007).

Diversos grupos analisaram o padrão de metilação dos sítios CpG de *hTERT*. Era esperado que, como na maioria dos genes, a metilação do DNA estivesse associada com silenciamento, e alguns grupos confirmaram esse dado (Lopatina et al, 2003; Liu et al, 2004). Outros, porém, não encontraram associação entre expressão de *hTERT* e metilação em sítios específicos ou de modo geral (Dessain et al, 2000; Widschwendter et al, 2004). Além disso, outro grupo encontrou

correlação oposta ao modelo geral de regulação da metilação do DNA, em que, a presença de citosinas metiladas levava a transcrição do gene (Guilleret et al, 2002). Recentemente, foi observado que a metilação desse gene pode ser heterogênea, e que, para haver expressão da proteína, o sítio de início da transcrição de *hTERT* deve estar desmetilado (Zinn et al, 2007).

Sabe-se que o processo de transformação neoplásica envolve uma série de eventos que permite a célula ultrapassar ou sobrepor as vias senescentes. A introdução de *hTERT* em células com telomerase silenciada é suficiente para reativar essa enzima, que vai promover alongação ou manutenção dos telômeros, ultrapassando a senescência (Shay e Wright, 2007).

Atividade da telomerase está associada ao câncer e é detectada em estágios iniciais em cânceres de pulmão, mama, cólon e próstata. Alta expressão de *hTERT* ou atividade da telomerase estão correlacionadas com pior prognóstico em neuroblastoma, leucemia mielóide aguda, câncer de mama e gastrointestinais (Tollefsbol e Andrews, 2001), sugerindo que a telomerase pode ser um marcador útil de diagnóstico e prognóstico ou alvo de quimioterapia (Barclay et al, 2005). É sabido que a inibição da expressão da telomerase leva ao desgaste telomérico e à inibição do crescimento de células neoplásicas em cultura; portanto, é provável que expressão da telomerase e estabilização dos telômeros contribuam para tumorigênese (Tollefsbol e Andrews, 2001).

Zinn et al (2007) mostraram que o promotor do gene *hTERT* encontra-se hipermetilado e possui expressão variável e reduzida na maioria das linhagens celulares de câncer de cólon, mama, pulmão e leucemia. A expressão de *hTERT* em células de câncer parece ser menor do que em linhagens imortalizadas e em células tronco de embriões; portanto, o gene *hTERT* pode se comportar de forma similar a genes silenciados em tumores, no qual uma metilação densa e completa da região promotora leva a silenciamento gênico.

No câncer gástrico, verificou-se que a presença de mRNA de *hTERT* de tecido tumoral e margem normal foram de 100% e 25%, respectivamente, sugerindo que, diferentemente das outras subunidades da telomerase, um aumento da expressão

de *hTERT* possui um papel importante no desenvolvimento desse tipo tumoral (Chen et al, 2005).

Ainda nesse contexto, outros autores encontraram correlação entre aumento da expressão de mRNA desse gene e tumores pouco ou indiferenciados e sugere que hTERT pode ser um potencial biomarcador para o estado da telomerase na detecção prematura de câncer gástrico, podendo se tornar alvo de terapia gênica e inaugurando uma nova abordagem na terapia do câncer (Hu et al, 2004). Entretanto, estudo recente encontrou expressão de mRNA de hTERT presente em tecido gástrico normal e maligno (Li et al, 2008).

Um estudo sobre metilação e expressão de *hTERT* em câncer de ovário e cervical mostrou expressão aumentada nas amostras de câncer e baixa expressão em tecido normal. Porém, não houve relação entre expressão e padrão de metilação em nenhum dos tipos de câncer. Assim, foi proposto que a expressão de *hTERT* está diferentemente regulada em diversos tecidos. Também foi observado um aumento de idade em pacientes com tecido tumoral metilado, sendo um fator que pode contribuir para pior prognóstico desses pacientes (Widschwendter et al, 2004). Estudo recente corrobora esses achados em pacientes com lesões cervicais pré-malignas, no qual não foi observada correlação entre metilação e expressão de hTERT, sugerindo outro mecanismo de controle transcricional neste tecido (Oikonomou et al, 2007).

Em melanoma intraocular, foi demonstrado que a metilação do promotor de *hTERT* é um evento comum e ocorre em 52% dos indivíduos estudados (Moulin et al, 2008). Já em leucemia linfocítica de células B, o grau de metilação do promotor desse gene tinha impacto na atividade da telomerase, possuindo um papel na regulação da expressão gênica nesse pacientes (Bechter et al, 2002).

O aumento de expressão de *hTERT* também foi relatado em câncer colorretal induzida por hipermetilação dos sítios CpG das regiões de -281 a +88 e -441 a -220 e hipometilação de -31 a +170 no promotor do gene, sugerindo um mecanismo mais complexo de regulação epigenética nesse gene (Choi et al, 2007). Neste mesmo aspecto, outro grupo já havia avaliado o estado da metilação dos sítios CpG em -196 a +112 em amostras de linhagens de câncer pulmonar e colorretal, onde não observaram um padrão comum entre essas duas linhagens, mas que se especulou uma atuação da

regulação de *hTERT* por metilação em tipos específicos celulares e/ou em algum estágio do desenvolvimento ou carcinogênese (Devereux et al, 1999).

Essa distribuição não usual de metilação ao longo do promotor do gene *hTERT* foi relatada. Ao analisarem todas as ilhas CpGs do gene, com divisão do promotor em 5 regiões até o início do sítio de transcrição, revelou-se diferentes padrões de metilação e expressão em diversas linhagens e células de tipos tumorais, direcionando à ideia de que a metilação exerce um importante papel no controle da expressão desse gene em células telomerase positivas (Guilleret e Benhattar, 2004).

2.4.4 CAV1

O gene *CAV1* foi mapeado em 7q31 e sua proteína pode representar um supressor de tumor nesta frágil região genômica (Engelman et al, 1998). A deleção dessa região tem sido relatada em diversos tipos de câncer, incluindo carcinomas de mama, cólon, rim, próstata, ovário e pescoço (Williams e Lisanti, 2005).

A caveolina-1 (*CAV1*) é uma proteína integral de membrana, essencial na composição de cavéolas, invaginações da membrana plasmática com papel no transporte de moléculas, adesão celular e transdução de sinal (Burgermeister et al, 2008). *CAV1* participa da regulação da atividade de moléculas de sinalização como proteínas G, proteína quinase C, e integrinas ligadas à via Ras, dentre outras, além de promover progressão celular e estar potencialmente envolvida no desenvolvimento de cânceres humanos (Sunaga et al, 2004).

Em um estudo de células em cultura foi observado que o aumento da expressão da caveolina-1 estava associado ao estado senescente celular. Células em cultura saíam do estado de senescência, reiniciavam o ciclo celular e respondiam a fatores de crescimento celular quando introduzido miRNA que reduzia expressão de *CAV1* (Cho et al, 2003).

Em tumores, as funções de *CAV1* são controversas, dependendo do tipo de tecido e até do estágio do câncer (Bouras et al, 2004). *CAV1* é apontada como supressor tumoral em câncer de mama e próstata. Entretanto, a expressão aumentada está associada com aumento do potencial invasivo e metastático de células tumorais

de pulmão e rim (Joo et al, 2004). Além disso, sua expressão em câncer oral é diferencial em estágios tumorais (Hung et al, 2003).

Modificações na adesão celular são responsáveis pela progressão do tumor e a perda das moléculas relacionadas à adesão permite a transição de tumores benignos a metastáticos (Hirohashi e Kanai, 2003). Foi verificado que, durante a progressão de tumores gástricos humanos, CAV1 juntamente com a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM) contribuem para adesão metastática de células tumorais (Shin et al, 2006) e progressiva diminuição da expressão dessa proteína em células epiteliais gástricas está relacionada à carcinogênese gástrica (Gao et al, 2005). CAV1 modula adesão célula-célula pela translocação de membrana de moléculas de adesão e aumento da expressão de E-caderina (Miotti et al, 2005).

Foi observada expressão reduzida de CAV1 em câncer de mama, cólon, pulmão e estômago. Além disso, CAV1 mostrou-se um forte candidato de supressor tumoral, em câncer de ovário. Em tumor de rim e próstata, verificou-se aumento dos níveis de RNAm de CAV1, sugerindo uma função diferente nesses tecidos. Portanto, dependendo do contexto celular, CAV1 pode ter funções opostas, que resultam em inibição ou promoção do crescimento (Wiechen et al, 2001). Esse gene pode ter função dupla de gene supressor de tumor e oncogene (Williams e Lisanti, 2005). Dessa forma, proteína CAV1 pode ser a chave molecular para sinalização de crescimento e desenvolvimento de câncer.

Foram descritas ilhas CpG importantes nos éxons 1 e 2 de CAV1 (Engelman et al, 1999), e isso pode configurar um dos mecanismos de controle da expressão desse gene. A hipermetilação de seu promotor já foi relatada em linhagens de câncer de mama, relacionada com diminuição de sua expressão (Engelman et al, 1999; Chen et al, 2004). Também foi observada hipermetilação anormal em câncer de próstata quando comparado ao epitélio normal adjacente (Cui 2001) e em câncer colorretal esporádico (Lin et al, 2004). Além disso, alterações no padrão de metilação também foram relatadas, e apontadas como potencial biomarcador, sugerindo que CAV1 possa atuar como supressor tumoral em alguns tipos de câncer em carcinoma hepatocelular (Hirasawa et al, 2006).

2.4.5 IGFBP-3

Fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF) modulam diversas atividades biológicas, incluindo ações mitógenas e estimulação de funções de células diferenciadas. A interação entre IGF I e II e seus receptores é modulada por uma família de seis proteínas de ligação a IGF (IGFBP) que não compartilham relação estrutural com os receptores de IGF. Dentre essas, IGFBP-3 é a principal proteína de ligação no soro e circula predominantemente associada a um complexo de 150kD de IGFBP-3, a IGF-I ou -II e a uma subunidade ácido lábil, uma glicoproteína (Perks e Holly, 2008).

