

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DE SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

DANILO DO ROSÁRIO PINHEIRO

ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE COX-2 EM
Sapajus apella COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

BELÉM

2014

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DE SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

DANILO DO ROSÁRIO PINHEIRO

ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE COX-2 EM
Sapajus apella COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Bárbara do Nascimento Borges

BELÉM

2014

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DE SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

DANILO DO ROSÁRIO PINHEIRO

ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE COX-2 EM
Sapajus apella COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em ____/____/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof.a. Dra. Bárbara do Nascimento Borges (ISARH-UFRA) Presidente

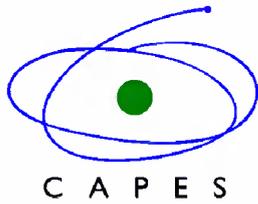
Prof.a. Dra. Maria Lúcia Harada (ICB-UFPA) 1º Examinador

Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano (ICB-UFPA) 2º Examinador

Prof. Dr. Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos (ICB-UFPA) 3º Examinador

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira (ICEN-UFPA) Suplente

FONTES FINANCIADORAS



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -
CAPES



Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA



Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Pará



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -
CNPq

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias
Mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito
Que nem gozam muito e nem sofrem muito, por que vivem nessa penumbra cinzenta
Que não conhece vitória nem derrota”

(Theodore Roosevelt)

Ao meu irmão, Diogo do Rosário Pinheiro.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges, pela oportunidade concedida, paciência, confiança e acima de tudo, pelo modelo profissional que tanto admiro.

Aos membros da Banca Examinadora, pelo aceite em participar da mesma e pelas críticas e sugestões ao presente trabalho.

Ao companheiro de laboratório e amigo Wallax Augusto Silva Ferreira, pelas diversas contribuições ao longo deste trabalho, além do exemplo de comprometimento e paixão pela ciência.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular Francisco Mauro Salzano (LABIOMOL): Mariceli Baia, Carlos Costa, Mariana Araújo, Symara Antunes, Thamirys Faro, Raissa Melo, Iane Guimarães e Verena Ferreira, pelo apoio e companheirismo em todos os momentos.

À minha mãe, Itacy Diana Seabra do Rosário, a maior responsável por essa e todas as realizações felizes da minha vida. Agradeço a sua paciência durante os anos que passamos afastados e acima de tudo pelo zelo e por ser muito mais do que eu mereço. Que possamos colher os frutos das conquistas futuras juntos.

Ao meu irmão, Diogo do Rosário Pinheiro, que muitas vezes foi além do seu papel de irmão, foi pai nos momentos em que zelou por mim e amigo em todos os outros. Meus esforços sempre foram e serão em busca de sua aprovação e reconhecimento.

À Universidade Federal Rural da Amazônia e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Mestrado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	07
1.1 Considerações Gerais	07
1.2 Genética do Câncer	08
1.3 Epigenética e Câncer	11
1.4 Câncer Gástrico	15
1.4.1 Epidemiologia	15
1.4.2 Fatores Etiológicos	16
1.4.3 Classificação Histopatológica	19
1.4.4 Fatores Genéticos e Epigenéticos Associados	21
1.5 O Gene COX-2	23
1.6 Modelos Animais	26
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Amostras	31
3.1.1 Extração de DNA e Sequência Genômica	31
3.1.2 Modificação do DNA	32
3.1.3 PCR metilação específica (MSP)	33
3.1.4 Imunohistoquímica	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Carcinogênese em <i>Sapajus apella</i>	36
4.2 Isolamento e caracterização da região promotora parcial de COX-2 em <i>Sapajus apella</i>	36
4.3 Identificação da Ilha CpG, MSP e Imunohistoquímica	41

5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÕES	54
7 REFERÊNCIAS	55
ANEXO 1	80

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Hallmarks do câncer. Conjunto de características comuns à maioria das células tumorais. Fonte: HANNAHAN; WINBERG, 2011	09
Figura 2	DNA metiltransferases (DNMTs) catalisam a metilação da posição 5 do anel da pirimidina. Fonte (adaptado): STRATHDEE; BROWN, 2002	12
Figura 3	O efeito da metilação do DNA no bloqueio da transcrição. Fonte (modificada): TUREK-PLEWA; JAGODZINSKI, 2005	13
Figura 4	(A) Incidência de câncer gástrico em homens. (B) Prevalência da infecção por <i>H. pylori</i> em adultos assintomáticos. Fonte (adaptado): CREW; NEUGUT, 2006.	17
Figura 5	Evolução do câncer gástrico do tipo intestinal em múltiplos passos. Fonte (adaptado): HARTGRINK et al., 2009	21
Figura 6	Papel da Ciclooxygenase 2 no desenvolvimento do câncer. Fonte: GRÖSCH et al., 2006	24
Figura 7	Estrutura química do MNU. Fonte: CHEMSPIDER, 2013	27
Figura 8	Mecanismo de ação de agentes metilantes no DNA: o agente realiza a metilação do oxigênio 6, culminando na incorporação errada de uma Timina, no lugar de uma Citosina. O sistema de reparo MMR remove a base inserida erroneamente, porém, esta é reinserida em oposição ao O6-MeG persistente, dando origem a uma sequência de ciclos fúteis e posteriormente a quebra da fita dupla de DNA (KONDO et al., 2010)	28
Figura 9	Método de modificação com bissulfito. Fonte: KRUEGER et al., 2012	33
Figura 10	Técnica de PCR metilação específica (MSP). Fonte: ZHANG et al., 2009	34
Figura 11	Alinhamento nucleotídico entre as sequências promotoras de COX-2	37

de *Homo sapiens* e *Saimiri boliviensis*. Os nucleotídeos em destaque indicam sequências idênticas entre as duas espécies.

Figura 12	Sequência nucleotídica do promotor de COX-2 de <i>S. boliviensis</i> flanqueada pelos iniciadores desenhados para o presente trabalho.	38
Figura 13	Alinhamento nucleotídico entre as sequências promotoras de COX-2 de <i>Homo sapiens</i> , <i>Sapajus apella</i> e <i>Saimiri boliviensis</i> . Os nucleotídeos em destaque indicam sequências idênticas entre as duas espécies.	39
Figura 14	Sítios para ligação de elementos cis-regulatórios (destacados em quadrados) e fatores de transcrição (sublinhados) identificados na sequência de <i>S. apella</i> . Com exceção do sítio para GATA-1/GATA-2 (em preto), todos os demais são idênticos ao observado em <i>H. sapiens</i> .	40
Figura 15	Identificação da Ilha CpG do promotor de COX-2 de <i>Sapajus apella</i>	41
Figura 16	Sequência nucleotídica da Ilha CpG de COX-2 de <i>Sapajus apella</i> . Em destaque na cor vermelha estão os sítios CpGs	41
Figura 17	Gel de agarose (3%) com o resultado de MSP para as amostras de <i>S. apella</i> . MM: Marcador Molecular. M: Metilado. U: Não metilado. Nr: Tecido Normal. G: Gastrite. GA: Gastrite Atrófica (Atrofia). MI: Metaplasia Intestinal. T: Tumor.	42
Figura 18	Arranjo filogenético obtido por Máxima Verossimilhança, mostrando o posicionamento dos gêneros <i>Saimiri</i> (em vermelho), <i>Sapajus</i> (em verde) e <i>Homo</i> (em azul). Os números indicam valores de bootstrap (em porcentagem) e de probabilidade posterior (Análise Bayesiana). Adaptado de FINSTERMEIER et al. (2013).	47
Tabela 1	Genes identificados como metilados em câncer gástrico (ZHAO; BU, 2012)	22
Tabela 2	Amostras utilizadas e seus respectivos histopatológicos	36
Tabela 3	Iniciadores utilizados para a técnica de MSP em <i>Sapajus apella</i>	42
Tabela 4	Resultado de MSP e Imunohistoquímica (IHQ) das amostras de <i>S. apella</i> analisadas	43
Tabela 5	Efeito carcinogênico do MNU em diversas espécies animais	46

RESUMO

O adenocarcinoma gástrico continua a ser um fardo mundial como uma das principais causas de morte relacionada ao câncer. Existem duas formas de adenocarcinoma gástrico: a do tipo difuso e a do intestinal, sendo esta última caracterizada através de uma série de passos sequenciais. Uma das enzimas mais alteradas durante esta progressão é a COX-2 que está presente em tumores e lesões pré-neoplásicas, sendo que vários estudos sugeriram que esta pode ser um fator importante na carcinogênese gástrica. Com o objetivo de estudar o padrão de metilação e de expressão de COX-2 durante os estágios de desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, foram utilizados seis animais da espécie *Sapajus apella*, induzidos à carcinogênese gástrica pelo uso de N-metil-N-nitrosurea (MNU), um potente agente mutagênico pertence à classe das nitrosamidas. A sequência da região promotora do gene COX-2 de *S. apella* foi obtida usando iniciadores desenhados a partir das sequências de *Homo sapiens* e *Saimiri boliviensis*, e utilizada para a identificação de sítios de ligação de fatores de transcrição e de elementos cis-regulatórios. A análise de metilação foi realizada pela técnica de PCR Metilação Específica (MSP) e a expressão analisada por Imunohistoquímica (IHQ). Foram obtidas 20 amostras, sendo que dos seis animais induzidos, apenas um desenvolveu tumor, enquanto os demais vieram a óbito ainda com lesões pré-neoplásicas. Foi obtido um fragmento de 675 pb do promotor de COX-2 de *S. apella*, e este apresentou uma similaridade de 99,2% e 68,2% com *H. sapiens* e *S. boliviensis*, respectivamente, sugerindo que *S. apella* pode ser considerado um modelo mais adequado que *Saimiri* para o estudo da carcinogênese comparada. Foram identificados diversos sítios de ligação para fatores de transcrição (CdxA, GATA-1 e GATA-2), bem como elementos cis-regulatórios, (P53RE, NF-Y e STAT), idênticos aos descritos para humanos. A análise de MSP revelou que todas as amostras analisadas (tecido normal, lesões pré-neoplásicas e tecido tumoral) apresentaram-se metiladas para o gene estudado. Já o teste de IHQ revelou que amostras normais foram as únicas que não apresentaram a expressão do gene, sugerindo que a região analisada em *S. apella*, não representa uma região chave na expressão de COX-2, fazendo-se necessários estudos mais aprofundados acerca da regulação transcricional desse gene.

Palavras chave: Macaco Prego, Adenocarcinoma gástrico, PTGS2, Fatores de Transcrição, Metilação, Imunohistoquímica, Modelo animal

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) remains one of the main causes of death by cancer in the world. There are two histological types of GC: Diffuse and Intestinal, and the latter is characterized by the presence of pre-neoplastic lesions. One of the most altered enzymes during the Intestinal GC pathway is COX-2, considered an important marker of this type of lesion. This work aims to study the methylation and expression pattern of COX-2 during the Intestinal GC pathway in six animals of *Sapajus apella*, induced by N-methyl-N-Nitrosurea (MNU). The promoter sequence of *S. apella* COX-2 gene was obtained using primers designed from conserved regions of *Homo sapiens* and *Saimiri boliviensis*, and used for the identification of transcription factors and cis-regulatory elements binding sites. Methylation pattern was assessed using Methylation Specific PCR (MSP) technique and the expression was analyzed by Immunohistochemistry (IHQ). A total of 20 samples were obtained, and from the six initially induced animals, only one developed gastric tumor. A fragment of 675 pb from the promoter region of *S. apella* COX-2 was obtained and this sequence was 99.2% and 68.2% similar with *H. sapiens* and *S. boliviensis*, suggesting that *S. apella* may be considered a more appropriate animal model than *Saimiri* for the comparative oncology study. Similar to humans, several binding sites for transcription factors (CdxA, GATA-1 and GATA-2), and cis-regulatory elements (P53RE, NF-Y and STAT), were identified in *S. apella* sequence. MSP revealed that all studied samples (normal, pre-neoplastic and tumoral) were methylated. On the other hand, IHQ results pinpointed to a positive expression of COX-2 in all pre-neoplastic and tumoral samples, suggesting that the analyzed fragment may not represent a core region in the COX-2 regulation in GC of *S. apella*. Our results suggest the needed of more studies about the transcriptional regulation of this gene in GC.

Keywords: Capuchin monkey, Gastric adenocarcinoma, PTGS2, Transcription Factors, Methylation, Immunohistochemistry, Animal model

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O câncer é a denominação atribuída ao conjunto de manifestações patológicas caracterizadas pela perda de controle sobre a atividade de inúmeros genes, levando a proliferação celular anormal e ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástases para tecidos distantes (PAZDUR et al., 2005).

A incidência global do câncer dobrou nos últimos 30 anos do século XX, e estima-se que esta irá duplicar novamente entre 2000 e 2020 e quase triplicará em 2030. Até recentemente, o câncer era considerado uma doença dos países ocidentais industrializados. Hoje, a situação mudou drasticamente, com a maioria dos casos globais sendo encontrada em países de baixos e médios recursos (BOYLE; LEWIN, 2008).

Considerada a segunda maior causa de morte por doença no Brasil, o câncer representa um grande desafio para a ciência e medicina, pois ainda não há cura para muitos tipos de tumores, e os tratamentos convencionais apresentam consideráveis efeitos colaterais. No Brasil, as estimativas para o biênio 2012-2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2011).

Segundo as estatísticas mundiais, é prevista a ocorrência de 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Os cânceres mais incidentes são o de pulmão, (1,52 milhões de casos novos), o de mama (1,29 milhões) seguido pelo de cólon de reto (1,15 milhões) e pelo câncer de estômago com 870 mil casos novos (BOYLE; LEWIN, 2008).

É uma doença complexa envolvendo anormalidades em muitos genes, levando a alterações na expressão ou funções de genes da homeostasia celular, acarretando mudanças metabólicas e comportamentais, que convertem uma célula normal em uma célula transformada, dando início a uma proliferação descontrolada e anormal (YEANG; MCCORMICK; LEVINE, 2008). Estas mudanças surgem devido às alterações genéticas, modificando a proliferação celular, influenciando no

relacionamento destas células com as células vizinhas. Em muitos aspectos, as células cancerosas possuem uma organização independente de sobrevivência não seguindo as regras de um ciclo celular normal. Com isto, estas células se adaptam, lutando contra o sistema de defesa do organismo, adotando, então, um comportamento agressivo e invasivo, resultando na formação de uma massa tumoral (DE VITA; HELLAN; ROSENBERG, 2005).

Por se tratar de uma doença multifatorial, tanto fatores endógenos quanto exógenos têm sido considerados como predisponentes ao risco de câncer no homem, incluindo histórico familiar, raça, idade e fatores nutricionais (BOSTWICK et al., 2004; SONN; ARONSON; LITWIN, 2005).

1.2 GENÉTICA DO CÂNCER

A formação e o desenvolvimento das neoplasias, denominado de carcinogênese, é um processo complexo, dividido em três etapas: iniciação, promoção e progressão. O primeiro estágio, a iniciação, se caracteriza pela desregulação genômica, devido a um agente cancerígeno, provocando modificações em alguns genes, e transformando a célula. O estágio de promoção acontece por uma série de interações entre citocinas, fatores de crescimento e seus receptores, consistindo na proliferação, ou expansão das células iniciadas. A etapa de progressão tumoral é considerada irreversível, onde ocorrem inúmeras modificações biológicas, ou seja, caracterizada pela alta instabilidade genômica, tornando o câncer cada vez mais agressivo (KUMMAR et al., 2005).

Várias etapas mutagênicas são necessárias para o surgimento do câncer, e ao decorrer destas, as células irão adquirir um conjunto comum de propriedades como potencial de proliferação ilimitado, auto-suficiência em sinais de crescimento e resistência a ações antiproliferativa e apoptótica. Durante a sua evolução, os tumores podem invadir tecidos adjacentes, formar novos vasos sanguíneos, evitar a detecção pelo sistema imunológico e realizar metástase para órgãos distantes (**Figura 1**) (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009; NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011; ALMENDRO; MARUSYK; POLYAK, 2013; SHEN; LAIRD, 2013).

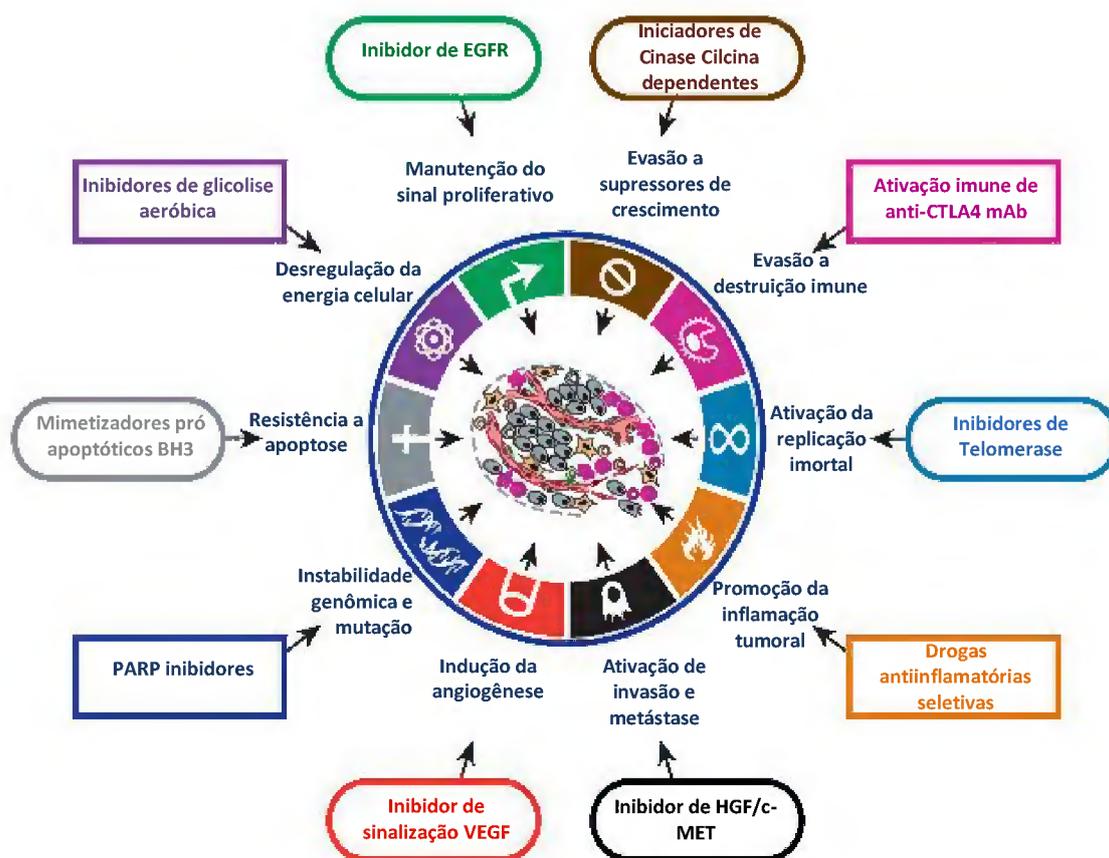


Figura 1: Hallmarks do câncer. Conjunto de características comuns à maioria das células tumorais. Fonte (adaptado): HANNAHAN;

Sabe-se que alterações no DNA podem ocorrer em todas as fases do ciclo celular, sendo geralmente causadas por erros na replicação da molécula ou lesões provocadas por agentes mutagênicos como radiação ultravioleta (UV), radiação ionizante e agentes químicos. Estas lesões no DNA representam barreiras para a continuidade da replicação gerando uma situação precária para a célula. Para corrigir esses erros, existe uma complexa maquinaria de reparo, que se não for bem sucedida, seja por um excesso de danos no DNA ou por defeitos neste maquinário, as células podem entrar em apoptose ou senescência (KASTAN; BARTEK, 2004; REDDY; VASQUEZ, 2005; ABBAS; KEATON; DUTTA, 2013).

De um modo geral, a maioria destas alterações no DNA pode ocorrer em duas classes de genes, os oncogenes e os genes supressores de tumor. A alteração em um ou mais destes grupos cooperam na indução da condição neoplásica. Os oncogenes são

importantes para o controle do crescimento, divisão e sobrevivência celular, já os genes supressores de tumor atuam no ciclo celular, inibindo a proliferação, e ativando o processo de morte celular (HARRINGTON, 2011).

Os oncogenes foram primeiramente identificados em vírus de RNA que causam tumores e pesquisas posteriores revelaram que estes são derivados de genes celulares normais denominados proto-oncogenes (VARMUS, 1985; CROCE, 2008), que possuem um papel importante na homeostase celular normal, porém quando alterados, tornam-se oncogenes ativos específicos de tumores. Mais de 70 oncogenes foram identificados como participantes da proliferação, diferenciação celular, senescência e apoptose atuando como fatores de transcrição, remodeladores de cromatina, fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, transdutores de sinais e reguladores da apoptose (POLSKY; CORDON-CARDO, 2003; CROCE, 2008).

Oncogenes codificam proteínas que controlam a proliferação celular, apoptose ou ambos. Podem ser ativados por alterações resultantes de fusão ou mutação, por justaposição de elementos iniciadores ou por amplificação. Translocações e mutações podem ocorrer como eventos iniciadores ou durante a progressão do tumor, enquanto a amplificação geralmente ocorre durante a progressão (CROCE, 2008).