Esse complexo mantém uma reserva de IGF circulante, transportando e prolongando sua meia vida (Perks e Holly, 2008). Porém, em nível celular, há uma ambiguidade no papel de IGFBP-3 na regulação das ações de IGF, com estudos que mostram aumento ou inibição dos efeitos mitogênicos desses fatores. Uma explicação para isso pode ser a proteólise de IGFBP-3, que sob certas circunstâncias, pode liberar IGF de sua ação inibitória, aumentando assim sua biodisponibilidade (Butt e Williams, 2001).

A maior parte de IGF circulantes é produzida nos hepatócitos em resposta ao estímulo do hormônio do crescimento. O receptor de IGF tipo 1 (IGF-R1) estimula mitose em diferentes tipos celulares, protege a celular contra apoptose e desenvolve um papel na transformação celular por outros agentes. IGFBP-3 inibe ação de IGF por se ligar a esses fatores ao evitar sua ligação por competir com IGF-R1. Por sequestrar IGF de IGF-1R, IGFBP-3 atua como agente pró-apoptótico por inibir o sinal de sobrevivência celular de IGF (Grimberg, 2000).

O nível circulante de IGFBP-3 foi relatado em associação inversa com o risco de desenvolvimento de tumores, enquanto que IGF-I encontrou-se diretamente associado ao aumento do risco de desenvolvimento de cânceres de mama, próstata, pulmão e colorretal (Zhang et al, 2004). Portanto, um aumento de IGF circulante pode contribuir para a carcinogênese. Além disso, IGFBP-3 pode exercer efeito independente de IGF e participar na via apoptótica direcionada por p53, WT1, citocinas e ácidos retinóico, além de sofrer controle transcricional por p53 (Grimberg,

2000). Também foi verificado que IGFBP-3 prolonga o aumento da resposta da proteína p53 ao dano ao DNA em células esofágicas (Hollowood et al, 2000). Além disso, o aumento da expressão de *IGFBP-3* é regulado pela proteína supressora tumoral PTEN, que parece agir via p53 (Yi et al, 2005).

O gene *IGFBP-3* localiza-se em 7p13 (Yamashita et al, 2006) e sua regulação transcricional pode ser mediada por alterações na atividade ou nas propriedades dos fatores de transcrição ou por modificações epigenéticas, como metilação ou acetilação (Shon et al, 2009). Já foi relatada a hipermetilação do promotor de *IGFBP3* em tumores hepáticos, renal, ovariano, colorretal, gástrico e de mama. Além disso, foi observado que o silenciamento epigenético promovido pela metilação de DNA com consequente supressão da expressão gênica é reversível após tratamento por inibidores de metiltransferases, como 5-aza-2-deoxicitosina (5-aza-dC) (Fridman et al, 2007).

Já a expressão de IGFBP-3 pode ser induzida por agentes de inibidores do crescimento, como ácido retinóico, TNF- α (fator de necrose tumoral), antiestrógenos e supressor tumoral p53. IGFBP-3 pode mediar indução da apoptose por ação de p53 em diversos tipos celulares. Pode também aumentar apoptose dependente de p53 após o dano ao DNA, porém não possui efeito nas células não danificadas. Portanto, IGFBP-3 parece ser protetor contra carcinogênese via p53 (Zhang et al, 2004).

Em 2002, foi sugerido que *IGFBP-3* possuía um papel supressor tumoral em carcinoma hepatocelular, pois foi observada uma correlação entre hipermetilação do promotor de *IGFBP-3* e silenciamento de sua proteína (Hanafusa et al, 2002). Mais tarde, esse mesmo grupo mostrou que o mecanismo pelo qual a supressão da expressão da proteína ocorria era a hipermetilação de quatro sequências seletivas de p53 (de um total de onze) no promotor de *IGFBP-3* (Hanafusa et al, 2005). Um estudo mais recente neste mesmo tipo tumoral confirmou que a metilação da ilha CpG do promotor de *IGFBP-3* inibe sua expressão em linhagem de hepatocarcinoma celular e em tecido tumoral. Além disso, a expressão de *IGFBP-3* também é controlada por acetilação/desacetilação via histona desacetilase 1 recrutado pela proteína X do vírus da hepatite B, que reprime sua transcrição gênica (Shon et al, 2009).

A metilação de *IGFBP-3* foi correlacionada com maior risco de recorrência tumoral, além de ser comum em todos os estágios de carcinoma de bexiga, indicando um comportamento biológico mais agressivo para este padrão (Christoph et al, 2007). Em câncer ovariano, também foi observada essa correlação entre metilação e pior taxa de sobrevida e progressão da doença (Wiley et al, 2006).

Em câncer colorretal, a metilação do promotor desse gene também desempenha papel na tumorigênese. Uma correlação inversa entre metilação e instabilidade de microssatélite e fenótipo metilador de ilha CpG foi observada, indicando uma interrelação complexa entre fenômenos genéticos e epigenéticos e eventos únicos, como metilação do DNA de *IGFBP-3* e alterações em p53 (Kawasaki et al, 2007).

Por outro lado, Tomii et al (2007) sugerem que o papel de *IGFBP-3* varia durante a carcinogênese em diferentes órgãos e que uma comparação interracial do padrão de metilação de *IGFBP-3* deve ser analisado. Esse grupo observou frequente metilação do promotor de *IGFBP-3* em pacientes japoneses com câncer gástrico, câncer colorretal e mesotelioma maligno, o que não foi observado em pacientes americanos (Tomii et al, 2007).

Na carcinogênese gástrica, o papel de *IGFBP-3* também tem sido observado. No aspecto genético, foi relatado um polimorfismo de região promotora, localizado em -202, que atua nos níveis circulantes de *IGFBP-3* em indivíduos saudáveis, podendo afetar a produção local desta proteína. Em linhagens de câncer gástrico, foi descrita relação entre o genótipo homocigoto para o alelo polimórfico e pouco ou nenhum nível *IGFBP-3* sérico, apresentando, portanto, influência na atividade do promotor e, conseqüentemente, na expressão deste gene (Zhang et al, 2004). Outro grupo verificou a associação entre o alelo polimórfico maior risco de câncer gástrico, quando comparado ao alelo selvagem, pois a troca de bases na posição -202 acarreta em diminuição da atividade do promotor de *IGFBP-3* (Chen et al, 2008). Em pacientes com metaplasia intestinal na região de antro e corpo, observou-se maior frequência de homocigotos do alelo raro, indicando que menores níveis de *IGFBP-3* estão associados a uma proliferação celular aumentada e apoptose inalterada (Scotiniotis et al, 2000).

Além do aspecto genético, modificações no padrão epigenético do promotor de *IGFBP-3* têm sido relatadas em câncer gástrico. A metilação de ilhas CpG em pacientes com metaplasia intestinal no antro foi mais frequentemente observada quando comparada a presença em outros locais (Tomii et al, 2007).

IGFBP-3 também estava metilado em amostras de linhagem celular de câncer gástrico e em amostras tumorais de pacientes japoneses. Sugerindo o envolvimento do silenciamento deste gene parece com desenvolvimento e progressão do câncer gástrico. Por outro lado, em mucosa gástrica normal, a proteína IGFBP-3 estava expressa e desempenhando função de indução de apoptose (Yamashita et al, 2006). Sendo assim, IGFBP-3 parece possuir um papel protetor contra carcinogênese por inibir crescimento celular e induzir apoptose em no tecido gástrico e em linhagens celulares, evitando o desenvolvimento de doenças pré-malignas neste órgão.

Além disso, o adenocarcinoma gástrico intestinal possui maior porcentagem de marcação de IGFBP-3 por imunistoquímica, quando comparado ao tipo difuso, indicando que IGFBP-3 também pode contribuir para um melhor prognóstico de pacientes com câncer gástrico (Zhang et al, 2004).

Em células senescentes, a expressão dos genes das seis IGFBP tem sua expressão aumentada (Fridman et al, 2007). *IGFBP-3* em particular possui expressão elevada em células senescentes, e diminuída em células imortalizadas (Schwarze et al, 2002). Em linhagens imortalizadas por mutação de p53, também foi observada a diminuição da expressão de mRNA de *IGFBP-3*. Esse mesmo estudo relatou que, após tratamento com o agente desmetilante 5-aza-dC, havia um aumento da expressão, indicando regulação epigenética neste processo de senescência (Fridman et al, 2007).

2.4.6 CDH1

As caderinas constituem uma família de proteínas de adesão celular homofílicas expressas em uma variedade de tecidos. A porção extracelular dessas proteínas consiste em cinco domínios repetidos em tandem que requerem ligação de Ca^{2+} para sua adesividade, rigidez e estabilidade (Nagar et al, 1996).

A E-caderina é o principal membro dessa família de proteínas expressas em tecido epitelial e localizada nas junções aderentes (região de contato célula-célula). As moléculas de E-caderina de uma mesma célula formam dímeros paralelos na superfície celular (Yamamoto et al, 2011). A caderina liga-se às proteínas citosólicas α -catenina, β -catenina e γ -catenina, que se ligam a actinas para formar o citoesqueleto (Takeichi, 1993). A baixa expressão do complexo E-caderina-catenina tem sido encontrada em vários tipos de câncer, como no câncer gástrico, hepatocelular, de esôfago, de mama, e é correlacionada com capacidade infiltrativa e metastática (Takeichi, 1993).

No processo de carcinogênese, a E-caderina age diretamente na supressão da invasão tumoral. Células tumorais epiteliais transfectadas com cDNA de E-caderina têm perda da capacidade infiltrativa e da formação de metástase (Takeichi, 1993). Portanto, a perda da adesão célula-célula mediada por CDH1 é um pré-requisito para a invasão de células tumorais e para a formação de metástases (Birchmeier e Behrens, 1994).

A expressão reduzida de E-caderina tem sido relatada em vários tipos de câncer. Na literatura, a diminuição da expressão dessa proteína varia entre 17% e 92% em câncer gástrico, e é mais frequente no tipo difuso do que no tipo intestinal. Além disso, uma correlação direta entre o nível de expressão de E-caderina e o grau de diferenciação tumoral tem sido observada (Liu et al, 2006).

O gene da E-caderina (*CDH1*) está localizado no cromossomo 16q22.1 e contém uma sequência codificante de 2.6 kb com 16 éxons. Esse gene pode ser inativado por mecanismos tanto genéticos quanto epigenéticos durante o desenvolvimento e a progressão tumoral (Yamamoto et al, 2011).