Genes supressores de tumor codificam proteínas cuja função normal consiste em inibir a transformação celular e sua inativação, por conseguinte, é vantajosa para a sobrevivência e o crescimento de células tumorais. São responsáveis pela diferenciação celular, integridade genômica e reparo de erros no material genético, adesão celular, regulação do ciclo celular e apoptose e, transdução de sinal (HARRIS, 1988; OLIVEIRA; ROSS; FLETCHER., 2005).

Conceitualmente, os genes supressores de tumor podem ser divididos em duas categorias principais, os gatekeepers e os caretakers. Os gatekeepers inibem diretamente o crescimento celular ou enviam a célula ao processo apoptótico. Os caretakers são genes cuja perda de função não está diretamente ligada ao desenvolvimento de tumores. Entretanto, sua inativação resulta no aumento da ocorrência de mutações genômicas, o que pode ocasionar a inativação dos gatekeepers (YANG; LI; WEISSMAN, 2004; OLIVEIRA; ROSS; FLETCHER, 2005; COWIN et al., 2010).

1.3 EPIGENÉTICA E CÂNCER

Epigenética refere-se a alterações no padrão de expressão gênica, que não ocorrem por modificações nas seqüências de bases do DNA. Estas modificações são, em geral, reversíveis, estáveis e herdáveis e encontram-se presentes em diversas espécies (WATERLAND, 2006; RIOS, 2007; SHARMA; KELLY; JONES, 2010; KANWAL; GUPTA, 2012).

Os primeiros estudos em epigenética descreveram a heterocromatina como regiões do genoma que apresentam baixa densidade gênica. Posteriormente observou-se a associação presente da heterocromatina e eucromatina com o padrão de metilação do DNA e modificação das histonas, ambas relacionadas diretamente à atividade gênica, levando à idéia de que um “código epigenético” determina o estado da cromatina e conseqüentemente à expressão dos genes (MURRELL; RAKYAN; BECK, 2005).

Diferentes tipos de alterações epigenéticas têm sido identificados. Entre as mais importantes estão a metilação reversível do DNA e a acetilação e metilação das histonas; temos também a fosforilação, microRNAs, ubiquitinação e sumoilação (TUREK-PLEWA; JAGODZINSKI, 2005).

A metilação do DNA figura como a alteração epigenética mais amplamente estudada atualmente podendo ser observada no genoma de bactérias, fungos, invertebrados e algumas plantas, sendo um acontecimento comum na constituição do DNA humano (SHARMA; KELLY; JONES, 2010). Entretanto, existe uma variação na sua função e abundância entre esses genomas, como por exemplo o DNA fortemente metilado de muitos vertebrados em contraste ao genoma desmetilado de *Caenorhabditis elegans*. Os diferentes padrões da metilação do DNA encontrados entre as espécies revelam as diferentes funções que estas modificações exercem em seus genomas. Em organismos eucariontes, a metilação do DNA ocorre predominantemente em dinucleotídeos CpG e está associada com o estado de repressão da cromatina e a inibição da expressão gênica. Já em plantas e fungos, a metilação pode ocorrer em diferentes sítios, como CpNpG. Nos procariontes, a metilação do DNA ocorre tanto em bases citosina como adenina, fazendo parte de importantes sistemas de repressão (SCARANO et al., 2005; KLOSE; BIRD, 2006).

No genoma de mamíferos, a metilação ocorre por adição covalente de um grupo metil ao resíduo do carbono na posição 5' da citosina em dinucleotídeos citosina-guanina (CpG), resultando na formação de um composto chamando 5-metilcitosina (m^5C). Esse grupo metil se projeta no sulco maior do DNA, inibindo efetivamente a transcrição da fita. Em mamíferos, a m^5C é encontrada em cerca de 4% do genoma (BIRD, 1996; POIRIER, 2002; BAYLIN, 2005; ESTELLER, 2005; TUREK-PLEWA; JAGODZINSKI, 2005; SUZUKI; BIRD, 2008).

As DNA metiltransferases (DNMTs) são uma classe de enzimas específicas responsáveis por catalisar a metilação do DNA. Várias DNMTs foram identificadas (DNMT 1, DNMT 2, DNMT 3A, DNMT 3B, e DNMTL), porém apenas a DNMT1, 3A e 3B possuem atividades de metiltransferase. A reação de metilação envolve a presença da S-adenosilmetionina (SAM-CH₃) que é utilizada como doador de um radical metil para a posição 5 do anel da citosina, gerando a m^5C (**Figura 2**) (CHIAcCHIERA; PIUNTI; PASINI, 2013; JIN; ROBERTSON, 2013).

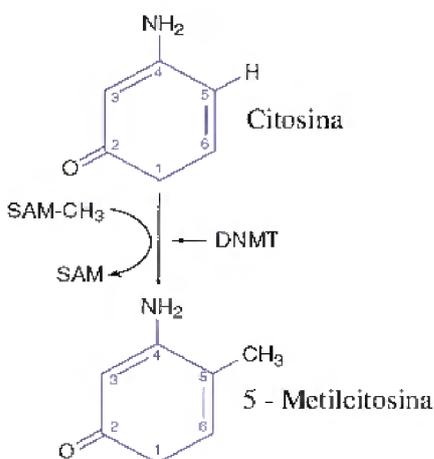


Figura 2: DNA metiltransferases (DNMTs) catalisam a metilação da posição 5 do anel da citosina, envolvendo a presença de S-adenosilmetionina (SAM), formando a 5-metilcitosina. Fonte (adaptado): STRATHDEE; BROWN, 2002.

Os genomas de vertebrados contém regiões com aproximadamente 200-4000 pares de bases, com um teor de G+C de 50% ou superior chamadas de ilhas CpG e

ocorrem geralmente nas regiões de sequências repetitivas, promotoras ou nos primeiros éxons dos genes (CHATTERJEE; VINSON, 2013; JONES, 2012; LEE; LEE, 2012).

A metilação de ilhas CpG situadas nas regiões promotoras proximais estão entre os mecanismos mais estudados por pesquisadores. Cerca de 70% dos genes possuem ilhas CpG em suas regiões promotoras, sendo que estas apresentam-se frequentemente não metiladas. A metilação destas regiões representa uma supressão da atividade transcricional de genes importantes, como por exemplo, genes supressores de tumor. Porém, a ausência de metilação não necessariamente indica uma expressão elevada (ZEISBERG; ZEISBERG, 2013).

Quando metiladas, estas ilhas CpG promovem um bloqueio transcricional pela interferência na ligação dos fatores de transcrição. Outro mecanismo de inibição da transcrição é através do recrutamento de proteínas ligadoras de metil-CpGs (MBDs) pelo grupo metil, que por sua vez trazem histonas deacetilases (HDACs) que ativam a maquinaria de remodelagem da cromatina (o complexo NuRD) (**Figura 3**) (LEE, 2003; DAS; SINGAL, 2004; LAIRD, 2005; TUREK-PLEWA; JAGODZINSKI, 2005).

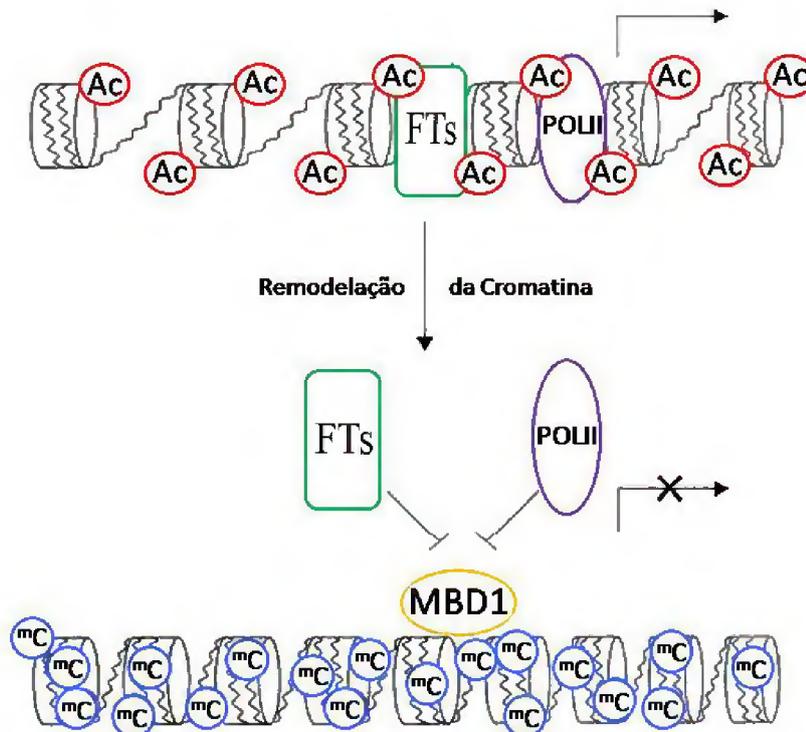


Figura 3: O efeito da metilação do DNA no bloqueio da transcrição. Ac= histonas hiperacetilada. FTs= fatores de transcrição. POLII= RNA polimerase II. MBD1= m⁵CpG binding domain 1. m⁵C= citosinas metiladas
Fonte (adaptada): TUREK-PLEWA; JAGODZINSKI, 2005

A metilação das ilhas CpG em regiões promotoras está associada com a condensação da cromatina (LOPEZ et al., 2009). Desta forma, a estrutura da cromatina, que compõe o nucleossomo, é uma ferramenta de regulação epigenética de extrema importância para a expressão de genes, e está intimamente ligada ao processo de metilação do DNA e acetilação das histonas. A estrutura da cromatina aberta (eucromatina) pode levar à expressão gênica, em parte, devido ao aumento da acessibilidade dos promotores gênicos à maquinaria transcricional. Em contraste, a cromatina fechada (heterocromatina) está associada frequentemente com a repressão transcricional (SUTHERLAND; COSTA, 2003).

O desenvolvimento do câncer também pode estar relacionado a eventos epigenéticos. Eventos de hipo e hipermetilação do DNA promovem a sustentação para a relação entre ambiente, estado epigenético e câncer, que ocorrem ao longo do tempo, afetando seqüências repetitivas como elementos transponíveis (LAIRD, 2003). Tais eventos são observados principalmente em genes específicos como supressores de tumor, os quais podem representar fatores de risco importantes para o desenvolvimento do câncer (JOHANNING; HEIMBURGER; PIYATHILAKE., 2002; SCARANO et al., 2005).

A perda no controle do processo de metilação do DNA parece ocorrer em muitos tipos de cânceres humanos (STRATHDEE; BROWN, 2002; JIRTLE; SKINNER, 2007). Estudos têm evidenciado uma correlação inversa entre metilação das ilhas CpG e expressão gênica em células tumorais (POGRIBNY; JAMES, 2002). Diante disso, busca-se identificar o maior número possível de ilhas CpG de genes hipermetilados em câncer, na tentativa de definir um padrão único de hipermetilação para cada neoplasia (PAZ et al., 2003; FRAGA et al., 2004).

Mecanismos epigenéticos desregulados podem, também, dar origem a instabilidade genética, ocasionando mutações tanto em genes supressores de tumor quanto em oncogenes. Além disso, resíduos de m^5C podem provocar mutações afetando a estrutura e função de genes, visto que esta é altamente mutável por desaminação, podendo resultar em transições C→T (KANWAL; GUPTA, 2012).

Diversos genes supressores de tumor têm sido identificados como hipermetilados em vários tipos de câncer, como por exemplo, o inibidor da cinase dependente da ciclina 2A (CDKN2A), responsável por regular o número de células-

tronco e o ciclo celular, a proteína de ligação GATA 4 e 5 (GATA 4 e 5), de extrema importância para uma diferenciação epitelial adequada, E-caderina (CDH1) essencial para a adesão celular e a proteína cinase ligada a morte (DAPK), gene relacionado a apoptose (FUKUSHIGE; HORII, 2013).

Por outro lado, a perda global de metilação do DNA (hipometilação) é uma característica comum de células cancerosas e está relacionada com a ocorrência de instabilidade genômica e ativação de genes normalmente reprimidos ou com controle preciso, como fatores de transcrição e genes específicos da linhagem germinativa. A hipometilação também pode comprometer as funções de genes próximos através de interferência transcricional e potencialmente desencadear a mutagênese pela ativação de elementos transponíveis (PEREIRA et al., 2001; CEBOLA; PEINADO, 2012; TORAÑO et al., 2012).

1.4 CÂNCER GÁSTRICO

1.4.1 Epidemiologia

O adenocarcinoma gástrico continua a ser um fardo mundial como uma das principais causas de morte relacionada ao câncer em ambos os sexos (FERLAY et al., 2010; NOBILI; BRUNO; LANDINI, 2011; YAMASHITA et al., 2011; ZAGOURI et al., 2011). Representa a grande maioria dos tumores gástricos (90%), possui etiologia complexa e dependente de uma combinação de fatores ambientais (dieta e fumo), do hospedeiro (infecção por *Helicobacter pylori*) e fatores genéticos (SAUKKONEN et al., 2003; LOCHHEAD; EL-OMAR, 2008).

Apesar de extensos estudos terem sido realizados para identificar vias genéticas e genes envolvidos no desenvolvimento da doença e sua progressão, o prognóstico para pacientes com adenocarcinoma gástrico permanece pobre e poucos avanços foram alcançados na melhora da sobrevida a longo prazo (ZHENG et al., 2004).

É a quarta neoplasia maligna mais comum em todo o mundo e a segunda causa de óbitos por câncer (CREW; NEUGUT, 2006; GAO; NIETERS; BRENNER, 2008;

KIM et al., 2012). No Brasil, segundo o INCA, são esperados para o biênio de 2012/2013 12.670 novos casos de câncer de estômago em homens e 7.420 em mulheres, valores esses que correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e 7 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2011).

As taxas de incidência de adenocarcinoma gástrico podem ter variações de até dez vezes em todo o mundo. Apesar de Japão e Coreia apresentarem as maiores taxas de câncer gástrico no mundo, quase dois terços dos cânceres de estômago ocorrem em países em desenvolvimento. Áreas de alta incidência incluem o leste da Ásia, Europa Oriental e América do Sul e Central. Áreas de baixa incidência são encontradas no sul da Ásia, América do Norte e na África Oriental, Austrália e Nova Zelândia (CREW; NEUGUT, 2006).

Nas últimas décadas, a incidência global de adenocarcinoma gástrico vem reduzindo, sobretudo em países desenvolvidos (OLIVEIRA et al., 2004). Esse fato pode ser explicado pelas mudanças nos hábitos alimentares, como a diminuição da ingestão de alimentos salgados e defumados, no uso de antibióticos, mudanças no consumo de alimentos refrigerados, maior utilização de exames preventivos e também a erradicação da *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (HOWSON; HIYAMAI; WYNDER, 1986; DRUMM; ROLAND, 2003; JOHNSON; EVERS, 2008).

1.4.2 Fatores Etiológicos

Por mais que o câncer possa ser considerado uma doença genética, já que é desencadeado por alterações no DNA, ao contrário das demais síndromes genéticas humanas, este não tem necessariamente um caráter hereditário. Em média 90% dos casos de câncer não possuem antecedente familiar (YAGHOUBI; BIJARCHI; NAROD, 2010). Desta forma, as alterações responsáveis por ocasionar tumores ocorrem em células somáticas, portanto não sendo transmitidas aos descendentes (ZHOU et al., 2009).

Diversos trabalhos com adenocarcinoma gástrico mostraram que este é resultante de complexas interações gene-ambiente (HUDLER, 2012). Vários fatores de riscos foram identificados para este tumor, tais como: infecção por *H. pylori*, baixo

nível socioeconômico, tabagismo, consumo de alimentos salgados e defumados, baixo consumo de frutas e vegetais e fatores hereditários (KOBAYASHI et al., 2002; BAE; LEE; GUYATT, 2008; LADEIRAS-LOPES et al., 2008; YU et al., 2008).

A prevalência da infecção por *H. pylori* varia de acordo com o desenvolvimento das nações, sendo de 30% em países desenvolvidos e de até 80% em países em desenvolvimento (**Figura 4**) (MALATY, 2007; ALBAKER, 2011).

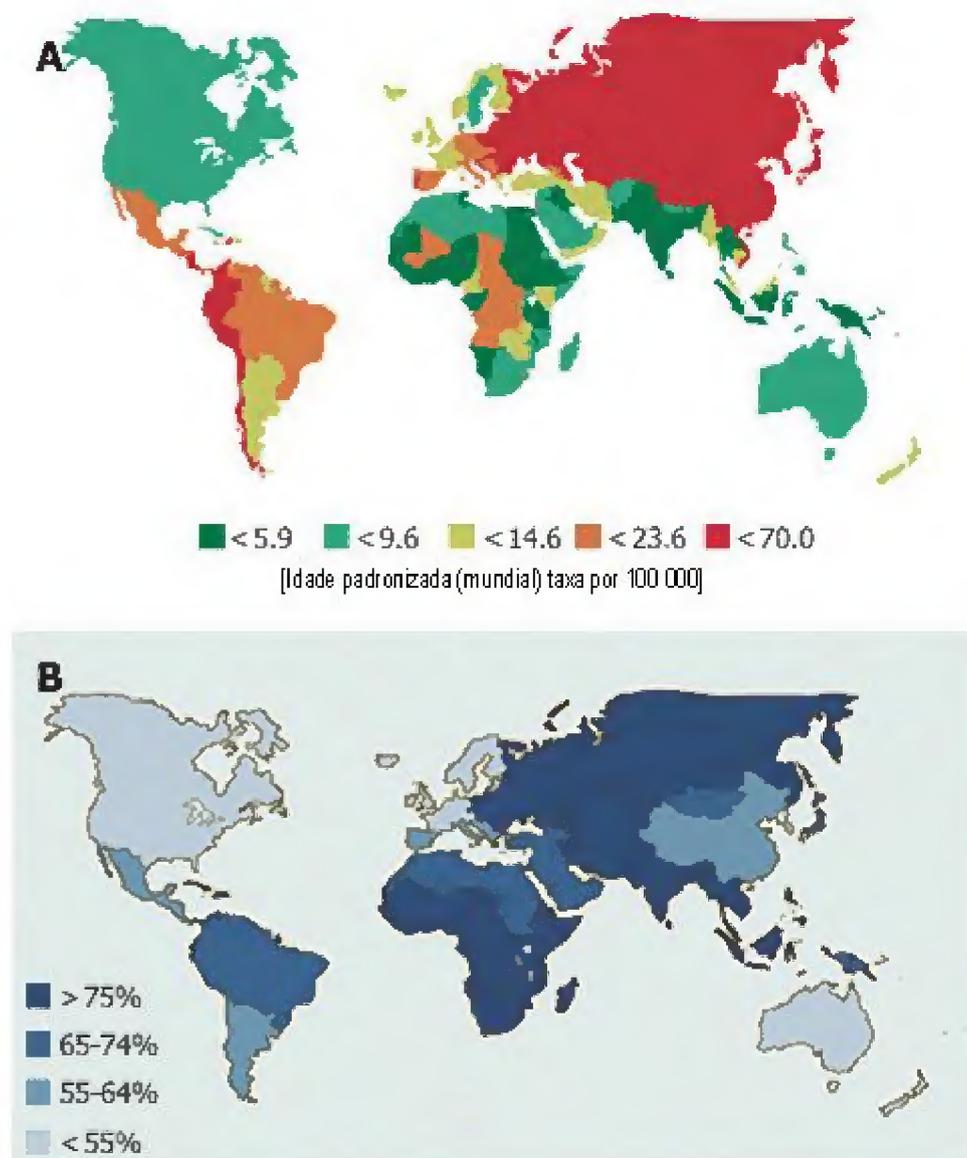


Figura 4: (A) Incidência de adenocarcinoma gástrico em integrantes do sexo masculino. (B) Prevalência da infecção por *H. pylori* em adultos assintomáticos. Fonte (adaptado): CREW; NEUGUT, 2006.

O *H. pylori* é um microorganismo que se concentra especificamente no epitélio gástrico e é considerada a infecção bacteriana mais comum no planeta, sendo considerada um carcinógeno tipo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC - International Agency For Research on Cancer) em 1994 (SUZUKI; SHIOTA; YAMAOKA, 2012).

Apesar da infecção por *H. pylori* ser o maior fator de risco para o câncer de estômago, esta por si só, não é capaz de explicar completamente a distribuição mundial da doença. É muito importante avaliar os efeitos da *H. pylori* em conjunto com outros fatores, como por exemplo, a ingestão de sal, no desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico (WANG; TERRY; YAN, 2009).

No modelo proposto por Correa (1996) da carcinogênese gástrica, a infecção por *H. pylori* desencadeia uma cascata progressiva de lesões indo desde gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal, displasia até finalmente, adenocarcinoma gástrico (CORREA, 1996). Com o passar do tempo, a mucosa infectada por *H. pylori*, irá passar diversas vezes por processos de regeneração. Seguindo durante anos nesse constante ciclo de dano-reparação, poderá ocorrer o desenvolvimento gradual de atrofia gástrica e metaplasia intestinal, posteriormente resultando em adenocarcinoma (PANDEY et al., 2010).

A *H. pylori* induz a expressão de genes associados à inflamação, incluindo a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (NAUMANN, 2001), um fator de transcrição regulador essencial em muitos processos celulares, como o controle da resposta imune e inflamação (LAIA et al., 2008), além de desempenhar um papel importante na proliferação do adenocarcinoma gástrico via expressão de COX-2 (LIM et al., 2000).

Hábitos alimentares são conhecidos fatores etiológicos para o desenvolvimento de tumores gástricos. Historicamente, o sal tem sido utilizado para a conservação de diversos tipos de alimentos, em especial carnes, sendo que sua utilização excessiva tem sido associada com a maior incidência e mortalidade por adenocarcinoma gástrico (GUGGENHEIM; SHAH, 2013). Uma hipótese para o potencial efeito do consumo exagerado de sal na carcinogênese gástrica seria a de que este contribui para a alteração da viscosidade do muco protetor do estômago, potencializando a exposição à

carcinógenos como compostos N-nitrosos e conduzindo à morte celular (TATEMATSU et al., 1975; SHIKATA et al., 2006).

Com as melhorias na conservação de alimentos e nos sistemas de refrigeração, tem-se observado uma diminuição na incidência de tumores gástricos (PARK et al., 2011), sendo este associado, nos EUA e Europa, com a propagação do consumo de alimentos refrigerados, uma alternativa a conservação de alimentos com sal (FUCCIO; EUSEBI; BAZOLLI, 2010).

Enquanto evidências consideráveis relacionam o consumo de sal e de alimentos salgados com o aumento do risco de câncer, é sugerido que o consumo de vegetais não amiláceos e frutas contribui para a diminuição desse risco (TSUGANE; SASAZUKI, 2007). Elevada ingestão de antioxidantes, tais como vitaminas C e E e β -caroteno, podem ter um efeito protetor sobre o risco de adenocarcinoma gástrico. Altos níveis séricos de α -caroteno, β -caroteno, licopeno e vitamina C foram significativamente associados com risco reduzido de câncer gástrico em Xangai e China (YUAN et al., 2004).

Um grande número de estudos encontrou uma correlação positiva entre o tabagismo e o desenvolvimento de tumores gástricos, sendo que seu risco é aumentado em 60% em fumantes do sexo masculino e 20% no sexo feminino, em comparação a não fumantes (LADEIRAS-LOPES et al., 2008). As taxas de morte por câncer de estômago são consistentemente mais elevadas em homens e mulheres que utilizam qualquer produto a base de tabaco do que em ex-usuários e não fumantes, sendo que aumentos significativos do risco foram associados com o uso de produtos derivados do tabaco em homens e com o consumo de cigarros em mulheres (CÉSAR; SILVA; TAJARA, 2002).

1.4.3 Classificação Histopatológica

A classificação mais utilizada e mais difundida do câncer gástrico foi criada por Lauren (1965). Ele distingue dois tipos principais de carcinoma gástrico com base na característica histológica: o tipo intestinal (bem diferenciado) e difuso (pobremente diferenciado). Dependendo dos critérios de classificação e da população estudada, a

proporção de câncer intestinal e difuso varia (STEMMERMANN et al., 2002; VAUHKONEN; VAUHKONEN; SIPPONEN, 2006; PIAZUELO; EPPLEIN; CORREA, 2010). Esta classificação é muito utilizada por patologistas, epidemiologistas e clínicos de forma rotineira para a avaliação do adenocarcinoma gástrico, principalmente com relação a sua incidência e etiologia, embora com valor limitado em relação a decisões terapêuticas (YAKIREVICH; RESNICK, 2013). A classificação mais recente é baseada na expressão de mucina e distingue três tipos de adenocarcinoma gástrico: o tipo difuso (tipo-D), o tipo intestinal (tipo-I), e o tipo misto difuso e intestinal (tipo-DI) (FIOCCA et al., 1987; TATEMATSU et al., 1990; TATEMATSU; TSUKAMOTO; INADA, 2003).

A forma intestinal tem sua origem nas células da mucosa gástrica que sofreram metaplasia para células do tipo intestinal (GUGGENHEIM; SHAH, 2013). Tumores intestinais são compostos de células malignas que estão unidas para formar estruturas semelhantes à glândulas funcionais do trato gastrointestinal. Sua evolução tem sido caracterizada através de uma série de passos sequenciais (**Figura 5**). Essas etapas iniciam-se com a gastrite, que evolui para atrofia da mucosa (gastrite atrófica), seguida por metaplasia intestinal, displasia e carcinoma com disseminação metastática subsequente (SMITH et al., 2006). Este é o padrão de câncer mais diferenciado, e representa o tipo mais comum em populações de grande risco (SHIBATA et al., 2003).

Acredita-se que a forma difusa origina-se a partir de células nativas da mucosa gástrica, e tende a ser pouco diferenciada. Pode apresentar desmoplasia pronunciada e inflamação com relativa proteção da mucosa sobrejacente. Em comparação com o câncer gástrico do tipo intestinal, o tipo difuso está menos relacionado a influências ambientais, têm aumentado em incidência, ocorre com mais frequência em pacientes jovens e possui um pior prognóstico (DICKEN et al., 2005).

No tipo misto (tipo-DI) as células gástricas são encontradas compartilhando as mesmas glândulas metaplásicas com células do fenótipo intestinal em várias combinações. A mistura dos fenótipos gástrico e intestinal ocorre em nível celular, bem como em nível glandular, envolvendo células do fenótipo difuso em conjunto com o fenótipo intestinal (TATEMATSU; TSUKAMOTO; INADA, 2003).

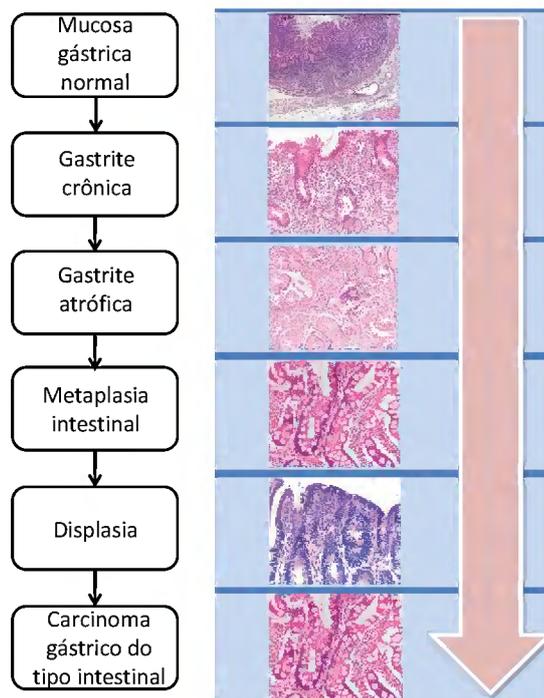


Figura 5: Evolução do câncer gástrico do tipo intestinal em múltiplos passos. Fonte (adaptado): HARTGRINK et al., 2009

1.4.4 Fatores Genéticos e Epigenéticos Associados

Diversos mecanismos moleculares são relatados na carcinogênese gástrica, tais como alterações em oncogenes, genes supressores tumorais, moléculas de adesão celular, entre outros. Além disso, a instabilidade genética e as alterações nos fatores de crescimento e citocinas contribuem para a complexidade das vias envolvidas na carcinogênese gástrica (SMITH et al., 2006).

Os eventos genéticos que podem conduzir à expressão de genes alterados incluem, amplificação de genes, deleções e mutações em regiões codificadoras ou em regiões reguladoras. Em tumores gástricos, amplificação gênica e aumento na expressão foram observadas em diversos oncogenes como o ERBB2, MET ou FGFR2 (TAHARA, 2004). Entre os genes que sofrem mutação, vários, tais como o EBB2, PTGS2/COX-2 e EGFR, estão sendo considerados como possíveis alvos para a terapia do adenocarcinoma gástrico (LYNCH et al., 2005).

Além de anormalidades genéticas envolvidas na patogênese do adenocarcinoma gástrico outro mecanismo freqüente de inativação gênica é o silenciamento epigenético por metilação do DNA.

A metilação aberrante de ilhas CpG resulta em inibição transcricional de genes e é um mecanismo para inativação de genes supressores de tumor em câncer gástrico e outros tumores, sendo que a medida que o câncer se desenvolve, ocorre um aumento no número de genes metilados, sugerindo uma correlação entre a progressão tumoral e padrões de metilação definidos (VARIS; ZAIKA; PUOLAKKAINEN, 2004; PARK, 2010).

Entre os diversos genes que tem sido identificados como metilados em câncer gástrico, os genes CDKN2A, MLH1, CDH1, RUNX3, APC, MGMT, RASSF1A e DAPK tem sido amplamente estudados (**Tabela 1**) (ZHENG et al., 2004; YASUI et al., 2005; ZHAO; BU, 2012).

Tabela 1: Genes identificados como metilados em câncer gástrico (ZHAO; BU, 2012)

Genes	Principal função	Frequência
CDKN2A	Inibidor CDK	30%~40%
MLH1	Reparo de pareamento errôneo	25%~32%
CDH1	Supressor de metástase	40%~50%
RUNX3	Sinalizador TGF-beta	40%~71%
APC	Regulador de adesão celular	53%~84%
MGMT	Reparo de DNA	16%~23%
DAPK	Regulador de apoptose	41%~70%
RASSF1A	Inibidor G1/S	59%~67%

Diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e alterações de expressão em genes que codificam moléculas envolvidas no processo inflamatório tais como citocinas e a Ciclooxigenase-2 (COX-2) têm sido associados com o risco de câncer gástrico entre diversas populações e podem ser utilizados como indicadores úteis para avaliar o risco de câncer gástrico (LOH et al., 2009; BURADA et al., 2012; FELIPE et al., 2012).

1.5 O GENE COX-2

A Ciclooxigenase (COX) é uma enzima responsável pela formação de importantes mediadores biológicos, que utiliza o ácido araquidônico como substrato, convertendo-o em prostaglandina H_2 por uma reação em duas etapas (**Figura 6**) (COHEN et al., 2003; GOLIJANIN et al., 2004; JANG, 2004).

Possui três isoenzimas identificadas – COX-1, COX-2, COX-3. A COX-3 é uma variante da COX-1, e por isso alguns preferem a denominação COX-1b ou COX1-variante (COX1v). As outras duas isoformas, COX-1 e COX-2, diferem principalmente no seu padrão de expressão, e embora atuem basicamente da mesma maneira, elas possuem uma semelhança de 61% na sequência de aminoácidos (WANG; HONN; NIE, 2007).

A COX-1 é uma enzima presente em quantidades relativamente constantes na maioria das células, embora possa ser regulada sob certas condições. Por outro lado, a COX-2 não é normalmente expressa nas células, sendo rapidamente induzida por mensageiros intercelulares, incluindo fatores de crescimento, mediadores de inflamação e promotores de tumor (CHA; SOLNICA-KREZEL; DUBOIS, 2006).

O gene COX-2 é caracterizado pela presença de um TATA Box e uma multiplicidade de sítios de ligação para fatores de transcrição na sua região promotora, que são responsáveis pela regulação complexa de sua expressão. Além disso, uma longa região 3' não traduzida, atua como determinante da instabilidade do mRNA ou como elemento inibidor da tradução, o que sugere o controle pós-transcricional da expressão de COX-2 (MINGHETTI, 2004).

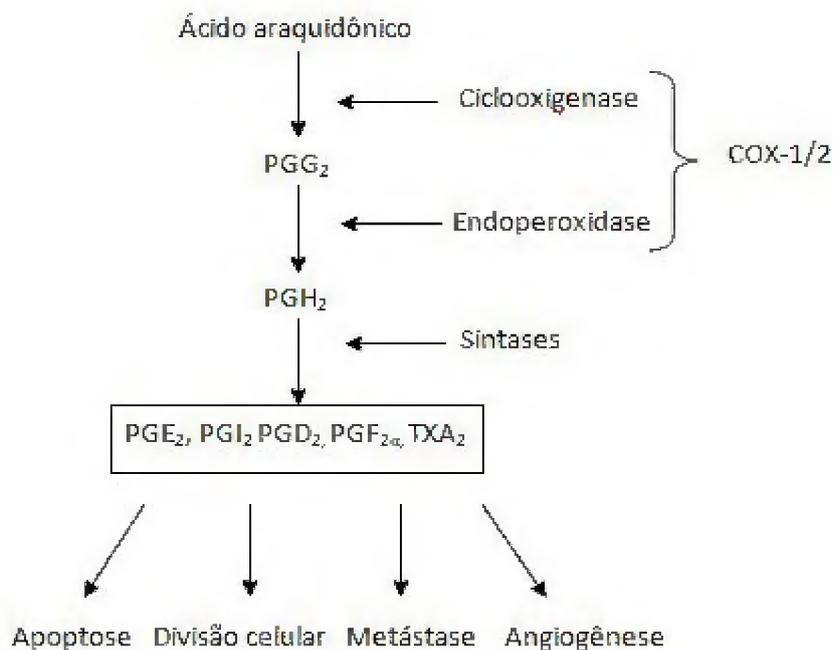


Figura 6: Papel da Ciclooxigenase 2 no desenvolvimento do câncer.

Fonte: GRÖSCH et al., 2006

A hiperexpressão de COX-2 pode acelerar o reparo da mucosa gástrica pela indução da proliferação celular epitelial e inibição da apoptose. Porém, a estimulação excessiva de COX-2 no epitélio gástrico pode provocar lesões pré-malignas além de ser responsável pela progressão e ocorrência de adenocarcinoma e indicar uma tendência em direção a um padrão de crescimento agressivo antes mesmo da ocorrência de grandes alterações cromossômicas (MRENA et al., 2010; YAN et al., 2013).

O aumento dos níveis de COX-2 está presente na progressão da gastrite atrófica a metaplasia intestinal e adenocarcinoma do estômago (YUAN et al., 2004). Vários estudos sugeriram que esta enzima pode ser um fator importante na carcinogênese gástrica, sendo sua expressão relacionada ao tipo histológico intestinal, grandes formações tumorais e estágio avançado (MRENA et al., 2005; WU et al., 2005; SCHILDBERG et al., 2013). Além disso, exposição a fumaça de cigarro, condições ácidas no compartimento gástrico e infecções por *H. pylori* também podem induzir a expressão de COX-2 (SHIRVANI et al., 2000).

A relação entre a expressão de COX-2 e a carcinogênese gástrica pode ser observada no trabalho de Shin et al. (2004) que identificaram, em uma linhagem de adenocarcinoma gástrico, o aumento dos níveis de COX-2 e MYC. Posteriormente ao tratamento com inibidores de COX-2, verificou-se uma diminuição na expressão de MYC e da proliferação celular. Quando realizado o bloqueio apenas do MYC, houve uma diminuição da proliferação celular sem interferir nos níveis de COX-2, revelando assim que a COX-2 participa do processo de carcinogênese gástrica em uma etapa anterior ao MYC.

O mecanismo de hiperexpressão da COX-2 tem sido amplamente estudado e as vias de transdução de sinais que induzem a sua expressão incluem a via PI3K/Akt/GSK-3 β , proteínas cinases ativadas por mitógenos, a via sinalizadora Notch1 e o fator nuclear- κ B. Recentemente, foi identificada a regulação da expressão de COX-2 por microRNAs (miRNAs), como o miR-101 (RESENDE et al., 2011).

A hiperexpressão de COX-2 está envolvida no desenvolvimento do câncer através da promoção da divisão celular, inibição da apoptose, alteração na adesão celular e estimulação da neovascularização e metástase (GRÖSCH et al., 2006). Muitos trabalhos relatam que a hiperexpressão de COX-2 em células cancerosas estimula a angiogênese por meio da prostaglandina E (PGE₂), visto que sua produção resulta na indução do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos (bFGF) (AMIR; AGARWAL, 2005). A inibição da apoptose através da COX-2, favorece o crescimento neoplásico ao permitir que células tumorais sobrevivam durante um tempo prolongado e assim multipliquem-se um maior número de vezes (MASSFERRER et al., 2000; CHEN et al., 2005).

Nos últimos anos, vários resultados tem sugerido que além dos mecanismos genéticos de regulação transcricional do gene, alterações epigenéticas, como a metilação do DNA e acetilação de histonas, afetam a expressão de COX-2 pela modificação da estrutura da cromatina. Em células cancerosas que não expressam a COX-2, foi detectada uma densa metilação da região 5' do gene, indicando que a metilação desempenha um papel importante na regulação do mesmo (GREENHOUGH et al., 2009).

A hipermetilação do gene COX-2 pode suprimir os efeitos de fatores de regulação e fatores de crescimento, devido a inativação de elementos de ligação na

região promotora. A supressão da enzima resulta em diminuição dos níveis de prostaglandina E2 e citocinas promotoras de tumores, além de aumentar a imunidade celular (MAAT et al., 2007).

1.6 MODELOS ANIMAIS

Modelos experimentais que representem com precisão as alterações celulares e moleculares associadas com a iniciação e a progressão do câncer são, de extrema importância, embora algumas espécies sejam mais adequadas para aplicações específicas (MOGNETTI; DI CARLO; BERTA, 2008).

Diversas vantagens estão presentes na avaliação do risco de câncer humano a partir de estudos com modelos animais, visto que estes podem ser utilizados em testes pré-clínicos de novos agentes farmacêuticos antes de serem testados em seres humanos, devido a similaridades entre espécies na biologia dos processos de doença; na avaliação de potenciais agentes tóxicos e cancerígenos em nosso ambiente; e na eliminação da necessidade de esperar por uma alta incidência de tumores humanos antes de serem implementadas estratégias de proteção à saúde pública (MELNICK; THAYER; BUCHER, 2008).

Há diversos elementos necessários para a obtenção de um modelo animal ideal, entre eles: o modelo deve possuir relevância para tumores humanos, no que diz respeito a produzir lesões cancerosas de patologia semelhante; as anormalidades genéticas observadas nas lesões devem possuir similaridade com as que são observadas em humanos; o modelo deve apresentar lesões intermediárias que simulem ou se aproximem do processo carcinogênico que ocorre em humanos, tanto molecular quanto histologicamente (STEELE; LUBET, 2010)

A utilização de grandes animais, como os primatas não-humanos, para experimentos de carcinogênese tem grande importância devido sua estreita relação filogenética com os seres humanos, e maiores semelhanças no que diz respeito à anatomia, fisiologia e bioquímica se comparados com roedores e outros mamíferos. Procedimentos diagnósticos como biópsias, coleta de amostras de sangue e endoscopias, são facilitados graças ao tamanho relativamente grande dos órgãos, sendo possível

realizar este tipo de procedimento repetidas vezes durante um longo período de tempo no mesmo animal. Além disso, a longevidade dos primatas não-humanos permite que esses animais sejam expostos a carcinógenos durante longos períodos, comparáveis ao que ocorre nos seres humanos (TAKAYAMA; THORGEISSON; ADAMSON, 2008).

Diversos tipos de substâncias são capazes de promover o desenvolvimento de tumores, agindo como agentes carcinogênicos. Carcinógenos químicos causam alterações genéticas e epigenéticas em células, transmitindo uma vantagem de crescimento seletivo, resultando em células genômicamente instáveis, que podem sofrer expansão clonal e se transformar em células neoplásicas (LOEB; HARRIS, 2008).

Entre essas substâncias, destacam-se os compostos N-nitrosos, que de acordo com a sua estrutura química podem ser divididos em dois grupos principais: N-nitrosaminas e N-nitrosamidas. Estes grupos se caracterizam por um grupo nitroso ligado a um átomo de hidrogênio e são formados pela reação de aminas ou amidas com um composto de nitrito (DIETRICH et al., 2005). Os compostos N-nitrosos estão presentes em diversos alimentos consumidos pelo homem, como carnes e peixes. O nitrito de sódio também é utilizado como corante e meio de conservação de carnes. As N-nitrosaminas também podem ser produtos da nicotina, cujo consumo pode predispor ao câncer (SUTANDYO, 2010).

O N-metil-N-nitrosurea (MNU) (**Figura 7**) pertence a classe das nitrosamidas e tem ação cancerígena direta sobre o organismo, induzindo tumores em diversas espécies e em muitos órgãos diferentes, como por exemplo, o sistema nervoso central, estômago, intestino, rim e pele (TARSO et al., 2011; YOSHIZAWA et al., 2013). É um potente agente mutagênico químico, podendo realizar a metilação do DNA através da reação com o nitrogênio, ocorrendo principalmente na posição N⁷ da metil-Guanina (N⁷MeG) e com o oxigênio na posição O⁶-Guanina (O⁶-G) formando a O⁶-metil-Guanina (O⁶-MeG) (FEITSMA; AKAY; CUPPEN, 2008).

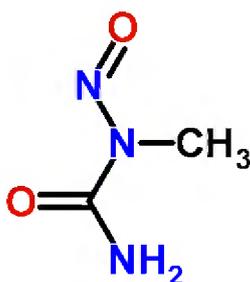


Figura 7: Estrutura química do MNU. Fonte: CHEMSPIDER, 2013

A indução de lesões O6-MeG por agentes alquilantes possui grande importância biológica, pois a O6-MeG pode sofrer um pareamento equivocado com uma timina (T) durante a replicação do DNA, causando muitos dos danos mutagênicos e citotóxicos atribuídos aos agentes alquilantes (FU; CALVO; SAMSON, 2012). Diante disto, o mecanismo de reparo de pareamento errôneo (MMR- mismatch repair) é ativado, realizando a retirada da T inserida. Com a permanência da O6MeG, uma nova T é incorporada em oposição, portanto, dando origem a uma nova tentativa de reparo. Após várias tentativas, denominadas de Loop de reparo fútil (futile repair loop), podem ocorrer quebras na dupla fita, levando posteriormente a apoptose (**Figura 8**) (KONDO; ISSA, 2010).