A hipermetilação de *CDH1* ocorre em 40-80% dos carcinomas gástricos primários em humanos, especialmente no tipo difuso (Graziano et al, 2004; Yamamoto et al, 2011). A hipermetilação é considerada um segundo evento comum associado à inibição de E-caderina (Machado et al, 2001). Vários estudos têm associado ausência de E-caderina em tumores ao fenótipo mais agressivo e pior prognóstico nessa neoplasia (Yonemura et al, 2000). Diferenças na frequência de hipermetilação *CDH1* entre os tipos intestinal e difuso de carcinomas gástricos têm sido

relatadas (Oue et al, 2003). O silenciamento de *CDH1* devido à hipermetilação pode representar um grupo interessante para testar novos agentes desmetilantes.

Referências Bibliográficas

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998;58:5489-94.

Aihara T, Miyoshi Y, Koyama K, Suzuki M, Takahashi E, Monden M, et al. Cloning and mapping of SMARCA5 encoding hSNF2H, a novel human homologue of Drosophila ISWI. *Cytogenet Cell Genet* 1998;81:191-3.

Allison SJ, Milner J. SIRT3 is pro-apoptotic and participates in distinct basal apoptotic pathways. *Cell Cycle* 2007;6:2669-77.

Anisimov VN. Carcinogenesis and aging 20 years after: escaping horizon. *Mech Ageing Dev* 2009;130:105-21.

Araujo LM, Cendoroglo MS, Giguek CO, Chen ES, Smith Mde A. Association of lipase lipoprotein polymorphisms with high-density lipoprotein and triglycerides in elderly men. *Genet Mol Res* 2010;9:86-96.

Ashraf N, Zino S, Macintyre A, Kingsmore D, Payne AP, George WD, et al. Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 2006;95:1056-61.

Barbieri M, Bonafe M, Franceschi C, Paolisso G. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E1064-71.

Barclay JY, Morris AG, Nwokolo CU. HTERT mRNA partially regulates telomerase activity in gastric adenocarcinoma and adjacent normal gastric mucosa. *Dig Dis Sci* 2005;50:1299-303.

Bechter OE, Eisterer W, Dlaska M, Kuhr T, Thaler J. CpG island methylation of the hTERT promoter is associated with lower telomerase activity in B-cell lymphocytic leukemia. *Exp Hematol* 2002;30:26-33.

Bellizzi D, Dato S, Cavalcante P, Covello G, Di Cianni F, Passarino G, et al. Characterization of a bidirectional promoter shared between two human genes related to aging: SIRT3 and PSMD13. *Genomics* 2007;89:143-50.

Bellizzi D, Rose G, Cavalcante P, Covello G, Dato S, De Rango F, et al. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics* 2005;85:258-63.

Berdyshev GD, Korotaev GK, Boiarskikh GV, Vaniushin BF. [Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of humpback and its changes during spawning]. *Biokhimiia* 1967;32:988-93.

Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1994;1198:11-26.

Bouras T, Lisanti MP, Pestell RG. Caveolin-1 in breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2004;3:931-41.

Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* 2005;19:1751-9.

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004;303:2011-5.

Burgermeister E, Liscovitch M, Rocken C, Schmid RM, Ebert MP. Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett* 2008;268:187-201.

Burtner CR, Kennedy BK. Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:567-78.

Butt AJ, Williams AC. IGFBP-3 and apoptosis--a license to kill? *Apoptosis* 2001;6:199-205.

Calcagno DQ, Leal MF, Assumpcao PP, Smith MA, Burbano RR. MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2008;14:5962-8.

Calvanese V, Lara E, Kahn A, Fraga MF. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2009;8:268-76.

Casillas MA, Jr., Lopatina N, Andrews LG, Tollefsbol TO. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2003;252:33-43.

Chen ES, Furuya TK, Mazzotti DR, Ota VK, Cendoroglo MS, Ramos LR, et al. APOA1/A5 variants and haplotypes as a risk factor for obesity and better lipid profiles in a Brazilian Elderly Cohort. *Lipids* 2010;45:511-7.

Chen ES, Mazzotti DR, Furuya TK, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araujo LQ, et al. Apolipoprotein A1 gene polymorphisms as risk factors for hypertension and obesity. *Clin Exp Med* 2009;9:319-25.

Chen ES, Mazzotti DR, Furuya TK, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araujo LQ, et al. Association of PPARalpha gene polymorphisms and lipid serum levels in a Brazilian elderly population. *Exp Mol Pathol* 2010;88:197-201.

Chen F, Hu L, Li Y, Wang L. Expression of telomerase subunits in gastric cancer. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005;25:741-3.

Chen ST, Lin SY, Yeh KT, Kuo SJ, Chan WL, Chu YP, et al. Mutational, epigenetic and expressional analyses of caveolin-1 gene in breast cancers. *Int J Mol Med* 2004;14:577-82.

Chen W, Wang L, Ke Q, Jin G, Tan Y, Zhou Y, et al. The role of IGFBP3 functional polymorphisms in the risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. *Eur J Cancer Prev* 2008;17:82-7.

Cho KA, Ryu SJ, Park JS, Jang IS, Ahn JS, Kim KT, et al. Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *J Biol Chem* 2003;278:27789-95.

Choi JH, Park SH, Park J, Park BG, Cha SJ, Kong KH, et al. Site-specific methylation of CpG nucleotides in the hTERT promoter region can control the expression of hTERT during malignant progression of colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:615-20.

Christoph F, Kempkensteffen C, Weikert S, Krause H, Schostak M, Miller K, et al. Frequent epigenetic inactivation of p53 target genes in seminomatous and nonseminomatous germ cell tumors. *Cancer Lett* 2007;247:137-42.

Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004;305:390-2.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992;52:6735-40.

Correia M, Machado JC, Ristimaki A. Basic aspects of gastric cancer. *Helicobacter* 2009;14 Suppl 1:36-40.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins: Patologia estrutural e funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.; 2000.

Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12:354-62.

Dai JM, Wang ZY, Sun DC, Lin RX, Wang SQ. SIRT1 interacts with p73 and suppresses p73-dependent transcriptional activity. *J Cell Physiol* 2007;210:161-6.

de Magalhaes JP, Faragher RG. Cell divisions and mammalian aging: integrative biology insights from genes that regulate longevity. *Bioessays* 2008;30:567-78.

DeAngelis JT, Farrington WJ, Tollefsbol TO. An overview of epigenetic assays. *Mol Biotechnol* 2008;38:179-83.

Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beijersbergen RL, Weinberg RA. Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res* 2000;60:537-41.

Devereux TR, Horikawa I, Anna CH, Annab LA, Afshari CA, Barrett JC. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res* 1999;59:6087-90.

Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Ann Surg* 2005;241:27-39.

Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett* 1998;436:403-10.

Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett* 1999;448:221-30.

Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002;21:5427-40.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007;8:286-98.

Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 2007;16 Spec No 1:R50-9.

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148-59.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006;7:21-33.

Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Campbell J, et al. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS ONE* 2008;3:e2020.

Flachsbar F, Croucher PJ, Nikolaus S, Hampe J, Cordes C, Schreiber S, et al. Sirtuin 1 (SIRT1) sequence variation is not associated with exceptional human longevity. *Exp Gerontol* 2006;41:98-102.

Fraga MF. Genetic and epigenetic regulation of aging. *Curr Opin Immunol* 2009;21:446-53.

Fraga MF, Agrelo R, Esteller M. Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:60-74.

Fridman AL, Rosati R, Li Q, Tainsky MA. Epigenetic and functional analysis of IGFBP3 and IGFBP1 in cellular immortalization. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357:785-91.

Fuccio L, Eusebi LH, Bazzoli F. Gastric cancer, *Helicobacter pylori* infection and other risk factors. *World J Gastrointest Oncol* 2010;2:342-7.

Gao X, Sun Y, Huang L, Chen XY, Zhang KL, Kong QY, et al. [Down-regulation of caveolin-1 in gastric carcinoma and its clinical biological significance]. *Ai Zheng* 2005;24:311-6.

Gigek CO, Chen ES, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araujo LM, Payao SL, et al. Association of lipase lipoprotein polymorphisms with myocardial infarction and lipid levels. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:599-604.

Golbus J, Palella TD, Richardson BC. Quantitative changes in T cell DNA methylation occur during differentiation and ageing. *Eur J Immunol* 1990;20:1869-72.

Gonzalez CA, Riboli E. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer* 2010;46:2555-62.

Gonzalo S. Epigenetic alterations in aging. *J Appl Physiol* 2010;109:586-97.

Graziano F, Arduini F, Ruzzo A, Mandolesi A, Bearzi I, Silva R, et al. Combined analysis of E-cadherin gene (CDH1) promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in patients with gastric cancer: implications for treatment with demethylating drugs. *Ann Oncol* 2004;15:489-92.

Grimberg A. P53 and IGFBP-3: apoptosis and cancer protection. *Mol Genet Metab* 2000;70:85-98.

Guilleret I, Benhattar J. Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:1037-43.

Guilleret I, Yan P, Grange F, Braunschweig R, Bosman FT, Benhattar J. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int J Cancer* 2002;101:335-41.

Hakimi MA, Bochar DA, Schmiesing JA, Dong Y, Barak OG, Speicher DW, et al. A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature* 2002;418:994-8.

Hamilton JP, Meltzer SJ. A review of the genomics of gastric cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:416-25.

Hanafusa T, Shinji T, Shiraha H, Nouso K, Iwasaki Y, Yumoto E, et al. Functional promoter upstream p53 regulatory sequence of IGFBP3 that is silenced by tumor specific methylation. *BMC Cancer* 2005;5:9.

Hanafusa T, Yumoto Y, Nouso K, Nakatsukasa H, Onishi T, Fujikawa T, et al. Reduced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and its promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2002;176:149-58.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298-300.

Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:10-21.

Hayflick L. The cell biology of human aging. *N Engl J Med* 1976;295:1302-8.

Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:1-13.

Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.

Hirasawa Y, Arai M, Imazeki F, Tada M, Mikata R, Fukai K, et al. Methylation status of genes upregulated by demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2006;71:77-85.

Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003;94:575-81.

Hirohata T, Kono S. Diet/nutrition and stomach cancer in Japan. *Int J Cancer* 1997;Suppl 10:34-6.

Hollowood AD, Lai T, Perks CM, Newcomb PV, Alderson D, Holly JM. IGFBP-3 prolongs the p53 response and enhances apoptosis following UV irradiation. *Int J Cancer* 2000;88:336-41.

Hu LH, Chen FH, Li YR, Wang L. Real-time determination of human telomerase reverse transcriptase mRNA in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:3514-7.

Hung KF, Lin SC, Liu CJ, Chang CS, Chang KW, Kao SY. The biphasic differential expression of the cellular membrane protein, caveolin-1, in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 2003;32:461-7.

IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994;61:1-241.

IBGE. (2010). "Censo 2010." Retrieved 01/02/2011, 2011, from <http://www.ibge.gov.br/censo2010/>.

Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett* 2009;583:1713-20.

Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 2000;403:795-800.

INCA (2010). *Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro.

Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, Oshimura M. The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. *Cell Cycle* 2007;6:1011-8.

Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;249:101-18.

Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 1994;7:536-40.

Jacobs KM, Pennington JD, Bisht KS, Aykin-Burns N, Kim HS, Mishra M, et al. SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression. *Int J Biol Sci* 2008;4:291-9.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011.

Johnson SM, Evers BM. Translational research in gastric malignancy. *Surg Oncol Clin N Am* 2008;17:323-40, viii.

Joo HJ, Oh DK, Kim YS, Lee KB, Kim SJ. Increased expression of caveolin-1 and microvessel density correlates with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int* 2004;93:291-6.

Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH, Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2003;163:1551-6.

Kawasaki T, Nosho K, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Fuchs CS, et al. IGFBP3 promoter methylation in colorectal cancer: relationship with microsatellite instability, CpG island methylator phenotype, and p53. *Neoplasia* 2007;9:1091-8.

Khushalani N. Cancer of the esophagus and stomach. *Mayo Clin Proc* 2008;83:712-22.

Kuningas M, Putters M, Westendorp RG, Slagboom PE, van Heemst D. SIRT1 gene, age-related diseases, and mortality: the Leiden 85-plus study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007;62:960-5.

Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci* 2008;99:1528-38.

Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt at a Histo-Clinical Classification. Acta Pathol Microbiol Scand 1965;64:31-49.

Li W, Li L, Liu Z, Liu C, Liu Z, Straat K, et al. Expression of the full-length telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcript in both malignant and normal gastric tissues. Cancer Lett 2008;260:28-36.

Lin SY, Yeh KT, Chen WT, Chen HC, Chen ST, Chang JG. Promoter CpG methylation of caveolin-1 in sporadic colorectal cancer. Anticancer Res 2004;24:1645-50.

Liu L, Saldanha SN, Pate MS, Andrews LG, Tollefsbol TO. Epigenetic regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity during cellular differentiation. Genes Chromosomes Cancer 2004;41:26-37.

Liu YC, Shen CY, Wu HS, Hsieh TY, Chan DC, Chen CJ, et al. Mechanisms inactivating the gene for E-cadherin in sporadic gastric carcinomas. World J Gastroenterol 2006;12:2168-73.

Lopatina NG, Poole JC, Saldanha SN, Hansen NJ, Key JS, Pita MA, et al. Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun 2003;306:650-9.

Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, et al. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. Oncogene 2001;20:1525-8.

Mazzotti DR, Singulane CC, Ota VK, Rodrigues TP, Furuya TK, de Souza FJ, et al. PPARalpha polymorphisms as risk factors for dyslipidemia in a Brazilian population. Mol Genet Metab 2011;102:189-93.

McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. Clin Cancer Res 2009;15:3927-37.

McStay B, Grummt I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008;24:131-57.

Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 2005;16:4623-35.

Milne AN, Carneiro F, O'Morain C, Offerhaus GJ. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. *Hum Genet* 2009;126:615-28.

Miotti S, Tomassetti A, Facetti I, Sanna E, Berno V, Canevari S. Simultaneous expression of caveolin-1 and E-cadherin in ovarian carcinoma cells stabilizes adherens junctions through inhibition of src-related kinases. *Am J Pathol* 2005;167:1411-27.

Morimoto RI, Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: taking care of proteins from the cradle to the grave. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009;64:167-70.

Moulin AP, Clement G, Bosman FT, Zografos L, Benhattar J. Methylation of CpG island promoters in uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 2008;92:281-5.

Moutinho V, Marinho E. Epidemiological features of the gastric cancer in Belem (Brazil). *ABCD: Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva* 1988;3:69-74.

Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 1996;380:360-4.

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998;393:386-9.

North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 2003;11:437-44.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson, genética na medicina. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Oakes CC, Smiraglia DJ, Plass C, Trasler JM, Robaire B. Aging results in hypermethylation of ribosomal DNA in sperm and liver of male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1775-80.

Oikonomou P, Messinis I, Tsezou A. DNA methylation is not likely to be responsible for hTERT expression in premalignant cervical lesions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:881-6.

Oshima J, Yu CE, Piusan C, Klein G, Jabkowski J, Balci S, et al. Homozygous and compound heterozygous mutations at the Werner syndrome locus. *Hum Mol Genet* 1996;5:1909-13.

Oue N, Oshimo Y, Nakayama H, Ito R, Yoshida K, Matsusaki K, et al. DNA methylation of multiple genes in gastric carcinoma: association with histological type and CpG island methylator phenotype. *Cancer Sci* 2003;94:901-5.

Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, Kufareva I, Strathearn KE, Amore AM, et al. Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science* 2007;317:516-9.

Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. *Cancer Lett* 2008;266:99-115.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. *Cancer Incidence in Five Continents*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2002.

Perks CM, Holly JM. IGF binding proteins (IGFBPs) and regulation of breast cancer biology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008;13:455-69.

Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 2001;269:1-12.

Rattan SI. The science of healthy aging: genes, milieu, and chance. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1114:1-10.

Resende C, Ristimaki A, Machado JC. Genetic and epigenetic alteration in gastric carcinogenesis. *Helicobacter* 2010;15 Suppl 1:34-9.

Richardson B. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev* 2003;2:245-61.

Romanov GA, Vaniushin BF. [Intragenomic specificity of DNA methylation in animals. Qualitative differences in tissues and changes in methylation of repeating sequences during aging, carcinogenesis and hormonal induction]. *Mol Biol (Mosk)* 1980;14:357-68.

Rose G, Dato S, Altomare K, Bellizzi D, Garasto S, Greco V, et al. Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly. *Exp Gerontol* 2003;38:1065-70.

Saif MW, Makrilia N, Zalonis A, Merikas M, Syrigos K. Gastric cancer in the elderly: an overview. *Eur J Surg Oncol* 2010;36:709-17.

Santos-Rosa H, Schneider R, Bernstein BE, Karabetsou N, Morillon A, Weise C, et al. Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol Cell* 2003;12:1325-32.

Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. The Biochemistry of Sirtuins. *Annu Rev Biochem* 2006.

Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* 2006;75:435-65.

Schlemper RJ, Kato Y, Stolte M. Review of histological classifications of gastrointestinal epithelial neoplasia: differences in diagnosis of early carcinomas between Japanese and Western pathologists. *J Gastroenterol* 2001;36:445-56.

Schlicker C, Gertz M, Papatheodorou P, Kachholz B, Becker CF, Steegborn C. Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol* 2008;382:790-801.

Schwarze SR, DePrimo SE, Grabert LM, Fu VX, Brooks JD, Jarrard DF. Novel pathways associated with bypassing cellular senescence in human prostate epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:14877-83.

Schwer B, North BJ, Frye RA, Ott M, Verdin E. The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol* 2002;158:647-57.

Scotiniotis IA, Rokkas T, Furth EE, Rigas B, Shiff SJ. Altered gastric epithelial cell kinetics in *Helicobacter pylori*-associated intestinal metaplasia: implications for gastric carcinogenesis. *Int J Cancer* 2000;85:192-200.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:27-36.

Shay JW, Wright WE. Hallmarks of telomeres in ageing research. *J Pathol* 2007;211:114-23.

Shen L, Ahuja N, Shen Y, Habib NA, Toyota M, Rashid A, et al. DNA methylation and environmental exposures in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:755-61.

Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 2005;280:13560-7.

Shi Y, Zhou Y. The role of surgery in the treatment of gastric cancer. *J Surg Oncol* 2010;101:687-92.

Shin J, Kim J, Ryu B, Chi SG, Park H. Caveolin-1 is associated with VCAM-1 dependent adhesion of gastric cancer cells to endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 2006;17:211-20.

Shon JK, Shon BH, Park IY, Lee SU, Fa L, Chang KY, et al. Hepatitis B virus-X protein recruits histone deacetylase 1 to repress insulin-like growth factor binding protein 3 transcription. *Virus Res* 2009;139:14-21.

Sibille E, Su J, Leman S, Le Guisquet AM, Iburguen-Vargas Y, Joeyen-Waldorf J, et al. Lack of serotonin1B receptor expression leads to age-related motor dysfunction, early onset of brain molecular aging and reduced longevity. *Mol Psychiatry* 2007;12:1042-56, 975.

Singh KK. Mitochondria damage checkpoint, aging, and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:182-90.

Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12:2979-90.

Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:531-57.

Stopka T, Zakova D, Fuchs O, Kubrova O, Blafkova J, Jelinek J, et al. Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia. *Leukemia* 2000;14:1247-52.

Stunkel W, Peh BK, Tan YC, Nayagam VM, Wang X, Salto-Tellez M, et al. Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnol J* 2007;2:1360-8.

Sugano K. Gastric cancer: pathogenesis, screening, and treatment. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2008;18:513-22, ix.

Sunaga N, Miyajima K, Suzuki M, Sato M, White MA, Ramirez RD, et al. Different roles for caveolin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer. *Cancer Res* 2004;64:4277-85.

Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin* 2010;60:376-92.

Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:806-11.

Tollefsbol TO, Andrews LG. Mechanisms for telomerase gene control in aging cells and tumorigenesis. *Med Hypotheses* 2001;56:630-7.