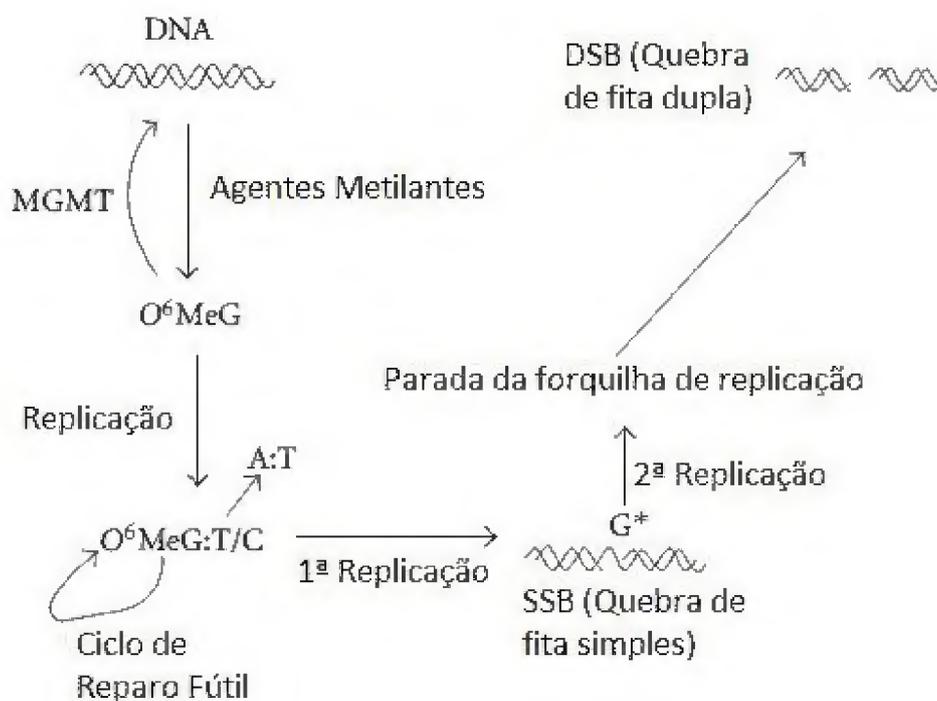


Figura 8: Mecanismo de ação de agentes metilantes no DNA: o agente realiza a metilação do oxigênio 6, culminando na incorporação errada de uma T, no lugar de uma C. O sistema de reparo MMR remove a base inserida erroneamente, porém, esta é reinsertada em oposição ao O6-MeG persistente, dando origem a uma sequência de ciclos fúteis e posteriormente a quebra da fita dupla de DNA. Fonte (adaptada): KONDO; ISSA, 2010.

Apesar do MNU ter sido utilizado combinado com a ciclofosfamida no tratamento da doença de Hodgkin e carcinoma do pulmão indiferenciado em humanos, este composto foi capaz de induzir carcinomas no trato gastrointestinal superior em mais de um terço dos primatas não-humanos que receberam a substância. Isto sugere que o MNU exerce efeitos carcinogênicos diretos no trato gastrointestinal superior após a sua administração oral (TAKAYAMA; THORGEIRSSON; ADAMSON, 2008).

Como um produto do metabolismo da creatinina, o MNU é formado na presença de nitritos no ambiente gástrico ácido. A tumorigênese induzida pelo MNU é um modelo interessante para o estudo do câncer gástrico, pois o seu acúmulo leva ao desenvolvimento de vários tipos de tumores no trato digestivo, cavidade oral, faringe e principalmente esôfago e estômago de primatas não-humanos, gerando lesões pré-neoplásicas, antes do desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, geralmente na região do antro do estômago dos animais tratados (COSTA et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de metilação e expressão do gene COX-2 em amostras de mucosa gástrica – nos diferentes estágios da patogênese do câncer de estômago do tipo intestinal – em um modelo experimental desenvolvido em primatas da espécie *Sapajus apella*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o promotor do gene COX-2 em primatas da espécie *Sapajus apella*;
- Avaliar o perfil de metilação do gene COX-2 nas amostras coletadas;
- Avaliar por imunohistoquímica, o perfil de expressão do gene COX-2 nos diferentes estágios do processo carcinogênico induzido por MNU em *Sapajus apella*;
- Correlacionar o perfil de expressão protéica com o perfil de metilação de COX-2 nos diferentes estágios do processo carcinogênico induzido por MNU em *Sapajus apella*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Seis primatas adultos da espécie *Sapajus apella* foram tratados com MNU (N1517 Sigma-Aldrich, USA) durante dois anos e meio. Os animais tinham entre seis e sete anos e pesavam entre 2,7 e 3,6 kg, sendo considerados saudáveis ao início do estudo após uma avaliação veterinária. Durante todo o tempo de tratamento com a droga, ficaram sob os cuidados do Centro Nacional de Primatas (CENP) localizado em Belém, na rodovia BR-316 – Km 7, identificados por microchips, submetidos a uma dieta balanceada, não enriquecida com cloreto de sódio, e pesados diariamente.

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

Após a biópsia e a análise histopatológica, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular, da Universidade Federal do Pará (UFPA) para análises moleculares. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE) da UFPA, sob protocolo: MED-002-13 (Anexo 1).

3.1.1 Extração de DNA e Sequência Genômica

O tecido gástrico coletado foi utilizado para a obtenção de DNA por meio do QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, foi realizada a quantificação no NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 (Thermo Scientific).

A sequência genômica para a região promotora do gene COX-2 de *S. apella* foi obtida a partir de iniciadores desenhados utilizando-se regiões conservadas das sequências de *Homo sapiens* (Código de acesso GenBank: NG_028206) e *Saimiri boliviensis* (Código de acesso GenBank: AGCE_01110177)

Foi realizada primeiramente uma reação em cadeia da polimerase (PCR) apenas com amostras de mucosa gástrica normal. A reação teve volume final de 25 µl contendo: 50 ng de DNA molde, 10 pM de cada um dos iniciadores, 0,20 mM de cada dNTP, 2,5 mM MgCl₂ e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™).

Após a PCR, os fragmentos obtidos foram seqüenciados utilizando o sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa BioEdit (HALL, 2011), juntamente com as mesmas sequências da literatura utilizadas no desenho dos iniciadores. As análises da região promotora foram realizadas comparando a sequência de *S. apella* obtida com a de humanos, utilizando o programa Transcriptional Factor Search (TFsearch) (HEINEMEYER, et al, 1998) para a identificação de sítios de ligação de fatores de transcrição e de elementos cis-regulatórios.

3.1.2 Modificação do DNA

Para análise do padrão de metilação foi utilizada a técnica de modificação pelo bissulfito de sódio, que converte citosinas não metiladas em uracilas, conservando o estado original das citosinas metiladas (5-metilcitosinas) (**Figura 9**) (HERMAN et al., 1996; HAYATSU, 2008).

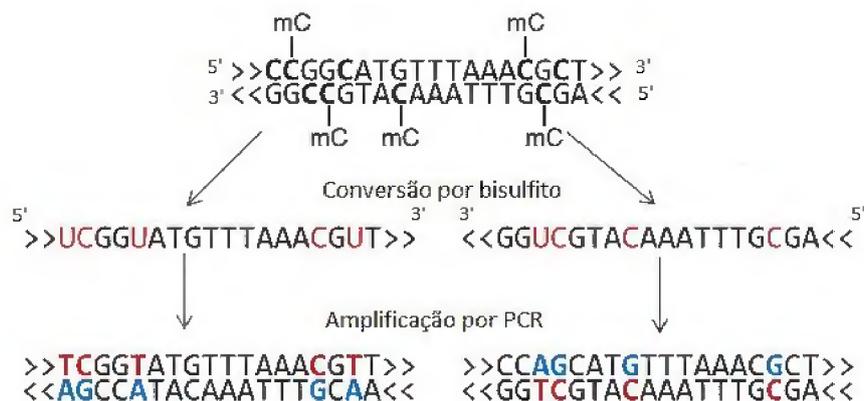


Figura 9: Método de modificação do DNA com bissulfito. Fonte: KRUEGER et al., 2012

Inicialmente, 2 μg de DNA genômico foram desnaturados por tratamento com NaOH (concentração final de 0,2 M) por 10 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 30 μl de hidroxiquinona 10 mM e 520 μl de bissulfito de sódio 3M e as amostras incubadas por 16 horas para que ocorressem as modificações na molécula de DNA. As amostras foram então purificadas, utilizando-se o Wizard DNA purification Kit (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras passaram por um tratamento com NaOH (concentração final de 0,3 M), seguido de precipitação com etanol. O DNA obtido foi ressuspendido em 50 μl de água ultra - pura e armazenado a -20°C até o uso.

3.1.3 PCR metilação específica (MSP)

Este procedimento associa o tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio com a amplificação por PCR utilizando iniciadores específicos contendo pelo menos um sítio CpG (**Figura 10**).

A reação de PCR possuía volume final de 25 μl contendo: 2 μl de DNA modificado, 10 pM de cada iniciador, 0,20 mM de dNTP, 2,5 mM MgCl_2 e 0,5 U de Taq DNA polymerase. Os iniciadores para MSP foram desenhados a partir da sequência genômica de COX-2 para *S. apella* utilizando-se o programa Methyl Primer Express

Software v1.0 (Applied Biosystem). Para cada amostra foi realizada uma reação com o par de iniciador metilado e outra com o par de iniciador não metilado. A PCR foi realizada utilizando a estratégia de Hot Start, iniciando-se com um ciclo de 95°C por 5 minutos antes da adição de Taq DNA polimerase (Invitrogen™). Após este estágio, foram efetuados 40 ciclos de 95°C por 30 segundo, 54°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e, por último, uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos das PCRs foram então visualizados em gel de agarose a 3% sob a luz UV. A presença de banda no gel na reação com par de iniciador metilado indicou amostra metilada. O inverso indicou amostra não metilada

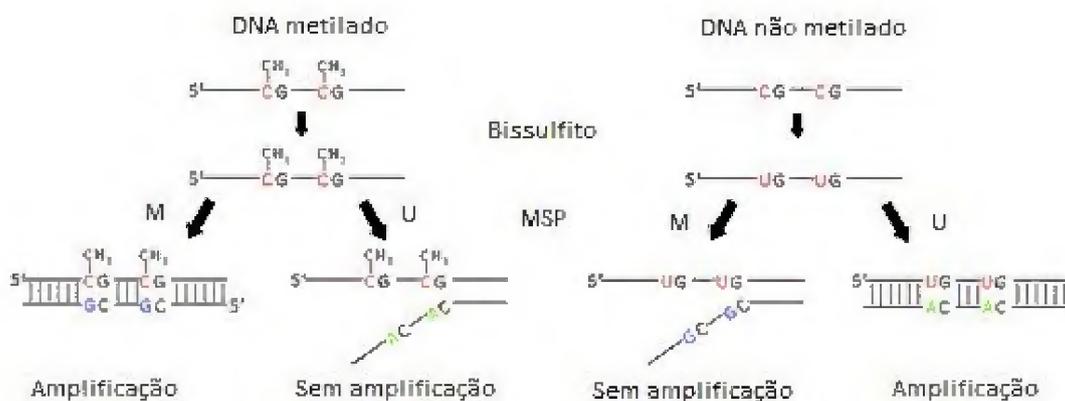


Figura 10: Técnica de PCR metilação específica (MSP). M = metilado. U = não metilado. Fonte (adaptado): ZHANG et al., 2009.

3.1.4 Imunohistoquímica

Com a finalidade de se avaliar a expressão do gene COX-2 em cada uma das amostras, foi realizado teste de imunohistoquímica. Para detecção da enzima COX-2 nas células tumorais, foi utilizado o anticorpo primário da marca Zymed®. O método imunohistoquímico adotado foi o da estreptavidina-biotina-peroxidase descrito por Hsu et al. (1981), com modificações.

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

O passo seguinte consistiu em uma recuperação antigênica das lâminas, durante o qual foi utilizado tampão citrato 10mM (pH 6), aquecidas em forno de microondas (± 99 °C), por 15 minutos. Após esse período, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena mergulhando-se as lâminas em um borel com peróxido de hidrogênio a 3%. Os cortes histológicos foram, então, cobertos por anticorpo primário diluído (1:60) e as lâminas incubadas (4-8°C) por 16 horas. A detecção foi realizada pelo sistema LSAB+ (DakoCytomation®), seguindo as recomendações do fabricante. A revelação pelo sistema DAB+ (3,3-diaminobenzidine) (DakoCytomation®), também foi realizada seguindo recomendações do fabricante.

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

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

4 RESULTADOS

4.1 Carcinogênese em *Sapajus apella*

Todos os animais utilizados neste trabalho desenvolveram lesões, porém apenas em um animal foi observada a presença do tumor gástrico do tipo intestinal. Os demais animais vieram a óbito antes do final do experimento, provavelmente devido a intoxicação por MNU, já que estes apresentaram vômitos e náuseas, sintomas característicos da intoxicação por esse agente.

Durante cada um dos exames de rotina para acompanhamento, foram coletadas amostras de tecido da mucosa gástrica. Um total de 20 amostras foram obtidas e posteriormente classificadas segundo as análises histopatológicas em mucosa normal, gastrite, gastrite atrófica, metaplasia e tumoral do tipo intestinal (**Tabela 2**)

Tabela 2. Amostras utilizadas e seus respectivos histopatológicos

TECIDO	NÚMERO DE AMOSTRAS
Mucosa Gástrica Normal	06
Gastrite	06
Gastrite Atrófica	05
Metaplasia Intestinal	02
Tumor (tipo intestinal)	01
TOTAL DE AMOSTRAS	20

4.2 Isolamento e caracterização da região promotora parcial de COX-2 em *Sapajus apella*

Como não está descrita na literatura a sequência promotora de COX-2 para *S. apella*, iniciadores para a região promotora foram desenhados a partir de regiões

conservadas das sequências de *Saimiri boliviensis* (Código de acesso GenBank: AGCE_01110177) e *Homo sapiens* (Código de acesso GenBank: NG_028206).

Realizando a comparação de sequência flanqueada pelos iniciadores de *S. boliviensis* com a de *Homo sapiens*, foi observada, em um fragmento de 1.060 e 1.188 pb, respectivamente, uma similaridade de 76,1%, com a presença de 144 gaps e 141 mudanças (81 transições e 60 transversões), sendo considerada uma região conservada do gene (**Figura 11**). Na **Figura 12** podemos observar a região flanqueada pelos iniciadores na sequência de *S. boliviensis*.

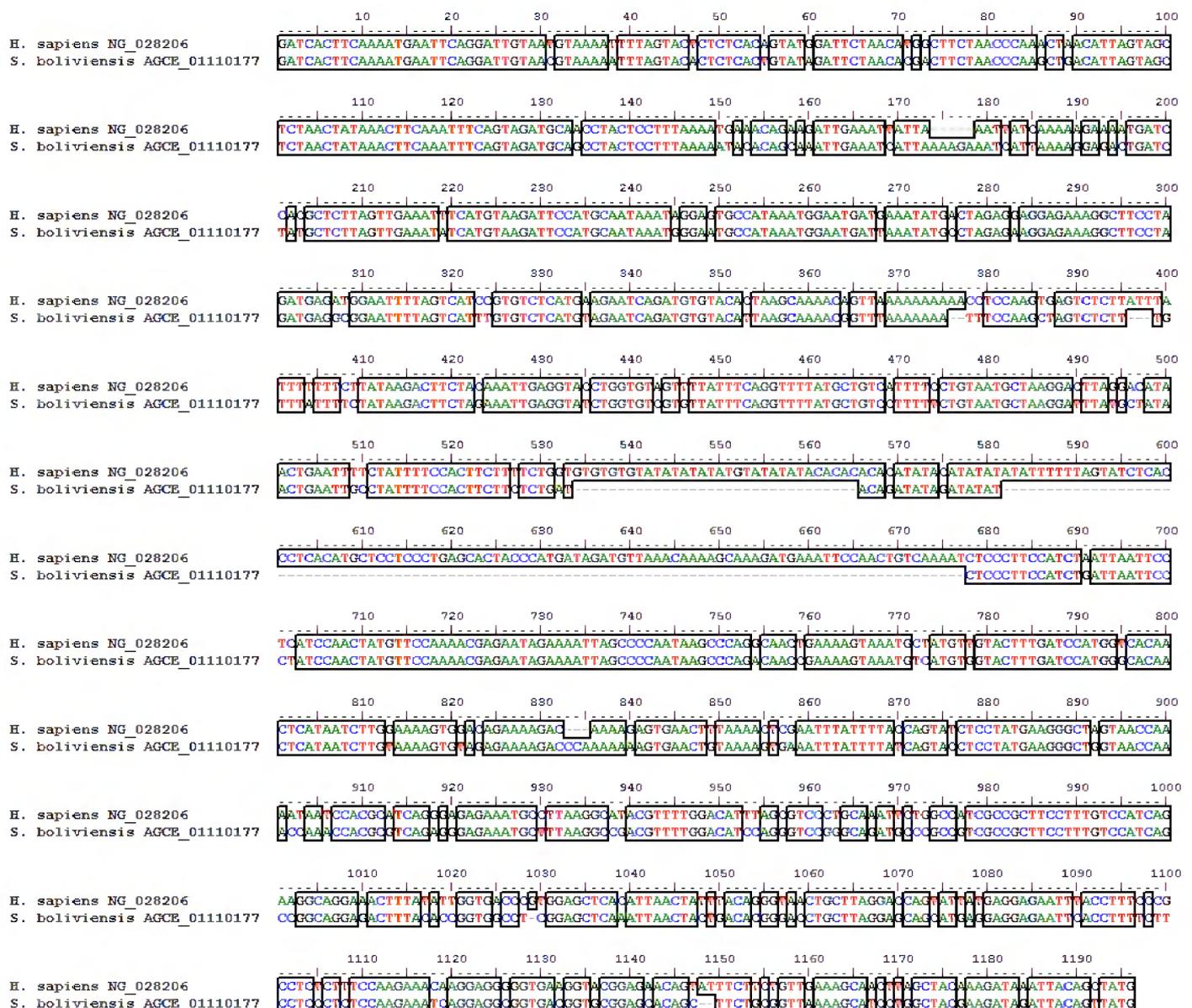


Figura 11: Alinhamento nucleotídico entre as sequências promotoras de COX-2 de *Homo sapiens* e *Saimiri boliviensis*. Os nucleotídeos em destaque indicam sequências idênticas entre as duas espécies.

```

1  GATCACTTCAAAATGAATTCAGGATTGTAACGTAAAAATTTAGTACACTC 50
51  TCACTGTATAGATTCTAACACGACTTCTAACCCAAGCTGACATTAGTAGC 100
101 TCTAACTATAAACTTCAAATTTCACTAGATGCAGCCTACTCCTTTAAAAA 150
151 TACACAGCAAATTGAAATCATTAAAAGAAATCATTAAAAGGAGACTGATC 200
201 TATGCTCTTAGTTGAAATATCATGTAAGATTCCATGCAATAAATGGGAAT 250
251 GCCATAAATGGAATGATTAATATGCCTAGAGAAGGAGAAAGGCTTCCTA 300
301 GATGAGGCGGAATTTTAGTCATTTGTGTCTCATGTAGAATCAGATGTGTA 350
351 CATTAAGCAAAACGGTTTAAAAAAATTTCCAAGCTAGTCTCTTTGTTTAT 400
401 TTTCTATAAGACTTCTAGAAATGAGGTATCTGGTGTCGTGTTATTTTCAG 450
451 GTTTTATGCTGTCTTTTTCTGTAATGCTAAGGATTTATGCTATAACTGA 500
501 ATTGCCTATTTTCCACTTCTTCTCTGATACAGATATAGATATATCTCCCT 550
551 TCCATCTGATTAATTCCTATCCAACATGTTCCAAAACGAGAATAGAAA 600
601 ATTAGCCCAATAAGCCCAAGACAACCGAAAAGTAAATGTCATGTGGTACT 650
651 TTGATCCATGGGCACAACCTATAATCTTGTAAGTGTAGAGAAAAGACC 700
701 CAAAAAAGTGAACGTAAAAGTAAATTTATTTTATCAGTACCTCCTAT 750
751 GAAGGGCTGGTAACCAAACCAACACGCGTCAGAGGGAGAAATGCTTTA 800
801 AGGCCGACGTTTTGGACATCCAGGGTCCGGGCAGATGCCCGCCGTCGCCG 850
851 CTTCCCTTTGTCCATCAGCCGGCAGGAGACTTTACACCGGTGGCCTCGGAG 900
901 CTCAAATTAACTACTGACACGGGACCTGCTTAGGAGCAGCATGAGGAGGA 950
951 GAATTCACCTTTTCTTCCCTCTCCAAGAAATCAGGAGGCGGTGACGG 1000
1001 TGCGGAGCACAGCTTCTGCGGTTAAAAGCATCCTGGCTACGAAGATAGAT 1050
1051 TACAGTTATG 1060

```

Figura 12: Sequência nucleotídica do promotor de COX-2 de *S. boliviensis* flanqueada pelos iniciadores (em destaque) desenhados para o presente trabalho.

A partir de uma PCR utilizando os iniciadores desenhados, foi obtido um fragmento de 675 pb do promotor de COX-2 de *S. apella* (**Figura 13**). Quando comparado com os fragmentos de *H. sapiens* e *S. boliviensis*, foi observada uma similaridade de 99,2% (4 transições e 1 transversão) e 68,2% (134 gaps, 44 transições e 37 transversões) entre eles, respectivamente.

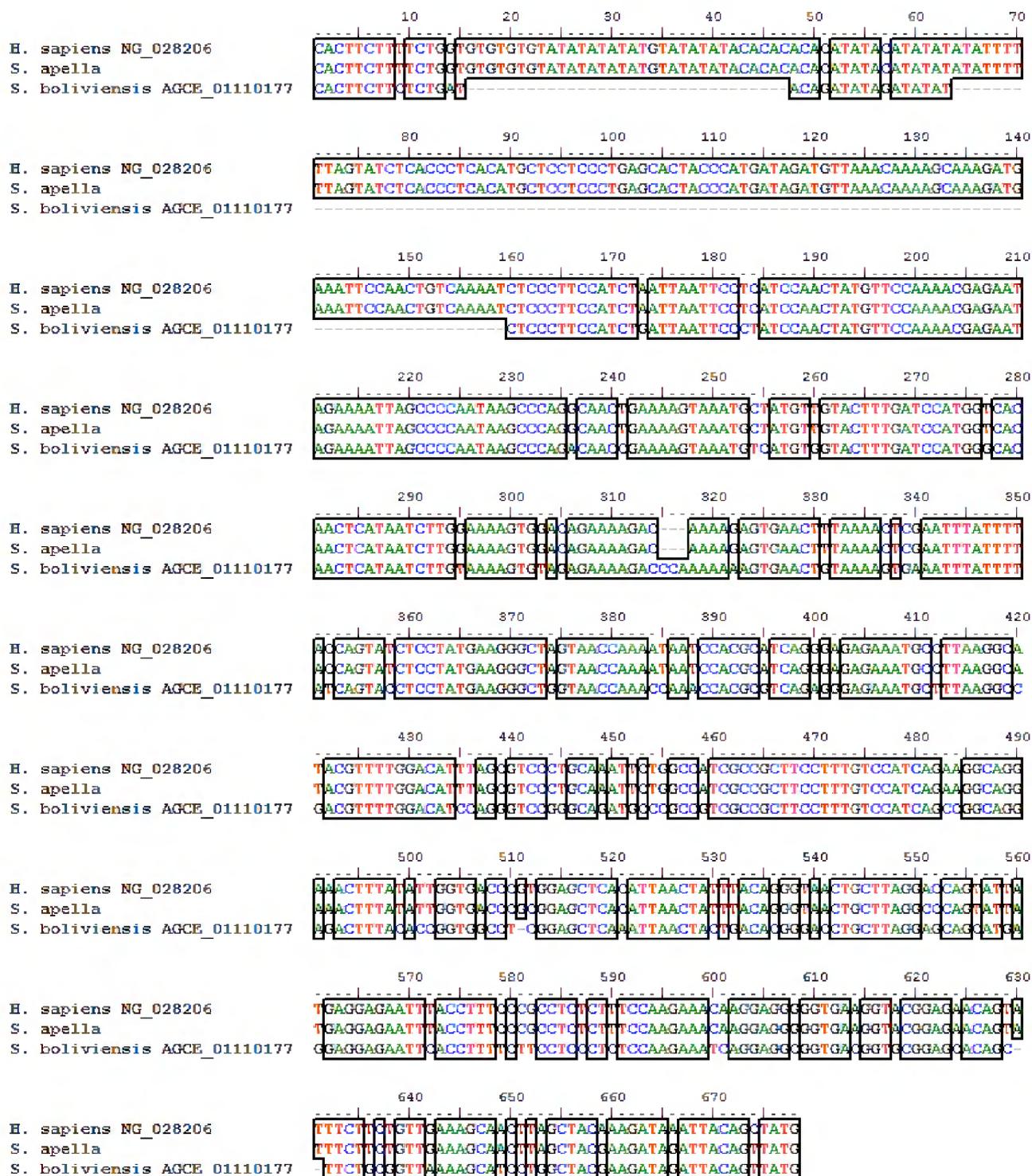


Figura 13: Alinhamento nucleotídico entre as sequências promotoras de COX-2 de *Homo sapiens*, *Sapajus apella* e *Saimiri boliviensis*. Os nucleotídeos em destaque indicam sequências idênticas entre as duas espécies.

4.3 Identificação da Ilha CpG, MSP e Imunohistoquímica

Para a análise do padrão de metilação do promotor de COX-2 de *S. apella*, primeiramente foi realizada a identificação da Ilha CpG do fragmento obtido pelo programa MethylPrimer Express. Após as análises computacionais foi observada a presença de uma Ilha CpG, de 127 pb (**Figura 15**), com 7 sítios CpG (**Figura 16**), localizada entre as posições 388 e 514 do fragmento.

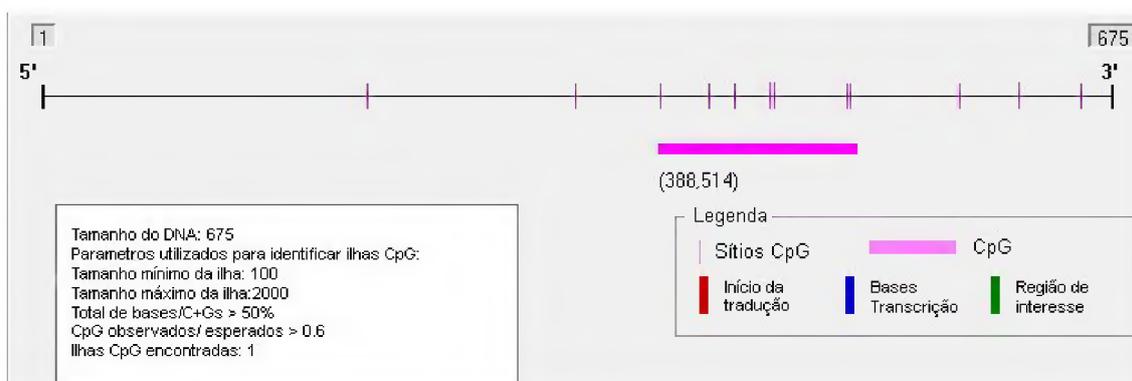


Figura 15: Identificação da Ilha CpG do promotor de COX-2 de *Sapajus apella*.

1	ACGTATTAGGGAGAGAAATGTTTTAAGGTATACGTTTGGATATTTAGCG	50
51	TTTTTGTAATTTTGGTTATCGTCGTTTTTTTTGTTTATTAGAAGGTAGG	100
101	AAATTTTATATTGGTGATTGCGGAG	126

Figura 16: Sequência nucleotídica da Ilha CpG de COX-2 de *Sapajus apella*. Em destaque na cor vermelha estão os sítios CpGs

A análise do padrão de metilação do promotor de COX-2 foi realizada através da técnica de MSP, utilizando os iniciadores selecionados pelo programa MethPrimer (**Tabela 3**). De forma geral, todas as amostras analisadas (tecido normal, lesões pré-neoplásicas e tecido tumoral) apresentaram-se metiladas para o gene estudado (**Tabela 4**). Na **Figura 17**, podemos observar um gel de agarose a 3% com a representação de uma amostra de cada tipo histológico coletado com o produto das PCRs com iniciadores metilados (M) e não metilados (U).

Tabela 3: Iniciadores utilizados para a técnica de MSP em *Sapajus apella*

Iniciador	Sequência (5'→3')	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento (pb)
COX2MSPMF	AAATAATTAATATAAACTCCGCGAA	51°C	136
COX2MSPMR	TAGGGAGAGAAATGTTTTAAGGTATAC		
COX2MSPUF	AAATAATTAATATAAACTCCACAAA	51°C	136
COX2MSPUR	TAGGGAGAGAAATGTTTTAAGGTATATGT		

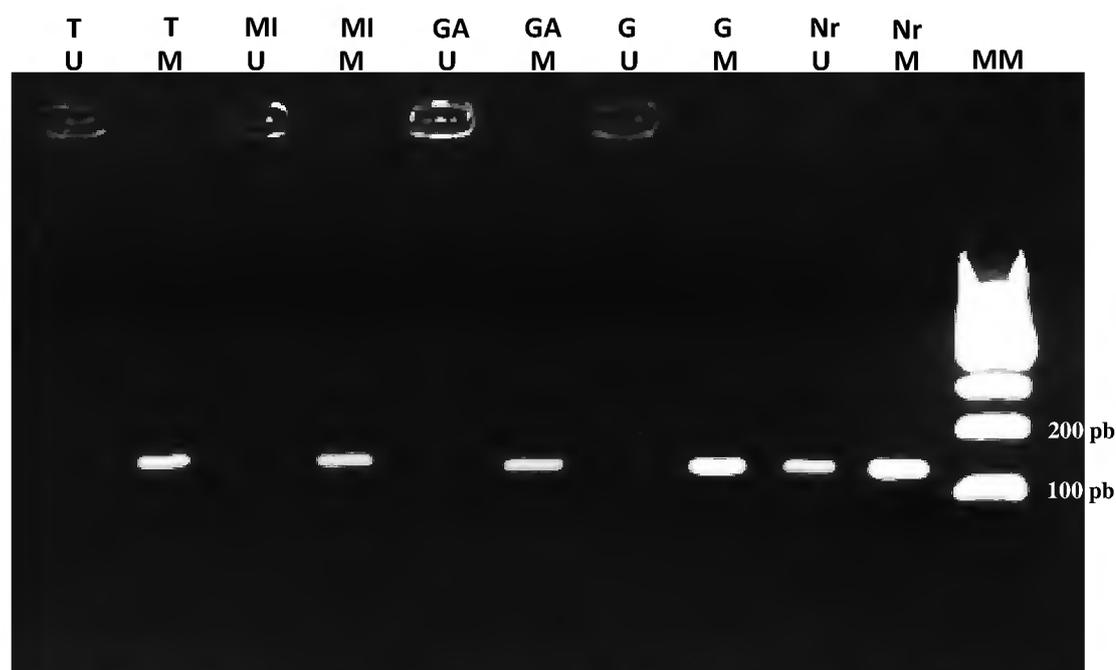


Figura 17: Gel de agarose (3%) com o resultado de MSP para as amostras de *S. apella*. MM: Marcador Molecular. M: Metilado. U: Não metilado. Nr: Tecido Normal. G: Gastrite. GA: Gastrite Atrófica (Atrofia). MI: Metaplasia Intestinal. T: Tumor.

Com o objetivo de verificar a expressão da proteína COX-2 nas amostras obtidas, foi realizado o teste de imunohistoquímica. Os resultados revelaram que amostras normais foram as únicas que não apresentaram a expressão do gene. As amostras de tecido com lesões pré-neoplásicas (gastrite crônica, gastrite atrófica e metaplasia) e a amostra tumoral, apresentaram resultado positivo para a expressão de COX-2 (**Tabela 4**).

Tabela 4: Resultado de MSP e Imunohistoquímica (IHQ) das amostras de *S. apella* analisadas

Tipo de Amostra	Número de Amostras	Metiladas	Não Metiladas	Resultado IHQ
Mucosa Normal	6	6	0	Negativo
Gastrite	6	6	0	Positiva
Gastrite atrófica	4	4	0	Positiva
Metaplasia	2	2	0	Positiva
Tumoral	1	1	0	Positiva

5. DISCUSSÃO

Os modelos animais representam uma valiosa ferramenta para o estudo das origens e mecanismos moleculares do câncer e podem ser utilizados também para o desenvolvimento e teste de novas estratégias terapêuticas. Na pesquisa do câncer, os modelos animais são utilizados para estudar os mais diversos tipos de tumores, como meduloblastoma (PEI et al., 2012), mamário (FATAKUCHI; SINGH, 2013), de próstata (ITTMANN et al., 2013), gástrico (TSUKAMOTO; MIZOSHITA; TATEMATSU, 2007), entre outros.

Roedores representam excelentes modelos para a investigação do câncer humano, pois possuem tamanho reduzido, ciclo de vida curto, baixo custo e disponibilidade de diversas linhagens puras e técnicas transgênicas (XIA; CHEN, 2011). Porém, considerando a complexidade do desenvolvimento de tumores humanos, modelos animais baseados em roedores podem não ser representativos o suficiente. Em diversos modelos utilizando camundongos, as alterações genômicas geralmente ocorrem na linhagem germinativa ou em uma grande porção das células somáticas. Em contrapartida, em tumores humanos, mutações nas linhagens germinativas são raras e a maioria das mutações somáticas ocorrem como eventos aleatórios (CHEON; ORSULIC, 2011).

Além disso, células humanas e de roedores diferem em vários processos relacionados a carcinogênese, portanto, tumores de camundongos e humanos podem não possuir as mesmas alterações genéticas, visto que esses animais possuem taxas metabólicas mais elevadas que os seres humanos, o que pode levar a geração significativamente maior de produtos do metabolismo oxidativo, ocasionando um aumento no dano ao DNA (CÉSPEDES et al., 2006).

Diante disso, tem se utilizado cada vez mais primatas não-humanos como modelos para o estudo do câncer. Em comparação aos roedores, primatas não-humanos são mais semelhantes a humanos em relação a sua evolução genética, anatomia, fisiologia, bioquímica e sistema de órgãos. Sabe-se, por exemplo, que quase todos os genes envolvidos em cânceres humanos, são altamente conservados entre chimpanzés e seres humanos (PUENTE et al., 2006).

Devido a baixa incidência de tumores espontâneos em animais, modelos experimentais de tumores, especialmente em primatas não-humanos são extremamente necessários para a pesquisa do câncer humano. É sabido que os tumores são resultantes de fatores ambientais e genéticos e 85% dos tumores malignos estão relacionados a fatores químicos, biológicos e ambientais. Dessa forma, diversos modelos tem sido estabelecidos fazendo o uso de diferentes agentes cancerígenos para induzir tumores nesses primatas (XIA; CHEN, 2011).

Neste trabalho, optou-se por utilizar a espécie *S. apella*, pois de acordo com Costa et al. (2011), esta espécie representa um excelente modelo para fins de pesquisa, pois podem ser alojados com facilidade devido ao seu tamanho reduzido e também por apresentarem ótima adaptabilidade e flexibilidade. O tamanho relativamente grande de seus órgãos facilita a realização de exames diagnósticos rotineiros, como endoscopias, coleta de sangue e biópsia no mesmo animal por um longo período de tempo.

Muitos tipos diferentes de agentes carcinogênicos são utilizados na indução do câncer experimental, entre eles a N-etil-N-nitrosourea (ENU) e o MNU, considerados potentes mutagênicos, que provocam dano ao DNA pela transferência de um grupo metil ou etil para o oxigênio ou nitrogênio das bases dos nucleotídeos (FEITISMA; AKAY; CUPPEN, 2008).

Como agente indutor, foi escolhido o MNU, sendo que diversos trabalhos utilizaram este composto com o objetivo de induzir a carcinogênese em animais experimentais (LU; LAROYE; ARCHER, 1992; PAZOS et al., 1998; CHOU et al., 1999; MARUTA et al., 2000; JIANG, 2003; SHIMANO et al., 2007; SOARES-MAIA et al., 2013; YOSHIZAWA, et al., 2013). No presente experimento, os animais receberam a dose de 16 mg/Kg de MNU durante um período de 940 dias. Em relação a outros estudos como o de Takayama et al. (2008), realizado com primatas do velho mundo, o tamanho reduzido dos animais no nosso trabalho, permitiu maior agilidade na obtenção das amostras.

É sabido que os diferentes efeitos organotrópicos do MNU em animais são dependentes da dose, frequência, via de administração e idade do animal, sendo que sua administração oral provoca alterações ao longo de todo o trato gastrointestinal, principalmente no estômago, desde os estágios pré-neoplásicos até o aparecimento do

tumor propriamente dito (MARUTA et al., 2000) em diversos animais testados, tais como roedores, suínos, cães, coelhos e primatas (**Tabela 5**) (TSUBARA et al., 2011).

Tabela 5: Efeito carcinogênico do MNU em diversas espécies animais.

Ordem	Espécie	Localização
Primatas	Macaco	Trato Gastrointestinal superior
Artiodactyla	Suíno	Estômago
Carnivora	Cão	Cérebro
Lagomorpha	Coelho	Tecido nervoso, intestino, vasos sanguíneos
Rodentia	Camundongo, rato, hamster	Tecido nervoso, estômago, esôfago, trato respiratório, intestino, pele, rins

Segundo a classificação proposta por Láuren (1965), o câncer gástrico pode ser dividido em duas formas principais: o tipo intestinal, que tem como principal característica a formação de diversos estágios pré-neoplásicos; e o difuso, que não compartilha dessa particularidade. As lesões ocasionadas pela administração de MNU neste experimento estão de acordo com os estágios pré-neoplásicos característicos do tipo intestinal: seis animais desenvolveram gastrite, destes, cinco apresentaram displasia e apenas dois desenvolveram metaplasia. Apenas um dos macacos sobreviveu a todo o tratamento e desenvolveu tumor. Tais lesões apresentadas durante o desenvolvimento tumoral são similares as que ocorrem em humanos como um processo de múltiplos passos iniciado com gastrite, progredindo através de atrofia, metaplasia, displasia, até o desenvolvimento do carcinoma gástrico (YAKIREVICH; RESNICK, 2013).

Considerando que a sequência do promotor de COX-2 em *S. apella* ainda não estava disponível na literatura, os iniciadores para a obtenção do fragmento parcial do mesmo foram desenhados a partir de sequências conservadas de *S. boliviensis*, uma espécie filogeneticamente próxima ao *S. apella*, e também de *H. sapiens* (**Figura 18**).

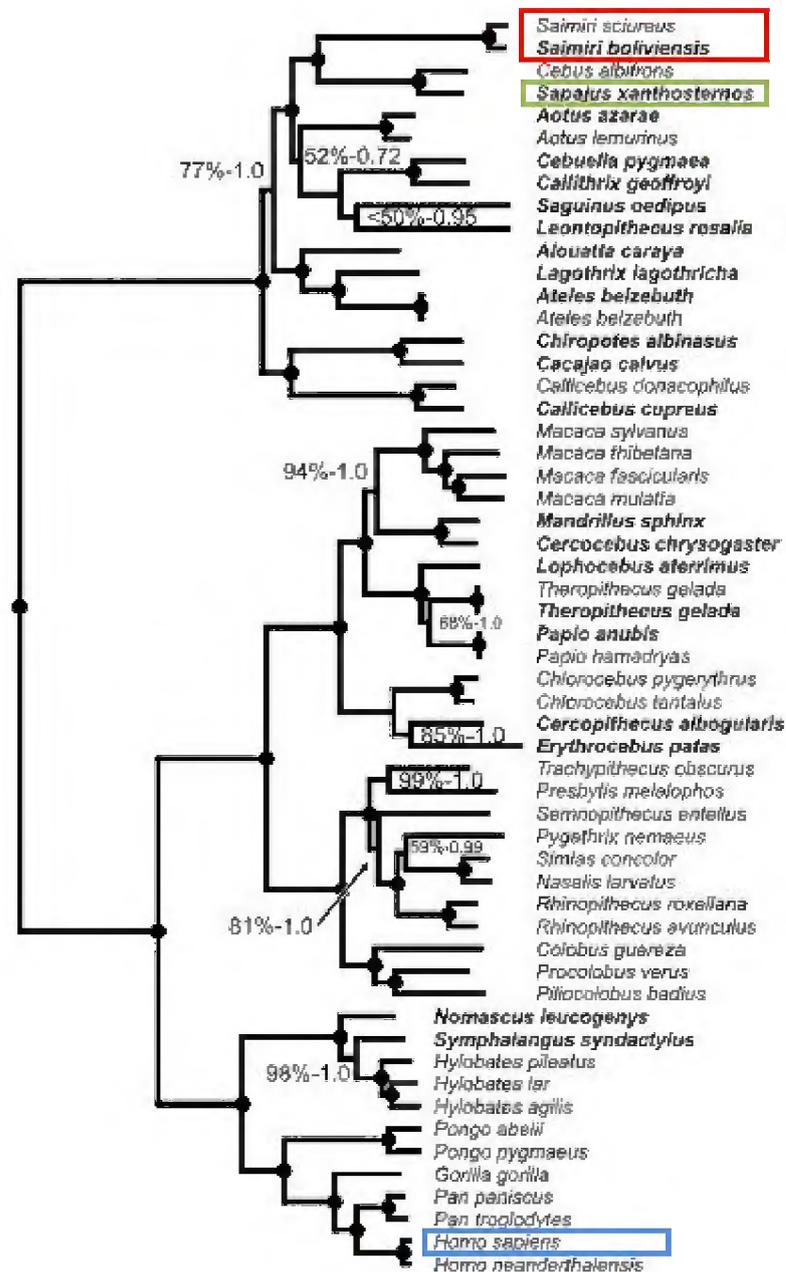


Figura 18: Arranjo filogenético obtido por Máxima Verossimilhança, mostrando o posicionamento dos gêneros *Saimiri* (em vermelho), *Sapajus* (em verde) e *Homo* (em azul). Os números indicam valores de bootstrap (em porcentagem) e de probabilidade posterior (Análise Bayesiana). Adaptado de FINSTERMEIER et al. (2013).

Analisando o fragmento obtido, observou-se que há uma grande similaridade entre as sequências de *S. apella* e humanos (99,2%), demonstrando se tratar de uma porção conservada da região promotora desse gene nas duas espécies. Esta similaridade não é tão evidente quando as sequências de *S. apella* e *S. boliviensis* são comparadas, revelando que apesar de serem grupo-irmãos *S. apella* pode ser considerado um modelo mais adequado que *Saimiri* para o estudo da carcinogênese comparada.