Tomii K, Tsukuda K, Toyooka S, Dote H, Hanafusa T, Asano H, et al. Aberrant promoter methylation of insulin-like growth factor binding protein-3 gene in human cancers. *Int J Cancer* 2007;120:566-73.

UICC. (2009). " Union for International Cancer Control." Retrieved Maio, 2010, from <http://www.uicc.org/>.

Vanyushin BF, Nemirovsky LE, Klimenko VV, Vasiliev VK, Belozersky AN. The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents. *Gerontologia* 1973;19:138-52.

Vanyushin BF, Tkacheva SG, Belozersky AN. Rare bases in animal DNA. *Nature* 1970;225:948-9.

Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:651-74.

Vertino PM, Yen RW, Gao J, Baylin SB. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. *Mol Cell Biol* 1996;16:4555-65.

Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1942;1:18–20.

Westphal CH, Dipp MA, Guarente L. A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? *Trends Biochem Sci* 2007;32:555-60.

Widschwendter A, Muller HM, Hubalek MM, Wiedemair A, Fiegl H, Goebel G, et al. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase in ovarian and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2004;93:407-16.

Wiechen K, Diatchenko L, Agoulnik A, Scharff KM, Schober H, Arlt K, et al. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2001;159:1635-43.

Wiley A, Katsaros D, Fracchioli S, Yu H. Methylation of the insulin-like growth factor binding protein-3 gene and prognosis of epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:210-8.

Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C494-506.

Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem* 1987;262:9948-51.

Yamamoto E, Suzuki H, Takamaru H, Yamamoto H, Toyota M, Shinomura Y. Role of DNA Methylation in the Development of Diffuse-Type Gastric Cancer. *Digestion* 2011;83:241-49.

Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M, Ushijima T. Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci* 2006;97:64-71.

Yamashita S, Wakazono K, Sugimura T, Ushijima T. Profiling and selection of genes differentially expressed in the pylorus of rat strains with different proliferative responses and stomach cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2002;23:923-8.

Yi HK, Kim SY, Hwang PH, Kim CY, Yang DH, Oh Y, et al. Impact of PTEN on the expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in human gastric adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:760-7.

Yonemura Y, Endou Y, Kimura K, Fushida S, Bandou E, Taniguchi K, et al. Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:4234-42.

Zhang ZW, Newcomb PV, Moorghen M, Gupta J, Feakins R, Savage P, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3: relationship to the development of gastric pre-malignancy and gastric adenocarcinoma (United Kingdom). *Cancer Causes Control* 2004;15:211-8.

Zinn RL, Pruitt K, Eguchi S, Baylin SB, Herman JG. hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer Res* 2007;67:194-201.

Zschoernig B, Mahlknecht U. SIRTUIN 1: regulating the regulator. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;376:251-5.

4. ARTIGOS

4.1 Artigos publicados

4.1.1 *hTERT* methylation and expression in gastric cancer

4.1.2 *Insulin-like growth factor binding protein-3* gene methylation and protein expression in gastric adenocarcinoma

4.1.3 *SMARCA5* methylation and expression in gastric cancer

4.2 Artigos submetidos

4.2.1 Epigenetic pattern, mRNA and protein expression of E-cadherin and Caveolin-1 in gastric adenocarcinoma

Submetido como *Original Research* à revista “Cancer Causes and Control” em 08/03/11.

Epigenetic pattern, mRNA and protein expression of E-cadherin and Caveolin-1 in gastric adenocarcinoma

Short Title: CDH1 and CAV1 methylation, mRNA and protein expression

Carolina Oliveira Gigek¹; Mariana Ferreira Leal¹; Patricia Natalia Oliveira Silva¹; Luara Carolina Frias Lisboa¹; Eleonidas Moura Lima²; Danielle Queiroz Calcagno³; Bárbara do Nascimento Borges³; Paulo Pimentel Assumpção⁴; Rommel Rodriguez Burbano³; Marilia de Arruda Cardoso Smith¹

¹Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP;

²Laboratório de Genética Humana e Oncogenética, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal do Piauí, João Pessoa, PB;

³Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA;

⁴Serviço de Cirurgia, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

ABSTRACT

Plasma membrane proteins are potential drug targets and diagnostic markers. E-cadherin contributes to cell-cell adhesion and Caveolin-1 is an integral membrane protein. Their respective genes have potential sites for epigenetic regulation by DNA methylation. Epigenetic modifications have a central role in several types of cancer, including gastric adenocarcinoma. Immunostaining, mRNA and DNA methylation were analyzed in neoplastic and

non-neoplastic gastric samples. Lack of E-cadherin was associated with gastric carcinogenesis and with metastasis, whereas Caveolin-1 expression was associated with gastric cancer and with *H. pylori* infection in diffuse type gastric cancer. Higher CAV1 mRNA levels were also correlated with gastric cancer samples. *CDH1* and CAV1 methylation status did not differ between gastric cancer and normal mucosa. Our data showed an inverse relationship between E-cadherin and Caveolin-1 expression. E-cadherin was associated with gastric cancer and with a metastatic phenotype and Caveolin-1 seems to have a role as a pro-tumorigenic factor.

INTRODUCTION

Plasma membrane proteins play a role in cell signalling, adaptation to environment and cell–matrix interactions, and are also involved in the acquisition and maintenance of invasive and metastatic properties of tumour cells. These proteins are potential drug targets and diagnostic markers [1].

E-cadherin is a member of calcium-dependent adherins and contributes to cell-cell adhesion [2]. It has been proposed that loss of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion has a role in tumor cell invasion and metastasis [3]. Moreover, E-cadherin was suggested to modulate intracellular signaling, thus promoting tumor growth [4, 5].

The E-cadherin gene (*CDH1*) is one of the most important tumor suppressor genes in gastric cancer. Genetic alterations such as mutations and chromosomal deletions as well as epigenetic modifications have been reported to be involved in *CDH1* inactivation [6-9]. Loss of E-cadherin expression is more frequently associated to methylation of *CDH1* promoter region [10], which contains a GC-rich region at -40 from start transcription site [11-13].

Therefore, the molecular mechanism of *CDH1* gene silencing may be of great importance in understanding the metastatic process. Lack of *CDH1* expression due to methylation has been reported in some human cancer cells [14, 15].

Caveolin-1 is an integral membrane protein in caveolae, which are invaginations in the plasma membrane. It has been implicated in diverse cellular processes such as cholesterol homeostasis, vesicular transport, cell migration, cell cycle, regulation of cell transformation and signal transduction [16].

Associated functions of Caveolin-1 in tumors are controversial depending upon tissue types and stages of cancer [17]. In fact, it is still unknown whether Cav-1 acts as a tumor suppressor [5, 18] or a tumor promoter, increasing invasive and metastatic potentials [17] in gastric carcinogenesis.

A detailed analysis of *CAV1* has shown that exons 1 e 2 are embedded within CpG islands, being potential sites for epigenetic regulation by DNA methylation [19]. Indeed, promoter methylation of this gene has already been investigated in several tumors, such as prostate [20, 21], breast [22], colorectal [23] and ovarian [24]. Nevertheless, there are no data of *CAV1* promoter methylation in gastric tissue samples.

Gastric cancer is the fourth most common type of neoplasia and the second most prevalent cause of cancer death worldwide [25]. Gastric adenocarcinoma has poor prognosis and high mortality, therefore remaining a health issue. In the state of Pará, northern Brazil, the gastric cancer mortality rates are higher than the national average rate [26]. A better understanding of the biology of this neoplasia progression is crucial for the development of better tests to early neoplasia detection and may help to predict the disease prognosis.

Epigenetic modifications have a central role in several types of cancer, including gastric adenocarcinoma. In tumors, global reduction of DNA methylation (hypomethylation) has been suggested to induce chromosome instabilities and transcriptional activation of oncogenes and prometastatic genes, leading to initiation and propagation of oncogenesis [27]. In contrast, a region- and gene-specific increase of methylation (hypermethylation) of multiple CpG islands has been shown in the carcinogenesis process [28] and is often associated with transcriptional silencing of the associated gene [27].

This study aimed to evaluate E-cadherin and Caveolin-1 protein expression in gastric adenocarcinoma from individuals of North Brazil, and to elucidate the epigenetic mechanism involved in the control of these proteins expression by correlating protein expression with promoter methylation of these genes.

MATERIAL AND METHODS

1. Casuistic

All the gastric samples were obtained surgically from João de Barros Barreto University Hospital (HUUJBB) in Pará State, Brazil. This population is composed of interethnic crosses among three main origin groups: European (mainly represented by Portuguese), Africans and Amerindians [29]. Informed consent with approval of the ethics committee of HUUJBB was obtained. All samples were classified according to Laurén [30] and tumors were staged using standard criteria by TNM staging [31]. All patients had negative histories of exposure to either chemotherapy or radiotherapy before surgery and there was no other co-occurrence of diagnosed cancers.

2. Immunohistochemical staining

E-cadherin protein expression was evaluated in formalin-fixed paraffin embedded tissues of 78 samples of gastric mucosa. Among these samples, 58 were sporadic gastric adenocarcinoma and 20 were non-neoplastic and non-infiltrated gastric mucosa. Caveolin-1 protein expression was analyzed in 75 samples of gastric mucosa formalin-fixed, 57 neoplastic and 18 non-neoplastic gastric tissue.

Antigen retrieval was performed by microwave treatment 20 min at 900 W in a citrate buffer, pH 6.0. After cooling, sections were immersed in 0.3% hydrogen peroxide in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 minutes to block endogenous peroxidase activity. Sections were then incubated in a humid chamber overnight with E-cadherin primary antibody (NCH-38, DAKO, USA) or Caveolin-1 primary antibody (N20 sc894, Santa Cruz Biotechnology, USA). After the PBS rinse, slides were incubated with secondary antibody and then with streptavidin-biotin-peroxidase complex, both for 30 minutes at room temperature with a PBS wash between each step. Slides were visualized with diaminobenzidine-hydrogen peroxide and counterstained with Harry's hematoxylin.

Positive protein expression was defined as clear cellular staining, whereas negative immunostaining was considered when no positive cells were observed or in rare cases (less than 25% weakly stained tumor cells) (Figure 1). Normal gastric mucosa was used as an internal control. Two pathologists evaluated the immunostaining results independently.