É sabido que, em humanos, a região promotora de COX-2 possui cerca de 1.700 pb e é repleta de sítios de ligação para i) elementos cis-regulatórios, que são sequências de DNA degeneradas (motivos) que geralmente possuem múltiplos sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, e ii) sítios de ligação para fatores de transcrição, denominação dada para sequências específicas de DNA onde ocorre a ligação de proteínas (WANG et al., 2007; YÁÑEZ-CUNA; KVON; STARK, 2013). Em humanos, para esta região, são descritos diversos sítios, tais como C/EBP β , NF κ B, NF-Y, PEA3, E-box, SP-1, AP-1, dentre outros, sendo que combinações distintas entre os diferentes elementos ligantes são responsáveis por modular a expressão do gene em situações distintas (YANG et al., 1997; LUKIW et al., 1998; YANG; BLEICH, 2004; WU, 2006; KANG et al., 2007; MBONYE; SONG, 2009; RATOVITSKI, 2010; ASTING et al., 2011; CHO et al., 2012).

Em uma análise mais aprofundada da região amplificada em *S. apella*, foram encontrados sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, sendo os mais relevantes CdxA, USF, C/EBP, SP1, AP-1, P53RE, NF-Y, GATA-1 e GATA-2 (**Figura 14**). De todos os sítios observados, com exceção dos localizados na porção final do fragmento obtido (CdxA em humanos; GATA-1 e GATA-2 em *S. apella*), todos os demais são idênticos aos descritos para humanos. Este resultado está de acordo com a literatura, que descreve apenas pequenas diferenças entre os promotores da COX-2 de humanos, rato, camundongo, bovinos e cavalos (WU, 2006; KANG et al., 2007).

O fator de transcrição Cdx (ou CDX) figura entre os mais bem estudados dentre os identificados. A família de genes homeobox Cdx (caudal-type homeobox gene) é considerada como sendo de extrema importância na diferenciação precoce e manutenção de células epiteliais intestinais (FRUMKIN et al., 1994). Enquanto em aves apenas um desses genes foi identificado (CdxA), dois homólogos são descritos em

mamíferos: Cdx1 e Cdx2, sendo este último diferencialmente expresso no trato gastrointestinal (FRUMKIN et al., 1994; LI; FOLPE, 2004).

Devido sua importância na formação de células do intestino, Cdx2 é considerado um dos principais fatores de transcrição indutores do fenótipo intestinal, resultando, quando expresso de forma descontrolada, na formação de metaplasia intestinal (BARROS et al., 2010; SUGANO, 2013). Em humanos, este fator de transcrição tem sua expressão induzida na presença de *H. pylori*, e é considerado de grande importância na carcinogênese gástrica, especialmente a do tipo Intestinal (GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ; WRIGHT, 2008).

Elementos Responsivos (RE) a P53 (P53RE) são sequências de DNA, geralmente compreendendo dois decâmeros RRRCWWGYYY (onde “R” representa purinas, “W” representa Adenina ou Timina, e “Y” representa pirimidinas), separados por até 13 pb, que são reconhecidos pela proteína P53 e que servem de sítio de ligação para a mesma. Dessa forma, a P53 orquestra a resposta genômica aos sinais de estresse celular, se ligando a diversas variantes dos motivos RE, causando ativação ou repressão dos genes-alvo (MA et al., 2007; MENENDEZ et al., 2007; WANG; XIAO; REN, 2009; BECKERMAN; PRIVES, 2010). Apesar de ser um motivo relativamente conservado, sabe-se que cerca de 95% dos P53REs possuem substituição de bases em sua sequência consenso (WANG et al., 2010).

Apesar de em COX-2 a presença do sítio P53RE ser contraditória (RATOVITSKI, 2010; WANG et al., 2010), sabe-se que este gene pode ser regulado tanto positiva quanto negativamente por P53, dependendo da célula e do estímulo que esta sofre (SUBBARAMAIAH et al., 1999; BENOIT et al., 2006).

Outro fator de transcrição bem estudado, é o NF-Y, considerado um ativador de genes envolvidos na promoção do crescimento, tais como genes reguladores do ciclo celular. Este fator se liga a uma região presente nos promotores denominada CCAAT box e é extremamente importante na regulação transcricional, visto que a RNA Polimerase II e a Proteína Ligadora de TATA Box (TBP), se ligam aos promotores gênicos de uma maneira NF-Y dependente (KABE et al., 2005; IMBRIANO; GNESUTTA; MANTOVANI, 2012). Assim como descrito para P53REs, a presença de um sítio de ligação para NF-Y em promotores de COX-2 ainda não está bem esclarecida (RATOVITSKI, 2010; IMBRIANO; GNESUTTA; MANTOVANI, 2012).

Outro sítio identificado nas análises foi para o fator de transcrição c/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein), cuja sequência de ligação se caracteriza por ser uma repetição palindrômica contendo o pentanucleotídeo CCAAT (MANTOVANI, 1998). Este fator de transcrição possui uma sequência conservada de um zíper de leucina, que está envolvido em sua homo e heterodimerização e na ligação ao DNA (REGALO et al., 2006). Diferentemente dos fatores descritos anteriormente, a presença do sítio para ligação de c/EBP no promotor de COX-2 é bem documentada, sendo que a ligação deste fator de transcrição ao gene resulta na superexpressão do mesmo, inclusive em tumores gástricos (REGALO et al., 2006; DENG; MONTERO; WU, 2007).

Sítios de ligação para outros fatores de transcrição também foram identificados no promotor de *S. apella*. Dentre estes destacam-se AP-1, que desempenha papel importante na promoção da carcinogênese sendo ativado em resposta a diversos estímulos, tais como a secreção de TNF- α e Interleucina-1 (SANTOS et al., 2011); e USF (Upstream Stimulating Factor), pertencente à família de proteínas Hélice-Volta-Hélice-Zíper de Leucina (CORRE; GALIBERT, 2005). Ambos são reconhecidamente participantes da regulação transcricional de COX-2, induzindo a ativação deste (ANSORGE et al., 2007; CHO et al., 2010; SANTOS et al., 2011).

A família de fatores de transcrição do tipo GATA é composta por seis elementos altamente conservados em todos os vertebrados, divididos em dois grupos: GATA 1/2/3 e GATA 4/5/6, sendo o primeiro grupo expresso primariamente em células sanguíneas, enquanto que o segundo está relacionado à diversos tecidos de origem meso e endodérmica. Em contrapartida aos fatores de transcrição descritos acima, onde uma relação com a regulação de COX-2 é suportada, a presença de sítios de ligação para GATA-1 e GATA-2 não foi registrada na literatura até o momento (AYANBULE; BELAGULI; BERGER, 2011; ARONSON et al., 2014).

Um outro mecanismo de regulação gênica descrito para COX-2 está relacionado com a metilação do DNA. Este evento representa a modificação epigenética mais comum em câncer gástrico, provavelmente devido a ação facilitada de agentes exógenos, tendo sido demonstrada como um importante mecanismo de inativação da transcrição (ALVES et al., 2011).

Segundo KANG et al. (2012), a hipermetilação de COX-2 parece ser a explicação mais consistente para a perda da expressão de sua proteína em pacientes com câncer.

Diversas técnicas podem ser empregadas para avaliar o perfil de metilação de promotores gênicos, entre elas podemos destacar a técnica de PCR metilação específica (MSP). Esta técnica é utilizada para avaliar e analisar de forma qualitativa o grau de metilação com base na reatividade do bisulfito, utilizando dois conjuntos específicos de iniciadores para a sequência de interesse: um que irá amplificar apenas o DNA não metilado convertido por bisulfito de sódio, enquanto que o outro é específico para o DNA convertido metilado. Esta é uma técnica sensível, rápida e de baixo-custo para avaliar o estado de metilação de dinucleotídeos CpG (SHANMUGANATHAN et al., 2013). Devido a estas vantagens mencionadas anteriormente, esta técnica foi escolhida para o nosso estudo.

Os resultados obtidos através da técnica de MSP evidenciaram um padrão metilado das amostras analisadas para o promotor do gene COX-2 de *S. apella*. Ao relacionar esses resultados com os resultados oriundos da análise imunohistoquímica, não foi possível identificar uma correlação negativa como descrito na literatura, confirmando o envolvimento da metilação na inativação deste gene (YU et al., 2003; HUANG et al., 2006; FERRASI et al., 2010), exceto na amostra de tecido normal que apresentou-se metilada em COX-2 e com expressão negativa para a proteína.

Entre as diversas hipóteses para a ausência de correlação entre os resultados da análise do perfil de metilação e imunohistoquímica obtida no presente trabalho, a mais provável é que a região do promotor analisada em *S. apella*, não representa uma região chave (core promoter ou promotor central) na expressão de COX-2, fazendo-se necessários estudos mais aprofundados acerca da regulação transcricional desse gene.

Esta hipótese pode ser confirmada pelos estudos de HUR et al. (2003), WANG et al. (2005) e MAAT et al. (2007) que observaram que a metilação aberrante dos sítios CpG localizados mais próximos à região 5' do sítio de início da transcrição, mais especificamente na região do promotor entre -590 a +186 pb, são responsáveis pelo silenciamento transcricional da COX-2 em linhagens celulares e tecidos humanos de carcinoma gástrico, região esta, diferente da que foi analisada neste estudo.

Porém, vale a pena destacar que, segundo WANG et al. (2005), a interação entre os efeitos supressores da metilação de ilhas CpG e a ativação dos fatores de transcrição podem influenciar a transcrição de COX-2, ou seja, mesmo com ilhas CpG desmetiladas, se não houver a ligação de determinados fatores de transcrição, o gene pode não ser ativado e se manter em um silenciamento transcricional, o que também pode justificar a incongruência entre os resultados da análise do perfil de metilação e análise imunohistoquímica, além de revelar a complexidade na regulação da expressão de COX-2.

Em relação à expressão da proteína COX-2, os resultados de imunohistoquímica obtidos para as amostras de *S. apella* demonstraram a presença da proteína em todas as lesões pré-neoplásicas e na amostra tumoral, estando ausente nas amostras de tecido gástrico normal. Estes resultados estão de acordo com os da literatura, onde diversos estudos apontam uma hiperexpressão da mesma em tumores gastrointestinais. Sabe-se que no câncer gástrico, por exemplo, a expressão de COX-2 está envolvida em diversos mecanismos relacionados a progressão tumoral, como angiogênese, inibição da apoptose e invasão de tecidos adjacentes (LEUNG et al., 2003; TATSUGUCHI et al., 2004).

De acordo com MAO et al. (2007), a hiperexpressão de COX-2 é um processo inicial da carcinogênese em todos os tumores, sendo que sua elevada expressão em câncer gástrico está significativamente correlacionada com a invasão tumoral em vasos linfáticos, na mucosa gástrica e metástase nos linfonodos. Em seus estudos, o índice de COX-2 no carcinoma gástrico foi significativamente maior do que na mucosa normal ($3,4 \pm 0,7$ vs $2,2 \pm 0,7$; $p < 0,05$), resultados estes semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Outro dado interessante é de que os níveis de COX-2 eram mais elevados em carcinomas gástricos mais invasivos ($p < 0,05$).

Em uma comparação realizada acerca da expressão de COX-2 entre os tipos intestinal e difuso de câncer gástrico, YAMAGATA et al. (2002) observaram um nível mais elevado da expressão desta proteína no tipo intestinal, mais especificamente na mucosa com metaplasia intestinal, uma lesão pré-neoplásica característica deste tipo de tumor gástrico.

Estes dados são corroborados pelos resultados de ALMEIDA et al. (2012), que ao analisarem tecidos pré-neoplásicos, afirmaram que a expressão de COX-2 ocorre em

lesões pré-neoplásicas como gastrite, metaplasia intestinal, displasia e mais acentuadamente no adenocarcinoma gástrico, de maneira progressiva e de acordo com o grau das lesões.

LIM et al. (2000) verificaram a expressão de COX-2 em 104 amostras de tumores gástricos humanos por análises de imunohistoquímica e Western Blot. Os resultados revelaram que a proteína COX-2 estava hiperexpressa nos tecidos com câncer gástrico em comparação com a mucosa gástrica normal.

6. CONCLUSÕES

-A região promotora parcial de COX-2 obtida para *S. apella* apresentou uma similaridade maior com a sequência humana do que com a sequência de *Saimiri boliviensis*, sugerindo que *S. apella* pode ser considerado um bom modelo animal da carcinogênese gástrica;

-Foram identificados diversos sítios de ligação para fatores de transcrição e elementos cis-regulatórios na sequência promotora de COX-2 de *S. apella*, idênticos aos descritos para a sequência humana, sugerindo que os mecanismos de regulação similares entre as duas espécies;

-A região promotora obtida apresentou apenas uma Ilha CpG, com sete sítios. Esta apresentou-se metilada em todas as amostras testadas;

-Os resultados de imunohistoquímica revelaram a presença da expressão protéica em todos os estágios pré-neoplásicos e na amostra tumoral, sendo negativa na amostra de tecido gástrico normal;

-A ausência de correlação entre os resultados de metilação e de imunohistoquímica sugerem que a região promotora obtida não parece ser crucial na regulação de COX-2 de *S. apella*.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, T.; KEATON, M. A; DUTTA, A. Genomic instability in cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 5: a012914. 2013.

ALBAKER, I. W. Helicobacter pylori infection and its relationship to metabolic syndrome: is it a myth or fact? **Saudi Journal of Gastroenterology**, 17:165-169. 2011.

ALMEIDA, P.R.C; FERREIRA, F.V.A; SANTOS, C.C; ROCHA-FILHO, F.D; FEITOSA, R.R.P; FALCÃO, E.A.A; CAVADA, B.K; LIMA-JUNIOR, R.C.P; RIBEIRO, R.A. Immunoeexpression of cyclooxygenase-2 in primary gastric carcinomas and lymph node metastases. **World Journal of Gastroenterology**, 18(8): 778-784. 2012.

ALMENDRO, V.; MARUSYK, A.; POLYAK, K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. **Annual Review of Pathology**, 8: 277–302. 2013.

ALVES, M.K.S; FERRASI, A.C; LIMA, V.P; FERREIRA, M.V.P; PARDINI, M.I.M.C; RABENHORST, S.H.B. Inactivation of COX-2, HMLH1 and CDKN2A Gene by Promoter Methylation in Gastric Cancer: Relationship with Histological Subtype, Tumor Location and Helicobacter pylori Genotype. **Pathobiology**, 78: 266-276. 2011.

AMIR, M.; AGARWAL, H.K. Role of COX-2 selective inhibitors for prevention and treatment of câncer. **Pharmazie** 60: 563–570. 2005.

ANSORGE, N; JUTTNER, S; CRAMER, T; SCHIMIDT, W.E; HOCKER, M; SCHMITZ, F. An upstream CRE-E-box element is essential for gastrin-dependent activation of the cyclooxygenase-2 gene in human colon cancer cells. **Regulatory Peptides** 144:25–33. 2007.

ARONSON, B.E; STAPLETON, K.A; KRASINSKI, S.D. The role of GATA factors in development, differentiation, and homeostasis of the small intestinal epithelium.

American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology, 16: 1-35. 2014.

ASTING, A.G; CARÉN, H; ANDERSON, M; LONNROTH, C; LAGERSTEDT, K; LUNDHOLM, K. COX-2 gene expression in colon cancer tissue related to regulating factors and promoter methylation status. **BMC Cancer**, 11: 238. 2011.

AYANBULE, F; BELAGULI, N.S; BERGER, D.H. GATA Factors in Gastrointestinal Malignancy. **World Journal of Surgery**, 35:1757–1765. 2011.

BAE, J.M.; LEE, E.J.; GUYATT, G. Citrus fruit intake and stomach cancer risk: a quantitative systematic review. **Gastric Cancer**; 11: 23-32. 2008.

BARROS, R; CAMILO, V; PEREIRA, B; FREUND, J-N; DAVID, L; ALMEIDA, R. Pathophysiology of intestinal metaplasia of the stomach: emphasis on CDX2 regulation. **Biochemical Society Transactions**, 38: 358–363. 2010.

BARTEK, J.; LUKAS, C.; LUKAS, J. Checking on DNA damage in S phase. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 5: 792–804. 2004.

BAYLIN, S.B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nature Clinical Practice Oncology**, 2: S4-11. 2005.

BECKERMAN, R; PRIVES, C. Transcriptional Regulation by p53. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 2:a000935. 2010.

BENOIT, V; MORAES, E; DAR, N.A; TARANCHON, E; BOURS, V; HAUTEFEUILLE, A; TANIÈRE, P; CHARIOT, A; SCOAZEC, J-Y; GALLO, C.V.M; MERVILLE, M-P. HAINAUT, P. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 by tumor suppressor p53 requires nuclear factor-kappa β . **Oncogene**, 25: 5708–5718. 2006.

BIRD, A.P. The relationship of DNA methylation to cancer. **Cancer Surveys**, 28: 87-101. 1996.

BOCK, C., REITHER S, MIKESKA T, PAULSEN M, WALTER J, LENGAUER T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. **Bioinformatics**, 21: 4067–4068. 2005.

BOSTWICK, D.G.; BURKE, H.B.; DJAKIEW, D.; EULING, S.; HO, S.M.; LANDOLPH, J.; MORRISON, H.; SONAWANE, B.; SHIFFLETT, T.; WATERS, D.J.; TIMMS, B. Human prostate cancer risk factors. **Cancer**, 101: 2371–2490. 2004.

BOYLE, P.; LEVIN, B. World Cancer Report. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon. 2008.

BURADA, F., ANGELESCU C, MITRUT P, CIUREA T, CRUCE M, SAFTOIU A, IOANA M Interleukin-4 receptor -3223 C→T polymorphism is associated with increased gastric adenocarcinoma risk. **Can J Gastroenterol**, 26: 532–536, 2012.

BUYONG. **Nucleic Acids Research**, 35: 2986–3001. 2007.

CEBOLA, I.; PEINADO, M. A. Epigenetic deregulation of the COX pathway in cancer. **Progress in Lipid Research**, 51: 301–313. 2012.

CÉSAR, A.C.G.; SILVA A.E.; TAJARA, E.H. Fatores Genéticos e Ambientais Envolvidos na Carcinogênese Gástrica. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 39, n. 4, p. 253-9, 2002.

CÉSPEDES, M.V; CASANOVA, I; PARREÑO, M; MANGUES, R. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. **Clinical and Translational Oncology**, 8 (5): 318-329. 2006.

CHA, Y.I.; SOLNICA-KREZEL, L.; DUBOIS, R.N. Fishing for prostanoids: Deciphering the developmental functions of cyclooxygenase derived prostaglandins. **Developmental Biology**, 298: 263-272. 2006.

CHATTERJEE, R.; VINSON, C. CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. **Gene Regulatory Mechanisms**, v 1819: 763–770. 2013.

CHEMSPIDER® **1-Methyl-1-nitrosourea** [ACD/IUPAC Name]. Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.12177.html>. Acessado em 27 de junho de 2013.

CHEN, X.L.; SU, B.S.; SUN, R.Q.; ZHANG, J.; WANG, Y.L. Relationship between expression and distribution of cyclooxygenase-2 and bcl-2 in human gastric adenocarcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, 11: 1228-1231. 2005.

CHEON, D-J; ORSULIC, S. Mouse models of cancer. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease**, 6: 95-119. 2011.

CHIACCHERA, F.; PIUNTI, A.; PASINI, D. Epigenetic methylations and their connections with metabolism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 70: 1495–1508. maio. 2013.

CHO, D-I; KIM, S-Y; ZHENG, M; JIN, M; CHOI, H.K; YI, A-K; KIM, K-M. Identification of Cis-acting Elements and Signaling Components of High Affinity IgE Receptor that Regulate the Expression of Cyclooxygenase-2. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 29: 725-736. 2012.

CHO, S.O; LIM, J.W; KIM, K.H; KIM, H. Involvement of Ras and AP-1 in Helicobacter pylori-Induced Expression of COX-2 and iNOS in Gastric Epithelial AGS Cells. **Digestive Diseases and Sciences**, 55:988–996. 2010.

CHOU, Y-C; GUZMAN, R.C; SWANSON, S.M; YANG, J. LUI, H.M; WU, W; NANDI, S. Induction of mammary carcinomas by N-methyl-N-nitrosourea in ovariectomized rats treated with epidermal growth factor. **Carcinogenesis**, vol.20 no.4 pp.677–684. 1999.

COHEN, E.G.; ALMAHMEED, T.; DU, B.; GOLIJANIN, D.; BOYLE, J.O.; SOSLOW, R.A. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, 9: 3425–3430. 2003.

CORRE, S; GALIBERT, M-D; Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. **Pigment Cell Research**, 18: 337-348. 2005.

CORREA, P. Helicobacter pylori and gastric cancer: state of the art. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 5: 477-481. 1996.

COSTA, J.F.F.B; LEAL, M.F; SILVA, T.C.R; ANDRADE JUNIOR, E.F; REZENDE, A.P; MUNIZ, J.A.P; LACRETA JUNIOR, A.C.C; ASSUMPÇÃO, P.P; CALCAGNO,

D.Q.; DEMACHKI, S; RABENHORST, S.H.B; SMITH, M.A.C; BURBANO, R.M. Experimental Gastric Carcinogenesis in *Cebus apella* Nonhuman Primates. **Plos one**, 6(7):1-13. 2011.