3. Methylation specific PCR (MSP)

CDH1 and *CAV1* methylation pattern were evaluated in 158 and 131 samples of gastric tissue, respectively. Genomic DNA (200 ng) of gastric tissue samples underwent bisulfite modification using EpiTect Bisulfite kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions, converting unmethylated cytosines to uracils and leaving methylated cytosines unchanged. MSP was performed on treated DNA as previously described [32]. MSP for *CDH1* was performed as previously described [33]. Specific primers for *CAV1* promoter, were as follows: 5'-GAAAATATTTGTTTTTTTTGGGAT-3' (sense) and 5'-ACAAATAAAAACATTTCTCCCACA-3' (antisense) for the unmethylated reactions; 5'-TTTCGGGACGTTTTTCGGTGGT-3' (sense) and 5'-TAAAACGTTTCTCCCGCGCTA-3' (antisense) for the methylated reactions, with PCR products of 116 bp and 96 bp respectively. Briefly, PCR reaction was carried out in a 25 mL volume with 200 mmol/L of MgCl₂, 100 ng of DNA, 200 pmol/L of primers and 1.25 units of Taq DNA polymerase. After initial denaturation for 5 min at 94°C, 40 cycles of 94°C for 45 s, at 57.8°C for 45 s, and 72°C for 30 s were carried out, followed by a final extension for 5 min at 72°C.

Results were scored when there was a clear and visible band on the electrophoresis gel with the methylated or unmethylated primers. Hypermethylation was considered only in the presence of methylated band (Figure 2).

4. TaqMan quantitative RT-PCR analysis

Complementary DNA was synthesized using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) from RNA of approximately 40 gastric tissue extracted with AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Taqman RT-PCR for *CDH1* (Hs01013953_m1) and *CAV1* (Hs00971716_m1) were performed using and ABI 7500 Fast System. The expression levels were normalized to *ACTB* gene (Hs03023943_g1).

5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the χ^2 test or Fisher's exact test to assess associations between the expression or methylation status and clinicopathological characteristics. χ^2 test was also used to correlate *CDH1* and *CAV1* methylation status with its respective protein expression. Student's

paired t or Wilcoxon tests were used to compare RNAm expression with clinicopathological characteristics. P-values < 0.05 were regarded as statistically significant.

RESULTS

E-cadherin and Caveolin-1 IHC

E-cadherin immunostaining was observed in all cases of normal gastric mucosa and in 36.2% of tumor samples. Lack of E-cadherin was associated with gastric carcinogenesis ($p < 0.0001$) and with metastasis ($p = 0.0035$). Absence of E-cadherin expression was significantly higher in diffuse than in intestinal type gastric cancer (0.9063 vs 0.3077, $p < 0.0001$) (Table 1).

Only one sample of normal gastric mucosa (5.6%) presented Caveolin-1 expression, while 84.2% of neoplastic samples had positive immunostaining. Hence, Caveolin-1 expression was associated with gastric cancer ($p < 0.0001$). Caveolin-1 immunostaining was also more frequently observed in intestinal than in diffuse type gastric cancer (1 vs 0.6786, $p = 0.0008$). In addition, Caveolin-1 expression was associated with H. pylori infection ($p = 0.0196$) in diffuse type gastric cancer (data not shown).

Taken together, an inverse relationship between E-cadherin and Caveolin-1 expression ($p = 0.0259$) was observed in our gastric samples.

CDH1 and CAV1 gene promoter methylation

Methylated *CDH1* promoter was observed in 90.4% and 90.6% of normal mucosa and tumor samples, respectively (Table 2). *CDH1* methylation status did not differ between gastric cancer and normal mucosa, as well as between the diffuse and intestinal type. *CDH1* methylation and protein expression were both evaluated in 56 gastric tumor and in 20 normal gastric mucosa samples. Our findings did not show a correlation between methylation pattern and protein expression, although all samples with E-cadherin expression presented methylated sequences (Table 3).

Presence of *CAV1* promoter methylation was observed in 100% of normal gastric mucosa and 97.7% of gastric cancer samples. Hypermethylated *CAV1* samples were observed in 27.9% and 34.1% of non-neoplastic and neoplastic samples, respectively. *CAV1* methylation frequencies did not differ between non-neoplastic and neoplastic samples (Table 2). *CAV1* methylation

and protein expression were both evaluated in 56 gastric cancer and in 17 normal gastric mucosa samples. We observed an association between hypermethylated *CAV1* promoter and no Caveolin-1 expression in tumor samples ($p=0.0001$) (Table 3). No association between *CDH1* and *CAV1* promoter methylation status was found.

Quantitative RT-PCR analysis of *CDH1* and *CAV1* expression.

We next performed quantitative RT-PCR on complementary DNA from gastric samples. We analyzed 17-paired samples for *CDH1* mRNA and differences of expression were observed (Figure 3A). For *CAV1* mRNA, 37-paired samples were analyzed, and were significantly increased in tumors samples (5.3781 ± 1.6950) than in normal gastric mucosa (4.2630 ± 1.5015) ($p=0.0004$) (Figure 3B). Relative quantification of *CDH1* and *CAV1* mRNA did not show any association with clinicopathological characteristics.

DISCUSSION

In the present study, 63.8% of tumor samples did not present E-cadherin immunoreactivity and absence of this protein was associated with gastric carcinogenesis (Table 1). This association has been widely described in gastric cancer from patients from other populations. Decreased expression of E-cadherin has been observed in this neoplasia ranging from 17-92%, depending on the methodology and the definition used [34]. Moreover, our findings also showed that lack of E-cadherin is more frequent in diffuse than intestinal type cancer, confirming previous studies in sporadic gastric adenocarcinomas [35-37]. Here, we also reported a negative correlation between E-cadherin expression and metastasis, supporting the hypothesis that loss of E-cadherin expression is a prerequisite for tumor cell invasion and metastasis [3, 4].

Loss of E-cadherin mediated cell-cell adhesion may also affect the Wnt-signaling pathway, including the modulation of MYC gene [39, 40], an important oncogene in gastric carcinogenesis [41]. In previous studies, we have observed that all gastric cancer samples of individuals from Northern Brazil, including early gastric cancer, presented positive MYC immunoreactivity [42-44].

We did not observed any differences between quantification of *CDH1* mRNA from neoplastic and non-neoplastic gastric samples. This may

reflect an unknown regulatory mechanism that affects this protein translation. A recent study reports E-cadherin regulation by miRNA in breast cancer [38].

CDH1 promoter methylation has been indicated as the main mechanism of E-cadherin inactivation in gastric cancer. Several studies have reported a strong association between *CDH1* methylation and the decrease/lack of its expression [34, 45, 46] (Table 2). However, we did not observe an association between *CDH1* methylation and protein expression, probably due to the higher frequency of promoter methylation in our sample.

The frequency of *CDH1* promoter methylation was about 90% in both neoplastic and non-neoplastic specimens. Thus, no association between *CDH1* methylation and the carcinogenesis process was found, corroborating data from Zazula et al [47]. In a previous study with a smaller sample size, we had shown that all advanced gastric tumors of individuals from Northern Brazil presented *CDH1* methylated sequences [33].

The stomach presents the highest level of methylated CpG island in non-neoplastic cells, along with age-related methylation that reflects increased CpG island methylation frequency in gastric cancer [48]. Moreover, our research group did not observe the influence of aging in *CDH1* methylation pattern in peripheral lymphocytes [49], suggesting that increased frequency of *CDH1* methylation in the aging process is tissue specific or limited to gastric mucosa. The high frequency of methylation in the stomach might be related to the accessibility of the tissue to exogenous agents, such as dietary factors or heavy metals to which it is directly exposed [50]. Reactive oxygen species – caused, in example, by *H. pylori* – may also play a role in aging-related methylation in the stomach [51, 52].

Here we describe that Caveolin-1 expression in 84.2% of the gastric adenocarcinomas while only 5.6% of normal gastric tissue presented positive staining, suggesting a pro-tumorigenic action in this malignancy (Table 1). Higher mRNA levels are also observed in tumor samples, when compared to normal gastric mucosa (Figure 3). However, the literature data is controversial. Burgermeister et al [53] and Gao et al [54] described only 7% and 17.9%, respectively, of Caveolin-1 expression in gastric cancer. On the other hand, a more recent study relates 94% of Caveolin-1 expression in neoplastic gastric cells [55], thus similar to our study. It was suggested that Caveolin-1 is down-

regulated during gastric epithelial cell transformation, and then regains expression in gastric cancer cells undergoing detachment and invasion [53]. In our samples,

The expression status of Caveolin-1 also indicates a tissue-dependent behavior in carcinogenesis. Down-regulation of Caveolin-1 was previously observed in ovarian adenocarcinoma [24], soft tissue sarcoma [56] and thyroid cancer [57]. By contrast, Caveolin-1 was found to be overexpressed in breast and prostate cancer [58], pancreatic adenocarcinoma [59], renal carcinoma [60], lung cancer [61], esophageal carcinoma [62, 63] and colorectal adenocarcinoma [64].

In our sample, Caveolin-1 was expressed in 100% of intestinal type and in 67.9% of diffuse type gastric cancer, hence differing significantly. These findings are also supported by previous reports [53-55], which showed that the intestinal type presented higher expression of Caveolin-1, whereas no or lower immunostaining was found in the diffuse type.

Caveolin-1 usually co-localizes with E-cadherin in plasma membranes [65]. In the present study, we observed that the presence of Caveolin-1 was associated with a lack of E-cadherin expression. This finding corroborates a previous study in hepatocellular carcinoma cells, which demonstrated that Caveolin-1 overexpression leads to a decrease in the E-cadherin expression [66].

The inverse association between E-cadherin and Caveolin-1 may have a stimulant effect for tumor growth through b-catenina pathway [67]. Moreover, the inverse correlation between these proteins reinforces that Caveolin-1 did not have a role as tumor suppressor in our advanced gastric cancer samples. Torres et al [68] showed that the presence of E-cadherin in cancer cells is required for Caveolin-1 functions as a tumor suppressor – for example, leading down-regulation of β -catenin-Tcf/Lef-dependent transcription and Survivin expression.