COSTA, J.F.F.B; LEAL, M.F; SILVA, T.C.R; JUNIOR, E.F.A; REZENDE, A.P; MUNIZ, J.A. P.C; JUNIOR, A.C.C.L; ASSUMPCÃO, P.P; CALCAGNO, D.Q; DEMACHK, S; RABENHORST, S.H.B; SMITH, M.A.C; BURBANO, R.R. Experimental Gastric Carcinogenesis in *Cebus apella* Nonhuman Primates. **Plos One**, V6 I7 e21988, 2011.

COWIN, P.A.; ANGLÉSIO, M.; ETEMADMOGHADAM, D.; BOWTELL, D.D. Profiling the cancer genome. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, 11: 133 - 159. 2010.

CREW, K.D.; NEUGUT, A.L. Epidemiology of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, 12: 354-362. 2006.

CROCE, C.M. Oncogenes and cancer. **The New England Journal of Medicine**, 5: 502 – 511. 2008

DAHL, C.; GULDBERG, P. DNA methylation analysis techniques. **Biogerontology** 4: 233–250. 2003.

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

DE VITA, V.T.; HELLMANN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: Principles e Practice of Oncology**. 7.ed. Philadelphia: Lippincott Willians e Wilkins, 2005.

DENG, W-G; MONTERO, A.J; WU, K.K. Interferon- γ suppresses cyclooxygenase-2 promoter activity by inhibiting C-Jun and C/EBPbeta binding. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, 27:1752-1759. 2007.

DICKEN, B.J.; BIGAM, D.L.; CASS, C.; MACKEY, J.R.; JOY, A.A.; HAMILTON, S.M. Gastric Adenocarcinoma: Review and Considerations for Future Directions. **Annals of Surgery**, 241: 27 – 39. 2005.

DIETRICH, M; BLOCK, G; POGODA, J M; BUFFLER, P; HECHT, S; PRESTONMARTIN, S. A review: dietary and endogenously formed N-nitroso compounds and risk of childhood brain tumors. **Cancer Causes and Control**, 16:619–635. 2005.

DRUMM, B.; ROWLAND, M. The epidemiology of *Helicobacter pylori*: Where to from here? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 36: 7-8. 2003.

ESTELLER, M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. **The Journal of Pathology**, 205: 172-180. 2005.

FATAKUCHI, M; SINGH, R.K. Animal model for mammary tumor growth in the bone microenvironment. **Breast Cancer**, 20: 195-203. 2013.

FEITSMA, H; AKAY, A; CUPPEN, E. Alkylation damage causes MMR-dependent chromosomal instability in vertebrate embryos. **Nucleic Acids Research**, 22: 999-1013. 2008.

FELIPE, A.V; SILVA, T.D; PIMENTA, C.A; KASSAB, P.FORONES, M.N .Interleukin-8 gene polymorphism and susceptibility to gastric cancer in a brazilian population.**Biological Research**, p. 369–374. 2012.

FERLAY, J.; SHIN, H R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, 127: 2893–2917. 2010.

FERRASI, A.C; PINHEIRO, N.A; RABENHORST, S.H; CABALLERO, O.L; RODRIGUES, M.A; DE CARVALHO, F; LEITE, C.V; FERREIRA, M.V; BARROS, M.A; PARDINI, M.I. *Helicobacter pylori* and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. **World Journal of Gastroenterology**, 16: 312–319. 2010.

FIOCCA, R; VILLANI, L; TENTI, P; SOLCIA, E. Characterization of four main cell types in gastric cancer: foveolar, mucopeptic, intestinal columnar and goblet cells. An histopathologic, histochemical and ultrastructural study of “early” and “advanced” tumours. **Pathology Research and Practice**, 182: 308 – 325. 1987.

FRAGA, M.F.; HERRANZ, M.; ESPADA, J.; BALLESTAR, E.; PAZ, M. F.; ROPERO, S.; ERKEK, E.; BOZDOGAN, O.; PEINADO, H.; NIVELEAU, A.; MAO, J. H.; BALMAIN, A.; CANO, A.; ES TELLER, M. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. **Cancer Research**, 64: 5527-5534. 2004.

FRUMKIN, A.; PILLEMER, G.; HAFFNER, R.; TARCIC, N.; GRUENBAUM, Y.; FAINSOD, A. A role for CdxA in gut closure and intestinal epithelia differentiation. **Development**, 120: 253-263. 1994.

FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nature Reviews Cancer**, 12: 104–120. 2012.

FUKUSHIGE, S.; HORII, A. DNA Methylation in Cancer: A Gene Silencing Mechanism and the Clinical Potential of Its Biomarkers. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, 173–185. 2013.

GAO, L.; NIETERS, A.; BRENNER, H. Meta-analysis: tumour invasion-related genetic polymorphisms and gastric cancer susceptibility. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 28: 565–573. 2008.

GOLIJANIN, D.; TAN, J.Y.; KAZIOR, A.; COHEN, E.G.; RUSSO, P.; DALBAGNI, G. Cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 are over-expressed in squamous cell carcinoma of the penis. **Clinical Cancer Research**, 10: 1024–1031. 2004.

GREENHOUGH, A.; SMARTT, H.J.M.; MOORE, A.E.; ROBERTS, H.R.; WILLIAMS, A.C.; PARASKEVA, C.; KAIDI, A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. **Carcinogenesis**, 30: 377–386. 2009.

GRÖSCH, S.; MAIER, T. J.; SCHIFFMANN, S.; GEISLINGER, G. Cyclooxygenase-2 (COX-2) – Independent Anticarcinogenic Effects of Selective COX-2 Inhibitors, **Journal of the National Cancer Institute**, 98: 736-747. 2006.

GUGGENHEIM, D.E.; SHAH, M.A. Gastric Cancer Epidemiology and Risk Factors. **Journal of Surgical Oncology**, 107: 230–236. 2013.

GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ, L. WRIGHT, N.A. Biology of intestinal metaplasia in 2008: More than a simple phenotypic alteration. **Digestive and Liver Disease** 40: 510–522. 2008.

HALL, T. BioEdit: An important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Biosciences**, 2: 60-61. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG R.A. Hallmarks of cancer : the next generation **Cell**, 5: 646-674. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100: 57–70. 2000.

HARRINGTON, J.K. Biology of cancer. Cancer biology and imaging. **Medicine**, 39: 689-692. 2011.

HARRIS, H. The analysis of malignancy by cell fusion: the position in 1988. **Cancer Research**, 48: 3302-3306. 1988.

HARTGRINK, H.H; JANSEN, E.P.M; VAN GRIEKEN, N.C.T; VAN DE VELDE, C.J.H. Gastric cancer. **Lancet**, 374: 477–490. 2009.

HAYATSU, H. Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis—A personal account. **Proceedings of Japan Academy Series B**, 84: 321-330. 2008.

HEINEMEYER, T; WINGENDER, E; REUTER, I; HERMJAKOB, H; KEL, A. E; KEL, O. V; IGNATIEVA, E. V; ANANKO, E. A; PODKOLODNAYA, O. A; KOLPAKOV, F. A; PODKOLODNY N. L; KOLCHANOV, N. A. Databases on Transcriptional Regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. **Nucleic Acids Research**. 26, 364-370. 1998.

HERMAN, J.G; GRAFF, J.R; MYÖHÄNEN, S; NELKIN, B.D; BAYLIN, S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93: 9821-9826. 1996.

HOWSON, C.P.; HIYAMA, T.; WYNDER, E.L. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. **Epidemiologic Reviews**, 8: 1-26. 1986.

HSU, T-I; WANG, M- C; CHEN, S-Y; YEH, Y-M; SU, W-C; CHANG, W-C; HUNG, HUANG, L; ZHANG, K.L; LI, H; Chen, X.Y; KONG, Q.Y; SUN, Y; GAO, X; GUAN, H.W; LIU, J. Infrequent COX-2 expression due to promoter hypermethylation in gastric cancers in Dalian, China. **Human Pathology**, 37:1557–1567. 2006.

HUDLER, P. Genetic Aspects of Gastric Cancer Instability. **The Scientific World Journal**, 2012: 761909. 2012.

HUR, K; SONG, S.H; LEE, H.S; KIM, W.H; BANG, Y-J; YANG, H-K. Aberrant methylation of the specific CpG island portion regulates cyclooxygenase-2 gene expression in human gastric carcinomas. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 310: 844–851. 2003.

IMBRIANO, C; GNESUTTA, N; MANTOVANI, R. The NF-Y/p53 liaison: Well beyond repression. **Biochimica et Biophysica Acta** 1825: 131–139. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. 2011.

ITMANN, M; HUANG, J; RADAELLI, E; MARTIN, P; SIGNORETTI, S; SULLIVAN, R; SIMONS, B.W; WARD, J.M; ROBINSON, B.D; CHU, G.C; LODA, M; THOMAS, G; BOROWSKY, A; CARDIFF, R.D. Animal Models of Human Prostate Cancer: The Consensus Report of the New York Meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Research**, 73:2718-2736. 2013.

JANG, T.J. Expression of proteins related to prostaglandin E2 biosynthesis is increased in human gastric cancer and during gastric carcinogenesis. **Virchows Archiv**, 445: 564–571. 2004.

JANJIGIAN, Y. Y.; KELSEN, D. P. Genomic dysregulation in gastric tumors. **Journal of Surgical Oncology**, 107: 237–42. 2013.

JIANG, W; ZHU, Z; THOMPSON, H.J. Effect of Energy Restriction on Cell Cycle Machinery in 1-Methyl-1-Nitrosourea-induced Mammary Carcinomas in Rats. **Cancer Research**. 63:1228-1234. 2003.

JIN, B.; ROBERTSON, K. D. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 754: 3–29. 2013.

JIRTLE, R.L.; SKINNER, M.K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics**, 4: 253-262. 2007.

JOHANNING, G.L.; HEIMBURGER, D.C.; PIYATHILAKE, C.J. Diet, growth factors and cancer. **Journal of Nutrition**, 132: 3814S-3818S. 2002.

JOHNSON, S.M; EVERS, B.M. Translational Research in Gastric Malignancy. **Surgical Oncology Clinics of North America**, 17: 323 – 340. 2008.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, 13: 484–492. 2012.

KABE, Y; YAMADA, J; UGA, H; YAMAGUCHI, Y; WADA, T; HANDA, H. NF-Y Is Essential for the Recruitment of RNA Polymerase II and Inducible Transcription of Several CCAAT Box-Containing Genes. **Molecular And Cellular Biology**, 25: 512–522. 2005.

KANG, H-J; KIM, E-J; KIM, B-G; YOU, C-H; LEE, S-Y; KIM, D-I; HONG, Y-S. Quantitative Analysis of Cancer-associated Gene Methylation Connected to Risk Factors in Korean Colorectal Cancer Patients. **Journal of Preventive Medicine & Public Health**, 45:251-258. 2012.

KANG, YJ; MBONYE UR; DELONG CJ; WADA M; SMITH WL. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. **Progress in Lipid Research**. 46:108-125. 2007.

KANWAL, R.; GUPTA, S. Epigenetic modifications in cancer. **Clinical Genetics**, 81: 303–311. 2012.

KASTAN, M.B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, 432: 316–323. 2004.

KIM, J; CHO, Y.A; CHOI, I.J; LEE, Y.S; KIM, S.Y; SHIN, A; CHO, S.J; KOOK, M.C; NAM, J.H; RYU, K.W; LEE, J.H; KIM, Y.W. Effects of interleukin-10 polymorphisms, *Helicobacter pylori* infection, and smoking on the risk of noncardia gastric cancer. **PLoS One**, 7: e29643. 2012.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends in Biochemical Science**, 31: 89-97. 2006.

KOBAYASHI, M.; TSUBONO, Y; SASAZUKI, S.; SASAKI, S.; TSUGANE, S. Vegetables, fruit and risk of gastric cancer in Japan: a 10-year follow-up of the JPHC Study Cohort I. **International Journal of Cancer**, 102: 39-44. 2002.

KONDO, Y.; ISSA, J-P. J. DNA methylation profiling in cancer. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 12: 1-26. 2010.

KRUEGER, F; KRECK, B; FRANKE, A; ANDREWS, S.R. DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data. **Nature Methods**, 9: 145–151. 2012.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Pathology Basis of Disease**. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 7a ed. 2005.

LADEIRAS-LOPES, R.; PEREIRA, A.K; NOGUEIRA, A; PINHEIRO-TORRES, T; PINTO, I; SANTOS-PEREIRA, R; LUNET, N. Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Cancer Causes Control**, 19: 689-701. 2008.

LAIA, C.H.; FANGB, S.H.; RAOC, Y.K.; GEETHANGILIC, M.; TANGD, C.H.; LINE, Y.J; HUNGA, C. H.; WANGF, W.C.; TZENG, Y.M. Inhibition of *Helicobacter pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells by *Phyllanthus urinaria* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 118: 522–526. 2008.

LAIRD, P.W. Cancer epigenetics. **Human Molecular Genetics**, 14: R65-R76. 2005.

LAIRD, P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature Reviews Cancer**, 3: 253-266. 2003.

LAURÉN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**; 64:31-49. 1965.

LEE, J. T. Molecular links between X-inactivation and autosomal imprinting: X-inactivation as a driving force for the evolution of imprinting? **Current Biology**, 13: R242-R254. 2003.

LEE, J.; LEE, T. Effects of histone acetylation and CpG methylation on the structure of nucleosomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, 1824: 974–982. 2012.

LEUNG, W.K; TO, K.F; GO, M.Y.Y; CHAN, K-K; CHAN, F.K.L; NG, E.K.W; CHUNG, S. C.S; SUNG, J.J.Y. Cyclooxygenase-2 upregulates vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in human gastric carcinoma. **International Journal of Oncology** 23:1317-1322. 2003.

LI, M.K; FOLPE, A.L. CDX-2, a New Marker for Adenocarcinoma of Gastrointestinal Origin. **Advances in Anatomic Pathology**,11:101–105. 2004.

LIM, H.Y. JOO, H.J; CHOI, J.H; YI, J.W; YANG, M.S; CHO, D.Y; KIM, H.S; NAM, D.K; LEE, K.B; KIM, H.C. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. **Clinical Cancer Research**, 6: 519-525. 2000.

LIM, H.Y; JOO, H.J; CHOI, J.H; YI, J.W; YANG, M.S; CHO, D.Y; KIM, H.S; NAM, D.K., LEE, K.B; KIM, H.C. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. **Clin Cancer Res**, 6:519 –525. 2000.

LOCHHEAD, P.; EL-OMAR, E. M. Gastric cancer. **British Medical Bulletin**, 85: 87–100. 2008.

LOEB, L.A.; HARRIS, C.C. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. **Cancer Res**, 68: 6863-6872. 2008.

LOH, M; KOH, K.X; YEO, B.H; SONG, C.M; CHIA, K.S; ZHU, F. YEOH, K.G; HILL, J. IACOPETTA, B; SOONG, R. Meta-analysis of genetic polymorphisms and gastric cancer risk: variability in associations according to race. **European Journal of Cancer**, 45: 2562–2568. 2009.

LOPEZ, J.; PERCHARDE, M.; COLEY, H.M.; WEBB, A.; CROOK, T. The context and potential of epigenetics in oncology. **British Journal of Cancer**, 100: 571-577. 2009.

LU, S-J; LAROYE, G; ARCHER, M.C. Mammary Tumor Induction by N-Methyl-N-nitrosourea in Genetically Resistant Copenhagen Rats. **Cancer Research**, 52:5037-5041. 1992.

LUKIW, W.J; PELAEZ, R.C; MARTINEZ, J; BAZAN, N.G; Budesonide epimer R or dexamethasone selectively inhibit platelet-activating factor-induced or interleukin 1-induced DNA binding activity of cis-acting transcription factors and cyclooxygenase-2 gene expression in human epidermal keratinocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 95: 3914–3919. 1998.

LUO. J.; SOLIMINI, N.L.; ELLEDGE, S.J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non- oncogene Addiction. **Cell**, 136: 826- 837. 2009.

LYNCH, H.T.; GRADY, W.; SURIANO, G.; HUNTSMAN, D. Gastric Cancer: New Genetic Developments. **Journal of Surgical Oncology**, 90:114–133. 2005.

MA, B; PAN, Y; ZHENG, J; LEVINE, A.J; NUSSINOV, R. Sequence analysis of p53 response-elements suggests multiple binding modes of the p53 tetramer to DNA targets

MAAT, M.F.G.; VELDE, C.J.H.; UMETANI, N.; HEER, P.; PUTTER, H.; HOESEL, A.; MEIJER, G.A.; GRIEKEN, N.C.; KUPPEN, P.J.K.; BILCHIK, A.J.; TOLLENAAR, R.A.E.M.; HOON, D.S.B. Epigenetic Silencing of Cyclooxygenase-2 Affects Clinical Outcome in Gastric Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 25:4887-4894. 2007.

MAAT, M.F.G; VAN DE VELDE, C.J.H; UMETANI, N; HEER, P; PUTTER, H; VAN HOESEL, A.Q; MEIJER, G.A; VAN GRIEKEN, N.C; KUPPEN, P.J.K;

BILCHIK, A.J; TOLLENAAR, R.A.E.M; HOON, D.S.B. Epigenetic Silencing of Cyclooxygenase-2 Affects Clinical Outcome in Gastric Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 25:4887-4894.2007.

MALATY, H.M. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 21: 205-214. 2007.

MANTOVANI, R. A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. **Nucleic Acids Research**, 26: 1135–1143. 1998.

MAO, X.Y; WANG, X-G; LV, X-J; XU, L; HAN, C-B. COX-2 expression in gastric cancer and its relationship with angiogenesis using tissue microarray. **World Journal of Gastroenterology**, 13(25): 3466-3471. 2007.

MARUTA, F; SUGIYAMA, A; ISHIDA, K; IKENO, T; MURAKAMI, M; KAWASAKI, S; OTA, H; TATEMATSU, M; KATSUYAMA, T. Timing of N-methyl-N-nitrosourea administration affects gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils infected with Helicobacter pylori. **Cancer Letters** 160: 99±105. 2000.

MASFERRER, J.L.; LEAHY, K.M.; KOKI, A.T.; ZWEIFEL, B.S.; SETTLE, S.L.; WOERNER, B.M.; EDWARDS, D.A.; FLICKINGER, A.G.; MOORE, R.J.; SEIBERT, K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Cancer Research**, 60: 1306-1311. 2000.

MBONIE, U.R; SONG, I. Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression. **Bmb Reports**, 42: 552 – 560. 2009.

MELNICK, R.L.; THAYER, K.A.; BUCHER, J.R. Conflicting Views on Chemical Carcinogenesis Arising from the Design and Evaluation of Rodent Carcinogenicity Studies. **Environmental Health Perspectives**, 116(1): 130-135. 2008.

MENENDEZ, D; INGA, A; JORDAN, J.J; RESNICK, M.A. Changing the p53 master regulatory network: ELEMENTary, my dear Mr Watson. **Oncogene**, 26: 2191–2201. 2007.

MINGHETTI, L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory and Degenerative Brain Diseases. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 63: 901-910. 2004.

MOGNETTI, B.; DI CARLO, F.; BERTA, G.N. Animal models in oral cancer research. **Oral Oncology**, 42: 448–460. 2006.

MRENA, J.; WIKSTEN, J. P.; KOKKOLA, A.; NORDLING, S.; RISTIMÄKI, A.; HAGLUND, C. COX-2 is associated with proliferation and apoptosis markers and serves as an independent prognostic factor in gastric cancer. **Tumor Biology**, 31: 1–7. 2010.

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

MURRELL, A.; RAKYAN, V. K.; BECK, S. From genome to epigenome. **Human Molecular Genetics**, 14: R3-R10. 2005.

NAUMANN, M. Host cell signalling in *Helicobacter pylori* infection. **International Journal of Medical Microbiology**, 291: 299–305. 2001.

NEGRINI, S; GORGOULIS, V.G.; HALAZONETIS, T.D. Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. **Molecular Cell Biology**, 11: 220 -228. 2010.

NOBILI, S.; BRUNO, L.; LANDINI, I. Genomic and genetic alterations influence the progression of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, 17: 290–299. 2011.

OLIVEIRA, A.M.; ROSS, J.S.; FLETCHER, J.A. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. **American Journal of Clinical Pathology**, 12: 16- 28. 2005.

OLIVEIRA, C.; FERREIRA, P.; NABAIS, S.; CAMPOS, L.; FERREIRA, A.; CIRNES, L; ALVES, C.C.; VEIGA, I.; FRAGOSO, M.; REGATEIRO, F.; DIAS, MOREIRA, L.M.; SURIANO, H.; MACHADO, G.; LOPES, J.C.; CASTEDO, C.;

CARNEIRO, S.; SERUCA, F.R. E-Cadherin (CDH1) and p53 rather than SMAD4 and Caspase-10 germline mutations contribute to genetic predisposition in Portuguese gastric cancer patients. **European Journal of Cancer**. 40: 1897-1903. 2004.

PANDEY, R.; MISRA, V.; MISRA, S.P.; DWIVEDI, M.; KUMAR, A.; TIWARI, B.K. Helicobacter Pylori and Gastric Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 11: 583-588. 2010.

PARK, B.; SHIN, A.; PARK, S.K.; KO, K.; MA, S.H.; LEE, E.; GWACK, J.; JUNG, E.; CHO, L.; YANG, J.J.; YOO, K. Ecological Study for Refrigerator Use, Salt, Vegetable, and Fruit Intakes, and Gastric Cancer. **Cancer Causes Control**, 22:1497–1502. 2011.