Helicobacter pylori is the strongest known risk factor for gastric adenocarcinoma. Here, we observed that Caveolin-1 immunoreactivity was more frequent in samples with *H. pylori* infection in diffuse type gastric cancer. In intestinal type gastric cancer, the evaluation of an association between this neoplasia subtype and *H. pylori* was not possible due to a high frequency of

Caveolin-1 expression in these samples. Little is known about the relationship between *H. pylori* and Caveolin-1. Gauthier et al [69] suggested that Caveolin-1 is not necessary to internalize *H. pylori* into cell.

The gene encoding Caveolin-1 (*CAV1*) is located on chromosome 7q31.1 [5]. Thus, the up-regulation of Caveolin-1 observed in the present study may also reflect a chromosome gain of this locus. The trisomy of chromosome 7 was previously observed by our group in gastric cancer cell lines established from tumors and ascitic fluid of individuals from Northern Brazil [70]. Matturri et al [71] observed trisomy of chromosome 7 in 40% of gastric cancer samples. Kokkola et al [72] reported that the most common gains involved chromosome 7 in adenoma, a preneoplastic lesion. Therefore, the frequent detection of trisomy 7 in gastric cancer suggests presence of important oncogenes in this chromosome, such as *CAV1*.

To our knowledge, this is the first study to evaluate *CAV1* methylation in gastric cancer tissue. We observed low frequency of *CAV1* hypermethylation in normal and in tumor gastric tissue. Hence, we did not observe an association between *CAV1* methylation and gastric cancer (Table 2).

In the present study, we used the MSP to evaluate the methylation status of *CAV1*. Although this assay only detects the methylation status at CpG sites within the primer binding sites, it is an interesting methodology to study the methylation pattern of *CAV1*. Cui et al [20] demonstrated that *CAV1* methylation is a generalized event and, thus, the degree of CpG methylation in this gene is not site-specific. Furthermore, the presence of methylated and unmethylated sequences in most of samples through MSP could be due to heterogeneous methylation patterns in different cell populations in gastric samples, as well as all cells presenting methylation at one allele.

Similar to our *CDH1* results, *CAV1* promoter methylation showed high frequency in normal gastric cells (Table 2). Gene promoter methylation is commonly reported in the gastric carcinogenesis process [19, 33, 73-77]. Moreover, it is known that gene methylation status and regulation are frequently tissue-specific or disease-specific [78]. In contrast with gastric cancer, no *CAV1* methylation was observed in urinary bladder adenocarcinoma [79]. In prostate

tumor a hypermethylation of *CAV1* promoter was reported differing from normal tissue [20].

We have also demonstrated an association between methylation status and protein expression, in which hypermethylated tumor samples presented lack of Caveolin-1 expression (Table 3). Epigenetic regulation of *CAV1* by DNA methylation was previously reported in different tumors, such as breast cancer [19, 22], sporadic colorectal cancer tissues [23] and hepatocellular carcinoma [80].

In conclusion, the methylation status of *CDH1* and *CAV1* was not correlated to gastric carcinogenesis and is probably a common event in gastric mucosa samples of individuals from Northern Brazil. On the other hand, E-cadherin, as described in other populations, is associated with gastric cancer, especially of diffuse type, and with a metastatic phenotype. Caveolin-1 protein and mRNA expression might be a good marker for gastric cancer.

BIBLIOGRAPHY

1. Dowling, P., et al., Proteomic analysis of isolated membrane fractions from superinvasive cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1774(1): p. 93-101.
2. Stemmler, M.P., Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst*, 2008. 4(8): p. 835-50.
3. Koizume, S., et al., Heterogeneity in the modification and involvement of chromatin components of the CpG island of the silenced human *CDH1* gene in cancer cells. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(21): p. 4770-80.
4. Birchmeier, W. and J. Behrens, Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1198(1): p. 11-26.
5. Engelman, J.A., et al., Chromosomal localization, genomic organization, and developmental expression of the murine caveolin gene family (*Cav-1*, -2, and -3). *Cav-1* and *Cav-2* genes map to a known tumor suppressor locus (6-A2/7q31). *FEBS Lett*, 1998. 429(3): p. 330-6.
6. Brooks-Wilson, A.R., et al., Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet*, 2004. 41(7): p. 508-17.

7. Guilford, P., et al., E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*, 1998. 392(6674): p. 402-5.
8. Kanai, Y., Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers. *Pathol Int*, 2008. 58(9): p. 544-58.
9. Kangelaris, K.N. and S.B. Gruber, Clinical implications of founder and recurrent CDH1 mutations in hereditary diffuse gastric cancer. *Jama*, 2007. 297(21): p. 2410-1.
10. Strathdee, G., Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol*, 2002. 12(5): p. 373-9.
11. Faraldo, M.L., et al., Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*, 1997. 20(1): p. 33-47.
12. Hennig, G., et al., Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo. *Oncogene*, 1995. 11(3): p. 475-84.
13. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*, 2004. 48(5-6): p. 365-75.
14. Graff, J.R., et al., Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem*, 2000. 275(4): p. 2727-32.
15. Yoshiura, K., et al., Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(16): p. 7416-9.
16. Goetz, J.G., et al., Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev*, 2008. 27(4): p. 715-35.
17. Shin, J., et al., Caveolin-1 is associated with VCAM-1 dependent adhesion of gastric cancer cells to endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*, 2006. 17(5-6): p. 211-20.
18. Razani, B., et al., Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans*, 2001. 29(Pt 4): p. 494-9.
19. Engelman, J.A., X.L. Zhang, and M.P. Lisanti, Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the

- D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett*, 1999. 448(2-3): p. 221-30.
20. Cui, J., et al., Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer. *Prostate*, 2001. 46(3): p. 249-56.
 21. Bachmann, N., et al., Expression changes of CAV1 and EZH2, located on 7q31 approximately q36, are rarely related to genomic alterations in primary prostate carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008. 182(2): p. 103-10.
 22. Chen, S.T., et al., Mutational, epigenetic and expressional analyses of caveolin-1 gene in breast cancers. *Int J Mol Med*, 2004. 14(4): p. 577-82.
 23. Lin, S.Y., et al., Promoter CpG methylation of caveolin-1 in sporadic colorectal cancer. *Anticancer Res*, 2004. 24(3a): p. 1645-50.
 24. Wiechen, K., et al., Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol*, 2001. 159(5): p. 1635-43.
 25. Li, W., et al., Expression of the full-length telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcript in both malignant and normal gastric tissues. *Cancer Lett*, 2008. 260(1-2): p. 28-36.
 26. Resende, A.L.S., I.E. Matos, and S. Koifman, Mortalidade por câncer gástrico no Estado do Pará, 1980-1997. *Arq Gastroenterol*, 2006. 43: p. 247-52.
 27. Tost, J., DNA Methylation: An Introduction to the Biology and the Disease-Associated Changes of a Promising Biomarker. *Mol Biotechnol*, 2009.
 28. Jones, P.A. and S.B. Baylin, The epigenomics of cancer. *Cell*, 2007. 128(4): p. 683-92.
 29. Batista dos Santos, S.E., et al., Differential contribution of indigenous men and women to the formation of an urban population in the Amazon region as revealed by mtDNA and Y-DNA. *Am J Phys Anthropol*, 1999. 109(2): p. 175-80.
 30. Lauren, P., The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1965. 64: p. 31-49.

31. Sobin, L.H. and C.H. Wittekind, TNM: Classification of malignant tumours. 6th ed 2002, New York: Wiley-Liss
32. Herman, J.G., et al., Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(18): p. 9821-6.
33. Leal, M.F., et al., Promoter hypermethylation of CDH1, FHIT, MTAP and PLAGL1 in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil. *World J Gastroenterol*, 2007. 13(18): p. 2568-74.
34. Liu, Y.C., et al., Mechanisms inactivating the gene for E-cadherin in sporadic gastric carcinomas. *World J Gastroenterol*, 2006. 12(14): p. 2168-73.
35. Mayer, B., et al., E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res*, 1993. 53(7): p. 1690-5.
36. Matsuura, K., et al., Altered expression of E-cadherin in gastric cancer tissues and carcinomatous fluid. *Br J Cancer*, 1992. 66(6): p. 1122-30.
37. Oka, H., et al., Immunohistochemical evaluation of E-cadherin adhesion molecule expression in human gastric cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1992. 421(2): p. 149-56.
38. Ma, L., et al., miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*, 2010. 12(3): p. 247-56.
39. Bienz, M. and H. Clevers, Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 2000. 103(2): p. 311-20.
40. Polakis, P., Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 2000. 14(15): p. 1837-51.
41. Calcagno, D.Q., et al., MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(39): p. 5962-8.
42. Calcagno, D.Q., et al., Interrelationship between chromosome 8 aneuploidy, C-MYC amplification and increased expression in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*, 2006. 12(38): p. 6207-11.
43. Calcagno, D.Q., et al., MYC insertions in diffuse-type gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res*, 2009. 29(7): p. 2479-83.

44. Costa Raiol, L.C., et al., Interrelationship between MYC gene numerical aberrations and protein expression in individuals from northern Brazil with early gastric adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008. 181(1): p. 31-5.
45. Graziano, F., et al., Combined analysis of E-cadherin gene (CDH1) promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in patients with gastric cancer: implications for treatment with demethylating drugs. *Ann Oncol*, 2004. 15(3): p. 489-92.
46. Grady, W.M., et al., Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet*, 2000. 26(1): p. 16-7.
47. Zazula, M., et al., CDH1 gene promoter hypermethylation in gastric cancer: relationship to Goseki grading, microsatellite instability status, and EBV invasion. *Diagn Mol Pathol*, 2006. 15(1): p. 24-9.
48. Esteller, M., CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 2002. 21(35): p. 5427-40.
49. Silva, P.N., et al., Promoter methylation analysis of SIRT3, SMARCA5, HTERT and CDH1 genes in aging and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2008. 13(2): p. 173-6.
50. Kang, G.H., et al., Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol*, 2003. 163(4): p. 1551-6.
51. Issa, J.P., CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000. 249: p. 101-18.
52. Shen, L., et al., DNA methylation and environmental exposures in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 2002. 94(10): p. 755-61.
53. Burgermeister, E., et al., Differential expression and function of caveolin-1 in human gastric cancer progression. *Cancer Res*, 2007. 67(18): p. 8519-26.
54. Gao, X., et al., [Down-regulation of caveolin-1 in gastric carcinoma and its clinical biological significance]. *Ai Zheng*, 2005. 24(3): p. 311-6.

55. Barresi, V., et al., Caveolin-1 immuno-expression in human gastric cancer: histopathogenetic hypotheses. *Virchows Arch*, 2008. 453(6): p. 571-8.
56. Wiechen, K., et al., Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *Am J Pathol*, 2001. 158(3): p. 833-9.
57. Aldred, M.A., et al., Caveolin-1 and caveolin-2, together with three bone morphogenetic protein-related genes, may encode novel tumor suppressors down-regulated in sporadic follicular thyroid carcinogenesis. *Cancer Res*, 2003. 63(11): p. 2864-71.
58. Yang, G., et al., Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(8): p. 1873-80.
59. Suzuoki, M., et al., Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer*, 2002. 87(10): p. 1140-4.
60. Campbell, L., M. Gumbleton, and D.F. Griffiths, Caveolin-1 overexpression predicts poor disease-free survival of patients with clinically confined renal cell carcinoma. *Br J Cancer*, 2003. 89(10): p. 1909-13.
61. Ho, C.C., et al., Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *Am J Pathol*, 2002. 161(5): p. 1647-56.
62. Ando, T., et al., The overexpression of caveolin-1 and caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 2007. 18(3): p. 601-9.
63. Kato, K., et al., Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer*, 2002. 94(4): p. 929-33.
64. Fine, S.W., et al., Elevated expression of caveolin-1 in adenocarcinoma of the colon. *Am J Clin Pathol*, 2001. 115(5): p. 719-24.
65. Galbiati, F., et al., Caveolin-1 expression inhibits Wnt/beta-catenin/Lef-1 signaling by recruiting beta-catenin to caveolae membrane domains. *J Biol Chem*, 2000. 275(30): p. 23368-77.
66. Cokakli, M., et al., Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion. *BMC Cancer*, 2009. 9: p. 65.

67. Selga, E., et al., Role of caveolin 1, E-cadherin, Enolase 2 and PKCalpha on resistance to methotrexate in human HT29 colon cancer cells. *BMC Med Genomics*, 2008. 1: p. 35.
68. Torres, V.A., et al., E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Mol Cell Biol*, 2007. 27(21): p. 7703-17.
69. Gauthier, N.C., et al., Helicobacter pylori VacA cytotoxin: a probe for a clathrin-independent and Cdc42-dependent pinocytic pathway routed to late endosomes. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(10): p. 4852-66.
70. Leal, M.F., et al., Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*, 2009. 195(1): p. 85-91.
71. Maturri, L., et al., Prognostic significance of different biological markers (DNA index, PCNA index, apoptosis, p53, karyotype) in 126 adenocarcinoma gastric biopsies. *Anticancer Res*, 1998. 18(4B): p. 2819-25.
72. Kokkola, A., et al., Presence of high-level DNA copy number gains in gastric carcinoma and severely dysplastic adenomas but not in moderately dysplastic adenomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 1998. 107(1): p. 32-6.
73. Lima, E.M., et al., Study of Methylation Pattern of de Novo DNA Methyltransferase Genes and its Correlation with DNA Methylation Pattern of RUNX3 in Individuals with Gastric Cancer from Northern Region of Brazil. *Int J Morphol*, 2007. 25(4): p. 817-824.
74. Lima, E.M., et al., Methylation status of ANAPC1, CDKN2A and TP53 promoter genes in individuals with gastric cancer. *Braz J Med Biol Res*, 2008. 41(6): p. 539-43.
75. Moura Lima, E., et al., DNA mismatch repair gene methylation in gastric cancer in individuals from northern Brazil. *Biocell*, 2008. 32(3): p. 237-43.
76. Gigeck, C.O., et al., hTERT methylation and expression in gastric cancer. *Biomarkers*, 2009. 14(8): p. 630.

77. Gizek, C.O., et al., Insulin-like growth factor binding protein-3 gene methylation and protein expression in gastric adenocarcinoma. *Growth Horm IGF Res*, 2010. 20(3): p. 234-8.
78. Nagase, H. and S. Ghosh, Epigenetics: differential DNA methylation in mammalian somatic tissues. *Febs J*, 2008. 275(8): p. 1617-23.
79. Kunze, E. and T. Schlott, High frequency of promoter methylation of the 14-3-3 sigma and CAGE-1 genes, but lack of hypermethylation of the caveolin-1 gene, in primary adenocarcinomas and signet ring cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Mol Med*, 2007. 20(4): p. 557-63.
80. Hirasawa, Y., et al., Methylation status of genes upregulated by demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 2006. 71(1-2): p. 77-85.

Table 1: Clinicopathological characteristics and immunohistochemistry results of gastric tissue samples, n (%).

Variable	E-cadherin				Caveolin-1			
	Total	Positive	Negative	p value	Total	Positive	Negative	p value
Gender								
Male	30	15 (50%)	15 (50%)	p=0.3693	39	33 (84.6%)	6 (15.4%)	p=0.9972
Female	18	6 (33.3%)	12 (66.7%)		18	15 (83.3%)	3 (16.7%)	
Tissue								
NGM	20	20 (100%)	0	p<0.0001*	18	1 (5.6%)	17 (94.4%)	p<0.0001*
GC	58	21 (36.2%)	37 (63.8%)		57	48 (84.2%)	9 (15.8%)	
Onset								
≤ 45y	6	3 (50%)	3 (50%)	p=0.6573	5	4 (80%)	1 (20%)	p=0.9759
> 45y	52	18 (34.6%)	34 (65.4%)		52	44 (84.6%)	8 (15.4%)	
<i>H. pylori</i>								
Present	42	14 (33.3%)	28 (66.7%)	p=0.5460	41	37 (90.2%)	4 (9.8%)	p=0.0987
Absent	16	7 (43.8%)	9 (56.2%)		16	11 (68.8%)	5 (31.2%)	
Laurén								
Classification								
Diffuse	32	3 (9.4%)	29 (90.6%)	p<0.0001*	28	19 (67.9%)	9 (32.1%)	p<0.0008*
Intestinal	26	18 (69.2%)	8 (30.8%)		29	29 (100%)	0	
Tumor								
Location								
Cardia	11	7 (63.6%)	4 (36.4%)	p=0.0775	11	9 (81.8%)	2 (18.2%)	p=0.9908
Noncardia	47	14 (29.8%)	33 (70.2%)		46	39 (84.8%)	7 (15.2%)	
Stage								
I/II	5	0	5 (100%)	p=0.1479	4	4 (100%)	0	p=0.6059
III/IV	53	21 (39.6%)	32 (60.4%)		53	44 (83%)	9 (17%)	
Lymph node								
metastasis								
Present	53	21 (39.6%)	32 (60.4%)	p=0.1479	53	44 (83%)	9 (17%)	p=0.6059
Absent	5	0	5 (100%)		4	4 (100%)	0	
Distant								
metastasis								
Present	18	12 (66.7%)	6 (33.3%)	p=0.0035*	20	18 (90%)	2 (10%)	p=0.4582
Absent	37	9 (24.3%)	28 (75.7%)		34	27 (79.4%)	7 (20.6%)	
Unkown	3				3			

IHC: immunohistochemistry assay; NGM: normal gastric mucosa; GC: gastric cancer

Table 2: Clinicopathological characteristics methylation frequency in gastric tissue samples, n (%).

Variable	CDH1				CAV1			
	Total	M n (%)	U n (%)	p value	Total	M n (%)	U n (%)	p value
Gender								
Male	70	64 (91.4%)	6 (8.6%)	p=0.7311	59	19 (32.2%)	40 (67.8%)	p=0.6371
Female	36	32 (88.9%)	4 (11.1%)		29	11 (37.9%)	18 (62.1%)	
Tissue								
NGM	52	47 (90.4%)	5 (9.6%)	p=0.9991	43	12 (27.9%)	31 (72.1%)	p=0.6081
GC	106	96 (90.6%)	10 (9.4%)		88	30 (34.1%)	58 (65.9%)	
Onset								
≤ 45y	14	11 (78.6%)	3 (21.4%)	p=0.1259	10	2 (20%)	8 (80%)	p=0.4838
> 45y	92	85 (92.4%)	7 (7.6%)		78	28 (36.9%)	50 (64.1%)	
<i>H. pylori</i>								
Present	71	66 (93%)	5 (7%)	p=0.2926	59	17 (28.8%)	42 (71.2%)	p=0.0987
Absent	35	30 (85.7%)	5 (14.3%)		29	13 (44.8%)	16 (55.2%)	
Laurén								
Classification								
Diffuse	55	47 (85.5%)	8 (14.5%)	p=0.1779	44	18 (40.9%)	26 (59.1%)	p=0.2608
Intestinal	51	49 (96%)	2 (4%)		44	12 (27.3%)	32 (72.7%)	
Tumor								
Location								
Cardia	22	21 (95.5%)	1 (4.5%)	p=1	22	9 (40.9%)	13 (59.1%)	p=0.4372
Noncardia	80	74 (92.5%)	6 (7.5%)		65	20 (30.8%)	45 (69.2%)	
Stage								
I/II	10	9 (90%)	1 (10%)	p=0.9472	6	4 (66.7%)	2 (33.3%)	p=0.1746
III/IV	95	86 (90.5%)	9 (9.5%)		82	26 (31.7%)	56 (68.3%)	
Lymph node								
mestasis								
Present	92	84 (91.3%)	8 (8.7%)	p=10.6061	80	27 (33.8%)	53 (66.2%)	p=0.9981
Absent	13	11 (84.6%)	2 (15.4%)		8	3 (37.5%)	5 (62.5%)	
Distant								
metastasis								
Present	30	28 (93.3%)	2 (6.7%)	p=0.5982	27	8 (29.6%)	19 (70.4%)	p=0.8030
Absent	60	58 (96.7%)	2 (3.3%)		54	19 (35.2%)	35 (64.8%)	
Unkown	15				7			

IHC: immunohistochemistry assay; NGM: normal gastric mucosa; GC: gastric cancer