PARK, W.S. Molecular Pathogenesis of Gastric Cancer. **Journal of the Korean Medical Association**, 53: 270 – 282. 2010.

PAZ, M.F.; FRAGA, M.F.; AVILA, S.; GUO, M.; POLLAN, M.; HERMAN, J. G.; ESTELLER, M. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. **Cancer Research**, 63: 1114-1121. 2003.

PAZDUR, R.; HOSKINS, W.J.; CAIA, L.R.; WAGMAN, L.D. Cancer management: a multidisciplinary approach. Medical, surgical and radiation oncology. **CMP United Business Media**, 9th edition, 259-271. 2005.

PAZOS, P; LANARI, C; ELIZALDE, P; MONTECCHIA, F; CHARREAU, E.H; MOLINOLO, A.A. Promoter effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) in N-methyl-N-nitrosourea (MNU) induced mammary tumors in BALB/c mice. **Carcinogenesis**, vol.19 no.3 pp.529–531. 1998.

PEI, Y; MOORE, C.E; WANG, J; TEWARI, A.K; EROSHKIN, A; CHO, Y-J; WITT, H; KORSHUNOV, A; READ, T-A; SUN, J.L; SCHMITT, E.M; MILLER, C.R; BUCKLEY, A.F; McLENDON, R.E; WESTBROOK, T.F; NORTHCOTT, P.A; TAYLOR, M.D; PIFSTER, S.M; FEBOO, P.G; WECHSLER-REYA, R.J. An Animal Model of MYC-Driven Medulloblastoma. **Cancer cell**, 21: 155-167.2012.

PEREIRA, M.A.; KRAMER, P.M.; CONRAN, P.B.; TAO, L. Effect of chloroform on dichloroacetic acid and trichloroacetic acid-induced hypomethylation and expression of

the c myc gene and on their promotion of liver and kidney tumors in mice. **Carcinogenesis**, 9: 1511-1519. 2001.

PIAZUELO, M.; EPPLEIN, M.; CORREA, P. Gastric cancer: an infectious disease. **Infectious Disease Clinics of North America**, 24: 853–869, 2010.

POGRIBNY, I.P.; JAMES, S.J. De novo methylation of the p16 gene in early preneoplastic liver and tumors induced by folate/methyl deficiency in rats. **Cancer Letters**, 187: 69-75. 2002.

POIRIER, L.A. The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction. **Journal of Nutrition**, 132: 2336S-2339S. 2002.

POLSKY, D.; CORDON-CARDO, C. Oncogenes in Melanoma. **Oncogene**, 22: 3087-3091.2003.

PUENTE, X.S; VELASCO, G; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A; BERTRANPETIT, J; KING, M.C; LÓPEZ-OTÍN, C. Comparative analysis of cancer genes in the human and chimpanzee genomes. **BMC Genomics**, 7: 15. 2006.

RATOVITSKI, E.A. LKB1/PEA3/ Δ Np63 pathway regulates PTGS-2 (COX-2) transcription in lung cancer cells upon cigarette smoke exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 3:5, 317-324. 2010.

REDDY, M. C.; VASQUEZ, K. M. Repair of genome destabilizing lesions. **Radiation Research**, 164: 345-356. 2005.

REGALO, G; CANEDO, P; SURIANO, G; RESENDE, C; CAMPOS, M.L; OLIVEIRA, M.J; FIGUEIREDO, C; RODRIGUES-PEREIRA, P; BLIN, N; SERUCA, R; CARNEIRO, F; MACHADO, J.C. C/EBPbeta is over-expressed in gastric carcinogenesis and is associated with COX-2 expression. **Journal of Pathology**, 210: 398–404. 2006.

RESENDE, C.; THIEL, A.; MACHADO J.C.; RISTIMAKI, A. **Gastric Cancer: Basic Aspects**. Blackwell Publishing Ltd, 16: 38–44. 2011. ¶

RIOS, A.F.L. Caracterização in silico e análise epigenética em bovinos produzidos in vivo e por transferência nuclear da região homóloga à 11p15.5 envolvida com a síndrome de beckwith-wiedemann em humanos. Tese de Doutorado–Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2007.

ROHDE, C; ZAHNG, Y; REINHARDT, R; JELTSCH, A. BISMA--fast and accurate bisulfite sequencing data analysis of individual clones from unique and repetitive sequences. **BMC Bioinformatics**, 11: 230. 2010

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of National Academi of Sciences**, 74: 5463-5467. 1977.

SANTOS, R.C.V; RICO, M.A.P; BARTRONS, R; PUJOL, F.V; ROSA, J.L; OLIVEIRA, J.R. The transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in zymosan-activated macrophages is dependent on NF-kappa B, C/EBP, AP-1, and CRE sites. **Inflammation**, 34: 653-658. 2011.

SAUKKONEN, K; RINTAHAKA, JOHANNA;ANNA SIVULA; CHRISTIANNE J. BUSKENS; BASTIAAN P. VAN REES; MARIE-CHRISTINE RIO; C.A.J HAGLUND; J. JAN B. VAN LANSCHOT; G. JOHAN A. OFFERHAUS; ARI RISTIMAKI. Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, 111: 915-925. 2003

SCARANO, M.I.; STRAZZULLO, M.; MATARAZZO, M. R.; D'ESPOSITO, M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, 204: 21-35. 2005.

SCHILDBERG, C; ABBAS, M; MERKEL, S; AGAIMY, A; DIMMLER, A; SCHLABRAKOWSKI, A; CRONER, R; LEUPOLT, J; HOHENBERGER, W; ALLGAYER, H. COX-2, TFF1, and Src define better prognosis in young patients with gastric cancer. **Journal of Surgical Oncology**, 108: 1–5. 2013.

SCHUG, J., OVERTON, G.C. TESS: **Transcription Element Search Software**. WWW Technical Report CBIL-TR-1997-1001-v0.0, Computational Biology and Informatics Laboratory. School of Medicine, University of Pennsylvania. 1997

SHANMUGANATHAN, R; BASHEER, N.B; AMIRTHALINGAM, L; MUTHUKUMAR, H; KALIAPERUMAL, R; SHANMUGAM, K. Conventional and Nanotechniques for DNA Methylation Profiling. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Vol. 15, No. 1. 2013.

SHARMA S. KELLY, T.K; JONES P.A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, 1: 27 – 36. 2010.

SHEN, H.; LAIRD, P. W. Interplay between the cancer genome and epigenome. **Cell**, 153: 38–55. 2013.

SHIBATA, N.; WATARI, J.; FUJIYA, M.; TANNO, S.; SAIITOH, Y.; KOHGO, Y. Cell Kinetics and Genetic Instabilities in Differentiated Type Early Gastric Cancers With Different Mucin Phenotype. **Human Pathology**, 34:32 – 40. 2003.

SHIKATA, K.; KIYOHARA, Y.; KUBO, M.; YONEMOTO, K.; NINOMIYA, T.; SHIROTA, T.; TANIZAKI, Y.; DOI, Y.; TANAKA, K.; OISHI, Y.; MATSUMOTO, T.; IIDA, M. A Prospective Study of Dietary Salt Intake and Gastric Cancer Incidence in a Defined Japanese Population: the Hisayama Study. **International Journal of Cancer**, 119: 196-201. 2006.

SHIN V.Y.; LIU, E.S.L.; YE, Y-N.; KOO, M.W.L.; CHU, K-M.; CHO C-H. A mechanistic study of cigarette smoke and cyclooxygenase-2 on proliferation of gastric cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 195:103-12. 2004.

SHIRVANI, V.N.; OUATU-LASCAR, R.; KAUR, B.S.; OMARY, M.B.; TRIADAFILOPOULOS, G. Cyclooxygenase 2 Expression in Barrett's Esophagus and Adenocarcinoma: Ex vivo Induction by Bile Salts and Acid Exposure. **Gastroenterology**, 118: 487- 496. 2000.

SMITH, G.M.; HOLD, G.L.; TAHARA, E.; EL-OMAR, E.M. Cellular and Molecular Aspects of Gastric Cancer. **World Journal of Gastroenterology**, 12: 2979-2990. 2006.

SOARES-MAIA, R; FAUSTINO-ROCHA, A.I; TEIXEIRA-GUEDES, C.I; PINHO-OLIVEIRA, J; TALHADA, D; REMA, A; FARIA, F; GINJA, M; FERREIRA, R; GIL DA COSTA, R.M; OLIVEIRA, P.A; LOPES, C. MNU-Induced Rat Mammary

Carcinomas: Immunohistology and Estrogen Receptor Expression. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, 32(2):157-163. 2013.

SONN, G.A.; ARONSON, W.; LITWIN, M.S. Impact of diet on prostate cancer: a review. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, 8: 304–310. 2005.

STEELE, V.; LUBET, R. The use of animal models for cancer chemoprevention drug development. **Seminars in Oncology**, 37: 327–338. 2010.

STEMMERMANN, G.N.; NOMURA, A.M.; KOLONEL, L.N.; GOODMAN, M.T.; WILKENS, L.R. Gastric carcinoma: pathology findings in a multiethnic population. **Cancer**, 95: 744 – 750. 2002.

STOCK, M; OTTO, F. Gene Deregulation in Gastric Cancer. **Gene**, 360: 1 – 19. 2005.

STRATHDEE, G.; BROWN, R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 4: 1-17. 2002.

SUBBARAMAIAH, K; ALTORKI, N; CHUNG, W.J; MESTRE, J.R. ¶; SAMPAT, A; DANNENBERG, A.J. Inhibition of Cyclooxygenase-2 Gene Expression by p53. **The Journal Of Biological Chemistry**, 16: 10911–10915, 1999.

SUGANO, K. Premalignant conditions of gastric cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 28: 906–911. 2013.

SUTANDYO, N. Nutritional Carcinogenesis. **Acta Medica Indonesiana**, 42: 36- 42. 2010.

SUTHERLAND, J. E.; COSTA, M. Epigenetics and the environment. **Annals of New York Academy Science**, 983: 151-160. 2003.

SUZUKI, M. M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature Reviews Genetics**, 9: 465–476. 2008.

SUZUKI, R.; SHIOTA, S.; YAMAOKA, Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. **Infection, Genetics and Evolution**, 12: 203–213. 2012.

TAKAYAMA, S.; THORGEIRSSON, U.P.; ADAMSON, R.H. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates. **Proceeding of the Japan Academy**, 84: 176-187. 2008.

TARSO, L.; MEYER, F.S.; CIOATO, M.G.; MEURER, L.; SCHIRMER, C.C. O modelo experimental de carcinogênese gástrica induzido por n-methyl-n-nitrosourea em ratos F344 e camundongos C3H é valido para os ratos Wistar? **ABCD Arq Bras Cir Dig**, 24: 55-58. 2011.

TATEMATSU, M.; TAKAHASHI, M.; FUKUSHIMA, S.; HANANOUCHE, M.; SHIRAI, T. Effects in Rats of Sodium Chloride on Experimental Gastric Cancers Induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline-1-oxide. **Journal of National Cancer Institute**, 55: 101-106. 1975.

TATEMATSU, M., ICHINOSE, M., MIKI, K., HASEGAWA, R., KATO, T., ITO, N., Gastric and intestinal phenotypic expression of human stomach cancers as revealed by pepsinogen immunohistochemistry and mucin histochemistry. **Acta Pathologica Japonica**, 40: 494 – 504. 1990.

TATEMATSU, M., TSUKAMOTO, T., INADA, K. Stem cells and gastric cancer: role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia. **Cancer Science**, 94: 135 – 141. 2003.

TATSUGUCHI, A; MATSUI, K; SHINJI, Y; GUDIS, K; TSUKUI, T; KISHIDA, T; FUKUDA, Y; SUGISAKI, Y; TOKUNAGA, A; TAJIRI, T; SAKAMOTO, C. Cyclooxygenase-2 expression correlates with angiogenesis and apoptosis in gastric cancer tissue. **Human Pathology**, 35:488-495. 2004.

TORAÑO, E. G; PETRUS, S; FERNANDEZ, A.F; FRAGA, M.F. Global DNA hypomethylation in cancer: review of validated methods and clinical significance. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 50: 1733–1742. 2012.

TSUBARA, A; LAI, Y-C; MIKI, H; SASAKI, T; UEHARA, N; YURI, T; YOSHIZAWA, K. Animal Models of N-Methyl-N-nitrosourea-induced Mammary Cancer and Retinal Degeneration with Special Emphasis on Therapeutic Trials. **in vivo**, 25: 11-22. 2011.

TSUGANE, S.; SASAZUKI, S. Diet and the Risk of Gastric Cancer: Review of Epidemiological Evidence. **Gastric Cancer**, 10:75–83. 2007.

TSUKAMOTO, T; MIZOSHITA, T; TATEMATSU, M. Animal Models of Stomach Carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, 35:636–648. 2007.

TUREK-PLEWA, J.; JAGODZINSKI, P. P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. **Cellular and Molecular Biology Letters**, 10: 631-647. 2005.

VARIS, A.; ZAIKA, A.; PUOLAKKAINEN, P. Coamplified and Overexpressed Genes at ERBB2 locus in Gastric Cancer. **International Journal of Cancer**, 109:548–553. 2004.

VARMUS, H.E. Molecular biology: Reverse transcriptase rides again. **Nature**, 314: 583-584. 1985.

VAUHKONEN, M.; VAUHKONEN, H.; SIPPONEN, P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. **Best Practice & Research. Clinical gastroenterology**, 20: 651–674. 2006.

WANG, B.C; GUO, C-Q; SUN, C; SUN, Q-L; LIU, G-Y; LI, D.G. Mechanism and clinical significance of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, 11(21):3240-3244. 2005.

WANG, B; XIAO, Z; KO, H.L; REN, E.C. The p53 response element and transcriptional repression. **Cell Cycle** 9:5, 870-879. 2010.

WANG, B; XIAO, Z; REN, E.C. Redefining the p53 response element. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 34: 14373–14378. 2009.

WANG, M.T.; HONN, K.V.; NIE, D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. **Cancer and Metastasis Review**, 26:525–534. 2007.

WANG, X.; TERRY, P.D.; YAN, H. Review of Salt Consumption and Stomach Cancer Risk: Epidemiological and Biological Evidence. **World Journal of Gastroenterology**, 15: 2204-2213. 2009.

WATERLAND, R.A. Assessing the effects of high methionine intake on dna methylation. **Journal of Nutrition**, 136: 1706S-1710S. 2006.

WHANG, Z; WEI, G-H; LIU, D-P; LIANG, C-C. Unravelling the world of cis-regulatory elements. **Medical & biological engineering & computing**, 45:709–718. (2007).

WU, C.Y.; WANG, C.J.; TSENG, C.C.; CHEN, H.P.; WU, M.S.; LIN, J.T.; INOUE, H.; CHEN G.H. Helicobacter pylori promote gastric cancer cells invasion through a NF- κ B and COX-2 mediated pathway. **World Journal of Gastroenterology**, 11: 3197-3203. 2005.

WU, K.K. Transcription-based COX-2inhibition:A therapeutic strategy. **Thrombosis and Haemostasis**, 96: 417–22. 2006.

XIA, H-J; CHEN, C-S. Progress of non-human primate animal models of cancers. **Zoological Research**, 32(1): 70-80. 2011.

YAGHOOBI, M.; BIJARCHI, R.; NAROD, S.A. Family History and the Risk of Gastric Cancer. **British Journal of Cancer**, 102: 237-242, 2010.

YAKIREVICH, E.; RESNICK, M. B. Pathology of gastric cancer and its precursor lesions. **Gastroenterology Clinics of North America**, 42: 261–284. 2013.

YAKIREVICH, E; RESNICK, M.B. Pathology of gastric cancer and its precursor lesions. **Gastroenterology Clinics of North America**, 42(2):261-84. 2013.

YAMAGATA, R; SHIMOYAMA, T; FUKUDA, S; YOSHIMURA, T; TANAKA, MASANORI; MUNAKATA, A. Cyclooxygenase-2 expression is increased in early intestinaltype gastric cancer and gastric mucosa with intestinal metaplasia. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, 14:359-363. 2002.

YAMASHITA, K.; SAKURAMOTO, S.; WATANABE, S. “Genomic and epigenetic profiles of gastric cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. **Surgery Today**, 41: 24–38. 2011.

YAN, W. F. et al. Cyclooxygenase-2 polymorphisms were associated with the risk of gastric cancer: evidence from a meta-analysis based on case-control studies. **Tumour Biology**, 18 jun. 2013. In press.

YÁÑEZ-CUNA, J.O; KVON, E.Z; STARK, A. Deciphering the transcriptional cis-regulatory code. **Research Institute of Molecular Pathology**, vol 29, No 1. 2013.

YANG, F; BLEICH, D. Transcriptional Regulation of Cyclooxygenase-2 Gene in Pancreatic β -Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 34: 35403–35411. 2004.

YANG, X; HOU, F; TAYLOR, L; POLGAR, P. Characterization of human cyclooxygenase 2 gene promoter localization of a TGF- β 3 response element. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1350: 287-292. 1997.

YANG, Y.; LI, C.C.; WEISSMAN, A.M. Regulating the p53 system through ubiquitination. **Oncogene**, 23: 2096-2106. 2004.

YASUI, W.; OUE, N.; AUNG, P.P.; MATSUMURA, S.; SHUTOH, M.; NAKAYAMA, H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. **Gastric Cancer**, 8: 86–94. 2005.

YEANG. C. H.; MCCORMICK, F.; LEVINE, A. Combinatorial patterns of somatic gene mutations in cancer. **The FASEB Journal**, 22: 2605-2622. 2008.

YOSHIZAWA, K; EMOTO, Y; KINOSHITA, Y; YURI, T; TSUBURA, A. N-methyl-N-nitrosourea-induced cerebellar hypoplasia in rats: Effect of arachidonic acid supplementation during the gestational, lactational and post-weaning periods. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 6: 627–634. 2013

YOSHIZAWA, K; KINOSHITA, Y; EMOTO, Y; KIMURA, A; UEHARA, N; YURI, T; SHIKATA, N; TSUBURA, A. N-Methyl-N-nitrosourea-induced Renal Tumors in Rats: Immunohistochemical Comparison to Human Wilms Tumors. **Journal of Toxicology Pathology**, 26: 141–148. 2013.

YU, J; LEUNG, W.K; LEE, T.L; TSE, P.C; TO, K.F; SUNG, J.J. Promoter hypermethylation of cyclooxygenase-2 in gastric carcinoma. **International Journal of Oncology**, 22: 1025–1031. 2003.

YU, X.Q.; O'CONNELL, D.L.; GIBBERD, R.W.; ARMSTRONG, B.K. Assessing the impact of socio-economic status on cancer survival in New South Wales, Australia 1996-2001. **Cancer Causes Control**, 19: 1383-1390. 2008.

YUAN, J.M.; ROSS, R.K.; GAO, Y.T.; QU, Y.H.; CHU, X.D.; YU, M.C. Prediagnostic levels of serum micronutrients in relation to risk of gastric cancer in Shanghai, China. **Cancer Epidemiol Biomarkers**, 13: 1772-1780. 2004.

ZAGOURI, F; PAPADIMITRIOU, C.A; DIMOPOULOS, M-A; PECTASIDES, D. Molecularly targeted therapies in unresectable-metastatic gastric cancer: a systematic review. **Cancer Treatment Reviews**, 37: 599–610. 2011.

ZEISBERG, E. M.; ZEISBERG, M. The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. **The Journal of Pathology**, 229: 264–273. 2013.

ZHANG, Y; BAILEY, V; PULEO, C.M; EASWARAN, H; GRIFFITHS, E; HERMAN, J.G; BAYLIN, S.B; WANG, T-H. DNA methylation analysis on a droplet-in-oil PCR array. **Lab Chip**, 9, 1059-1064. 2009.

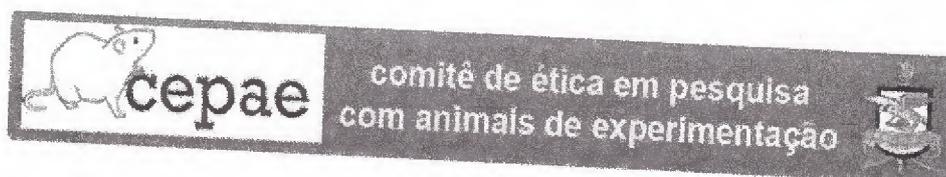
ZHAO, C.; BU, X. Promoter methylation of tumor-related genes in gastric carcinogenesis. **Histology and Histopathology**, 27: 1271–1282. 2012.

ZHENG, L.; WANG, L.; AJANI, J.; XIE, K. Molecular basis of gastric cancer development and progression. **Gastric Cancer**, 7: 61–77. 2004.

ZHOU, X.; HE, Y.; SONG, W.; PENG, J.; ZHANG, C.; LI, W.; WU, H. **World Journal of Gastroenterology**, 15: 2644-2650. 2009.

ZULLO, A. Gastric Cancer, Helicobacter pylori Infection and Other Risk Factors. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, 15: 342-347. 2010.

ANEXO 1



PARECER MED-002-13

Projeto: MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER GÁSTRICO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS

Coordenador: Prof. Dr. Rommel Rodrigues Burbano

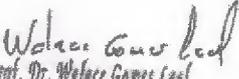
Área Temática: Oncologia

Vigência: 12/2011 a 12/2014

Nº no CEPAE-UFPA: MED-002-13

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de janeiro de 2011


Prof. Dr. Welice Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFPA